



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO EL HOMBRE Y SU AMBIENTE
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

INFORME FINAL DE SERVICIO SOCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGO

**Uso de un sistema lítico para facilitar la recuperación del
bioplástico polihidroxitirato (PHB) producido por
*Azotobacter vinelandii***

QUE PRESENTA EL ALUMNO (A)

Fernando Loyola Martínez

Matrícula: 2142035516

ASESORES:

Dr. Daniel Genaro Segura Gonzáles - Instituto de Biotecnología
UNAM

Dra. María del Carmen Monroy Dosta - Universidad Autónoma
Metropolitana-Xochimilco (28906)

Ciudad de México

Fecha: 18-10-2019

Resumen

Con el fin de crear un sistema de autólisis en *Azotobacter vinelandii*, una bacteria Gram-negativa productora natural de polihidroxi-butirato, se siguieron tres diferentes estrategias en esta investigación con el fin de obtener genes de bacteriófagos que codifican proteínas involucradas en la lisis celular: 1) se sometieron a condiciones de estrés (luz UV y altas temperaturas) células de *A. vinelandii* con el fin de promover el ciclo lítico de un profago inserto en el genoma de esta bacteria; 2) se realizaron ensayos para aislar bacteriófagos directamente del suelo o de intestinos humanos que tuvieran la capacidad de infectar células de *A. vinelandii*; 3) se amplificaron dos genes de *Pseudomonas aeruginosa* (PA0614 y PA0629), cuyo origen se relaciona con bacteriófagos, que están implicados en lisis celular de esta bacteria; con ayuda de los plásmidos pUC19 y pUMA se logró por recombinación homóloga insertar los genes obtenidos en la tercera estrategia. Los genes se colocaron bajo regulación de dos diferentes promotores, uno constitutivo y otro inducible por sacarosa. Se obtuvieron tres transformaciones de *A. vinelandii* denominadas: lysR2, PA1429 y LR2614. Se realizaron cinéticas de crecimiento de las tres transformaciones, midiendo la densidad óptica, para observar cambios en el crecimiento al inducir la expresión de los genes, además se visualizaron al microscopio las células en diferentes tiempos para observar cambios en la forma de las células.

Palabras clave:

Polihidroxi-butirato, bacteriófagos, *Azotobacter vinelandii*, lisis.

Indice

1. Introducción.....	1
2. Revisión de la literatura.....	3
2.1. Generalidades de los polihidroxicanoatos.....	3
2.1.1. Los PHA como sustitutos de los plásticos derivados del petróleo.....	3
2.1.2. El polihidroxitirato (PHB).....	4
2.2. <i>Azotobacter vinelandii</i> , bacteria productora de PHB.....	5
2.3. Procesos de recuperación de los PHA´s.....	5
2.4. Sistemas líticos como alternativas para mejorar la recuperación de los PHA´s.....	7
2.4.1. El sistema de lisis holina-endolisina, un ejemplo de un proceso eficiente para lisar células bacterianas.....	7
2.5. Antecedentes en el desarrollo de bacterias autolíticas.....	8
3. Objetivos.....	10
3.1. Objetivo General.....	10
3.2. Objetivos específicos.....	10
4. Metodología.....	11
4.1. Inducción del profago de <i>A. vinelandii</i> OP por agentes estresantes.....	11
4.2. Método de doble agar con bacteriófagos aislados de intestinos de niños sanos y enfermos.....	11
4.3. Aislamiento de bacteriófagos del suelo.....	12
4.4. Clonación de genes líticos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1.....	13
4.4.1. Cepas bacterianas y plásmidos utilizados.....	13
4.4.2. Oligonucleótidos utilizados.....	14
4.4.3. Amplificación de los genes PA0614 y PA0629 de <i>P. aeruginosa</i> PAO1.....	14
4.4.4. Clonación de los genes PA0614 y PA0629 en el plásmido pJET y transformación en <i>E. coli</i> TOP10.....	15
4.4.5. Secuenciación de genes PA0614 y PA0629 clonados en pJET.....	15
4.4.6. Clonación de los genes PA0614 y PA0629 en vectores de interés.....	15
4.4.7. Transformación de células de <i>A. vinelandii</i> OP con los plásmidos pUMATc::lysGmR2 y pUC19::holina-lisina.....	17
4.4.8. PCR de transformaciones de <i>Azotobacter vinelandii</i> para observar confirmar genotipo.....	18
4.4.9. Curvas de crecimiento de las cepas lysR2, LR2614 y PA1429...19	
5. Resultados.....	20
5.1. Inducción del profago de <i>A. vinelandii</i> OP.....	20
5.2. Búsqueda de posibles bacteriófagos líticos que infecten a <i>A.</i> <i>vinelandii</i> a partir del suelo y de intestinos humanos.....	20
5.3. Amplificación de genes PA0614 y PA0629, clonación en pJET y secuenciación.....	20

5.4.	Clonación de los genes PA0614 y PA0629 en vectores de interés.....	22
5.5.	Transformación de <i>A. vinelandii</i> OP.....	26
5.6.	Crecimiento de las cepas que expresan los genes PA0614 y PA0629.....	29
6.	Discusión.....	32
7.	Conclusiones.....	35
8.	Referencias.....	36
9.	Anexos.....	40

1. Introducción.

El polihidroxibutirato (PHB) es el miembro más común de la familia de los polihidroxialcanoatos. Es acumulado intracelularmente como material de energía y carbono por un amplio número de bacterias (Peña *et al.*, 2014). En la industria química, el PHB ha sido usado como sustituto de plásticos tradicionales, como el polietileno y el polipropileno. Recientemente, con base en sus propiedades de biocompatibilidad y biodegradación, nuevas aplicaciones atractivas para el PHB han sido propuestas en el campo médico y farmacéutico, donde su composición química y pureza son críticos (Williams & Martin, 2005). En tales aplicaciones, la masa molecular del PHB es una característica muy importante a considerar, debido a que determina sus propiedades mecánicas y por lo tanto, su aplicación final (Peña *et al.*, 2014).

El proceso de recuperación de PHAs a partir de las células que han producido y acumulado el polímero a través de la fermentación, incluye procesos como la centrifugación, la filtración, y procesos mecánicos como presión hidrodinámica para inducir lisis celular. En *Cupriavidus necator*, el método más utilizado para extraer el PHB a partir de la biomasa involucra el uso de solventes (Lee, 1995; Martínez *et al.*, 2011). También se utiliza un proceso que incluye la digestión enzimática y el lavado con un tensioactivo aniónico. Sin embargo a una escala industrial, estos métodos requieren grandes cantidades de reactivos químicos y/o enzimas, lo cual se presenta como un obstáculo para reducir el costo de recuperación (Hori *et al.*, 2002). Además, otra desventaja de usar solventes o detergentes es que se requieren varios pasos de lavado para poder deshacerse de los residuos de esos reactivos, lo que provoca una reducción del peso molecular del polímero. Así mismo, los procesos mecánicos para lisar células también afectan las propiedades de los PHAs (Resch *et al.*, 1998; Martínez *et al.*, 2011).

En la actualidad, la investigación gira en torno a desarrollar eficientes productores de PHAs, incrementando la concentración intracelular de los mismos, y también en optimizar los procesos de fermentación. Además, debido a que los PHAs son acumulados en el citoplasma, el desarrollo de un eficiente proceso de recuperación es indispensable para reducir el costo total de producción de estos bioplásticos biodegradables. Teniendo esto en consideración, el uso de sistemas líticos de bacteriófagos se ha propuesto como una opción para mejorar los procedimientos para la liberación- recuperación en bacterias productoras de PHAs (Díaz-Barrera & Soto, 2010; Hori *et al.*, 2002; Martínez *et al.*, 2011).

Azotobacter vinelandii es una bacteria gram-negativa, organotrófica y fijadora de nitrógeno (Segura *et al.*, 2014), productora natural de PHB que puede ser cultivada en diversos sustratos, como melaza de caña, de remolacha, peptona de pescado y desechos de la crianza de cerdos. Es capaz de almacenar una gran cantidad de polímero y dependiendo de la fuente de carbono suministrada puede

sintetizar el copolímero PHBV (Chen & Page, 1994; Chen & Page, 1997). Varias cepas de *A. vinelandii* inician la producción del PHB en fase de crecimiento exponencial tardía y lo consumen en la fase estacionaria. En algunas cepas, hay una relación entre la producción de PHB y la formación de quistes resistentes a la desecación (Noar & Bruno-Bárcena, 2018). Actualmente, no hay estudios relacionados con el diseño un proceso de liberación-recuperación del PHB en *A. vinelandii* mediado por un sistema lítico de un fago. A simple vista se presentan tres alternativas para conseguirlo; 1) a través del estudio del sistema lítico de bacteriófagos aislados del suelo en esta bacteria (Duff & Wyss, 1961; Hegazi & Leitgeb, 1976); 2) en el genoma de *A. vinelandii* DJ (NC_012560) se han secuenciado genes de un bacteriófago tipo P2, lo que significa que está inserto como un profago y su inducción al ciclo lítico involucraría la lisis celular; y 3) en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* se han identificado genes similares a aquellos involucrados en la lisis celular. Estos genes están agrupados en un cassette junto con unas bacteriocinas y relacionadas evolutivamente con bacteriófagos (Nakayama *et al*, 2000). El papel de estos genes es ayudar a exportar al exterior de la célula las bacteriocinas y otros componentes importantes para la formación de biofilms (Turnbull, *etal.* 2016). La clonación de estos genes en *A. vinelandii* controlando su expresión es una opción a considerar. El conocimiento y utilización de un sistema de este tipo puede representar una alternativa eficiente para desarrollar un proceso de liberación-recuperación del PHB en esta bacteria, y así contribuir a disminuir los costos de producción del polímero.

2. Revisión de la literatura

2.1. Generalidades de los polihidroxialcanoatos

Los polihidroxialcanoatos (PHA) son polímeros de ácidos hidroxialcanoicos sintetizados por diversas bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y arqueas. Los PHA juegan un papel como material de reserva de energía y nutrientes y son acumulados como polímeros sólidos, móviles y amorfos en forma de gránulos que se alojan en el citoplasma microbiano (Madison & Huisman, 1999; Gonzáles *et al.* 2013). En relación con las condiciones bajo las cuales ocurre la síntesis de los PHA, en la mayoría de los casos tiene lugar en respuesta a una limitación de N, P, S, Mg u O, aunado a la presencia de un exceso de fuente de carbono (Reddy *et al.* 2003).

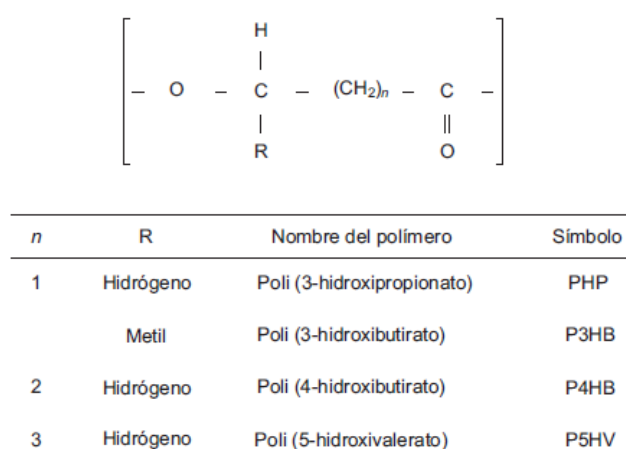


Figura 1. Estructura general de los PHA, y ejemplos de su nomenclatura y símbolo según la longitud y posición de la cadena lateral (Tomado de Lee, 1995).

2.1.1. Los PHA como sustitutos de los plásticos derivados del petróleo

Una vez extraídos de la célula, los PHA presentan propiedades físicas similares a plásticos derivados del petróleo, como el polipropileno y polietileno, por lo que pueden utilizarse como plásticos. El conocimiento para la utilización de estos polímeros como materiales biodegradables se tiene desde la década de 1920, y a partir de la década de 1980 han sido estudiados intensivamente y actualmente siguen siendo un tema de investigación importante, sobre todo como sustitutos de los plásticos de origen petroquímico, ya que los PHA tienen la ventaja de que son completamente biodegradables y se producen a partir de fuentes de carbono renovables. También tienen una aplicación importante como materiales biocompatibles en el área biomédica y farmacéutica (Madison & Huisman, 1999; Gonzáles García *et al.* 2013).

La habilidad para degradar PHA es amplia entre bacterias y hongos gracias a enzimas depolimerasas extracelulares específicas (PHA-depolimerasas) (Jendrosseck & Handrick, 2002). Debido a los altos costos de producción de los

PHA en comparación a los plásticos derivados de la industria petroquímica se mantuvieron subutilizados hasta años recientes. A pesar de ello se reconoce que su uso es ambientalmente sostenible (Gavrilescu & Chisti, 2005), por lo que la investigación relacionada a su producción se ha intensificado.

2.1.2. El polihidroxiбутirato (PHB)

El polihidroxiбутirato (PHB) es el miembro más común de la familia de los polihidroxiácidoalcanoatos. Es acumulado intracelularmente como material de energía y carbono por un amplio número de bacterias, tales como *Cupriavidus necator*, varias especies de *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azotobacter* y además *Escherichia coli* recombinante, expresando los genes para la biosíntesis del PHB de *C. necator* o *Azotobacter vinelandii* (Peña *et al.* 2014). El PHB también es el PHA más estudiado, especialmente en *C. necator*, por lo que la ruta de biosíntesis en este microorganismo a partir de carbohidratos ha sido descrita a detalle. En general el proceso metabólico para su producción comienza a partir de acetil-CoA, en una secuencia de tres reacciones catalizadas por las enzimas 3-cetotiolasa (acetil-CoA acetiltransfera), acetoacetilCoA reductasa (hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa) y la poli(3-hidroxibutirato) sintasa (ver Figura 2) (González *et al.* 2013).

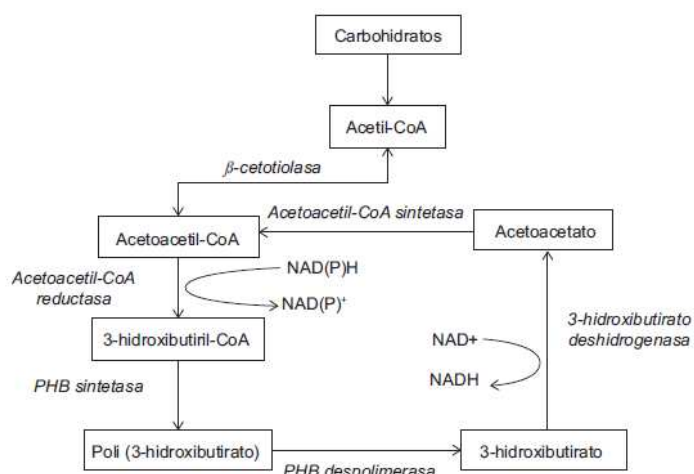


Figura 2. Ruta metabólica para la síntesis y degradación intracelular del PHB a partir de carbohidratos (Tomado de Babel y Steinbüchel, 2001)

En la industria química, el PHB ha sido usado como sustituto de plásticos tradicionales, como el polietileno y el polipropileno. Recientemente, con base en sus propiedades de biocompatibilidad y biodegradabilidad, nuevas aplicaciones atractivas para el PHB han sido propuestas en el campo médico y farmacéutico, donde su composición química y pureza son críticos (Williams & Martin, 2005). En tales aplicaciones, la masa molecular del PHB es una característica muy importante a considerar, debido a que determina sus propiedades mecánicas y por lo tanto, su aplicación final (Peña *et al.* 2014).

2.2. *Azotobacter vinelandii*, bacteria productora de PHB

Azotobacter vinelandii es una bacteria gram-negativa, organotrófica y fijadora de nitrógeno (Segura *et al.* 2014), productora natural de PHB que puede ser cultivada en diversos sustratos, como melaza de caña, de remolacha, peptona de pescado y desechos de la crianza de cerdos. Es capaz de almacenar una gran cantidad de polímero y dependiendo de la fuente de carbono suministrada puede sintetizar el copolímero PHBV (Chen & Page, 1994; Chen & Page, 1997). Posee tres tipos de nitrogenasas con diferentes metales como cofactores centrales. Estas enzimas pueden sustituirse mutuamente para permitir el crecimiento fijando nitrógeno atmosférico cuando algún metal esencial está ausente o cuando hay variaciones en la temperatura (Noar & Bruno-Bárcena, 2018).

A. vinelandii puede acumular hasta un 85-90 % de PHB del peso seco celular, y en algunas cepas hay una relación entre la producción de PHB y la formación de quistes resistentes a la desecación; el PHB es el polímero de almacenamiento durante este proceso en cepas que producen quistes (Stevenson & Socolofsky, 1966; Noar & Bruno-Bárcena, 2018). En condiciones más controladas, la limitación de oxígeno induce la producción de PHB en especies de *Azotobacter*. Las células pueden reasimilar el PHB si la limitación del oxígeno termina. La limitación de hierro también puede inducir la producción de PHB (Senior *et al.* 1972; Jackson & Dawes, 1976; Pyla *et al.* 2009). La fuente de carbono también juega un papel importante: el acetato y el etanol permiten una poca o nula producción de PHB, comparada con la producción a partir de azúcares o butanol (Page & Knosp, 1989; Stevenson & Socolofsky, 1966)

En cultivos en biorreactores, *A. vinelandii* puede producir PHB de ultra alto peso molecular de 4800 kDa durante el crecimiento de fase exponencial, sin embargo, durante la fase estacionaria, su peso molecular decrece a 3600 kDa, coincidiendo además con un incremento en la actividad de PHB depolimerasas (Millán *et al.* 2017). Lo anterior fue solucionado con la inactivación del gen de una PHB depolimerasa (Adaya *et al.* 2018).

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

2.3. Procesos de recuperación de los PHA's

El proceso de recuperación de PHAs a partir de las células que han producido y acumulado el polímero a través del cultivo, incluye operaciones como la centrifugación, la filtración, procesos mecánicos como presión hidrodinámica para inducir lisis celular y extracción con solventes.

En *Ralstonia eutropha*, el método más utilizado para extraer el PHB a partir de la biomasa involucra el uso de solventes. Entre los reactivos empleados en gran cantidad se incluyen el cloroformo, cloruro de metileno, carbonato de propileno, dicloroetano y el hipoclorito (Lee, 1995; Martínez *et al.* 2011). También se utiliza un proceso que incluye la digestión enzimática y el lavado con un tensioactivo aniónico. Sin embargo a una escala industrial, estos métodos requieren grandes cantidades de reactivos químicos y/o enzimas, lo cual se presenta como un obstáculo para reducir el costo de recuperación (Hori *et al.* 2002). Además, otra desventaja de usar solventes o detergentes es que se requieren varios pasos de lavado para poder deshacerse de los residuos de esos reactivos, lo que provoca una reducción del peso molecular del polímero. Así mismo, los procesos mecánicos para lisar células también afectan las propiedades de los PHA (Resch *et al.* 1998; Martínez *et al.* 2011).

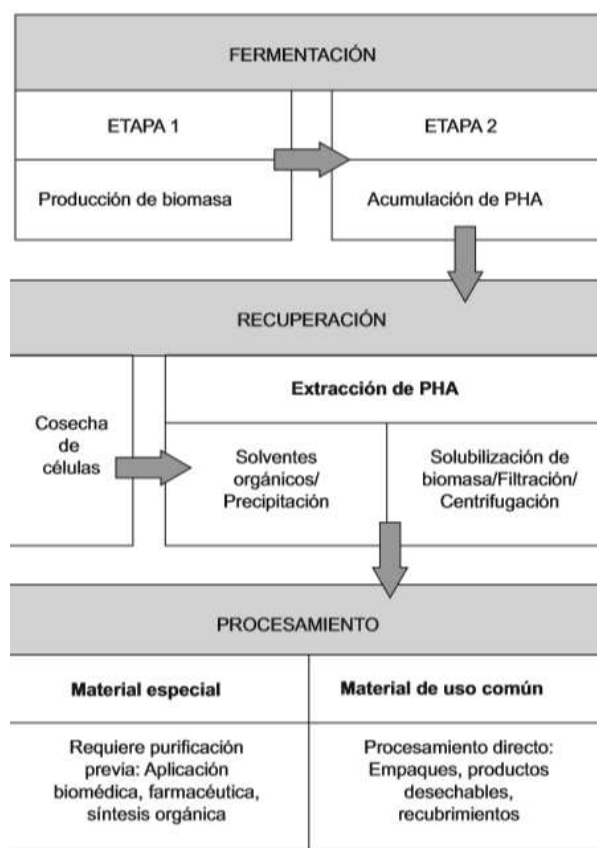


Figura 3. Esquema general de producción de PHA, indicando las características de los procesos de fermentación, recuperación y procesamiento del polímero según su uso final (Tomado y modificado de Gónzales *et al.* 2013).

2.4. Sistemas líticos como alternativas para mejorar la recuperación de los PHA's

En la actualidad, la investigación gira en torno a desarrollar productores de PHA eficientes, incrementando la concentración intracelular de los mismos, y también

en optimizar el crecimiento para alcanzar alta densidad celular. Además, debido a que los PHA son acumulados en el citoplasma, el desarrollo de un proceso de recuperación eficiente es indispensable para reducir el costo total de producción de estos bioplásticos. Teniendo esto en consideración, el uso de sistemas líticos de bacteriófagos se ha propuesto como una buena opción para mejorar la liberación - recuperación del polímero en bacterias productoras de PHA. El uso de bacteriófagos como “bioextractores” para liberar PHA desde las bacterias que los producen se ha probado (Hand *et al.* 2016). Con el mismo objetivo, también se han usado únicamente las enzimas involucradas en la lisis celular, como la holina y la endolisina, construyendo cepas autodestructivas que han mostrado que se puede facilitar la expulsión del polímero al medio extracelular (Díaz-Barrera & Soto, 2010; Hori *et al.* 2002; Martínez *et al.* 2011).

2.4.1. El sistema de lisis holina-endolisina, un ejemplo de un proceso eficiente para lisar células bacterianas.

Un sistema que se ha manejado para construir cepas autolíticas es aquel que consiste en la acción de dos proteínas, una denominada holina, y la otra denominada endolisina. Algunos trabajos ya han evaluado cepas transformadas con los genes que codifican dichas proteínas (Hori *et al.* 2002; Martínez *et al.* 2011). Esta es la forma en cómo actúan en células infectadas por bacteriófagos que tienen este sistema genético: la holina se acumula inofensivamente cerca de la membrana y en un tiempo específico, llamado “triggering”, término que se refiere a la permeabilización de la bicapa, permite a la endolisina escapar desde el citoplasma, llegar a periplasma y atacar el peptidoglicano. El “triggering” ocurre prematuramente si las células infectadas son sometidas a condiciones que causan un repentino decrecimiento en la fuerza protón-motriz. Este tipo de lisis únicamente ocurre en bacterias Gram-negativas (Young, 2013).

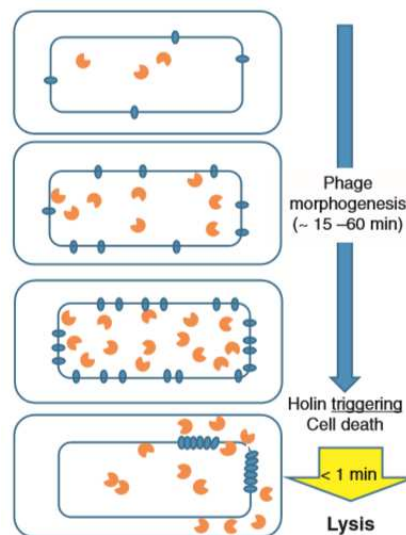


Figura 4. Modelo de lisis (holina-endolisina) en bacterias Gram-negativas (Tomado y modificado de Young, 2013)

2.5. Antecedentes en el desarrollo de bacterias autolíticas

El desarrollo de sistemas autolíticos se ha probado en bacterias productoras de PHAs y en *E. coli* recombinante. Resch y colaboradores (1998) expresaron el gen *E* para lisis del bacteriófago PhiX174 a partir del plásmido pSH2, en una cepa de *E. coli* recombinante que incluía en su genoma el operón *phbCAB* para la síntesis de PHB proveniente de *Ralstonia eutropha*. Con el objetivo de mejorar la liberación del polímero en esa cepa, mediante la lisis-E consigue hacer túneles transmembranales (con un diámetro de 40-200 nm) por los que son expulsados los gránulos de PHB. La fuerza que ayuda a expulsarlos es la diferencia de presión osmótica entre el citoplasma y el medio. En este sistema, todos los demás componentes de la membrana celular permanecen intactos. Las desventajas de este sistema es que se complica inducir la lisis celular en la fase donde se ha alcanzado la máxima concentración de PHB, y no se libera todo el PHB producido (solo un 50-70%), permaneciendo los remanentes en la célula. Por ello, crearon un método modificado de lisis-E para evitar estos problemas. La adición de MgSO₄ ayudó a retrasar la lisis y promover la expresión de la proteína E. Para causar la lisis, posteriormente las células se sometieron a centrifugación y se suspendían en agua o en una solución buffer, consiguiendo así una liberación de PHB de hasta un 90%.

Yu y colaboradores (2000) crearon una cepa de *E. coli* en la cual consiguieron expresar simultáneamente el operón *phbCAB* de *R. eutropha*, el gen *vgb* de la hemoglobina de *Vitreoscilla* y los genes *S*, *R* y *Rz* del fago lambda que infecta a *E. coli*, los cuales son necesarios para la lisis celular. Esta cepa, denominada VG1 (Ptu14), fué capaz de producir grandes cantidades de PHB (poco más de 80%) y autolisarse al alcanzar una gran cantidad de polímero y sin la necesidad de un inductor.

Hori y colaboradores (2002) construyeron una cepa de *B. megaterium* (una bacteria Gram-positiva) con un sistema autolítico que responde al agotamiento de sustrato. Para conseguirlo, transfirieron los genes líticos del fago de *Bacillus amyloliquefaciens* que codifican las proteínas holina y endolsina, a *B. megaterium* con ayuda del vector pX. Los genes fueron integrados en el locus *amyE* del ADN cromosomal de *B. megaterium* por recombinación homóloga. Dicho sistema está bajo control de un sistema de expresión inducible por xilosa, *xyIR-xyIA'*, es decir, la expresión de los genes objetivo era inducida por xilosa pero inhibida por glucosa. Por ello, cuando las células eran cultivadas en un medio con ambos sustratos, al agotarse la glucosa la lisis celular era inducida. El diseño de este sistema logró que la autólisis ocurriera inmediatamente después de que las células alcanzaran la concentración máxima de PHB. Sin embargo, hay una fracción de PHB producido (un tercio del total) que queda asociado con restos celulares a través de interacciones hidrofóbicas, lo que complica la liberación total del PHB.

Otro trabajo al respecto, lo realizaron con *Pseudomonas putida* KT2440. A partir de esta bacteria, Martínez y colaboradores (2011), construyeron una cepa denominada *Pseudomonas putida* BXHL con un sistema autolítico. Al igual que en

el ejemplo anterior, este sistema está basado en la acción coordinada de dos proteínas del bacteriófago neumococal EJ-1, una endolsina (Ejl) y una holina (Ejh), y además en una mutación del gen *tolB*, lo que modifica la membrana externa haciéndola hipersensible a lisis celular. Los genes *ejl* y *ejh* están bajo control del sistema de expresión XylS/*Pm*, con 3-metilbenzoato como molécula inductora. A pesar de que se demostró que este sistema es totalmente funcional en *P. putida*, la proteína Ejl fue menos eficiente que en sus hospederos naturales (pneumococos), atribuyendo los autores esto a requerimientos estructurales específicos. En general, lograron demostrar que el uso del sistema lítico del bacteriófago EJ-1, junto con otras mutaciones que ayudan a tener una bacteria más sensible a la lisis celular, es posible extraer PHAs con una mayor pureza y disminuyendo pasos adicionales para la extracción del polímero.

Por otra parte, Nakayama y colaboradores (2000), estudiaron en *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 algunas bacteriocinas, denominadas piocinas de tipo S y R, con el fin de elucidar la relación entre ellas y los bacteriófagos. Sus resultados demostraron que las piocinas de tipo R están relacionados evolutivamente con el fago P2 y las tipo F con el fago λ . Además estos resultados están apoyados con la identificación de un cassette de genes de lisis similar a aquellos presentes en los bacteriófagos. Turnbull y colaboradores (2016) también llegan a la conclusión de que una endolsina codificada por el mismo gen es esencial para la lisis celular. Ellos estudian como las bacterias exportan algunos productos, como las vesículas de membrana. Describen como es necesario un sistema de lisis celular para exportar estos componentes, y demuestran cómo mutantes que carecen de esta proteína son ineficientes en la producción de estas vesículas y desarrollo de biofilms en *Pseudomonas*.

3. Objetivos.

3.1. Objetivo General:

- Generar un sistema de lisis en *A. vinelandii* utilizando un bacteriófago para la liberación del PHB que permita simplificar la extracción y purificación del bioplástico.

3.2. Objetivos específicos:

- Inducir a través de agentes estresantes (altas temperaturas, radiación UV) el ciclo lítico del profago inserto en el genoma de *A. vinelandii*.
- Aislar bacteriófagos del suelo y evaluar la efectividad de lisis celular en *A. vinelandii*.
- Identificar los elementos genéticos del sistema lítico y evaluar la posibilidad de clonarlos e insertarlos en el genoma de *A. vinelandii* bajo el control de un promotor inducible.
- Evaluar los genes involucrados en lisis celular identificados en *P. aeruginosa* PAO1 y observar si son funcionales en *A. vinelandii* OP.
- Evaluar si el sistema permite lisar la bacteria.

4. Metodología.

4.1. Inducción del profago de *A. vinelandii* OP por agentes estresantes

Para observar si el profago inserto en el genoma de *A. vinelandii* OP es inducible bajo condiciones que interfieran con la replicación del ADN hospedador, se sometió esta cepa a altas temperaturas y radiación ultravioleta (UV). La cepa fue crecida en medio Burk sacarosa (Ver anexos) a dos diferentes tiempos de crecimiento (8 y 24 hrs). Para obtener una concentración alta de células, después del tiempo de crecimiento las células fueron centrifugadas a 7000 rpm por 10 min y resuspendidas en 300 µl de MgSO₄. Con este concentrado, la bacteria fue cultivada con el método de doble agar (Ver Anexos) en cajas Petri para posteriormente aplicar las siguientes condiciones de estrés (Tabla 1):

Condición 1. Radiación UV: una vez cultivada *A. vinelandii* OP en cajas Petri con el método de doble agar, se sometió por tiempos de 30 seg, 1 min y 5 min a radiación UV con el equipo CL-1000 Ultraviolet Crosslinker. Posteriormente cada caja fue incubada a 30°C por varios días hasta observar placas de lisis. Cada tiempo se hizo por triplicado, y una caja con el mismo método pero sin someterla a radiación UV sirvió como control.

Condición 2. Altas temperaturas: después de cultivar la cepa con el método de doble agar, ésta fue incubada a las temperaturas 30, 37 y 42° C. En las últimas dos temperaturas, se incubaron por distintos tiempos, 12, 24 y 48 hrs, y pasado este tiempo se observó su crecimiento y se incubaron a 30°C hasta observar placas de lisis. Cada temperatura se hizo por triplicado, y el control se mantuvo todo el tiempo a 30°C.

Tabla 1. Condiciones a las que fue sometida *A. vinelandii* después de haberla crecido siguiendo el método de doble agar para aislar bacteriófagos.

Horas de crecimiento	Condiciones de stress					
	Temperatura de incubación			Exposición a radiación UV		
8	30°C	37°C	42°C	30''	1'	5'
24	30°C	37°C	42°C	30''	1'	5'

4.2. Método de doble agar con bacteriófagos aislados de intestinos de niños sanos y enfermos

Como otra alternativa para encontrar un bacteriófago que infecte y lise a células de *A. vinelandii*, bacteriófagos de intestinos humanos fueron sometidos al método de doble agar con células de *A. vinelandii* OP y *A. vinelandii* AEIV para observar placas que indicaran infección y lisis.

La concentración de la muestra era de 5×10^5 fagos en 20 μ l. Se realizaron diluciones en serie hasta 10^{-4} en buffer SM (Ver Anexos). Para el método de doble agar se mezclaron 20 μ l de un cultivo overnight de *A. vinelandii* OP y *A. vinelandii* AEIV a una concentración de 4.5×10^{10} células/ml (previamente centrifugado a 7000 rpm x 10 min y resuspendido en 300 μ l de $MgSO_4$) en distintos tubos de ensayo, 3 ml de agar BS suave (Ver Anexos) y 100 μ l de cada dilución de los bacteriófagos. La mezcla se vertió en cajas Petri con la primera capa solidificada de agar BS. Cada dilución se realizó por duplicado, y un tubo de ensayo para cada cepa sin los bacteriófagos se utilizó como control. Todas las cajas se incubaron a 30°C hasta observar placas de lisis.

Para observar si la concentración celular bacteriana afectaba la formación y visibilidad de las placas de lisis, se realizó de nuevo el método de doble agar variando la concentración, añadiendo 2.5, 5, 10 y 20 μ l de cada cepa por cada tubo con agar suave y diluciones de bacteriófagos.

4.3. Aislamiento de bacteriófagos del suelo

Al mismo tiempo que la estrategia descrita arriba, y con el fin de aislar bacteriófagos que infecten y lisen células de *A. vinelandii*, se procedió a tomar muestras de suelo y al enriquecimiento (con sacarosa) e inoculación (con células de *A. vinelandii*) de lugares seleccionados según lo recomendado por Bishop *et al.* (1977). Se eligieron 3 sitios de muestreo en jardines dentro del Instituto de Biotecnología en Cuernavaca, Morelos. De cada sitio se tomaron 100 gr de suelo a una profundidad de 5 a 10 cm y se colocaron en recipientes. En esos mismos sitios de muestreo se añadieron 5 ml de un cultivo overnight de la cepa *A. vinelandii* OP y 15 ml de sacarosa al 2%. Los recipientes con las muestras de suelo, también se enriquecieron con sacarosa y fueron almacenados a temperatura ambiente. Cada sitio de muestreo y cada recipiente almacenado fueron enriquecidos con sacarosa e inoculados con la cepa *A. vinelandii* OP por 5 días consecutivos.

Posteriormente en un matraz de 250 ml se añadieron 50 ml de medio BS, 1 ml de cultivo de *A. vinelandii* OP crecido overnight en agitación y 10 gr de cada una de las muestras de suelo. El control fue un matraz con 10 gr de suelo sin enriquecer y sin inocular. Los 8 matraces fueron incubados a 30°C en agitación.

Después de 48 horas de incubación, la mezcla fue centrifugada a 7000 rpm x 10 min. Debido a la alta turbidez de las muestras, se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones. El sobrenadante fue filtrado con membranas millipore de 0.45 μ m y se hicieron diluciones hasta 10^{-2} .

Se prepararon células de *A. vinelandii* OP previamente cultivadas en agitación a 30°C overnight, centrifugándolas a 7000 rpm x 10 min y resuspendiéndolas en $MgSO_4$. A continuación se realizó el método de doble agar: en tubos estériles se colocaron 3 ml de agar BS suave, 100 μ l de las muestras filtradas diluidas y sin diluir y 20 μ l de células de *A. vinelandii* OP resuspendidas en $MgSO_4$. El contenido

se agitó suavemente y se vertió en cajas con medio BS sólido, se dejaron secar unos minutos y se incubaron a 30°C.

Después de 48 horas, en algunas cajas se observaron pequeños “agujeros” y pequeños grumos además de las colonias de *A. vinelandii*. Lo anterior podría indicar una contaminación, sin embargo, debido a que las placas de lisis pueden aparecer con diversas morfologías, no se descartó la posibilidad de que las estructuras visibles en las cajas fueran producidas por bacteriófagos que estuvieran lisando las células de *A. vinelandii*. Por ello, se realizó el método de doble agar de la siguiente manera: con una micropipeta se succionaron 10 posibles placas de lisis, procurando elegir aquellas estructuras que fueran lo más parecidas a placas de lisis y que estuvieran bien aisladas. Se resuspendieron en 1 ml de buffer SM, se filtraron con membranas millipore de 0.45 µm y se dejaron reposar 2 horas. Después en tubos de ensayo estériles se mezclaron 3 ml de BS suave, 20 µl de un cultivo overnight de *A. vinelandii* OP (a una concentración de 4.3×10^8 células/ml) y 100 µl de las posibles placas de lisis. Debe aclararse que en este paso experimental, a la mezcla se le añadió CaCl₂ (4 mM) y glucosa 2%, ya que algunos autores como Omaña, 2015, han empleado este método para facilitar la infección con bacteriófagos. Las cajas fueron incubadas a 30 °C.

Con algunas variaciones en los ensayos, se realizó un segundo enriquecimiento e inoculación de suelo con *A. vinelandii* OP siguiendo lo recomendado por Bishop *et al.*, 1977. Después de 5 días de enriquecimiento e inoculación, se realizó lo siguiente: se tomaron 5 gr de la muestra y se mezclaron con 15 ml de buffer fosfatos y se centrifugó a 7000 rpm x 10 minutos. El sobrenadante se extrajo con una micropipeta y se filtró con membranas millipore de .45 µm. En matraces de 250 ml se añadieron 2 ml de éste filtrado, 19 ml de un inóculo overnight de *A. vinelandii* OP (a una concentración de 1.23×10^8 células/ml) y 20 ml de medio BS. Se incubaron overnight a 30° C en agitación. Después de la incubación, se realizó el método de doble agar: en tubos de ensayo estériles se mezclaron 20 µl del cultivo de las bacterias con los filtrados del suelo y 3 ml de agar suave. Se mezcló bien y se vertió el contenido en cajas con medio BS sólido. Se dejaron secar las cajas y se incubaron a 30°C. El mismo proceso se realizó pero con muestras incubadas por 48 horas para observar si había una diferencia en el tiempo en que se mantenían células de *A. vinelandii* OP con los fagos que pudieran encontrarse en los filtrados del suelo.

4.4. Clonación de genes líticos de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

4.4.1. Cepas bacterianas y plásmidos utilizados

Para la estrategia en la que se usaron los genes PA0614 y PA0629 desde *P. aeruginosa* PAO1, *A. vinelandii* OP fue la única cepa del género *Azotobacter* que se utilizó, siendo la de mayor interés para el objetivo de este trabajo, ya que tiene una alta producción de PHB. También *Escherichia coli* TOP10 se utilizó para clonar los genes. Un resumen de estas cepas y de los plásmidos utilizados se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Cepas bacterianas, plásmidos y sus características. *Mencionado como pUC19scrX en el texto. 1. Estudiante de doctorado en Instituto de Biotecnología, departamento de Microbiología Molecular. 2. Estudiante de maestría en Instituto de Biotecnología, departamento de Microbiología Molecular

Cepas bacterianas	Características
<i>Azotobacter vinelandii</i> OP	Produce gran cantidad de PHB y poco alginato.
<i>Escherichia coli</i> TOP10	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	
Plásmidos	Características
pJET	Vector con cassett de resistencia a ampicilina.
pJETR200420	Contiene cassett de resistencia a ampicilina y tiene el gen de una diguanilato ciclasa. Obtenido por Carlos Leonel Ahumada ¹ .
pUMATc	Contiene cassett de resistencia a tetraciclina.
pUC19upscrX-phaG-PA3924-loxGm-downscrX*	Contienen casete de resistencia a gentamicina y lleva los genes de phaG y PA3924. Obtenido por Gabriela Morales ² .

4.4.2. Oligonucleótidos utilizados

La secuencia de los oligonucleótidos utilizados para realizar la PCR (Polymerase Chain Reaction) para amplificar los genes PA0614 y PA0629 se muestran en la Tabla 3. Fueron sintetizados en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para amplificar los genes PA0614 y PA0629 de *P. aeruginosa* PAO1. En negritas se resaltan los sitios de restricción.

Nombre	Secuencia
UP629GM	5´ CAT GGGATCC AACTGACCGAGCAGC 3´
DW629GM	3´ ATT CTCTAGAGCCGGCTCATGACAGCAC 5´
UP629	5´ GAT CATCGATATCGGAGTGCAGGAGGAT 3´
DW629	3´ TACT ATCGATGCCGGCTCATGACAGCAC 5´
UP0614	5´ GGT CGGTACCGCGTCCCCAGGGAGGCAC 3´
DW0614	3´ GGT CGGATCCCTTCGATCAGTTTCAATG 5´

4.4.3. Amplificación de los genes PA0614 y PA0629 de *P. aeruginosa* PAO1

Para lograr la clonación de los genes PA0614 y PA0629 en los vectores que utilizamos, primero se amplificaron los genes desde *P. aeruginosa* mediante PCR. El ADN de *P. aeruginosa* PAO1 utilizado ya estaba purificado en laboratorio, y los oligos utilizados se muestran en la Tabla 3. Las condiciones de PCR fueron las

siguientes: 10 µl de Buffer GC, 5 µl de DNTPs, 2.5 µl de cada oligonucleótido, 2 µl de DMSO, 1 µl de ADN de *P. aeruginosa* PAO1, 0.2 µl de enzima Phusion, completando a 50 µl con H₂O. Fueron 30 ciclos de: 98 °C 30'' en la desnaturalización, un gradiente de 58, 60 y 62°C 30'' en alineamiento, y 72°C 30'' en extensión.

Una vez confirmados los tamaños de los genes amplificados por PCR (Figura 5), se procedió a colocar las muestras en un gel preparativo para purificar banda. Las muestras elegidas fueron: PA0614 a 58°C, PA0629 a 62°C, y PA0629Gm a 62°C. Una vez corrido el gel lo suficiente, se cortó la banda y se siguió el protocolo de Thermo Scientific para purificación de banda (ver Anexos).

4.4.4. Clonación de los genes PA0614 y PA0629 en el plásmido pJET y transformación en *E. coli* TOP10

Los genes amplificados y purificados por columna se clonaron en el vector pJET para su posterior secuenciación. Se utilizó el PCR Cloning Kit de Thermo Scientific. En tubos eppendorf de 1.5 ml mantenidos en hielo, se agregaron 10 µl de Buffer de reacción, 7-8 µl del gen purificado, 1 µl del pJET, 1 µl de ligasa, y se llevó a 20 µl con H₂O. Se mezcló con ayuda de un agitador vortex.

Para la transformación de *E. coli* con el producto de la ligación, en tubos eppendorf de 1.5 ml, se colocaron 200 µl de células competentes *E. coli* TOP10 y se añadió la ligación del pJET con los genes PA0614 y PA0629 (por separado, es decir, una transformación por cada pJET ligado con cada gen); se incubaron 30 min en hielo; se aplicó un choque de calor de 5 min a 37°C; en tubos de ensayo se colocó 1 ml de LB y se añadieron las transformaciones; se incubaron por 1 hora a 37°C en agitación; se plaquearon en cajas Petri con LB ampicilina (200 µg/ml) para seleccionar.

4.4.5. Secuenciación de genes PA0614 y PA0629 clonados en pJET

Una vez clonados los genes, se procedió a confirmar que no existieran mutaciones en la secuencia del ADN que se obtuvo por PCR. Se seleccionaron 10 candidatas de cada transformación y se crecieron overnight en agitación a 37°C en tubos de ensayo para extraer el plásmido por perclorato. Posteriormente se pusieron a digerir con la enzima de restricción BglII y con los sitios insertados en cada oligonucleótido (ver Tabla 3). Por electroforesis se corroboró que se liberara el fragmento correspondiente al tamaño de los genes. Se eligieron 2 candidatas de cada transformación, y el plásmido extraído se purificó por columna (ver Anexos). Las muestras se mandaron a secuenciar en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología. A cada vector se le denominó según el fragmento clonado: pJET::holina (con el gen PA0614), pJET::lys y pJET::lysGm (con el gen PA0629) (Ver mapas en Anexos).

4.4.6. Clonación de los genes PA0614 y PA0629 en vectores de interés

Una vez corroborado que las secuencias de los genes estuvieran sin errores en el vector pJET, se clonaron en diferentes vectores:

- Vector pJETR2: Este vector contiene un promotor constitutivo, denominado Pc, obtenido de un casete de resistencia a gentamicina. Dicho promotor nos interesaba que regulara la expresión del gen PA0629. Tanto este vector como el pJET que contenía el gen PA0629GM fueron digeridos con las enzimas de restricción BamHI y XbaI. Los fragmentos de interés liberados fueron purificados por columna. Se hizo la reacción para ligar el fragmento del vector de 3237 pb y el fragmento del gen de 639 pb, dando lugar a un plásmido de 3876 pb. Se seleccionaron en cajas Petri con LB Ampicilina (200 µg/ml), y una vez se eligieron las candidatas, se purificó el plásmido por la técnica de perclorato y se comprobó por digestión enzimática que el gen y el vector se ligaran correctamente. Posteriormente, este nuevo vector se puso a digerir con la enzima BglII, para liberar un fragmento de 948 pb, el cual fue purificado por columna. Este nuevo fragmento además de llevar el gen PA0629Gm, también contiene el promotor constitutivo Pc.
- Vector pUMA-Tc: Este vector de 5258 pb contiene la región que se usó para recombinar en *A. vinelandii*. Dicha región corresponde al gen de *A. vinelandii* Avin_51420. El plásmido se linearizó con la enzima BamHI y se purificó por columna. Se realizó la ligación del vector con el fragmento de 948 pb obtenido del pJETR2 bajo las siguientes condiciones: 4 µl del vector, 30 µl del fragmento promotor/gen, 4 µl de Buffer ligasa, 1 µl de ligasa y 1 µl de ATP. Se transformaron células competentes de *E. coli* TOP10 con la ligación, y se plaquearon en cajas de LB tetraciclina (15 µg/ml) para seleccionar. Se eligieron algunas candidatas y se crecieron a 37°C overnight en líquido para extraer el plásmido por el método de perclorato. Por digestión enzimática, con XbaI, se corroboró la dirección en que se ligó el fragmento con el vector, y por electroforesis se observaron los tamaños resultantes, siendo el de nuestro interés una banda de 6188 pb. Al plásmido resultante se le denominó pUMATc::lysGmR2.
- Vector pUC19scrX: Este vector contiene la región del gen de *A. vinelandii* Avin_51780 que se usó para recombinar en esa bacteria. Para poder escindir los genes que se habían clonado con anterioridad en este plásmido y así tener solo la región del gen scrX, a este plásmido de 8541 pb primero se le hizo una digestión con la enzima BamHI, dando un fragmento de 6711 pb, el cual se purificó por columna. Se realizó la ligación de este fragmento y se transformaron con él células de *E. coli* TOP10 para poder almacenarlo y posteriormente extraer el plásmido por el método de perclorato.

El siguiente paso fue linearizar este plásmido de 6711 pb con la enzima KpnI. Sin embargo, como hay un total de dos de estos sitios de restricción, se realizó una digestión parcial: se realizó una mezcla con 1.5 µl de la enzima KpnI y 13.5 µl de H₂O; en 5 tubos eppendorf se colocaron 5 µl del

plásmido purificado por perclorato, 2.5 µl de Buffer KpnI, y diferentes cantidades de la mezcla enzima/H₂O (1, 2, 3, 4 y 5 µl), llevando todos los tubos a 20 µl con H₂O. Se incubaron 30 min a 37°C y por electroforesis se observó que se haya linearizado. Después, se purificó por columna la banda linear de 6711 pb, y para observar que haya ocurrido la digestión en el sitio KpnI que es de nuestro interés, se le hizo una digestión con BamHI. Por electroforesis se confirmó que ocurrió la digestión en el sitio esperado, ya que se distinguió claramente la banda de 5803 pb.

Se procedió a purificar por columna dicha banda. Posteriormente se hizo la reacción de ligación de este plásmido y del gen PA0614 también purificado por columna y secuenciado. Las condiciones fueron las siguientes: 15 µl de vector, 15 µl del gen PA0614, 4 µl de buffer ligasa, 1 µl de ligasa, a 20 µl con H₂O, y finalmente se incubó overnight a 22°C. Posteriormente se realizó la transformación con células competentes *E. coli* TOP10 y se plaqueó en cajas Petri con LB Gentamicina (10 µg/ml). Una vez secas las cajas, se incubaron overnight a 37°C. Ya crecidas se seleccionaron candidatas y se crecieron overnight a 37°C en agitación en tubos de ensayo con 6 ml de LB Gentamicina (10 µg/ml). Se extrajo plásmido por el método de perclorato. Por digestión enzimática con BamHI - KpnI se comprobó que la ligación y transformación fueran exitosas, liberando tres fragmentos, uno de 3617, otro de 2186 y uno de 484 pb. A este plásmido se le denominó pUC19::PA0614NS.

Posteriormente por digestión enzimática, con BglII se obtuvo del vector pJET::lys el gen PA0629, con 722 pb y el vector pUC19::PA0614NS se linearizó con BamHI y se realizó la reacción de ligación de ambos fragmentos, incubando overnight a 22°C. Se transformaron células de *E. coli* TOP10 y se plaqueó en cajas con LB Gentamicina (10 µg/ml) para seleccionar. Después de incubar overnight a 37°C se seleccionaron 20 candidatas y se crecieron en tubos de ensayo con 6 ml de LB Gentamicina (10 µg/ml) overnight a 37°C en agitación. Se extrajo el plásmido por el método de perclorato. Por digestión enzimática, con las enzimas EcoRI y AgeI, se comprobó que ambos genes estuvieran en el vector y que además el gen PA0629 haya entrado en la dirección de la transcripción. Al vector resultante se le denominó pUC19::holina-lisina.

4.4.7. Transformación de células de *A. vinelandii* OP con los plásmidos pUMATc::lysGmR2 y pUC19::holina-lisina

Para transformar células de *A. vinelandii* primero se prepararon células competentes de la cepa OP (Ver protocolo en Anexos). Los plásmidos que llevan los genes PA0614 y PA0629 fueron linearizados, y siguiendo el protocolo para transformar células de *A. vinelandii* (Ver protocolo en Anexos) se clonaron en la cepa OP. La primera transformación en *A. vinelandii* OP fue con el plásmido pUMATc::lysGmR2, el cual se linearizó con la enzima NdeI. Se seleccionó en cajas de BS tetraciclina (60 µg/ml) y después de 48 horas de incubación a 30 °C

se seleccionaron algunas candidatas y se crecieron de nuevo en cajas de BS tetraciclina (60 µg/ml). A la cepa resultante se le denominó lysR2.

Posteriormente, con el mismo protocolo con el que se trataron las células de la cepa OP, se prepararon células competentes de la cepa lysR2 y el vector pUC19::PA0614NS se linearizó con la enzima XbaI para transformar estas células. Se seleccionó en cajas de BG gentamicina (1 µg/ml). Después de incubar 48 horas se eligieron candidatas para los pases posteriores con antibiótico. A esta cepa se le asignó el nombre de LR2614.

Por último, con el vector pUC19::holina-lisina linearizado con Sall, se transformaron células competentes de la cepa OP. Se seleccionó en cajas de BG gentamicina (1µg/ml) y se incubó a 30 °C por 48 horas. Se eligieron varias candidatas y se resembraron en cajas con las mismas condiciones. A esta cepa se le denominó PA1429.

Una vez elegidas las candidatas de todas las transformaciones en *A. vinelandii* se resembraron al menos en dos ocasiones en cajas con BS o BG, según el caso, con el antibiótico que se usó para seleccionar. Esto se hizo con el fin de que los genes clonados segregaran completamente en los cromosomas de la bacteria.

4.4.8. PCR de transformaciones de *Azotobacter vinelandii* para observar confirmar genotipo

Con el objetivo de saber si los genes clonados en el genoma de *A. vinelandii* segregaron por completo en los múltiples cromosomas que caracterizan a esta bacteria, se realizaron diversas PCR flanqueando la región en donde se espera haya ocurrido la recombinación homóloga. Los oligonucleótidos utilizados para este fin se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 4. Oligonucleótidos usados para realizar PCR a las transformaciones en *A. vinelandii*.

Nombre	Secuencia	Región en el genoma de <i>A. vinelandii</i> DJ
MeIAI-F	5´ GGCCTTCTACCTGTCCTTC 3´	Región de 201 pb dentro del gen Avin_51420.
MeIAI-R	3´ TGGCGCTTGATGAACCAGG 5´	
scrX-F	5´ TTTCGCTCTGCTCCAGAAG 3´	Abarca una longitud de 2043 pb. Va de una región arriba del gen Avin_51780 hasta una dentro de él.
scrX-R	3´ CTTACAACGGCCACCTAGA 5´	

4.4.9. Curvas de crecimiento de las cepas lysR2, LR2614 y PA1429

Se realizaron cinéticas de crecimiento para analizar si las bacterias transformadas tienen la capacidad de lisarse al momento de someterlas a concentraciones bajas de CHCl_3 (lysR2), y a sacarosa (LR2614 y PA1429). midiendo la densidad óptica (D.O.) a una longitud de onda (λ) de 600 nm. Debido a que en el genoma de la cepa lysR2 únicamente recombinó el gen PA0629, a cuya proteína se le atribuye acción hidrolítica en el peptidoglicano, se utilizó cloroformo (CHCl_3) para permeabilizar ligeramente la membrana celular de las células y así la proteína pudiera tener contacto con la pared del copolímero. Se utilizaron matraces de 125 ml y 25 ml de medio BS Tetraciclina (30 $\mu\text{g/ml}$), incubando a 30 °C en agitación. Una D.O. de .1 se tomó como tiempo inicial o T0 y se midió la D.O. cada 4 horas después de 12 horas de crecimiento y de haber añadido el CHCl_3 . Para comparar el efecto de la proteína endolisina con *E. coli*, se realizó el mismo experimento en la cepa que lleva el vector que se usó para transformar *A. vinelandii*, el pUMATc::lysGmR2. En este caso se usaron matraces de 125 ml con 25 ml de medio LB Tetraciclina (15 $\mu\text{g/ml}$), y se incubaron a 37 °C en agitación. La D.O. inicial fue de .1 y se midió cada 30 minutos, añadiendo el CHCl_3 en el tiempo 5.

Para las cepas LR2614 y PA1429 del mismo modo se usaron matraces de 125 ml con 25 ml de medio BG, ya que la sacarosa se utilizó como inductor del promotor del gen Avin_51780 donde recombinaron ambos genes, PA0614 y PA0629, en el caso de la cepa PA1429, y donde recombinó únicamente el gen PA0614, en el caso de la cepa LR2614. En esta segunda cepa el otro gen está situado en la región del gen Avin_51420. La D.O. inicial fue de .1 y la sacarosa se añadió a una concentración de 15 g*L a las 12 horas de crecimiento. Se midió cada 4 horas a partir de haber añadido la sacarosa.

En los experimentos descritos arriba, se utilizaron triplicados para cada condición, incluidos los controles, y en algunos casos se hizo más de una vez cada experimento, observado reproducibilidad de los resultados. Antes después de agregar el inductor o el CHCl_3 , se tomó una pequeña muestra para observarla al microscopio óptico.

5. Resultados.

5.1. Inducción del profago de *A. vinelandii* OP.

Los resultados de estos experimentos indican que bajo las variaciones ambientales a las que fué sometida la cepa OP no hubo lisis aunque se obtuvieron diferencias en la velocidad de crecimiento, resultado esperado ya que la temperatura óptima de crecimiento para *A. vinelandii* es de 30 °C. El experimento fue repetido un par de veces y se observó al microscopio una muestra de algunas cajas, sin observar cambios en su crecimiento ni lisis bacteriana.

5.2. Búsqueda de posibles bacteriófagos líticos que infecten a *A. vinelandii* a partir del suelo y de intestinos humanos.

En los ensayos de doble agar en donde células de *A. vinelandii* fueron puestas en contacto con bacteriófagos aislados de intestinos humanos y con los posibles fagos aislados desde el suelo y resuspendidos en buffer SM, no se detectaron placas de lisis que indicaran la infección por bacteriófagos. Sin embargo en algunas cajas se observaron pequeños “agujeros” y pequeños grumos además de las colonias de *A. vinelandii*. Bajo el microscopio, se distinguían células de *A. vinelandii* y restos amorfos que pudieran ser restos celulares. Esto también podría indicar una contaminación, además, debido a que las placas de lisis pueden aparecer con diversas morfologías, no se descartó la posibilidad de que las estructuras visibles en las cajas fueran producidas por bacteriófagos que estuvieran lisando las células de *A. vinelandii*. Por ello, se intentó aislar fagos de estas estructuras y se volvieron a someter al ensayo de doble agar para comprobar que fueran bacteriófagos. Sin embargo, después de varios días de incubación, las colonias de *A. vinelandii* crecieron adecuadamente y no se observó la formación de placas de lisis con las posibles placas. Al incluir un periodo de incubación de las muestras con las células en cultivo con el fin de facilitar la infección tampoco se observó lisis celular.

5.3. Clonación de genes líticos de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

5.4. Amplificación de genes PA0614 y PA0629, clonación en pJET y secuenciación

Mediante PCR se amplificaron los genes PA0614 y PA0629 (Figura 5) de 450 y 630 pb respectivamente.

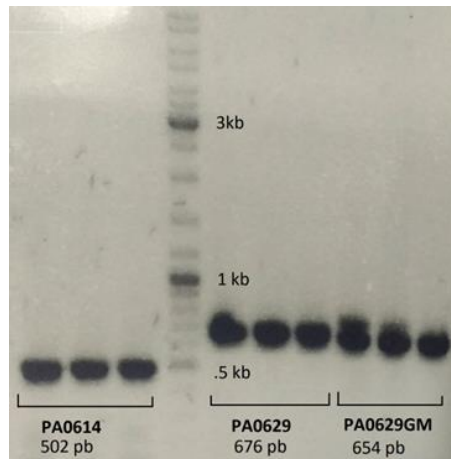
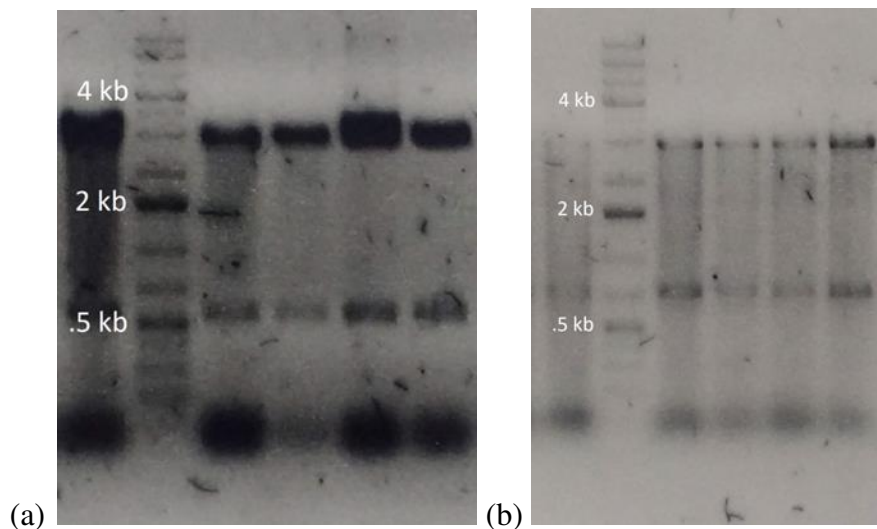
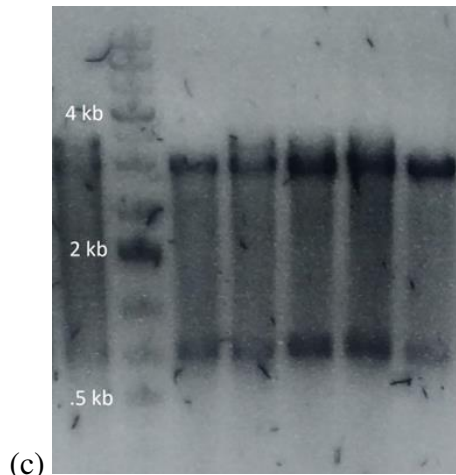


Figura 5. Fotografía de un gel de electroforesis en el que se observa el tamaño de los genes amplificados, PA0614 y PA0629, cuyos tamaños son de 450 y 630 pb. Los tamaños indicados en la figura son distintos debido a la región de donde se decidió amplificar.

Para poder secuenciar los genes de interés primero se clonaron en el vector pJET (ver mapas en Anexos) y se transformaron en *E. coli* TOP10. Después de haber elegido las candidatas, se purificó el plásmido por el método de perclorato (Ver en Anexos "2. Protocolos"), y por digestión enzimática se comprobó que los genes estuvieran clonados en el vector (Figura 6). Posteriormente se mandaron a secuenciar en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología.





(c)
Figura 6. Fotografías del gel de electroforesis de las digestiones con BglIII del vector pJET obtenido por el método por perclorato después de haber clonado los genes PA0614 y PA0629. Las bandas se muestran más grandes a las que se esperan según los tamaños de los genes debido a que la digestión se hizo con BglIII, sitios pertenecientes al vector. (a) Gen PA0614; los cuatro carriles después del marcador muestran una banda de 548 pb. (b) y (c) Gen PA0629; en los carriles después del marcador se muestra una banda de 722 y 699 pb respectivamente.

5.5. Clonación de los genes PA0614 y PA0629 en vectores de interés

Una vez comprobado que la secuencia de los genes fuera correcta, el siguiente paso fue clonar los genes en los vectores elegidos. La característica de ellos es que fueron diseñados para que ocurra la recombinación homóloga en sitios específicos en el genoma de *A. vinelandii*.

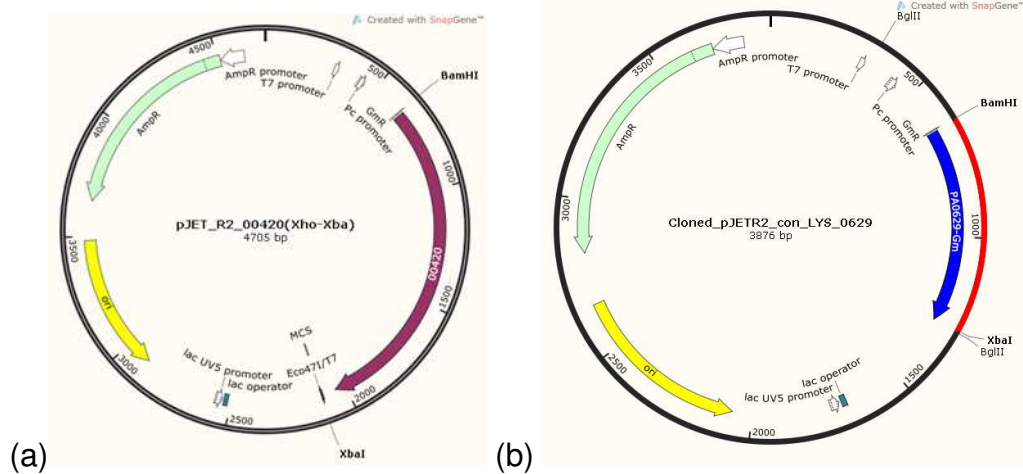
En primer lugar, el gen PA0629 se clonó en el vector pJETR2, el cual no tiene región para recombinar en *A. vinelandii*. En este vector, nos interesaba obtener un promotor constitutivo proveniente de un cassette de resistencia a gentamicina que quedó justo arriba del gen PA0629 (Figura 7, a y b). La secuencia del promotor/gen PA0629 de 948 pb se clonó en el vector pUMATc. Con este último vector, se obtuvieron células de *E. coli* TOP10 resistentes a tetraciclina. Se corroboró que el gen entró en la misma dirección de la transcripción del cassette de resistencia a tetraciclina (Figura 7, f).

Este nuevo vector denominado pUMATc::lysGmR2 (Figura 7, e), fue el que posteriormente se utilizó para recombinar en *A. vinelandii*. Como puede observarse en el mapa, la región donde recombina en el genoma de esta bacteria es donde está el gen Avin_51420, registrado como una alfa-galactosidasa (https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?avn:Avin_51420) de 441 aminoácidos.

Al vector pUC19scrx se le hicieron varios procedimientos antes de poder clonar el gen PA0614. Como se puede observar en la Figura 8a, el vector contiene un segmento para recombinar en la región del gen Avin_51780, registrado como una alfa-glucosidasa de 673 aminoácidos (<https://www.genome.jp/dbget->

bin/www_bget?avn:Avin_51780). Primero se escindieron los dos genes que tenía el plásmido original, quedando un vector con 6711 pb (Figura 8b). Posteriormente se obtuvo un nuevo vector de 5803 pb después de la digestión parcial (Figura 8c, d y e).

Una vez ligado el vector de 5803 pb con el gen PA0614 se transformaron células de *E. coli* TOP10 resistentes a gentamicina. El mapa de este vector puede observarse en la Figura 9a. La región en verde muestra la secuencia que recombina en el genoma de *A. vinelandii*, esta región incluye su propio promotor, el cual es inducido por sacarosa, por lo que no fue necesario incluir el promotor del gen PA0614. La figura 9b muestra la digestión de este vector con KpnI y BamHI que demuestra que la clonación fue como se esperaba. Debido a que era de nuestro interés que los genes PA0614 y PA0629 estuvieran bajo la regulación del mismo promotor del gen Avin_51780, a este nuevo vector, denominado pUC19::PA0614NS (Figura 9a), le añadimos el gen PA0629 justo después del gen PA0614 transformando células de *E. coli* TOP10, seleccionando en gentamicina (10 µg/ml). Posteriormente por digestión enzimática se comprobó que ambos genes estuvieran en la posición que se desea (Figura 9c y d).



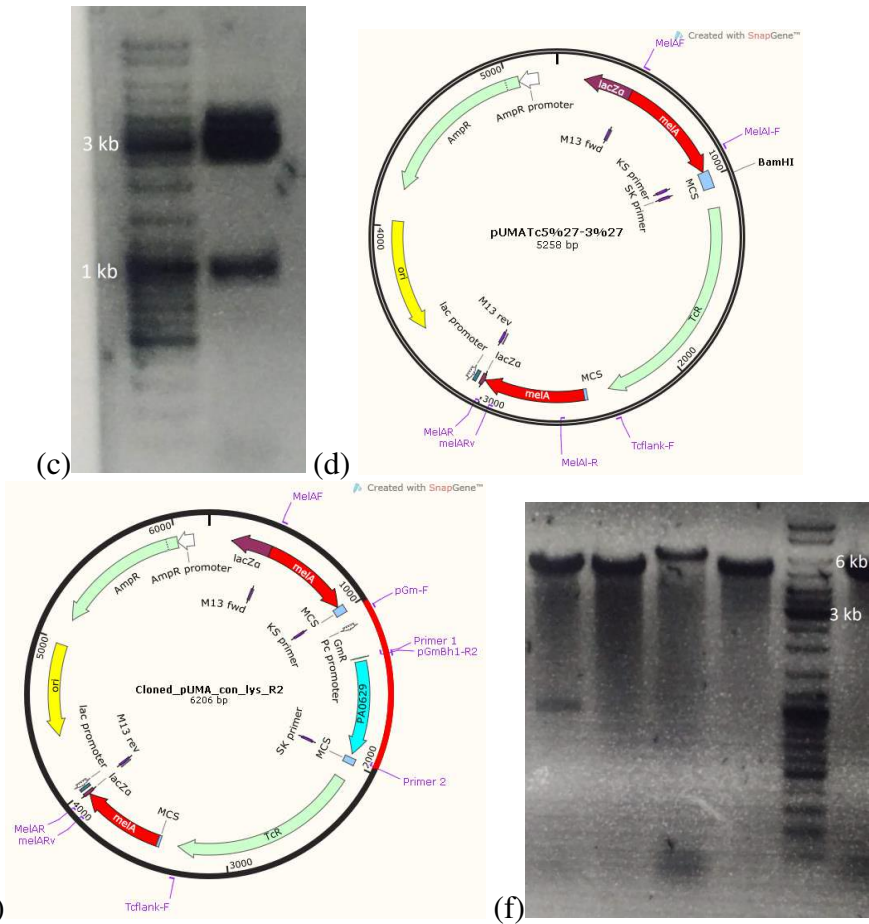
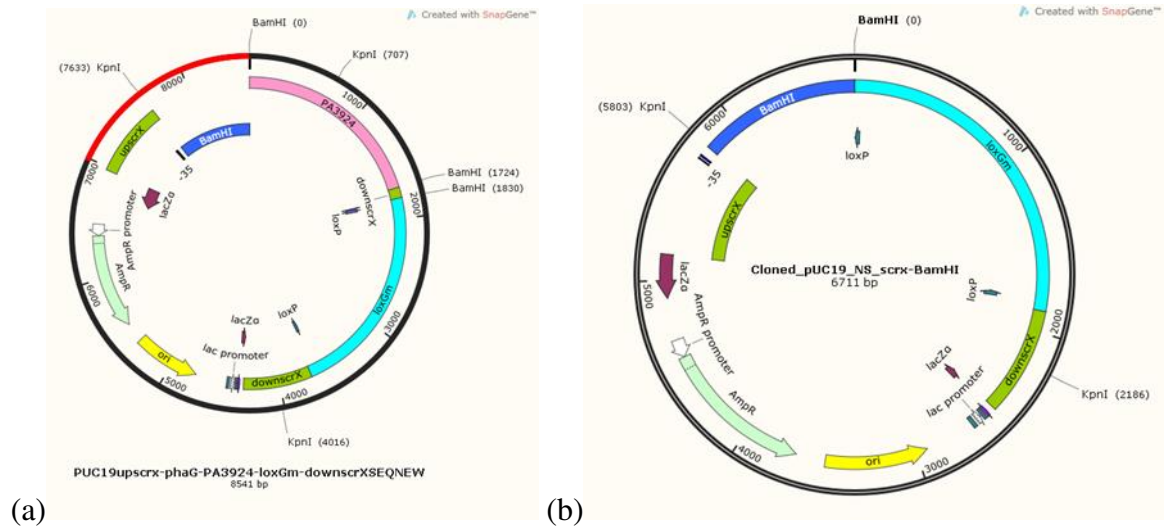
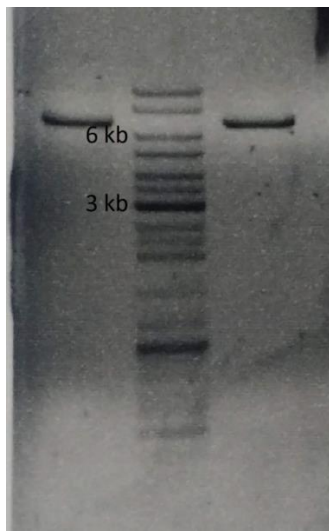


Figura 7. (a) Mapa del vector pJETR2 utilizado en este trabajo. El gen anotado como 00420 fue escindido por digestión enzimática (BamHI y XbaI). (b) Diseño del mapa del vector pJETR2 después de haber clonado el gen PA0629. (c) Fotografía de un gel de agarosa en el que se observa el fragmento de 948 pb que contiene el gen PA0629 y el promotor Pc constitutivo. Se obtuvo por digestión enzimática con BglII, cuyos sitios flanquean el fragmento. (d) Mapa del vector pUMATc, el cual se caracteriza por poseer regiones del gen Avin_51420 para recombinar en *A. vinelandii*. (e) Diseño del mapa del vector pUMATc::lysGmR2, el cual lleva clonado el gen PA0629 y el promotor constitutivo Pc. (f) Fotografía del gel de agarosa donde se muestra únicamente en el carril 3 de izquierda a derecha, la banda con 6188 pb, que corresponde a la orientación que nos interesaba en el vector pUMATc ya con el fragmento de 948 pb del pJETR2. El carril 1 muestra la orientación contraria, es decir, que el gen entro con dirección contraria a como se muestra en el mapa de la figura (e), y el carril 2 y 4 muestra el vector pUMATc linear en su tamaño original de 5258 pb.

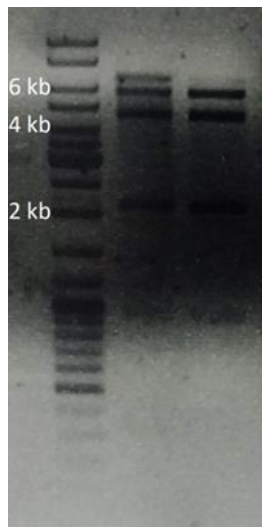


(a)

(b)



(c)



(d)



(e)

Figura 8. (a) Mapa del vector pUC19scrx utilizado en este trabajo. Los segmentos marcados en azul y rosa son dos genes que posteriormente fueron escindidos. (b) Mapa del vector pUC19scrx después de haber digerido con BamHI, ligado y transformado en *E. coli* TOP10. (c) Fotografía de un gel de agarosa donde se observa en el carril 1 y 3 de izquierda a derecha, una banda de 6711 pb del pUC19scrx de la figura b después de haber digerido parcialmente con KpnI y purificado dicha banda. (d) Fotografía de un gel de agarosa donde se observa en los carriles 2 y 3 las bandas resultado de haber digerido con BamHI la banda de 6711 pb de la figura c: 908, 2186, 4525 y 5803 pb. (e) Fotografía de un gel de agarosa donde se distingue en los carriles 2 y 3 la banda de 5803 pb del vector pUC19scrx que se observa en el gel d. Se purificó por columna, razón por la que se distingue con dificultad.

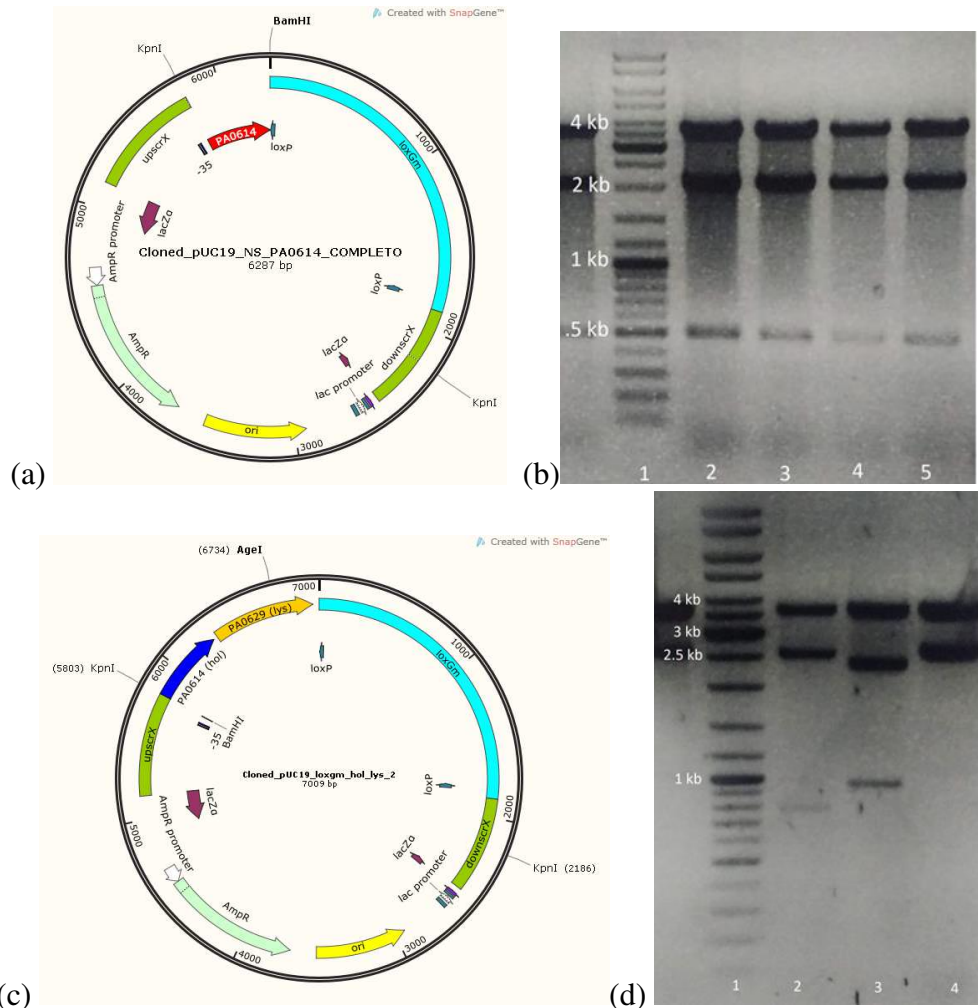


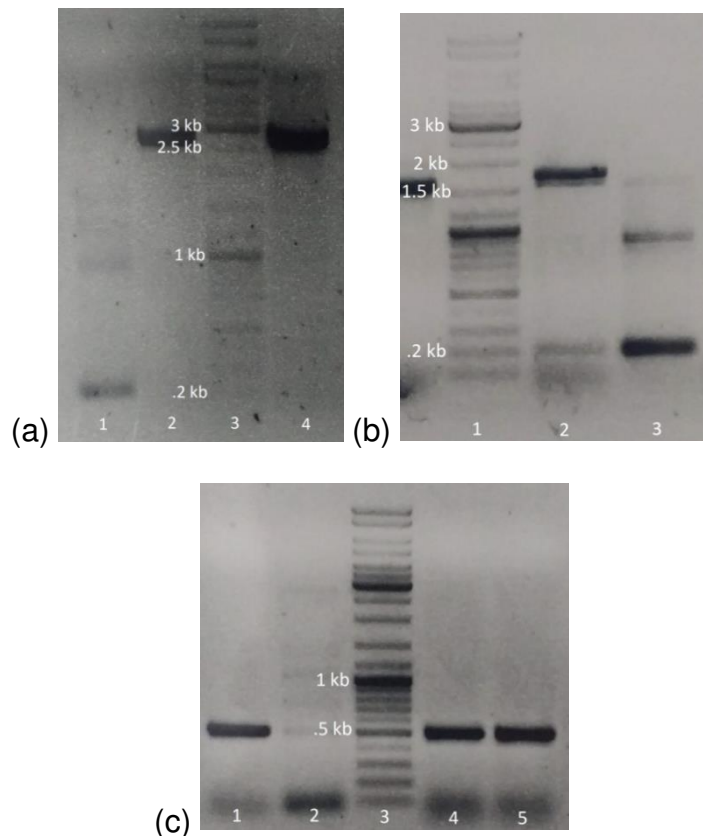
Figura 9. (a) Mapa del vector pUC19::PA0614NS. La región en rojo pertenece al gen PA0614, y la región en verde es la que recombina en *A. vinelandii*. (b) Fotografía de un gel de agarosa donde el pUC19::PA0614NS se cortó con las enzimas BamHI y KpnI. Los carriles 2 a 5 muestran que todas las candidatas mostraron las bandas esperadas: 484, 2186 y 3617 pb. (c) Mapa del pUC19::holina-lisina. Este vector de 7009 pb, es resultado de la ligación del pUC19::PA0614NS (linearizado en el sitio BamHI) con el gen PA0629, el cual se obtuvo del vector pJET en el cual se había clonado. El gen, se obtuvo con la enzima BglII desde el pJET, teniendo así el gen en ambos lados sitios BglII. (d) Fotografía de un gel de agarosa en el que se observan las bandas resultantes de la digestión del pUC19::holina-lisina con las enzimas KpnI y AgeI. Los tamaños esperados de las bandas eran: 931, 2461 y 3617 pb, y como puede observarse, únicamente en el carril 3 se notan las bandas correspondientes. El carril 2 muestra la candidata en la que el gen PA0629 entro en dirección contraria a la transcripción.

5.6. Transformación de *A. vinelandii* OP

Siguiendo el protocolo para transformar células de *A. vinelandii* (Ver Anexos) se clonaron los genes PA0614 y PA0629 en la cepa OP. Se eligieron algunas candidatas para realizar un PCR de colonia para conocer si la cepa aun contaba con copias silvestres de la región en donde ocurrió la recombinación homóloga. En la cepa lysR2, pudo comprobarse que ya no posee copias de la región silvestre (Figura 10a). En la cepa LR2614 se distinguen aun copias silvestres en donde

recombinó el gen PA0629, y en la región del gen Avin_51780, donde recombinó el gen PA0614 no se pudo demostrar si existían copias silvestres aún, pero sí que el gen estuviera en el genoma (Figura 10b y c). En la cepa PA1429, no se pudo demostrar si la cepa conserva regiones silvestres, sin embargo, utilizando los oligonucleótidos con los que se amplificaron ambos genes desde *P. aeruginosa* PAO1 y en combinación con los oligos de la región del gen Avin_51780, se verificó que los genes se encuentran en la región esperada (Figura 10d y e). En la tabla 5 se describen las características de las cepas obtenidas.

Posteriormente, para ver si existían diferencias visibles en el fenotipo de las cepas transformantes en comparación con la cepa parental, se crecieron en BS y BG sólido por 72 horas a 30 °C (Figura 11). En el medio BS parece no haber diferencia alguna. En este medio, se esperaba que el crecimiento en las cepas PA1429 y LR2614 fuera al menos disminuido, ya que al estar ambos genes bajo el promotor del gen Avin_51780 en la primera, y el gen PA0614 en la segunda, la expresión de ellos debería tener un efecto letal en las cepas. En medio BG el crecimiento también fue similar. El color ligeramente más amarillento en las cepas LR2614 y PA1429 parecería tener más relación con un mayor número de células que se colocaron al estriar en comparación a la OP y a la lysR2 que con su fenotipo.



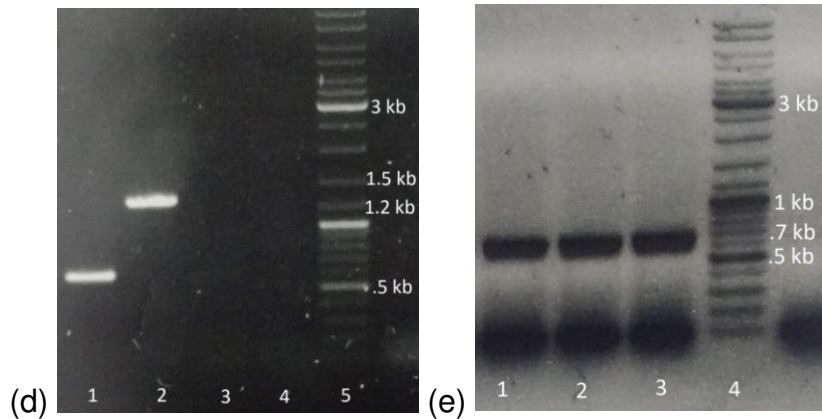


Figura 10. Se muestran las fotografías de los geles de agarosa donde se colocaron las diferentes muestras de los PCR de colonia realizados a cada una de las cepas de *A. vinelandii* OP transformadas. (a) PCR de la cepa *lysR2*. Se utilizaron los oligos MelA1-F y MelA1-R (Tabla#). En el carril 1 se muestra el tamaño silvestre, 201 pb de la cepa OP; en los carriles 2 y 4 se muestra el tamaño de las candidatas transformadas, con 2668 pb. No se distinguen copias silvestres. (b) En el carril 2 se ve la muestra del PCR de la cepa LR2614 con los oligos MelA1-F y MelA1-R. La banda de 2668 pb muestra que la cepa lleva el gen PA0629 y el cassette de resistencia a tetraciclina pero aún conserva regiones con tamaño silvestre. El carril 3 es el PCR realizada con los mismos oligos a la cepa OP. (c) En los carriles 4 y 5 se muestra la banda de 494 pb, correspondiente al gen PA0614, y es resultado de la PCR a las cepas LR2614 y PA1429. El carril 1 muestra la banda del mismo tamaño pero de la bacteria donde se obtuvo el gen, *P. aeruginosa* PAO1. (d) PCR de la cepa PA1429. Los oligos utilizados fueron: scrX-F y DW0614, amplifican una región de 634 pb y la muestra se observa en el carril 1; scrX-F y DW629, amplifican una región de 1327 pb y la muestra se observa en el carril 2; UP629 y scrX-R (carril 3) y UP0614 y scrX-R (carril 4), cuya región a amplificar es de 2736 pb y 3241 pb respectivamente, sin embargo el resultado fue negativo. (e) PCR de la cepa PA1429. Los oligos utilizados fueron UP629 y DW629. La banda amplificada es de 676 PB.

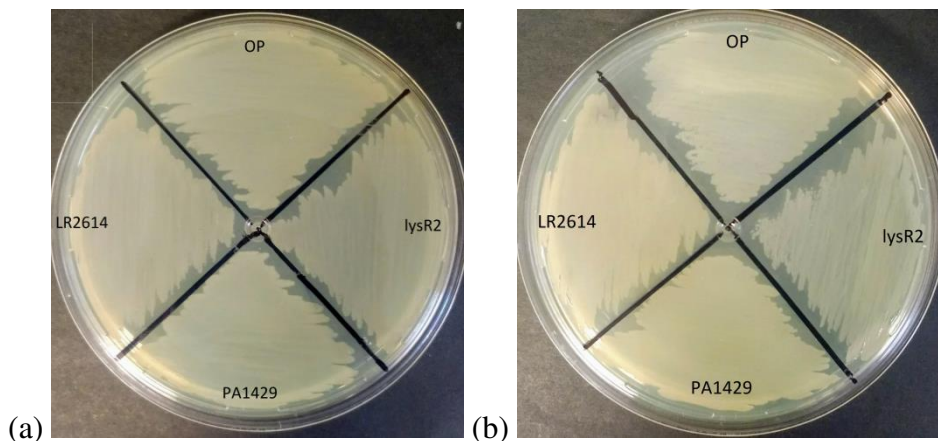


Figura 11. Comparación del fenotipo de las transformaciones obtenidas en este trabajo en comparación a la cepa parental, *A. vinelandii* OP. Ambas cajas se incubaron a 30 °C por 72 horas. (a) Crecimiento en medio BS. (b) Crecimiento en BG. En ambos medios, no se distingue alguna diferencia entre las cepas transformadas y su parental, la OP. El color amarillento que se observa se debe a la alta acumulación del PHB.

Tabla 5. Características de las transformaciones de *A. vinelandii*.

Nombre	Características
lysR2	<p>Contiene el gen PA0629 bajo el promotor constitutivo Pc.</p> <p>Contiene un cassette de resistente a tetraciclina.</p> <p>En caja, se observó buen crecimiento a una concentración de 60 µg/ml de antibiótico.</p> <p>En matraz, se nota un mejor crecimiento a 30 µg/ml de antibiótico.</p> <p>El fenotipo en caja, tanto en BS como en BG, no cambia con respecto a la cepa parental.</p> <p>Mediante PCR, se comprobó que ya no posee copias silvestres de la región en donde recombinó.</p>
LR2614	<p>El gen PA0614 recombinó en la región del gen Avin_51780, y está bajo la regulación del promotor de ese mismo gen, inducido con sacarosa.</p> <p>El gen PA0629 recombinó en la región del gen Avin_51420, bajo el control de un promotor constitutivo.</p> <p>Contiene un cassette de resistente a gentamicina y otro a tetraciclina.</p> <p>En caja crece bien a una concentración de gentamicina de 1 µg/ml. En cambio en matraz crece bien a .1 µg/ml.</p> <p>El fenotipo en caja, tanto en BS como en BG no cambia con respecto a la cepa parental.</p> <p>Se comprobó que tiene ambos genes, pero no se pudo comprobar si aún posee copias silvestres en la región del gen Avin_51780.</p>
PA1429	<p>Los genes PA0614 y PA0629 recombinaron en la región del gen Avin_51780.</p> <p>Ambos genes están bajo el promotor del gen Avin_51780, inducido por sacarosa.</p> <p>Contiene cassette de resistente a gentamicina.</p> <p>En caja crece bien a una concentración de antibiótico de 1 µg/ml. En cambio en matraz crece bien a .1 µg/ml.</p> <p>El fenotipo en caja, tanto en BS como en BG no cambia con respecto a la cepa parental.</p> <p>No se pudo comprobar si aún posee copias silvestres.</p>

5.7. Crecimiento de las cepas que expresan los genes PA0614 y PA0629

Las transformaciones de *A. vinelandii* se sometieron a cinéticas de crecimiento en medio líquido. La cepa lysR2, se creció en medio BS con tetraciclina (30 µg/ml), una cantidad de antibiótico menor a la que fue sometida en medio sólido para segregar el gen en los múltiples cromosomas. El crecimiento de la cepa lysR2 comparado con el crecimiento de la parental es menor, debido probablemente al antibiótico añadido al medio de la transformante. A las 12 horas de crecimiento se le añadió CHCl₃ (.5%) y la disminución de la D.O. fue notoria a las 4 horas en ambas cepas. En las siguientes 12 horas siguió disminuyendo la D.O. sin notarse alguna diferencia en las dos cepas (Figura 12a).

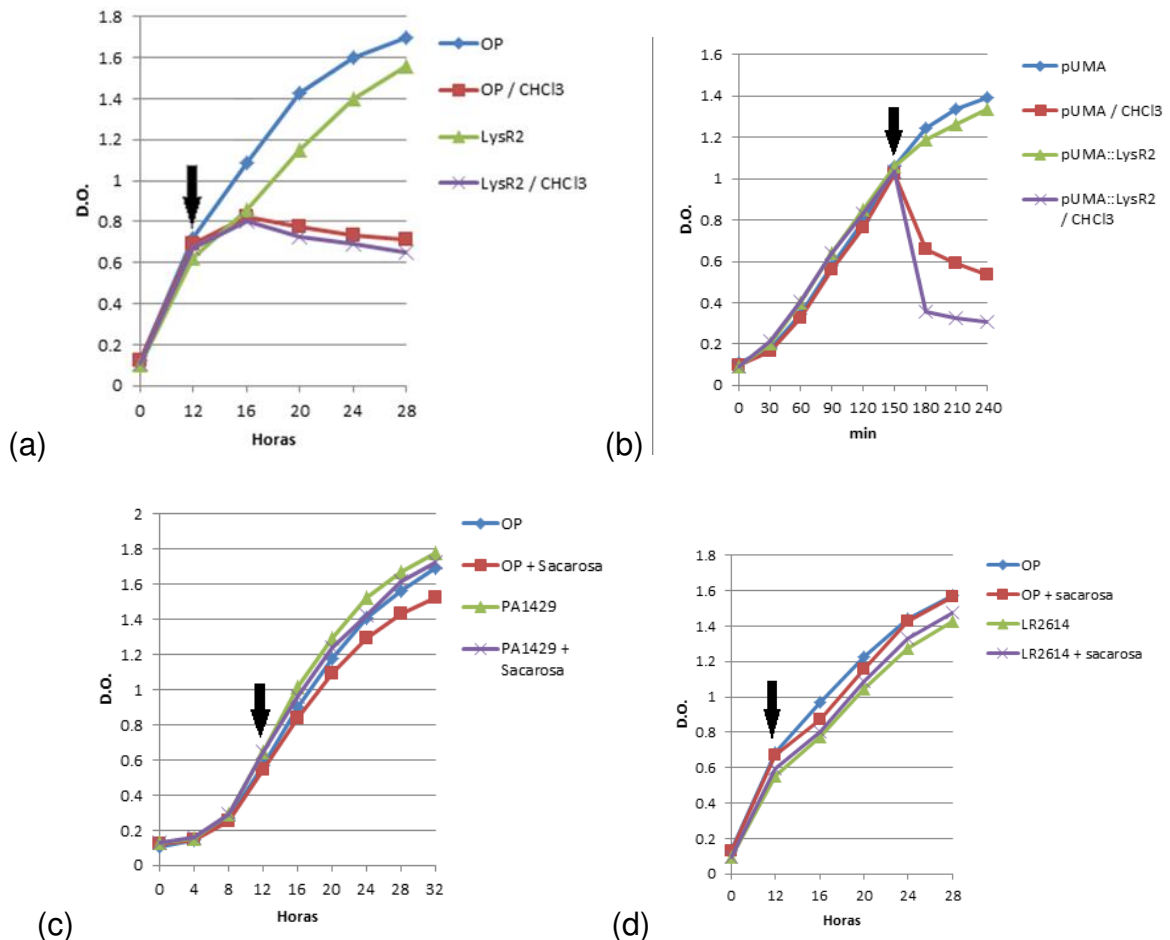


Figura 12. Curvas de crecimiento de las distintas cepas de *A. vinelandii* transformadas en este trabajo. La curva de la cepa PA1429 fue la única en que se midió la D.O. cada cuatro horas desde el tiempo inicial, en las cepas restantes, se midió la D.O. en el tiempo inicial y después se volvió a medir hasta las 12 horas, donde fue añadido el CHCl₃ o la sacarosa. Después de esto, la D.O. fue medida cada cuatro horas. (a) Curva de crecimiento de la cepa lysR2 comparada con la parental. El cloroformo fue añadido a las 12 horas (flecha negra) a una concentración de .5 %. El medio de crecimiento fue BS para la OP y BS tetraciclina (30 µg/ml) para la cepa lysR2. Se incubaron en matraces de 125 ml a 30 °C en agitación. (b) Curva de crecimiento de las cepas de *E. coli* TOP10 con el vector pUMATc y con el vector pUMATc::lysR2. El cloroformo fue añadido a los 150 minutos de crecimiento a una concentración de .5%. El medio utilizado para ambas fue LB tetraciclina (15 µg/ml). Se usaron matraces de 125 ml y fueron incubados a 37 °C en agitación. (c) (d) Curva de crecimiento de la cepa PA1429 y LR2614 respectivamente comparada con la cepa parental. La sacarosa (15g/L) fue añadida a las 12 horas de crecimiento. El medio inicia utilizado para ambas cepas fue BG. Se incubaron en matraces de 125 ml a 30 °C en agitación.

En *E. coli* se realizó una curva de crecimiento utilizando la cepa que contiene el plásmido pUMATc como control, y la cepa que tiene el plásmido pUMATc::lysR2. El crecimiento de ambas fue muy similar. El CHCl₃ se añadió a los 150 minutos de crecimiento y en contraste con lo ocurrido en *A. vinelandii*, las diferencias se hicieron notar entre aquella cepa que tiene el gen PA0629 bajo el promotor constitutivo Pc y la que no lo tiene (Figura 12b). En la cepa con el pUMATc::lysR2 cae su D.O. hasta casi 5 veces después de 90 minutos de haber añadido el CHCl₃, y en la que no lleva el gen su D.O. cae a la mitad, sugiriendo que la actividad del CHCl₃ junto con la endolisina marca diferencia en comparación con el efecto solo del CHCl₃. Es posible que la viabilidad celular de la cepa lysR2

comparada con la silvestre sea menor, sin embargo en las lecturas de la D.O. puede no distinguirse debido a la interferencia de los gránulos de PHB en las lecturas de las muestras.

En la cepa PA1429, después de la adición de sacarosa con la consecuente inducción del promotor del gen *Avin_51780* y expresión de ambos genes debió mostrar un efecto negativo en el crecimiento. Como se observa en la figura 12c, el crecimiento de la cepa PA1429 fue muy similar a la parental después de 32 horas de crecimiento. Por la manera en que actúan en conjunto las proteínas, debió haber transcurrido un tiempo no especificado antes de observar una disminución del crecimiento debido a la lisis celular. Algo similar se esperaba en la cepa LR2614, cuya expresión constitutiva del gen PA0629 debió de hacer que se acumulara en el citoplasma la proteína que codifica, esperando una alta acumulación del producto del gen PA0614 tiempo después de haber añadido la sacarosa, sin embargo, después de 16 horas de crecimiento no se observó efecto alguno en el crecimiento. El análisis de las células de las transformaciones al microscopio óptico antes y después de la adición de CHCl_3 o posterior a la inducción con sacarosa reveló ligeras diferencias en la morfología de las células (Figura 13). El contenido de PHB en todas las cepas fue similar, pero pequeños cúmulos de aparentemente PHB aparecían en el medio en las células inducidas con sacarosa o permeabilizadas con CHCl_3 . Es necesario estudiar distintas concentraciones de sacarosa y/o mayor tiempo para que las proteínas se expresen, actúen y lisen las células.

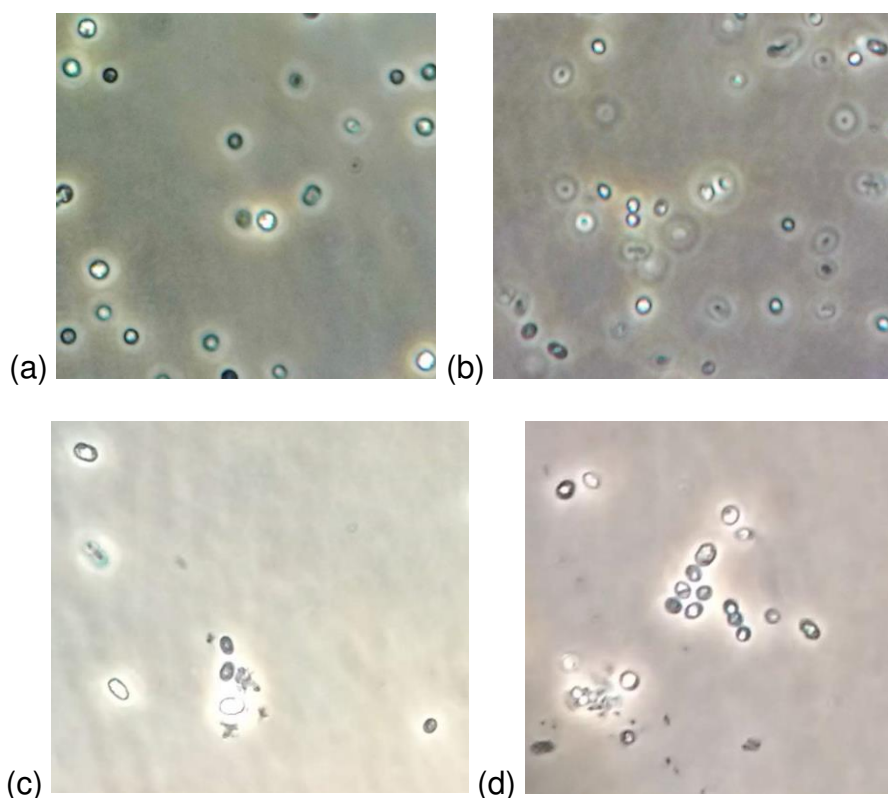


Figura 13. Fotografías de las cepas transformadas de *A. vinelandii* vistas al microscopio óptico. Las fotos fueron tomadas con un Smartphone. (a) OP 48 horas después de crecerla en BG, con una adición de sacarosa (15 g/L) a las

12 horas. (b) PA1429 48 horas después de crecerla en BG, con una adición de sacarosa (15 g/L) a las 12 horas. (c) (a) LysR2 crecida en BS 8 horas después de añadir el CHCl₃. (d) OP crecida en BS 12 horas después de añadir el CHCl₃.

6. Discusión.

Los PHA son plásticos producidos naturalmente por diversas bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y arqueas (González García *et al.* 2013). La investigación intensiva alrededor de ellos se debe a su potencial como sustitutos de plásticos tradicionales de origen petroquímico, ya que son completamente biodegradables (Madison & Huisman, 1999). Sin embargo, uno de los problemas actualmente relacionado a su producción a gran escala son los costos de recuperación, ya que para recuperar el polímero desde la célula es necesario emplear reactivos en grandes cantidades, lo que se presenta como un obstáculo para su producción a nivel industrial (Hori *et al.* 2002). A la desventaja anterior, se suman que, al utilizar los diferentes solventes o detergentes, y al emplear procesos mecánicos para lisar las células, existe un daño al peso molecular del polímero modificando sus propiedades como elasticidad o resistencia a la tracción (Resch *et al.* 1998; Martínez *et al.* 2011).

Por la problemática anterior, a principios de los 2000 surgió la idea de utilizar un sistema genético basado en dos proteínas producidas en bacteriófagos que se encargan de lisar las células, la holina y la endolisina (Hori *et al.* 2002), con el fin de facilitar la recuperación del polímero y de reducir el daño que pudieran ocasionarle los métodos normalmente utilizados.

Como primera parte de este trabajo, se buscó aislar bacteriófagos que fueran capaces de lisar las células de *Azotobacter vinelandii* para que posteriormente se obtuvieran los genes que codifican las proteínas responsables de dicha actividad y se insertaran en el genoma del microorganismo. Para ello, se trabajó para aislar bacteriófagos a partir de una muestra de fagos aislados de intestinos humanos y desde el suelo, aplicando las recomendaciones hechas en la literatura para aislar fagos para *A. vinelandii* (Bishop *et al.* 1977). A pesar de que se han logrado aislar bacteriófagos para *A. vinelandii* (Duff & Wyss, 1960; Hegazi & Jensen, 1972; Bishop *et al.* 1977; Sadik *et al.* 2016), se ha mencionado en los mismos trabajos que aislar fagos para este microorganismo es complicado, sin tener aun conocimiento de por qué sucede así. Los experimentos realizados en este trabajo, donde por el ensayo de doble agar se intentó aislar fagos desde el suelo (previamente enriquecido) y desde una muestra con gran cantidad de fagos aislados de intestinos humanos, no se observaron placas de lisis que indicaran fagos viables para esta bacteria. Se sabe que *A. vinelandii* posee regiones CRISPR, y es probable que dichas secuencias le confieran a la bacteria una resistencia a infecciones por fagos (Setubal & Almeida, 2015). Es bien sabido que estas regiones actúan como un mecanismo de inmunidad ante secuencias de ADN exógeno para la bacteria (Labrie *etal.* 2010; Oechslin, 2018), aunque no se descarta la posibilidad de que haya fagos que infecten a *A. vinelandii*.

Como segunda parte de la investigación, se encontraron algunos genes relacionados a bacteriófagos en el genoma de *A. vinelandii*, lo que en un principio nos hizo pensar que la presencia de un profago en su genoma pudiera ayudarnos con nuestro objetivo si éste aun tuviera la capacidad de activarse. Se han hecho muchos trabajos en donde se demuestra que condiciones de estrés para la cepa hospedera de un profago, como luz UV (Woods & Barry, 1974; Monk & Kinross, 1975; Barnhart *et al.* 1976; Lamont *et al.* 1989; Pato, 2001) o temperaturas mayores a 40 °C (Bertani, 1968) hacen que un fago atemperado entre al ciclo lítico, replicándose dentro de la célula y lisándola para escapar de la misma antes de que un daño pueda inactivarlo. En este estudio *A. vinelandii* fue sometida a distintas temperaturas y expuesta a varios tiempos con luz UV. La bacteria fue crecida en agar suave sobre una capa de agar 1.5 % para observar placas de lisis. No se visualizaron placas después de varios días de incubación. Es posible que ya no se encuentren todos los genes necesarios que un fago atemperado necesite para salir de un estado lisogénico.

Una tercera estrategia surgió en el curso de este trabajo tomando en cuenta un proyecto en el que se encontró en el genoma de *P. aeruginosa* PAO1 dos genes, PA0614 y PA0629, relacionados a genes de bacteriófagos que codifican las proteínas encargadas de lisar las células de sus hospederos. En ese trabajo, dichas proteínas demostraron actividad lítica en *E. coli* y en *P. putida* (Nakayama *et al.* 2000). Esta última estrategia consistió en amplificar por PCR esos dos genes de *P. aeruginosa* PAO1 y con ayuda de plásmidos y promotores para controlar su expresión insertarlos en *A. vinelandii* OP. El gen PA0614 tiene similitud con un gen de bacteriófagos que codifica una proteína llamada holina, cuya función es acumularse en el citoplasma hasta conseguir una concentración que le permita agruparse en la membrana interna para hacer agujeros u hoyos. Este daño a la membrana interna de la célula permite a una segunda proteína denominada endolisina, igualmente codificada por un gen de bacteriófago, escapar al periplasma, donde hidroliza el peptidoglicano lisando finalmente a la célula (Young, 2013). El gen que codifica para la endolisina en bacteriófagos comparte gran similitud con el gen PA0629 en *P. aeruginosa* PAO1. Considerando la función de cada proteína se decidió probar con diferentes promotores en la cepa OP de *A. vinelandii*.

Se construyó una cepa (lysR2) donde el gen PA0629 se puso bajo el control del promotor Pc, cuya característica es ser constitutivo. En *E. coli* pUMA::lysR2, al añadir CHCl₃ después de cierto tiempo de incubación, con el fin de permeabilizar ligeramente las células, la caída en la D.O. era casi cinco veces más rápida que la cepa control, por lo que es un indicio de la eficiencia de la función del producto del gen PA0629 al facilitarle el escape al periplasma. En comparación a lo observado en *E. coli*, en la cepa lysR2 se observó un cambio menos pronunciado al añadir CHCl₃ en contraste con la cepa control (Figura 12a,b). La curva de crecimiento no permite discernir si la caída se debe únicamente al efecto del CHCl₃ o a la proteína producto del gen PA0629.

En otra transformación, LR2614, igualmente se dejó bajo control del promotor Pc constitutivo el gen PA0629, pero el gen PA0614 se puso bajo control del promotor del gen *Avin_51780* inducido cuando hay sacarosa en el medio. A las 12 horas de crecimiento de la cepa, se añadió sacarosa 15 g/L, sin embargo, después de 14 horas de crecimiento, no se observaron cambios en la D.O. de la cepa LR2614 en comparación a la parental (Figura 12c). Las observaciones en el microscopio, nos permitió notar que la acumulación de PHB en la célula parental y en la cepa LR2614 es muy similar. Cumulos de aparente PHB libre en el medio cuando las transformaciones eran permeabilizadas con CHCl_3 podría ser un indicio de que las proteínas están llevando a cabo su función (Figura 11).

Similar fue lo que sucedió con la transformación PA1429, donde ambos genes, PA0614 y PA0629, se colocaron bajo el control del promotor del gen *Avin_51780*. Al añadir sacarosa 15 g/L al medio no hubo diferencia alguna comparada con la cepa parental (Figura 12d). La cantidad de PHB visto bajo el microscopio en esta cepa y la parental fue muy similar, e igual que la transformación anterior, se distinguían pocos cúmulos de aparente PHB en el medio.

Se demostró en las tres transformaciones que los genes se clonaron en el genoma de *A. vinelandii*. También se comprobó que no hubo copias de la región silvestre en el caso de la cepa *lysR2* aunque no pudo comprobarse lo mismo en las cepas en donde se clonó en la región del gen *Avin_51780*. Otros experimentos que demostraran que los genes se están expresando en un alto nivel no pudieron realizarse. Por ello, como perspectivas de este proyecto recomendamos:

- Utilizar un promotor inducible para controlar la expresión del gen PA0629 y pueda observarse mejor su actividad en *A. vinelandii*.
- Realizar cinéticas de crecimiento en *E. coli* pUC19::holina-lisina para examinar el comportamiento del promotor del gen *Avin_51780* en otra bacteria y poderlo comparar con lo que se obtuvo en *A. vinelandii*.
- Realizar experimentos que midan la cantidad de ARNm de los genes PA0629 y PA0614 en las cepas transformadas para asegurarse de que los promotores utilizados expresan los genes en cantidades suficientes para lisar las células.
- Realizar una búsqueda de otros promotores adecuados para nuestro objetivo. Sobre todo, que hayan demostrado su eficacia en otros trabajos.

7. Conclusiones.

- Basándonos en la cinética de crecimiento, la actividad hidrolítica del producto del gen PA0629 fue evidente en el crecimiento de *E. coli*.
- El gen PA0629 junto con el promotor Pc segregaron por completo en el genoma de *A. vinelandii*.
- La curva de crecimiento en la transformación lysR2 mostró una ligera caída mayor al añadir CHCl₃ en comparación a la cepa parental, indicando también la existencia del efecto hidrolítico de la enzima endolisina.
- No podemos asegurar que las proteínas sean o no funcionales en *A. vinelandii*. Experimentos para medir el nivel de expresión o cantidad de ARNm de ambos genes posteriores ayudarán a resolver este cuestionamiento.

8. Referencias.

- Adams MH (1959) Bacteriophages. Interscience Publisher, INC., New York. pp. 620.
- Adaya M, Millán M, Peña C, Jenndrossek D, Espín G, Tinoco-Valencia R, Guzmán J, Pfeiffer D, Segura D (2018) Inactivation of an intracellular poly-3-hydroxybutyrate depolymerase of *Azotobacter vinelandii* allows to obtain a polymer of uniform high molecular mass **102**: 2693-2707.
- Barnhart BJ, Cox SH & Jett JH (1976) Prophage induction and inactivation by UV light. American Society for Microbiology **18**: 950-955.
- Bertani LE (1968) Abortive induction of bacteriophage P2'. Virology **36**: 87-103.
- Bishop PE, Supiano MA and Brill WJ (1977) Technique for isolating phage for *Azotobacter vinelandii*. Applied and environmental microbiology **33**: 1007-1008.
- Castañeda M, Guzmán J, Moreno S, Espín G (2000) The GacS sensor kinase regulates alginate and poly-β-hydroxybutyrate production in *Azotobacter vinelandii*. Journal of Bacteriology **182**: 2624-2628.
- Chen GQ and Page W (1994) The effect of substrate on the molecular weight of poly-β-hydroxybutyrate produced by *Azotobacter vinelandii* UWD **16**: 155-160.
- Chen GQ and Page W (1997) Production of poly-β-hydroxybutyrate by *Azotobacter vinelandii* in a two-stage fermentation process. Biotechnology Techniques **11**: 347-350.
- Díaz-Barrera A and Soto E (2010) Biotechnological uses of *Azotobacter vinelandii*: current state, limits and prospects. American journal of biotechnology **9**: 5240-5250.
- Duff JT and Wyss O (1961) Isolation and Classification of a new series of *Azotobacter* Bacteriophages. Journal of general microbiology **24**: 273-289.
- Espín G (2002) Biología de *Azotobacter vinelandii* en: Microbios en línea. Consultado en: <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/>
- Gavrilescu M and Chisti Y (2005) Biotechnology-a sustainable for chemical industry. Biotechnology Advances **23**: 471-499.
- González Y, Meza JC, González O y Cordova JA (2013). Síntesis y biodegradación de polihidroxialcanoatos; plásticos de origen microbiano. Revista Internacional de Contaminación Ambiental **29**: 77-115.
- Hand S, Gill J and Chu KH (2016) Phage-based extraction of polyhydroxybutyrate (PHB) produced from synthetic crude glycerol. Science of the total environment **557-558**: 317-321.
- Hegazi NA and Leitgeb (1976) *Azotobacter* bacteriophages in czechoslovakian soils. Plant and soil **45**: 379-395.
- Hernández-Eligio A, Castellanos M, Moreno S, Espín G (2011). Transcriptional activation of the *Azotobacter vinelandii* polyhydroxybutyrate biosynthetic genes phbBAC by PhbR and RpoS. Microbiology **157**: 3014-3023.

- Hernández-Eligio A, Moreno S, Castellanos M, Castañeda M, Nuñez C *et al* (2012) RsmA post-transcriptionally controls PhbR expression and polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology* **158**: 1953-1963.
- Hori K, Kaneko M, Tanji Y, Xing X and Unno H (2002) Construction of self-disruptive *Bacillus megaterium* in response to substrate exhaustion for polyhydroxybutyrate production. *Applied Microbiology Biotechnology* **59**: 211-216.
- Jendrossek D and Handrick R (2002) Microbial Degradation of Polyhydroxyalkanoates. *Annual Review of Microbiology* **56**: 403–32.
- Labrie SJ, Samson JE & Moineau S (2010) Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature Reviews Microbiology* **8**: 317-327.
- Lamont I, Brumby AM & Barry EJ (1989) UV induction of coliphage 186: prophage as an SOS function. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **86**: 5492-5496.
- Law JH and Slepecky RA (1960) Assay of poly- β -hydroxybutyric acid. *Journal of bacteriology* **82**: 33-36.
- Lee S (1995) Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering* **49**: 1-14.
- Madison LL and Huisman GW (1999) Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **63**: 21-53.
- Martínez V, García P, García JL and Prieto MA (2011) Controlled autolysis facilitates the polyhydroxyalkanoates recovery in *Pseudomonas putida* KT2440. *Microbial Biotechnology* **4**: 533-547.
- Millán M, Salazar M, Segura D, Castillo T, Díaz-Barrera A, and Peña C (2017) Molecular mass of Poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) produced by *Azotobacter vinelandii* is influenced by the polymer content in the inoculum. *Journal of Biotechnology* **259**: 50-55.
- Muriel-Millan LF, Castellanos M, Hernández-Eligio JA, Moreno S, and Espín G (2014) Posttranscriptional regulation of PhbR, the transcriptional activator of polyhydroxybutyrate synthesis, by iron and the sRNA ArrF in *Azotobacter vinelandii*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **98**: 2173-2182.
- Monk M & Kinross J (1975) The Kinetics of Derepression of Prophage E Following Ultraviolet Irradiation of Lysogenic Cells. *Molecular Genetics and Genomics* **137**: 263-268.
- Nakayama K, Takashima K, Ishihara H *et al.* (2000) The R-type pyocin of *Pseudomonas aeruginosa* is related to P2 phage, and the F-type is related to lambda phage. *Molecular Microbiology* **38**: 213-231.
- Noar JD and Bruno-Bárcena JM (2018) *Azotobacter vinelandii*: the source of 100 years of discoveries and many more to come. *Microbiology* DOI 10.1099/mic.0.000643.
- Oechslin F (2018) Resistance Development to bacteriophages occurring during bacteriophage therapy. *Viruses* **10**: 1-23.
- Omaña TV (2015) Actividad del sistema de restricción de DNA modificado de *Streptomyces coelicolor* contra la infección de fagos. Tesis licenciatura:

Universidad Nacional Autónoma de México. Consultada en: <http://132.248.9.195/ptd2015/septiembre/0735748/Index.html>

- Page WJ, Knosp O (1989) Hyperproduction of poly- β -hydroxybutyrate during exponential growth of *Azotobacter vinelandii* UWD. Applied and Environmental Microbiology **55**: 1334-1339.
- Pato ML (2001) Lambda excision revisited: testing a model for sinapsis of prophage ends. American Society for Microbiology **183**: 5206-5208.
- Peña C, Catillo T, García A *et al.* (2014) Biotechnological strategies to improve production of microbial poly-(3-hydroxybutyrate): a review of recent research work. Microbial Biotechnology **7**: 278-293.
- Peralta-Gil M, Segura D, Guzmán J, Servín González L, and Espín G (2002) Expression of the *Azotobacter vinelandii* Poly-beta-Hidroxybutyrate Biosynthetic phbBAC Operon is Driven by two overlapping promoters and is dependent on the transcriptional activator PhbR. Journal of Bacteriology **184**: 5672-5677.
- Reddy CSK, Ghai R, Rashmi and Kalia VC (2003) Polyhydroxyalkanoates: an overview. Bioresour. Technol **87**: 137-146.
- Resch S, Gruber K, Wanner G *et al.* (1998) Aqueous release and purification of poly(β -hydroxybutyrate) from *Escherichia coli*. Journal of Biotechnology **65**: 173-182.
- Sadik AS, El-Kamash NA and Mohamed SH (2016) Isolation and characterization of free-nitrogen fixer bacterial strains (*Azotobacter* sp.) and their phages from maize rhizosphere-soil at Taif. Pakistan Journal of Biotechnology **13**: 31-37.
- Segura D, Núñez S and Espín G (2014) *Azotobacter Cysts*. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0000295.pub2.
- Segura D and Espín G (2004) Inactivation of *pycA*, encoding pyruvate carboxylase activity, increases poly-beta-hydroxybutyrate accumulation in *Azotobacter vinelandii* on solid medium. Applied Microbiology and Biotechnology **65**: 414-418.
- Setubal JC & Almeida NF (2015) The *Azotobacter vinelandii* genome: an update. Biological Nitrogen Fixation, Volume I.
- Setubal JC, dos Santos P, Goldman BS *et al.* (2009) Genome sequence of *Azotobacter vinelandii*, an obligate aerobe specialized to support diverse anaerobic metabolic processes. Journal of bacteriology **191**: 4534-4545.
- Stevenson LH and Socolofsky MD (1966) Cyst formation and poly-beta-hydroxybutyric acid accumulation in *Azotobacter*. Journal Bacteriology **91**: 304-310.
- Turnbull L, Toyofuku M, Hynen A, *et al.* (2016) Explosive cell lysis as a mechanism for the biogenesis of bacterial membrane vesicles and biofilms. Nature communications DOI: 10.1038/ncomms11220
- Williams SF and Martin DP (2005) Applications of polyhydroxyalkanoates (PHA) in medicine and pharmacy, pp. 93-120. Online: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

- Woods WH & Barry EJ (1974) Prophage induction of noninducible coliphage 186. American Society for Microbiology **14**: 1349-1356.
- Young R (2013) Phage lysis: Do we have the hole story yet?. Current Opinion in Microbiology **16**: 2-14.
- Yu H, Yin J, Li H *et al.* (2000) Construction and selection of the novel recombinant *Eschericia coli* strain for poly(β -hydroxybutyrate) production. Journal of bioscience and bioengineering 89: 307-311.

9. Anexos.

1. Medios de cultivo y buffers

Burk Sacarosa (BS)

Soluciones para preparar 500 ml de medio líquido

- Sacarosa 20% (50 ml)
- Buffer fosfatos (50 ml)
K₂HPO₄ 0.046 M
KH₂PO₄ 0.015 M
- NA₂SO₄ 0.13 M (5 ml)
- CaCl₂ 2H₂O 0.05 M (5 ml)
- MgCl₂ 0.79 M (.5 ml)
- NaMoO₄ 0.00083 M (.5 ml)
- FeSO₄ 7H₂O 0.018 M (.5 ml)
- 400 ml de agua desionizada

Medio CM

Para preparar 500 ml

- Sacarosa 20% (50 ml)
- Buffer fosfatos (50 ml)
K₂HPO₄ 0.046 M
KH₂PO₄ 0.015 M
- NA₂SO₄ 0.13 M (5 ml)
- CaCl₂ 2H₂O 0.05 M (5 ml)
- MgCl₂ 0.79 M (.5 ml)
- 400 ml de agua desionizada

BurK Sacarosa Solido (BSS)

- Agar 1.5 %
- Buffer fosfatos (50 ml)
K₂HPO₄ 0.046 M
KH₂PO₄ 0.015 M
- NA₂SO₄ 0.13 M (5 ml)
- CaCl₂ 2H₂O 0.05 M (5 ml)
- MgCl₂ 0.79 M (.5 ml)
- NaMoO₄ 0.00083 M (.5 ml)
- FeSO₄ 7H₂O 0.018 M (.5 ml)
- 400 ml de agua desionizada

Burk Sacarosa Suave (BSs)

- Agar .5 %
- Buffer fosfatos (50 ml)
K₂HPO₄ 0.046 M
KH₂PO₄ 0.015 M
- NA₂SO₄ 0.13 M (5 ml)
- CaCl₂ 2H₂O 0.05 M (5 ml)

- $MgCl_2$ 0.79 M (.5 ml)
- $NaMoO_4$ 0.00083 M (.5 ml)
- $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.018 M (.5 ml)
- 400 ml de agua desionizada

Medio CM sólido para preparar células competentes

- Agar 1.5% (400 ml)
- Sacarosa 20% (50 ml)
- Buffer fosfatos (50 ml)
 K_2HPO_4 0.046 M
 KH_2PO_4 0.015 M
- Na_2SO_4 0.13 M (5 ml)
- $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.05 M (5 ml)
- $MgCl_2$ 0.79 M (.5 ml)

Buffer SM

Soluciones para aforar a 100 ml con agua milli-Q

- Tris-HCl 1 M, pH 7.5
- Mg_2SO_4 1 M
- NaCl 5 M
- Gelatina 0.1 g

2. Protocolos

P1. Purificación de banda

- Añadir la solución "Binding Buffer" al tubo con la banda elegida, en una concentración de 100 μ l de solución por cada 100 mg de agarosa.
- Incubar la muestra a 60°C hasta disolverse.
- Ya disuelta, pasar a las columnas y centrifugar 1 min x 13000 rpm. Se tira el sobrenadante.
- Añadir 700 μ l de "Washing Solution" y centrifugar 1 min x 13000 rpm. Tirar sobrenadante.
- Se vuelve a centrifugar 1 min x 13000 rpm.
- Pasar la columna a un tubo eppendorf estéril y añadir cuidadosamente sobre la membrana 30-40 μ l de agua estéril Dejar reposar 10 min.
- Centrifugar 1 min x 13000 rpm.

P2. Purificación de ADN por columna, "Kit..."

- En las columnas del Kit colocar el plásmido extraído por perclorato.
- Añadir 500 μ l de Binding Buffer, y centrifugar a 1 min a 13,000 rpm.
- Tirar sobrenadante, añadir 300 μ l de "Washing Solution", y centrifugar 1 min a 13,00 rpm.
- Tirar sobrenadante y centrifugar 1 min a 13,000 rpm.
- Añadir 40 μ l de H₂O a la membrana, dejar reposar 10 minutos para eluir, colocar la columna en un tubo eppendorf y centrifugar 1 min a 13,000.

P3. Preparación de células competentes de *Azotobacter vinelandii*

- Crecer en caja con BS sólido *A. vinelandii* por 48 hrs.

- Subcultivar 2 veces en cajas de CM las células por 24 hrs.
 - En un tubo de centrifuga estéril recoger todas las células y resuspenderlas en MgSO₄. Centrifugar 7 minutos a 7,000 rpm.
 - Tirar el sobrenadante y resuspender el pellet en 250 µl de CM líquido.
 - Almacenar en refrigeración las células en tubos eppendorf.
- P4. Transformación de células de *Azotobacter vinelandii*
- En un tubo eppendorf 1.5 ml mezclar 150 µl de células competentes de *A. vinelandii* y el plásmido linearizado que lleva el gen o genes que se quieren clonar.
 - Dejar reposar 10 minutos en hielo.
 - En cajas con CM sólido colocar la mezcla de células competentes/plásmido y con una asa remover en forma circular la mezcla, sin extenderse demasiado en la caja.
 - Dejar secar muy bien de 15 a 20 minutos.
 - Incubar a 30°C de 24 a 48 horas.
 - Con una asa recoger todas las células y resuspender en 1 ml de MgSO₄ y centrifugar 1 minuto a 13,000 rpm.
 - Tirar sobrenadante y resuspender el pellet en 500 µl de MgSO₄.
 - Plaquear con perlas en cajas de BS sólido con el antibiótico para seleccionar.
 - Incubar a 30°C por 48 horas.

3. Mapas de plásmidos utilizados y modelos de las clonaciones

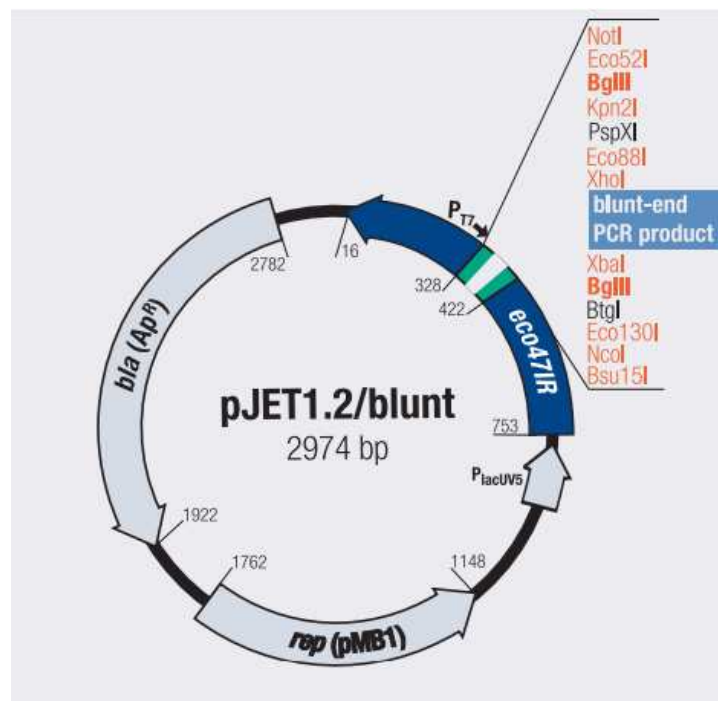


Ilustración 1. Vector pJET utilizado en este proyecto.

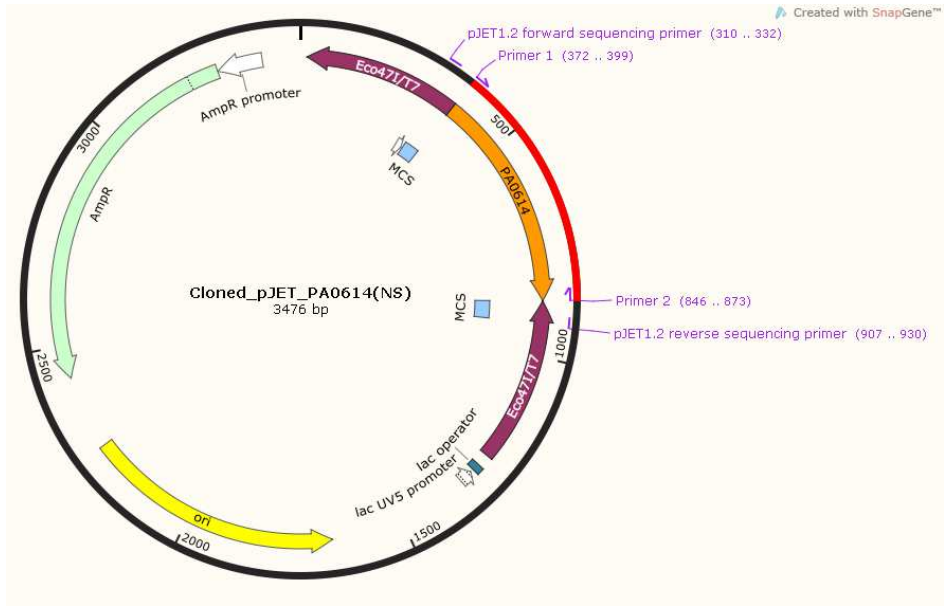


Ilustración 2. Vector pJET::holina

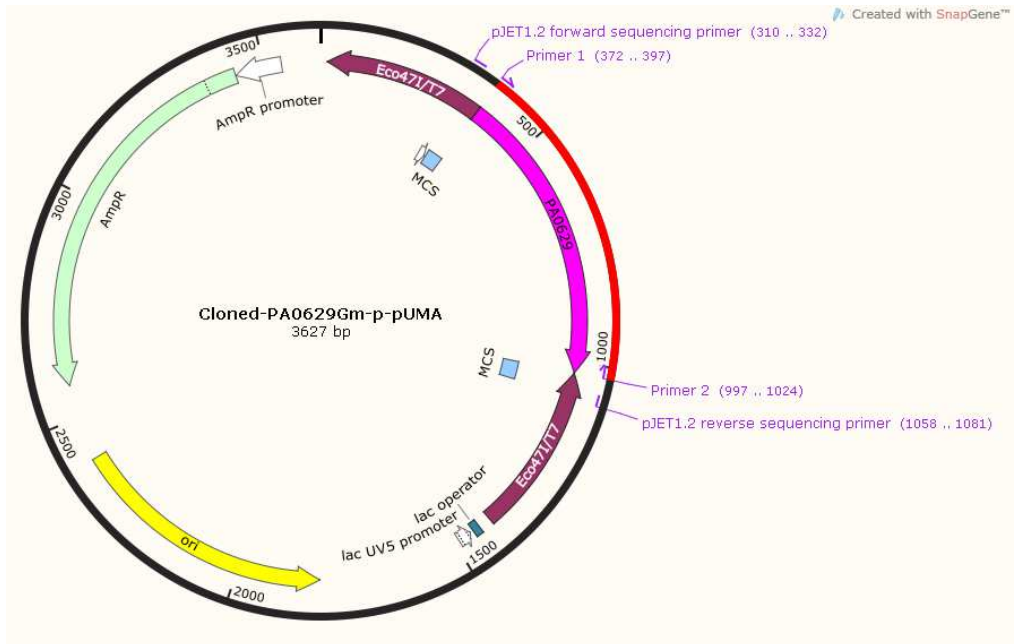


Ilustración 3. Vector pJET::lysGm

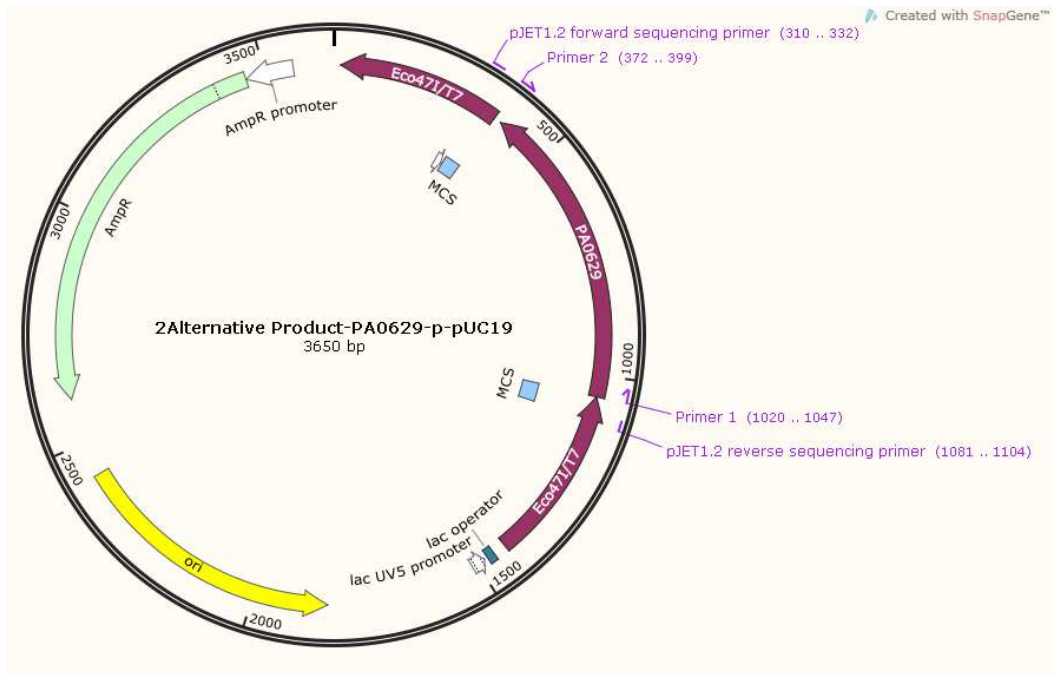


Ilustración 4. Vector pJET::lys