



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

CARACTERIZACIÓN DEL CAMBIO EN LA RELACIÓN RNA/PROTEÍNA  
DE CEPAS DE *Escherichia coli* CON MODIFICACIONES EN LA  
MAQUINARIA TRADUCCIONAL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A:

LEVI JAFET BASTIDA RAMÍREZ



DIRECTORES DE TESIS:  
DR. JOSÉ UTRILLA CARRERI  
DRA. LORENA ROMERO SALAZAR  
AGOSTO 2019



## Índice

Abreviaciones .....	6
1. Resumen.....	8
2. Antecedentes.....	9
3. Marco Teórico .....	13
3.1 Biología Sintética.....	13
3.2 Operones de <i>rrn</i> .....	14
3.3 <i>E. coli</i> como organismo modelo .....	16
3.4 Control de transcripción de rRNA.....	18
3.5 Respuesta estricta.....	20
3.6 Regulación de la síntesis de rRNA dependiente de la tasa de crecimiento....	23
3.7 Repartición de recursos y partición del proteoma .....	24
4. Métodos Experimentales.....	27
4.1 Generalidades .....	27
4.2 Cinéticas de crecimiento .....	29
4.3 Cuantificación de RNA total .....	30
4.4 Cuantificación de proteína total.....	31
4.5 Cuantificación de azúcares reductores .....	32
4.6 Análisis Estadístico .....	33
5. Presentación y discusión de resultados .....	34
5.1 Velocidades de crecimiento .....	34
5.2 Tasa específica de consumo de sustrato ( $q_s$ ).....	39
5.3 Relación RNA/Proteína.....	41
6. Conclusiones .....	52
7. Perspectivas.....	53
8. Referencias .....	54
9. Anexos .....	59

### Abreviaciones

Símbolo	Definición	Unidades
(p)ppGpp	Tetrafosfato + Pentafosfato de guanosina	
$\mu$	Velocidad de crecimiento	$h^{-1}$
AMP	Adenosín monofosfato	
Amp	Ampicilina	
AmpR	Resistencia a ampicilina	
ATP	Adenosín trifostfato	
CCR	Represión catabólica por carbono	
DksA	Factor de transcripción	
DNA	Ácido desoxirribonucleico	
DNS	Ácido 3,5 dinitrosalicílico	
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	
$g_{DWC}/g_s$	g de biomasa en peso seco / g sustrato	
LI	Límite inferior	
LS	Límite superior	
M9	Medio mínimo de cultivo bacteriano	
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero	
OD	Densidad óptica	nm
Operón de <i>rrn</i>	Operón de RNA ribosomal	
ori	Origen de replicación	
P	Promotor	
p15A ori	Plásmido usado como vector de clonación	
pBR322 ori	Plásmido usado como vector de clonación	
pKK3535	Plásmido de rRNA	
ppGpp	Tetrafosfato de guanosina	
pppGpp	Pentafosfato de guanosina	
PTC	Centro peptidiltransferasa	
ptRNA67	Plásmido de tRNA	
qs	Tasa/ velocidad de consumo de sustrato	$g/g_{DWC}/h$
RelA	Enzima, ppGpp sintetasa I	
RNA	Ácido ribonucleico	
RNAP	RNA Polimerasa	
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal	
S	Svedbergs	

### Abreviaciones (Continuación)

---

Sitio A	Sitio aminoacilo	
Sitio E	Sitio de salida	
Sitio P	Sitio peptidil	
Spc	Espectinomicina	
SpcR	Resistencia a espectinomicina	
Spot bifuncional	Enzima, ppGpp sintetasa II	
SQ	Nomenclatura para las cepas con eliminación de los operones de <i>rnn</i>	
T	Terminador	
tRNA	Ácido ribonucleico de transferencia	
TS	Espacios transcritos	
UV	Ultra violeta visible	nm
$Y_{x/s}$	Rendimiento biomasa/sustrato	$g_{DWC}/g_s$
$\Delta$	Eliminación de genes	

---

## 1. Resumen

Es de interés contar con nuevos organismos cuyos componentes celulares sean los mínimos necesarios y que permitan simplificar el estudio de diferentes funciones en la célula, ya que al contener sólo la información esencial son más fáciles de entender y de manipular en comparación a los organismos silvestres.

Las bacterias suelen contar con más de un operón de RNA ribosomal (*rrn*), los cuales influyen en la disponibilidad de ribosomas y por ende en la síntesis de proteínas. En particular *Escherichia coli* (*E. coli*) cuenta con siete copias de operones de *rrn*, no obstante aún no se conoce la contribución real de cada uno de ellos. Las cepas con eliminaciones de esta clase de operones pueden ser útiles para estudios relacionados con la maquinaria de traducción.

Previamente se caracterizó la dinámica de crecimiento de cepas con modificaciones en los operones de *rrn*, se encontró que en medios ricos un mayor número de operones implica una velocidad de crecimiento mayor, no obstante, en medio mínimo la tendencia no se mantiene. Con base en los datos reportados se planteó la pregunta, ¿las cepas de *E. coli* con modificaciones en la maquinaria de traducción son más aptas para el crecimiento en medio mínimo al expresar una menor cantidad de RNA ribosomal?, para contestar esta interrogante se evaluaron cepas con diferentes eliminaciones de operones de *rrn* en medio mínimo con glucosa, glicerol y arabinosa como fuentes de carbono.

Mediante cinéticas de crecimiento en matraz se determinó la velocidad de crecimiento ( $\mu$ ), tasa de consumo de sustrato ( $q_s$ ), así como la relación RNA/Proteína de las cepas antes mencionadas, con la finalidad de describir su crecimiento en diferentes ambientes. Los datos obtenidos se caracterizaron con la teoría de partición del proteoma, de particular interés fueron los resultados de las cepas mutantes con genotipos  $\Delta rrnGBAD$  y  $\Delta rrnGADE$  (SQ53 y SQ78 respectivamente).

Se observó que las cepas SQ53 y SQ78 contaron con una velocidad de crecimiento mayor en relación a la cepa silvestre (MG1655), por su parte, la tasa de consumo de sustrato también fue mayor para estas cepas en arabinosa como fuente de carbono. Finalmente se encontró que para la cepa MG1655 en diferentes ambientes la cantidad de RNA y la relación RNA/Proteína presenta una tendencia lineal directa respecto a la velocidad de crecimiento, no obstante esta tendencia no se halló para las cepas con eliminaciones en glucosa como fuente de carbono. El comportamiento de las cepas mutantes puede ser justificado como una compensación celular por la capacidad de traducción reducida.

## 2. Antecedentes

La síntesis de proteínas depende directamente del contenido de ribosomas en la célula, este proceso es altamente costoso [1], y para que se lleve a cabo es necesario que se cuente con ribosomas funcionales, es decir, una fracción de ribosomas que participan activamente en el alargamiento de la cadena peptídica. La existencia de ribosomas activos e inactivos, resulta benéfico en las condiciones variantes de la naturaleza. Sin embargo, desde un punto de vista práctico, es poco oportuno contar con ribosomas inactivos ya que la producción de estos consume una gran cantidad de recursos que podrían aprovecharse para otras funciones como la producción de metabolitos de interés, proteínas sintéticas, generación de nuevas funciones biológicas, entre otros [2] [3].

La tasa de síntesis de proteínas por ribosoma se puede calcular a partir de la relación RNA/proteína a una tasa de crecimiento dada. Dennis & Bremer [4] determinaron la dependencia de la tasa de crecimiento con el contenido de RNA y de proteínas utilizando una cepa de *E. coli* B/r cultivada en medio mínimo suplementado. Entre otros datos, encontraron una tendencia lineal directa entre la relación RNA/ Proteína y la tasa de crecimiento. Se menciona que a menores tasas de crecimiento, el contenido de proteína disminuye más rápido que el contenido de RNA. Además se sugiere que en células de rápido crecimiento el aumento de RNA refleja una acumulación de ribosomas debido a que se requiere una mayor cantidad de estos para apoyar una tasa de síntesis de proteínas alta. Por lo que con el aumento de la tasa de crecimiento, la relación RNA/ Proteína aumenta indicando una proporcionalidad, no obstante, es inversamente proporcional a la eficiencia del ribosoma, ya que cuanto mayor es la eficiencia de los ribosomas, menos de ellos se necesitan para lograr una tasa de crecimiento determinada [1] [4].

Debido a que la mayor parte del RNA es RNA ribosómico la relación RNA/ Proteína es un indicativo del número de ribosomas por proteína en la célula. Esta relación aumenta conforme se inhibe la traducción y cuando esta se reduce a cero, la partición de recursos celulares se inclina a la síntesis de ribosomas [2] reflejando de esta forma la asignación de recursos celulares. Este y otros procesos como la dinámica de crecimiento se pueden explicar considerando una partición del proteoma celular [2] [3].

Según los estudios realizados por Scott, *et al.* [2], el modelo más simple de la teoría de partición del proteoma, indica que éste se constituye por tres sectores, las proteínas de la fracción R, asociadas a los ribosomas, la fracción Q que es invariable y la fracción P o

metabólica. La suma de estas fracciones debe sumar la unidad, de tal forma que la inhibición traduccional da como resultado un aumento de las proteínas del sector R, disminuyendo de este modo la fracción de las proteínas del sector P.

Estas observaciones surgieron a partir de pruebas realizadas a diferentes cultivos de *E. coli* en crecimiento exponencial. Se encontró que la relación RNA/ Proteína se relaciona linealmente con la tasa de crecimiento. Dicho comportamiento se observó en medios de cultivo mínimos así como en cepas mutantes con traducción lenta y en cultivos con antibióticos inhibidores de la traducción. Los datos encontrados concordaron con lo mencionado anteriormente por Dennis & Bremer [4]. No obstante, notaron que cuando la traducción se veía afectada, la relación mostraba pendientes más pronunciadas que la cepa silvestre (Anexo A) [2].

Existen además, otros trabajos en donde se han generado y probado cepas de *E. coli* con operones *inactivos* o agregados. Tal es el caso de Condon *et al.* [5] que determinaron el número de operones de *rrn* necesarios para obtener tiempos de crecimiento óptimos, para ello utilizaron antibióticos para inactivar hasta cuatro operones. Para simular las condiciones variables naturales de los nutrientes, las cepas se cultivaron en medio mínimo durante la fase exponencial, cambiándolas posteriormente a un medio rico. Encontraron que en condiciones altas de nutrientes sólo son necesarios cinco de los siete operones de *rrn* para que la cepa muestre un crecimiento similar al de una cepa silvestre. Se menciona que la expresión de las copias activas puede aumentar compensando a los operones inactivos. No obstante, fueron necesarios siete operones de *rrn* para que las células se adaptaran rápidamente a cambios en la concentración de nutrientes. Esto se derivó a partir de la observación de tiempos extremadamente largos de adaptación al nuevo medio a medida que disminuía el número de operones activos sugiriendo que la función de los siete operones de *rrn* es permitir una adaptación rápida de una condición a otra.

De igual forma, Gyorfy *et al.* [6] trabaron analizando el número óptimo de operones de *rrn* en *E. coli* mediante la construcción de cepas que contenían de 5–10 copias. Las cepas se generaron a partir de *E. coli* MG1655 y MDS42 mediante la delección o inserción de operones de *rrn*. Los efectos se analizaron midiendo el contenido de RNA, proteínas, y parámetros de crecimiento como tiempo de duplicación y tiempo para alcanzar el crecimiento exponencial. Se midieron con las cepas bajo dos condiciones: flujo periódico rico en nutrientes y en un flujo estable de pocos nutrientes.

Se encontró que relación RNA/ Proteína de las células se mantuvo constante independientemente del número de operones de *rrn* sugiriendo este resultado como una consecuencia de la homeostasis celular. Los valores obtenidos reflejan el número de operones óptimos en cada caso ya que al aumentar el número de operones, se observó un aumento en el contenido de RNA y proteínas por célula. El cambio de esta relación fue significativo con 5 a 7 operones, pero disminuyó para los operones adicionales. Finalmente, se encontró que el número óptimo de copias de los operones *rrn* está determinado por las ventajas del ajuste rápido a la disponibilidad de nutrientes y por la capacidad de crecimiento rápido ya que en los ambientes con condiciones nutricionales limitantes pero estables el número óptimo de operones se encuentra por debajo de 7 operones. Por otro lado, las cepas con 7 y 8 operones fueron más aptas en condiciones fluctuantes y ricas en nutrientes reflejando el estilo de vida natural, de la bacteria, sin embargo, se menciona que diferentes números de copias pueden ser óptimos para *E. coli* en condiciones nutricionales controladas artificialmente [6].

Por otro lado, Asai, *et al.* [3] publicaron un trabajo en donde inactivaron secuencialmente los siete operones de *rrn*, con el séptimo las células se compensaron mediante un plásmido multicopia con un solo operón de *rrn*. Los cultivos se realizaron en medio rico y encontraron una reducción similar de la tasa de crecimiento y la relación RNA/ Proteína en las cepas a las cuales se les eliminó los dos primeros operones. Cuando el número de eliminaciones se extendió hasta seis, se observó una disminución en la tasa de crecimiento ligeramente mayor que la disminución en la relación RNA/ proteína, estos resultados sugirieron una eficiencia baja del ribosomas debido una disminución en la fracción de ribosomas activos. Finalmente, cuando se inactivó el séptimo operón, la relación RNA/ Proteína se restauró a los niveles de la cepa silvestre, pero la tasa de crecimiento mantuvo los niveles bajos, por lo que se dedujo que la tasa de crecimiento reducida no se debe simplemente a la reducción de las concentraciones de ribosomas. Se propuso que la concentración y la eficiencia de los ribosomas son limitantes del crecimiento en cualquier célula.

En particular Quan, *et al.* [7] construyeron un conjunto de cepas con eliminaciones secuenciales de *rrn* a partir de *E. coli* MG1655, las cepas generadas fueron; SQ37, SQ88, SQ2203, SQ110 y SQ171. Las células fueron probadas en un medio de cultivo rico, encontrando que la eliminación de tres operones de *rrn* no alteró significativamente el tiempo de duplicación de las cepas, no obstante se observó un crecimiento más lento al inactivar la cuarta copia, debido a la expresión limitante de los RNA de transferencia, de

igual forma, la eliminación de la sexta copia de *rnr* condujo a una tasa de crecimiento reducida debido al contenido ribosomal.

Por otro lado, en el estudio realizado por Dai, *et al.* [8] se caracterizó la dependencia entre el contenido de ribosomas (relación RNA/ proteína) y la tasa de elongación de la traducción para diferentes tasas de crecimiento, para lo cual se cultivaron cepas de *E. coli* silvestres y de crecimiento lento en medio rico adicionado con glucosa y en medio mínimo tamponado suplementado con diferentes fuentes de carbono y nitrógeno, además utilizaron antibióticos inhibitorios de la traducción. Los valores obtenidos mostraron una relación lineal directa con la tasa de crecimiento al igual que en los trabajos anteriormente mencionados. Sin embargo, esta relación no se cumplió con las cepas de crecimiento lento ya que se observa una curva ascendente. Se encontró además que las células bacterianas mantienen su velocidad de elongación al reducir la fracción de ribosomas activos, elevando la expresión de mecanismos de traducción.

Finalmente, en el laboratorio de Biología de Sistemas y Biología Sintética del Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM, como parte del proyecto de tesis doctoral de David Hidalgo (en proceso, 2019) se ha trabajado con las cepas MG1655, SQ37, SQ40, SQ49, SQ53, SQ78, SQ88, SQ110, SQ141 y SQ171, caracterizando la dinámica de crecimiento en medios ricos y en medios mínimos con diferentes fuentes de carbono. Se ha observado que, en medios ricos, a mayor número de operones de RNA ribosomal, mayor es la velocidad de crecimiento, siendo la cepa silvestre la más veloz. No obstante, en medio mínimo la tendencia no se mantiene. En su lugar, se ha observado que algunas cepas con menor número de operones de *rnr* son capaces de crecer a una velocidad mayor a la cepa silvestre. Hasta ahora, la caracterización del crecimiento de las cepas se ha realizado solamente midiendo la densidad óptica en cinéticas realizadas en placas de 96 pozos. Sin embargo, se debe de considerar la teoría de partición del proteoma, siendo necesario conocer la relación existente entre la cantidad total de RNA y de proteína, ya que con ello es posible explicar la capacidad de algunas cepas con eliminación de operones de *rnr* para crecer a una velocidad mayor que la cepa silvestre.

Con base a datos reportados, se llega a la pregunta ¿Las cepas de *E. coli* que tienen modificaciones en la maquinaria de traducción son más aptas para el crecimiento en medio mínimo al expresar una menor cantidad de RNA ribosomal?

### **3. Marco Teórico**

#### **3.1 Biología Sintética**

En biotecnología, el conocimiento sobre los organismos generalmente se emplea para realizar modificaciones y mejoras de los sistemas biológicos, con el objetivo de producir alguna molécula de interés comercial [9]. Sin embargo, la gran diversidad de variables biológicas que maneja la biotecnología clásica limita la capacidad de diseño racional de sistemas y la predicción de su comportamiento. Bajo este enfoque, es deseable contar con un número limitado de objetos bien caracterizados, obteniendo así una visión mayormente empleada por la biología sintética [10].

La biología sintética es un campo que hace uso de las ciencias biológicas, ingenieriles y modelos computacionales con la finalidad de diseñar nuevos sistemas biológicos que no se hallan en la naturaleza. La evolución de las técnicas empleadas por la biología sintética hace posible modelar organismos altamente eficientes y con características acorde a las necesidades de cada investigación [11]. En general, los sistemas sintéticos se alejan cada vez más del sistema natural, no obstante, los organismos modificados dependen de interruptores metabólicos controlados por el hombre para sobrevivir [9].

Es así que el objetivo final de la biología sintética es combinar partes básicas y construir sistemas útiles con propiedades predecibles con una complejidad cada vez mayor pudiendo modificarlos y aun así predecir de manera confiable el comportamiento de los sistemas compuestos, así pues, la comprensión de enfoques para sintetizar biomoléculas, desarrollar análogos sintéticos y aplicarlos en el marco de los sistemas biológicos es parte también de las aplicaciones de esta disciplina y solo han sido posibles con el uso de métodos eficientes de síntesis de DNA (ácido desoxirribonucleico) que permiten el diseño sin restricciones de partes y que por lo tanto, van más allá de lo que se encuentra en la naturaleza [10].

Los avances en esta disciplina permiten la expansión de las redes de genes a programas biológicos más grandes, que son prometedores para una amplia gama de aplicaciones prácticas, incluyendo biosensores, moléculas terapéuticas y la producción de biocombustibles, productos farmacéuticos y biomateriales. Por ejemplo, las contribuciones de la biología sintética con fines terapéuticos incluyen: redes y organismos diseñados para la elucidación del mecanismo de la enfermedad, la identificación del objetivo del fármaco, el suministro terapéutico y la producción y el acceso al fármaco. En la producción

microbiana de biocombustibles y productos farmacéuticos, la biología sintética ha complementado los esfuerzos tradicionales de ingeniería genética y metabólica ayudando a la construcción de rutas biosintéticas optimizadas [12].

La comprensión de los componentes celulares es uno de los enfoques principales de la biología sintética por lo que se ha recurrido a la creación y al estudio de células mínimas, las cuales contienen un número esencial de genes para que la célula pueda subsistir, esta clase de sistemas pueden ser utilizadas para introducir nuevas funciones y con ello desarrollar o hacer más eficiente un proceso, no obstante, los genomas mínimos conducen también a la creación de cromosomas sintéticos, los cuales al contener solo la información esencial son más fáciles de entender y de manipular en comparación a los cromosomas naturales [11].

De particular interés son las investigaciones relacionados con el número de copias de operones de RNA ribosomal (*rrn*) presentes en los genomas bacterianos, los cuales influyen en la disponibilidad de rRNA (ácido ribonucleico ribosomal), determinando el número de ribosomas, y por ende la síntesis de proteínas. No obstante no ha sido posible descifrar la contribución real del número de copias de operones de *rrn* en una célula bacteriana. Al identificar correctamente el aporte de cada una de las copias de operones de *rrn* y mediante la manipulación de estos podría ser posible el diseño de células mejoradas con genomas funcionales que, por ejemplo, tengan un crecimiento más rápido en comparación a las cepas silvestres [6].

### **3.2 Operones de *rrn***

El metabolismo altamente regulado de los procariontes, como *E. coli*, les permite vivir con recursos limitados y adaptarse a un entorno dinámico. La síntesis oportuna de cada molécula sólo cuando es necesaria evita el desperdicio de energía. Esta cualidad se hace posible a nivel genético, en donde el control de los genes inducibles a menudo está a cargo de operones (Figura 1). Un operón es un grupo de genes estructurales y reguladores los cuales se asocian a un mismo operador el cual es una secuencia reguladora que se une a proteínas represoras o activadoras específicas que modulan la expresión génica [13].

Las proteínas activadoras promueven que la RNA polimerasa (RNAP) se una al promotor y que desencadene la transcripción, por otra parte, las proteínas represoras se unen al

operador evitando que la RNAP llegue hasta esta secuencia, las cuales son generalmente cortas y, a menudo, son palíndromos [14].

La RNAP se conforma por diferentes subunidades, 2 subunidades idénticas que ayudan a ensamblar a la enzima, reconociendo al promotor y uniendo moléculas activadoras. La subunidad  $\beta$  que forma el enlace fosfodiéster en el centro catalítico, por otra parte, la subunidad  $\beta'$  sirve de unión al DNA molde. Finalmente, el factor  $\sigma$  que brinda la especificidad al promotor [15].

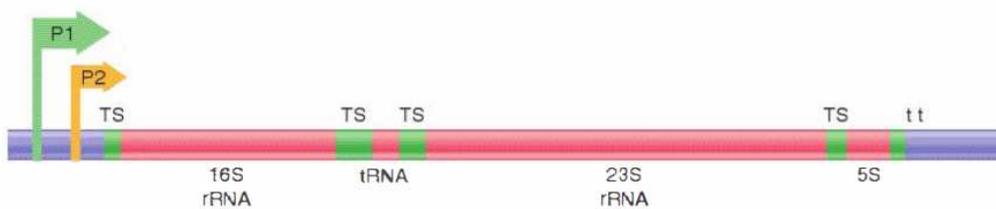


Figura 1. Estructura del operón de *rrn* de *E. coli*. Se señalan con flechas los dos promotores, el promotor mayor P1 y el promotor menor P2. Los genes que codifican para 16S, tRNA (ácido ribonucleico de transferencia), 23S y 5S están indicadas en rosa. Los espaciadores transcritos (TS) se muestran en verde. Los dos terminadores (t) están al final del operón [14].

En procariontes la redundancia de genes normalmente es eliminada, sin embargo, es común que en los cromosomas bacterianos existan copias múltiples de cada gen que codifica rRNA. El número de copias de operones de *rrn* por genoma bacteriano varía de 1 a 15 y se ha estipulado que se requieren múltiples copias de estos operones para lograr altas tasas de crecimiento ya que permiten sintetizar ribosomas y responder a variaciones en el medio. Sin embargo, se han observado tasas de crecimiento óptimas y un tiempo de duplicación corto para ciertas bacterias con un solo operón de *rrn* [16]. Además, se ha observado que los números de copia de los operones de *rrn* más altos tienden a ocurrir en organismos de rápido crecimiento, y en aquellos con genomas más grandes, los cuales tienen la capacidad de codificar múltiples vías para la absorción y utilización de nutrientes, mientras que las bacterias que viven en ambientes acuáticos poco cambiantes y bajos en nutrientes tienden a mostrar solo algunas copias de los operones de *rrn* además de tener genomas más pequeños [6].

### 3.3 *E. coli* como organismo modelo

*E. coli* es una bacteria Gram negativa con forma de bacilo cuyo hábitat generalmente es el tracto digestivo de vertebrados siendo un microorganismo comensal mutualista, sin embargo, también existen cepas que pueden ser patógenas. Gracias a que cuentan con una amplia plasticidad ecológica puede adaptarse rápidamente a vivir en diferentes ambientes pasando a ser microorganismos de vida libre, esta característica es en parte debido a que son anaerobios facultativos. Al igual que el resto de las bacterias, cuenta con un cromosoma circular único formado por una sola molécula de DNA asociado a diversas proteínas [17] [18].

Esta bacteria es un organismo modelo para múltiples investigaciones debido al hecho de que se cuenta con cepas que están muy bien caracterizadas en términos de genética y fisiología, además de que existen múltiples herramientas disponibles para la edición del genoma así como herramientas de expresión génica, por ejemplo, plásmidos, promotores y terminadores [19].

En particular la cepa de laboratorio MG1655, contiene 4, 639, 221 pares de bases de DNA circular de doble cadena. El 87.8% de este genoma codifica para proteínas, el 0.8% codifica para RNAs estables y 0.7% consiste en DNA repetido que no tiene función conocida, finalmente alrededor del 11% del genoma tiene funciones de regulación [18].

Los plásmidos, los cuales son elementos circulares de DNA extracromosómicos pueden estar presentes o no en este microorganismo ya que esta bacteria puede sobrevivir sin ninguno de ellos o bien, tener un buen porcentaje de su genoma total. El número y tipo de plásmidos se regula por el número de réplicas de estos dentro una bacteria y por la entrada de nuevos plásmidos por conjugación o transformación [18].

En la naturaleza, el entorno de las células de *E. coli* puede estar en constante cambio. En un hospedero, cuentan con una gran cantidad de nutrientes, mientras que, en un medio acuático, se pueden encontrar en condiciones de inanición. Debido a esto, han desarrollado mecanismos de control de la expresión del rRNA que están altamente relacionados con los requisitos de crecimiento celular. La mayor parte de esta regulación se produce al nivel del inicio de la transcripción, por lo que si el microorganismo se encuentra en un entorno nutricional rico, posee mecanismos para aumentar rápidamente su síntesis de rRNA para utilizar los nutrientes disponibles y elevar sus tasas de síntesis de

proteínas y de crecimiento. Por otro lado, si el suministro de nutrientes baja, existen estrategias que reducen rápidamente la síntesis de rRNA [20].

Debido a que el control del contenido de ribosomas se relaciona con la transcripción de los siete operones de *rrn* presentes en el genoma de *E. coli*, el número de ribosomas por célula varía en proporción a la tasa de crecimiento para satisfacer la demanda cambiante de síntesis de proteínas. En tiempos de duplicación de alrededor de 20 minutos, hay hasta 70,000 ribosomas por célula bacteriana, mientras que a tasas de crecimiento más bajas puede haber solo 20,000 ribosomas. Cuando los ribosomas son menos abundantes, la acumulación de biomasa decrece y las tasas de crecimiento disminuyen [5].

Los siete operones ribosomales (*rrnA*, *rrnB*, *rrnC*, *rrnD*, *rrnE*, *rrnG* y *rrnH*) que sintetizan el rRNA en *E. coli* son altamente conservados y se encuentran ubicados en varios sitios no contiguos en la mitad del cromosoma circular, centrados alrededor del origen de la replicación (*oriC*) (Figura 2). Los operones de *rrn* se transcriben en la misma dirección en que se replica el cromosoma con la finalidad de prevenir colisiones entre las polimerasas de RNA y DNA. A partir de estos operones se sintetizan los RNAs ribosomales (rRNA) 16S, 23S y 5S. Las regiones espaciadoras que existen entre 16S Y 23S están ocupadas por varios genes de tRNA 16S y 23S. Aunque estos operones tienen una organización similar, la estructura general de los operones no es idéntica ya que contienen heterogeneidades de secuencia dentro de los propios genes y dentro de las regiones espaciadoras y de control por lo que es posible que puedan existir algunas diferencias en la función de los RNA producidos. Sin embargo, en general se asume que todos los operones *rrn* son esencialmente equivalentes [20].

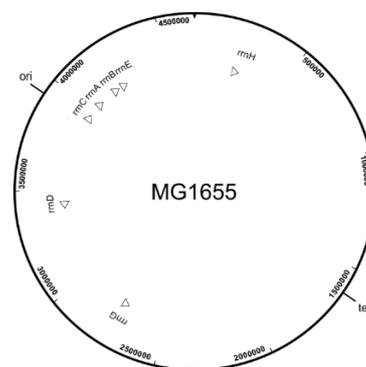


Figura 2. Ubicación de los operones rRNA (*rrn*) en el cromosoma de *E. coli*. Las puntas de flecha blancas indican la posición genómica y la dirección de transcripción. También se indican el origen (Ori) y el término de la replicación del DNA [6].

### 3.4 Control de transcripción de rRNA

Los ribosomas son complejos macromoleculares catalíticos encargados de la síntesis de proteínas mediante el ensamblaje de aminoácidos, son estructuras no membranosas compuestas principalmente por hasta 80 proteínas ribosómicas y diferentes moléculas de rRNA, las moléculas de rRNA componen de un 50–60% de la estructura terciaria de un ribosoma y constituyen del 80-90% del RNA total en una célula. Las proteínas ribosómicas y el rRNA se autoensamblan únicamente al inicio del proceso de traducción. La estructura ribosomal ensamblada contiene tres sitios para la unión del tRNA: el sitio A (aminoacilo), que se une al nuevo aminoacil-tRNA; el sitio P (peptidil), que se une al péptido en crecimiento y el sitio E (salida) que contiene tRNA desasociado [15].

En células procariotas, los ribosomas tienen un coeficiente de sedimentación de 70S (Svedbergs). La estructura del ribosoma consta de dos subunidades de ribonucleoproteínas (Figura 3), la subunidad menor (30S) se conforma por una molécula de rRNA (16S) y 21 proteínas, su función es mediar las interacciones entre los anticodones de los tRNA y los codones en el mRNA que se traducen con la finalidad de determinar el orden de los aminoácidos en la proteína que se está sintetizando. Por su parte, la subunidad mayor (50S) contiene dos moléculas de rRNA (5S y 23S) y 34 proteínas asociadas, debido a la presencia de un centro peptidiltransferasa (PTC) esta subunidad se encarga de la formación de enlaces peptídicos de la proteína en crecimiento [21].

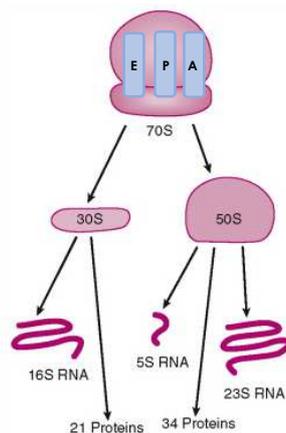


Figura 3. Estructura de los ribosomas en células procariotas [21].

Las bacterias han evolucionado para maximizar su crecimiento al tiempo que minimizan su ajuste a las condiciones dinámicas del medio, el ajuste rápido para aumentar el suministro

de nutrientes requiere la disponibilidad los ribosomas la cual depende principalmente de la cantidad de rRNA, que regula la expresión de las proteínas ribosómicas. Particularmente en las células de *E. coli*, hasta el 85% del RNA total puede ser rRNA. Para solventar el suministro de rRNA, los genomas bacterianos suelen incluir varias copias de operones de *rnm* en su genoma y con altas tasas de crecimiento la mayoría de las moléculas de RNA polimerasa están asignadas a la transcripción de estos operones [6].

El nivel primario de control de la transcripción es el control del crecimiento. Mientras que las bacterias tengan una cantidad suficiente de ATP (Adenosín trifosfato), las células continuarán dividiéndose.

Cada división requiere una duplicación de los ribosomas y, por tanto, de rRNA y tRNA que al tratarse de RNAs estables, sólo deben formarse cuando la célula está en crecimiento, es así que el nivel primario de control de la transcripción de los RNA estables depende del suministro de ATP [14].

No obstante, la síntesis de rRNA puede cambiar en respuesta a estímulos extra e intracelulares, los cambios medioambientales que sufre un microorganismo repercuten en la producción de rRNA y por lo tanto en la de las proteínas necesarias para el crecimiento celular. Debido a los cambios nutricionales por los que puede atravesar una célula, los microorganismos deben de ser capaces de adaptarse, por lo que han desarrollado mecanismos de control asociados a sus requerimientos nutricionales por lo que cuando las bacterias se encuentran en condiciones de crecimiento deficientes y carecen de un suministro suficiente de aminoácidos para mantener la traducción, minimizan diversas actividades, la bacteria conserva sus recursos al participar solo en el mínimo de actividades y enfocándose principalmente en la síntesis de aminoácidos [5] [14].

*E. coli* por ejemplo, puede habitar diferentes organismos en donde el ambiente cuenta con una gran cantidad de nutrientes por lo que aumenta rápidamente la síntesis de rRNA, sin embargo, también puede sobrevivir en ambientes acuosos en donde hay escasez de nutrientes, en este caso se reduce drásticamente la síntesis de rRNA hasta obtener los recursos mínimos necesarios [5] [20].

A pesar de lo anterior, la síntesis de ribosomas es un proceso energéticamente costoso para la célula por lo que la fabricación de ribosomas de una forma excesiva podría resultar en un crecimiento poco óptimo. Por lo tanto, la expresión de los operones de *rnm* está estrechamente regulada y se ajusta rápidamente a las necesidades celulares mediante

mecanismos moleculares de regulación por retroalimentación, existiendo entonces un segundo nivel de control de la transcripción de los RNA estables [6] [14].

Los mecanismos moleculares los cuales implican la modulación de la expresión del rRNA en bacterias, le permiten al microorganismo ajustar su velocidad de crecimiento en relación con la disponibilidad de recursos celulares. Se han examinado diferentes mecanismos relacionados con la expresión del rRNA que se enfocan en la capacidad de su síntesis, entre ellos destacan la regulación dependiente de la velocidad de crecimiento y la respuesta estricta, la cual es una respuesta global al estrés debida a factores adversos como limitación de nutrientes o incremento en la temperatura de cultivo [9] [5].

### **3.5 Respuesta estricta**

La respuesta estricta es un mecanismo de control realizado por células procariotas como método de adaptación a la falta repentina de aminoácidos esenciales en el medio, así como a otras circunstancias que causan la detención del crecimiento [22].

Las características distintivas de este mecanismo son una disminución rápida de la síntesis de rRNA y tRNA, además la tasa de elongación de las RNAP que transcriben el mRNA disminuye. Finalmente, se observa la acumulación de dos nucleótidos poco frecuentes en la célula, el tetrafosfato de guanosina (ppGpp) y el pentafosfato de guanosina (pppGpp) denominados en conjunto como (p)ppGpp, los cuales son dos nucleótidos con niveles normalmente bajos, sus concentraciones comienzan a aumentar pocos segundos después de que inicia la falta de aminoácidos, alcanzando su nivel máximo después de 5 a 15 minutos para luego disminuir a un nivel estable que es de 10 a 20 veces superior al valor basal original [5].

En *E. coli* esta acumulación utiliza dos vías diferentes para producir ppGpp: las vías dependientes de RelA y SpoT. En la primera vía, la enzima RelA unida a ribosoma (ppGpp sintetasa I) sintetiza los nucleótidos de (p)ppGpp, este mecanismo se lleva a cabo cuando RelA se asocia con los ribosomas y produce ppGpp (inicialmente se produce (p)ppGpp y luego se convierte en ppGpp) en respuesta a tRNA no cargado en el sitio A del ribosoma durante la falta de aminoácidos. Por otro lado, se piensa que el mecanismo dependiente de SpoT bifuncional (ppGpp sintetasa II) es el principal responsable de la acumulación de ppGpp en respuesta a la mayoría de las limitaciones de estrés y nutrientes aparte de la falta de aminoácidos. Además, SpoT exhibe funciones duales ya que también es responsable de

hidrolizar ppGpp manteniendo así, los niveles intracelulares adecuados a través de la degradación enzimática [23] [22].

Una cepa que carece tanto de RelA como de SpoT es completamente incapaz de producir ppGpp, la respuesta a la inanición de esta clase de cepas se conoce como respuesta relajada. La característica principal de la respuesta relajada es una acumulación continua de rRNA cuando la falta de nutrientes se hace presente [22].

El ppGpp puede controlar varias reacciones, principalmente la transcripción. Por una parte activa la transcripción en algunos promotores, los cuales están involucrados en la biosíntesis de aminoácidos y recientemente se ha descubierto que la ppGpp también es importante para regular diferentes rasgos de virulencia en muchas bacterias diferentes, no obstante, su función principal es inhibir la síntesis de los operones de rRNA y tRNA estables [22] [14].

La secuencia del promotor principal de los genes de rRNA de *E. coli* da como resultado un complejo abierto potencialmente inestable con la RNA polimerasa durante el inicio de la transcripción y se colapsará si la concentración de ATP es demasiado baja. Esta clase de promotor también requiere la actividad de un factor de transcripción (DksA), para unirse a la RNA polimerasa para efectuar la respuesta estricta ya que ppGpp compite con el ATP por el primer nucleótido para estimular el colapso, inhibiendo efectivamente la transcripción de rRNA [14].

Las moléculas de ppGpp disminuyen la vida media del complejo abierto en la mayoría de los promotores, el resultado fisiológico es la fuerte regulación a la baja de los promotores con vidas medias intrínsecamente cortas, como es el caso de los promotores de los genes de RNAs estables. Dado que la expresión de los genes de la proteína ribosomal está controlada por los niveles de rRNA, la respuesta estricta incluye una regulación descendente a gran escala del aparato de traducción [24].

La privación de cualquier aminoácido o una mutación que desactive cualquier aminoacil tRNA sintetasa es suficiente para iniciar la respuesta estricta, esta respuesta causa una reducción masiva en la síntesis de rRNA y de tRNA. Lo cual es suficiente para reducir la cantidad total de síntesis de RNA de un 5-10%. Además, la tasa de degradación de proteínas aumenta y se producen muchos ajustes metabólicos, tales como la reducción de la síntesis de nucleótidos, carbohidratos y lípidos [14].

El mecanismo comienza cuando las bajas concentraciones de aminoácidos conducen a una disminución de la carga de los tRNAs correspondientes. Los tRNAs no aminoacilados

(descargado) no pueden unirse de forma inmediata a los factores de elongación por lo que no entran al sitio aceptor en el ribosoma, cuando no hay tRNAs aminoacilados suficientes en la célula para satisfacer una síntesis de proteínas óptima, se produce un bloqueo transitorio del ribosoma. Debido a esto el alargamiento de la cadena polipeptídica se detiene cuando un tRNA no cargado con el aminoácido correspondiente se une al ribosoma. Si la detención del ribosoma se prolonga demasiado, el tRNA no cargado es capaz de unirse directamente al sitio A sin el factor de elongación EF-Tu, comenzando la síntesis de (p)ppGpp, la cual se produce sin ningún movimiento del ribosoma en el momento de la elongación [23] [5].

Esto se debe a que cuando el tRNA no cargado se une al ribosoma se estimula a la proteína RelA, la cual es activada en presencia de la proteína ribosómica L11, catalizando la síntesis de nucleótidos de (p)ppGpp.



La mayoría de los reguladores transcripcionales actúan uniéndose a las regiones de ADN en o cerca de un promotor para afectar la unión o exclusión de RNAP. Por el contrario, ppGpp se une cerca del sitio activo de RNAP, interactuando con las subunidades  $\beta$  y  $\beta'$  y parece afectar la capacidad de unión de los factores sigma a la RNA polimerasa central inhibiendo la transcripción de operones de RNA estables [5] [22] [23].

DksA también se une a la RNA polimerasa y aumenta la regulación (p) ppGpp al inicio de la transcripción en ciertos promotores dependientes de  $\sigma_{70}$ , funcionando tanto como reguladores negativos como positivos. Estos reguladores cambian la expresión génica disminuyendo la actividad de transcripción de genes involucrados en la traducción y aumentando la transcripción de los operones relacionados con el estrés y los genes que codifican las enzimas necesarias para la síntesis y el transporte de aminoácidos [23].

Cuando las condiciones del medio regresan a tener concentraciones de nutrientes suficientes, el gen *spoT* codifica una enzima cuya actividad cataliza la degradación de ppGpp. Cuando comienza la degradación de esta molécula su vida media es de aproximadamente 20 segundos, por lo que la respuesta estricta se revierte rápidamente cuando la síntesis de (p)ppGpp se ve interrumpida [14].

Como se ha descrito, cuando los nutrientes se vuelven limitantes para el crecimiento, *E. coli* ajusta su programa de expresión génica de uno que apoya el crecimiento celular a uno que permita una supervivencia prolongada en la fase estacionaria. Debido a que en un estado libre de estrés celular la concentración de (p)ppGpp es baja, las células bacterianas producen ribosomas suficientes, además de otros factores, lo cual da lugar a un crecimiento más rápido. En medios pobres o limitantes, aumenta la concentración de (p)ppGpp por lo que se detiene la síntesis de RNA ribosomal y las células crecen lentamente. Se entiende entonces, que cuando hay suficientes nutrientes, estos se utilizarán para el crecimiento. Esto tiene un gran impacto sobre la composición celular y particularmente sobre la distribución del proteoma [24] [25].

### **3.6 Regulación de la síntesis de rRNA dependiente de la tasa de crecimiento**

A medida que el crecimiento celular en *E. coli* aumenta, las células producen más proteínas por unidad de tiempo, por lo que deben fabricar más ribosomas por célula para adaptarse al aumento de la tasa de síntesis de proteínas. En la regulación dependiente de la tasa de crecimiento de la síntesis de ribosomas en bacterias de crecimiento moderado a rápido, los promotores de los operones de *rrn* están regulados de manera que la síntesis de rRNA por unidad de proteína aumenta con el cuadrado de la tasa de crecimiento celular, y los ribosomas, por lo tanto, se acumulan en proporción a la tasa de crecimiento, es decir que el número de ribosomas por unidad de proteína celular es proporcional a la tasa de crecimiento ( $\mu$ ) y la tasa de síntesis de ribosomas es proporcional a  $\mu^2$ . La finalidad de este mecanismo es garantizar un suministro suficiente de ribosomas para satisfacer la demanda de síntesis de proteínas de la célula [26] [5].

Es de importancia destacar que la tasa de rRNA o la síntesis de ribosomas no determinan la tasa de crecimiento. Más bien, la tasa de síntesis de ribosomas responde a la tasa de crecimiento, aunque hay situaciones en las que las alteraciones en la tasa de síntesis de ribosomas o en la actividad de los ribosomas pueden reducir la tasa de crecimiento [26].

En este mecanismo de control, la síntesis de proteínas ribosómicas se modula mediante el control de la síntesis del rRNA, debido a que esta clase de proteínas tienen una fuerte afinidad de unión por estas moléculas, por lo que si las proteínas r están en exceso respecto a los rRNAs a los que normalmente se unen durante el proceso de ensamblaje del ribosoma, estas proteínas se unirán a sus propios mRNAs, reprimiendo de esta manera la traducción

de una forma directa. Existiendo entonces, una competencia directa entre el mRNA y el rRNA para la unión de estas proteínas r reguladoras, por lo tanto esta clase de autoregulación post transcripcional asegura que la traducción de las proteínas ribosomales sea acorde con la transcripción del rRNA [25] [26].

Existen diferentes modelos para explicar la regulación dependiente de la tasa de crecimiento, los cuales, en general se pueden clasificar en dos grupos: los modelos de ppGpp y los modelos de retroalimentación de ribosomas. Los primeros proponen que la concentración intracelular de ppGpp regula directamente el nivel de síntesis de rRNA al restringir el número de moléculas de RNAP disponibles para iniciar la transcripción en los promotores de RNA estables. Los modelos de retroalimentación ribosoma, por otro lado, sugieren que la tasa de síntesis de rRNA se rige por un mecanismo de realimentación sensible a la capacidad de traducción de la célula. Es posible que estos sistemas coexistan y se complementen [5].

### **3.7 Repartición de recursos y partición del proteoma**

El proteoma es el total proteínas en un organismo, incluyendo a las que cuentan con modificaciones postraduccionales, además, este término también puede referirse a la masa proteica total de una célula. Para una célula bacteriana en crecimiento exponencial, el proteoma es el componente principal de la masa celular seca ya que la célula desvía la mayor parte de sus nutrientes a la síntesis de proteínas [27].

El crecimiento bacteriano consiste en la conversión de nutrientes a biomasa y los principales constituyentes de la biomasa son proteínas. Para aprovechar al máximo los nutrientes y contar con un crecimiento óptimo, es necesario que el proteoma en la célula se distribuya en las proporciones correctas. Esto requiere que se asignen los recursos disponibles a la síntesis de proteínas de manera precisa y oportuna, la concentración de ribosomas aumentara con la tasa de crecimiento [9].

En un estado estable los ribosomas representan el 30% del proteoma, lo que significa que el 30% de los ribosomas participan en la producción de otros ribosomas. En un entorno sin restricciones, la fracción de proteína ribosomal debe establecerse lo más alta posible para maximizar la tasa de crecimiento; sin embargo, la restricción impuesta por la partición de proteoma da como resultado una tasa de traducción limitada de aminoácidos si la fracción de proteína ribosomal se eleva demasiado. Por lo tanto, la expresión de funciones

sintéticas (que no se relacionan con el crecimiento) está siempre limitada por la regulación nativa de la célula [25].

Después de la síntesis de proteínas, la cual tiene lugar durante el crecimiento celular, las bacterias deben asignar de manera óptima todos los recursos del proteoma a diversas funciones celulares en los diferentes entornos de crecimiento, a nivel fisiológico, los recursos de proteoma asignados a los ribosomas y la tasa de crecimiento se relacionan mediante las leyes de crecimiento bacteriano. La relación existente entre las leyes de crecimiento y la partición de proteoma puede proporcionar un modelo predictivo de la respuesta de la bacteria a las perturbaciones fisiológicas [2].

Las bacterias deben adaptar constantemente su crecimiento a los cambios en la disponibilidad de nutrientes, las leyes de crecimiento conectan la abundancia de ribosomas y la tasa de crecimiento, estas leyes surgen de la estrategia reguladora que se relaciona en el control de la tasa de crecimiento [25].

Las leyes de crecimiento bacteriano mencionan que durante el crecimiento exponencial equilibrado, la composición macromolecular de una bacteria se relaciona solo con la tasa de crecimiento del cultivo independientemente de los nutrientes encontrados en el medio, por lo que cuando la composición del medio es fija y la traducción de proteínas se ve afectada (por ejemplo, con tratamiento de antibióticos), la reducción en la tasa de crecimiento refleja un aumento lineal de la fracción de proteína ribosomal. Sin embargo en el cultivo por lotes, la tasa de crecimiento bacteriano se puede modular a través de la composición del medio, variando la calidad de los nutrientes suministrados, en este caso, la fracción de proteínas ribosomal aumenta linealmente con la tasa de crecimiento [25].

Por su parte, la partición del proteoma bacteriano engloba un conjunto de sectores funcionales, que son grupos de genes conectados por un propósito común. En el caso más simple, el proteoma total se divide en una fracción independiente de la tasa de crecimiento que puede incluir genes constitutivos autoregulados negativamente, fracciones dependientes de la tasa de crecimiento, en donde se encuentran las proteínas ribosómicas y otras proteínas de traducción, la última fracción contiene a las proteínas metabólicas, incluidos los transportadores y las enzimas anabólicas y catabólicas. Esta partición da como resultado una restricción en la asignación dependiente del crecimiento de estas fracciones, es decir si la fracción de proteína ribosomal aumenta, debe hacerlo a costa de reducir la fracción de proteína metabólica (Figura 4) [25].

Dicho de otra forma, el contenido total de proteínas de la célula bacteriana se compone de tres fracciones:

La fracción R es de tamaño variable y directamente proporcional a la tasa de crecimiento, se constituye por todas las proteínas ribosómicas. La fracción P también es de tamaño variable, y está asociada con la absorción de nutrientes, esta fracción se modifica a expensas de la fracción R. Además, ejerce un efecto positivo sobre el crecimiento al proporcionar nutrientes que, en última instancia, alimentan a los precursores para la síntesis de proteínas en el sector R ya que se forma con proteínas de procesamiento y captación de nutrientes. Finalmente las proteínas restantes pertenecen a la fracción fija Q, la cual es invariante en proporción del proteoma total y se relaciona con el mantenimiento y la estructura celular, su proporción es constante debido a que no se ve afectada por la tasa de crecimiento [2].

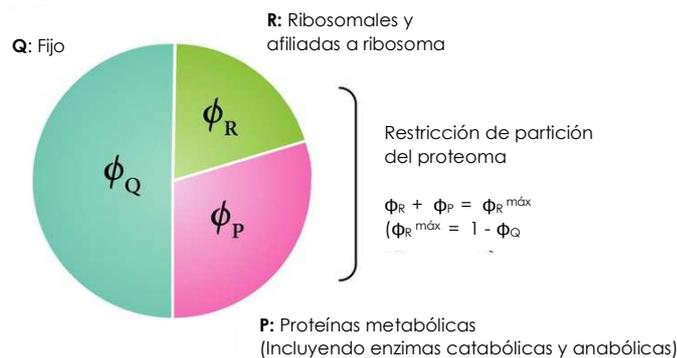


Figura 4. Partición mínima del proteoma. El proteoma consiste en tres fracciones. La fracción Q independiente de la tasa de crecimiento, la fracción R que incluye las proteínas asociadas al ribosoma y una fracción metabólica P contiene el resto de proteínas [25].

Debido a que las fracciones R y P cambian recíprocamente sus proporciones en función de la tasa de crecimiento celular, la fracción R alcanza su mayor magnitud en condiciones de rápido crecimiento, lo cual coincide con el hecho de que los ribosomas son más abundantes en las células de crecimiento más rápido [2].

Sin embargo, el crecimiento óptimo requiere una asignación proteómica equilibrada de los sectores P y R. Ya que los aumentos en el sector P, debido, por ejemplo, a la necesidad de una mayor capacidad de absorción de nutrientes al sintetizar más transportadores, se producen a expensas del sector R dando como resultado una tasa de crecimiento menor

que si se invirtiera menos en el proteoma. Así mismo, el tamaño y la composición de estos sectores están limitados por su codependencia en los recursos finitos de la célula, así como por sus respectivos roles metabólicos en la utilización de esos recursos. El conjunto interdependiente de restricciones en el tamaño del sector del proteoma sugiere que la célula está sujeta a un principio de austeridad del proteoma. Los ajustes al medio ambiente, como un cambio en la abundancia o la calidad de las fuentes de carbono y nitrógeno, o la presencia de drogas, cambiarán la demanda de las funciones de cada sector de proteoma. Las células entonces, deben adaptarse a tal cambio en las demandas metabólicas cambiando las fracciones de masa del sector, remodelando efectivamente la distribución de recursos en los sectores funcionales del proteoma [2] [27].

Así pues, el tamaño del proteoma puede considerarse como un factor limitante en el crecimiento microbiano ya que las tasas de crecimiento son linealmente proporcionales al contenido celular de los ribosomas [2] [25].

#### **4. Métodos Experimentales**

Para determinar las cepas de *E. coli* más aptas para crecer en medios mínimos se calcularon las velocidades de crecimiento de cada cepa mediante datos obtenidos con cinéticas de crecimiento bacteriano con base en la medición de OD600 (densidad óptica con longitud de onda de 600 nm), la información se relacionó con la cantidad de RNA y proteína total, las cuales se determinaron a partir de espectrofotometría de luz UV visible. También se interpretó la información obtenida respecto a las velocidades de consumo de fuente de carbono mediante el método de colorimétrico DNS.

##### **4.1 Generalidades**

Las cepas de *E. coli* con las que se trabajó se muestran en la tabla 1. Dichas cepas fueron obtenidas en The Coli Genetic Stock Center.

Como se mencionó previamente las cepas silvestres de *E. coli* tienen un total de 7 operones de *rnn* (*rnnA*, *rnnB*, *rnnC*, *rnnD*, *rnnE*, *rnnG* y *rnnH*), la letra griega  $\Delta$  se utiliza para indicar la deleción de genes, por lo que una vez que los operones son eliminados se usa la nomenclatura  $\Delta A - \Delta H$ . Para simplificar lo anterior las cepas mutantes se denominan SQ y

debido a que cuentan con diferentes operones de *rrn* eliminados, a partir de  $\Delta 5$  y  $\Delta 6$ , los genes de tRNA y rRNA se compensaron con plásmidos. La cepa SQ88 únicamente cuenta con el plásmido de tRNA p $\text{tRNA67}$  (p15A ori, SpcR), el cual compensa genes de tRNA mientras que las cepas SQ141 y SQ171 además de tener el plásmido antes mencionado, también cuentan con el plásmido de rRNA pKK3535 (pBR322 ori, AmpR), el cual compensa genes de rRNA eliminados. Por otra parte los plásmidos introducidos generan resistencia a antibióticos en las cepas correspondientes, por lo que para trabajar con la cepa SQ88 se utilizó espectinomicina (50  $\mu\text{g/ml}$ ), y para SQ141 y SQ171 se usó espectinomicina (50  $\mu\text{g/ml}$ ) más ampicilina (100  $\mu\text{g/ml}$ ).

Tabla 1. Se muestran los genotipos de las cepas de *E. coli* probadas [3] [28]. Se utiliza  $\Delta$  para indicar eliminación de operones de *rrn*.

Cepa	Genotipo	Operones de <i>rrn</i> en cromosoma	Operones de <i>rrn</i> agregados con plásmido
MG1655	WT	7 ABCDEGH	-
SQ37	$\Delta\text{rrnE}$	6 ABCDGH	-
SQ40	$\Delta\text{rrnEG}$	5 ABCDH	-
SQ49	$\Delta\text{rrnGBA}$	4 CDEH	-
SQ53	$\Delta\text{rrnGBAD}$	3 CEH	-
SQ78	$\Delta\text{rrnGADE}$	3 BCH	-
SQ88	$\Delta\text{rrnGADEH}$ (p $\text{tRNA67}$ )	2 BC	-
SQ141	$\Delta\text{rrnGADEHB}$ (pKK3535, p $\text{tRNA67}$ )	1C	B
SQ171	$\Delta\text{rrnGADEHBC}$ (pKK3535,p $\text{tRNA67}$ )	0	B

Para cada cepa se utilizó M9 como medio mínimo, el cual es un medio de crecimiento líquido que se usa típicamente para brindar las necesidades nutricionales de bacterias de cepas mutantes que puedan tener requisitos nutricionales específicos ya que está formulado para poder adicionar suplementos como aminoácidos u otros nutrientes. La composición de las sales mínimas de M9 incluye un buffer, fuente de nitrógeno y los iones necesarios para completar el medio [29]. El M9 requiere de una fuente de carbono para el

cultivo microbiano. En este las fuentes de carbono adicionadas por separado al medio de cultivo fueron, glucosa, glicerol y arabinosa. Todas las cepas se probaron con glucosa, solo las cepas MG1655, SQ53 y SQ78 fueron probadas con glicerol y arabinosa debido a que en experimentos anteriores realizados en microplaca, con medio mínimo y diferentes fuentes de carbono se encontró que a diferencia del resto de las cepas mutantes, la SQ53 contó con una velocidad de crecimiento mayor o similar a la cepa silvestre, por su parte también se decidió probar a la cepa SQ78 debido a que al igual que la SQ53 cuenta con cuatro eliminaciones de los operones de *rnn*. Como puntos de control, la cepa MG1655 se cultivó en LB como medio rico, en M9 con galactosa y con glucosa más casaminoácidos.

Las metodologías que se mencionan a continuación se realizaron con cada una de las condiciones y cepas señaladas anteriormente.

Para realizar la cuantificación de RNA, proteína y azúcares reductores se utilizó un lector de placas BioTek Synergy H1 el cual cuenta con un sistema basado en monocromadores, que tiene sondas superiores e inferiores, se utiliza para la absorbancia, la fluorescencia y la luminiscencia. En particular las mediciones de absorbancia se realizan utilizando la óptica del monocromador que junto con la lámpara de xenón permite mediciones de luz UV visible [30].

## **4.2 Cinéticas de crecimiento**

El crecimiento celular bacteriano, requiere de una serie de procesos para duplicar todo el contenido de la célula, este proceso culmina cuando se llega a la etapa de división, en donde una célula se divide para dar paso a dos células hijas, ocurriendo de esta forma un aumento en la masa poblacional. Los tiempos de generación para que este proceso se lleve a cabo varían ampliamente entre los distintos microorganismos, además, dependen del medio de cultivo, así como de las condiciones ambientales [31]. Las cinéticas de crecimiento microbiano son una herramienta clave que permite estudiar la tasa de crecimiento específica de una población de microorganismos en relación a la concentración y tipo de sustrato mediante elementos como la densidad óptica, debido a que la turbidez de un medio de cultivo líquido es proporcional a la cantidad de bacterias cuando estas están presentes en una proporción mayor a  $10^7$  células / mL [32] [33].

Para llevar a cabo las cinéticas de crecimiento se realizaron cultivos en lote. Inicialmente, de cada una de las cepas se tomaron de 10-30  $\mu$ L de células criopreservadas en glicerol a  $-20^{\circ}\text{C}$  en un congelador ThermoScientific (Ferma FFGL2330A), posteriormente, la muestra celular se estrió con una aza bacteriológica en medio LB sólido adicionado con los antibióticos correspondientes, se mantuvieron en una incubadora estática de ThermoScientific (Heratherm) durante la noche a  $37^{\circ}\text{C}$ . Las colonias aisladas se inocularon en matraces con 25 mL de M9 enriquecido con la fuente de carbono a probar y con los antibióticos correspondientes. Dependiendo de la cepa y la fuente de carbono, los preinóculos se mantuvieron en una incubadora agitada NewBrunswick (Excella) 25 a  $37^{\circ}\text{C}$  con agitación a 220 rpm durante 16-21 h.

Los cultivos con los que se llevaron a cabo las cinéticas se obtuvieron midiendo la absorbancia a 600 nm de los preinóculos en crecimiento exponencial en un espectrofotómetro BIO-RAD (SmartSpec 3000), se calculó el volumen necesario para obtener una OD600 inicial de 0.05 unidades y por triplicado se inocularon matraces de 250 mL con un volumen inicial de 70 mL del medio de cultivo correspondiente. Los matraces se incubaron en un baño de agua a  $37^{\circ}\text{C}$ , la aireación se obtuvo mediante agitadores magnéticos.

Finalmente, se monitorearon los cultivos midiendo la OD600 y obteniendo muestras para cuantificar RNA y Proteína total así como los Azúcares Reductores. El tiempo de muestreo y el tiempo total de las cinéticas dependieron de la fuente de carbono y del tiempo de duplicación de cada cepa.

#### **4.3 Cuantificación de RNA total**

La extracción de RNA total se determinó siguiendo la metodología con modificaciones de You *et al.* [34]. La extracción de RNA mediante hidrólisis alcalina requiere de un agente alcalino que pueda ser neutralizado fácilmente una vez terminada la reacción y que facilite la remoción selectiva del RNA. La cuantificación mediante absorción de luz UV, mide la interacción de las moléculas con la radiación electromagnética utilizando la energía de la luz para llevar a los electrones deslocalizados de las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos de un estado base a un estado excitado. Cada una de las bases tiene su propio y único espectro de absorción y a un pH neutro el rango de absorción máximo varía de 253 nm a 271 nm y, por lo que existe absorbancia alta cerca de 260 nm [35].

Las muestras para realizar la cuantificación de RNA total se obtuvieron a partir de las cinéticas de crecimiento. En tubos de microcentrifuga se colectaron 1.8 mL de cultivo para cada condición y en diferentes puntos del crecimiento, este volumen se centrifugó a 0 °C con 14000 rpm durante dos minutos en una cetrífuga refrigerada Eppendorf (5418R), se retiró el sobrenadante y el pellet obtenido se congelo en hielo con etanol, posteriormente fue almacenado a -80°C en un ultracongelador Nuair (NU-99728G) hasta realizar la extracción de RNA.

El pellet se descongelo a temperatura ambiente y se lavó con 0.6 mL de agua destilada, posteriormente se lavó por duplicado con 0.6 mL de HClO<sub>4</sub> 0.1 M. A continuación se digirió con 0.3 mL de KOH 0.3 M durante 60 min a 37° C en una incubadora agitada NewBrunswick (Excella25). El extracto celular se neutralizó con 0.1 ml de HClO<sub>4</sub> 3M y se centrifugo a 13 000 rpm durante 5 minutos en una centrífuga de mesa Eppendorf (5415C). El sobrenadante se colecto en un tubo de microcentrifuga nuevo, y el precipitado se lavó por duplicado con 0.55 mL de HClO 0.5 M, obteniendo un volumen final de 1.5 mL. Para eliminar cualquier contaminante el sobrenadante se centrifugo nuevamente a 13, 000 rpm durante 5 minutos. La concentración de RNA se midió mediante espectrofotometría de UV visible en un lector de placas BioTek Synergy (H1) con un plato para micro volumen Take 3.

#### **4.4 Cuantificación de proteína total**

Para la extracción y cuantificación de proteínas se siguió el método de Biuret con modificaciones. El método consiste en una reacción colorimétrica que se basa en la formación de un complejo formado entre el ion Cu<sup>2+</sup> y los grupos NH de los enlaces peptídicos de las proteínas en un medio alcalino [36].

Las muestras se obtuvieron a partir de las cinéticas de crecimiento. En tubos de microcentrifuga se colectaron 1.8 mL de cultivo para cada condición y en diferentes puntos del crecimiento, este volumen se centrifugó a 0 °C con 14000 rpm en una cetrífuga refrigerada Eppendorf (5418R) durante dos minutos, se retiró el sobrenadante y el pellet obtenido se congelo en hielo con etanol, posteriormente fue almacenado a -80°C en un ultracongelador Nuair (NU-99728G) hasta realizar la cuantificación de proteínas.

Los pellets se descongelaron y se lavaron con 0.6 mL de agua destilada, se centrifugo a 14000 rpm a temperatura ambiente durante 2 minutos en una centrífuga de mesa

Eppendorf (5415C), el sobrenadante fue eliminado y el pellet resuspendió en 100  $\mu$ L de agua destilada, posteriormente se homogeneizó con 50  $\mu$ L de NaOH 6M, las muestras se incubaron a 99°C durante 5 minutos en un thermomixer Eppendorf (Comfort), a continuación se dejaron enfriar en un baño de agua a temperatura ambiente y se agregaron 50  $\mu$ L de CuSO<sub>4</sub> al 3.2%, se resuspendió e incubo durante 5 minutos, al final de este lapso se centrifugaron a 14000 rpm a temperatura ambiente durante 2 minutos.

Se tomaron 150  $\mu$ L del sobrenadante de cada muestra y se colocaron en una placa de 96 pozos, se midió la absorbancia de las muestras en un lector de placas BioTek Synergy (H1) a 555 nm.

Los estándares empleados para determinar la concentración de proteína total se trataron bajo la misma metodología utilizando 100  $\mu$ L de albumina de suero bovino (BSA) con diferentes concentraciones de 0.05 a 20 mg/mL a partir de un stock de 40 mg/mL.

#### **4.5 Cuantificación de azúcares reductores**

El consumo de fuente de carbono se llevó acabo con una variación del método de Azúcares reductores DNS de Miller, 1959. La reacción se lleva a cabo en un medio alcalino en el que el ácido 3,5 dinitrosalicílico es reducido a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, al tiempo que los grupos carbonilos libres del azúcar presente en la muestra son oxidados [37], debido a que la reacción produce un cambio de color de amarillo a naranja, la saturación del color es proporcional a la concentración de azucares reductores presentes en la muestra.

Las muestras se obtuvieron a partir de las cinéticas de crecimiento, el sobrenadante resultante del muestreo para llevar los ensayos de RNA/ proteína se recuperó en tubos de microcentrifuga, se congelaron en etanol con agua y posteriormente se almacenaron -80°C en un ultracongelador Nuair (NU-99728G) hasta el momento del ensayo.

Para llevar a cabo la reacción de azucares reductores, los sobrenadante se descongelaron a temperatura ambiente, posteriormente se homogenizo y se centrifugó a 14 000 rpm durante dos minutos en una centrífuga de mesa Eppendorf (5415C). Se tomaron 25  $\mu$ L del sobrenadante y se agregaron 200  $\mu$ L de reactivo DNS, se calentó a 99° C durante 10 min en un thermomixer Eppendorf (Comfort). Terminado el tiempo de reacción se enfrió en un baño

de agua temperatura ambiente. Se colocaron 150  $\mu$ L de cada reacción en una placa de 96 pozos y se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de placas BioTek Synergy (H1).

Para obtener las concentraciones de la fuente de carbono empleada, la metodología se aplicó sobre un grupo de estándares de glucosa y arabinosa de 0-5 g/L.

La velocidad específica de consumo de sustrato se calculó durante la fase de crecimiento exponencial mediante:

$$q_s = Y_{x/s} * \mu \quad (2)$$

$$Y_{x/s} = (X_2 - X_1) / (S_2 - S_1) \quad (3)$$

En donde:

$Y_{x/s}$  = rendimiento biomasa/sustrato ( $g_{DWC}/g_s^*$ )

$\mu$  = velocidad de crecimiento ( $h^{-1}$ )

#### 4.6 Análisis Estadístico

Las pruebas estadísticas se realizaron en el software Statgraphics Centurion XVII mediante un análisis de varianza mediante la prueba de ANOVA, por lo que se utilizó un estadístico F para determinar las diferencias entre las medias de la cepa silvestre y de las mutantes.

Debido a que existieron diferencias significativas con un valor de  $p < 0.05$ , se aplicó una prueba múltiple de rangos para realizar comparaciones entre los pares de medias entre cada una de las cepas, se usó el método de la diferencia menos significativa (LSD) de Fisher ya que construye un intervalo de confianza para cada par de medias. Con este método se usa el estadístico t con un nivel de confianza del 95% por lo que sólo existe un riesgo del 5% al decir que cada par de medias es estadísticamente diferente [38].

La distribución t es simétrica alrededor de una media cero, por ello hipótesis nula establece que todas las medias de la población son iguales mientras que la hipótesis alternativa establece que al menos una es diferente [39] (Anexo B), es decir:

$$H_0 : \mu_i = \mu_j \text{ contra } H_1 : \mu_i \neq \mu_j$$

---

\* g de biomasa en peso seco / g sustrato

Si la diferencia entre los pares de medias del estadístico obtuvieron valores dentro de la región crítica establecida para cada caso por el límite superior (LS) y el límite inferior (LI), se rechazó  $H_0$  y se determinó que ese par de medias son significativamente diferentes.

## 5. Presentación y discusión de resultados

### 5.1 Velocidades de crecimiento

Con los datos obtenidos mediante las cinéticas se graficaron curvas de crecimiento (Anexo 1A -1C) de las diferentes cepas con las tres fuentes de carbono, a partir de ellas se determinaron las tasas de crecimiento (Figura 5-7). Se encontró que en el medio de cultivo adicionado con glucosa, salvo para la cepa MG1655 contra la SQ37 existen diferencias significativas entre las velocidades de crecimiento de todas las cepas en comparación con la tipo silvestre (Figura 5).

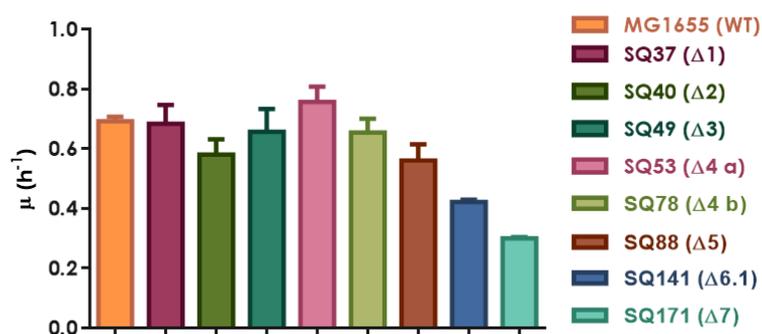


Figura 5. Tasas de crecimiento con glucosa como fuente de carbono. Se observa que la cepa SQ53 tiene una velocidad de crecimiento mayor al resto de las cepas, incluida la tipo silvestre.

En particular, se encontró que la tasa de crecimiento de la cepa MG1655 en glucosa fue de  $0.69 \pm 0.006 h^{-1}$ , dicha velocidad es comparable a lo hallado por LaCroix, *et al.* [40], quien bajo condiciones similares encontró una tasa de crecimiento de  $0.69 \pm 0.02 h^{-1}$ , por otra parte la velocidad de crecimiento reportada por Towbin, *et al.* [41] fue de  $0.64 \pm 0.02 h^{-1}$ , no obstante la fuente de carbono se adicionó a una concentración menor a la empleada en este trabajo.

Cabe destacar las observaciones realizadas entre la cepa MG165 contra la SQ53 y SQ78, entre las cuales además de existir una diferencia significativa entre las velocidades de crecimiento con un nivel de confianza del 95% (prueba múltiple de rangos) (Tabla 2), se

observa un crecimiento similar a la tipo silvestre en el caso de la cepa SQ78, por otra parte la velocidad de crecimiento de la SQ53 a es incluso mayor a la cepa MG1655. Lo anterior, se aprecia además en la magnitud de cambio de las cepas mutantes respecto a la cepa silvestre (Tabla 2)

Tabla 2 Tasas de crecimiento y Magnitud de cambio en medio M9 adicionado con glucosa como fuente de carbono.

Cepa/ Comparación	Velocidad de Crecimiento (h <sup>-1</sup> )	Magnitud de cambio (%)	Diferencia Limites= +/- 0.3
MG1655 (WT)	0.69 ± 0.01	100±0	-
SQ37 (Δ1) - WT	0.68 ±0.02	98.9±0.04	0.01
SQ40 (Δ2) - WT	0.58±0.02	83.9±0.04	0.11*
SQ49 (Δ3) - WT	0.66±0.03	94.9±0.05	0.03*
SQ53 (Δ4 a) - WT	-	-	-0.06*
SQ53 (Δ4 a) - SQ78	0.76± 0.02	109.3±0.03	0.10*
SQ53 (Δ4 a)- SQ88	-	-	0.20*
SQ78 (Δ4 b) - WT	0.65 ±0.02	94.5±0.03	0.04*
SQ88 (Δ5) - WT	0.56±0.02	81.1±0.03	0.13*
SQ141 (Δ6.1) - WT	0.42±0.003	61±0.01	0.27*
SQ171 (Δ7) - WT	0.30±0.001	43.4±0.002	0.39*

\* Indica una diferencia estadísticamente significativa. LI: -0.03/ LS: +0.03

En los medios de cultivo adicionados con glicerol y arabinosa como fuente de carbono únicamente se probaron las cepas MG1655, SQ53 Y SQ78. En el medio con glicerol, se observó que la cepa SQ53 sigue manteniendo una velocidad de crecimiento mayor que la tipo silvestre, al igual que en glucosa como fuente de carbono, no obstante la cepa SQ78 mostró una velocidad de crecimiento menor (Figura 6). De igual manera, existe una diferencia significativa entre las velocidades de crecimiento con un nivel de confianza del 95% (prueba múltiple de rangos) (Tabla 3).

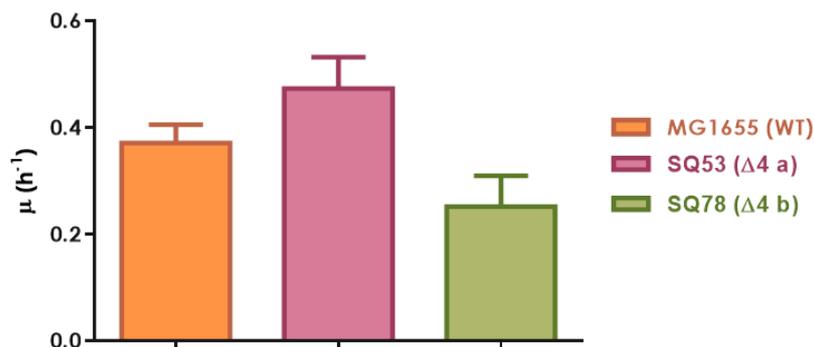


Figura 6. Tasas de crecimiento con glicerol como fuente de carbono. Se observa que la cepa SQ53 sigue manteniendo una velocidad de crecimiento respecto a la cepa silvestre.

Se encontró que, con glicerol, la velocidad de crecimiento de la cepa MG1655 fue de  $0.37 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$  (Tabla 3), esta velocidad es similar a la reportada por Towbin, *et al.* [41] quienes en condiciones experimentales diferentes encontraron una velocidad de crecimiento de  $0.38 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$ . Por otra parte, Trinh, *et al.* [42], encontraron una velocidad de crecimiento de  $0.27 \pm 0.06 \text{ h}^{-1}$ , sin embargo la cepa contenía el plásmido pLOI297 relacionado con la producción de proteínas exógenas, lo que pudo afectar el crecimiento de la cepa.

Tabla 3. Tasas de crecimiento y Magnitud de cambio en medio M9 adicionado con glicerol como fuente de carbono.

Cepa/ Comparación	Velocidad de Crecimiento ( $h^{-1}$ )	Magnitud de cambio (%)	Diferencia Limites= +/- 0.04
MG1655 (WT)	$0.37 \pm 0.01$	$100 \pm 0$	-
SQ53 ( $\Delta 4$ a) – WT	$0.47 \pm 0.02$	$127.5 \pm 0.02$	-0.05*
SQ53 ( $\Delta 4$ a) – SQ78	-	-	0.17*
SQ78 ( $\Delta 4$ b) - WT	$0.25 \pm 0.02$	$68.1 \pm 0.09$	0.12*

\* Indica una diferencia estadísticamente significativa. LI: -0.04/ LS: +0.04

Finalmente la tasa de crecimiento de las cepas SQ53 y SQ78 en arabinosa como fuente de carbono fueron superiores a los de la cepa MG1655 (Figura 6) existiendo una diferencia significativa entre las velocidades de crecimiento con un nivel de confianza del 95% (prueba múltiple de rangos) respecto a la cepa silvestre, no obstante no se encontraron

diferencias significativas entre las velocidades de crecimiento de las cepas SQ53 y SQ78 con un nivel de confianza del 95% (prueba múltiple de rangos) (Tabla 4). Además, la magnitud de cambio de las cepas SQ53 y SQ78 fue de  $122.5 \pm 0.06$  y  $119.2 \pm 0.03$  respectivamente (Tabla 4).

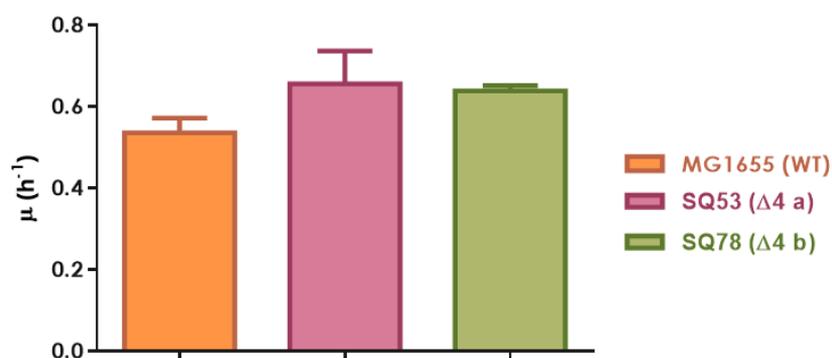


Figura 6. Tasas de crecimiento con arabinosa como fuente de carbono. Se observa que la cepa SQ53 mantiene una velocidad de crecimiento mayor al resto de las cepas, por su parte la cepa SQ78 también muestra una velocidad de crecimiento a la tipo silvestre.

La tasa de crecimiento de la cepa MG1655 con arabinosa en el medio fue de  $0.54 \pm 0.01$ , por su parte, Towbin, et al. [41] con el medio de cultivo con condiciones saturantes de nitrógeno y con cinéticas de crecimiento realizadas en placa reportaron una velocidad de crecimiento de  $0.50 \pm 0.06$  h<sup>-1</sup>.

Tabla 4 Significancia Estadística, Tasas de crecimiento y Magnitud de cambio en medio M9 adicionado con arabinosa como fuente de carbono.

Cepa/ Comparación	Velocidad de Crecimiento (h <sup>-1</sup> )	Magnitud de cambio (%)	Diferencia Limites= +/- 0.4
MG1655 (WT)	$0.54 \pm 0.01$	$100 \pm 0$	-
SQ53 (Δ4 a) - WT	$0.66 \pm 0.03$	$122.5 \pm 0.06$	-0.12*
SQ53 (Δ4 a) - SQ78	-	-	0.02
SQ78 (Δ4 b) - WT	$0.64 \pm 0.01$	$119.2 \pm 0.03$	-0.10*

\* Indica una diferencia estadísticamente significativa. LI: -0.04/ LS: +0.04

En general se observó que en las tres fuentes de carbono probadas la velocidad de crecimiento de la cepa SQ53 fue superior que la de la cepa silvestre ya que presentó una tasa de crecimiento mayor, aún con la eliminación de cuatro los operones que codifican para *rrnGBAD*. Por su parte la cepa SQ78, la cual también cuenta con cuatro eliminaciones de operones que codifican para *rrnGADE*, mostró un comportamiento errático ya que su velocidad de crecimiento respecto a la cepa MG1655 fue mayor en arabinosa y en glucosa como fuente de carbono la velocidad de crecimiento fue cercana, no obstante, en glicerol la tasa de duplicación estuvo por debajo de los valores mostrados por la cepa silvestre. En ninguno de los casos la cepa SQ78 logró superar a la cepa SQ53.

Comúnmente se asume que todos los operones *rrn* son esencialmente equivalentes, a pesar de que su estructura general no es idéntica [20], con base en el enunciado anterior y en las diferencias de velocidades obtenidas entre las cepas mutantes es posible que la función de los RNA producidos por cada operón sean diferentes.

Además, se menciona que la tasa de crecimiento se determina por la velocidad a la que los nutrientes pueden convertirse en proteínas, la tasa de crecimiento es máxima si la tasa de suministro como el consumo son máximas [25] por lo que se asume, que en este caso la cepa SQ53 tiene una tasa de suministro de nutrientes mayor.

Los ensayos realizados confirman que en medio mínimo cepas con menor número de operones de *rrn* son capaces de crecer a una velocidad mayor a la cepa silvestre, siendo así más hábiles en el uso de recursos, está es una característica útil en laboratorio, cuando las condiciones de cultivo son controladas, no obstante en la naturaleza el microorganismo puede sufrir modificaciones drásticas en el suministro de nutrientes, por lo que deberían adaptarse rápidamente al cambio, Gyorfy, *et al.* [6] observaron que las cepas con inserciones o eliminación de los operones de *rrn* no se adaptan rápidamente a esta situación mostrando una limitación con los cambios de ambiente, solamente las cepas con siete operones, es decir la tipo silvestre pudo adaptarse rápidamente a esta situación por lo que se puede decir que esta clase de cepas son mucho más aptas en un entorno natural.

Por otra parte se ha sugerido que la variación en las tasas de crecimiento en cepas con eliminaciones no se debe únicamente al contenido total de ribosomas, Asai, *et al.* [3] propusieron que además de la concentración de ribosomas, la eficiencia de estos también es limitante del crecimiento por lo que las tasas de crecimiento mayores en las cepas mutantes en parte se pueden atribuir un aumento de la eficiencia de ribosomal, la cual está determinada por la fracción de ribosomas activos. En *E. coli*, la fracción de ribosomas

activos es de ~80% y se mantiene constante en diferentes de tasas de crecimiento, sin embargo, este valor puede no aplicarse a las cepas con eliminaciones de *rrn*, por lo que la velocidad de crecimiento reducida o aumentada que se observa en las cepas mutantes puede deberse a una disminución o aumento de la fracción de ribosomas activos [3].

## 5.2 Tasa específica de consumo de sustrato ( $q_s$ )

La glucosa es la fuente de carbono preferida para *E. coli*, ya que permite un crecimiento más rápido en comparación con otros azúcares, no obstante, impide el uso de otras fuentes de carbono, este fenómeno se denomina represión catabólica por carbono (CCR), se cree que el uso preferencial de glucosa es importante en ambientes naturales para permitir que las bacterias maximicen su tasa de crecimiento [43].

Se esperaba que el consumo de fuentes de carbono preferenciales y no preferenciales fuera mayor para la cepa MG1655, por lo que se cuantificó la tasa de consumo de sustrato para las cinéticas de crecimiento cuya fuente de carbono fueron azúcares reductores. Se encontró que tanto las cepas mutantes con eliminaciones *rrnGBAD* y *rrnGADE* como la silvestre consumieron gradualmente la glucosa durante la cinética de crecimiento en tiempos aparentemente similares (Figura 7).

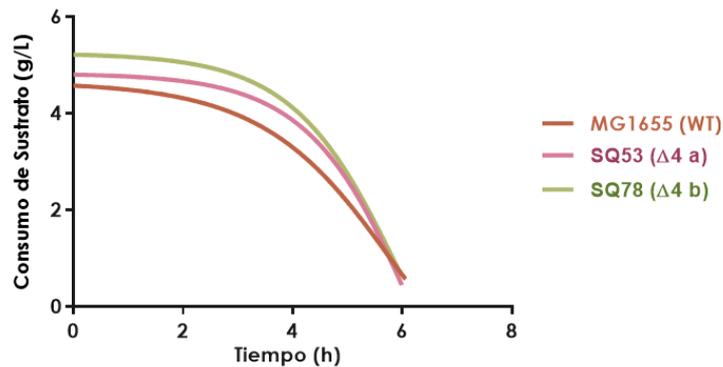


Figura 7. Consumo de glucosa de la cepa MG1655, SQ53 y SQ78.

No obstante, se observa que para la glucosa como fuente de carbono, la cepa silvestre tuvo la tasa específica de consumo más alta con un valor de  $4.42 \pm 0.09 \text{ g/g}_{\text{DWC}}/\text{h}$  respecto

a las cepas mutantes (Tabla 5). A continuación la cepa con mayor  $q_s$  fue la SQ88, la cual únicamente contiene los operones *rrnBC*, además del plásmido de tRNA *ptRNA67* obteniendo una magnitud de cambio del 88.4% respecto a la velocidad de consumo observada por la cepa MG1655, por su parte las cepas SQ53 y SQ78 obtuvieron alrededor del 50% a pesar de contar con un menor número de eliminaciones de operones de *rrn*. El *rrnC* no se encuentra en las cepas SQ53 y SQ88, por lo que se podría pensar que este operón tiene una contribución importante respecto al consumo de glucosa, sin embargo como se ha mencionado aún no se sabe el aporte real de cada uno de los operones de *rrn*.

Por otra parte, con arabinosa como fuente de carbono, gráficamente se observa que las cepas mutantes consumieron el sustrato en un tiempo menor que la cepa silvestre, siendo la SQ53 la que presenta la tasa más alta en términos de consumo de fuente de carbono (Figura 8).

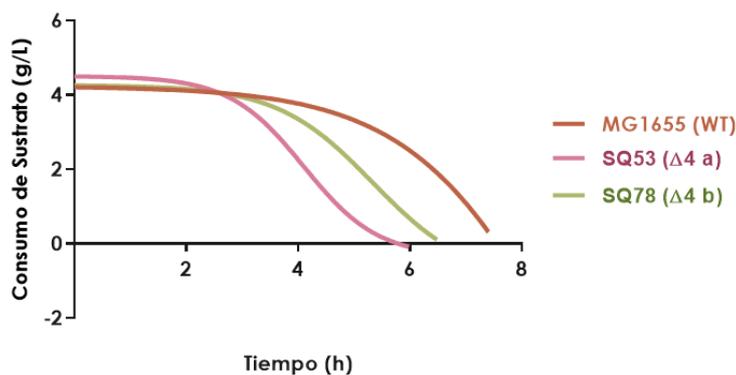


Figura 8. Consumo de arabinosa de la cepa silvestre, SQ53 y SQ78.

Se encontró que respecto a las magnitudes de cambio se presentó un aumento en la velocidad de consumo de más del 171% para la cepa SQ78, mientras que para la cepa SQ53 hubo un incremento en la velocidad de consumo del sustrato del 428.4% (Tabla 5) en comparación a la cepa silvestre con arabinosa en el medio.

Tabla 5 Tasas específica de consumo de sustrato para glucosa y arabinosa como fuentes de carbono.

Fuente de Carbono	Cepa	qs (g/g <sub>DWC</sub> /h)	Magnitud de cambio (%)
	MG1655 (WT)	4.42 ± 0.09	100 ± 0.00
	SQ37 (Δ1)	2.17 ± 0.91	49 ± 0.21
	SQ40 (Δ2)	1.69 ± 0.13	38.2 ± 0.03
	SQ49 (Δ3)	2.57 ± 0.11	58.1 ± 0.03
	SQ53 (Δ4 a)	2.21 ± 0.07	50.1 ± 0.02
	SQ78 (Δ4 b)	2.28 ± 0.12	51.7 ± 0.03
	SQ88 (Δ5)	3.91 ± 0.07	88.4 ± 0.01
	SQ141 (Δ6.1)	1.69 ± 0.06	38.2 ± 0.02
	SQ171 (Δ7)	0.99 ± 0.07	22.6 ± 0.01
Arabinosa	MG1655 (WT)	2.17 ± 0.04	100 ± 0.00
	SQ53 (Δ4 a)	9.28 ± 0.10	428.4 ± 0.07
	SQ78 (Δ4 b)	3.71 ± 0.08	171.3 ± 0.03

La diferencia indicada es aún mayor a la hallada entre las cepas mutantes y la silvestre con glucosa como fuente de carbono. Por lo que para la velocidad de consumo con esta fuente de carbono se presentaron diferencias en las que las cepas mutantes superaron significativamente a la cepa MG1655. Este aumento en el consumo de arabinosa por parte de las cepas con eliminación de operones de *rrn* puede indicar que bajo ciertas fuentes de carbono no preferenciales, como la arabinosa, la eliminación de operones ribosomales llega a aumentar drásticamente la tasa de consumo de sustrato, estos efectos no se observaron en el uso de glucosa que si es una fuente de carbono preferencial. Es posible que los operones en las cepas SQ53 (*rrnCEH*) y SQ78 (*rrnBEH*), en particular los *rrnEH* hagan que las cepas sean más aptas para el consumo de arabinosa como una forma de compensación celular por los genes eliminados.

### 5.3 Relación RNA/Proteína

La relación RNA/Proteína puede tomarse como una buena aproximación de la cantidad de ribosomas en la célula bacteriana en crecimiento exponencial, debido a que el 86% de RNA total es rRNA [8].

Los datos obtenidos al cuantificar el RNA y la proteína total de cada muestra se normalizaron respecto a la OD de cada cultivo en el tiempo correspondiente. Como parámetro para estandarizar las muestras, estas se tomaron en un momento en el que los

cultivos se encontraban en una fase de crecimiento exponencial temprana es decir, alrededor de 0.4 unidades de OD según los datos experimentales.

El RNA para la cepa silvestre en diferentes ambientes presenta una tendencia lineal directa en relación a la velocidad de crecimiento. Particularmente en glucosa como fuente de carbono se encontró que no existen diferencias estadísticamente significativas entre la cantidad del RNA/OD de las cepas SQ141 y SQ171 en comparación a la cepa MG1655 un nivel de confianza del 95% (prueba múltiple de rangos) (Figura 9), no obstante, la cepa silvestre cuenta con una velocidad de crecimiento mayor, se observa, además que esta cepa cuenta con la menor cantidad de RNA ( $81 \pm 1.995 \mu\text{g}/\text{OD}600$ ). A excepción de las cepas antes mencionadas, el resto de las cepas mutantes cuentan con una cantidad mayor de RNA en comparación a la MG1655 con un nivel de confianza del 95% (prueba múltiple de rangos), cabe destacar que las cepas SQ78 y SQ88 contienen la mayor cantidad de RNA/OD, a pesar de ello la cepa SQ53 fue la más rápida en términos de crecimiento en este medio de cultivo.

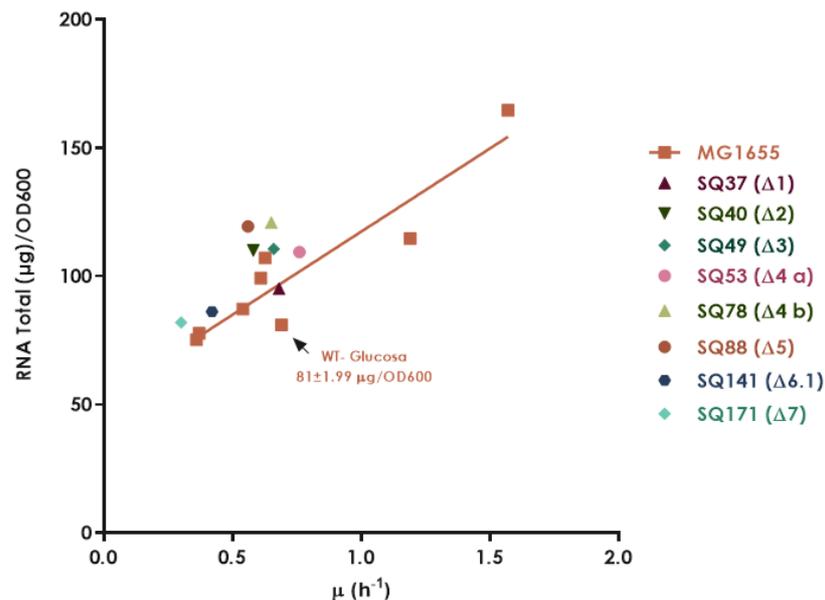


Figura 9. Relación RNA Total/OD600 de las cepas MG1655 y mutantes. Se observa la línea de tendencia formada por la cepa silvestre en diferentes ambientes, la flecha marca la cepa MG1655 en medio enriquecido con glucosa, las mutantes también se cultivaron con glucosa.

Se encontró además que tanto la cepa silvestre como las mutantes con glicerol como fuente de carbono (Figura10) no contaron con concentraciones similares de RNA estadísticamente significativas entre ellas con un nivel de confianza del 95% (prueba

múltiple de rangos), además se observa que nuevamente la cepa silvestre cuenta con la menor cantidad de RNA ( $77.66 \pm 1.80 \mu\text{g}/\text{OD}600$ ) en comparación a las cepas mutantes, en este caso la cepa SQ53 tiene mayor cantidad de RNA ( $89.86 \pm 1.17 \mu\text{g}/\text{OD}600$ ).

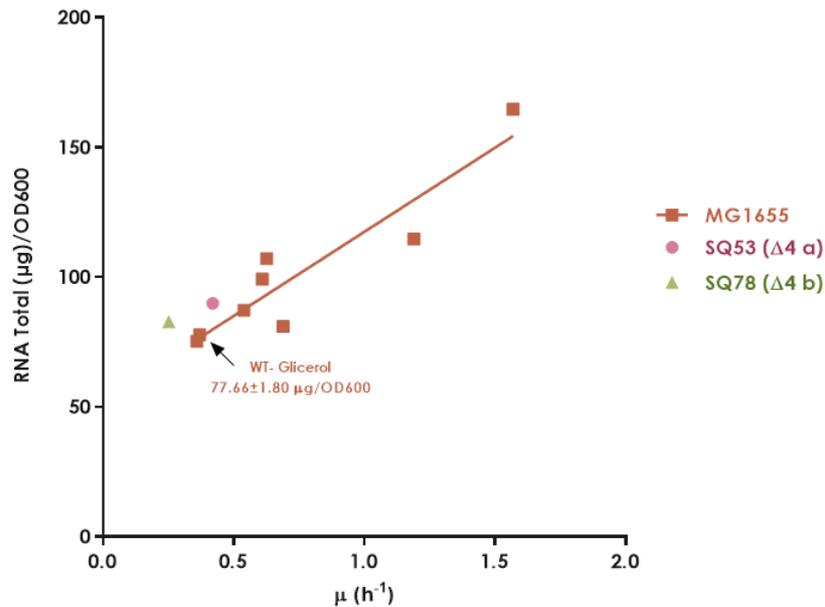


Figura 10. Relación RNA Total/OD600 de las cepas MG1655, SQ53 y SQ78. Se observa la línea de tendencia formada por la cepa silvestre en diferentes ambientes, la flecha marca la cepa MG1655 en medio enriquecido con glicerol, las mutantes también se cultivaron con esta fuente de carbono.

Por otra parte, con arabinosa como fuente de carbono, las concentraciones de RNA tampoco fueron similares entre cepas con un nivel de confianza del 95% (prueba múltiple de rangos), con esta fuente de carbono la cepa con mayor cantidad de RNA fue la SQ78 ( $100.38 \pm 0.95 \mu\text{g}/\text{OD}600$ ), mientras que la SQ53 fue la que contó con una menor cantidad de RNA ( $78.81 \pm 2.92 \mu\text{g}/\text{OD}600$ ), a pesar de las diferencias entre las concentraciones de RNA entre las cepas mutantes, en términos de crecimiento ambas fueron más rápidas que la cepa silvestre (Figura 11).

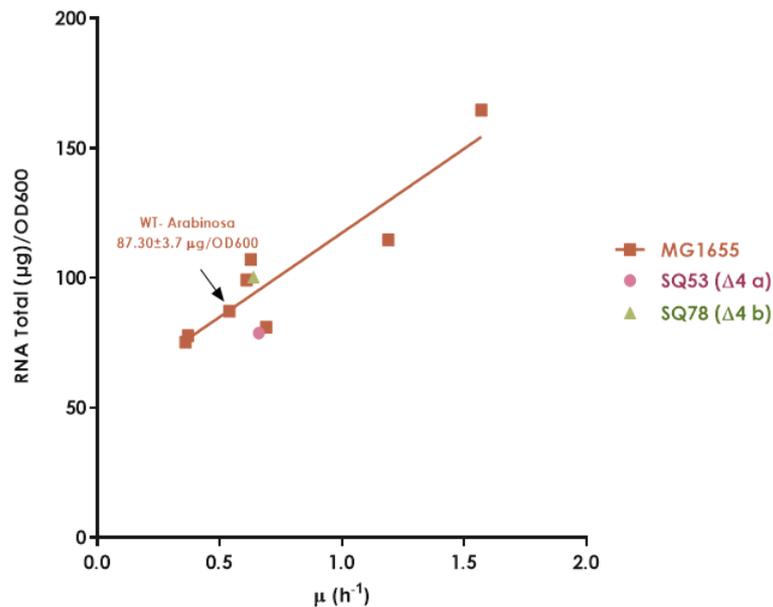


Figura 11. Relación RNA Total/OD600 de las cepas MG1655, SQ53 y SQ78. Se observa la línea de tendencia formada por la cepa silvestre en diferentes ambientes, la flecha marca la cepa MG1655 en medio enriquecido con arabinosa, las mutantes también se cultivaron con esta fuente de carbono

Finalmente, se observó que entre todas las cepas y con todas las condiciones probadas, la SQ78 en glucosa fue la que contó con la mayor cantidad de RNA/OD con un valor de  $120.92 \pm 0.097 \mu g/OD600$ , es decir que la fracción de proteínas ribosomales (R) aumento para esta mutante mientras que las cepas SQ53 en arabinosa y MG1655 en glicerol la fracción R fue la más baja ya que presentaron la menor cantidad de RNA. Se observa además que el RNA de las cepas mutantes con glicerol y arabinosa en el medio siguen la tendencia lineal directa respecto a la velocidad de crecimiento.

Como se ha mencionado, en cultivos por lotes la tasa de crecimiento depende de la composición del medio, a su vez la composición macromolecular se relaciona con la tasa de crecimiento por lo que al variar la calidad de los nutrientes el tiempo de duplicación puede variar ampliamente. En este caso la fracción de proteína ribosomal aumenta linealmente con la tasa de crecimiento [8].

En general estos resultados no cumplen con la condición de que a mayor contenido de RNA mayor será la velocidad de crecimiento, lo cual puede deberse a los diferentes medios de cultivo empleados en relación a las cepas mutantes, o bien a una expresión de proteínas innecesarias, ya que se ha demostrado que la expresión de esta clase de proteínas

disminuye efectivamente la fracción asignable a los sectores metabólicos y de proteínas asociadas a ribosomas causando a su vez una disminución en la tasa de crecimiento [2].

Respecto a la cuantificación de proteína total se encontró que de las cepas con glucosa como fuente de carbono obtuvieron valores entre  $226.94 \pm 1.81 \mu\text{g}/\text{OD}600$  y  $304.51 \pm 3.65 \mu\text{g}/\text{OD}600$  de proteína, dichos valores corresponden a las cepas SQ53 y SQ141 respectivamente, se destaca que a pesar de que la cepa SQ53 cuenta con la menor cantidad de proteína en comparación al resto de las cepas, es la que cuenta con una mayor velocidad de crecimiento. Dicho comportamiento concuerda con estudios anteriores, los cuales han reportado que a una mayor cantidad de proteína la velocidad de crecimiento disminuye [44].

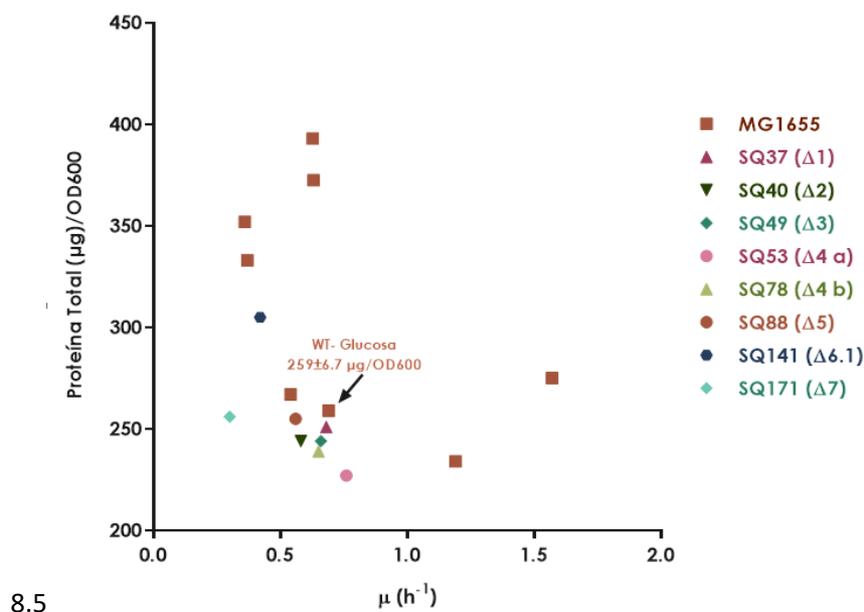


Figura 12. Proteína Total/OD de las cepas MG1655 y mutantes. No se encontró una línea de los datos de proteína total de la cepa silvestre en diferentes ambientes, la flecha marca la cepa MG1655 en medio enriquecido con glucosa, las mutantes también se cultivaron con glucosa.

La cantidad de proteína total de las cepas con glucosa (Figura 12), salvo para la SQ141, no existen diferencias estadísticamente significativas entre las cepas mutantes y la MG1655 con un nivel de confianza del 95% (prueba múltiple de rangos).

En glicerol como fuente de carbono se observa la mayor cantidad de proteína respecto a las demás condiciones. Particularmente la cepa SQ78 muestra la mayor cantidad de

proteína con un valor de  $380.87 \pm 4.35 \mu\text{g}/\text{OD}600$ , mientras que la cepa silvestre cuenta con la menor cantidad de proteína con un valor de  $333.35 \pm 3.47 \mu\text{g}/\text{OD}600$  (Figura 13). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las cepas mutantes y la cepa silvestre con un nivel de confianza del 95% (prueba múltiple de rangos).

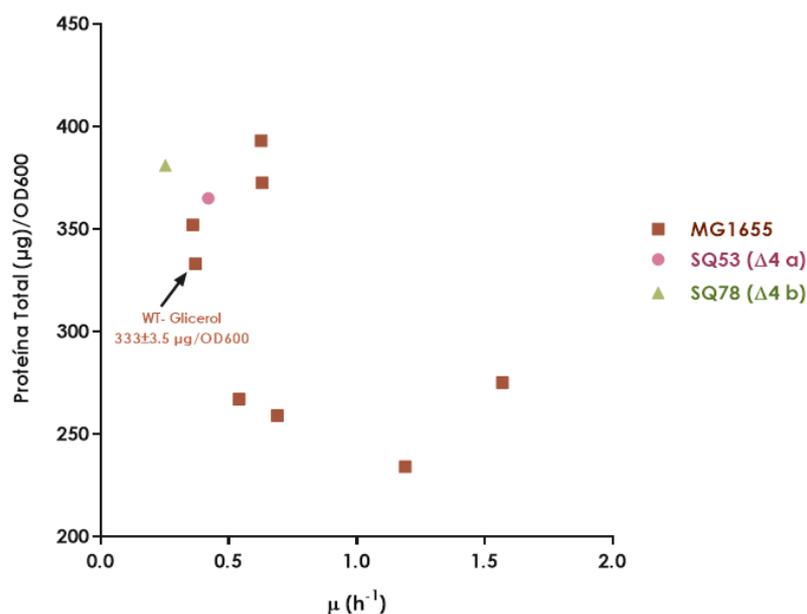


Figura 13. Relación Proteína Total/OD600 de las cepas MG1655, SQ53 y SQ78. No se encontró una tendencia lineal de los datos de proteína de la cepa silvestre en diferentes ambientes, la flecha marca la cepa MG1655 en medio enriquecido con glicerol, las mutantes también se cultivaron con esta fuente de carbono

Además se encontró que los valores de proteína entre los cultivos con glucosa y arabinosa son similares, para el caso de las cepas cultivadas con arabinosa como fuente de carbono se observó que la MG1655 es la que cuenta con mayor cantidad de proteína con  $267.29 \pm 19.24 \mu\text{g}/\text{OD}600$ , mientras que la cepa SQ53 es la que cuenta con una menor cantidad, con un valor de  $234.14 \pm 1.92 \mu\text{g}/\text{OD}600$  (Figura 14), estos valores indican una diferencia estadísticamente significativa con un nivel de confianza del 95% (prueba múltiple de rangos), no obstante no se encontró diferencias entre la cepa SQ78 y la tipo silvestre.

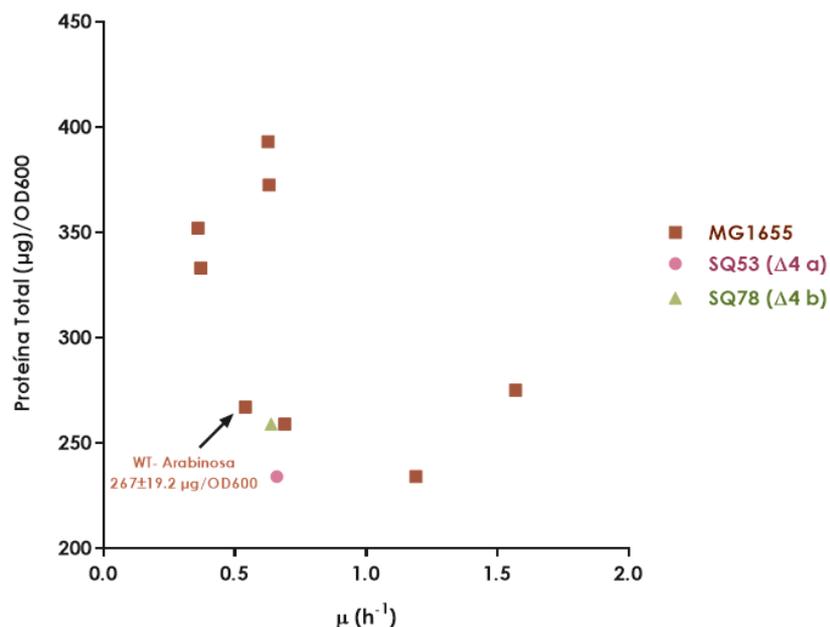


Figura 14. Relación Proteína Total/OD600 de las cepas MG1655, SQ53 y SQ78. No se encontró una tendencia lineal por parte de los valores de proteína de la cepa silvestre en diferentes ambientes, la flecha marca la cepa MG1655 en medio enriquecido con arabinosa, las mutantes también se cultivaron con esta fuente de carbono

Finalmente, se observó que la cepa con mayor cantidad de proteína fue la SQ78 con glicerol como fuente de carbono, mientras que la cepa SQ53 con glucosa como fuente de carbono presentó una menor cantidad de proteína, se destaca que esta misma cepa, bajo las condiciones mencionadas cuenta con la mayor velocidad de crecimiento en comparación al resto de condiciones, mientras que la cepa SQ78 con glicerol como fuente de carbono mostró la menor velocidad de crecimiento entre todas las cepas en las diferentes condiciones (Figura 13).

En un estudio Schmidt, *et al.* [44] probaron tres cepas silvestres de *E. coli* bajo diferentes condiciones de cultivo y establecieron los cambios en la cantidad de proteína total por cepa encontrando que en cultivos dependientes de la tasa de crecimiento a mayor velocidad de crecimiento mayor será la proporción de las proteínas asociadas a ribosomas, por el contrario, a una menor velocidad de crecimiento el sector R se reduciría dándole mayor proporción al sector metabólico, esta tendencia para el sector P es consistente con lo observado en las cepas mutantes. Este comportamiento se debe a que cuando las células bacterianas no cuentan con los aminoácidos necesarios en el medio de cultivo deben fabricar la maquinaria enzimática para la síntesis de estos para finalmente sintetizar proteínas, disminuyendo así la velocidad de crecimiento, por el contrario, si la célula

encuentra suficientes aminoácidos en el medio la fracción de proteína ribosomal aumentaría para solventar la demanda de síntesis de proteínas. Se puede decir entonces que la eficiencia de la traducción tiene una dependencia de aminoácidos [25].

En cuanto a la relación RNA/Proteína esta se determinó a partir de los datos mencionados anteriormente encontrando que las cepas que fueron cultivadas con glucosa y que cuentan con una relación menor son la SQ141, SQ171 y MG1655 con valores de  $0.28 \pm 0.003$ ,  $0.32 \pm 0.01$  y  $0.313 \pm 0.005$  unidades respectivamente, sin embargo no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre estos datos con un nivel de confianza del 95% (prueba múltiple de rangos).

De igual forma se encontró que la relación RNA/Proteína de la cepa silvestre en diferentes ambientes muestra una relación lineal directa respecto a la velocidad de crecimiento, las cepas mutantes con glucosa no presentan la misma tendencia (Figura 15).

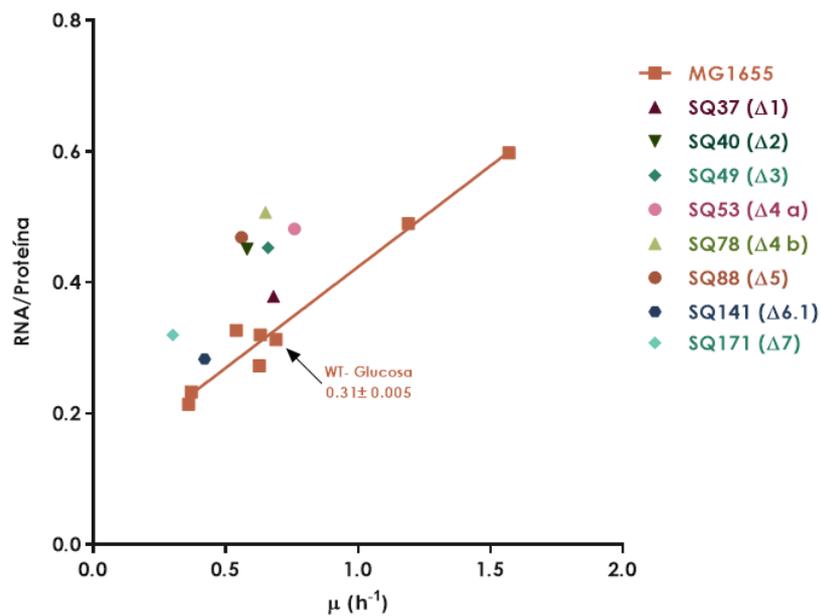


Figura 15. Relación RNA/Proteína de las cepas MG1655 y mutantes. Se observa la línea de tendencia formada la relación RNA/Proteína de la cepa silvestre en diferentes ambientes, la flecha marca la cepa MG1655 en medio enriquecido con glucosa, las mutantes también se cultivaron con esta fuente de carbono.

Por su parte, las cepas que cuentan con una relación RNA/Proteína mayor fueron la SQ53 con un valor de  $0.48 \pm 0.02$  unidades y la cepa SQ78 con un valor de  $0.51 \pm 0.004$ . De igual

forma no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre ellas y entre las cepas SQ40, SQ49 y SQ78.

También se encontró que la relación de RNA/Proteína fue menor en las cepas cultivadas con glicerol como fuente de carbono (Figura 16) con valores entre  $0.22 \pm 0.01$  y  $0.25 \pm 0.01$  unidades. Además se observa que las cepas mutantes siguen una relación lineal directa respecto a la velocidad de crecimiento, la línea de tendencia, se graficó a partir de los valores de RNA/Proteína de la cepa silvestre cultivada en diferentes ambientes. Por otra parte, se encontraron diferencias significativas entre las cepas probadas con esta fuente de carbono con un nivel de confianza del 95% (prueba múltiple de rangos).

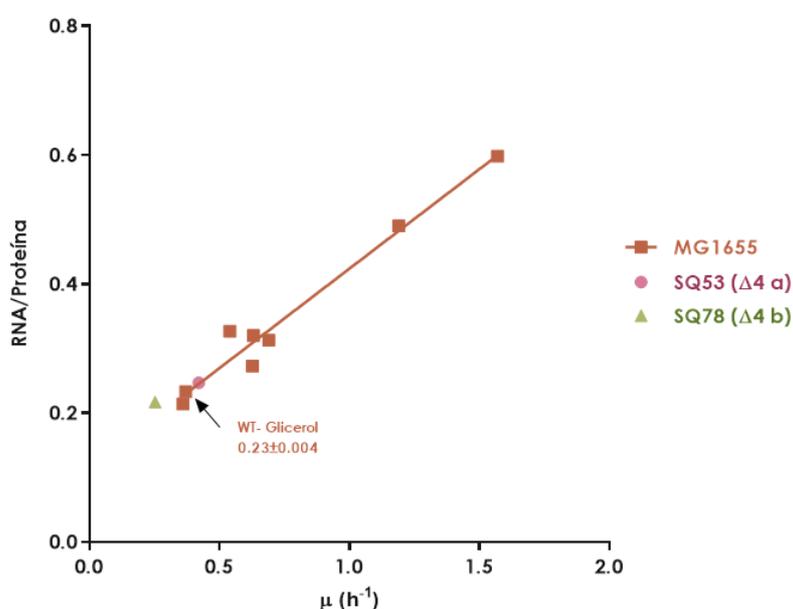


Figura 16. Relación RNA/Proteína de las cepas MG1655, SQ53 y SQ78. Se observa la línea de tendencia graficada a partir de los valores correspondientes de la cepa silvestre en diferentes ambientes, la flecha marca la cepa MG1655 en medio enriquecido con glicerol, las mutantes también se cultivaron con esta fuente de carbono.

Se observó además que la relación de RNA/Proteína en las cepas cultivadas con arabinosa como fuente de carbono (Figura 17) tuvo valores entre  $0.33 \pm 0.03$  y  $0.39 \pm 0.01$ . No se encontraron diferencias significativas entre la cepa MG1655 y la SQ53, no obstante se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la relación RNA/Proteína de la cepa SQ78 y las cepas antes mencionadas con un nivel de confianza del 95% (prueba múltiple de rangos). Además se observa que la relación es similar con la cepa MG1655 cultivada en glucosa. Finalmente se encontró que entre fuentes de carbono los valores de

RNA/Proteína de las cepas mutantes cultivadas con glucosa como fuente de carbono fueron los más altos.

Como se mencionó anteriormente, los valores obtenidos de la relación RNA/Proteína se mantuvieron prácticamente constantes, excepto para las cepas cultivadas con glicerol como fuente de carbono y para la SQ78 en arabinosa. Dicho comportamiento también fue reportado por Gyorfy, *et al.* [6] quienes trabajaron con cepas de *E. coli* MG1655 y MDS42 con inserciones y eliminación de operones de *rnn*. Se mencionó además, que los valores constantes en la relación RNA/Proteína se mantienen como secuencia de la homeostasis celular ya que la inactivación de los operones de *rnn* conduce a una mayor expresión de las copias intactas restantes, lo cual también fue mencionado por Asai, *et al.* [3] ya que en base a datos experimentales demostraron que cuando el número de eliminaciones de operones de *rnn* aumenta en cepas de *E. coli* se produce un aumento en la cantidad de tRNA contribuyendo al mantenimiento de un nivel relativamente constante de RNA total en las células.

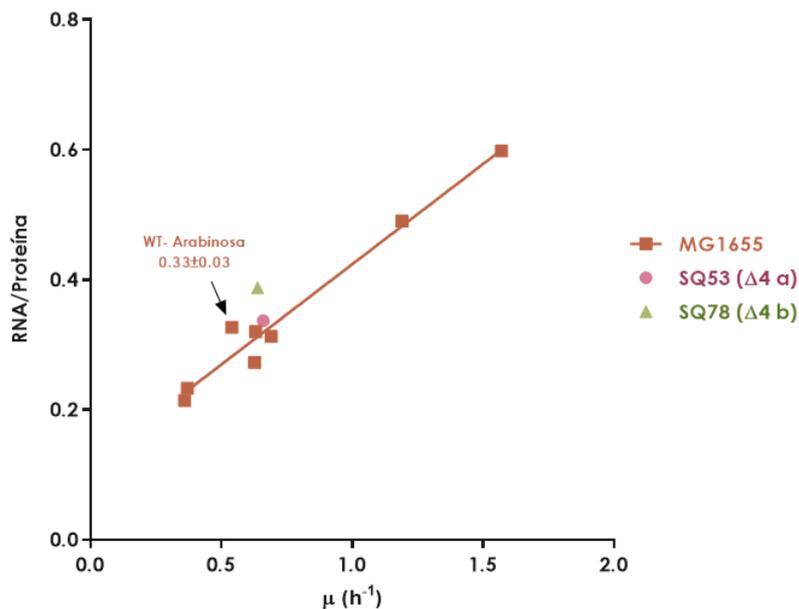


Figura 17. Relación RNA/Proteína de las cepas MG1655, SQ53 y SQ78. Se observa la línea de tendencia de la cepa silvestre en diferentes ambientes, la flecha marca la cepa MG1655 en medio enriquecido con arabinosa como fuente de carbono, las mutantes también se cultivaron en esta condición.

Gráficamente se observa que con el aumento de la tasa de crecimiento la relación RNA/Proteína también aumenta para las cepas SQ53 y SQ78, Dennis & Bremer [4] mencionaron

que este comportamiento indica una proporcionalidad, ya que el aumento de RNA refleja una acumulación de ribosomas debido a que se requiere una mayor cantidad de estos para apoyar una tasa de síntesis de proteínas alta. Además se ha reportado que esta relación depende del medio de cultivo, por lo que entre más disponibilidad de nutrientes tenga, mayor será la relación RNA/Proteína [8].

También se encontró que en conjunto los datos obtenidos de la relación RNA/Proteína por la cepa silvestre en los diferentes ambientes muestran una relación lineal directa respecto a la tasa de crecimiento, lo anterior fue mencionado por Dennis & Bremer, [4], como una ley de crecimiento bacteriano en la cual la relación RNA/Proteína depende linealmente de la tasa de crecimiento. Esta tendencia también fue reportada por Scott, *et al.* [2] quienes trabajaron con cepas de *E. coli* NCM3722. No obstante el grupo de trabajo también reportó la misma tendencia para cepas mutantes con traducción lenta, dicho comportamiento no se observó claramente con las cepas mutantes probadas con glucosa, sin embargo las cepas con glicerol y arabinosa si se apegaron a la tendencia lineal directa.

Cabe señalar que la pendiente hallada es mayor que la reportada, sin embargo, la cepa y las condiciones de experimentales fueron diferentes, ya que las concentraciones de la fuente de carbono y nitrógeno del grupo de trabajo mencionado fueron de 0.2 % y 10 mM respectivamente, mientras que para este trabajo se utilizó 0.4% de fuente de carbono y 19 mM de la fuente de nitrógeno. Lo anterior también puede atribuirse a una cuantificación incompleta de RNA y de proteínas.

Por otra parte Dai, *et al.* [8] reportaron datos de RNA/Proteína en los cuales también se observa una tendencia lineal directa, no obstante cuando sometieron a las cepas a dosis de diferentes antibióticos como medio para inhibir la traducción, la relación lineal no se mantuvo, en cambio se observó una curva ascendente.

Las proporciones de RNA y proteína se compararon con los datos obtenidos por Scott, *et al.* [2] y pese a que en la relación RNA/Proteína de las cepas silvestres con glucosa como fuente de carbono no hubo diferencias significativas entre lo reportado en la literatura y lo encontrado en este trabajo con un nivel de confianza del 95% (prueba múltiple de rangos), se destaca que en la cantidad de proteína como en la de RNA si existieron diferencias estadísticamente significativas. Lo mismo sucedió con la cepa cultivada con glicerol como fuente de carbono. Por su parte, para las cepas cultivadas con arabinosa se observó que si existen diferencias estadísticamente significativas de la proteína y de la relación

RNA/Proteína, dicha diferencia no se observó en la cantidad de RNA en esta condición (Anexo 2).

## 6. Conclusiones

No se encontró una tendencia clara entre la pérdida secuencial de operones de *rnn* y la cantidad de RNA y proteína, en el caso de glucosa y arabinosa como fuentes de carbono, la relación RNA/Proteína fue mayor en las cepas mutantes respecto a la silvestre, dicho comportamiento no se observó en glicerol, siendo la cepa SQ78 la que contó con una relación menor y la cepa SQ53 con una relación mayor. Cabe señalar que las cepas mutantes que muestran un aumento de la relación RNA/Proteína puede ser justificado como una compensación por la capacidad de traducción reducida.

En relación a la velocidad de consumo de sustrato, las cepas mutantes que se probaron en arabinosa obtuvieron valores superiores a la cepa MG1655, esto no sucedió con glucosa en el medio, en este caso, la cepa silvestre consumió el sustrajo más rápidamente que las mutantes, lo anterior podría indicar que un número reducido de operones de *rnn* proporciona mayor capacidad a las células de *E. coli* para el consumo de sustratos no preferenciales, como lo es la arabinosa.

Los datos encontrados muestran que el hecho de que algunas de las cepas mutantes como la SQ53 y la SQ78 crezcan más rápido que la silvestre en medio mínimo no es necesariamente porque disminuya la síntesis de ribosomas, pudiendo existir entonces una tendencia a invertir los recursos celulares únicamente en procesos que ayuden a su crecimiento como una manera de amortiguar la pérdida de operones de *rnn*, maximizando de esta forma la expresión de los ribosomas activos existentes dentro de la célula, así como la capacidad aumentada de las cepas por el consumo de algunas fuentes de carbono, lo anterior se vio acentuado cuando el ambiente fue más hostil.

Pese a que no se encontró una explicación clara sobre las velocidades de consumo de arabinosa por parte de las cepas mutantes, los resultados se podrían emplear para la construcción y uso de cepas de *E. coli* capaces de generar algún producto de interés a partir de biomasa vegetal ya que después de la glucosa, la arabinosa y la xilosa son los azúcares más abundantes presentes en la biomasa vegetal [45]. Por lo tanto, sería de utilidad contar con cepas capaces de fermentar adecuadamente fuentes de carbono como como la arabinosa.

Siguiendo con un enfoque práctico las células de diseño personalizado se utilizan para propósitos específicos. Particularmente la caracterización y aplicación de cepas con eliminación de operones de *rnr* puede emplearse como una herramienta útil en una amplia gama de estudios relacionados con la maquinaria de traducción, desde análisis evolutivos y ensayos *in vitro* sobre las funciones de los ribosomas, hasta determinar funciones específicas de rRNA. También es posible explorar los cambios que conducen a la resistencia de fármacos inhibidores de la traducción ya que el panorama general de la maquinaria de traducción se ve simplificado en cepas con eliminación de operones de *rnr* [3] [6].

## 7. Perspectivas

- Realizar cinéticas de crecimiento en medio mínimo con mezclas de fuentes de carbono como glucosa + arabinosa con la finalidad de obtener más información respecto a las velocidades de consumo de sustrato para las cepas mutantes.
- Caracterizar la tasa consumo de sustrato para glicerol como fuente de carbono mediante técnicas cromatográficas con el fin de encontrar la tendencia que siguieron las cepas mutantes respecto a la silvestre con esta fuente de carbono.
- Observar el comportamiento de las cepas SQ37, SQ40, SQ49, SQ88, SQ141 y SQ141 con glicerol y arabinosa como fuente de carbono, así como los parámetros analizados en ese trabajo.

## 8. Referencias

- [1] H. Bremer y P. Dennis, «Modulation of Chemical Composition and Other Parameters of the Cell at Different Exponential Growth Rates,» *Ecosal Plus*, vol. 3, nº 1, pp. 1-49, 2008.
- [2] M. Scott, C. Gunderson, E. Mateescu, Z. Zhang y T. Hwa, «Interdependence of Cell Growth and Gene Expression: Origins and Consequences,» *Science*, vol. 330, nº 1, pp. 1099-1102, 2010.
- [3] T. Asai, C. Condon, J. Voulgaris, D. Zaporozets, B. Shen, M. Al-Omar, C. Squires y C. Squires, «Construction and Initial Characterization of Escherichia coli Strains with Few or No Intact Chromosomal rRNA Operons,» *J Bacteriol*, vol. 181, nº 12, p. 3803–3809, 1999.
- [4] P. Dennis y H. Bremer, «Macromolecular Composition During Steady-State Growth of Escherichia coli B/r,» *Journal of Bacteriology*, vol. 119, nº 1, pp. 270-281, 1974.
- [5] C. Condon, D. Liveris, C. Squires, I. Schwartz y C. Squires, «rRNA Operon Multiplicity in Escherichia coli and the Physiological Implications of rrn Inactivation,» *Journal of Bacteriology*, vol. 177, nº 14, p. 4152–4156, 1995.
- [6] Z. Gyorfy, G. Draskovits, V. VERNYIK, F. Blattner, T. Gaal y G. Posfai, «Engineered ribosomal RNA operon copy-number variants of E. coli reveal the evolutionary trade-offs shaping rRNA operon number,» *Nucleic Acids Research*, vol. 43, nº 3, p. 1783–1794, 2015.
- [7] S. Quan, O. Skovgaard, R. McLaughlin, E. Burman y C. Squires, «Markerless Escherichia coli rrn Deletion Strains for Genetic Determination of Ribosomal Binding Sites,» *Genes, Genomes and Genetics*, vol. 5, nº 12, p. 2555–2557, 2015.
- [8] X. Dai, M. Zhu, M. Warren, R. Balakrishnan, V. Patsalo, H. Okano, J. Williamson, K. Fredrick, Y.-P. Wang y T. Hwa, «Reduction of translating ribosomes enables Escherichia coli to maintain elongation rates during slow growth,» *Nature Microbiology volume*, vol. 2, nº 16231, pp. 1-9, 2016.

- [9] H. De Jong, J. Geiselman y D. Ropers, «Resource Reallocation in Bacteria by Reengineering the Gene Expression Machinery,» *Trends in Microbiology*, vol. 25, n° 6, pp. 480-493, 2017.
- [10] J. Pleiss, «The promise of synthetic biology,» *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 73, n° 4, p. 735-739, 2006.
- [11] M. Engelhard, de *Synthetic Biology Analysed*, Springer, 2016, pp. 3-6.
- [12] A. Khalil y J. Collins, «Synthetic Biology: Applications Come of Age,» *Nature Reviews Genetics*, vol. 11, n° 1, p. 367-379, 2010.
- [13] T. McKee y J. McKee, *Bioquímica. Las Bases Moleculares De La Vida*, México: McGRAW-HILL, 2014.
- [14] L. Benjamin, J. Krebs , E. Goldstein y S. Kilpatrick , *Lewin´s Genes IX*, USA: Jones & Bartlett Learning , 2014.
- [15] J. Pelley, *Elsevier's Integrated Review Biochemistry*, Elsevier Saunders, 2012.
- [16] J. Klappenbach, J. Dunbar y T. Schmidt, «rRNA Operon Copy Number Reflects Ecological Strategies of Bacteria,» *Appl Environ Microbiol*, vol. 66, n° 4, p. 1328-1333, 2000.
- [17] G. Tortora, B. Funke y . C. Case, *Introducción a la Microbiología*, México: Médica Panamericana, 2007.
- [18] V. Souza, R. Martha , L. Sander y . L. Eguiarte , «Historia natural, ecología y evolución de la patogenicidad en *Escherichia coli*,» Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, 2002. [En línea]. Available: <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap5/>. [Último acceso: 12 2018].
- [19] J. Nielsen y J. Keasling, «Engineering Cellular Metabolism,» *Cell*, vol. 164, n° 6, pp. 1185-1197, 2016.
- [20] C. Condon , C. Squires y C. Squires , «Control of rRNA Transcription in *Escherichia coli*,» *Microbiological Reviews* , vol. 59, n° 4, p. 623-645, 1995.

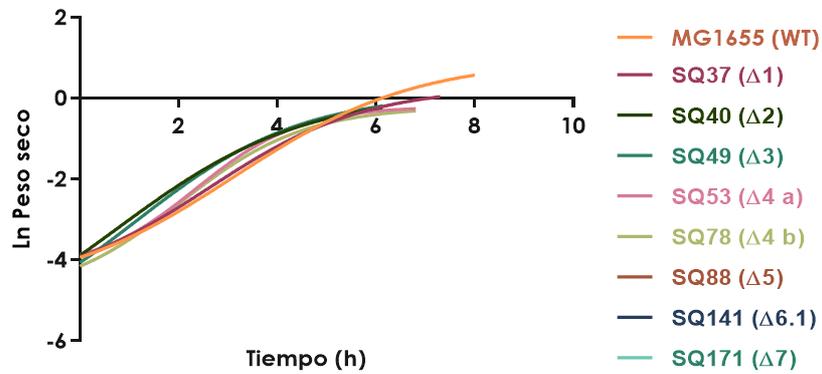
- [21] T. Steitz, «A structural understanding of the dynamic ribosome machine,» *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 9, n° 1, p. 242–253, 2008.
- [22] L. Magnusson, A. Farewell y T. Nyström, «ppGpp: a global regulator in *Escherichia coli*,» *Cell Press*, vol. 13, n° 5, pp. 236-242, 2005.
- [23] S. Carneiro, A. Lourenço, E. Ferreira y I. Rocha, «Stringent response of *Escherichia coli*: revisiting the bibliome using literature mining,» *Microb Inform Exp*, vol. 1, n° 14, pp. 1-24, 2011.
- [24] M. Traxler , S. Summers , H. Nguyen , V. Zacharia , A. Hightower , J. Smith y T. Conway, «The global, ppGpp-mediated stringent response to amino acid starvation in *Escherichia coli*,» *Molecular Microbiology*, vol. 68, n° 5, pp. 1128-1148, 2008.
- [25] M. Scott, S. Klumpp, . E. Mateescu y T. Hwa, «Emergence of robust growth laws from optimal regulation of ribosome synthesis,» *Molecular Systems Biology*, vol. 10, n° 8, pp. 1-14, 2014.
- [26] R. Gourse, T. Gaal, M. Bartlett, A. Appleman y W. Ross, «rRNA Transcription And Growth Rate-Dependent Regulation Of Ribosome Synthesis In *Escherichia Coli*,» *Annual Review of Microbiology*, vol. 50, n° 1, pp. 645-677, 1996.
- [27] S. Hui, . J. Silverman, D. Erickson, M. Basan, J. Wang, H. Terence y J. Williamson, «Quantitative proteomic analysis reveals a simple strategy of global resource allocation in bacteria,» *Molecular Systems Biology*, vol. 784, n° 11, pp. 1-15, 2015.
- [28] National Science Foundation, «*E. coli* Genetic Resources at Yale CGSC, The Coli Genetic Stock Center,» 2019. [En línea]. Available: <http://cgsc2.biology.yale.edu/>. [Último acceso: 28 06 2019].
- [29] Thermo Fisher Scientific Inc. , «M9 Minimal Salts (2X),» 2014. [En línea]. Available: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/5059M9minimalsalts.pdf>. [Último acceso: 18 6 2019].
- [30] BioTek Instruments, Inc., «Synergy H1 Operator's Manual,» 2016. [En línea]. Available: <https://schanzelab.files.wordpress.com/2017/12/microplate-redader-synergy-h1-operators-manual-8041000-rev-k.pdf>. [Último acceso: 18 6 2019].

- [31] M. Madigan, J. Martinko, P. Dunlap y D. Clark, Brock. *Biología de los microorganismos*, México : Pearson Education, S.A, 2009.
- [32] D. Acebo-González y A. Hernández-García, «Los métodos Turbidimétricos y sus aplicaciones en las ciencias de la vida,» *CENIC Ciencias Biológicas*, vol. 44, nº 1, 2013.
- [33] K. Kovárová-Kovar y T. Egli, «Growth Kinetics of Suspended Microbial Cells: From Single-Substrate-Controlled Growth to Mixed-Substrate Kinetics,» *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 62, nº 3, p. 646–666, 1998.
- [34] C. You, H. Okano, S. Hui, . Z. Zhang, M. Kim, C. Gunderson, Y.-P. Wang, P. Len, . D. Yan y T. Hwa, «Coordination of bacterial proteome with metabolism by cyclic AMP signalling,» *Nature* , vol. 500, nº 1, p. 301–306, 2013.
- [35] S. Franz-Xaver , «Biological Macromolecules: UV-visible Spectrophotometry,» *Encyclopedia of Life Sciences*, pp. 1-4, 2001.
- [36] H. Robinson y C. Hogden , «The Biuret Reaction in the Determination of Serum Proteins,» 727-731, vol. 135, nº 1, p. *Journal Of Biological Chemistry*, 1940.
- [37] G. Miller, «Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar,» *Analytical Chemistry*, vol. 31, nº 3, pp. 426-428, 1959.
- [38] Statgraphics Technologies, Inc., «Analysis of Variance,» 2017. [En línea]. Available: <http://www.statgraphics.com/analysis-of-variance>. [Último acceso: 01 07 2019].
- [39] R. Walpole, R. Myers, S. Myers y K. Ye, *Probability & Statistics for Engineers & Scientists*, United States of America: Prentice Hall, 2011.
- [40] R. LaCroix, T. Sandberg, E. O'Brien, J. Utrilla, A. Ebrahim, G. Guzman, R. Szubin, B. Palsson y A. Feist, «Use of Adaptive Laboratory Evolution To Discover Key Mutations Enabling Rapid Growth of Escherichia coli K-12 MG1655 on Glucose Minimal Medium,» *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 81, nº 1, pp. 17-30, 2015.
- [41] B. Towbin, Y. Korem, B. Anat , D. Shany , S. Rotem y A. Uri , «Optimality and sub-optimality in a bacterial growth law,» *Nature Communication* , vol. 8, nº 14123, pp. 1-8, 2017.

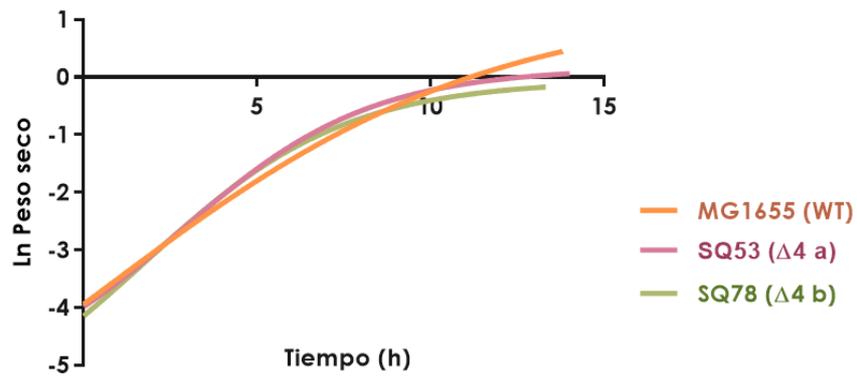
- [42] C. Trinh y F. Sreenc, «Metabolic Engineering of Escherichia coli for Efficient Conversion of Glycerol to Ethanol,» *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 75, n° 21, p. 6696–6705, 2009.
- [43] A. Bren , J. Park, B. Towbin, E. Dekel, J. Rabinowitz y U. Alon, «Glucose becomes one of the worst carbon sources for E.coli on poor nitrogen sources due to suboptimal levels of cAMP,» *Scientific Reports*, vol. 6, n° 24834, pp. 1-10, 2016.
- [44] A. Schmidt, K. Kochanowski, S. Vedelaar, E. Ahrné, B. Volkmer, L. Callipo, K. Knoops, M. Bauer, R. Aebersold y M. Heinemann, «The quantitative and condition-dependent Escherichia coli proteome,» *Nature Biotechnology*, vol. 31, n° 1, pp. 104-110, 2015.
- [45] T. Desai y C. Rao, «Regulation of Arabinose and Xylose Metabolism in Escherichia coli,» *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 76, n° 5, p. 1524–1532, 2010.
- [46] Z. Gyorfy, G. Draskovits, V. Verny, F. Blattner, T. Gaal y G. Posfai, «Engineered ribosomal RNA operon copy-number variants of *E. coli* reveal the evolutionary trade-offs shaping rRNA operon number,» *Nucleic Acids Research*, vol. 43, n° 3, p. 1783–1794, 2015.

## 9. Anexos

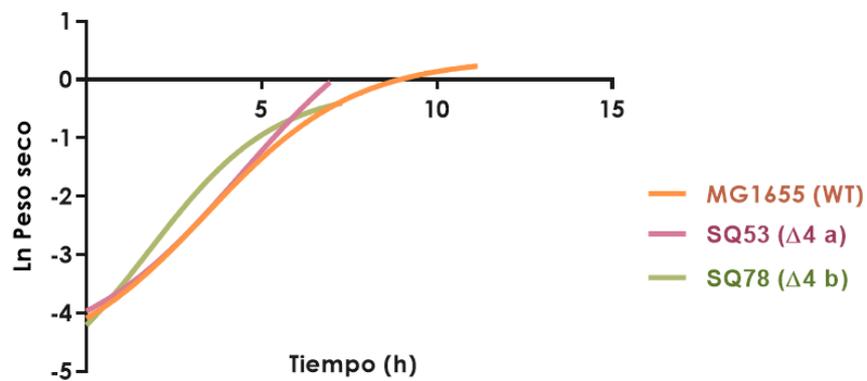
Anexo 1A. Curvas de crecimiento en glicerol como fuente de carbono.



Anexo 1B. Curvas de crecimiento en glicerol como fuente de carbono.



Anexo 1A. Curvas de crecimiento en arabinosa como fuente de carbono.



Anexo 2. Significancia estadística de los valores de proteína, RNA y de la relación RNA/Proteína de las condiciones evaluadas

<b>Glucosa RNA/Proteína</b>		
Cepas	Significancia	Diferencia
MG1655 - MG1655 <sub>D</sub>		-0.01
MG1655 - MG1655 <sub>C</sub>		-0.01
MG1655 - NCM3722		0.02
MG1655 <sub>D</sub> - MG1655 <sub>C</sub>		-0.003
MG1655 <sub>D</sub> - NCM3722		0.03
MG1655 <sub>C</sub> - NCM3722		0.03
SQ53 - SQ53 <sub>D</sub>	*	0.16
SQ53 - SQ53 <sub>C</sub>	*	0.06
SQ53 <sub>D</sub> - SQ53 <sub>C</sub>	*	-0.10
		LI: -0.06/ LS: +0.06
<b>Glucosa - RNA</b>		
MG1655 - MG1655 <sub>D</sub>	*	-23.90
MG1655 - MG1655 <sub>C</sub>	*	-18.32
MG1655 - NCM3722	*	-16.86
MG1655 <sub>C</sub> - NCM3722		1.45
MG1655 <sub>D</sub> - MG1655 <sub>C</sub>		5.59
MG1655 <sub>D</sub> - NCM3722		7.04
SQ53 - SQ53 <sub>D</sub>		-1.45
SQ53 - SQ53 <sub>C</sub>		-5.36
SQ53 <sub>D</sub> - SQ53 <sub>C</sub>		-3.91
		LI: -10.65/ LS: +10.65
<b>Glucosa - Proteína</b>		
MG1655 - MG1655 <sub>D</sub>	*	-65.99
MG1655 - MG1655 <sub>C</sub>	*	-44.65
MG1655 - NCM3722	*	-74.40
MG1655 <sub>D</sub> - MG1655 <sub>C</sub>		21.34
MG1655 <sub>D</sub> - NCM3722		-8.40

MG1655<sub>C</sub> - NCM3722

-29.74

Anexo 2 Continuación. Significancia estadística de los valores de proteína, RNA y de la relación RNA/Proteína de las condiciones evaluadas

SQ53 - SQ53 <sub>D</sub>	*	-115.34
SQ53 - SQ53 <sub>C</sub>	*	-54.45
SQ53 <sub>D</sub> - SQ53 <sub>C</sub>	*	60.89
		LI: -38.45/ LS: +38.45

#### Glicerol RNA/Proteína

Cepas	Significancia	Diferencia
MG1655 - NCM3722		0.006
		LI: -0.009/ LS: +0.009

#### Glicerol - RNA

MG1655 - NCM3722	*	-7.94
		LI: -2.88/ LS: +2.88

#### Glicerol - Proteína

MG1655 - NCM3722	*	-43.65
		LI: -12.23/ LS: +12.23

#### Arabinosa RNA/Proteína

Cepas	Significancia	Diferencia
MG1655 - NCM3722	*	0.10
		LI: -0.03/ LS: +0.03

#### Glicerol - RNA

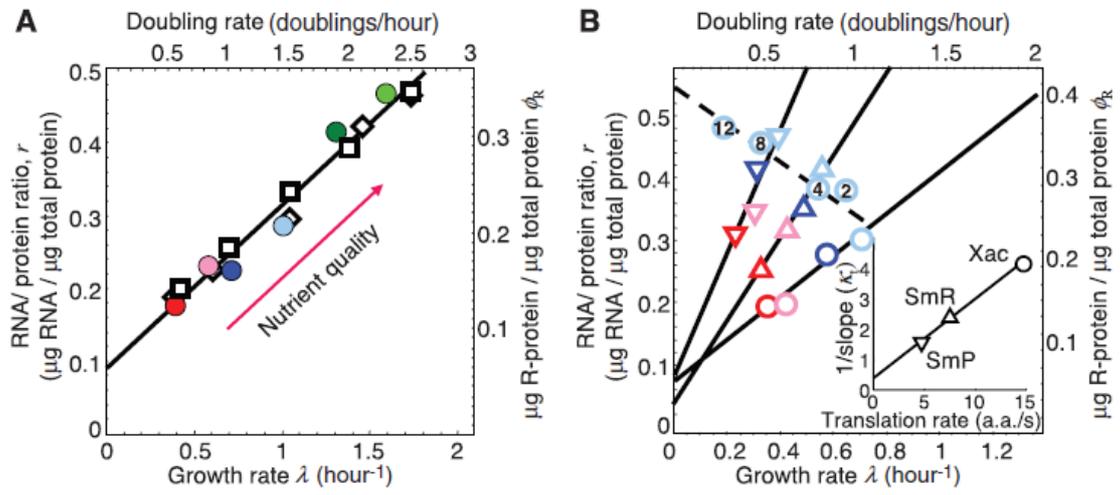
MG1655 - NCM3722		-4.62
		LI: -5.43/ LS: +5.43

#### Glicerol - Proteína

MG1655 - NCM3722	*	-70.81
		LI: -19.61/ LS: +19.61

\* Indica una diferencia estadísticamente significativa

Anexo A. Relación RNA/ Proteína contra la tasa de crecimiento. (A) Cepas de *E. coli* cultivadas en medio mínimo. (B) Cepas mutantes de *E. coli* con traducción lenta [2].



Anexo B. Región Crítica para el estadístico t. Se muestra sombreada la región de rechazo de  $H_0$  [39].

