



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**INCREMENTO DE LA PRODUCCIÓN DE RAMNOLÍPIDOS EN LA
CEPA MODELO DE ESTUDIO *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

David Hernández Garrido

MÉXICO, D.F.

2012





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Estela Sánchez Quintanar

VOCAL: Profesor: Marco Antonio Ortiz Jiménez

SECRETARIO: Profesor: Gloria Soberón Chávez

1er. SUPLENTE: Profesor: Francisco Javier Plasencia de la Parra

2° SUPLENTE: Profesor: Euclides Ávila Chávez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS DE LA UNAM.

ASESOR DEL TEMA: Dra. Gloria Soberón Chávez _____

SUPERVISOR TÉCNICO: M. en C. Abigail González Valdéz _____

SUSTENTANTE: David Hernández Garrido _____

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios primeramente, quien le da sentido a cada día de mi existencia, por permitirme llegar a este paso importante en mi vida y por haber creado este mundo maravilloso que no deja de asombrarme a medida que lo conozco más y más.

Agradezco a mis padres Blanca y Pablo por haber dedicado su esfuerzo y tiempo en mi preparación, para hoy ser la persona que soy.

A mi hermano Pablo, por todo su apoyo incondicional y amistad, dándome un gran ejemplo a seguir en cada área de mi vida.

A mis familiares y amigos, por todos los momentos que hemos vivido juntos, momentos que quedan muy profundamente grabados.

He aquí el que forma las montañas, el que crea el viento, el que revela al hombre sus designios, el que convierte la aurora en tinieblas, el que marcha sobre las alturas de la tierra: su nombre es el SEÑOR Dios Todopoderoso.

Amós 4:13

Este proyecto fue realizado en el laboratorio de la Dra. Gloria Soberón Chávez en el departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM y fue financiado por los donativos PAPIIT-UNAM IN202510 Y CONACYT 128673.

ÍNDICE

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN.....	4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5
Producción de ramnolípidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7
Biosíntesis de los Ramnolípidos.	10
La producción de ramnolípidos está regulada por el sistema sensor de quórum.	13
Regulación de la producción de ramnolípidos por factores nutricionales.	17
Producción de ramnolípidos en huéspedes heterólogos y en cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
OBJETIVOS.....	21
MATERIALES Y MÉTODOS	22
RESULTADOS Y DISCUSIONES	26
CONCLUSIONES	36
PERSPECTIVAS	36
REFERENCIAS.....	37

RESUMEN

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria gram negativa que produce diversas moléculas con propiedades biotecnológicas, entre ellas los ramnolípidos; los cuales son moléculas glicolípídicas con propiedades tensoactivas que tienen aplicaciones biotecnológicas potenciales. Las enzimas involucradas en la síntesis de ramnolípidos son la sintasa de dímeros de ácidos grasos RhIA y las ramnosiltransferasas RhIB (que sintetiza a partir del dímero de ácidos grasos, el mono-ramnolípidos que contiene una molécula de ramnosa) y RhIC (que produce los di-ramnolípidos que contienen dos moléculas de ramnosa usando como sustrato a los mono-ramnolípidos); ambas ramnosiltransferasas usan dTDP-L-ramnosa como sustrato. Diversos grupos de investigación han intentado incrementar la producción de ramnolípidos ya sea en sistemas heterólogos o en diversas cepas de *Pseudomonas* con éxito limitado. Sin embargo, la revisión de los antecedentes anteriores mostró que este trabajo es la primera vez que se aborda la sobreexpresión de los genes *rhlAB* sin sobreexpresar el locus regulatorio *rhlRI* en la cepa modelo de estudio *P. aeruginosa* PAO1. Así pues, en este trabajo se reporta un enfoque para incrementar la síntesis de ramnolípidos en *P. aeruginosa* mediante la sobreexpresión de las enzimas codificadas por los genes *rhlAB* clonados bajo un promotor que se induce por arabinosa (P_{BAD}). El mayor nivel en la producción de ramnolípidos al clonar *en trans* los genes *rhlAB* en la cepa modelo de estudio *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 se obtuvo con 0.01% de arabinosa como inductor, en donde se duplica la producción de ramnolípidos con respecto al control. Sin embargo, si se sobreexpresa *rhlAB* a la concentración de 0.1% de arabinosa, la producción de ramnolípidos disminuye con respecto a 0.01% a los niveles del control y la proporción de mono y di-ramnolípidos cambia significativamente, disminuyendo la concentración relativa del di-ramnolípidos. Este resultado sugiere que en estas condiciones se disminuye la actividad de la enzima RhIC, por lo que la producción de ramnolípidos está muy regulada. Un aumento en la síntesis de ramnolípidos mediante la sobreexpresión de los genes *rhlAB* en la cepa modelo de estudio *P. aeruginosa* PAO1 permitirá en un futuro utilizar esta construcción para sobreproducir ramnolípidos en otras cepas de *Pseudomonas aeruginosa* no virulentas ó con virulencia reducida que puedan ser usadas en la industria.

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is a gram-negative bacterium that produces different compounds that have potential biotechnological applications, among them the biosurfactant rhamnolipids; which are glycolipids with tensioactive properties. The enzymes involved in rhamnolipid production are the synthase of fatty acid dimmers, RhIA and the rhamnosyl-transferases RhIB (that synthesizes mono-rhamnolipid using as substrate a dimer of fatty acids and TDP-L-rhamnose) and RhIC (that produces di-rhamnolipid by the transfer of a second rhamnose moiety to mono-rhamnolipid, using TDP-L-rhamnose as rhamnose donor). Several research groups have tried to increase rhamnolipid production using diverse *Pseudomonas* strains or other bacteria as heterologous hosts, but they have had limited success. The aim of this research is to use a novel strategy to hyper produce rhamnolipids using the *P. aeruginosa* type strain PAO1; this is the first reported case in which an approach for the over-expression of the operon encoding for RhIA and RhIB (*rhIAB*) is made without modifying the expression of the regulatory genes *rhIR* and *rhII*. We use a promoter which is induced by arabinose (P_{BAD}) to over express the *rhIAB* operon. The highest rhamnolipid production level was achieved when the PAO1 strain containing a plasmid with the *rhIAB* operon under the *ara* promoter was induced with 0.01% of arabinose. In this condition rhamnolipid production was duplicated with respect to the control strain. However, if *rhIAB* operon is induced to a higher level by the addition of 0.1% arabinose, total rhamnolipid production is diminished and the relative proportion of mono- and di-rhamnolipid is dramatically changed, by a reduction of the relative proportion of di-rhamnolipids: This results suggest that RhIC activity is reduced due to a novel regulatory mechanism, not yet determined, and shows that *P. aeruginosa* presents a stringent regulation on the synthesis of rhamnolipids. An increment of rhamnolipids production in *P. aeruginosa* PAO1 type strain by over-expression of the *rhIAB* operon will enable the construction of rhamnolipids hyper-producing strains using as hosts *P. aeruginosa* strains with reduced virulence.

INTRODUCCIÓN

Los biosurfactantes son surfactantes ideales para aplicaciones ambientales debido a su biodegradabilidad y baja concentración micelar **(64)**. Sus propiedades fisicoquímicas, tensoactivas y biológicas los hacen compuestos efectivos para su aplicación en distintos procesos industriales y ambientales **(4)**. En comparación con los surfactantes sintéticos, los biosurfactantes ofrecen la ventaja de tener un impacto ambiental nulo o reducido y la posibilidad de producción in situ.

Entre los biosurfactantes producidos por bacterias, hongos y levaduras se incluyen a los glicolípidos, lipoaminoácidos, lipopéptidos, lipoproteínas, lipopolisacáridos, fosfolípidos, monoglicéridos y diglicéridos. De entre estos, los ramnolípidos producidos por cepas de *P. aeruginosa* han recibido gran atención debido a sus propiedades tensoactivas y emulsificantes **(62, 50)**.

En 1949, Jarvis y Johnson describieron este compuesto, y en 1963, se propuso una ruta biosintética para la síntesis de ramnolípidos mediante transferencias glicosílicas secuenciales **(9)**. En 1994, Ochsner *et al.* aislaron y caracterizaron los genes *rhlAB* involucrados en la biosíntesis de ramnolípidos.

Las especies de *P. aeruginosa* son conocidas por su habilidad para producir el biosurfactante conocido como ramnolípidos, que son compuestos tensoactivos que además de ser un factor de virulencia poseen usos biotecnológicos potenciales. **(45,50)** por lo que pueden tener un posible uso promisorio para la producción de biosurfactantes.

Sin embargo, *P. aeruginosa* es un patógeno oportunista (nivel de bioseguridad S2) y por lo tanto podría representar un peligro para personas inmunocomprometidas.

Como un enfoque alternativo para tener cepas que puedan ser usadas a nivel industrial para la síntesis de ramnolípidos, se ha expresado el operón *rhIAB* en huéspedes heterólogos como *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas oleovorans* y *Escherichia coli* con éxito limitado (10,12,66,98).

En la actualidad, la producción a gran escala utiliza cepas de *P. aeruginosa*, como las producidas por Rhamnolipid Inc., que provee preparaciones individuales de mono y di-ramnolípidos. Los ramnolípidos provenientes de *P.aeruginosa* son la clase más promisoría de biosurfactantes porque se pueden obtener a altos rendimientos y son considerados seguros para su uso en productos alimenticios, cosméticos y la industria farmacéutica. (63).

REVISIÓN DE LA LITERATURA

Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria gram negativa perteneciente a la rama γ de las proteobacterias que puede ser aislada de muchos hábitats diferentes que incluyen: agua, suelo y plantas y es también un patógeno oportunista para el humano que causa infecciones en individuos inmunocomprometidos, entre los que están aquellos con fibrosis quística (33), cáncer neutropénico (5) y heridas por quemaduras severas (77).

Es capaz también de establecer interacciones patogénicas con una gran variedad de huéspedes (18, 93). Los aislados clínicos no son genéticamente distintos de las cepas aisladas del medio ambiente (81). Su habilidad de producir una gran variedad de factores de virulencia como: toxinas, proteasas, alginato, lipopolisacáridos (LPS), piocianina, y ramnolípidos (92), le permite a este organismo versátil debilitar a sus huéspedes.

Sin embargo, a la vez que *P. aeruginosa* causa al hombre problemas de salud, esta bacteria tiene diversas aplicaciones biotecnológicas, sobre todo en el área ambiental. Así, es uno de los pocos organismos en degradar algunos contaminantes como los alcanos de cadena ramificada (84), produce algunas enzimas como la lipasa (52); al igual que otras *Pseudomonas* produce un polímero de ácidos grasos, el polihidroxicanoato (PHA), que puede ser usado para producir plásticos biodegradables (69) y produce los biosurfactantes ramnolípidos. La producción de ramnolípidos es característica de *P. aeruginosa* (42), aunque se han reportado recientemente otras especies de *Pseudomonas* capaces de producir ramnolípidos (63).

Strain	ST (mN/m)	CMC (mg/L)	Rhamnolipid (g/L)
<i>P. putida</i> ^a	31.2	91	4.1
<i>P. alcaligenes</i>	28	30	2.3
<i>P. fluorescens</i>	35	20	2.0
<i>P. chlororaphis</i>	25–30	n.d.	1.0
<i>P. stutzeri</i>	n.d.	n.d.	0.5
<i>P. cepacia</i>	n.d.	n.d.	0.3
<i>P. luteola</i>	n.d.	n.d.	0.38
<i>P. aeruginosa</i> ^a	27.9	9	12.5
<i>P. aeruginosa</i>	27.3	13.9	3.9
<i>P. aeruginosa</i> ^b	28.3	46.8	46

Tabla 1. Especies de *Pseudomonas* reportadas recientemente como productoras de ramnolípidos. n.d: no determinado, ^a cepa mutante, ^b fermentación sólida. ST: Tensión superficial CMC: Concentración Micelar Crítica.

Producción de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa*.

Los ramnolípidos son glicolípidos que contienen ramnosa. Estos compuestos están predominantemente contruidos por la unión de una o dos moléculas de ramnosa y uno o dos ácidos grasos β -hidroxi (45). Los ramnolípidos con una molécula de ramnosa son referidos como mono-ramnolípidos, mientras que los que tienen dos moléculas de ramnosa son di-ramnolípidos. La longitud de la cadena carbonada que se encuentra en la porción β -hidroxiacil del ramnolípidos puede variar significativamente. Sin embargo, en el caso de *P.aeruginosa* la forma predominante en cultivo líquido consiste en cadenas de moléculas de 10 carbonos (25) (Figura1). La producción de ramnolípidos por *P. aeruginosa* ocurre bajo condiciones limitadas de nitrógeno y hierro durante las fases exponencial tardía y estacionaria de crecimiento en medio líquido con agitación rápida (35).

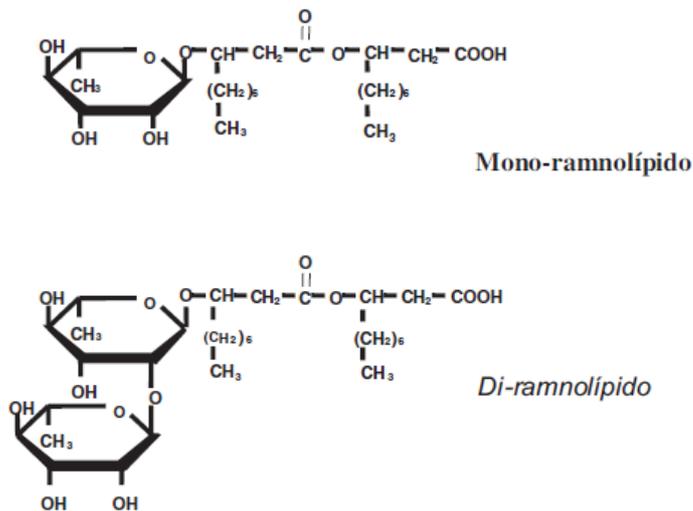


Figura 1. Estructura química de los ramnolípidos. Dímero de ácidos grasos 3-hidroxi, unidos mediante un enlace glicosídico β a una fracción mono o di de ramnosa.

Se muestran las especies con dímeros de ácido 3-hidroxidecanoico que es la especie más abundante producida por *Pseudomonas aeruginosa*:

ramnosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato (mono-ramnolípidos) y ramnosil-ramnosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato (di-ramnolípidos).

El rol que los ramnolípidos tienen en el ciclo de vida de *P. aeruginosa* y en su patogenicidad no ha sido completamente entendido, pero se conoce que estos glicolípidos están implicados en la degeneración de lípidos y lecitina, que en consecuencia pueden contribuir a la invasión de tejidos y necrosis **(96)**.

También se ha planteado la hipótesis de que los ramnolípidos pueden solubilizar los surfactantes de los pulmones, haciéndolos más accesibles a la degradación por otros factores de virulencia como la Fosfolipasa C **(16)**.

Se ha demostrado que los ramnolípidos inhiben el transporte mucociliar **(3)** y alteran el transporte iónico epitelial de las vías respiratorias **(82)**. Además de lo anterior, los ramnolípidos afectan la membrana celular externa **(2)** y han sido implicados en la motilidad celular y en la formación de la estructura de las biopelículas **(20)**.

Debido a sus propiedades tensoactivas estos compuestos tienen muchas aplicaciones potenciales en la industria y en el medio ambiente **(45, 50)**. Pueden ser usados como aditivos para la remediación ambiental en la limpieza de suelos contaminados con hidrocarburos **(50)** o con metales pesados **(58)**. También como agentes de control biológico **(91)** como en el control biológico de patógenos de plantas zoospóricos de importancia económica en la agricultura como *Phythium aphanidermatum* **(90)**, en la producción de agentes químicos finos como L-Ramnosa, en la industria cosmética como biosurfactante por sus efectos anti-irritantes y compatibilidad con la piel **(44)**, para la fabricación de liposomas **(39)** y emulsiones **(40)** y la caracterización de superficies y recubrimientos de superficies,

usando el pirenacilester de ramnolípido (R-PE) como una sonda fluorescente tensoactiva **(41)**.

La biosíntesis de ramnolípidos en *P.aeruginosa* es un proceso multienzimático que usa intermediarios del metabolismo central de la bacteria, como son la dTDP-L-ramnosa proveniente de la activación de azúcares por deoxi timidina difosfato (dTDP) y los ácidos grasos provenientes de la síntesis de ácidos grasos. La producción de este biosurfactante está altamente regulada a nivel transcripcional por la respuesta sensor de quórum, por las condiciones del medio ambiente y la producción de polihidroxicanoatos **(78)** .La vía de síntesis de los ramnolípidos tiene pasos en común con la síntesis de otros compuestos celulares como alginato, lipopolisacáridos (LPS), y polihidroxicanoatos (PHA).

Biosíntesis de los Ramnolípidos.

La producción de ramnolípidos al inicio se encontró en los extractos libres de células de *Pseudomonas aeruginosa* por dos reacciones secuenciales (8,9) (Fig.2)

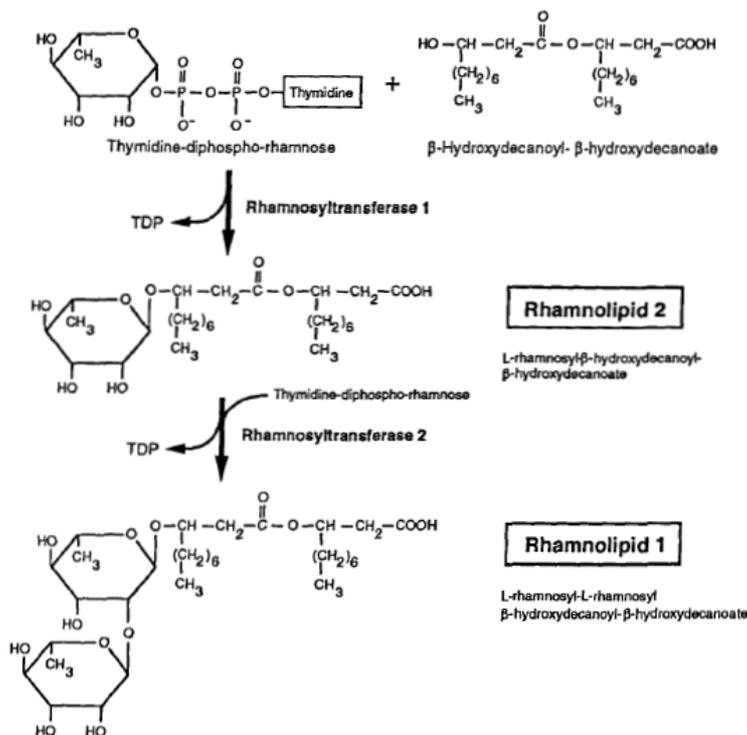


Figura 2. Diagrama de la Biosíntesis de ramnolípidos.

Ahora se sabe que *P.aeruginosa* produce ramnolípidos mediante tres reacciones secuenciales (Fig. 3). Las dos ramosiltransferasas que intervienen en la síntesis de los ramnolípidos, son RhIB para producir los mono-ramnolípidos (65,10,26) y RhIC para los di-ramnolípidos (78). Estas enzimas tienen como sustrato común a la dTDP-L-ramnosa (Fig. 3). Este azúcar activado es también un precursor del lipopolisacárido (LPS) y es sintetizado por las enzimas RmlA, RmlB, RmlC y RmlD a partir de glucosa-1-fosfato (30) (Fig.3).

La enzima AlgC, que también participa en la síntesis del exopolisacárido alginato, y convierte la glucosa-6-fosfato a glucosa-1-fosfato **(69)**.

Se ha visto que mutaciones en el operón *rml* de serotipos de *P. aeruginosa* inhiben la producción de ramnolípidos.**(Olvera and Soberón Chávez, datos no publicados)**.

En la primera reacción, la enzima ramnosiltransferasa A (RhIA), que parece estar ligeramente unida a la membrana interna **(78) (Fig.3)** usa como sustrato ácidos grasos de la síntesis celular, drenados del ciclo general de síntesis de novo por la enzima RhIG **(11)**, o del catabolismo de ácidos grasos, para sintetizar la parte que constituye el dímero de ácidos grasos de los ramnolípidos y de los HAAs libres. **(26)**. RhIG muestra una homología significativa en su secuencia con numerosas cetoacil reductasas dependientes de NADPH.

La siguiente reacción está catalizada por la enzima de unión a membrana ramnosiltransferasa B (RhIB) y usa dTDP-L-ramnosa y HAAs para producir mono-ramnolípidos **(65,78)**. Éstos son el sustrato, junto con la dTDP-L-ramnosa, de la enzima RhIC que interviene en la tercera reacción para producir di-ramnolípidos **(77)**. Esta enzima también al igual que RhIA parece estar ligeramente unida a la membrana interna.

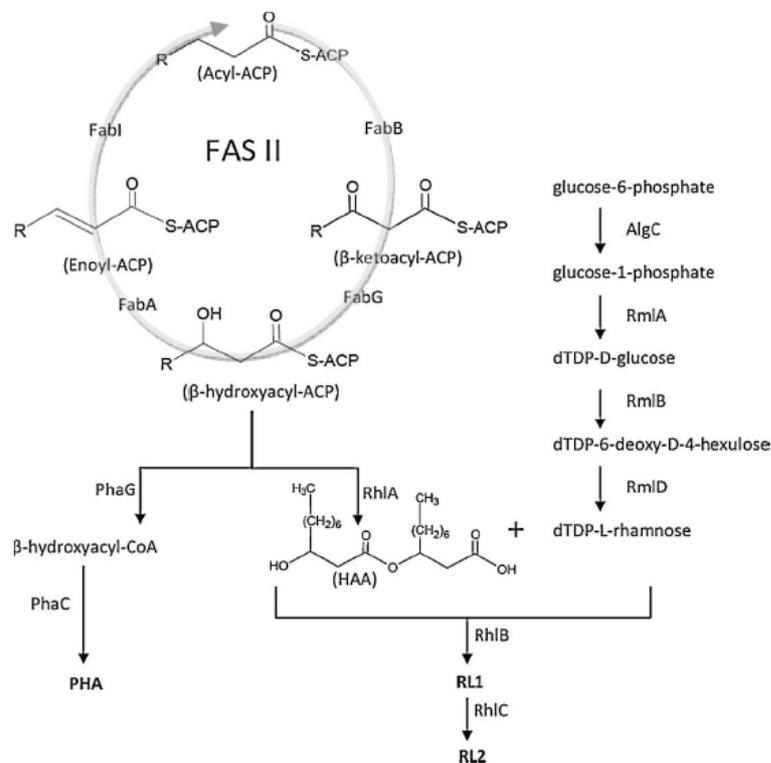


Figura 3. Vía biosintética de los ramnolípidos. El intermediario β -hidroxiacil-ACP de la vía de las sintasas de ácidos grasos de tipo II (FAS II) participa en la biosíntesis de ramnolípidos y de PHAs y su síntesis es determinada por la competencia entre PhaG y RhlA por los intermediarios de β -hidroxiacil-ACP. FabB(β -cetoacil-ACP-sintasa), FabG(β -cetoacil-ACP-reductasa), FabA(β -hidroxiacil-ACP dehidratasa), FabI (enoi-ACP reductasa), PhaG (3-hidroxiacil-CoA-ACP transferasa), PhaC (PHAsintasa), AlgC (fosfoglucomutasa), RmlA (glucosa-1-fosfato timidiltransferasa), RmlB (dTDP-D-glucosa 4,6-dehidratasa), RmlD (dTDP-6-deoxi-4-hexulosa 4-reductasa).

La producción de ramnolípidos está regulada por el sistema sensor de quórum.

P. aeruginosa controla muchos genes dependiendo de la densidad celular mediante un fenómeno denominado sensor de quórum, que depende de la producción de autoinductores bacterianos **(30, 102)**.

Los genes *rhIA* y *rhIB* están organizados en un operón y están agrupados junto con un locus regulatorio, que contiene los genes *rhIR* y *rhII* organizados en tandem corriente abajo de los genes *rhIAB*, que es requerido para su expresión a través del sistema sensor de quórum **(65,68)**. RhIR es una proteína de 28kDa que pertenece a la familia LuxR de activadores transcripcionales **(65)**. Su actividad está mediada por N-acil-homoserina-lactonas (HSL, por sus siglas en inglés), mediante un mecanismo dependiente de la densidad celular, producidas por la sintetasa del autoinductor RhII **(68)**.

Por su parte, el gen *rhIC* no se encuentra agrupado en el cromosoma junto a otros genes *rhl* y forma parte de un operón con un gen cuya función no se conoce aún, pero que está regulado a nivel transcripcional de una manera similar al operón *rhIAB* **(78)**.

P. aeruginosa posee dos circuitos interrelacionados reguladores de la transcripción **(30,46)**, llamados *las* y *rhl*, **(32,71,95)** que regulan diferentes procesos incluyendo la expresión de las enzimas involucradas en la síntesis de ramnolípidos, la producción de piocianina y diferentes enzimas como proteasa alcalina, la exotoxina A, y el mantenimiento de la arquitectura de las biopelículas

(21, 22, 81,87). En *P. aeruginosa* existe una jerarquía en el sistema sensor de quórum en donde el sistema *las* está en la parte superior de la cascada regulatoria.

La respuesta sensora de Quorum depende de la producción de 2 autoinductores. Los autoinductores más comunes producidos por las proteobacterias son N-acil-homoserina-lactonas (HSL, por sus siglas en inglés) con cadenas laterales de varias longitudes(30). Estas pequeñas moléculas difusibles de señalización activan la expresión génica a altas densidades bacterianas mediante la interacción con activadores específicos de la transcripción de la familia LuxR.

En *P. aeruginosa* existen dos autoinductores que son el autoinductor 1 (PAI-1) [N-(3-oxododecanoil) homoserina-lactona] también llamado 3-oxo-C₁₂-HSL] (72) y el autoinductor 2 (PAI-2) [N-butiril homoserina- lactona también llamado C4-HSL] (73). El C4-HSL es sintetizado por RhII y el 3-oxo-C₁₂-HSL es sintetizado por LasI. . La PQS [2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona] es otra molécula sensora de quórum (75), que actúa como un intermediario entre los sistemas sensores de quórum *las* y *rhl* (59). Se ha visto que en mutantes deficientes en la síntesis de PQS, las células de *P. aeruginosa* producen menos ramnolípidos a comparación de las cepa silvestre (27) por lo que se cree que PQS induce directa o indirectamente al regulón *rhl* (54).

Primero, con el incremento en la densidad celular bacteriana, ocurre la inducción del sistema sensor de quórum *las* mediante la inducción de *lasR* por Vfr **(1)** en la segunda mitad de la fase logarítmica de crecimiento llegando a una inducción máxima en la fase estacionaria **(74)**. Esto resulta en un incremento en la concentración del autoinductor PAI-1(3-oxo-C12-HSL) que al llegar a una concentración umbral, éste se une a la proteína LasR y la convierte en un activador transcripcional formando el complejo LasR-PAI-1. Este complejo activa la expresión de varios genes (*lasI* , *lasB*, *lasA*, *apr*, *toxA*) **(32, 46, 71, 74)** asociados a virulencia incluyendo el que codifica para el regulador transcripcional RhIR **(55)**, *rhlI***(22)** y *pqsH*, requerido para la producción de PQS **(53)**. Luego, C4-HSL se une a RhIR y promueve la expresión de *rhlAB***(65)** y *rhlC***(78)** de entre otros genes. RhIR activa la transcripción de *rhlAB* cuando está acoplado con C4-HSL pero reprime su transcripción cuando no está acoplado con su autoinductor **(56)**. Sin embargo, este operón aún en presencia de RhIR y C4-HSL no se expresa en la fase exponencial de crecimiento cuando *P. aeruginosa* se hace crecer en un medio rico, presuntamente debido a su dependencia transcripcional en el factor sigma de fase estacionaria (σ^S) **(56)**.

Los dos sistemas sensor de quórum de *P. aeruginosa* forman un gran complejo circuito regulatorio **(Fig. 4)** que no ha sido aún elucidado completamente. Los reguladores transcripcionales de la familia LuxR se unen a una secuencia específica de DNA para activar la transcripción **(30)**.

Regulación de la producción de ramnolípidos por factores nutricionales.

La producción de ramnolípidos también requiere condiciones apropiadas de crecimiento que han sido extensamente investigadas debido al interés comercial /biotecnológico que estos compuestos tienen. **(66)** Al ser los ramnolípidos metabolitos secundarios, su producción empieza con el comienzo de la fase estacionaria **(97, 23)**. En cuanto a las fuentes de carbono que influyen la producción de ramnolípidos, los aceites vegetales como aceite de soya **(45)**, maíz **(48)**, canola **(86)** y oliva **(80)** han sido sustratos más eficientes en la producción de ramnolípidos en cepas de *P.aeruginosa* que sustratos como glucosa, hidrocarburos y glicerol **(50)**. Esto se puede deber a que los aceites vegetales y los hidrocarburos al ser sustratos hidrofóbicos pueden contribuir a la formación de biosurfactantes **(100)**. Sin embargo, los hidrocarburos son en general menos biodegradables que los aceites vegetales, por lo que se tiene un poco crecimiento celular y por lo tanto una producción de ramnolípidos ineficiente **(14)**. Mientras que los aceites vegetales pueden ser hidrolizados por la lipasa de especies de *P. aeruginosa* para formar ácidos grasos de cadena larga compuestos esencialmente de 12-18 carbonos **(50)**.

Cocientes elevados de C/N **(34)** y C/P **(61)** promueven la producción de ramnolípidos y altas concentraciones de cationes divalentes, especialmente de hierro son inhibitorias **(97)**. Así, la máxima síntesis de ramnolípidos se encuentra bajo condiciones de limitación de nitrógeno durante la fase estacionaria de crecimiento usando glucosa, glicerol, o n-parafinas como fuente de carbono. Las condiciones limitantes de nitrógeno no favorecen la producción de ramnolípidos

por sí mismas, sino que la producción empieza con el agotamiento del nitrógeno **(80)**. Se ha demostrado que el NO_3^- es la mejor fuente de nitrógeno para la producción de ramnolípidos **(51)**.

Los elementos genéticos involucrados en la expresión diferencial de las características reguladas por el sistema sensor de quórum bajo condiciones limitadas de nutrientes son desconocidos actualmente. Se ha documentado la dependencia de la respuesta sensora de quórum de la disponibilidad de nutrientes para varias bacterias como *E.coli*, *Ralstoniasolanacearum* y *Vibrio sp.* **(17,29, 89,94)**,e incluso *P. aeruginosa* **(98)**. En muchas bacterias esta dependencia involucra la interacción de los reguladores transcripcionales del sistema sensor de quórum con reguladores que responden a estrés, como σ^s **(47)**. Se ha reportado que el promotor de *rhlAB* es parcialmente dependiente del factor σ^s para su expresión**(56)**.Además se ha encontrado que este operón no se expresa durante la fase logarítmica de crecimiento, aún en presencia de RhIR y C4-HSL cuando se crecen las células en un medio rico**(56)**o en medio mínimo suplementado con aminoácidos, mientras que en medio mínimo se expresa desde el comienzo del cultivo **(Medina y Soberón-Chávez, resultados no publicados)**. Este comportamiento también se observa cuando se estudia la expresión del promotor de *rhlAB* en *E.coli*, mostrando que un elemento de regulación ampliamente distribuido en bacterias es responsable del silenciamiento del promotor de *rhlAB* durante la fase exponencial de crecimiento **(55)**. Estos resultados también muestran que la expresión del operón *rhlAB* no sólo es dependiente de RhIR y C4-

HSL, sino que también la limitación de nutrientes es una condición necesaria para su transcripción.

Producción de ramnolípidos en huéspedes heterólogos y en cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

Ha habido varios intentos de producir ramnolípidos en huéspedes heterólogos. En 1994, Ochsner *et al.* lograron producir por primera vez ramnosiltransferasa en *E. coli*, clonando el operón *rhlAB*, pero sin producción de ramnolípidos. **(65)**. Posteriormente en 1995, Ochsner *et al.* lograron la producción de ramnolípidos en huéspedes heterólogos como *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida* por sobreexpresión del operón *rhlAB*. La sobreexpresión del operón *rhlAB* y el gen *rhlR* en la cepa silvestre *P.aeruginosa* PG201, resultó en una producción de ramnolípidos incrementada 1.5 veces más que la cepa silvestre **(67)**.

Más adelante, Soberón-Chávez *et al.* (2005) introdujeron el plásmido pUO58 conteniendo los genes *rhlABRI* en *P. aeruginosa* PAO1 para ver la relación entre la producción de ramnolípidos y la síntesis de PHA's y obtuvieron un incremento en la producción de ramnolípidos de 1.4 veces en relación a la cepa silvestre **(88)**.

Después, Soberón-Chávez *et al.* (2006) lograron producir monoramnolípidos en *E. coli*, expresando el operón de *P. aeruginosa* *rhlAB* y los genes involucrados en la síntesis de dTDP-L-ramnosa. **(10)**. Más adelante, Wang y colaboradores (2007) integraron los genes *rhlAB* en el cromosoma de *P. aeruginosa* y de *E. coli*, que originalmente no producían ramnolípidos, para producir ramnolípidos **(99)**.

Por su parte, Cha et al (2008) incrementaron la producción de ramnolípidos clonando los genes *rhlAB* y el sistema sensor de quórum *rhlRI* en *P. putida*, resultando en una producción de 1.3 veces más en relación a la cepa silvestre *P. aeruginosa* EMSI (12).

HIPÓTESIS

La sobreexpresión de las enzimas RhIA y RhIB, aumentará la síntesis de ramnolípidos en *P. aeruginosa* PAO1.

OBJETIVO GENERAL

Aumentar la síntesis de ramnolípidos por sobreexpresión de las enzimas de los genes *rhIAB* en *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

OBJETIVOS PARTICULARES

Clonación de los genes *rhIAB* involucrados en la síntesis de ramnolípidos en la cepa modelo de estudio *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

Demostrar la sobre-expresión de los genes *rhIAB* en la cepa de estudio *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

Inducir y cuantificar los ramnolípidos producidos en cada una de las condiciones de inducción del operón *rhIAB*.

Determinar cualitativamente la proporción de mono- y di-ramnolípidos producidos en cada una de las condiciones de inducción del operón *rhIAB*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas, plásmidos, medios y condiciones de cultivo:

Las cepas utilizadas en este trabajo se presentan en la Tabla 1. Las cepas de *E. coli* se crecieron en medio Luria Broth a 37 °C. La cepa de *P. aeruginosa* PAO1 se creció en medio PIA a 37°C. Los antibióticos utilizados en el medio de selección fueron: carbenicilina 200 ug/ml y ampicilina 200 ug/ml para *E.coli* y *P. aeruginosa*. Para la determinación de ramnolípidos, la cepa *P.aeruginosa* PAO1 con el vector pHERD20TAB se creció primero en medio LB toda la noche y luego en medio líquido bajo en fosfatos denominado PPGAS (104) a una densidad óptica inicial medida a 600nm de 0.1. Se determinaron las siguientes condiciones: Adición de arabinosa como inductor al 0%, 0.01 % (0.666mM) y 0.1 % (6.66mM) con sus respectivos controles de vector y de cepa. Se cultivaron las cepas a 225 rpm, 37°C por 24 hrs. Al final se registró la D.O. a la que llegó cada cepa y se hicieron 3 experimentos en el tiempo con 3 réplicas para cada uno.

Tabla 1. Cepas y plásmidos utilizados en este trabajo.

<u>Cepa</u>	<u>Genotipo ó características relevantes</u>	<u>Referencia y Fuente</u>
<i>P.aeruginosa</i>		
PAO1	Cepa silvestre no mucoide.	Holloway, et al. 1979 University of Washington
<i>E.coli</i>		
MC4100	<i>[araD139]_{B/r}</i>	Peters et al., 2003
GM33	<i>dam -3</i>	M. G. Marinus, 1973
BW25113	<i>Δ(araD-araB)567</i>	Datsenko et. al., 2000

<u>Plásmidos</u>		
pTZ57R/T	Vector de clonación	Fermentas
pHERD20T	Vector de clonación y expresión que contiene al promotor <i>araBAD</i> (P_{BAD})	Dongru Qiu <i>et.al.</i>, 2008 Invitrogen
pHERD20TAB	pHERD20T conteniendo los genes <i>rhlAB</i>	En este estudio

Manipulación del DNA

Los procedimientos estándar para purificación de DNA total y de plásmidos, digestiones con enzimas de restricción, electroforesis en geles de agarosa, ligación de DNA y transformación de *E.coli* se realizaron según lo descrito en **Sambrook, et al. 1989**, con sus respectivos controles. Las transformaciones de *P. aeruginosa* se realizaron de acuerdo a **Irani et Rowe, 1997**. Las purificaciones de DNA de geles de agarosa se realizaron con el kit Wizard SV Gel Clean-Up System (Promega).

Clonación de los genes *rhlAB* en el vector pHERD20T.

La amplificación de los genes *rhlAB* se llevó a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa bajo las recomendaciones del proveedor utilizando la enzima Phusion® Hot Start II (Finnzymes) con una T_m de 53.8 °C, se utilizó como templado el DNA cromosomal de *P. aeruginosa* PAO1; los oligonucleótidos utilizados *rhlAB*-BspH1 (5'-TTGGGAGGTGTGTCATGAGGCG-3') y *rhlAB*-HindIII

(5'-TAAGCTTGCACCGTTCAGGACG-3') se diseñaron a partir de secuencias obtenidas del banco de datos del genoma completo de *P.aeruginosa* (*Pseudomonas* genome project; <http://www.pseudomonas.com>). Se obtuvo una sola banda con el tamaño esperado de 2.3 kb, dicho producto se limpio por medio del kit Wizard SV Gel Clean-Up System (Promega).

Con el producto amplificado de 2.3 kb se añadió al producto de PCR extremos 3'-dA usando la enzima Gotac de Promega.

Posteriormente se ligó al vector de clonación pTZ57R/T en el sitio Eco321 con 3'-ddT , a ambos extremos , se verificó direccionalidad y peso molecular mediante una digestión con la enzima de restricción HindIII y se secuenció el fragmento *rhlAB* para confirmar que no hubiera mutaciones. Con dicha construcción se transformó a la cepa de *E.coli* GM33 (doble mutante en el sistema de metilación de *E.coli*) para digerir el fragmento *rhlAB* con las enzimas de restricción BspH1 (sensible a DNA metilado) y HindIII. Posteriormente se realizó la ligación del fragmento liberado purificado de *rhlAB* al vector de expresión pHERD20T (previamente digerido con las enzimas de restricción NcoI, isocaudómero de BspH1, y HindIII.) Esta construcción se denominó pHERD20TAB y se transformó en células competentes de *E.coli* MC4100 y se verificó el inserto *rhlAB* por secuenciación, amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa usando la enzima Phusion® Hot Start II de Finnzymes y digestión con la enzima de restricción HindIII. La construcción pHERD20TAB se transformó en la cepa de *P. aeruginosa* PAO1.

Ensayo de Expresión I. Cuantificación y caracterización de ramnolípidos.

La concentración de ramnolípidos se determinó midiendo la cantidad de ramnosa liberada después de una hidrólisis ácida usando el método de orcinol **(13)**. La cantidad de mono- y di-ramnolípidos se determinó mediante cromatografía en capa fina a partir de dos extracciones usando como solventes cloroformo-metanol (1:2) y revelando con alfa-naftol **(103)**.

Ensayo de Expresión II. Visualización de las proteínas RhIA y RhIB en un gel de poliacrilamida- SDS.

Para expresar las proteínas RhIA y RhIB, la cepa de *P.aeruginosa* PAO1 transformada con el vector pHERD20TAB se creció primero en medio LB toda la noche y luego en el medio líquido bajo en fosfatos denominado PPGAS a una densidad óptica medida a 600nm de 0.1. Se tuvieron las siguientes condiciones: Se añadió arabinosa como inductor al 0%, 0.01 % (0.666mM), 0.1 % (6.66mM) y 1.0% (66.6mM) y un control de cepa a 225 rpm, 37°C por 24 hrs. Al final se registró la D.O. a la que llegó cada cepa y se extrajeron las proteínas a partir de 3.0 ml de cultivo mediante un buffer de lisis para *Pseudomonas* y sonicación. **(Protocolo elaborado en el laboratorio)**. El sobrenadante se recuperó y se tomó una alícuota para cuantificar por triplicado la concentración de proteína total mediante el Método de Bradford. **(6)**. Posteriormente se cargaron 7 ug de proteína para cada condición en un gel de poliacrilamida–SDS al 12% .La electroforesis se realizó a 60V, durante 2.5 horas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El primer experimento que se hizo fue evaluar si la arabinosa no interfería en la producción de ramnolípidos para ello la cepa PAO1 se creció durante 24 horas a 37° C en medio PPGAS, adicionado con 0.01% y 0.1% de arabinosa y se cuantificaron los ramnolípidos producidos después de una hidrólisis acida (**Fig. 5**).

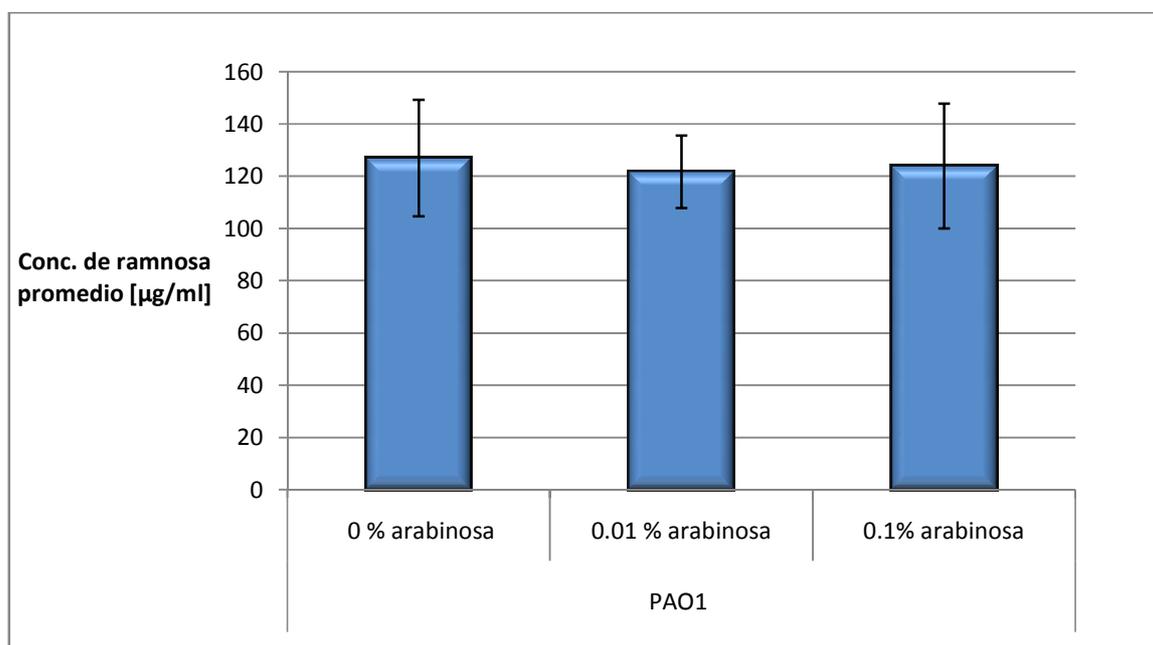


Figura 5. Gráfica que muestra la concentración de ramnolípidos en los controles de la cepa PAO1 a diferentes concentraciones de arabinosa.

Del primer experimento se concluye que la arabinosa no interfiere con la producción de ramnolípidos cuando se usa como inductor a concentraciones de 0.666mM y 6.66mM.

El segundo experimento que se hizo fue evaluar si el vector de clonación y expresión que contiene al promotor *araBAD* (P_{BAD}) no interfería con o sin inductor en la producción de ramnolípidos, para ello la cepa PAO1 con el vector pHERD20T se creció durante 24 horas a 37° C en medio PPGAS, a 0%, 0.01% y 0.1% de arabinosa y se cuantificaron los ramnolípidos producidos. (Fig. 6).

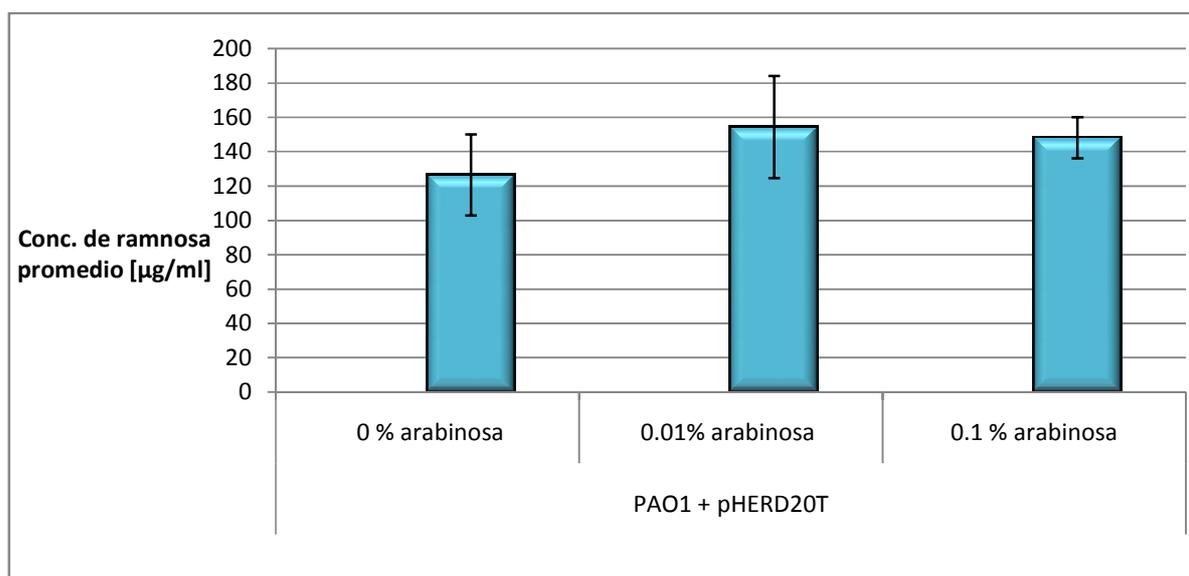


Figura 6. Gráfica que muestra la concentración de ramnosa en los controles del vector pHERD20T en la cepa PAO1 a diferentes concentraciones de arabinosa.

Del segundo experimento se concluye que el vector de clonación y expresión que contiene al promotor *araBAD* (P_{BAD}) no interfiere con o sin inductor en la producción de ramnolípidos.

El tercer y cuarto experimento se hicieron para evaluar el efecto de la sobreexpresión de las enzimas de los genes *rhlAB* en los niveles de producción de ramnolípidos en la cepa *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1) a distintas concentraciones de inductor y determinar a qué concentración de inductor se obtiene la máxima producción de ramnolípidos. Para esto estos genes se clonaron

en trans, se indujeron con diferentes concentraciones de arabinosa, se cuantificaron los ramnolípidos por el método de la ramnosa liberada después de una hidrólisis acida y se compararon con su control respectivo. La cepa PAO1 con la construcción pHERD20TAB se creció durante 24 horas a 37°C en medio PPGAS a 0%, 0.01% y 0.1% de arabinosa a una densidad óptica inicial medida a 600nm de 0.1 y se cuantificaron los ramnolípidos producidos (**Figs. 7 y 8**).

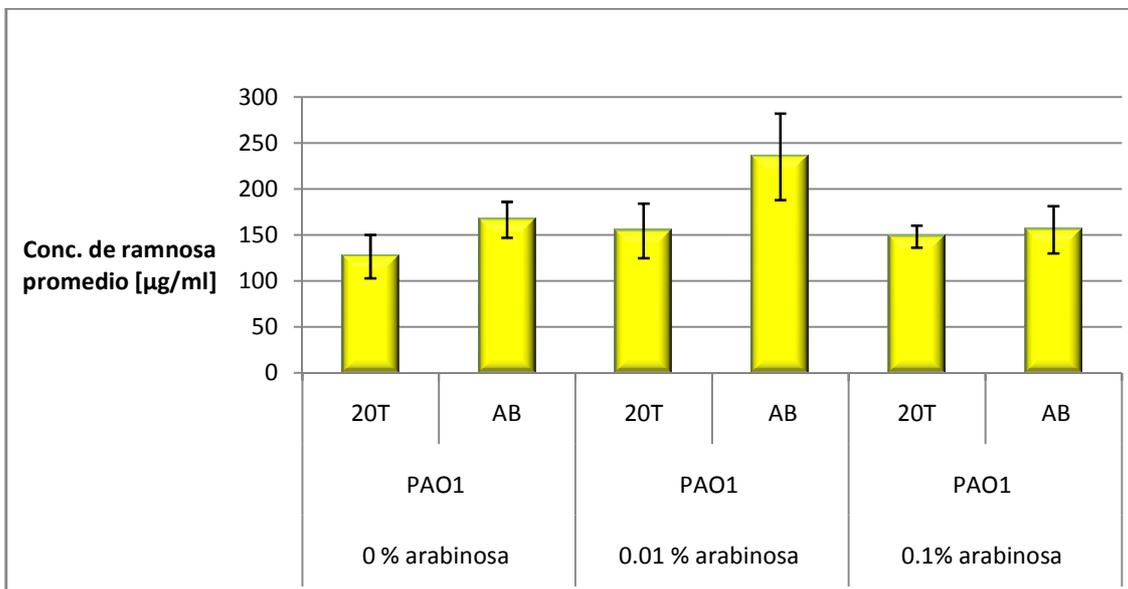


Figura 7. Tercer experimento. Gráfica que muestra la concentración promedio de ramnosa en muestras con la construcción pHERD20TAB con sus respectivos controles.

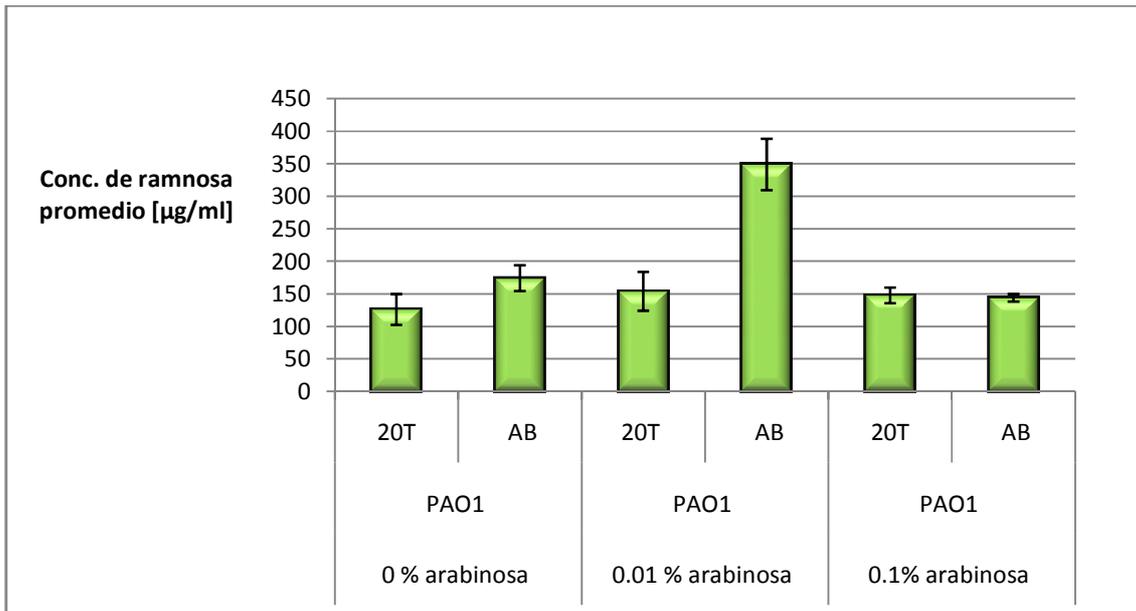


Figura 8. Cuarto experimento. Gráfica que muestra la concentración de ramnosa promedio en muestras con la construcción pHERD20TAB con sus respectivos controles.

A partir de estos dos experimentos se determinó que el mayor nivel en la producción de ramnolípidos al clonar *en trans* los genes *rhIAB* en la cepa modelo de estudio *P. aeruginosa* PAO1 se obtiene con 0.01% de arabinosa como inductor, la diferencia en los niveles de ramnosa se debe a la variabilidad biológica de la cepa. Así, el siguiente experimento que se hizo fue determinar la concentración de ramnosa promedio en la cepa *P.aeruginosa* PAO1 con la construcción pHERD20TAB a partir de tres experimentos independientes en el tiempo, con tres réplicas cada uno, y sus respectivos controles. Cada experimento independiente en el tiempo tuvo las siguientes condiciones: La cepa PAO1 con la construcción pHERD20TAB se creció durante 24 horas a 37°C en medio PPGAS a 0,01 % de arabinosa a una densidad óptica inicial medida a 600nm de 0.1 y se cuantificaron

los ramnolípidos producidos por el método de la ramnosa liberada después de una hidrólisis acida. (Fig. 9).

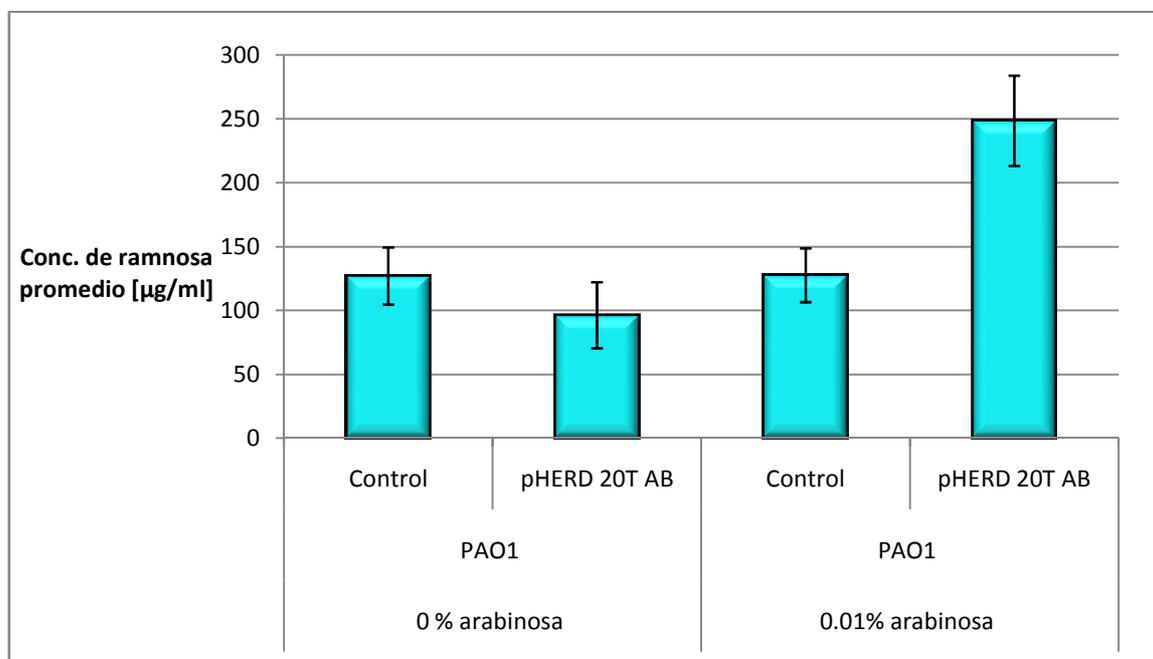


Figura 9. Gráfica que muestra la concentración de ramnosa promedio en la cepa *P. aeruginosa* PAO1 con la construcción pHERD20TAB de tres experimentos independientes en el tiempo, con tres réplicas cada uno, y sus respectivos controles.

Posteriormente se llevó a cabo una cromatografía en capa fina para determinar la proporción de mono y di-ramnolípidos producidos por la cepa *P. aeruginosa* PAO1 control de cepa, control de vector y con la construcción pHERD20TAB a 0%, 0.01%, 0.1% y 1.0% de arabinosa a partir de dos extracciones usando como solventes cloroformo-metanol (1:2) y revelando con alfa-naftol. Las cepas se crecieron durante 24 horas a 37° C en medio PPGAS a una densidad óptica inicial medida a 600nm de 0.1. (Fig. 10).

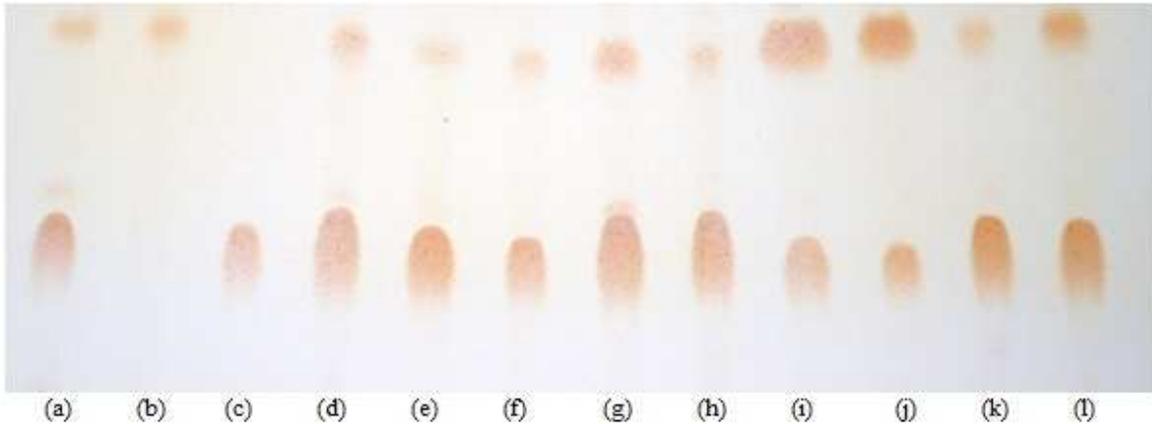


Figura 10. Análisis de la proporción de mono y di-ramnolípidos producidos por la cepa *P. aeruginosa* PAO1 control de cepa, control de vector y con la construcción pHERD20TAB mediante cromatografía en capa fina. **a:** Ramnolípidos producidos por *P.aeruginosa* PAO1 control de cepa. **b: Estándar de mono-ramnolípidos.** **c: Estándar de di-ramnolípidos.** **d, f, h, k:** Ramnolípidos producidos en la cepa control de vector a 0% , 0.01%, 0.1% y 1.0% de arabinosa respectivamente. **e, g, i, j, l:** Ramnolípidos producidos en la cepa *P.aeruginosa* PAO1 con la construcción pHERD20TAB a 0% , 0.01%, 0.1% ,0.1% replica de otro experimento independiente en el tiempo y 1.0% de arabinosa respectivamente.

A partir de este experimento se determinó que, si se sobreexpresa *rhIAB* a la concentración de 0.1% de arabinosa, la proporción de mono y di-ramnolípidos cambia significativamente, disminuyendo la concentración relativa del di-ramnolípidos.

Finalmente, el último experimento consistió en visualizar mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS el nivel de expresión de las proteínas RhIA y RhIB producidas en la cepa control *P.aeruginosa* PAO1 y la cepa con la construcción pHERD20TAB usando arabinosa al 0%, 0.01%, 0.1% y 1.0% como inductor. Las proteínas fueron extraídas después de que las cepas se crecieron en las mismas condiciones que los experimentos anteriores. **(Fig. 11).**

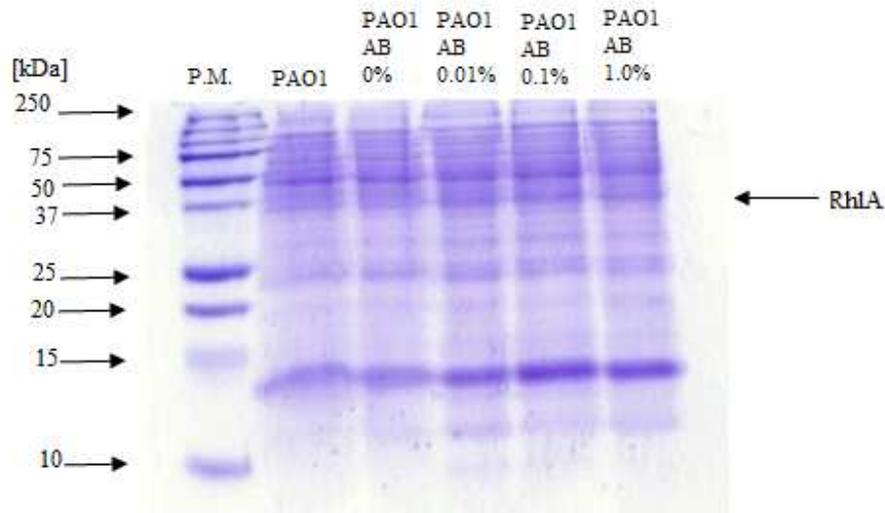


Figura 11. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS en donde se muestra la banda de proteína a 32.5 kDa, que podría corresponder a RhIA a partir de un extracto de proteínas de la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 y de la cepa de *P.aeruginosa* PAO1 con la construcción pHERD20TAB a 0%, 0.01%, 0.1% y 1.0% de arabinosa.

No fue posible detectar una banda con el peso molecular de la proteína RhIB dado que existen otras proteínas con peso molecular similar de 47 kDa. Por lo que es necesario en experimentos futuros realizar un protocolo de purificación de las proteínas RhIA y RhIB y anticuerpos anti-RhIA y anti-RhIB para la realización del Western Blot. Sólo de esta manera se podría comprobar la sobre-expresión de estas enzimas. Sin embargo, el plásmido utilizado, las condiciones de inducción, y el aumento de la proporción de mono-ramnolípido permiten suponer que sí se sobre-expresó el operón *rhIAB*.

A partir de este experimento se concluye que existe una diferencia de inducción en cada una de las condiciones usadas. En donde se tienen bandas de proteína más intensas cuando se utiliza arabinosa al 0.1% y a 1.0 %.

Con el método de orcinol usado para calcular la cantidad de ramnosa liberada después de una hidrólisis ácida no fue posible cuantificar la cantidad producida de ramnolípidos a 1.0% de arabinosa como inductor debido a interferencias que este azúcar presenta con el método a esta concentración.

En la **Fig. 9** puede observarse que el mayor nivel en la producción de ramnolípidos al clonar *en trans* los genes *rhIAB* en la cepa modelo de estudio *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 se obtiene con 0.01% de arabinosa como inductor, en donde se duplica la producción de ramnolípidos con respecto al control. Este valor obtenido es superior pero cercano al publicado en algunos artículos en donde se ha clonado al operón *rhIABRI* (**10, 66,88**) en distintas cepas de *P.aeruginosa*. Sin embargo, sobreexpresando *rhIAB* a una concentración de inductor diez veces mayor (0.1%) la producción de ramnolípidos disminuye con respecto a 0.01% a los niveles del control.

La cromatografía en capa fina muestra resultados que pueden ayudarnos a entender una posible causa de porque a 0.1 % de arabinosa como inductor la producción de ramnolípidos disminuye a niveles parecidos al control. Como se puede observar en la **Fig. 10**, si se sobreexpresa *rhIAB* a la concentración de 0.1% de arabinosa como inductor, la proporción de mono y di- ramnolípido cambia significativamente con respecto a los demás tratamientos, disminuyendo la concentración relativa del di-ramnolípido. Por lo que el método de cuantificación cuando se usa arabinosa al 0.1% como inductor detecta menos cantidad de ramnosa liberada. Este resultado sugiere que en estas condiciones (0.1% de arabinosa como inductor) se disminuye la actividad de la enzima RhIC que es la

responsable de sintetizar el di-ramnolípido, y que quizás el producto de RhIB a grandes cantidades esté inhibiendo algún sitio importante para la actividad catalítica de la enzima RhIC siendo esta enzima sensible a inhibición por el producto de RhIB. En la literatura se han reportado casos similares de enzimas que son sensibles a algún producto involucrado en la misma vía de biosíntesis cuando estos productos se encuentran a altos niveles **(7,15)**.

Sin embargo, la cromatografía en capa fina muestra que si se sobreexpresa *rhIAB* a la concentración de 1.0 % de arabinosa como inductor, la proporción de mono y di- ramnolípido no cambia significativamente con respecto a la cepa control de vector y de cepa. Este resultado sugiere que a estas condiciones no se está disminuyendo la actividad de la enzima RhIC, sin embargo el gel de poliacrilamida muestra para la proteína RhIA que a medida que la concentración de inductor aumenta en 0%, 0.01% y 0.1 % se tiene un aumento de la expresión de esta proteína, pero a 1.0% no se ve un aumento considerable en la expresión comparado a 0.1%. Estos resultados se podrían también esperar para la proteína RhIB.

También otra explicación de la disminución en los niveles de ramnolípidos a esta condición es que dado que los resultados sugieren que el flujo de la vía biosintética de ramnolípidos está alterado por la disminución de la actividad de la enzima RhIC, esta disminución podría hacer que el dímero de ácidos grasos sobreproducido por RhIA se esté utilizando también para producir PHA's, ya que se ha propuesto que es un sustrato común en la vía de ramnolípidos y PHA's. **(50)**.

Otra posible causa de la disminución en la producción de ramnolípidos a mayor concentración de inductor, podría deberse a los niveles de producción de dTDP-L-ramnosa, siendo también un sustrato necesario para la síntesis del mono-ramnolípido por la enzima RhIB y del di-ramnolípido por la enzima RhIC. La dTDP-L-ramnosa podría llegar a ser insuficiente, lo que impide que se sinteticen más di-ramnolípidos, sin embargo esta propuesta no explica el porqué a 0.01% de arabinosa como inductor la producción se duplica.

Otra posibilidad es que la actividad enzimática de RhIA puede diferir significativamente de la actividad enzimática de RhIB.

Por lo que los resultados obtenidos muestran que la producción de ramnolípidos está muy regulada y arrojan una nueva estrategia experimental para incrementar la producción de los ramnolípidos en cepas con virulencia reducida ó no virulentas.

CONCLUSIONES

La producción de ramnolípidos aumenta alrededor de dos veces cuando se usa la construcción PHERD20TAB en la cepa modelo de estudio *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 a 0.01% de arabinosa como inductor y disminuye a niveles parecidos al control cuando se usa dicha construcción a una concentración de 0.1% de arabinosa como inductor.

PERSPECTIVAS

Esta construcción puede ser utilizada para sobreproducir ramnolípidos en otras cepas de *P. aeruginosa* no virulentas ó con virulencia reducida que puedan ser usadas en la industria.

Medición de PHA's en la cepa PAO1 con la construcción *rhlAB* a las distintas concentraciones de inductor utilizadas en este trabajo.

Determinación del efecto del producto de RhlB a distintas concentraciones en la enzima RhlC y del tipo de inhibición que se presenta.

Clonar el operón de dTP-L-ramnosa junto con *rhlAB* en la cepa modelo de estudio PAO1 y medición de ramnolípidos a las distintas concentraciones de inductor utilizadas.

Realización de un Western Blot para comprobar la sobre-expresión de las proteínas RhlA y RhlB en la cepa de estudio *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 con la construcción PHERD20TAB a las distintas concentraciones de inductor utilizadas.

Clonar *rhlB* en la cepa PAO1 para conocer si esta enzima es limitante en la producción de ramnolípidos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Albus, A.M., Pesci, E.C., Runyen-Janecky, L.J., West, S.E.H. and Iglewski, B.H., 1997, Vfr controls quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 179, 3928–3935.
2. Al-Tahhan, R.A., Sandrin, T.R., Bodour, A.A., and Meier, R.M., 2000, Cell surface properties of *Pseudomonas aeruginosa*: Effect of rhamnolipid on fatty acid and lipopolysaccharide content. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66:3262-6238.
3. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K., 1990, *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley, New York.
4. Benincasa, M., Abalos, A., Oliveira, I., Manresa, A., 2004, Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock *Antoine van Leeuwenhoek* 8, 1-8.
5. Bergen, G.A., Shelhamer, J.H., 1996, Pulmonary infiltrates in the cancer patient. New approaches to an old problem. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 10, 297-325.
6. Bradford, M. 1976, "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding" *Anal. Biochem.* 72:248-254.
7. Bryan, P.A., Cawley, D., Brunner, C.E., Bryan, J.K., 1970, Isolation and characterization of a lysine-sensitive aspartate kinase from a multicellular plant. *Biochem Biophys Res Commun* 41:1211-1218.
8. Burger, M.M., Gläser, L., Burton, R.M., 1963, The enzymatic synthesis of rhamnose containing glycolipids by extracts of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.*, 238:2595-2602.
9. Burger, M.M., Gläser, L., Burton, R.M., 1966, Formation of rhamnolipids of *Pseudomonas aeruginosa*. *Meth. Enzymol.* 8, 441-445.
10. Cabrera, N., Olvera, C., Richardson, A., Treviño, G., and Soberón-Chávez, G., 2006, Mono-rhamnolipids and 3-(3-hydroxyalkanoxy) alkanolic acids (HAAs) production using *Escherichia coli* as a heterologous host. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 73:187-194.
11. Campos-García, J., A. D. Caro, R. Nájera, R. M. Miller-Maier, R. A. Al-Tahhan, & G. Soberón-Chávez. 1998, The *Pseudomonas aeruginosa* *rhIG* gene encodes a

NADPH-dependent b-ketoacyl reductase which is specifically involved in rhamnolipid synthesis. *J. Bacteriol.* 180:4442-4451.

12. Cha, M., Lee, N., Kim, M., Kim, M. and Lee, S. 2008, Heterologous production of *Pseudomonas aeruginosa* EMS1 biosurfactant in *Pseudomonas putida*. *Bioresource Technology* 99, 2192–2199.

13. Chandrasekaran, E.V., and J.N. Bemiller. 1980, Constituent analyses of glycosaminoglycans. *Methods Carbohydr. Chem.*, 8:89-96.

14. Chayabutra, C.J. Wu, Ju, L.K. 2001, Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* under denitrification: effects of limiting nutrients and carbon substrates. *Biotechnol. Bioeng.* 72, 25–33.

15. Cheshire, M.R. and Mifflin, J.B., 1975, The control of lysine biosynthesis in maize, *Phytochemistry*, 14:695-698.

16. Christian, V.D., Barbara, H.I., 1998, Cell-to-Cell Signaling and *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Eng. Infect. Dis.* 4 (4), 551–560.

17. Daca-DeLancey, R.R., South, M.M.T., Ding, x., and Rather, P.N., 1999, *Escherichia coli* genes regulated by cell-to-cell signalling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:4610-4614.

18. D'Argenio, D.A., Gallegher, L.A., Berg, C.A., and Manoil, C., 2002, *Drosophila* as a model host for *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J. Bacteriol.*, 183:1466-1471.

19. Datsenko, KA., Wanner, BL., 2000, One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci* 97:6640–6645.

20. Davey, M.E., Caiazza, N.C., and O' Toole, G.A., 2003, Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.*, 185:1027-1036.

21. Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W. *et al.*, 1998, The involvement of cell-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 280, 295–298.

22. De Kievit, T.R. and Iglewsky, B.H., 2000, Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Journal of Bacteriology* 68, 4839–4849.

23. Déziel É, Paquette G, Villemur R, Lépine F, Bisailon J-G , 1996, Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic

hydrocarbons. *Appl Environ Microbiol* 62:1908–191.

24. Déziel, E.F., Lepine, F., Dennie, D., Boismenu, D., Mamer, O.A., and Villemur, R., 1999, Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP grown on mannitol or naphthalene. *Biochim. Biophys. Acta-Molec. Cell. Biol. Lipids*, 1440:244-252.

25. Déziel, E., F. Lepine, S. Milot, and R. Villemur, 2000, Mass spectrometry monitoring of rhamnolipids from a growing culture of *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP. *Biochim. Biophys. Acta* 1485:145–152.

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

27. Diggle, S.P., Winzer, K., Chhabra, S.R., Worrall, K.E., Camara, M. et al., 2003, The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates *rhl*-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR. *Molecular Microbiology* 50, 29–43.

28. Dongru, Qiu, F., Health, Damron., Takehiko, Mima., Herbert, P, Schweizer., and Hongwei D. Yu, 2008, PBAD- Based Shuttle Vectors for Functional Analysis of Toxic and Highly Regulated Genes in *Pseudomonas* and *Burkholderia spp.* and other Bacteria *Appl. Environ. Microbiol.* 74(23): 7422-7426.

29. Flavier, A.B., Schell, M.A., and Denny, T.P., 1998, An RpoS (σ^S) homologue regulates acylhomoserine lactone-dependent autoinduction in *Ralstonia solanacearum*. *Mol. Microbiol.*, 28:475-486.

30. Fuqua, W.C., Parsek, M.R., and Greenberg, E.P., 2001, Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: Acyl-homoserine lactone quorum-sensing. *Annu. Rev. Genet.*, 35:439-468.

31. Gambello, M.J. and Iglewski, B.H., 1991, Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* lasR gene, a transcriptional activator of elastase expression. *Journal of Bacteriology* 173, 3000–3009.

32. Gambello, M. J., S. A. Kaye, and B. H. Iglewski, 1991, LasR of *Pseudomonas aeruginosa* is a transcriptional activator of the alkaline protease gene (*apr*) and an enhancer of exotoxin A expression. *Infect. Immun.* 61:1180–1184.

33. Govan, J.R.W., Deretic, V., 1996, Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol. Rev.* 60, 539-574.
34. Guerra-Santos LH, Käppeli O, Fiechter A, 1984, *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. *Appl Environ Microbiol* 48:301–305.
35. Guerra-Santos, L.H., Käppeli, O., Fiechter, A., 1986, Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24, 443–448.
36. Henkel, Marius., Müller, M. Markus., Kügler, H. Johannes., Lovaglio, B. Roberta., Contiero, Jonas., Syldatk, Christoph., Hausmann, Rudolf., Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: Concepts for next-generation rhamnolipid production, 2012, *Process Biochemistry* ., 47:1207-1219.
37. Holloway, B W., Krishnapillai, V., Morgan, A F., 1979, Chromosomal genetics of *Pseudomonas*. *Microbiological Reviews*, 43:73-102.
38. Irani V., Rowe J ., 1997, Enhancement of transformation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 by Mg²⁺ and heat. *Biotechniques* 22:54–56.
39. Ishigami Y, Gama Y, Nagahara H, Motomiya T, Yamaguchi M , 1988^a, Liposome containing rhamnolipids. Japanese Patent Kokaki 63-182,029.
40. Ishigami Y, Gama Y, Uji Y, Masui K, Shibayama Y, 1988^b, *Japanese Patent Kokai* 63-77,535.
41. Ishigami Y, Suzuki S (1997) Development of biochemical-functionalization of biosurfactants and natural dyes. *Prog Org Coat* 31:51-61.34
42. Jarvis, F.G. and Johnson, M.J., 1949, A glycol-lipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Am. Chem. Soc.*, 71:4124-4126.
43. Kiratisin, P., Tucker, K.D., and Passador, L., 2002, LasR, a transcriptional activator of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes, functions as a multimer. *J. Bacteriol.*, 184:4912-4919.
44. Kleckner V, Kosaric N, 1993, Biosurfactants for cosmetics. In: Kosaric N (ed) Biosurfactants, production, properties, applications. *Surfactant science series*, vol 48. Dekker, New York, pp 373-389.

- 45.Lang S, Wullbrandt D,1999,Rhamnose lipids—biosynthesis, microbial production and application potential. *Appl Microbiol Biotechnol* 51:22–322.
- 46.Latifi, A., M. Foglino, K. Tanaka, P. Williams, and A. Lazdunski, 1996,A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR to expression of the stationary phase sigma factor RpoS. *Mol. Microbiol.* 21:1137–1146.
- 47.Lazazzera,B.A.,2000,Quorum sensing and starvation signals for entry into stationary phase. *Curr.Opin.Microbiol.*, 3:177-182.
- 48.Linhardt RJ, Bakhit R, Daniels L, Mayerl F ,1989, Microbially produced rhamnolipid as a source of rhamnose. *Biotechnol Bioeng* 33:365–368.
49. Marinus, M.G., Morris, N.R. : Isolation of DNA methylase mutants from *Escherichia coli* K-12. J.,1973, *Bact.* 114, 1143 -1150.
- 50.Maier RM, Soberón-Chávez G ,2000,*Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* , 54:625–633.
- 51.Manresa A et al ,1991, Kinetic studies on surfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. *J IndMicrobiol* 8:133–136.
- 52.Martínez, A. & G. Soberón-Chávez, 2001,Characterization of the *lipA* gene encoding the major lipase from *Pseudomonas aeruginosa* IGB83. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56:731-735.
- 53.Mashburn, L.M. and Whiteley, M. ,2005, Membrane vesicles traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote. *Nature* 437, 422–425.
- 54.Mcknight, S.L., Iglewski, B.H. and Pesci, E.C.,2000,The *Pseudomonas* quinolone signal regulates *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 182, 2702–2708.
- 55.Medina G, Juarez K, Diaz R, Soberón-Chávez G,2003a,Transcriptional regulation of *Pseudomonas aeruginosa rhIR*, encoding a quorum-sensing regulatory protein. *Microbiology* 149:3073–3081.
- 56.Medina G, Juarez K, Soberón-Chávez G (2003b) The *Pseudomonas aeruginosa rhIAB* operon is not expressed during the logarithmic phase of growth even in the presence of its activator RhIR and the autoinducer N-butryl-homoserine lactone. *J Bacteriol* 185:377–380.

57. Medina G, Juarez K, Valderrama B, Soberón-Chávez G (2003c) Mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* RhlR transcriptional regulation of the rhlAB promoter. *J Bacteriol* 185:5976–5983.
58. Miller, R. M., 1995. Biosurfactant-facilitated remediation of metal-contaminated soils. *Environ. Health Perspect.* 103(Suppl): 59-62.
59. Monticello D.J. & Finnerty W.R., 1985, Microbial desulfurization of fossil fuels. *Annu. Rev. Microbiol.* 39: 371-389.
60. Muller-hurtig, R., Blaszczyk, R., Wagner, F. and Kosaric, N., 1993, Biosurfactants for environmental control. In *Biosurfactant* eds. N. Kosaric, pp 447–469. New York, Marcel Dekker Inc.
61. Mulligan CN, Mahmoudides G, Gibbs BF , 1989, The influence of phosphate metabolism on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 12:199–210.
62. Mulligan, C.N., 2005, Environmental applications for biosurfactants. *Environ. Pollut.* 133, 183-198.
63. Nitschke, Marcia., Costa, G.V.A.O., Siddhartha., Contiero, Jonas., Rhamnolipids and PHAs: Recent Reports on *Pseudomonas*-derived molecules of increasing industrial interest, 2011, *Process Biochemistry*, 46:621-630.
64. Nitschke, M., Siddhartha, G.V.A., Cost, O., Contier, J., 2005, Rhamnolipid surfactants: an update on the general aspects of these remarkable biomolecules. *Biotechnol. Prog.* 2, 1593-1600.
65. Ochsner, U. A., A. Fiechter & J. Reiser, 1994, Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa* rhlAB genes encoding a rhamnosyltransferase involved in rhamnolipid biosurfactant synthesis. *J Biol. Chem.* 269:19787-19795.
66. Ochsner UA, Hembach T, Fiechter A , 1995a, Production of rhamnolipid biosurfactants. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 53: 89–118.
67. Ochsner, U. A., J. Reiser, A. Fiechter, and B. Witholt., 1995, Production of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipid biosurfactant in heterologous hosts. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:3503–3506.

68. Ochsner, U.A. and Reiser, J., 1995, Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92:6424-6428.
69. Olivera, E. R., D. Cenicero, R. Jodra, B. Minambres, B. García, *et al.* 2001, Genetically engineered *Pseudomonas*: a factory of new bioplastics with broad applications. *Environ. Microbiol.* 3:612-618.
70. Olvera, C., J. B. Goldberg, R. Sánchez & G. Soberón-Chávez, 1999, *Pseudomonas aeruginosa algC* gene product participates in rhamnolipids biosynthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* 179:85-90.
71. Passador, L., Cook, J.M., Gambello, M.J., Rust, L. and Iglewski, B.H., 1993, Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. *Science* 260, 1127–1130.
72. Pearson, J.P., Gray, K.M., Passador, L., Tucker, K.D., Eberhard, A. *et al.*, 1994, Structure of the autoinducer required for expression of *P. aeruginosa* virulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 91, 197–201.
73. Pearson, J.P., Passador, L., Iglewski, B.H. and Greenberg, E.P., 1995, A second *N*-acyl homoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 92, 1490–1494.
74. Pesci, E. C., J. P. Pearson, P. C. Seed, and B. H. Iglewski., 1997, Regulation of *las* and *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 179:3127–3132.
75. Pesci, E.C., Milbank, J.B., Pearson, J.P., Mcknight, S., Kende, A.S. *et al.*, 1999, Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas*. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 96, 11229–11234.
76. Peters, J., Thate, T., and Craig, N., 2003, Definition of the *Escherichia coli* MC4100 Genome by Use of a DNA Array. *J. Bacteriol.* 185(6):2017-2021.
77. Pruitt Jr., B.A., McManus, A.T., Kim, S.H., Goodwin, C.W., 1998, Burn wound infections: current status. *World J. Surg.* 2, 135-145.
78. Rahim, R., U. A. Ochsner, C. Olvera, M. Graninger, P. Messner, J. S. Lam & G. Soberón-Chávez, 2001, Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa rhIC* gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for dirhamnolipid biosynthesis. *Mol. Microbiol.* 40:708-718.

79. Rehm BH, Mitsky TA, Steinbüchel A., 2001, Role of fatty acid de novo biosynthesis in polyhydroxyalkanoic acid (PHA) and rhamnolipid synthesis by pseudomonads: establishment of the transacylase (PhaG)-mediated pathway for PHA biosynthesis in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 67:3102–3109.
80. Robert M et al., 1989, Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. *Biotechnol Lett* 11:871–874.
81. Römling, U., Wingender, J., Müller, H., and Tümmler, B., 1994, A major *Pseudomonas aeruginosa* clone common to patients and aquatic habitats. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60:1734-1738.
82. Rumbaugh, K.P., Griswold, J.A. and Hamood, A.N. ,2000, The role of quorum sensing in the in vivo virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbes and Infection* 2, 1721–1731.
83. Sambrook, J., Russell, D.W., 2001, Molecular Cloning: a Laboratory Manual. third ed. Cold Spring Harbor/Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
84. Schaeffer T.L., S.G. Cantwell, J.L. Brown, D. Watt and R.R. Fall., 1979, Microbial growth on hydrocarbons: terminal branching inhibits biodegradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 38:742-746.
85. Seed, P. C., L. Passador, and B. H. Iglewski., 1995, Activation of the *Pseudomonas aeruginosa lasI* gene by LasR and the *Pseudomonas* autoinducer PAI: an autoinducer regulatory hierarchy. *J. Bacteriol.* 177:654–659.
86. Sim L, Ward OP, Li Z-Y., 1997, Production and characterization of a biosurfactant isolated from *Pseudomonas aeruginosa* UW-1. *J Ind Microbiol Biotechnol* 19:232–238.
87. Smith, R.S. and Iglewski, B.H., 2003, *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Current Opinion in Microbiology* 6, 56–60.
88. Soberón –Chávez, G., Aguirre-Ramírez, M., Sánchez ,R., 2005, The *Pseudomonas aeruginosa* RhlA enzyme is involved in rhamnolipid and polyhydroxyalkanoate production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 32:675-677
89. Srinivasan, S., Österling, J., Charlton, T., De Nys, R., Takayama, K., and Kjelleberg, S., 1998, Extracellular signal molecule(s) involved in the carbon starvation response of marine *Vibrio* sp. strain S14. *J. Bacteriol.*, 180:201-209.

90. Stanghellini ME, Rasmussen SL, Kim DH, Rorabaugh PA.,1996,Efficacy of nonionic surfactants in the control of zoospore spread of *Pythium aphanidermatum* in a recirculating hydroponic system. *Plant Dis* 80: 422-428.
91. Stanghellini, M.E. and Miller, R.M., 1997,Biosurfactants:Their identity and potential efficacy in the biological control of zoosporic plant pathogens.*Plant Dis.*, 81:4-12.
92. Stanislavsky,E.S.,Lam, J.S.,1997,*Pseudomonas aeruginosa* antigens as potential vaccines. *FEMS Microbiol.Rev.*21(3),243-277.
93. Tan,M.W. and Ausbel,F.M.,2000,*Caenorabditis elegans*: A model genetic host to study *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Curr.Opin.Microbiol.*,3:29-34.
94. Thorne,S.H. and Williams, H.D.,1999, Cell density-dependent starvation survival of *Rhizobium leguminosarum bv.phaseoli*: Identification of the role of an N-acyl homoserine-lactone in adaptation to stationary-phase survival. *J.Bacteriol.*,181:981-990.
95. Toder, D. S., M. J. Gambello, and B. H. Iglewski.,1991,*Pseudomonas aeruginosa* LasA: a second elastase under the transcriptional control of *lasR*. *Mol. Microbiol.* 5:2003–2010.
96. van Delden, C., Iglewski, B.H.,1998,Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg. Infect. Dis.* 4, 551–560.
97. Venkata Ramana K, Karanth NG.,1989,Factors affecting biosurfactant production using *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6 under submerged conditions. *J Chem Technol Biotechnol* 45: 249–257.
98. Wagner, E.V., Bushell,D.,Passador,L.,Brooks,A.I., and Iglewski, B.H.,2003, Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: Effects of growth phase and environment. *J.Bacteriol.*,185:2080-2095.
99. Wang, Q.H., Fang, X., Bai, B.J., Liang, X.L., Shuler, P.L. *et al.*,2007,Engineering bacteria for production of rhamnolipid as an agent for enhanced oil recovery. *Biotechnology and Bioengineering* 98, 842–853.
100. Wei, Y.H., Chou, C.L., Chang, J.S., 2005, Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater. *Biochem. Eng. J.* 27, 146–154.

101.Whiteley, M., Lee, K.M., and Greenberg, E.P.,1999, Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:13904-13909.

102.Whiteley, M., Parsek, M.R., and Greenberg,E.P., 2000, Regulation of quorum sensing by RpoS in *Pseudomonas aeruginosa*. *J.Bacteriol.*,182:4356-4360.

103.Wild, M, Caro, A.D. Miller, R.M. and Soberón-Chávez,G., 1997, Selection and partial characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* mono-rhamnolipid deficient mutant. *FEMS Microbiol. Lett.*153,279-285.

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