

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO



ESCUELA SUPERIOR DE APAN

TESIS DE LICENCIATURA

Influencia del regulador transcripcional AmrZ sobre la acumulación de PHB y la expresión del operón biosintético *phbBAC* en *Azotobacter vinelandii*

Para obtener el título de
Licenciada en Ingeniería en Biociencias

P R E S E N T A
Scherezada Orgaz Ramírez

Director
Dra. Cinthia Ernestina Núñez López

Codirector
Dr. Martín Peralta Gil

Apan, Hidalgo., México a 30 de enero de 2026.

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la tutoría de la Dra. Cinthia Ernestina Núñez López.

El desarrollo de este trabajo fue financiado por un proyecto del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, DGAPA-PAPIIT (IN215924) y también me otorgó una beca de estudios de licenciatura, lo que agradezco ampliamente



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
Escuela Superior de Apan

Campus Apan

Número de control: ESAp-036/2025

Asunto: Autorización de impresión de tesis

Scherezada Orgaz Ramírez

P.D.L.I.B.C.

P R E S E N T E

Por este medio le comunico que, el jurado asignado a la pasante de la licenciatura en Ingeniería en Biociencias **Scherezada Orgaz Ramírez (439499)**, a quienes les presentó el trabajo para su titulación en la modalidad de tesis con el título **“Influencia del regulador transcripcional AmrZ sobre la acumulación de PHB y la expresión del operón biosintético phbBAC en Azotobacter vinelandii”**, después de la revisión ha autorizado la impresión.

A continuación, se presentan las firmas de conformidad de los miembros de este jurado:

PRESIDENTE: Dr. Martín Peralta Gil

SECRETARIO: Dr. Cinthia Ernestina Núñez López

PRIMER VOCAL: Dr. Jaime Alioscha Cuervo Parra

SEGUNDO VOCAL: Dr. Víctor Hugo Pérez España

TERCER VOCAL: Dra. Teresa Romero Cortes

SUPLENTE 1: Dra. María Magdalena Armendáriz Ontiveros

SUPLENTE 2: Dr. Alejandro Morales Peñaloza

ATENTAMENTE
“Amor, Orden y Progreso”
Chimalpa, Apan, Hgo., México a 30 de enero de 2026



Dra. María Magdalena Armendariz Ontiveros
Coordinador de Ingeniería en Biociencias

“Amor, Orden y Progreso”

Carretera Apan - Calpulapan Km. 8, Colonia Chimalpa
Tlalayote, Apan, Hidalgo, México C.P. 43900
Teléfono: 7717172000 Ext. 50901
esap@uaeh.edu.mx



uaeh.edu.mx

DEDICATORIA

A mis abuelos: José Cruz Orgaz Ramírez y Raquel Vargas Hernández.

Gracias por cada sacrificio, por cada palabra de aliento y por cada gesto de amor que me sostuvo en los momentos difíciles. Ustedes han sido mi refugio, mi inspiración y mi fuerza silenciosa a lo largo de este camino.

Cada logro que hoy celebro lleva impreso el apoyo inquebrantable que me dieron la confianza cuando dudaba, el abrazo cuando lo necesitaba y la ayuda generosa que me permitió seguir adelante. Con su sabiduría y ternura me han mostrado lo que significa el amor verdadero y el esfuerzo compartido, siendo parte fundamental de esta meta cumplida. Con la más profunda gratitud y el más grande cariño, dedico estas páginas a quienes nunca dejaron de creer en mí.

Gracias por ser mi pilar, por enseñarme que con trabajo y perseverancia todo es posible. Este logro también es suyo.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más profundo agradecimiento a la Doctora Cinthia Núñez, por su confianza, por brindarme la oportunidad de integrarme al equipo y participar en un proyecto tan significativo. Su guía, paciencia y generosa manera de compartir el conocimiento marcaron una diferencia invaluable, inspirándome a seguir aprendiendo con entusiasmo y curiosidad.

A la Dra. Guadalupe Espín y al Dr. Daniel Segura, agradezco su disposición constante para aconsejarme y compartir su experiencia, creando un entorno de trabajo estimulante y lleno de motivación. Su apoyo hizo posible que mi participación en el proyecto fuera profunda y gratificante.

Al Dr. Martín Peralta, le agradezco su acompañamiento incondicional y su respaldo emocional, que transformaron los desafíos en aprendizajes e hicieron que cada experiencia se viviera plenamente.

Mi gratitud también es para la Biol. Soledad Moreno, la M.C Josefina Guzmán y la M.B María Luisa Tabche por su ánimo constante, sus valiosos consejos y su apoyo técnico en todo el proyecto.

Extiendo mi sincero agradecimiento a la Unidad de Microscopía Electrónica del Instituto de Biotecnología, cuyo apoyo técnico hizo posible la obtención de las micrografías incluidas en este trabajo.

Al grupo Espín, gracias por su colaboración y apoyo diario. A José Luis y Maguitos, gracias por encargarse de las tareas más difíciles y permitirme hacer tantas cosas en tan poco tiempo. A mis compañeros Jess, Taly, Andy, Marina, Almita, Frida y Andu, les agradezco la amistad, los consejos y las risas compartidas, que hicieron los días de trabajo más llevaderos. De manera especial, agradezco a Víctor y Citlalli, cuya paciencia, cuidado y confianza me brindaron libertad para aprender y seguridad en cada paso.

A mi mamá, Lucero Ramírez, a mi papá, Alejandro Orgaz, y a mi hermano, Hammurabi Orgaz, les expreso mi más profundo agradecimiento por su amor incondicional y su apoyo constante a lo largo de este proceso. Su presencia, comprensión y escucha atenta fueron un refugio invaluable en los momentos de incertidumbre y cansancio, y una fuente permanente de fortaleza y motivación. Gracias a sus palabras de aliento, paciencia y confianza, pude afrontar cada reto con serenidad y perseverar hasta alcanzar esta meta. Este logro no habría sido posible sin su acompañamiento cercano, su ejemplo y su fe en mí; por ello, cada paso dado y cada resultado obtenido llevan también su nombre.

A mis amigos Luis Ángel Millán, Adriana Castillo, Alberto Carrizo, Belén Olvera y Jonathan Rueda, les agradezco profundamente su amistad y compañía. Con Luis y Adri aprendí y crecí gracias a su generosidad; con Beto compartí risas y momentos inolvidables; y con Bel, la cercanía y el apoyo constante hicieron cada etapa más llevadera. De manera especial, agradezco a Jona, amigo que conocí antes de la carrera, por mostrarme este camino, animarme a seguirlo y acompañarme en la búsqueda de nuestros sueños. Su presencia transformó los desafíos en experiencias compartidas y significativas.

Finalmente, a Noe G. Canales, mi compañero y apoyo constante, gracias a su amor, comprensión y por estar presente incluso en los momentos más difíciles. Su cariño, paciencia y cercanía me dieron la fuerza y la seguridad necesarias para seguir adelante cuando todo parecía más complicado. Más que acompañarme, fue una parte esencial de este camino, compartiendo conmigo cada logro, cada duda y cada emoción. Su presencia marcó una diferencia invaluable en mi vida y en todo lo que pude alcanzar.

"Don't stop believing how you got here, Hold on to that feelin', Gonna make it far enough"

— ATEEZ, "Enough"

RESUMEN

La creciente preocupación por la contaminación ambiental causada por plásticos derivados del petróleo ha impulsado la búsqueda de alternativas biodegradables. Entre estos, el polihidroxibutirato (PHB), un biopolímero de la familia de los polihidroxialcanoatos (PHAs), ha cobrado gran interés debido a su biodegradabilidad y biocompatibilidad.

Azotobacter vinelandii es un modelo bacteriano ampliamente estudiado por su capacidad de producir PHB. En este contexto, el factor transcripcional AmrZ, previamente caracterizado en *Pseudomonas aeruginosa* como regulador maestro de múltiples vías metabólicas, ha mostrado tener un papel relevante en el metabolismo de *A. vinelandii*. Antecedentes previos de estudios transcriptómicos sugieren que AmrZ podría influir en la expresión del operón biosintético *phbBAC*, responsable de la producción de PHB.

El objetivo de este trabajo fue establecer la influencia del regulador transcripcional AmrZ sobre la acumulación de PHB y la expresión del operón biosintético *phbBAC* en *A. vinelandii*. Para ello, se generaron distintas cepas mutantes y complementadas con modificaciones en los genes *algA* y *amrZ*, así como cepas que portan fusiones transcripcionales *PphbB-gusA*. La correcta construcción de estas cepas fue confirmada mediante PCR. Se evaluó la acumulación de PHB y se determinó la actividad de β-glucuronidasa (producto del gen reportero *gusA*) como indicador indirecto de la expresión de *phbB*.

Los resultados mostraron que la ausencia de AmrZ provocó un incremento significativo en la acumulación de PHB en comparación con la cepa de referencia, particularmente en la fase estacionaria tardía (72 h). Este fenotipo se revirtió en la cepa complementada de *amrZ*, confirmando el papel represor de este regulador. Asimismo, la actividad reportada por la fusión transcripcional *PphbB-gusA* indicó que AmrZ ejerce un efecto negativo sobre la expresión del operón *phbBAC* en la misma etapa de crecimiento.

Este estudio demuestra que AmrZ actúa como un regulador negativo de la expresión del operón biosintético *phbBAC* y consecuentemente de la acumulación de PHB durante la fase estacionaria tardía. Estos hallazgos sugieren que la manipulación de este factor podría constituir una estrategia prometedora para el diseño de cepas con una capacidad mejorada de producción de PHB. Este conocimiento aporta bases para aplicaciones

biotecnológicas orientadas al aprovechamiento de biopolímeros como alternativas a los plásticos convencionales.

ÍNDICE

RESUMEN	v
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1.- Generalidades de <i>Azotobacter vinelandii</i>	3
1.2.- Ciclo celular de <i>A. vinelandii</i>	3
1.3.- Síntesis de Alginato	5
1.4.- Polihidroxialcanoatos.....	6
1.5.- Poli- β -Hidroxibutirato (PHB).....	7
1.6.- Vía biosintética y regulación de PHB	8
1.7.- El alginato y PHB compiten por fuente de carbono	10
1.8.- El factor transcripcional AmrZ	12
2. ANTECEDENTES	15
3. JUSTIFICACIÓN	17
4. HIPÓTESIS	18
5. OBJETIVOS	19
5.1.- Objetivo General.....	19
5.2.- Objetivos Particulares	19
6. MATERIALES Y MÉTODOS	20
6.1.- Cepas y Oligonucleótidos utilizados.	20
6.2.- Condiciones de cultivo	21
6.3.- Preparación de cultivos	22
6.4.- Preparación de células competentes	22
6.5.- Transformación de células competentes.....	22
6.6.- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	23
6.7.- Cuantificación de proteína	23
6.8.- Cuantificación de PHB	24
6.9.- Determinación de actividad de β -glucuronidasa.....	25
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
7.1.- Confirmación de la transformación de la cepa SO001 (<i>algA::Km, ΔamrZ::Gm</i>)	27
7.2.- Confirmación de la cepa SO002 (<i>algA::Km,ΔamrZ::Gm/amrZ⁺</i>)	28

7.3.- Determinación cualitativa de producción de PHB en las cepas JG519, SO001 y SO002	29
7.4.- AmrZ ejerce un efecto negativo sobre la producción de PHB en la fase estacionaria tardía	30
7.5.- Visualización de gránulos de PHB en las cepas JG519, SO001 y SO002	32
7.6.- Construcción de cepas con la fusión <i>PphbB-gusA</i> en el fondo de referencia y en el fondo <i>amrZ</i>	33
7.7.- Confirmación de la construcción <i>PphbB-gusA</i> en el fondo de referencia <i>algA::Km</i>	34
7.8.- Confirmación de la construcción <i>PphbB-gusA</i> en el fondo $\Delta amrZ::Gm$	35
7.9.- Determinación cualitativa de β -glucuronidasa en las cepas SO003 y SO005 ..	37
7.10.- AmrZ ejerce un efecto negativo en la expresión del operón <i>phbBAC</i> en la fase estacionaria tardía	38
8. CONCLUSIONES	40
9. REFERENCIAS.....	41
LISTA DE FIGURAS	46
LISTA DE TABLAS	47
GLOSARIO DE ABREVIATURAS.....	48
ANEXO	49

1. INTRODUCCIÓN

1.1.- Generalidades de *Azotobacter vinelandii*

Azotobacter vinelandii es una bacteria Gram-negativa, perteneciente a la familia *Pseudomonadaceae*. En su estado vegetativo tiene un metabolismo estrictamente aeróbico con la capacidad de fijar nitrógeno (Kennedy *et al.*, 2005).

A. vinelandii es una bacteria pleomórfica, generalmente presenta una forma alargada ovalada (Fig. 1A), pero puede presentarse desde bacilos hasta coccoides. Se ha reportado que tiene una longitud aproximada de 5 μm y un diámetro mayor a 2 μm , tiene motilidad gracias a sus flagelos perítricos (Fig 1B). Además, tiene la característica de ser un organismo poliploide (Sadoff, 1975; Kennedy *et al.*, 2005).

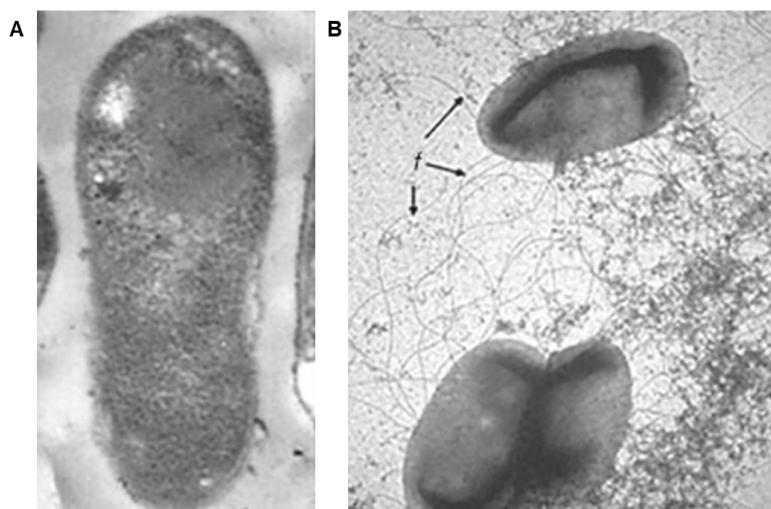


Figura 1. Micrografías electrónicas de una célula de *A. vinelandii*. A) Una célula en estado vegetativo. **B)** Célula vegetativa teñida negativamente para la visualización de flagelos; f, flagelos (Segura *et al.*, 2020).

1.2.- Ciclo celular de *A. vinelandii*

El ciclo celular de *A. vinelandii* se divide en dos estados: el estado vegetativo, en el cual, la bacteria presenta un crecimiento exponencial, seguido de una etapa en estado estacionario al igual que muchas otras bacterias; y el de enquistamiento, que comienza cuando, bajo condiciones adversas, la bacteria sufre un proceso de diferenciación celular. En este último estado *A. vinelandii*,

pierde sus flagelos y reemplaza los fosfolípidos de la membrana por una familia de 5-n-alkilresorcinoles y 6-n-alkilpirones.

La frecuencia de enquistamiento de manera natural es inferior al 0.01% (Lin & Sadoff, 1968; Reusch & Sadoff, 1983), pero se pueden inducir cuando las células en fase logarítmica se cultivan en n-Butanol o β -Hidroxibutirato (BHB) como única fuente de carbono (Hitchins & Sadoff, 1970; Sadoff, 1975) incrementando la frecuencia de cambios morfológicos hasta un 90% (Lin & Sadoff, 1968; Reusch & Sadoff, 1983).

El proceso para obtener quistes maduros tarda 5 días, obteniendo como resultado una célula esférica en reposo (cuerpo central), rodeada de una cápsula interna denominada intina y una capa externa denominada exina (Sadoff, 1975; Segura *et al.*, 2020) (Fig. 2).

En el proceso de diferenciación, *A. vinelandii* produce dos productos de interés biotecnológico: el alginato, un exopolisacárido lineal (Sadoff, 1975), y el Poli- β -Hidroxibutirato (PHB), un polihidroxialcanoato intracelular (Chen *et al.*, 2000).

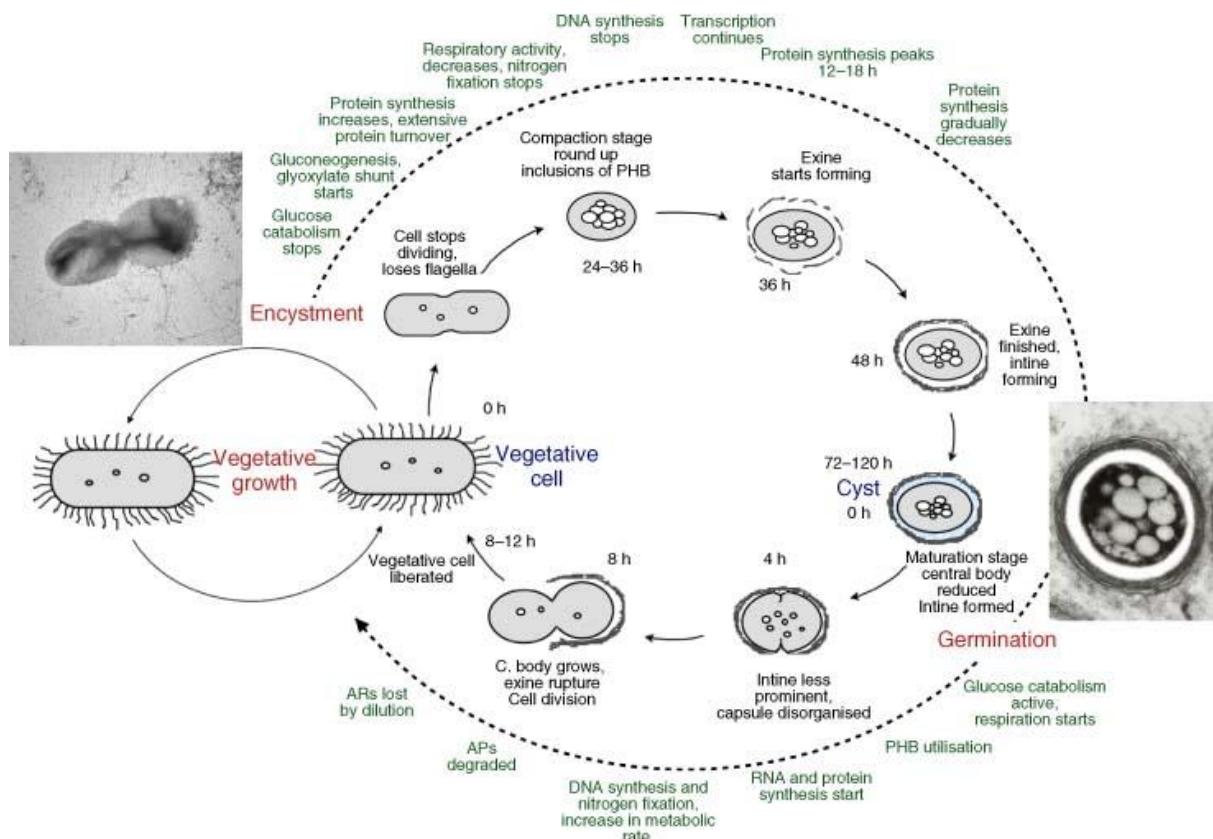


Figura 2. Diagrama del ciclo de vida de *A. vinelandii*. Se muestran las diferentes etapas de desarrollo, los cambios morfológicos y los dos tipos de células: vegetativas y quistes; AR: alquilresorcinoles; AP: alquiltrironas; PHB: polihidroxibutirato; h: horas (Segura *et al.*, 2020).

1.3.- Síntesis de Alginato

El alginato es un exopolisacárido que forma parte de la cubierta del quiste, la cual se divide en intina y exina (Sadoff, 1975). En especies de *Pseudomonas*, el alginato constituye la base para la formación de biopelículas. En *A. vinelandii*, este polímero actúa como una barrera protectora contra metales pesados y contribuye a la supervivencia de la bacteria (Sabra *et al.*, 2001; Núñez *et al.*, 2022).

La síntesis de este polímero depende del producto los genes estructurales de alginato, *alg* (*algD*, *alg8*, *alg44*, *algK*, *algJ*, *algX*, *algL*, *algI*, *algV*, *algF* y *algA*), los cuales están agrupados en una región cromosómica encabezados por el gen maestro *algD* (Fig. 3A); sin embargo, situados en diferentes *locus*, existen diversos genes que intervienen en la modificación de este exopolisacárido o en su regulación génica (Núñez *et al.*, 2022).

Podemos resumir la síntesis de alginato en cuatro importantes pasos (Fig. 3B): la síntesis del precursor ácido-GDP-manurónico, codificada por los primeros genes en la vía *algA* y *algC*; la polimerización; modificación y tránsito periplásmico y la exportación (Galindo *et al.*, 2007; Urtuvia *et al.*, 2017).

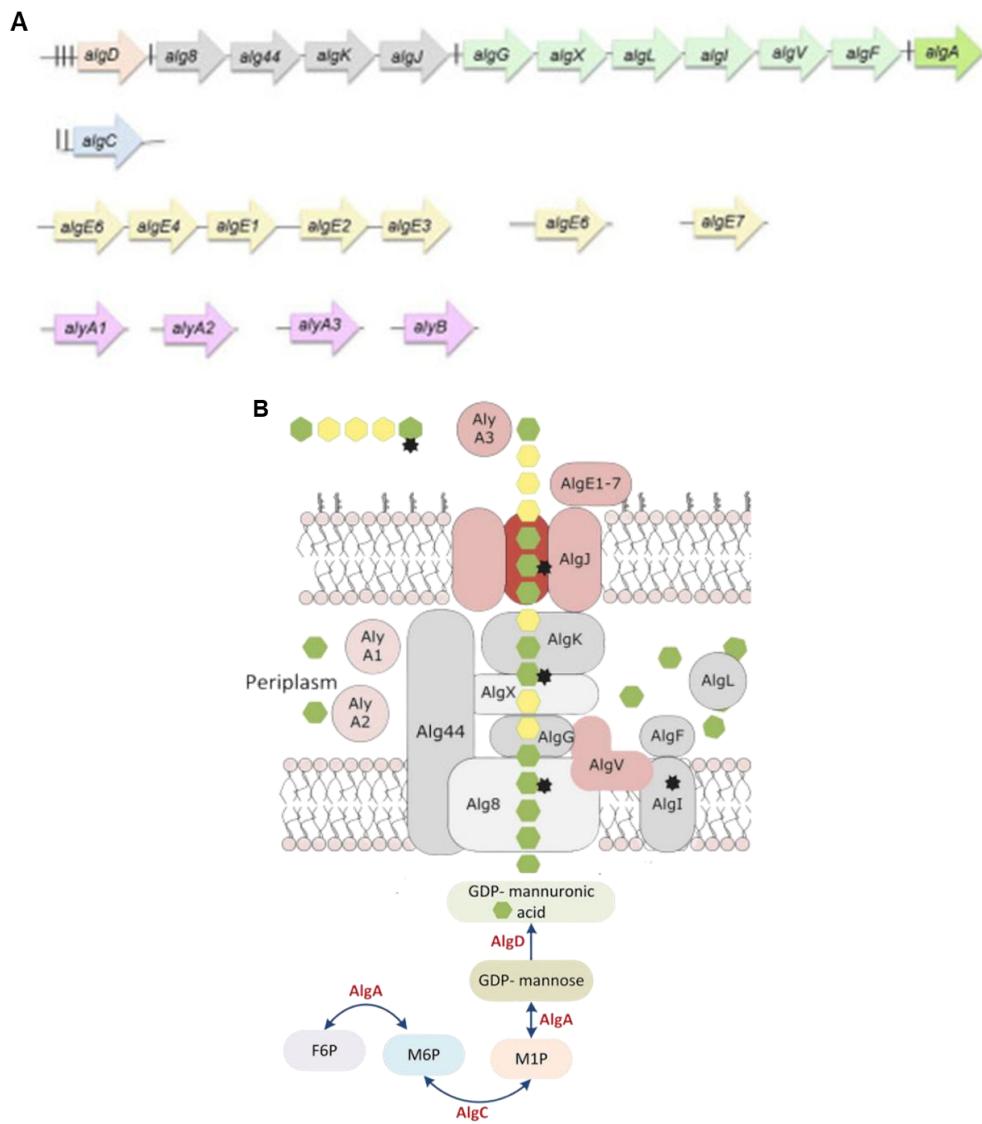


Figura 3. Síntesis de alginato en *A. vinelandii*. A) Arreglo genético de los genes biosintéticos del alginato (Núñez *et al.*, 2022). **B)** Representación esquemática de la biosíntesis de alginato (Urtuvia *et al.*, 2017).

1.4.- Polihidroxialcanoatos

Los polihidroxialcanoatos (PHAs), son polímeros intracelulares sintetizados en condiciones donde existe un desequilibrio nutricional, en el cual hay suficiente fuente de carbono en el medio, pero un nutriente limita el crecimiento; esto puede ocurrir en diversas bacterias, como lo son *Alcaligenes latus*, *Pseudomonas putida* LS46, *Methylobacterium* sp. ZP24, *Bacillus mycoides* RLJ B-017 y cepas recombinantes de *Escherichia coli* y *A. vinelandii* (Choi & Lee, 1997; Koller *et al.*, 2010; Blunt *et al.*, 2019), las cuales lo utilizan como fuente de

carbono y energía (Fig. 4B) (Brandl *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 2000; Velázquez-Sánchez *et al.*, 2020).

Los PHAs son poliésteres de interés biotecnológico debido a sus propiedades biodegradables y biocompatibles; son estructuralmente diversos, teniendo más de 150 diferentes tipos, conformados por cadenas de monómeros de (R)-hidroxialcanoatos.

Con base en el número de carbonos de cada cadena lateral pueden clasificarse en dos tipos: PHAs de cadena larga (conocidos como mcl-PHAs) siendo de ≥ 6 carbonos y de cadena corta (conocidos como scl-PHAs) teniendo entre 4 y 5 carbonos (Brandl *et al.*, 1990; Aldor & Keasling, 2003; Velázquez-Sánchez *et al.*, 2020).

1.5.- Poli- β -Hidroxibutirato (PHB)

El PHB es el miembro más común en la familia de PHAs (Chen *et al.*, 2000). Es un homopolímero compuesto de unidades de (R)-3-hidroxibutirato (Fig. 4A), con una masa molecular entre 200 y 20 000 kDa (Kusaka *et al.*, 1998; Sudesh *et al.*, 2000; Lenz & Marchessault, 2005; Peña *et al.*, 2014).

Existen diferentes bacterias capaces de producir PHAs, en el caso específico de PHB, este puede ser producido por *Cupriavidus necator* (también conocida como *Ralstonia eutropha* o *Alcaligenes eutrophus*), *Azohydromonas lata*, *Pseudomonas oleovorans*, *P. putida*, *Aeromonas hydrophila*, *Paracoccus denitrificans*, *Methylobacterium extorquens*, *Bacillus* spp., *A. vinelandii* y *Escherichia coli* recombinante, la cual expresa los genes de PHB de *C. necator*, *A. lata* o *A. vinelandii* (Lee, 1996; Olivera *et al.*, 2001; Chen, 2009; Centeno-Leija *et al.*, 2014).

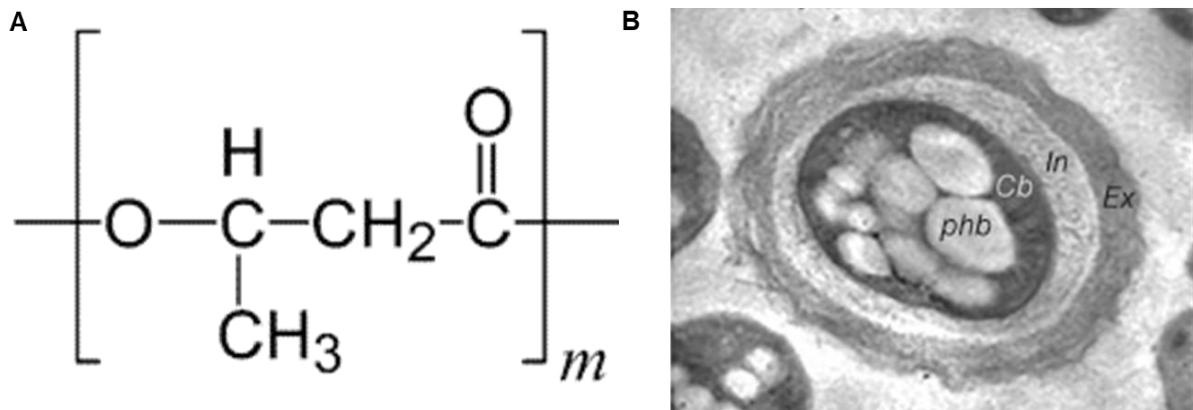


Figura 4. Estructura química del PHB y su morfología en *A. vinelandii*. A) Estructura química del PHB (Lenz & Marchessault, 2005). B) Micrografía electrónica de un quiste de *A. vinelandii*, donde podemos apreciar: Ex: exina; In: intina; Cb: cuerpo central; PHB: gránulos de polihidroxibutirato (Segura *et al.*, 2020).

Este biopolímero presenta características de interés biotecnológico. Se destaca por sus propiedades termoplásticas, similares a las de los plásticos derivados del petróleo. Además, es biodegradable, lo que permite su uso en la producción de diferentes recursos como: contenedores, recubrimientos, biberones y artículos desechables (máquinas de afeitar, pañales, tazas, bolsas, tapas, etcétera) (Chen, 2009).

Igualmente, es biocompatible, lo que permite su uso en el contexto médico, empleándose como un tipo de material de suturas y dispositivos cardiovasculares, reparación de nervios, cicatrización de heridas, andamios de ingeniería de tejidos, sistemas de liberación de medicamentos, materiales dentales, e incluso como biomarcadores y biosensores (Grage *et al.*, 2009; Panchar *et al.*, 2013; Peña *et al.*, 2014).

1.6.- Vía biosintética y regulación de PHB

La síntesis de PHB comienza con la condensación de 2 moléculas de Acetyl-CoA para formar Acetoacetil-CoA. La enzima que cataliza esta reacción es la beta-cetotiolasa, codificada por el gen *phbA*, liberando Coenzima A (CoA), en el proceso. Posteriormente una acetoacetil-CoA reductasa, codificada por el gen *phbB*, convierte el acetoacetil-CoA en beta-hidroxibutiril-CoA usando NADPH (Peña *et al.*, 2014).

Finalmente, la enzima PHB sintasa, codificada por el gen *phbC*, polimeriza monómeros de beta-hidroxibutiril-CoA a PHB, liberando finalmente cadenas de PHB (Pettinari *et al.*, 2001; Segura *et al.*, 2003; Lenz & Marchessault, 2005; Velázquez- Sánchez *et al.*, 2020) (Fig. 5A).

Las enzimas necesarias para la biosíntesis de PHB son codificadas por el operón *phbBAC* (Fig. 5B) el cual se expresa una vez que se presentan las condiciones necesarias para su activación.

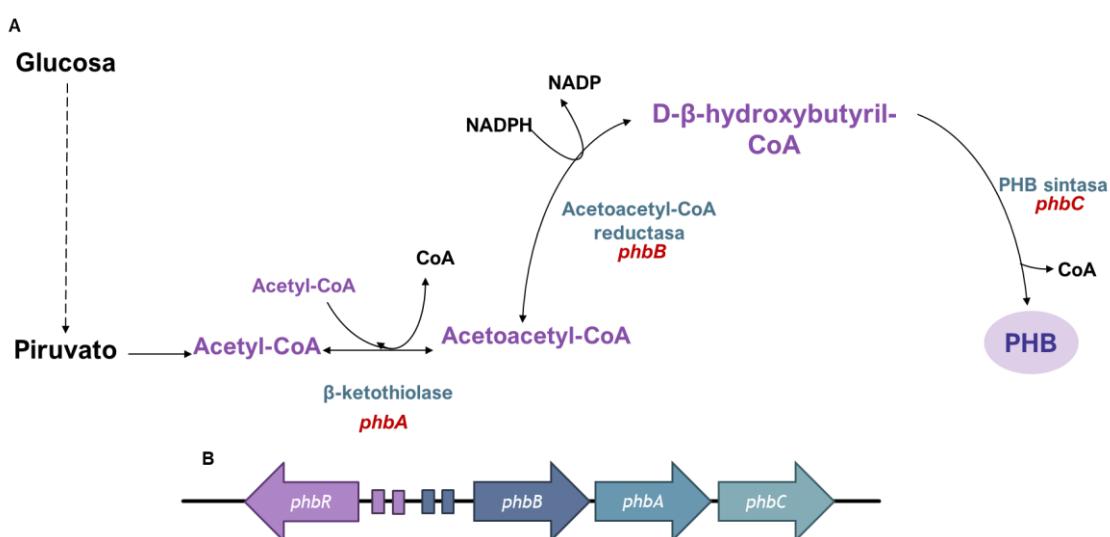


Figura 5. Síntesis de PHB en *A. vinelandii*. A) Vías metabólicas y genética implicadas en la producción de PHB (Tomado y modificado de Pettinari *et al.*, 2001; Segura *et al.*, 2003. Peña *et al.*, 2014. **B)** Representación esquemática del locus *phb* de *A. vinelandii*.

La ruta de biosíntesis de PHB en *A. vinelandii* posee una regulación compleja, orquestada por distintas estrategias de regulación genética, ya sean positivos o negativos, a nivel transcripcional el promotor es dependiente del factor sigma de fase estacionaria, RpoS; y es activado transcripcionalmente por el regulador PhbR, producto del gen divergente a *phbBAC* (Fig. 5B), los cuales regulan positivamente la síntesis de PHB.

Por otro lado, el sistema Gac/Rsm es uno de los más relevantes en la regulación post transcripcional del operón *phbBAC*. En este sistema la proteína RsmA impide la traducción de los mensajeros de *phbR* y del operón *phbBAC*

(Fig. 6) (Velázquez-Sánchez *et al.*, 2020), mientras que los pequeños RNAs RsmZ1-7 antagonizan la actividad de RsmA. A nivel de la membrana se encuentra el sistema de dos componentes GacS/A involucrado en la activación del operón *rsmZ1-7*.

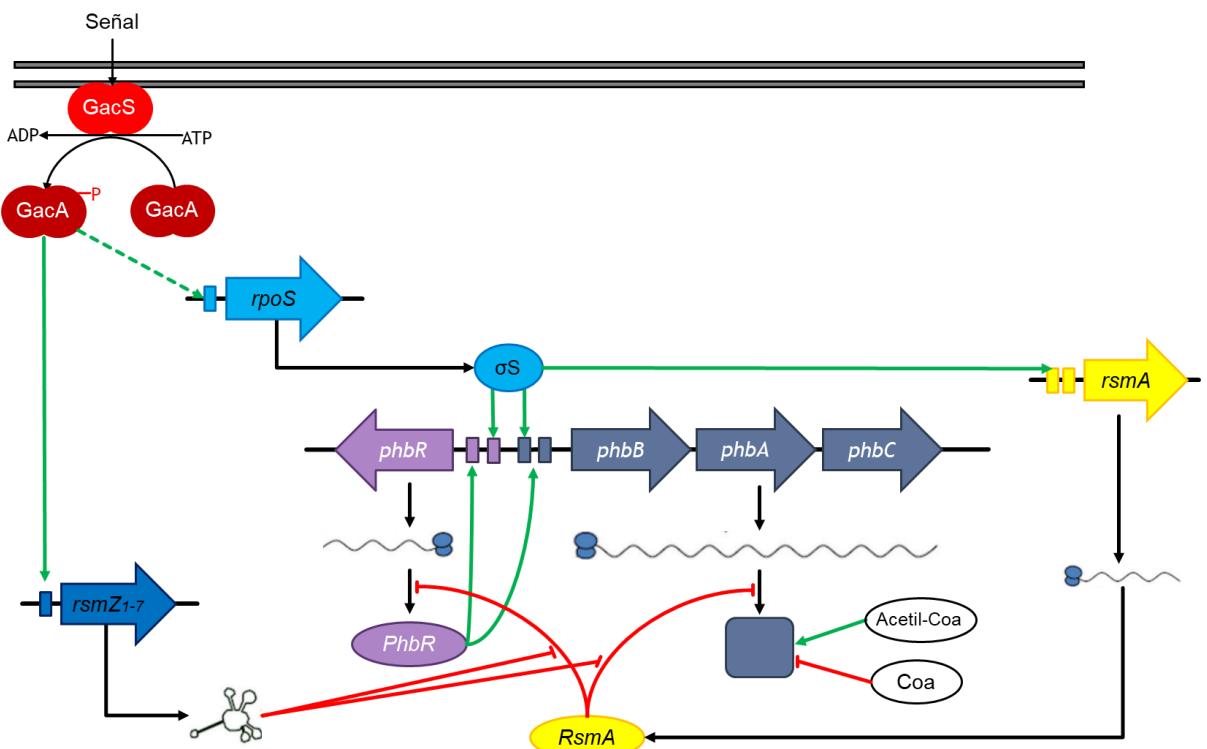


Figura 6. Cascada de regulación de la expresión del operón *phbBAC* en *A. vinelandii* (Tomado y modificado de Velázquez-Sánchez *et al.*, 2020).

1.7.- El alginato y PHB compiten por fuente de carbono

Debido a que el PHB y el alginato poseen esqueletos de carbono en su estructura central, estos dos polímeros compiten por la fuente de carbono disponible en los cultivos de *A. vinelandii*. En el caso de que se utilice glucosa como única fuente de carbono, esta se canaliza tanto a la síntesis de alginato como a la síntesis de PHB (Fig. 7A).

Este comportamiento se confirma en cepas con mutaciones en genes biosintéticos para la producción de estos biopolímeros. En una mutante *phbB*⁻ se observa un fenotipo de cepas carentes de gránulos de PHB, pero con una

sobreproducción de alginato, mientras que en la cepa *algA*⁻, es incapaz de sintetizar alginato, y sobreproduce PHB (Fig. 7B) (Galindo *et al.*, 2007).

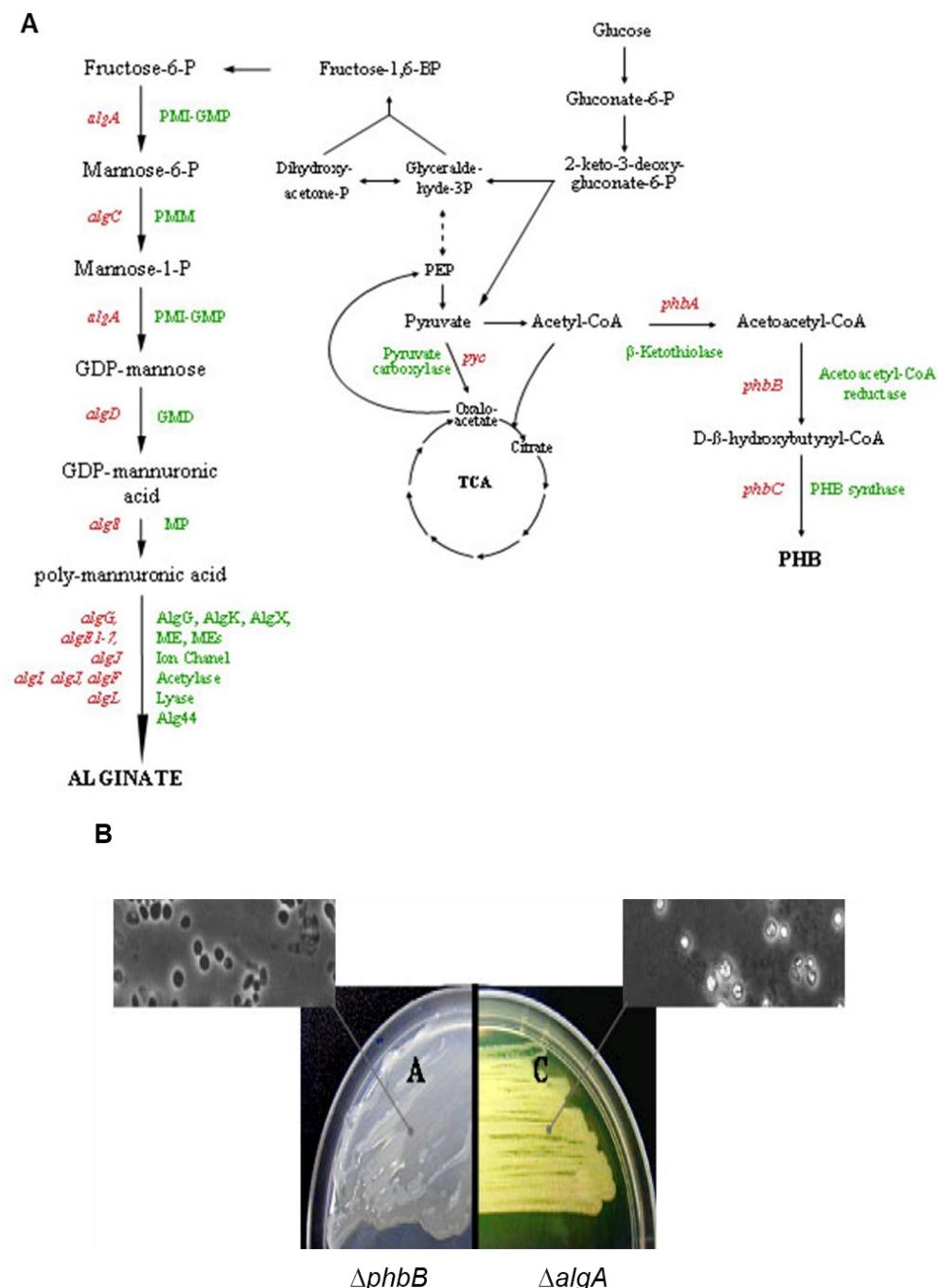


Figura 7. El alginato y PHB compiten por la fuente de carbono. A) Vías de biosíntesis de alginato y PHB y sus relaciones metabólicas en *A. vinelandii*. B) Fenotipo de cepas con mutaciones en genes cruciales (*phbB* y *algA*) para la producción de alginato y PHB (Tomado de Galindo *et al.*, 2007).

1.8.- El factor transcripcional AmrZ

AmrZ ha sido ampliamente caracterizado en especies de *P. aeruginosa* como un regulador de la síntesis de alginato y de la motilidad tipo natatoria dependiente de flagelos perítricos. Es una proteína de 108 aminoácidos con un peso estimado 12.3 kDa. Posee un dominio de unión Ribbon-Helix-Helix (RHH) (Pryor *et al.*, 2012).

Al poseer este dominio, este factor transcripcional es capaz de unirse al ADN en secuencias consenso específicas. Estas proteínas se unen al ADN como dímeros de dímeros conformadas por dos hélices alfa con núcleo hidrofóbico, interactuando con el ADN por medio de hojas beta (Fig. 8). Una característica que es importante destacar, es su capacidad de actuar como un factor transcripcional dual, es decir puede actuar como activador o represor de sus genes blanco (Schreiter *et al.*, 2003; Martínez *et al.*, 2014).

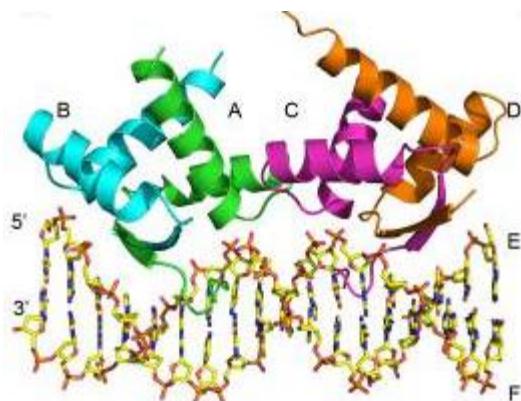


Figura 8. Cristalografía de la estructura de la proteína AmrZ. La estructura cuaternaria está compuesta por un dímero de dímeros representados por los colores: verde/cian y magenta/naranja (Pryor *et al.*, 2012).

Jones *et al.* (2014) identificaron a este factor transcripcional como un modulador de diferentes vías en distintas especies de *Pseudomonas*, reportando a este factor transcripcional como regulador maestro de las vías asociadas a la capacidad de virulencia específicamente en cepas de *P. aeruginosa*. Una de estas vías es la biosíntesis de alginato, debido a que AmrZ es esencial para la activación transcripcional del gen maestro *algD* (Baynham *et al.*, 1999).

Ramsey *et al.* (2005), describieron que esta proteína puede unirse a su propio promotor actuando como represor de su transcripción. Además, Blanco-

Romero *et al.*, (2024) reportaron que AmrZ regula las pozas del segundo mensajero -c-di-GMP (di-guanosín monofosfato cíclico) en *Pseudomonas*.

A continuación, se describen múltiples antecedentes que destacan las características en común entre AmrZ de *A. vinelandii* con su homólogo de *P. aeruginosa*.

Gonzaga-Peréz (2024), reportó que el factor transcripcional AmrZ de *P. aeruginosa* comparte un 85% de homología con el correspondiente en *A. vinelandii*, destacando que los residuos de aminoácidos que interactúan con el ADN se encuentran conservados en *A. vinelandii* (Fig. 9A).

También se reportó que en *locus amrZ* de varias especies, se conserva el gen *mgtE* aledaño a *amrZ* y que codifica una bomba de Mg²⁺ (Fig. 9B). Además, AmrZ en *A. vinelandii* fue esencial para la activación transcripcional del gen *algD* destacando la importancia de este regulador en la producción del exopolisacárido alginato (Fig. 10).

AmrZ es esencial para la producción de alginato en *A. vinelandii*, en su ausencia se abate la síntesis de este polímero y la expresión del gen *algD* (Gonzaga-Peréz, 2024) (Fig. 10 A y B). AmrZ se une directamente a la región reguladora de *algD* mediante el reconocimiento de 4 sitios (Fig 10C). Esto se comprobó mediante ensayos de retardo tipo EMSA (del inglés, Electrophoretic Mobility Shift Assay), usando diferentes segmentos de la región reguladora del gen *algD* y cantidades crecientes de la proteína AmrZ purificada (Fig. 10D-F).

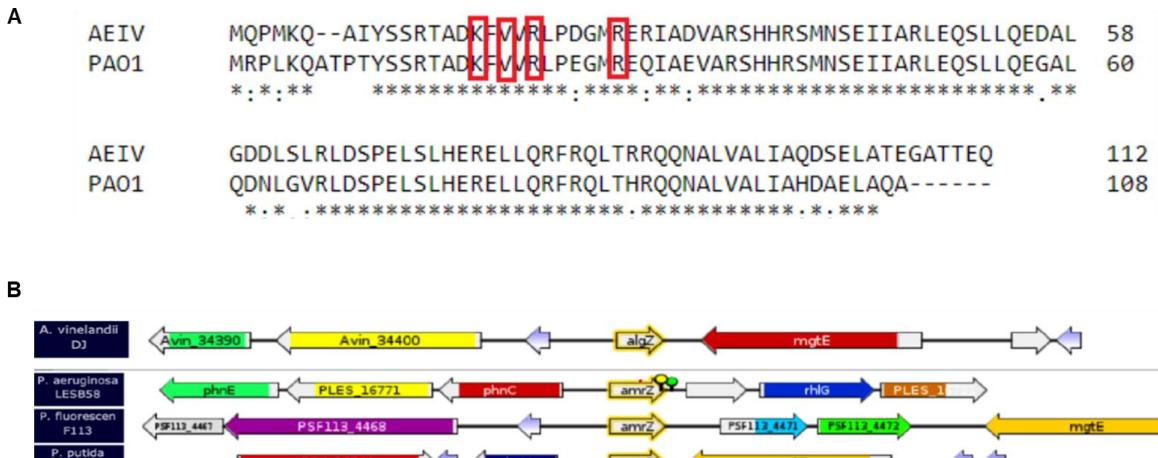


Figura 9. AmrZ de *A. vinelandii* es homóloga de AmrZ de *P. aeruginosa*. A) Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de AmrZ de *A. vinelandii* (AEIV) y *P. aeruginosa* (PA01). En cuadros rojos se señalan los residuos necesarios para la interacción con el ADN. **B)** Representación del locus *amrZen* en *A. vinelandii* y en algunas especies de *Pseudomonas* (Tomado de Gonzaga-Peréz., 2024).

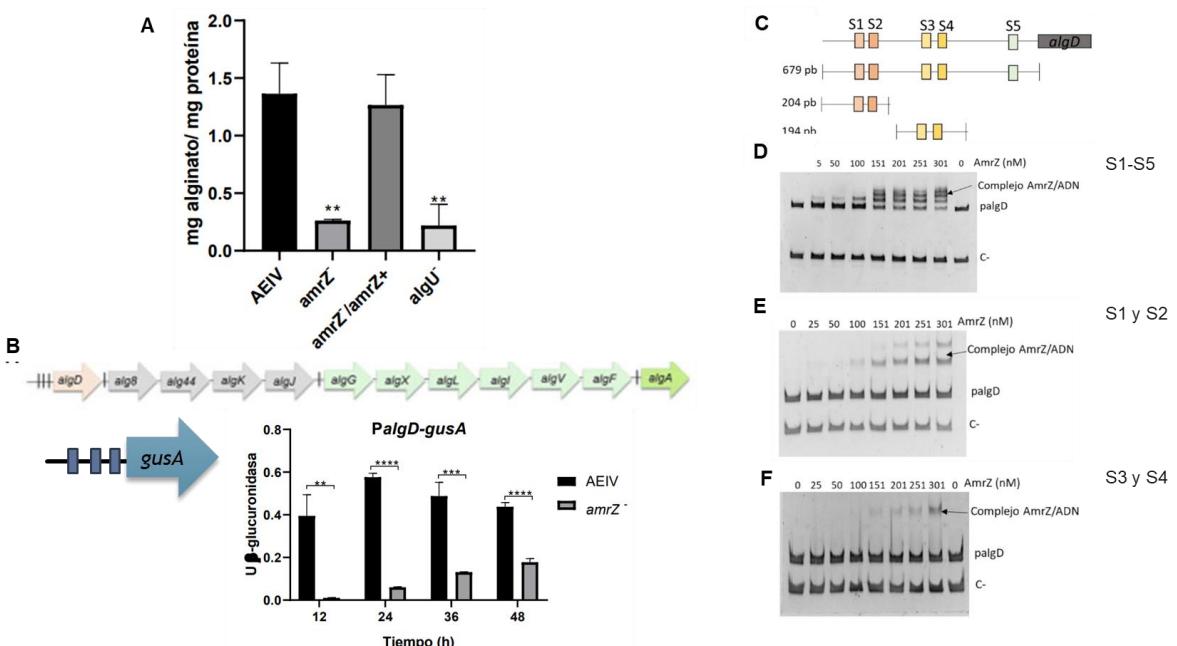


Figura 10. Función del factor transcripcional AmrZ en la síntesis de alginato. A) Efecto de AmrZ en la producción de alginato, se observa que la producción del polisacárido se abate en la cepa mutante *amrZ*. **B)** Determinación de la actividad del promotor de *algD* mediante una fusión transcripcional *PalgD-gusA*, donde se abate la actividad del promotor en la cepa mutante *amrZ*. **C)** Posibles sitios de unión de AmrZ en la región promotora de *algD*. **D)** Ensayo EMSA de la región intergénica de *algD*. **E)** Ensayo EMSA de la región intergénica que contiene a los posibles sitios de unión S1 y S2. **F)** Ensayo EMSA de la región intergénica que contiene a los posibles sitios de unión S3 y S4 (Tomado y modificado de Gonzaga-Peréz, 2024).

2. ANTECEDENTES

Ahumada-Manuel (2021), reportó un posible sitio de unión de AmrZ en la región reguladora del gen *phbB*. Esto se logró mediante predicciones computacionales con los programas MEME/FIMO (del inglés, Multiple EM for Motif Elicitation/Find Individual Motif Occurrences). Utilizando las secuencias de los sitios de unión de AmrZ, identificados experimentalmente en *P. aeruginosa* para construir una matriz de peso (Jones *et al.*, 2014) (Fig. 11A). Posteriormente se construyó una matriz de peso, para generar secuencias consenso, la cual se utilizó posteriormente para rastrear posibles sitios de unión de AmrZ en el genoma de *A. vinelandii*. De esta manera, se identificó un posible sitio de unión que se empalma sobre el promotor de *phbB*, tal y como se muestra en la figura 11B. Este hallazgo sugiere que AmrZ pudiera fungir como un represor de la acumulación de PHB en *A. vinelandii* al impedir la transcripción de *phbB* a partir de su promotor RpoS.

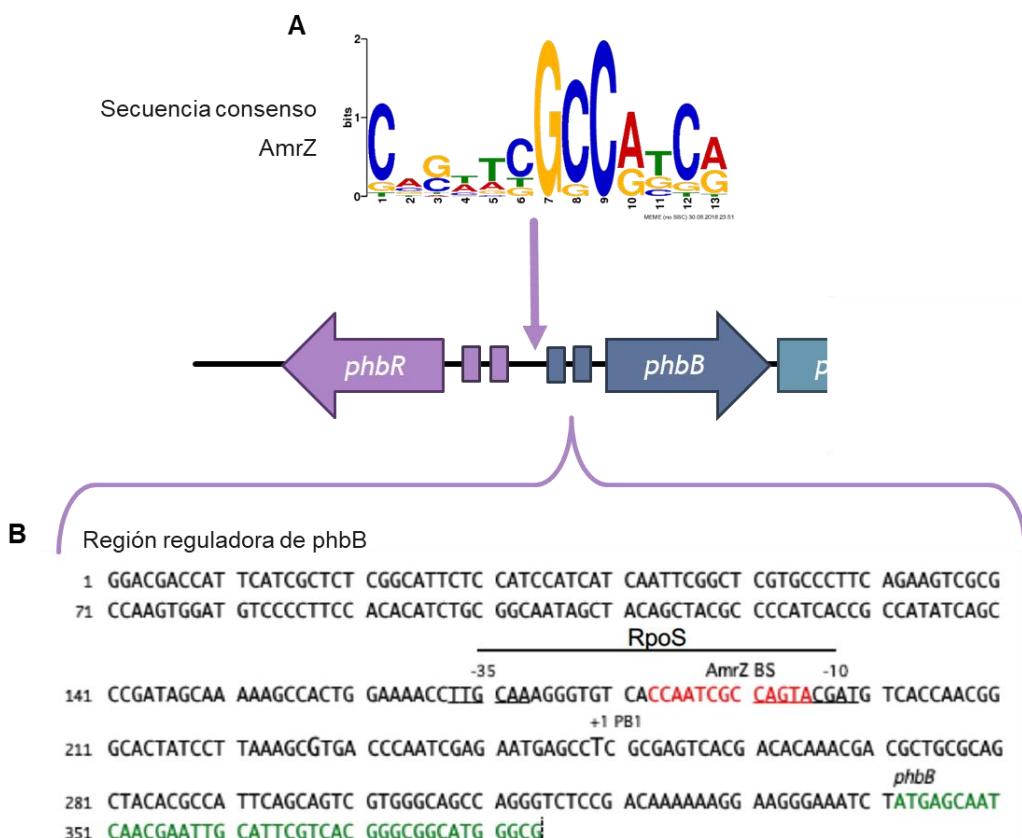


Figura 11. La región reguladora del operón *phbBAC* posee un sitio putativo de unión a AmrZ. A) Logo de la secuencia consenso del sitio de unión de AmrZ. **B)** Región intergénica del operón *phbBAC*. Se indica en rojo, la secuencia predicha del sitio

de la unión de AmrZ sobre el promotor RpoS de este gen (Tomado de Ahumada-Manuel, 2021).

El presente trabajo se enfoca en el estudio de la función del regulador transcripcional AmrZ sobre la acumulación de PHB y la expresión del operón biosintético *phbBAC* en *A. vinelandii*.

3. JUSTIFICACIÓN

La contaminación terrestre y acuática por plásticos derivados del petróleo es uno de los problemas ambientales más severos. Encontrar alternativas para sustituir el uso de estos plásticos por materiales biodegradables con las mismas propiedades mecánicas, como el PHB, es una de las necesidades actuales más importantes. El diseño de cepas de *A. vinelandii* con una mejorada capacidad en la producción de PHB se puede lograr mediante el estudio de reguladores que controlen la producción de polímeros en esta bacteria.

4. HIPÓTESIS

El regulador transcripcional AmrZ influye en la biosíntesis de PHB y en la expresión del operón biosintético *phbBAC* en *Azotobacter vinelandii*, mediante la unión específica a un sitio predicho, localizado en la región reguladora del operón, lo que limita la transcripción de los genes involucrados en la síntesis del biopolímero.

5. OBJETIVOS

5.1.- Objetivo General

Determinar la función del regulador AmrZ en *A. vinelandii*, mediante la construcción de fusiones transcripcionales en el operón *phbBAC* y la cuantificación del PHB, para contribuir al entendimiento de la regulación genética de biopolímeros con potencial biotecnológico sustentable.

5.2.- Objetivos Particulares

5.2.1.- Establecer el efecto del regulador transcripcional AmrZ sobre la producción de PHB en cultivos líquidos de *A. vinelandii*, mediante la cuantificación del biopolímero en cepas mutantes y complementadas, para evaluar su contribución en la biosíntesis de PHB.

5.2.2.- Establecer la influencia del regulador AmrZ sobre la expresión del operón *phbBAC* en *A. vinelandii*, mediante el uso de fusiones transcripcionales y el análisis comparativo de las cepas mutantes, para esclarecer su papel en la regulación transcripcional de la biosíntesis de PHB.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1.- Cepas y Oligonucleótidos utilizados.

Las cepas y oligonucleótidos utilizados en este trabajo se describen en las Tablas 1 y 2, respectivamente.

Tabla 1. Cepas utilizadas en este trabajo.

Nombre	Características	No. Cepario interno	Referencia
AEIV	Cepa silvestre de <i>A. vinelandii</i>	2 CN*	Larsen y Haug., 1971
JG519	Derivada de AEIV, porta la mutación <i>algA::Km</i> . <i>Km^r</i>	431 CN	Colección del laboratorio.
CLAM31	Derivada de AEIV, porta la mutación <i>amrZ::Gm</i> . <i>Gm^r</i>	392 LA**	Ahumada-Manuel et al., 2020
MG09	Derivada de la CLAM31, complementada genéticamente con una copia del gen <i>amrZ</i> integrada en el <i>locus mel</i> . $\Delta amrZ/amrZ^+$. <i>Gm^r, Tc^r</i>	46 CG***	Gonzaga-Pérez., 2024.
SO001	Derivada de JG519 (<i>algA::Km</i>), porta la mutación de $\Delta amrZ::Gm$. <i>Km^r, Gm^r</i>	631 CN	Este trabajo
SO002	Derivada de la MG09 ($\Delta amrZ::Gm$, <i>amrZ^r::Tc</i>), porta la mutación <i>algA::Km</i> <i>Km^r, Tc^r, Gm^r</i>	655 CN	Este trabajo
AEIV <i>PphbB-gusA</i>	Fusión transcripcional <i>PphbB-gusA</i> en el fondo silvestre AEIV. <i>Tc^r</i>	6 CG	Gonzaga-Pérez., 2018
SO003	Derivada de JG519 (<i>algA::Km</i>) porta la construcción <i>PphbB-gusA</i> . Clona 1 <i>Km^r, Tc^r</i>	676 CN	Este trabajo
SO004	Derivada de JG519 (<i>algA::Km</i>), porta la construcción <i>PphbB-gusA</i> . Clona 2. <i>Km^r, Tc^r</i>	677 CN	Este trabajo
SO005	Derivada de SO003 (<i>algA::Km</i> , <i>PphbB-gusA</i>), porta la mutación $\Delta amrZ::Gm$. <i>Km^r, Tc^r, Gm^r</i>	678 CN	Este trabajo

*: Cepario Cinthia Núñez; **: Cepario Leonel Ahumada; ***: Cepario Citlalli Gonzaga

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo

Nombre	Secuencia	Uso
<i>algA</i> Fw	CACGCAGTACATGCAAGACC	<i>locus silvestre algA</i> , 1700 pb
<i>algA</i> Rv	AGCAGGATGCCGTCGCATTC	
<i>amrZ</i> Fw	GATACTCTGCCAACAGCTTC	<i>locus silvestre amrZ</i> , 1099 pb
<i>amrZ</i> Rv	TGATGACGGCGCAATGAC	
<i>PphbB</i> Fw	TCTAGAGAGCCGTGCATAATTCACACTG	<i>locus PphbB-gusA</i> , 800 pb
<i>gusA</i> Rv	CTGCCTGGCACAGCAATTG	
MelAL-F	GGCCTTCTACCTGTCCCTTC	<i>locus silvestre melA</i> , 200 pb
MelAL-R	TGGCGCTTGATGAACCAGG	

6.2.- Condiciones de cultivo

Se utilizó medio Burk-Sacarosa (BS), preparado con: 0.16 g/L MgCl₂ 6H₂O, 0.002 g/L NaMoO₄ · 2H₂O, 0.005 g/L FeSO₄ · 7H₂O, 0.073 g/L CaCl₂ 2H₂O, 0.183 g/L NaSO₄, Buffer fosfatos: 0.8 g/L K₂HPO₄, 0.2 g/L KH₂PO₄, pH 7 y 20 g/L de sacarosa. Para medio sólido, se agregó 1.5% de agar.

Además, se implementó el uso de medio BSMg, el cual, es medio BS suplementado con 0.22 g/L de MgSO₄ · 7H₂O.

Todas las soluciones y medios líquidos se esterilizaron en la autoclave por 20 minutos a 120 °C, exceptuando el FeSO₄ · 7H₂O, este se esterilizó por filtración, con ayuda de una membrana de 0.22 µm.

Así mismo, se utilizaron los siguientes antibióticos para medio sólido: 1 µg/mL de kanamicina (km), 1 de µg/mL gentamicina (Gm) y 30 µg/mL de Tetraciclina (Tc). Para el caso de Gm en medio líquido, se utilizó una concentración no mayor a 0.25 µg/mL.

El medio de competencia (CM) para *A. vinelandii* contiene las mismas sales del medio Burk-Sacarosa, exceptuando NaMoO₄ · 2H₂O y FeSO₄· 7H₂O.

Se utilizó medio sólido PY-Sacarosa, para visualizar la acumulación de PH en sólido; este medio contiene 5 g/L de peptona, 3 g/L de levadura, 20 g/L de sacarosa y 1.5% de agar.

6.3.- Preparación de cultivos

Las cepas se recuperaron tomando una asada de los gliceroles de cada una y sembrando en placas con medio BS con el antibiótico correspondiente para cada cepa, las cuales se incubaron a 30°C durante 48 horas.

6.4.- Preparación de células competentes

Las cepas competentes de *A. vinelandii* se prepararon tomando una asada de colonias provenientes de una placa de BS con 48 horas de incubación.

Se cultivaron iniciando con un primer pase en placas CM a 30 °C durante 24 horas, realizando un segundo pase posterior a las 24 horas en placas CM a 30 °C durante 15 horas. Se recuperó el tapete celular pasado el tiempo de incubación con una espátula estéril. El paquete, se lavó con MgSO₄ 10 mM y se centrifugó durante 5 minutos.

Finalmente, el paquete celular se resuspendió en 1 mL de MgSO₄ 10 mM.

6.5.- Transformación de células competentes

En un tubo Eppendorf estéril se mezclaron 150 µL de células competentes con 10 µg de ADN cromosomal, posteriormente la mezcla se depositó sobre una placa de CM en una superficie aproximada de 2 cm².

Finalmente se incubaron a 30 °C durante 24 horas.

Pasadas las 24 horas, se recuperó el tapete y se lavó con MgSO₄ 10 mM, y se resuspendió en 1 mL de MgSO₄. Para finalizar se platearon 100 µL en medio de selección y se incubaron a 30 °C por 48 horas.

Se seleccionaron colonias aisladas de cada cepa de interés, las cuales se pasaron a placas con medio de selección respectivo para cada construcción y se

incubaron a 30 °C por 48 horas. Se comprobó la transformación mediante PCR de colonia.

6.6.- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se realizó PCR para comprobar candidatas resultantes de la transformación competente como se describe a continuación:

En un tubo Eppendorf se resuspendió una colonia aislada en 30 µL de agua, este tubo se pasó a incubar a 95 °C durante 20 minutos para lisar la colonia, posteriormente se centrifugó durante 20 minutos a 13000 rpm, se tomaron 2 µL de este lisado para la reacción. En la tabla 3 se describe de forma general la reacción de PCR utilizada en este trabajo.

Tabla 3. Reactivos y concentraciones empleados en una reacción de PCR

Reactivos	Volumen
Lisado celular	2 µL
Buffer taq 10X	2.5 µL
DMSO	1 µL
MgCl ₂ 25 mM	1.5 µL
Mix dNTP's 2 mM	2.5 µL
Oligonucleótido Fw 10 pmol/µL	1 µL
Oligonucleótido Rv 10 pmol/µL	1 µL
Taq polimerasa (Thermo Scientific Tag) 500 U	0.3 µL
Agua libre de nucleasas	13.2 µL
Volumen total	25 µL

6.7.- Cuantificación de proteína

La cuantificación de proteína se realizó por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

El paquete celular se lavó con MgSO₄ 10 mM y se resuspendió en 1 mL de agua, se tomaron 50 µl de muestra (vol. Rx; o una cantidad adecuada) y se

aforó a 200 μ L, posteriormente se le agregó 1 mL de solución reactiva y se dejó la reacción por 10 minutos, una vez pasado el tiempo se le agregó 100 μ L de Folin diluido 1:1, dejando la reacción durante 30 minutos, al mismo tiempo se realizó la curva de calibración de albúmina con las siguientes concentraciones: 50, 100, 200 y 400 μ g/mL. Finalmente se leyó la absorbancia a 625 nm.

Se preparó la solución reactiva con las siguientes soluciones A) Na_2CO_3 2% en NaOH 0.1 N; B) tartrato de sodio y potasio 2%; C) CuSO_4 1% se tomaron los volúmenes indicados en la Tabla 4 para cada reacción.

Tabla 4. Composición y volúmenes de la solución reactiva utilizados por reacción en el ensayo de Lowry.

	Volumen por reacción
Solución A	0.98 mL
Solución B	0.01 mL
Solución C	0.01 mL

Para determinar la cantidad de proteína se utilizaron los siguientes cálculos:

$$\left[\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right] = \left[\frac{DO_{625} - \text{intersección de la curva}}{\text{Pendiente}} \right]$$

$$\text{Proteína } \left[\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right] = \left[\frac{(\mu\text{g}/\text{mL})(\frac{200}{\text{Vol. Rx}})}{1000} \right]$$

6.8.- Cuantificación de PHB

La cuantificación de PHB se realizó por el método electrofotométrico Law y Splecky (Law & Splecky, 1961), cuyo fundamento consiste en la conversión del polímero en ácido crotónico.

Para esto fue necesario extraer el PHB como se describe a continuación: Se tomó 1 mL a partir de un cultivo de 48, 72 y 96 horas, se recuperó el paquete celular por centrifugación durante 5 minutos a 13000 rpm, inmediatamente se lavó el paquete celular con 1 mL de MgSO_4 10 mM, recuperando nuevamente el paquete celular, se agregó 1 mL de NaClO nivel comercial al 30%, se resuspendió y se incubó por 1 hora a 30 °C.

Pasado el tiempo de incubación, se centrifugó durante 5 minutos a 13000 rpm y decantó el sobrenadante, nuevamente se lavó el paquete celular con 1 mL de agua y se recuperó el paquete celular centrifugando por 5 minutos y decantando el sobrenadante; se agregó 1 mL de etanol absoluto y se resuspendió el paquete celular, se centrifugó a 13000 rpm durante 5 minutos y se decantó el sobrenadante.

Se agregó 1 mL de acetona y se resuspendió, recuperando el paquete celular centrifugando por 3 minutos a 13000 rpm; finalmente se dejaron secar las muestras toda la noche, tapando con un papel para evitar cualquier factor externo.

Para la cuantificación, se agregó 1 mL de ácido sulfúrico concentrado a las muestras obtenidas en la extracción, posteriormente se calentaron a 90 °C durante 13 minutos, una vez pasado el tiempo, se dejaron reposar durante 5 minutos, se realizaron las diluciones correspondientes y finalmente se leyó la absorbancia en el espectro a 235 nm utilizando celdas de cuarzo y ácido sulfúrico concentrado como blanco.

Con base a el coeficiente de extinción molar (181.21) se utilizaron los siguientes cálculos para determinar la acumulación específica de PHB:

Cuando se realizan diluciones:

$$DO_{235\text{ final}} = (DO_{235})(\text{Dilución } n)(\text{Dilución } n + 1)$$

PHB volumétrico:

$$\left[\frac{\text{mg PHB}}{\text{mL de cultivo}} \right] = \frac{DO_{235\text{ final}}}{181.21}$$

PHB específico:

$$\left[\frac{\text{mg PHB}}{\text{mg Proteína}} \right] = \frac{\text{PHB volumétrico}}{\text{Proteína}}$$

6.9.- Determinación de actividad de β-glucuronidasa

Para la determinación, se suspendió el paquete celular de la muestra en 1 mL de MgSO₄ 10 mM del cual se tomaron 20 µl (vol. Rx; o una cantidad adecuada) y se le agregaron 710 µl de buffer Z. Simultáneamente se preparó un

blanco que contenía 730 μ L de buffer Z y se procesó junto a las demás muestras. Se les agregó 10 μ L de solución de lisozima y se incubaron a 37°C durante 5 minutos, una vez concluido el tiempo de incubación, se agregó 10 μ L de solución de Tritón 10%.

Posteriormente los tubos se transfirieron a un baño de agua a 28°C y se les agregó 100 μ L de la solución de PNPG y se cronometró en tiempo de reacción por 10 minutos. Una vez concluido el tiempo de reacción, se agregó 150 μ L de Na₂CO₃ para detener la reacción. Finalmente, se leyó la absorbancia a 405 nm contra el blanco.

Se prepararon las soluciones necesarias para las reacciones: lisozima 10 mg/mL, p-nitrofenil- β -Dglucopiranósido (PNPG) 4 mg/mL, Na₂CO₃ 1.2 M, Tritón X100 solución 10% V/V de Tritón en agua destilada, K₂HPO₄ 0.5 M, KH₂PO₄ 0.5 M, EDTA 0.25 M, DTT 0.25 M. El buffer Z se preparó con 3 mL de K₂HPO₄ 0.5 M, 2 mL de KH₂PO₄ 0.5 M, 0.21 mL de EDTA 0.25 M, 1 mL de DTT 0.25 M, aforando a 50 mL con agua.

Se utilizó el siguiente cálculo para determinar la actividad de β -glucuronidasa:

$$U \beta - gluc = \frac{(DO_{405})(1000)}{[(0.018)(t \text{ Rx minutos})(\text{Vol. Rx } \mu\text{L})(\text{Proteína } \mu\text{g}/\text{mL})]}$$

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para evaluar el efecto del regulador AmrZ sobre la acumulación de PHB, se trabajó en un fondo genético alginato menos. Lo anterior derivado de la incapacidad de la mutante *amrZ* de producir alginato y por ende de acumular más PHB que la cepa silvestre. Por esta razón, en este trabajo se utilizó como cepa de referencia la mutante *algA::Km*, la cual no sintetiza alginato de esta forma cualquier diferencia será atribuida a la mutación *amrZ* y no a su efecto sobre una diferencia en la canalización o flujo de la fuente de carbono.

Se utilizaron células competentes de la cepa JG519 (*algA::Km*) tal y como se describe en Materiales y Métodos y se transformaron con ADN cromosomal de la cepa $\Delta amrZ::Gm$. Después de seleccionar candidatas Gm^r , se procedió a verificar la correcta construcción de la mutante *algA::Km*, $\Delta amrZ::Gm$, denominada SO001, mediante PCR de colonia.

Lo mismo se hizo para la construcción de la cepa complementada genéticamente con una copia del gen *amrZ* ($\Delta amrZ::Gm/amrZ^+$). Esta cepa llamada MG09, se hizo competente y se le transfirió la mutación *algA::Km* por transformación. La cepa resultante se llamó SO002. También se verificó su correcta construcción por PCR de colonia. A continuación, se detallan estas construcciones.

7.1.- Confirmación de la transformación de la cepa SO001 (*algA::Km*, $\Delta amrZ::Gm$)

Se confirmó la correcta construcción de la mutante *algA::Km*, $\Delta amrZ::Gm$; llamada SO001, mediante PCR de colonia. Para tal fin, se utilizaron el par de oligonucleótidos *amrZ Fw* y *amrZ Rv*, los cuales amplifican un producto con un peso 1.1 kb de *amrZ* silvestre y de 1.9 kb para el locus mutante *amrZ::Gm* (Fig. 12B-C).

Como podemos observar en el gel de agarosa presentado en la figura 12C, la cepa SO001 presenta un amplicón mutante *amrZ* y se descartó la

presencia de un amplicón silvestre, el cual, si se detectó en la cepa WT (AEIV), obteniendo como resultado una cepa con un genotipo $\text{algA}^-, \Delta\text{amrZ}$.

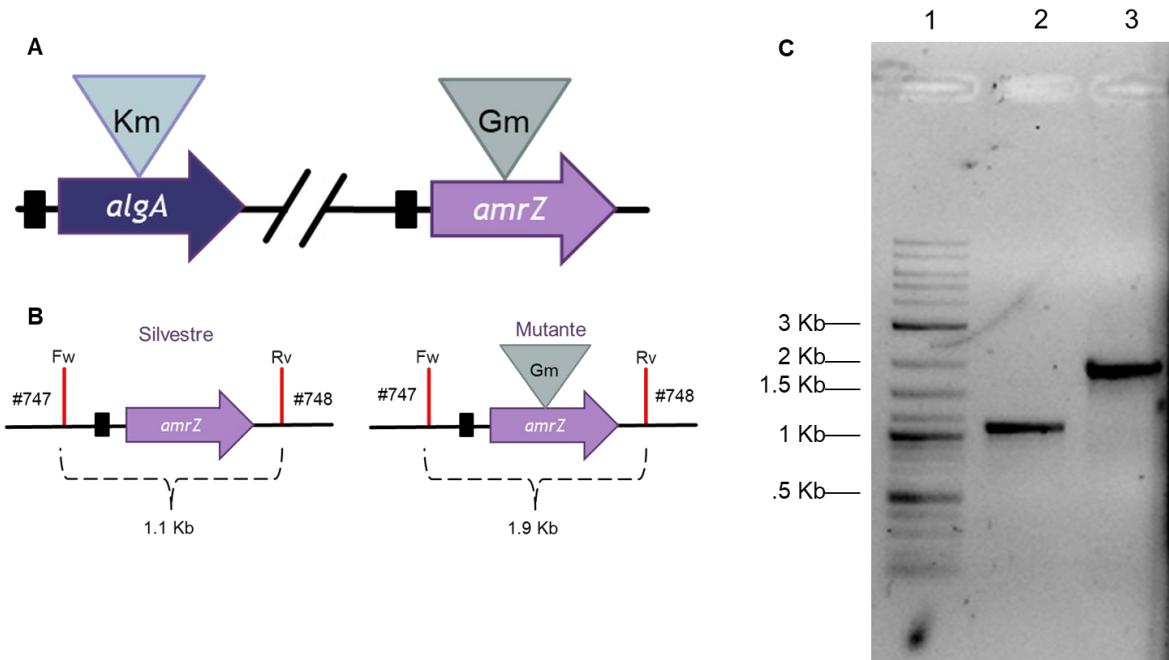


Figura 12. Construcción de la cepa SO001 ($\text{algA}::\text{Km}, \Delta\text{amrZ}::\text{Gm}$). **A)** Representación esquemática de las mutaciones presentes en la cepa SO001 (algA^- , amrZ). **B)** Representación esquemática del locus silvestre y mutante de amrZ . **C)** Electroforesis en gel de agarosa 1% de los productos de PCR usando lisado celular de la cepa silvestre (AEIV) o de la cepa mutante SO001. Carril 1.- Marcador molecular; Carril 2.- Banda correspondiente al amplicón silvestre de 1.1 kb; Carril 3.- Banda correspondiente al amplicón mutante de 1.9 kb en la cepa SO001.

7.2.- Confirmación de la cepa SO002 ($\text{algA}::\text{Km}, \Delta\text{amrZ}::\text{Gm}/\text{amrZ}^+$)

Se confirmó la correcta construcción de la mutante $\text{algA}::\text{Km}$, $\Delta\text{amrZ}::\text{Gm}/\text{amrZ}^+$; llamada SO002, mediante PCR de colonia. Para tal fin, se utilizaron el par de oligonucleótidos algA Fw y algA Rv, los cuales amplifican un producto con un peso 1.7 kb del locus silvestre algA y de 2.3 kb para el locus mutante $\text{algA}::\text{Km}$ (Fig. 13B).

Como se observa, en el gel de agarosa presentado en la figura 13C, la cepa SO002 presenta un amplicón mutante algA y se descartó la presencia de un amplicón silvestre, el cual sí está presente en la cepa WT (AEIV), obteniendo

como resultado una cepa con un genotipo algA^- , $\Delta\text{amrZ}/\text{amrZ}^+$.

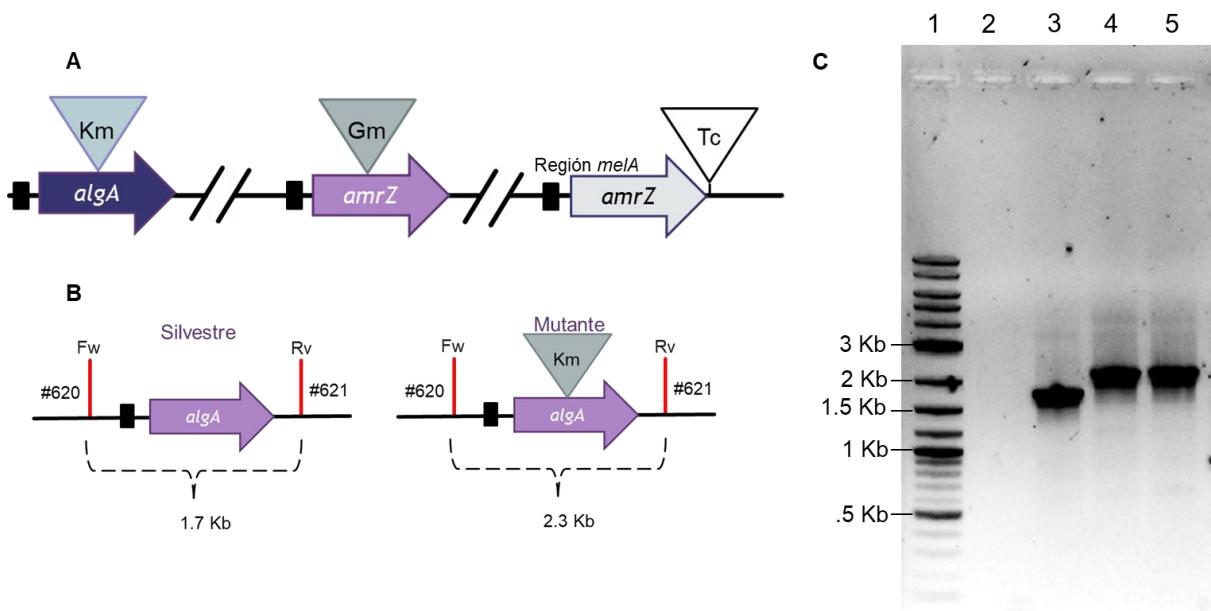


Figura 13. Construcción de la cepa SO002 ($\text{algA}::\text{Km}$, $\Delta\text{amrZ}::\text{Gm}/\text{amrZ}^+$). **A)** Representación esquemática de las mutaciones presentes en la cepa SO002 (algA^- , $\Delta\text{amrZ}/\text{amrZ}^+$). **B)** Representación esquemática del locus silvestre y mutante de algA . **C)** Electroforesis en gel de agarosa 1% de los productos de PCR usando lisado celular de la cepa silvestre (AEIV), de la cepa algA^- o de la cepa mutante SO002. Carril 1.- Marcador molecular; Carril 2.- Control negativo; Carril 3.- Banda correspondiente al amplicón silvestre de 1.7 kb; Carril 4.- Banda correspondiente al amplicón mutante de 2.3 kb en la cepa algA^- (Control positivo); Carril 5.- Banda correspondiente al amplicón mutante de 2.3 kb en la cepa SO002.

Una vez confirmadas las cepas $\Delta\text{amrZ}::\text{Gm}$ y su derivada complementada $\Delta\text{amrZ}::\text{Gm}/\text{amrZ}^+$ en el fondo de la cepa no productora de alginato (algA^-) se procedió a realizar la cuantificación de PHB. Para simplicidad en la redacción y en el análisis de resultados, en este trabajo a la cepa algA^- (JG519) se le llamará cepa de referencia, mientras que a sus derivadas amrZ^- (SO001) y amrZ complementada (SO002) solo se les llamará amrZ^- y $\text{amrZ}/\text{amrZ}^+$ teniendo presente que se encuentran con el fondo alginato menos.

7.3.- Determinación cualitativa de producción de PHB en las cepas JG519, SO001 y SO002

Ensayos realizados en el laboratorio han demostrado que el medio PY-Sacarosa promueve la acumulación de PHB, por tal razón permite fácilmente la visualización de acumulación de PHB. Por tal motivo antes de comenzar los

ensayos de cuantificación de PHB se realizó una determinación cualitativa de la producción de PHB en las cepas de referencia (*algA*⁻), de su derivada *amrZ* y de la derivada complementada *amrZ/amrZ⁺*.

Estas cepas se incubaron durante 96 horas a 30° C en medio PY-Sacarosa (Fig. 14). Cualitativamente se observó una mayor acumulación en la cepa *amrZ* con respecto a la cepa parental, a partir de las 48 horas, por tal motivo, los ensayos de cuantificación de PHB se enfocaron en la fase estacionaria, sin descartar lo que ocurriera en tiempos más tempranos.

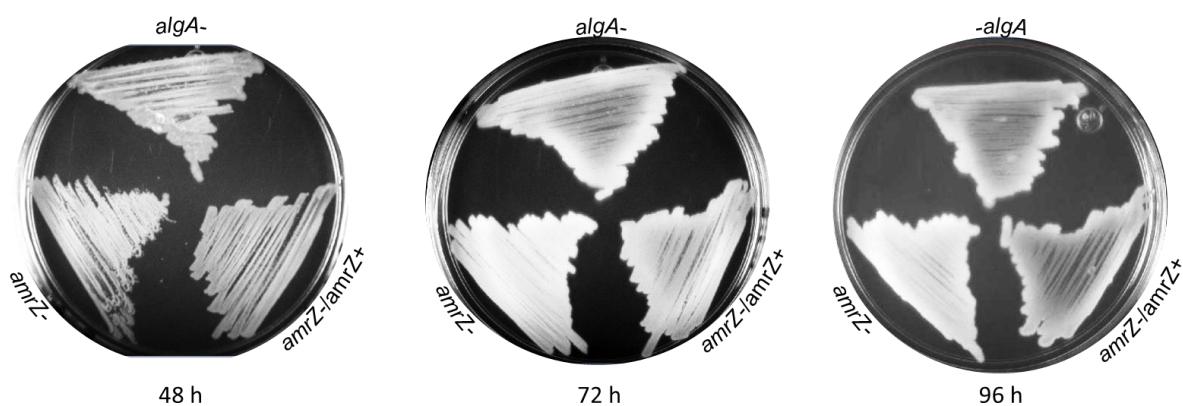


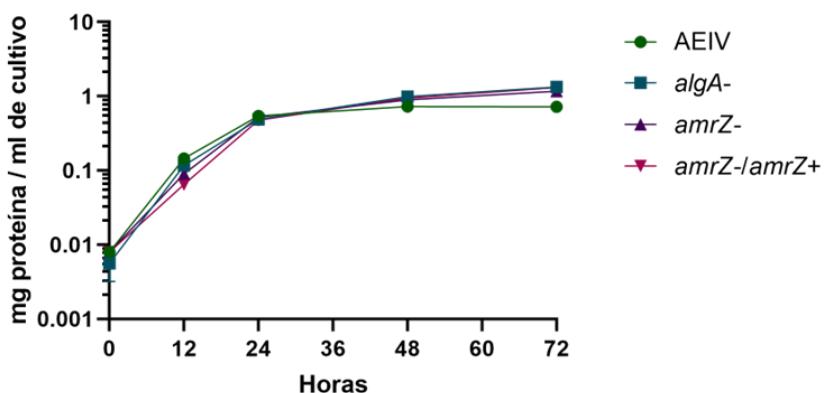
Figura 14. Determinación cualitativa de acumulación de PHB en la cepa de referencia y en sus derivadas *amrZ* y *amrZ/amrZ⁺*. El fenotipo blanquecino corresponde a la acumulación de PHB en las cepas. Se observa un mayor fenotipo blanquecino en la cepa *amrZ*, en comparación con la cepa de referencia y a la cepa complementada *amrZ/amrZ⁺*.

7.4.- AmrZ ejerce un efecto negativo sobre la producción de PHB en la fase estacionaria tardía

Para establecer la influencia de AmrZ sobre la producción de PHB, se realizaron cinéticas de crecimiento (Fig. 15A) utilizando triplicados a 30 °C en medio BSMg durante 72 horas, de las cepas AEIV (Cepa silvestre), *algA*⁻, *amrZ* y *amrZ/amrZ⁺*. Posteriormente se realizó cuantificación de PHB en los puntos de 24, 48 y 72 horas (Fig. 15B).

A

CINETICA DE CRECIMIENTO

**B**

Cuantificación de PHB

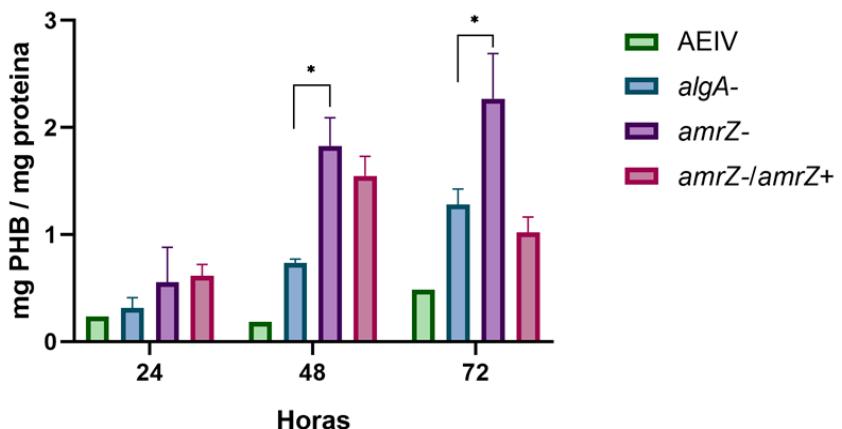


Figura 15. AmrZ ejerce un efecto negativo sobre la producción de PHB. **A)** Cinética de crecimiento de las cepas AEIV, la cepa de referencia *algA-*, *amrZ* y *amrZ/amrZ+*. **B)** Cuantificación de PHB de las cepas AEIV, la cepa de referencia *algA-*, *amrZ* y *amrZ/amrZ+*. Los datos corresponden al promedio de dos experimentos independientes presentados en el anexo. Los datos estadísticos se realizaron mediante una prueba de ANOVA de dos vías utilizando el software GraphPad Prism (versión 8.0.2) tomando como referencia a la cepa *algA-*. Las diferencias se consideraron significativas con un valor de $p<0.05$.

Como se evidencia en la figura 15A el crecimiento entre cepas es similar, siendo a las 48 horas el punto donde inicia la fase estacionaria. La producción de PHB de cada cepa se presenta en la figura 15B, la cepa no productora de alginato (*algA-*) tiene una mayor acumulación de PHB con respecto a la cepa silvestre de *A. vinelandii* (AEIV) a partir de las 48 horas, esto es consistente a lo esperado, ya que una cepa que produce ambos biopolímeros, canaliza la fuente de carbono sin distinción, en contraste con la cepa *algA-*, la cual solo canaliza la

fuente de carbono a la biosíntesis de PHB, es por tal motivo que la acumulación de este biopolímero aumenta en comparación a la cepa silvestre (AEIV).

Por otra parte, la cepa *amrZ* derivada de una cepa alginato menos presenta un aumento significativo en la producción de PHB en comparación a la cepa de referencia *algA* a partir de las 48 horas, y esta producción se revierte en la cepa complementada. Esto concuerda con lo sugerido por Ahumada-Manuel (2021), debido que el posible sitio de unión de AmrZ sobrepone al promotor tipo RpoS, sugiriendo que AmrZ tiene un efecto negativo en la producción de PHB. El efecto se observa en la figura 15B, siendo en la fase estacionaria tardía (72 h) donde se refuerza esta tendencia.

7.5.- Visualización de gránulos de PHB en las cepas JG519, SO001 y SO002

El PHB es un polímero que se acumula en forma de gránulos dentro de la bacteria, los cuales se pueden visualizar por microscopía electrónica. Por esta razón, se propuso analizar en cada cepa de este trabajo el punto máximo de acumulación de PHB (72 horas).

Como se observa en la figura 16, la cepa *amrZ* (Fig. 16B y E) presenta gránulos de mayor tamaño, en comparación a la cepa de referencia (Fig. 16A y D) y la *amrZ/amrZ⁺* (Fig. 16C y F), las cuales presentan más gránulos y de menor tamaño. Sin embargo, es necesario realizar un análisis detallado para tratar de establecer si AmrZ posee un efecto o no sobre el tamaño y el número de gránulos de PHB en la célula.

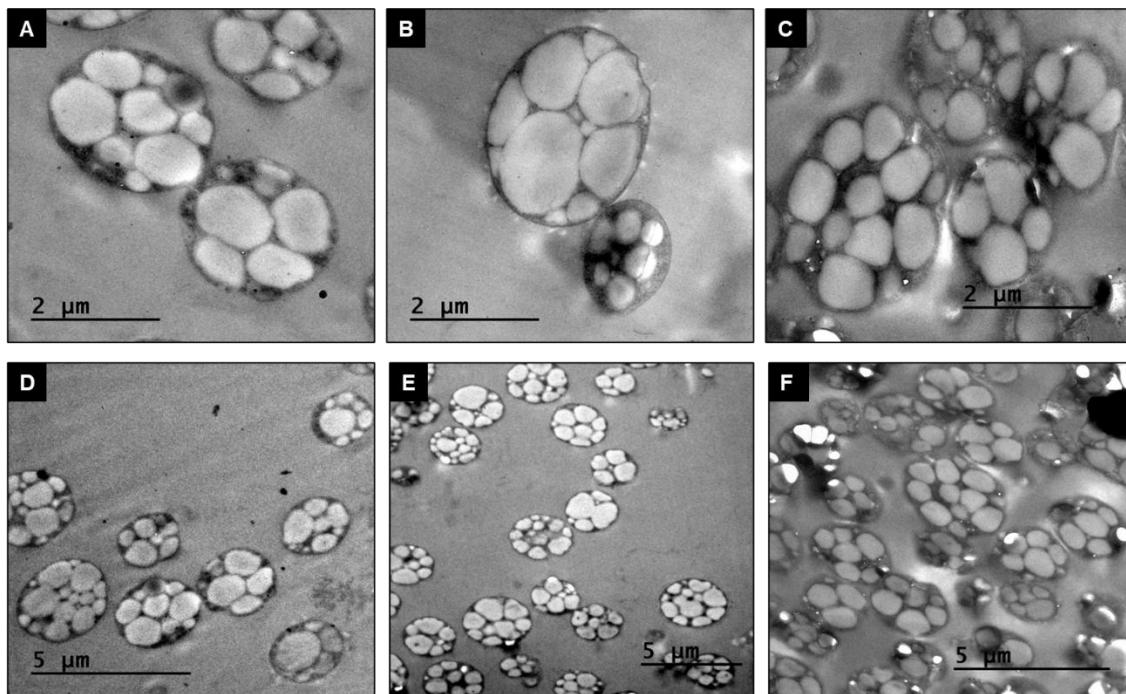


Figura 16. Las micrografías electrónicas muestran gránulos de PHB de las cepas utilizadas en este trabajo, a 2 μm y 5 μm durante las 72 horas. A y D) Micrografía de la cepa *algA⁺*. B y E) Micrografía de la cepa *amrZ⁺*. C y F) Micrografía de la cepa *amrZ⁺/amrZ^r*.

7.6.- Construcción de cepas con la fusión *PphbB-gusA* en el fondo de referencia y en el fondo *amrZ^r*

Para la influencia de AmrZ sobre la expresión del operón *phbBAC*, se trabajó con cepas que tuvieran un fondo alginato menos y una fusión transcripcional *PphbB-gusA*. Todo esto derivado de la incapacidad de la mutante *amrZ* de producir alginato, como se describe en los resultados anteriores.

Por tal razón se transformaron cepas competentes *algA::Km* con ADN cromosomal de la cepa AEIV, la cual contiene la fusión transcripcional *PphbB-gusA Tc^r*. Después de seleccionar candidatas *Tc^r*, se procedió a verificar la correcta construcción de la cepa *algA::Km, PphbB-gusA Tc^r*.

Posteriormente, se transformaron células competentes de la cepa resultante (*algA::Km, PphbB-gusA Tc^r*), con ADN cromosomal de la cepa $\Delta amrZ::Gm$, seleccionando candidatas *Gm^r* y finalmente se verificó su correcta construcción por PCR de colonia.

7.7.- Confirmación de la construcción *PphbB-gusA* en el fondo de referencia *algA::Km*

Se confirmó la correcta construcción de las clonas (SO003 y SO004) que portan la fusión transcripcional *PphbB-gusA* en el fondo de referencia *algA::Km* (Fig. 17A), mediante PCR de colonia. Para tal fin, se utilizaron el par de oligonucleótidos *PphbB* Fw y *gusA* Rv, los cuales amplifican un producto con un peso 0.8 kb de la fusión *PphbB-gusA* (Fig. 17B).

Como se puede observar en el gel de agarosa presentado en la figura 16C las cepas SO003 y SO004 presentan el amplicón correspondiente al producto de la construcción *PphbB-gusA*, la cual no está presente en el control negativo (lysado celular de la cepa *algA⁻*, no porta la fusión *PphbB-gusA*), obteniendo como resultado una cepa con un genotipo *algA⁻, PphbB-gusA*.

Además, mediante PCR de colonia se verificó que la segregación de la construcción fuera exitosa y las candidatas no portaran copias silvestres de la región *melA*, región en la cual se encuentra la fusión. Para este fin, se utilizaron los oligonucleótidos MelAL-Fw y MelAL-Rv, los cuales amplifican un locus *melA* silvestre con un peso de 0.2 kb (Fig. 17B).

Como se observa en el gel de agarosa presentado en la figura 17C, únicamente el carril 1 presenta un amplicón de 0.2 kb, el cual corresponde a la región silvestre de *melA*, contrario a las cepas SO003 y SO004, las cuales no presentan esta banda (Fig. 17D).

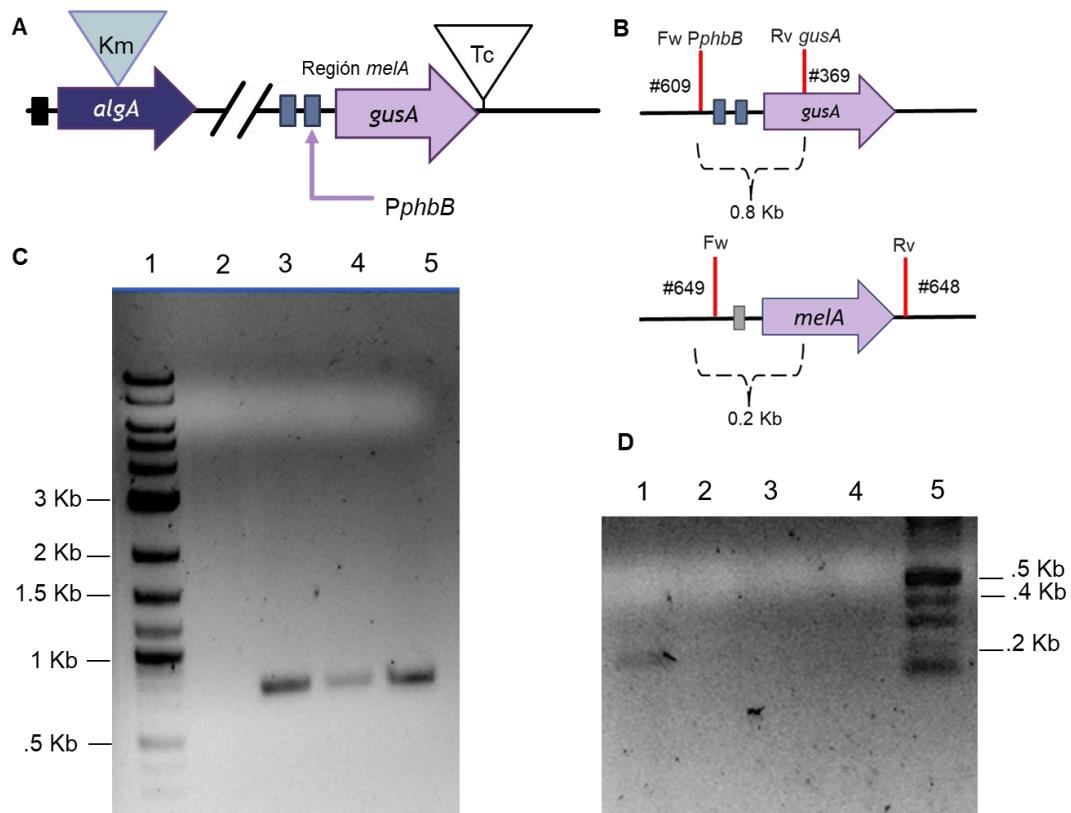


Figura 17. Construcción de cepas que portan la fusión *PphbB-gusA* en el fondo de referencia *algA::Km*. **A)** Representación esquemática de las mutaciones presentes en las cepas SO003 y SO004 (*algA*, *PphbB-gusA*). **B)** Representación esquemática con oligos en el locus *phbB-gusA* y el locus silvestre *melA*. **C)** Electroforesis en gel de agarosa 1% de los productos de PCR usando lisado celular de la cepa de referencia (*algA*), de la cepa AEIV *PphbB-gusA*, de la cepa SO003 o de la cepa SO004. Carril 1.- Marcador molecular; Carril 2.- Ausencia de banda de 0.8 kb de la cepa AEIV *PphbB-gusA* (Control negativo); Carril 3.- Banda correspondiente al amplicón de 0.8 kb en la cepa AEIV *PphbB-gusA* (Control positivo); Carril 4 y 5.- Banda correspondiente al amplicón de 0.8 kb en la cepa SO003 y en la cepa SO004, respectivamente. **D)** Carril 1.- Banda correspondiente al amplicón de 0.2 Kb de la región silvestre de *melA* (control positivo); Carril 2.- Ausencia de banda de 0.2 kb en la cepa AEIV *phbB-gusA*; Carril 3 y 4.- Ausencia de banda de 0.2 kb en la cepa SO003 y SO004, respectivamente; Carril 5.- Marcador molecular.

7.8.- Confirmación de la construcción *PphbB-gusA* en el fondo $\Delta amrZ::Gm$

Se confirmó la correcta construcción de la nueva cepa mutante *algA::Km*, *PphbB-gusA* Tc^r, $\Delta amrZ::Gm$ (Fig. 18A), llamada SO005 mediante PCR de colonia verificando el tamaño del amplicón derivado del locus *amrZ* silvestre o mutante. Para tal fin se utilizaron nuevamente los oligonucleótidos *amrZ* Fw y *amrZ* Rv, los cuales amplifican un producto de PCR con un peso de 1.1 kb para el locus silvestre de *amrZ*, y de 1.9 kb para el locus mutante de *amrZ* (Fig. 12B).

Como se puede observar en el gel de agarosa presentado en la figura 18B, la cepa SO005 presenta un amplicón mutante *amrZ* contrario a lo observado en el carril de la cepa de referencia (*algA⁻*). Esto confirmó la correcta construcción de la cepa *algA::Km*, *PphbB-gusA Tc^r*, $\Delta amrZ::Gm$, en la cual, no se observaron bandas de *locus* silvestre.

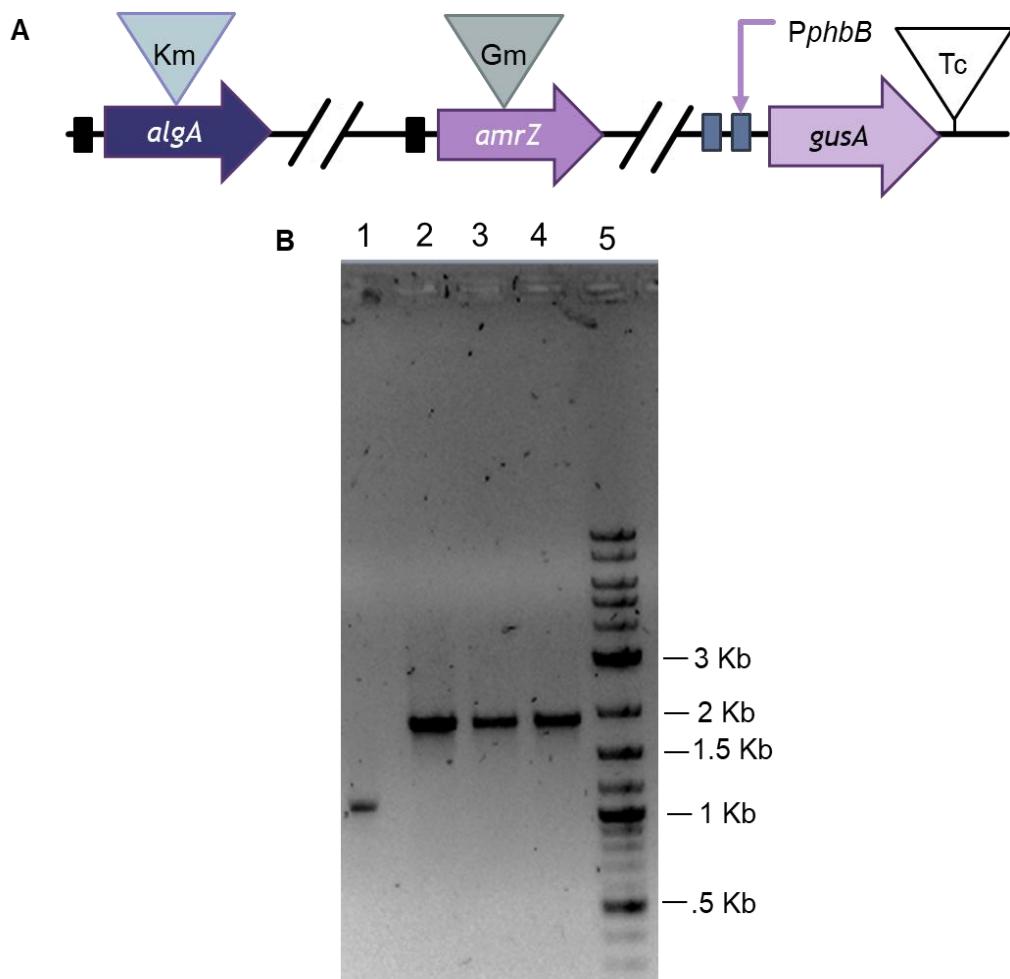


Figura 18. Construcción de la cepa que portan la fusión *PphbB-gusA* en el fondo mutante $\Delta amrZ::Gm$. **A)** Representación esquemática de las inserciones/construcciones presentes en la cepa SO005 (*algA⁻*, *amrZ*, *PphbB-gusA*). **B)** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR usando lisado celular de la cepa de referencia (*algA⁻*), de la cepa $\Delta amrZ$ o de la cepa SO005. Carril 1.- Banda correspondiente al amplicón silvestre de 1.1 kb de *amrZ* (Control positivo); Carril 2.- Banda correspondiente al amplicón mutante de 1.9 kb de *amrZ*; Carril 3 y 4.- Banda correspondiente al amplicón de 1.9 kb en la cepa SO005; Carril 5.- Marcador molecular.

Una vez confirmadas las cepas *algA::Km*, *PphbB-gusA Tc^r* y su derivada *amrZ*, *PphbB-gusA* en el fondo de la cepa no productora de alginato (*algA⁻*) se procedió a realizar la determinación de β -glucuronidasa. Para simplicidad en la

redacción y en el análisis de resultados, en este trabajo a la cepa *algA⁻* se le llamará cepa de referencia, mientras que a su derivada *amrZ⁻*, *PphbB-gusA* solo se le llamará *algA⁻/amrZ⁻*, teniendo presente que ambas portan la fusión transcripcional *PphbB-gusA*.

7.9.- Determinación cualitativa de β-glucuronidasa en las cepas SO003 y SO005

La hidrólisis del sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil β-D-glucurónido (X-gluc) por la enzima β-glucuronidasa (GusA) se manifiesta mediante una pigmentación azul en cepas que portan fusiones con el gen *gusA*, por tal motivo se realizó una determinación cualitativa de β-glucuronidasa de las cepas de referencia (*algA⁻*) y su derivada (*algA⁻, amrZ⁻*), las cuales portan la fusión *PphbB-gusA*. Esto se realizó, en cajas de BS suplementadas con X-Gluc, incubadas por 72 horas a 30° C y se tomaron evidencias a partir de las 12 horas, como se muestra en la figura 19.

Cualitativamente no se observó diferencia significativa entre las cepas, sin embargo, aprecia un aumento en la pigmentación azul en ambas a las 72 horas, lo cual, corresponde a la mayor acumulación observada en la cuantificación de PHB.

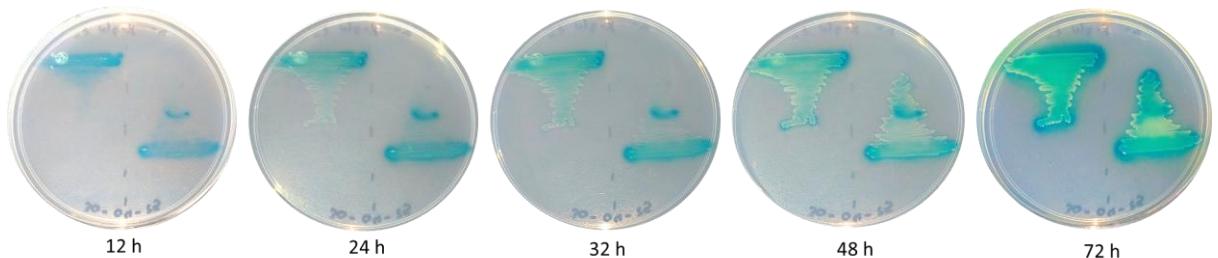


Figura 19. Determinación cualitativa de β-glucuronidasa en diferentes horas. En el lado izquierdo de la caja podemos observar la cepa de referencia *algA⁻*, mientras que en el lado derecho se presenta la cepa derivada *algA⁻/amrZ⁻*, dichas cepas portan la fusión *PphbB-gusA*.

7.10.- AmrZ ejerce un efecto negativo en la expresión del operón *phbBAC* en la fase estacionaria tardía

Para establecer la influencia de AmrZ sobre la expresión del operón *phbBAC*, se realizó una cinética de crecimiento (Fig. 20A), a 30 °C en medio BSMg durante 72 horas, de la cepa de referencia (SO003) y su derivada *amrZ*::Gm (SO005), las cuales portan la fusión transcripcional *PphbB-gusA*. La expresión de *phbB* se estimó de forma indirecta mediante la determinación de la actividad de β -glucuronidasa, producto del gen *gusA*, tal y como se describe en materiales y métodos; a partir de 12 horas (Fig. 20B).

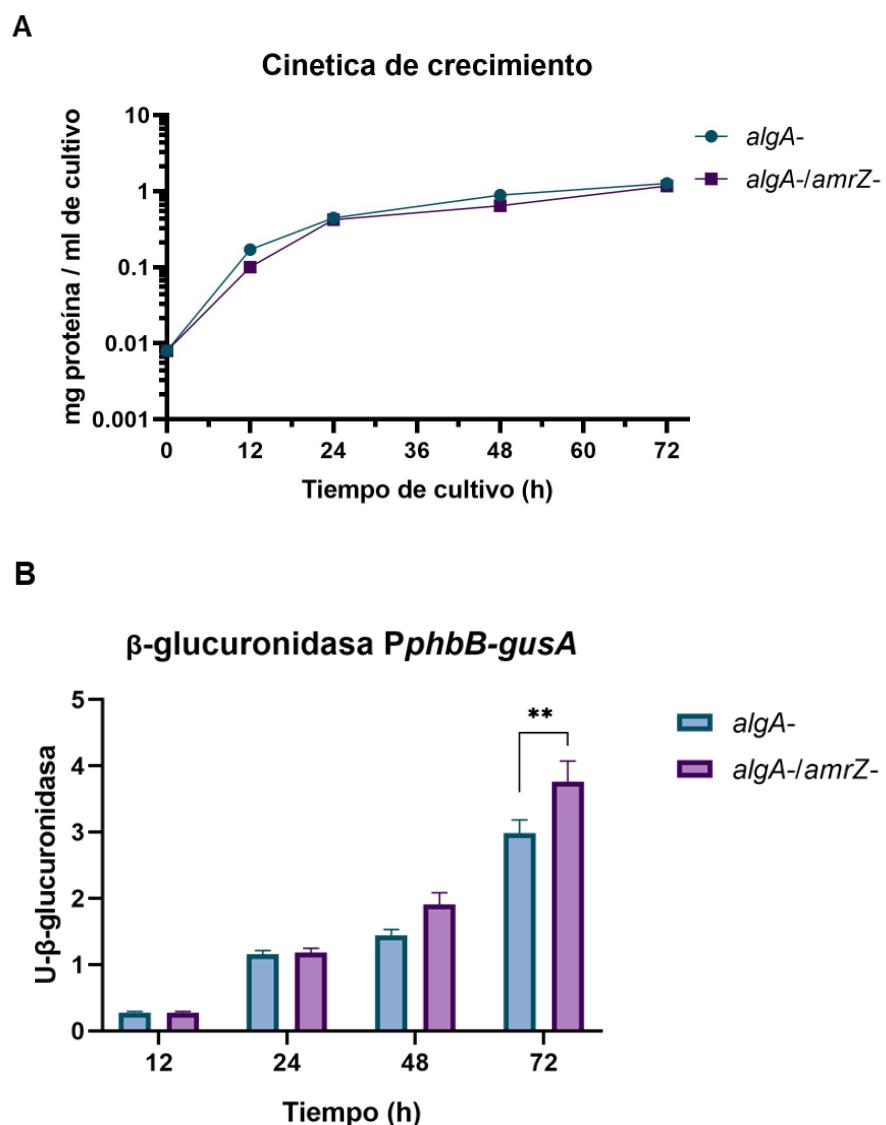


Figura 20. AmrZ ejerce un efecto negativo en la expresión del operón *phbBAC*. A) Cinética de crecimiento de las cepas SO003 (*algA*) y SO005 (*algA*/*amrZ*). B) Determinación de la actividad del promotor *phbB* mediante la determinación de β -

glucuronidasa en las cepas SO003 (*algA⁻*) y SO005 (*algA⁻/amrZ*). Los ensayos se corrieron por triplicado y se muestra el promedio de cada uno. Los datos estadísticos se realizaron mediante una prueba de ANOVA de dos vías utilizando el software GraphPad Prism (versión 8.0.2) tomando como referencia a la cepa *algA⁻*. Las diferencias se consideraron significativas con un valor de $p<0.05$.

Como podemos observar en la figura 20A, el crecimiento es similar entre ambas cepas, en cambio, la expresión de *phbB* (Fig. 20B) aumentó en la cepa *algA⁻/amrZ* a partir de las 48 horas de cultivo en comparación a la cepa de referencia (*algA⁻*). Sin embargo, se observa una diferencia significativa hasta las 72 horas de cultivo, siendo considerada como la fase estacionaria tardía. Esto último concuerda con lo observado en los ensayos de acumulación de PHB, en donde podemos observar una mayor acumulación respecto a etapas tempranas de crecimiento. De igual manera, lo anterior concuerda con lo sugerido por Ahumada-Manuel (2021), siendo que AmrZ ejerce un efecto negativo en la fase estacionaria tardía.

8. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo confirman que el factor transcripcional AmrZ influye en la acumulación de PHB (Fig. 15B) y en la expresión del operón biosintético *phbBAC* (Fig. 20B) en *A. vinelandii*. En particular, se observó una regulación negativa tanto en la acumulación de PHB como en la expresión del operón durante la fase estacionaria tardía (72 h), mientras que en etapas más tempranas esta influencia no resultó significativa en la expresión del operón biosintético *phbBAC*.

Si bien estos hallazgos coinciden con lo esperado, sería importante evaluar otras condiciones de crecimiento que podrían revelar resultados más significativos. Asimismo, aún se desconoce si la regulación del operón *phbBAC* por AmrZ ocurre de forma directa o indirecta, por lo que este trabajo puede servir como base para futuros estudios que profundicen en los mecanismos moleculares implicados.

Estos resultados aportan evidencia valiosa que respalda la importancia de seguir investigando reguladores transcripcionales como lo es AmrZ, principalmente por su potencial aplicación en el diseño de cepas bacterianas para la producción de biopolímeros.

9. REFERENCIAS

- Ahumada-Manuel, C. L. (2021). El c-di-GMP y su relación con la producción de alginato en *Azotobacter vinelandii* [Tesis de doctorado, Universidad Nacional Autónoma de México].
- Aldor, I. S., & Keasling, J. D. (2003). Process design for microbial plastic factories: Metabolic engineering of polyhydroxyalkanoates. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(5), 475–483. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2003.09.002>
- Baynham, P. J., Brown, A. L., Hall, L. L., & Wozniak, D. J. (1999). *Pseudomonas aeruginosa* AlgZ, a ribbon-helix-helix DNA-binding protein, is essential for alginate synthesis and *algD* transcriptional activation. *Molecular Microbiology*, 33(5), 1069–1080. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01550.x>
- Blanco-Romero, E., Garrido-Sanz, D., Durán, D., Rivilla, R., Redondo-Nieto, M., & Martín, M. (2022). Regulation of extracellular matrix components by AmrZ is mediated by c-di-GMP in *Pseudomonas ogarae* F113. *Scientific Reports*, 12(1), 11914. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-16162-x>
- Blunt, W., Dartailh, C., Sparling, R., Gapes, D. J., Levin, D. B., & Cicek, N. (2019). Development of high cell density cultivation strategies for improved medium chain length Polyhydroxyalkanoate productivity using *Pseudomonas putida* LS46. *Bioengineering*, 6(4), 89. <https://doi.org/10.3390/bioengineering6040089>
- Brandl, H., Gross, R. A., Lenz, R. W., & Fuller, R. C. (1990). Plastics from bacteria and for bacteria: Poly(β -hydroxyalkanoates) as natural, biocompatible, and biodegradable polyesters. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 41, 77–93. <https://doi.org/10.1007/BFb0010232>
- Centeno-Leija, S., Huerta-Beristain, G., Giles-Gómez, M., Bolivar, F., Gosset, G., & Martinez, A. (2014). Improving poly-3-hydroxybutyrate production in *Escherichia coli* by combining the increase in the NADPH pool and acetyl-CoA availability. *Antonie van Leeuwenhoek*, 105(4), 687–696. <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0124-5>

- Chen, G. Q. (2009). A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. *Chemical Society Reviews*, 38(8), 2434–2446. <https://doi.org/10.1039/b812677c>
- Chen, G. Q., Wu, Q., Zhao, K., & Yu, P. H. (2000). Functional polyhydroxyalkanoates synthesized by microorganisms. *Chinese Journal of Polymer Science*, 18(5), 389–396.
- Choi, J. I., & Lee, S. Y. (1997). Process analysis and economic evaluation for poly(3-hydroxybutyrate) production by fermentation. *Bioprocess Engineering*, 17(6), 335–342. <https://doi.org/10.1007/s004490050394>
- Galindo, E., Peña, C., Núñez, C., Segura, D., & Espín, G. (2007). Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii*. *Microbial Cell Factories*, 6, 7. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-6-7>
- Gonzaga-Pérez, M. C. (2018). Efecto del Sistema CbrA/CbrB sobre la expresión del operón biosintético de Poly-β-hidroxibutirato, *phbBAC*, en *Azotobacter vinelandii* [Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma del Estado de Morelos].
- Gonzaga-Pérez, M. C. (2024). Estudio de la función de AmrZ en la síntesis de alginato en *Azotobacter vinelandii* [Tesis de maestría, Universidad Nacional Autónoma de México].
- Grage, K., Jahns, A. C., Parlame, N., Palanisamy, R., Rasiah, I. A., Atwood, J. A., & Rehm, B. H. A. (2009). Bacterial polyhydroxyalkanoate granules: Biogenesis, structure, and potential use as nano-/micro-beads in biotechnological and biomedical applications. *Biomacromolecules*, 10(4), 660–669. <https://doi.org/10.1021/bm801394s>
- Hitchins, V. M., & Sadoff, H. L. (1970). Morphogenesis of cysts in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*, 104(1), 492–498. <https://doi.org/10.1128/jb.104.1.492-498.1970>
- Jones, C. J., Newsom, D., Kelly, B., Irie, Y., Jennings, L. K., Xu, B., Limoli, D. H., Harrison, J. J., Parsek, M. R., White, P., & Wozniak, D. J. (2014). ChIP-Seq and RNA-Seq reveal an AmrZ-mediated mechanism for cyclic di-GMP synthesis and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *PLOS Pathogens*, 10(3), e1003984. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003984>

- Kennedy, C., Rudnick, P., MacDonald, M. L., & Melton, T. (2005). Genus III. *Azotobacter* Beijerinck 1901. In D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley, & G. M. Garrity (Eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology: Vol. 2. The Proteobacteria* (2nd ed., pp. 384–402). Springer.
- Koller, M., Atlić, A., Dias, M., Reiterer, A., & Braunegg, G. (2010). Microbial PHA production from waste raw materials. In G.-Q. Chen (Ed.), *Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications* (pp. 85–119). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-03287-5_5
- Kusaka, S., Iwata, T., & Doi, Y. (1998). Microbial synthesis and physical properties of ultra-high-molecular-weight poly[(R)-3-hydroxybutyrate]. *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry*, 35(2), 319–335. <https://doi.org/10.1080/10601329808001984>
- Law, J. H., & Splecky, R. A. (1961). Assay of poly- β -hydroxybutyric acid. *Journal of Bacteriology*, 82(1), 33–36. <https://doi.org/10.1128/jb.82.1.33-36.1961>
- Lee, S. Y. (1996). Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering*, 49(1), 1–14. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19960105\)49:1<1::AID-BIT1>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19960105)49:1<1::AID-BIT1>3.0.CO;2-P)
- Lenz, R. W., & Marchessault, R. H. (2005). Bacterial polyesters: Biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology. *Biomacromolecules*, 6(1), 1–8. <https://doi.org/10.1021/bm049700c>
- Lin, L. P., & Sadoff, H. L. (1968). Encystment and polymer production by *Azotobacter vinelandii* in the presence of β -hydroxybutyrate. *Journal of Bacteriology*, 95(6), 2336–2343. <https://doi.org/10.1128/jb.95.6.2336-2343.1968>
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275.
- Martínez-Granero, F., Redondo-Nieto, M., Vesga, P., Martín, M., & Rivilla, R. (2014). AmrZ is a global transcriptional regulator implicated in iron uptake and environmental adaption in *P. fluorescens* F113. *BMC Genomics*, 15, 237. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-237>
- Núñez, C., López-Pliego, L., Ahumada-Manuel, C. L., & Castañeda, M. (2022). Genetic regulation of alginate production in *Azotobacter vinelandii* a

- bacterium of biotechnological interest: A mini-review. *Frontiers in Microbiology*, 13, 845473. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.845473>
- Olivera, E. R., Carnicero, D., Jodra, R., Miñambres, B., García, B., Abraham, G. A., Gallardo, A., Román, J. S., García, J. L., Naharro, G., & Luengo, J. M. (2001). Genetically engineered *Pseudomonas*: A factory of new bioplastics with broad applications. *Environmental Microbiology*, 3(10), 612–618. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2001.00225.x>
- Panchal, B., Bagdadi, A., & Roy, I. (2013). Polyhydroxyalkanoates: The natural polymers produced by bacterial fermentation. En S. Thomas, P. M. Visakh, & A. P. Mathew (Eds.), *Advances in Natural Polymers* (pp. 397–421). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-20940-6_12
- Peña, C., Castillo, T., García, A., Millán, M., & Segura, D. (2014). Biotechnological strategies to improve production of microbial poly-(3-hydroxybutyrate): A review of recent research work. *Microbial Biotechnology*, 7(4), 278–293. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12129>
- Pettinari, M. J., Vázquez, G. J., Silberschmidt, D., Rehm, B., Steinbüchel, A., & Méndez, B. S. (2001). Poly(3-hydroxybutyrate) synthesis genes in *Azotobacter* sp. strain FA8. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(11), 5331–5334. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.11.5331-5334.2001>
- Pryor, E. E., Jr., Waligora, E. A., Xu, B., Dellos-Nolan, S., Wozniak, D. J., & Hollis, T. (2012). The transcription factor AmrZ utilizes multiple DNA binding modes to recognize activator and repressor sequences of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *PLOS Pathogens*, 8(4), e1002648. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002648>
- Ramsey, D. M., Baynham, P. J., & Wozniak, D. J. (2005). Binding of *Pseudomonas aeruginosa* AlgZ to sites upstream of the *algZ* promoter leads to repression of transcription. *Journal of Bacteriology*, 187(13), 4430–4443. <https://doi.org/10.1128/JB.187.13.4430-4443.2005>
- Reusch, R. N., & Sadoff, H. L. (1983). Novel lipid components of the *Azotobacter vinelandii* cyst membrane. *Nature*, 302(5905), 268–270. <https://doi.org/10.1038/302268a0>
- Sabra, W., Zeng, A.-P., & Deckwer, W.-D. (2001). Bacterial alginate: Physiology, product quality and process aspects. *Applied Microbiology and*

- Biotechnology*, 56(3–4), 315–325.
<https://doi.org/10.1007/s002530100699>
- Sadoff, H. L. (1975). Encystment and germination in *Azotobacter vinelandii*. *Bacteriological Reviews*, 39(4), 516–539.
<https://doi.org/10.1128/br.39.4.516-539.1975>
- Schreiter, E. R., Sintchak, M. D., Guo, Y., Chivers, P. T., Sauer, R. T., & Drennan, C. L. (2003). Crystal structure of the nickel-responsive transcription factor NikR. *Nature Structural Biology*, 10(10), 794–799.
<https://doi.org/10.1038/nsb985>
- Segura, D., Cruz, T., & Espín, G. (2003). Encystment and alkylresorcinol production by *Azotobacter vinelandii* strains impaired in poly-β-hydroxybutyrate synthesis. *Archives of Microbiology*, 179(6), 437–443.
<https://doi.org/10.1007/s00203-003-0553-4>
- Segura, D., Núñez, C., & Espín, G. (2020). *Azotobacter* cysts. In eLS. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000295.pub3>
- Sudesh, K., Abe, H., & Doi, Y. (2000). Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: Biological polyesters. *Progress in Polymer Science*, 25(10), 1503–1555. [https://doi.org/10.1016/S0079-6700\(00\)00035-6](https://doi.org/10.1016/S0079-6700(00)00035-6)
- Urtuvia, V., Maturana, N., Acevedo, F., Peña, C., & Díaz-Barrera, A. (2017). Bacterial alginate production: An overview of its biosynthesis and potential industrial production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(11), 198. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2363-x>
- Velázquez-Sánchez, C., Espín, G., Peña, C., & Segura, D. (2020). The modification of regulatory circuits involved in the control of polyhydroxyalkanoates metabolism to improve their production. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 386.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00386>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Micrografías electrónicas de una célula de <i>A. vinelandii</i>	3
Figura 2. Diagrama del ciclo de vida de <i>A. vinelandii</i>	5
Figura 3. Síntesis de alginato en <i>A. vinelandii</i>	6
Figura 4. Estructura química del PHB y su morfología en <i>A. vinelandii</i>	8
Figura 5. Síntesis de PHB en <i>A. vinelandii</i>	9
Figura 6. Cascada de regulación de la expresión del operón <i>phbBAC</i> en <i>A. vinelandii</i>	10
Figura 7. El alginato y PHB compiten por la fuente de carbono.....	11
Figura 8. Cristalografía de la estructura de la proteína AmrZ.	12
Figura 9. AmrZ de <i>A. vinelandii</i> es homologa de AmrZ de <i>P. aeruginosa</i>	14
Figura 10. Función del factor transcripcional AmrZ en la síntesis de alginato. .	14
Figura 11. La región reguladora del operón <i>phbBAC</i> posee un sitio putativo de unión a AmrZ.....	15
Figura 12. Construcción de la cepa SO001 (<i>algA::Km</i> , $\Delta amrZ::Gm$).	28
Figura 13. Construcción de la cepa SO002 (<i>algA::Km</i> , $\Delta amrZ::Gm$ / <i>amrZ⁺</i>)....	29
Figura 14. Determinación cualitativa de acumulación de PHB en la cepa de referencia y en sus derivadas <i>amrZ</i> ⁻ y <i>amrZ</i> ⁻ / <i>amrZ</i> ⁺	30
Figura 15. AmrZ ejerce un efecto negativo sobre la producción de PHB.....	31
Figura 16. Las micrografías electrónicas muestran gránulos de PHB de las cepas utilizadas en este trabajo, a 2 μ m y 5 μ m durante las 72 horas.....	33
Figura 17. Construcción de cepas que portan la fusión <i>PphbB-gusA</i> en el fondo de referencia <i>algA::Km</i>	35
Figura 18. Construcción de la cepa que portan la fusión <i>PphbB-gusA</i> en el fondo mutante $\Delta amrZ::Gm$	36
Figura 19. Determinación cualitativa de β -glucuronidasa en diferentes horas ..	37
Figura 20. AmrZ ejerce un efecto negativo en la expresión del operón <i>phbBAC</i>	38

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Cepas utilizadas en este trabajo	20
Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo	21
Tabla 3. Reactivos y concentraciones empleados en una reacción de PCR	23
Tabla 4. Composición y volúmenes de la solución reactiva utilizados por reacción en el ensayo de Lowry.....	24

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico
AP: Alquilpironas
AR: Alquilresorcinoles
ARN: Ácido ribonucleico
BHB: B-Hidroxibutirato
B-gluc: B-glucuronidasa
BS: Medio Burk-Sacarosa
BSMg: Medio Burk-Sacarosa con Sulfato de Magnesio
°C: Grados centigrados
Cb: Cuerpo central
c-di-GMP: Diguanilato ciclico
cm: Centimetros
CM: Medio Competente
CoA: Coenzima A
DO: Densidad Optica
Ex: Exina
EMSA: Ensayo de Desplazamiento de Movilidad Electroforética
f: Flagelos
Fig: Figura
Fw: Forward
Gm: Gentamicina
h: Horas
In: Intina
kb: kilobases
kDa: kilodalton
Km: Kanamicina
L: Litro
M: Molar
mcl-PHAs: PHAs de cadena larga
MEME/FIMO: Multiple EM for Motif Ocurrences/Find Individual Motif Ocurrences
mg: Miligramo
mL: Mililitro
 mM: Milimolar
nm: Nanómetros
PCR: Reacción en Cadena en reacción de la Polimerasa
PNPG: p-nitrofenil-β-D-glucopiranósido
PHAs: Polihidroxialcanoatos
PHB: Poli-B-Hidroxibutirato
pmol: Picomol
rpm: Revoluciones por minuto
Rv: Reverse
Rx: Reacción
scl-PHAs: PHAs de cadena corta
t: Tiempo
Tc: Tetraciclina
U B-gluc: Unidades de B-glucuronidasa
WT: Wild type
X-Gluc: Ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil--D-glucurónico

ANEXO

En este apartado se presentan los resultados de las dos réplicas biológicas de la cinética de crecimiento y cuantificación de PHB. Estos datos sirvieron para elaborar la Fig. 15 en la cual se reporta el promedio de estas dos réplicas.

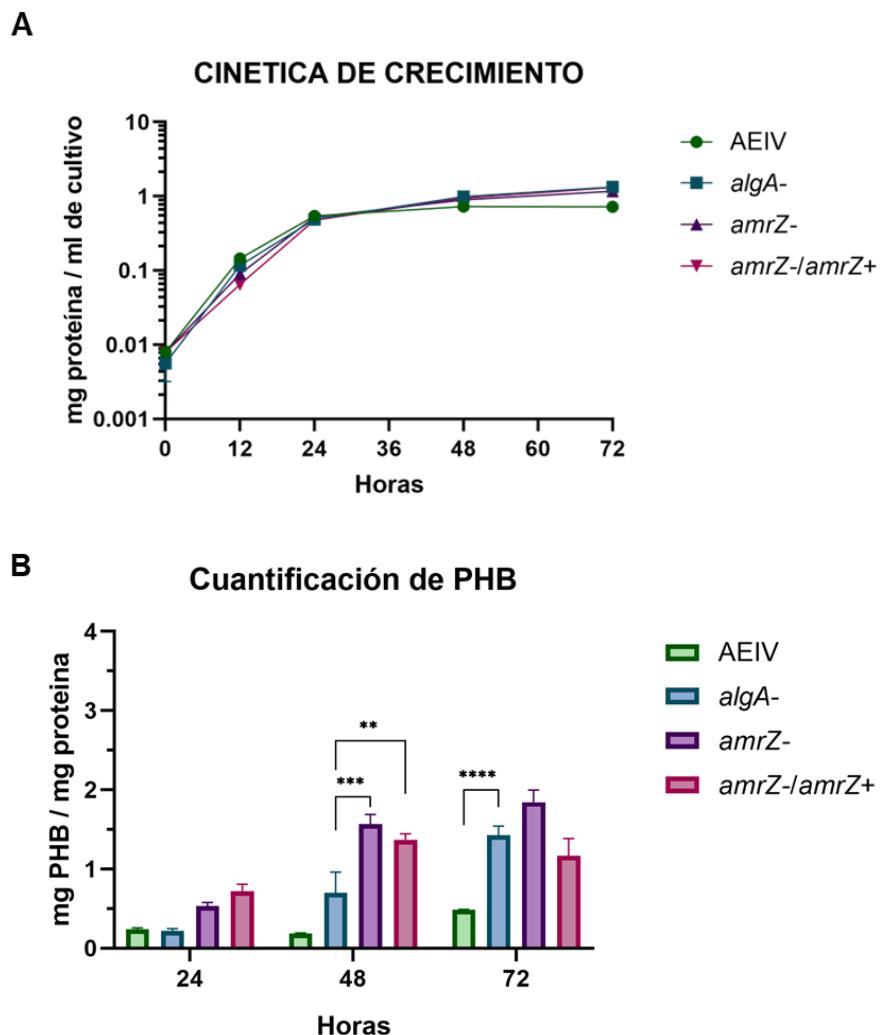


Figura 1. Influencia de AmrZ sobre el crecimiento y acumulación de PHB. Réplica 1. A) Cinética de crecimiento de las cepas AEIV, JG519 (*algA*⁻), SO001 (*amrZ*) y S0002 (*amrZ*/*amrZ*⁺). B) Cuantificación de PHB de las cepas AEIV, JG519 (*algA*⁻), SO001 (*amrZ*) y S0002 (*amrZ*/*amrZ*⁺). Los datos corresponden a la primera réplica independiente. Los datos estadísticos se realizaron mediante una prueba de ANOVA de dos vías utilizando el software GraphPad Prism (versión 8.0.2). Las diferencias se consideraron significativas con un valor de $p < 0.05$.

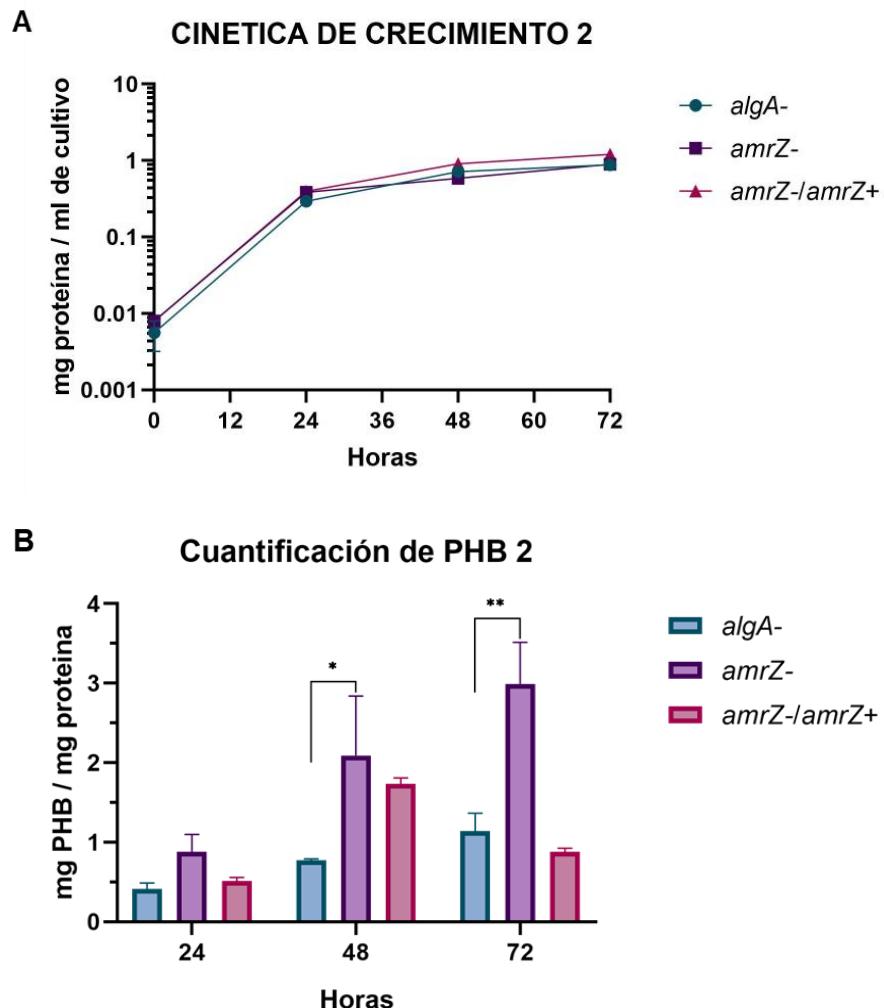


Figura 2. Influencia de AmrZ sobre el crecimiento y acumulación de PHB. Réplica 2. A) Cinética de crecimiento de las cepas AEIV, JG519 (*algA*), SO001 (*amrZ*) y S0002 (*amrZ/amrZ⁺*). B) Cuantificación de PHB de las cepas AEIV, JG519 (*algA*), SO001 (*amrZ*) y S0002 (*amrZ/amrZ⁺*). Los datos corresponden a la segunda replica independiente. Los datos estadísticos se realizaron mediante una prueba de ANOVA de dos vías utilizando el software GraphPad Prism (versión 8.0.2). Las diferencias se consideraron significativas con un valor de $p<0.05$.