



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR (CIDC)

ESTUDIO DE LA SÍNTESIS Y FUNCIÓN DE LOS LÍPIDOS
DE MEMBRANA DE *Flavobacterium johnsoniae*

TESIS PROFESIONAL PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAestrÍA EN CIENCIAS
(Biología celular y molecular)

PRESENTA:
MARITZA LORENA VENCES GUZMÁN

DIRECTOR: DR. CHRISTIAN SOHLENKAMP

CUERNAVACA, MORELOS

ABRIL , 2026

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS Y RECONOCIMIENTOS	4
ÍNDICE DE TABLAS	6
ÍNDICE DE FIGURAS	7
RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN	11
Membranas bacterianas	11
Algunos mecanismos de motilidad bacteriana	13
Motilidad por nado (Swimming motility)	13
Motilidad de enjambre (Swarming motility)	13
Motilidad espasmódica (Twitching motility)	14
Motilidad deslizante (Gliding motility)	14
Lípidos de membrana de bacterias	15
Importancia de los lípidos de membrana en las bacterias en la respuesta al estrés abiótico.	16
Biosíntesis del fosfolípido PE	17
ANTECEDENTES	22
HIPÓTESIS	28
OBJETIVO GENERAL	28
OBJETIVOS PARTICULARES	28
METODOLOGÍA GENERAL	29
1.- Identificación de genes y proteínas de interés	30
Síntesis de lípido de ornitina	30
Síntesis del fosfolípido fosfatidiletanolamina (PE)	31
2.1.- Obtención de células quimiocompetentes de cepas de <i>E. coli</i> con CaCl ₂	34
2.2.- Transformación de <i>E. coli</i>	34
2.3.- Obtención de colonias transconjugantes de la bacteria de interés.	35
3.- Identificación de candidatas a tener la mutación por delección del gen de interés	35
3.1.- Marcaje de lípidos con [14C] acetato o [14C] ornitina	36
3.2.- Extracción de lípidos	36
3.3.- Cromatografía en capa fina (TLC)	37
3.4.- Detección de lípidos marcados	37
4.- Confirmación de mutantes	37
5.- Complementación de la mutante deficiente en la formación de lípidos de ornitina	38
6.- Caracterización de las mutantes	38

6.1.- Antibiograma	38
6.2.- Ensayos de motilidad	39
6.3.-Efecto del pH del medio sobre la motilidad y la composición lipídica	39
6.4.-Efecto de diferentes concentraciones de nutrientes en el medio sobre la motilidad y la composición lipídica	40
6.5.- Efecto de diferentes concentraciones de NaCl sobre la motilidad y la composición lipídica	40
Caracterización de la mutante MALO 01 deficiente en la formación de lípidos de ornitina de <i>F. johnsoniae</i>.	43
-Crecimiento y composición lipídica de la mutante MALO 01 en los medios de cultivo MM y MC	43
-Análisis de la composición lipídica de la mutante MALO 01 y la mutante complementada en los medios de cultivo MM y MC	46
-La mutante MALO 01 muestra un perfil de resistencia a antibióticos diferente al de la cepa silvestre.	47
-La mutante MALO 01 muestra una motilidad por deslizamiento (gliding) reducido	48
-Ensayo de motilidad por gliding de la mutante de <i>F. johnsoniae</i> MALO 01 (Δfjo_0833) complementada	49
-La cepa silvestre de <i>F. johnsoniae</i> y la mutante MALO 01 muestran la mayor motilidad por gliding a pH 8	50
-La concentración de NaCl en el medio de cultivo afecta la motilidad por gliding de <i>F. johnsoniae</i>	54
DISCUSIÓN	60
PERSPECTIVAS	65
CONCLUSIONES:	66
ANEXOS	68
LITERATURA CITADA	73

AGRADECIMIENTOS Y RECONOCIMIENTOS

A mi hija, Paulina Aitana Hernández Vences por ser mi fortaleza, motivación y alegría, para ser la mejor versión de mi misma.

A mi esposo, Dr. Leandro David Hernandez por su apoyo y amor en todo momento, que ha sido un ejemplo a seguir en mi formación académica.

A mi Padre Miguel Vences Lopez, uno de mis cimientos, que siempre me acompaña dentro de mi corazón.

A mi Madre Natividad Guzman Aranda mi cimiento de vida, que me apoya incondicionalmente con amor y es una de mis motivaciones para superarme cada día.

A mis hermanos: Dr. Miguel A. Vences Guzmán que ha sido un pilar y ejemplo a seguir en mi formación académica, por su apoyo en el asesoramiento de este proyecto y amor incondicional. Lic. Laura A. Vences Guzmán por brindarme su sinceridad, amor y apoyo incondicional en todo momento.

A mi abuela María Aranda por su amor y cariño que siempre me acompaña.

A mi tutor de tesis: Dr. Christian Sohlenkamp por su paciencia, comprensión, apoyo y calidad humana que me ha brindado a lo largo de mi formación académica y durante la realización de esta tesis.

A mis sinodales: Dra. María Eugenia Núñez, Dr. Otoniel Rodríguez Jorge por su paciencia, dedicación en la revisión y asesoramiento de este proyecto.

A mi jurado revisor de tesis: Dra. Verónica Mercedes Narváez Padilla, Dra. Cinthia Ernestina Nuñez López, Dr. Armando Hernández Mendoza, Dr. Marco Antonio Rogel Hernández, Dr. Ramón Suárez Rodríguez, por sus valiosas recomendaciones y amable atención.

ABREVIATURAS

CL: cardiolipin (cardiolipina)

DGTS: diacylglyceryl-*N*, *N*, *N*-trimethylhomoserine
(diacilgliceriltrimetilhomoserina)

GL: glycine lipid (lípido de glicina)

LOL: lyso-ornithine lipid (lisolípido de ornitina)

LPS: lipopolysaccharide (lipopolisacárido)

OL: ornithine lipid (lípido de ornitina)

PC: phosphatidylcholine (fosfatidilcolina)

PCR: polymerase chain reaction (la reacción en cadena de la polimerasa)

PE: phosphatidylethanolamine (fosfatidiletanolamina)

PG: phosphatidylglycerol (fosfatidilglicerol)

SF: sulfonolipids (sulfonolípidos)

SGL: serine glycine lipid (lípido de serina glicina))

TLC: thin layer chromatography (cromatografía en capa fina)

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Propuesta de genes que codifican para enzimas que posiblemente participen en la biosíntesis de lípidos de membrana de <i>F. johnsoniae</i> .
Tabla 2	Cepas y plásmidos utilizados en este trabajo.
Tabla 3	Comparación de la composición de lípidos de la mutante MALO 01 y la cepa WT de <i>F. johnsoniae</i> .
Tabla 4	Capacidad de gliding de la cepa mutante de <i>F. johnsoniae</i> deficiente en la formación de OL (MALO 01) y de cepa silvestre de <i>F. johnsoniae</i> (WT) en medio MM a diferentes pH.
Tabla 5	Comparación de la capacidad de gliding de la mutante MALO 01 y de la cepa silvestre de <i>F. johnsoniae</i> (WT) en diferentes diluciones de medio MM.
Tabla 6	Comparación de la capacidad de gliding de la mutante MALO 01 y de la cepa silvestre de <i>F. johnsoniae</i> (WT) en diferentes concentraciones de NaCl.
Tabla 7	Comparación de la composición de lípidos de cepas de <i>F. johnsoniae</i> sometidos por 4 días a diferentes concentraciones de NaCl.
Tabla 8	Medios de cultivo.
Tabla 9	Buffers con distinto rango de pH para cultivo microbiano.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Representación esquemática de la envoltura celular de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas.
Figura 2	Estructuras de algunos fosfolípidos presentes en bacterias.
Figura 3	Biosíntesis de fosfatidiletanolamina en bacterias.
Figura 4	La biosíntesis de lípidos de ornitina (OLs).
Figura 5	Vía de biosíntesis propuesta de sulfonolípidos (SF) en <i>F. johnsoniae</i> .
Figura 6	Imagen adquirida después de 72 h de crecimiento en una placa de petri de medio MM de <i>F. johnsoniae</i> .
Figura 7	TLC en dos dimensiones de lípidos de <i>F. johnsoniae</i> UW101 marcados con acetato [¹⁴ C].
Figura 8	Una mutante de <i>F. johnsoniae</i> deficiente en <i>fjoh_2419</i> pierde casi completamente la motilidad por gliding.
Figura 9	Mapa de la región genómica de <i>F. johnsoniae</i> y que contiene el gen <i>fjoh_0833</i> .
Figura 10	Mapa de la región genómica de <i>F. johnsoniae</i> que contiene el gen <i>fjoh_2598</i> .
Figura 11	Esquema general de metodología que se siguió para la construcción del mutante en el gen de interés.
Figura 12	Identificación de mutantes que no sintetizan OL.
Figura 13	Confirmación de la delección del gen <i>fjoh_0833</i> en mutantes que no producen OL.
Figura 14	La mutante MALO 01 muestra un retraso de crecimiento en medio MM y MC.
Figura 15	TLC en dos dimensiones de lípidos marcados con acetato [¹⁴ C] de cepas de <i>F. johnsoniae</i> .

Figura 16	Análisis lipídico de la complementación de la mutante MALO 01.
Figura 17	La mutante MALO 01 muestra un perfil de resistencia diferente en comparación con la cepa silvestre de <i>F. johnsoniae</i> .
Figura 18	La mutante MALO 01 muestra una motilidad por deslizamiento (gliding) reducida.
Figura 19	La mutante MALO 01, complementada con el gen <i>fjoh_0833</i> en trans muestra una recuperación de la motilidad por gliding.
Figura 20	TLC en dos dimensiones de lípidos totales extraídos de bacterias crecidas en medio MM sólido a pH 6.5 o 7.5.
Figura 21	La motilidad por gliding de <i>F. johnsoniae</i> aumenta en medio de cultivo diluido.
Figura 22	TLC en dos dimensiones de lípidos totales extraídos de bacterias crecidas en medio MM sólido con diferentes concentraciones de NaCl.
Figura 23	TLC en dos dimensiones de lípidos extraídos de bacterias crecidas en medio MM sólido con diferentes concentraciones de NaCl.
Figura 24	Mapa del plásmido suicida pYT354.
Figura 25	Mapa del plásmido de expresión pCP23 para comprobar la funcionalidad del gen de interés.

RESUMEN

El género *Flavobacterium* pertenece a la familia *Flavobacteriaceae*, dentro del filo Bacteroidota. *Flavobacterium johnsoniae* fue descrita por primera vez en 1947 con el nombre de *Cytophaga johnsonae* como una bacteria móvil con pigmento amarillo, siendo algunas especies patógenas de peces. *F. johnsoniae* es un organismo modelo para estudiar la motilidad deslizante (gliding). Carece de flagelos o pili, y su movimiento depende de la presencia de adhesinas de motilidad. *F. johnsoniae* tiene una composición inusual de lípidos de membrana, ya que presenta mayoritariamente lípidos libres de fosfato como sulfonolípidos (SF), lípidos de ornitina (OL), lípidos de glicina (GL) y lípidos de serina glicina (SGL). A diferencia de otras especies bacterianas más estudiadas como *Escherichia coli* solamente se ha identificado un fosfolípido, la fosfatidiletanolamina (PE), en *F. johnsoniae*.

Recientemente en nuestro grupo de investigación describimos el gen *fjoh_2419* que codifica una enzima que cataliza un paso en la síntesis de SF. Un mutante deficiente en este gen ya no puede formar SF, pierde su motilidad y es más sensible a una amplia gama de antibióticos. Similar a otras bacterias donde los lípidos de membrana juegan con frecuencia un papel en la respuesta a condiciones de estrés abiótico es posible que en *F. johnsoniae* los lípidos tienen una función en estos procesos, por lo que, en el presente trabajo nos hemos propuesto investigar el papel que juegan el OL y la PE.

En el presente trabajo hemos descubierto que el gen *fjoh_0833* está implicado en la biosíntesis de OL y construimos un mutante en dicho gen, que presenta una disminución de la motilidad, así como una mayor sensibilidad a diversos antibióticos.

Utilizando la misma metodología hemos intentado construir un mutante deficiente en el gen *fjoh_2598* implicado en la biosíntesis de PE, pero sin éxito. Este resultado sugiere que este gen es esencial para la sobrevivencia de *F. johnsoniae*.

ABSTRACT

The genus *Flavobacterium* belongs to the family *Flavobacteriaceae*, within the phylum Bacteroidota. *Flavobacterium johnsoniae* was first described in 1947 under the name *Cytophaga johnsonae* as a motile bacterium with yellow pigment, some species being pathogenic to fish. *F. johnsoniae* is a model organism for studying gliding motility. It lacks flagella or pili, and its movement depends on the presence of motility adhesins. *F. johnsoniae* has an unusual membrane lipid composition, as it mainly features phosphate-free lipids such as sulfonolipids (SF), ornithine lipids (OL), glycine lipids (GL), and serine glycine lipids (SGL). Unlike other, more studied bacterial species such as *Escherichia coli*, only one phospholipid, phosphatidylethanolamine, (PE) has been identified in *F. johnsoniae*.

Recently, our research group described the gene *fjoh_2419*, which encodes an enzyme that catalyzes a step in SF synthesis. A mutant deficient in this gene can no longer form SF, loses its motility, and is more sensitive to a wide range of antibiotics. Similar to other bacteria where membrane lipids frequently play a role in the response to abiotic stress conditions, we thought it possible that lipids in *F. johnsoniae* might have a function in these processes. Therefore, in this work, we wanted to investigate the role of OL and PE.

We have shown that the *fjoh_0833* gene is involved in OL biosynthesis and we constructed a mutant in this gene, which exhibits decreased motility, as well as increased sensitivity to various antibiotics.

Using the same approach we have tried to construct a mutant deficient in the *fjoh_2598* gene involved in PE biosynthesis, but without success. The presence of this gene is thought to be essential for the survival of *F. johnsoniae*.

INTRODUCCIÓN

Membranas bacterianas

La membrana celular lleva a cabo diversas funciones celulares. Separa el contenido interior de la célula del medio exterior, sirviendo como una barrera selectiva y de permeabilidad para la entrada o la salida de moléculas, evitando así, la pérdida pasiva de componentes del citoplasma y la entrada indiscriminada de moléculas. También participa en otros procesos como por ejemplo la motilidad, la producción de ATP, patogenicidad, y resistencia al estrés abiótico (Madigan *et al.*, 2006).

Las bacterias son microorganismos procariotas con un tamaño que comúnmente oscila entre 0,5 y 5 μm de longitud. Una de las clasificaciones más usadas en la microbiología se basa en la técnica de tinción de Gram descrita por el bacteriólogo danés Christian Gram. Esta tinción permite dividir las bacterias en Gram-negativas y Gram-positivas, las cuales se diferencian en la estructura de su envoltura celular (Fig.1). Las bacterias Gram-positivas presentan una pared celular gruesa formada por varias capas de peptidoglicano y una membrana interna (MI), mientras que las bacterias Gram-negativas contienen una MI, una membrana externa (ME) y una capa delgada de peptidoglicano entre las dos membranas (Madigan *et al.*, 2006). El espacio periplasmático de las bacterias Gram-negativas, es un espacio de importancia osmótica y transporte de metabolitos, enzimas hidrolíticas, proteínas, sustancias tóxicas entre otros sustratos, hacia la membrana externa (Fig.1) (Rock *et al.*, 2008; Murakami *et al.*, 2020).

La MI está compuesta principalmente por lípidos de membrana que pueden variar según la especie bacteriana y proteínas. Por otro lado, la ME es la primera barrera en las bacterias Gram-negativas, en ella están embebidas las porinas (Fig.1), que actúan como canales para la entrada y salida de sustancias hidrofóbicas de bajo peso molecular. En la monocapa externa de la ME se encuentran los

lipopolisacáridos (LPS) también llamados endotoxina (Madigan *et al.*, 2006); dentro de la estructura del LPS se encuentra el primer componente; el lípido A que se relaciona con la patogenicidad, siendo el ancla hacia la membrana, después se encuentra el segundo componente; core o el oligosacárido central y por último se une el tercer componente; antígeno O (Cadena de polisacáridos externa) sirviendo de reconocimiento inmunitario, estos tres principales componentes se unen covalentemente para dar la estructura al LPS (Mandrell *et al.*, 1993; Raetz *et al.*, 2007). La monocapa interna de la ME está compuesta de fosfolípidos, pero en algunas bacterias también se ha observado la presencia de lípidos libre de fósforo como lípidos de ornitina, esfingolípidos o sulfonolípidos (Sohlenkamp & Geiger, 2016). Las lipoproteínas están presentes tanto en las bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, participan principalmente en procesos de virulencia (Nakayama *et al.*, 2012).

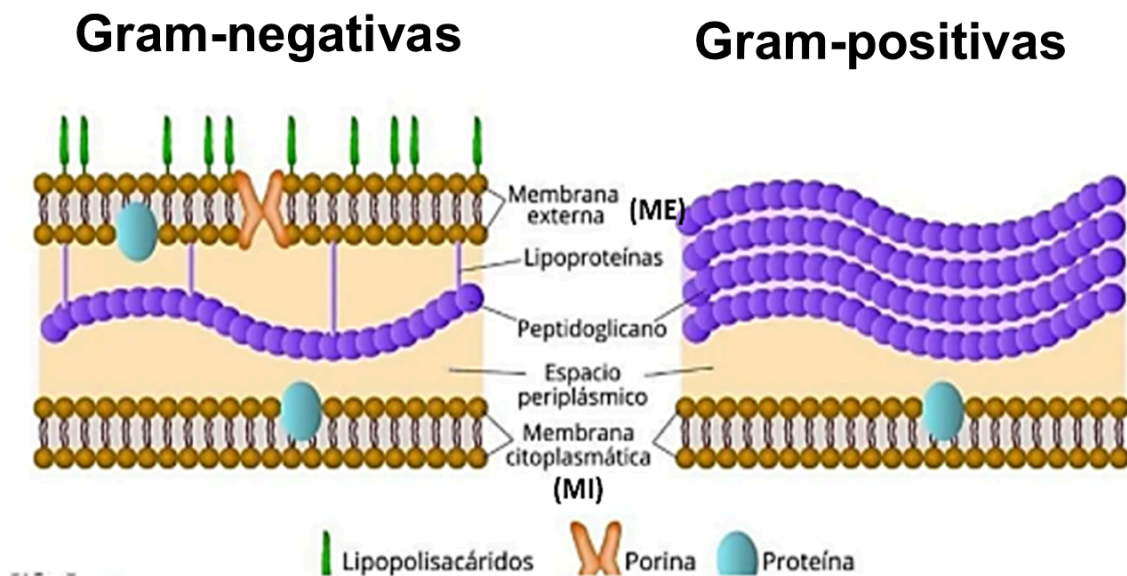


Figura 1.- Representación esquemática de la envoltura celular de bacterias-Gram negativas y Gram-positivas. Las bacterias Gram-negativas presentan las siguientes características: una membrana citoplasmática o membrana interna (MI) compuesta principalmente de lípidos anfipáticos como por ejemplo los fosfolípidos, una capa más delgada de peptidoglicanos que en las bacterias Gram-positivas, y una membrana externa

(ME) que contiene lipopolisacáridos (LPS). Entre la MI y la ME existe un espacio denominado espacio periplásmico. Las bacterias Gram-positivas generalmente presentan las siguientes características: la MI y una capa gruesa de peptidoglicano. Las porinas están presentes en bacterias Gram-negativas. En el caso de que se presenten, los pili y los flagelos se encuentran embebidos a las dos membranas. Figura tomada de Manual of Clinical Microbiology. 12ed., Carroll *et al.*, 2019.

Algunos mecanismos de motilidad bacteriana

La membrana plasmática juega un papel importante para explotar los recursos y entornos disponibles al ser sostén de estructuras implicadas en la motilidad. Algunos de estos mecanismos de motilidad estudiados son:

Motilidad por nado (Swimming motility)

El nado se basa en la rotación de apéndices helicoidales delgados llamados filamentos flagelares. La rotación de un filamento flagelar es impulsada en su base por un motor giratorio reversible y lo empuja hacia adelante en línea recta. Dependiendo de la bacteria los filamentos flagelares compuestos de flagelina, se encuentran en distintas posiciones, por ejemplo en: a) Perítrico: Los flagelos están distribuidos a lo largo del cuerpo celular como en *E. coli* y *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium*, o *S. enterica*; b) Polar: Los flagelos se pueden colocar en uno o ambos polos, por ejemplo, *Vibrio cholerae* tiene un flagelo en un polo, o múltiples flagelos en cualquier polo, como en *Spirillum volutans* (Navish *et al.*, 2022).

Motilidad de enjambre (Swarming motility)

Esta forma de movimiento se ha observado en géneros bacterianos como *Escherichia*, *Salmonella*, *Bacillus*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Serratia* y *Paenibacillus*.

El enjambre también está impulsado por flagelos, pero a diferencia del nado, ocurre en una superficie sólida o semisólida (cuasi-2D) de manera que el movimiento de células es colectivo y no individual, combinado con el crecimiento celular, conduce a un rápido alejamiento de la colonia inicial (Navish *et al.*, 2022).

Motilidad espasmódica (Twitching motility)

Esta motilidad se ha estudiado en bacterias como *Myxococcus xanthus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Neisseria gonorrhoeae*. Este movimiento no implementa flagelos sino filamentos delgados llamados "pili tipo IV", que están compuestos por pilina y se desplazan por superficies sólidas o semisólidas, utilizando un movimiento de gancho a diferencia de los flagelos que utilizan un movimiento helicoidal.

Los pili de manera general también se ven asociados a procesos como la adhesión del huésped, la captación de ADN, la depredación, la virulencia, la fototaxis etc. La maquinaria del pilus tipo IV está estrechamente relacionada con el sistema de secreción tipo II de las bacterias Gram-negativas (Navish *et al.*, 2022).

Motilidad deslizante (Gliding motility)

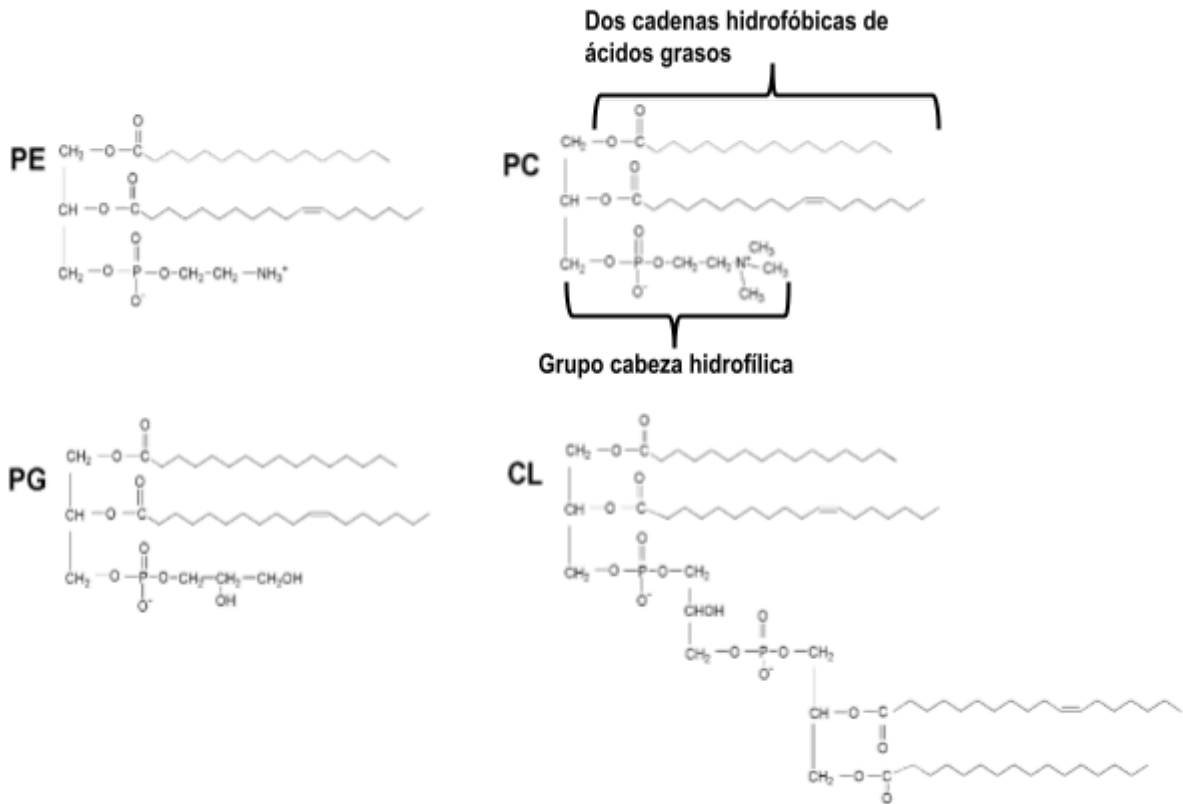
Para este movimiento no se requiere la ayuda de flagelos o pili. Un organismo modelo para estudiarlo es *Flavobacterium johnsoniae* (Wadhwa *et al.*, 2022). El mecanismo de motilidad deslizante es por medio de la secreción de adhesinas de motilidad, estas son proteínas que permiten el movimiento a partir de la adhesión o unión a algunos sacaridos, tal es el caso de la adhesina remA. Este movimiento está relacionado con el sistema de secreción tipo IX (T9SS) siendo responsable de la secreción de estas adhesinas, así como para la secreción de factores de virulencia (Barbier *et al.*, 2020). Recientemente se reportó por medio de un análisis de microscopía electrónica de SprB (adhesina), que el mecanismo de esta

motilidad se debe a un impulso de estas adhesinas a lo largo de vías/carriles bajo la membrana externa que le servirán de anclaje, formando un múltiple-carril. Sin embargo, este tipo de motilidad todavía sigue en estudio (Shibata *et al.*, 2023)

Lípidos de membrana de bacterias

Los lípidos de membrana cumplen una función estructural al formar la bicapa lipídica de las membranas celulares, creando una barrera física semipermeable que delimita la célula. Participan en diversos procesos esenciales como por ejemplo en el transporte, movimiento celular y patogenicidad etc. Estos lípidos se clasifican como lípidos saponificables complejos y son de carácter anfifílico: se componen de un extremo hidrofílico siendo este su grupo cabeza y un extremo hidrofóbico formado por cadenas hidrofóbicas largas de acilo o alquilo (Fig. 2) (Vance & Vance, 2008). La bacteria modelo Gram-negativa *E.coli* posee los glicerofosfolípidos (GL) fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilglicerol (PG), y cardiolipina (CL) (Rock *et al.*, 2008). Otro GL ausente en *E. coli* pero presente en algunas bacterias de importancia sanitaria como *Bartonella* spp. y *Brucella* spp. es la fosfaditilcolina (PC) (Fig. 2) (Vences-Guzmán *et al.*, 2014).

Figura 2.- Estructuras de algunos fosfolípidos presentes en bacterias. Fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilglicerol (PG), cardiolipina (CL) y fosfatidilcolina (PC). En el caso de la PC la parte hidrofóbica y la parte hidrofílica del fosfolípido están señaladas. Tomada de Vences-Guzmán *et al.*, 2014.



Importancia de los lípidos de membrana en las bacterias en la respuesta al estrés abiótico.

Muchas bacterias alteran la composición de los lípidos de membrana en respuesta a variaciones del ambiente. Una de las estrategias para enfrentar cambios de temperatura es adaptar la fluidez de la membrana aumentando o reduciendo la

saturación o insaturación de lípidos (Denich et al., 2003). La proteobacteria *Desulfobacter* aumenta la proporción de ácidos grasos ramificados e insaturados en respuesta al frío (Könneke et al., 2013).

Otra variación que puede presentar el ambiente es el cambio de pH, en diferentes bacterias se han identificado diversas estrategias en respuesta a estrés por acidez como el bombeo de protones, reparación o protección de macromoléculas, producción de amonio y reacciones de descarboxilación que consumen protones que causan un aumento del pH intracelular o evitan que disminuya el pH citoplasmático. Así se reducen los efectos nocivos de los protones como el daño al ADN, daño a la membrana, mal plegamiento de las proteínas o la reducción de la actividad enzimática (Lund et al., 2014). También se han reportado modificaciones de lípidos de membrana en respuesta a condiciones de acidez y temperatura. La mutante de *Rhizobium tropici* CIAT899 deficiente en la formación de un OL hidroxilado muestra un fenotipo que logra crecer a altas temperaturas (42 °C) y en condiciones de acidez (pH 4.0) (Vences-Guzmán et al., 2011).

Biosíntesis del fosfolípido PE

En *E. coli* la PE compone el 80% de los lípidos de su MI (Neidhardt et al., 1996). Su síntesis en *E. coli* comienza a partir de CDP-DAG (citidina difosfato-diacilglicerol) (Fig. 3). En un primer paso, la enzima fosfatidilserina sintasa (PssA) condensa el CDP-DAG con el aminoácido L-serina, formando el lípido aniónico fosfatidilserina (PS) y liberando citidina monofosfato (CMP). Después la PS es descarboxilada por la PS descarboxilasa (Psd), obteniendo como productos PE y CO₂ (Rock et al., 2008 y Sohlenkamp et al. 2016). Se han descrito versiones hidroxiladas de PE en géneros bacterianos como *Ralstonia* y *Burkholderia*, y una enzima aún desconocida cataliza la formación de 2-OH-PE a partir de PE (González-Silva et al., 2011). Recientemente se ha identificado otra vía para la biosíntesis de PE en *Xanthomonas campestris*, que sintetiza PE a partir de CDP-DAG y etanolamina (Fig. 3) (Moser et al., 2014).

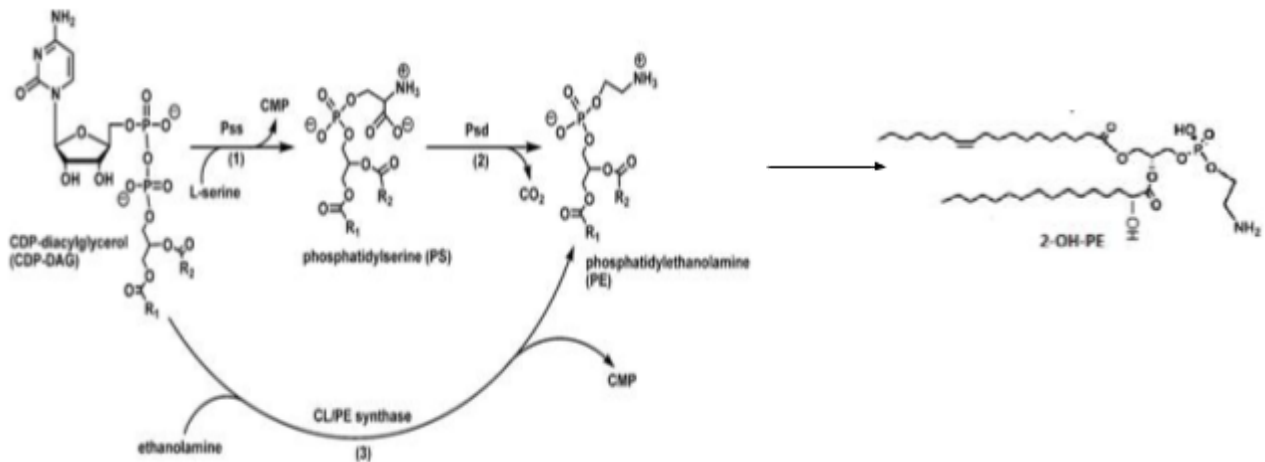


Figura 3.- Biosíntesis de fosfatidiletanolamina en bacterias. El primer paso de la síntesis de fosfatidiletanolamina (PE), comienza cuando el CDP-diacilglicerol es condensada con serina para formar fosfatidilserina (PS) catalizado por la enzima fosfatidilserina sintasa (PssA). En el segundo paso, la PS es descarboxilada por la enzima fosfatidilserina descarboxilasa (Psd) para producir PE. La PE puede ser hidroxilada en algunas bacterias pero la hidroxilasa responsable para la formación de 2-OH-PE es aún desconocida. Una segunda vía de biosíntesis de PE descrito en *Xanthomonas* es por la vía CL/PE sintasa, donde se cataliza PE a partir de CDP-diacilglicerol y etanolamina. Tomada y modificada de Sohlenkamp *et al.*, 2016 y González-Silva *et al.*, 2011.

Biosíntesis de lípidos de membrana libres de fósforo en bacterias

Además de los glicerofosfolípidos mencionados arriba se ha descrito una gran diversidad de lípidos de membrana y muchos de estos lípidos carecen de fósforo en su estructura. En varias bacterias estos lípidos libres de fósforo solamente se sintetizan en respuesta a condiciones de limitación de fosfato, mientras que otras bacterias los forman también en condiciones de exceso de fosfato. Se ha observado el reemplazo de fosfolípidos (PE, PG o PC) de sus membranas por lípidos de membrana libres de fósforo como diacilglicerol trimetil homoserina (DGTS), sulfoquinovosil diacilglicerol (SQD), lípido de glicina (GL) o lípidos de

ornitina (OLs) (Sohlenkamp *et al.*, 2016). Este tipo de remodelaje se ha estudiado con bastante detalle en *Sinorhizobium meliloti* 1021, que en condiciones normales de crecimiento produce los lípidos de membrana; PG, CL, PE y PC. Al crecer en limitación de fosfato, algunos de sus fosfolípidos son reemplazados por lípidos que no contienen fósforo como SQD, DGTS y OLs (Geiger *et al.*, 1999).

Lípidos de ornitina

Los lípidos de ornitina (OL) probablemente son los lípidos de membrana libres de fósforo más estudiados. Están presentes en varios géneros bacterianos, sin embargo, están ausentes de arqueas y eucariontes. En las bacterias Gram-negativas se encuentran enriquecidos en la ME y frecuentemente se ha observado un aumento de estos lípidos cuando la bacteria en cuestión se crece en ambientes con baja concentración de fosfato, probablemente actuando como sustituto de fosfolípidos. También, se ha reportado su presencia en algunas bacterias Gram-positivas, como *Streptomyces*, y *Mycobacterium* (López-Lara *et al.*, 2003; Geiger *et al.*, 2010; Vences-Guzmán *et al.*, 2012; Parsons *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2018). En 2002 y 2004 se describió en *S. meliloti* por primera vez una vía completa para la biosíntesis de OLs:

1.- El primer paso es catalizado por la *N*-aciltransferasa OlsB, que cataliza la transferencia de un grupo acilo 3-hidroxilado, desde una proteína acarreadora de acilos (ACP), al grupo α -amino de la ornitina, formando el lisolípido de ornitina (LOL).

2.- En el segundo paso la *O*-aciltransferasa OlsA cataliza la transferencia de un segundo grupo acilo, desde una ACP, al grupo 3-hidroxilo del LOL, formando el OL (Gao *et al.*, 2004; Weissenmayer *et al.*, 2002; Vences-Guzmán *et al.*, 2014).

Varios años más tarde se describió la proteína bifuncional OlsF en *Serratia proteamaculans* la cual cataliza una *N*-acilación seguido por una *O*-acilación llevando a la formación de lípidos de ornitina (Vences-Guzmán *et al.*, 2015) (Fig. 4)

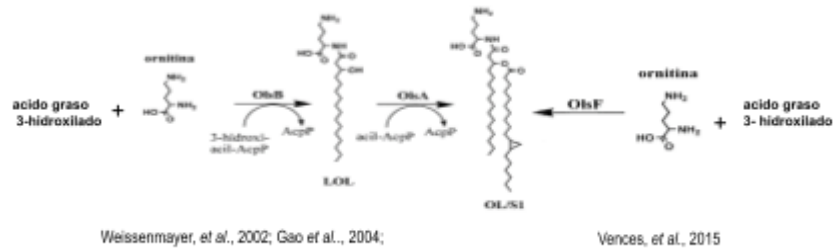
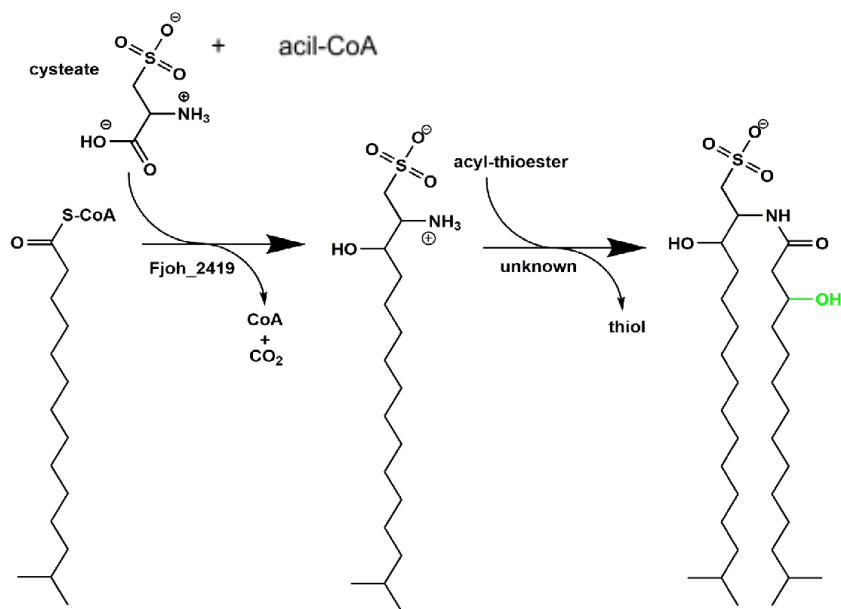


Figura 4.- La biosíntesis de lípidos de ornitina (OLs). Figura tomada y modificada de Weissenmayer *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2004; Vences-Guzmán *et al.*, 2015.

Sulfonolípidos

Los sulfonolípidos (SF) son lípidos anfipáticos relacionados estructuralmente con los esfingolípidos que se han encontrado hasta ahora solamente en el grupo *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroidetes*. En *F. johnsoniae* se describió la identificación de la aciltransferasa cisteato-grasa *fjoh_2419* requerida para la síntesis de capnina, precursor para la biosíntesis de sulfobacina o SF (Fig. 5) (Vences-Guzmán *et al.*, 2021). Mutantes deficientes en este gen pierden casi por completo la motilidad por gliding indicando que su presencia es importante para la motilidad de deslizamiento. En las bacterias aerobias, el precursor de la capnina, el cisteato, es producido por una cisteato sintasa dependiente de fosfato de piridoxal (PLP) (CapA1), un homólogo cercano de la cistationina β-sintasa (CBS). Recientemente en bacterias anaerobias se identificó AfCapA2, un homólogo de la cisteato sintasa arqueal de la bacteria anaerobia *Alistipes finegoldii* con capacidad de catalizar la conversión de O-fosfoserina (OPS) a cisteato (Yang S *et al.*, 2025).

Figura 5.- Vía de biosíntesis propuesta de sulfonolípidos (SF) en *F. johnsoniae*. Cisteato y acil-CoA son condensados para formar capnina, CO₂ y coenzima A en una reacción catalizada por *fjoh_2419* (Vences-Guzmán *et al.*, 2021). La *N*-acilación de capnina con diferentes ácidos grasos produce los SF (Geiger *et al.*, 2010). Se han descrito diferentes SF, entre ellos sulfobacina B y sulfobacina A, los cuales se distinguen en la presencia de un grupo hidroxilo en la posición C3 del ácido graso amidificado (Vences-Guzmán *et al.*, 2021).



ANTECEDENTES

Flavobacterium es un género de bacterias Gram-negativas, que pertenece a la familia *Flavobacteriaceae*, dentro del filo Bacteroidota (McBride *et al.*, 2009; Liu X *et al.*, 2025). Presenta motilidad por gliding (Nelson *et al.*, 2008; Shrivastava *et al.*, 2012; Nakane *et al.*, 2013), y forma colonias de pigmento amarillo. Es de importancia ecológica ya que algunas especies son patógenas de peces (Stanier *et al.*, 1947; Raetz *et al.* 1990) como *F. psychrophilum*, causante de la enfermedad del agua fría o síndrome del alevín de la trucha (Barbier *et al.*, 2020), *F. branchophilum*, ocasiona la enfermedad de las branquias (Speare *et al.*, 1995) y *F. columnare* da lugar a la enfermedad de la columna (LaFrentz *et al.*, 2018). Estas enfermedades infecciosas se suman a la causal de la pérdida de un 10 % de todos los animales acuáticos cultivados, lo que equivale a más de 10 mil millones de USD en pérdidas anuales a escala mundial (Adams *et al.*, 2019). La motilidad de esta bacteria se ha relacionado con su patogenicidad, porque un mutante deficiente en el gen *gldN*, muestra una disminución en la patogenicidad y una detención de gliding (Barbier *et al.*, 2020). *F. johnsoniae* es un modelo ideal para estudiar el gliding alcanzando una velocidad de desplazamiento de 2 a 10 micrómetros por segundo. Su genoma tiene un tamaño de 6.09 Mb, y contiene 5,017 genes predichos (Fig. 6) (Pate *et al.*, 1988).

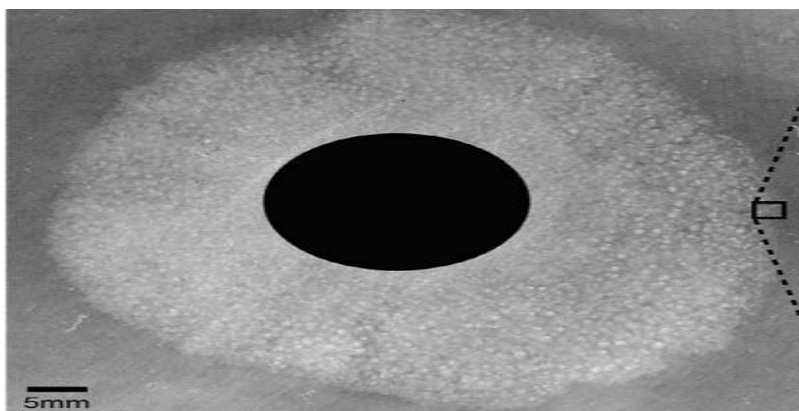


Figura 6.- Imagen adquirida después de 72 h de motilidad por gliding en una placa petri de medio MM de *F. johnsoniae*, la imagen se toma de un video por la técnica de **timelapse**, (Vences-Guzmán *et al.*, 2021).

Las bacterias mejor estudiadas con relación a la composición lipídica de su membrana presentan en su gran mayoría o exclusivamente lípidos con fósforo o fosfolípidos. Nuestro modelo de estudio *F. johnsoniae*, al contrario, presenta una composición de la membrana muy distinta, en la cual los fosfolípidos son una minoría. Se han descrito lípidos sin fósforo como sulfonolípidos (SF), lípidos de ornitina (OL), lípidos de glicina (GL) y lípidos de serina glicina y solamente un fosfolípido, la fosfatidiletanolamina (PE) (Fig.7) (Sohlenkamp *et al.*, 2016).

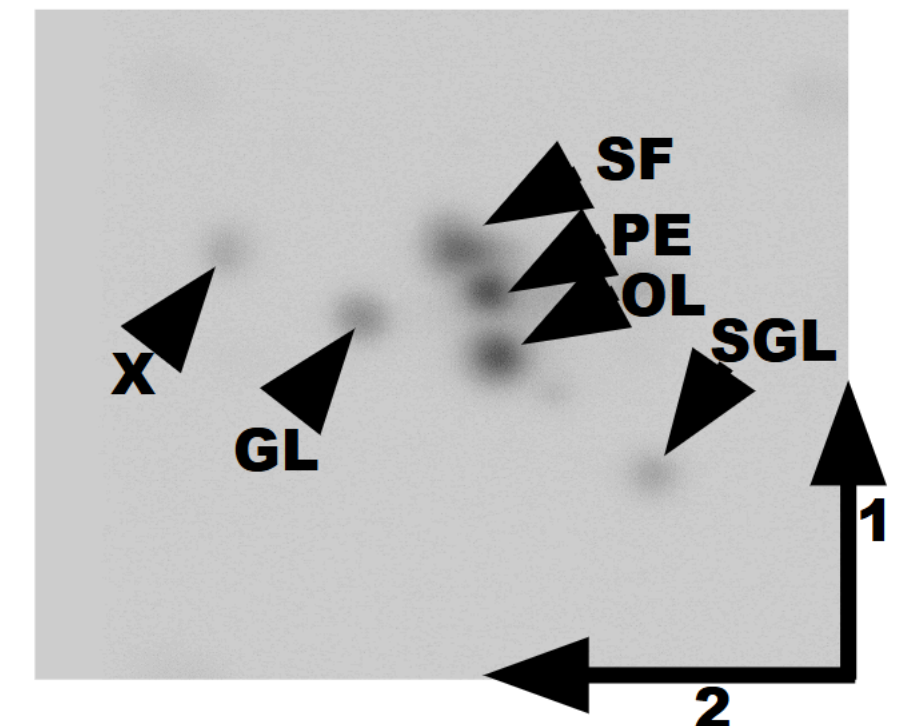


Figura 7.-TLC en dos dimensiones de lípidos de *F. johnsoniae* UW101 marcados con acetato [^{14}C]. PE: fosfatidiletanolamina, OL: lípido de ornitina, SF: sulfonolípido, GL: lípido de glicina, SGL: lípido de serina glicina y un lípido todavía no identificado (X).

Recientemente en nuestro grupo de investigación reportamos que el gen *fjoh_2419* codifica una enzima que cataliza un paso de la síntesis de SF (Vences-Guzmán *et al.*, 2021) (Fig. 5). Esta mutante pierde casi completamente su motilidad y se vuelve más sensible a una amplia variedad de antibióticos (Fig.8).

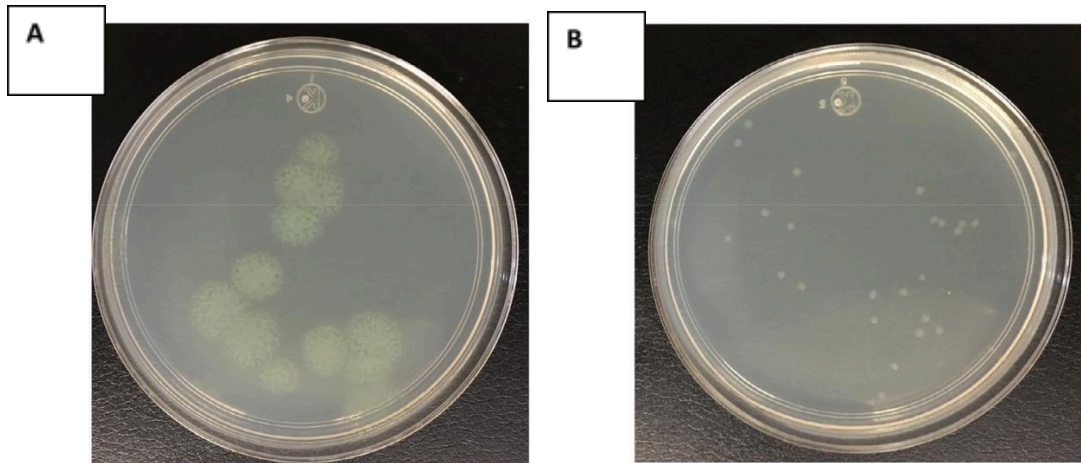


Figura 8.- Una mutante de *F. johnsoniae* deficiente en *fjoH_2419* pierde casi completamente la motilidad por gliding. (A) *F. johnsoniae* silvestre medio MM; (B) *F. johnsoniae* mutante deficiente en *fjoH_2419* medio MM, (Vences-Guzmán *et al.*, 2021).

Por lo tanto, sabemos que la presencia de SF es importante para la motilidad por gliding, pero es posible que otros lípidos también sean necesarios para este proceso, ya que no se ha elucidado por completo este proceso, además, se ha reportado que componentes membranales también están involucrados en este movimiento pertenecientes al T9SS, por lo que los lípidos quizás jueguen un papel estructural importante. Es por esto que en nuestro grupo de investigación se buscaron genes cuyos productos mostraran dominios conservados de enzimas ya descritas en vías de síntesis de lípidos de membrana. Esto se realizó mediante un alineamiento de secuencias múltiples BLAST (Tabla 1).

Tabla 1.- Propuesta de genes que codifican para enzimas que posiblemente participen en la biosíntesis de lípidos de membrana de *F. johnsoniae*.

Genes candidatos en <i>F. johnsoniae</i>	Anotación hipotética de la proteína codificada en <i>Flavobacterium</i>	Proteínas homólogas con función ya caracterizada
<i>fjoh_0833</i>	Fosfolípido/glicerol aciltransferasa	OlsF de <i>S. proteamaculans</i>
<i>fjoh_2598</i>	Fosfatidilserina sintasa (enzima que cataliza el primer paso en la síntesis de PE)	Pss de <i>S. meliloti</i>
<i>fjoh_2597</i>	Fosfatidilserina descarboxilasa (enzima que cataliza el segundo paso en la síntesis de PE)	Psd de <i>S. meliloti</i>
<i>fjoh_1025</i>	Enzima que cataliza el primer paso de la síntesis de lípidos de glicina	Sinac_1599 (OlsH) de <i>S. acidiphila</i>
<i>fjoh_1801</i>	Enzima que cataliza el segundo paso de la síntesis de lípidos de glicina	Sinac_1601 (OlsI) de <i>S. acidiphila</i>

En esta búsqueda genética se debe destacar la importancia ya reportada de algunos de estos lípidos, por ejemplo; OL que está implicado en la respuesta a estrés abiótico y patogenicidad en algunos géneros bacterianos (Vences-Guzmán *et al.*, 2011 y Aktas *et al.*, 2014), Además de que PE se ha observado es

importante para la vitalidad bacteriana, sin embargo, en nuestra bacteria modelo no se conoce el posible papel que pudiera desempeñar el OL y PE.

JUSTIFICACIÓN

Los lípidos de las membranas bacterianas juegan un papel fundamental en la sobrevivencia de las bacterias cuando son sometidas a diferentes estreses abióticos. Estos lípidos sufren cambios y/o modificaciones, en algunos casos se dejan de sintetizar o surgen nuevos lípidos que podrían alterar las propiedades de las membranas lo que les permite adaptarse a los diferentes ambientes. Se desconoce si *Flavobacterium* modifica su membrana y/o sustituye los lípidos de estas en respuesta a diferentes condiciones de estrés abiótico como por ejemplo temperatura, sensibilidad a antibióticos, déficit de nutrientes y estrés salino.

Anteriormente se ha reportado que la ausencia de sulfonolípidos detiene el gliding en *Flavobacterium*, sin embargo, esta relación entre lípidos y motilidad no está clara, además de que se desconoce qué otros lípidos podrían estar implicados en este movimiento y cómo influyen frente a algunos estreses abióticos, específicamente el papel del OL y PE como el único fosfolípido reportado.

Por lo tanto, este estudio propuesto de los lípidos en *F. johnsoniae*, es de relevancia en la fisiología bacteriana pues es parte del análisis de membranas bacterianas con escasos fosfolípidos en comparación con otras bacterias de estudio.

En este trabajo se pretende entender la función de los lípidos de membrana OL y PE de *F. johnsoniae* y si *F. johnsoniae* modifica la composición de su membrana en condiciones de estrés abiótico.

HIPÓTESIS

- 1) *F. johnsoniae* modifica la composición lipídica de sus membranas como una adaptación a condiciones de estrés abiótico.
- 2) Algunos otros lípidos de membrana de *F. johnsoniae* podrían contribuir al movimiento deslizante (gliding).

OBJETIVO GENERAL

Identificar los genes que codifican las enzimas requeridas para la síntesis del lípido de ornitina (OL) y fosfatidiletanolamina (PE) de *F. johnsoniae* y definir algunas de las funciones que estos lípidos tienen.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Identificar el conjunto de genes implicados en la síntesis de lípidos de ornitina (OL) y fosfatidiletanolamina (PE) en *F. johnsoniae* y construir mutantes deficientes en la formación de cada uno de estos lípidos.
- 2.-Caracterizar las mutantes construidas, en especial con base a su capacidad de motilidad por gliding, y resistencia a diferentes estreses abióticos.

METODOLOGÍA GENERAL

Tabla 2.- Cepas y plásmidos utilizados en este trabajo.

CEPAS Y PLÁSMIDOS	ESPECIFICACIONES	RESISTENCIA A	REFERENCIA
<i>F. johnsoniae</i> DSM2064	Aislado del suelo, UK	Kanamicina	(Reichenbach <i>et al.</i> , 1989; Bernardet <i>et al.</i> , 1996)
<i>E. coli</i> BL21(DE3) pLysS	Cepa de expresión	Cloranfenicol	(Studier <i>et al.</i> , 1991)
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>recA1</i> Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15; cepa de clonación	Ninguno	(Hanahan <i>et al.</i> , 1983)
<i>F. johnsoniae</i> MALO 01	Mutante de <i>F. johnsoniae</i> deficiente en el gen Δ <i>fjoh_0833</i>	Ampicilina	Este trabajo
<i>F. johnsoniae</i> MALO 01-C	Mutante MALO 01 complementado con plásmido pCP23/ <i>fjoh_0833</i>	Ampicilina y tetraciclina	Este trabajo
<i>F. johnsoniae</i> MALO 01 PV	Mutante MALO 01 con plásmido vacío pCP23	Tetraciclina	Este trabajo
Plásmidos			
pUC19	Vector de clonación	Carbenicilina	(Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)
pET9a	Vector de expresión para <i>E. coli</i> BL21(DE3)	Kanamicina	(Studier <i>et al.</i> , 1991)
pYT354	Plásmido suicida para <i>Flavobacterium</i>	Eritromicina	(Zhu <i>et al.</i> , 2017)

pcP23	Vector de expresión para <i>Flavobacterium</i>	Tetraciclina	Agarwal <i>et al.</i> , 1997)
pcP2301	pCP23/ <i>fjoh_0833</i>	Tetraciclina	Este trabajo

1.- Identificación de genes y proteínas de interés

Síntesis de lípido de ornitina

Se realizó un alineamiento múltiple de proteína con la secuencia de aminoácidos de OlsF de *S. proteamaculans* (ID de acceso: WP_129934566.1) con BLASTP, en KEGG, utilizando como filtros el código de nuestro organismo modelo “T00508 *Flavobacterium johnsoniae*”. El mejor hit con 30% de identidad fue el gen *fjoh_0833* el cual es un posible candidato para codificar una proteína involucrada en la síntesis de lípidos de ornitina. El tamaño del gen es de 1803 bp y su ID de acceso es: ABQ03867.1 (Fig. 9).

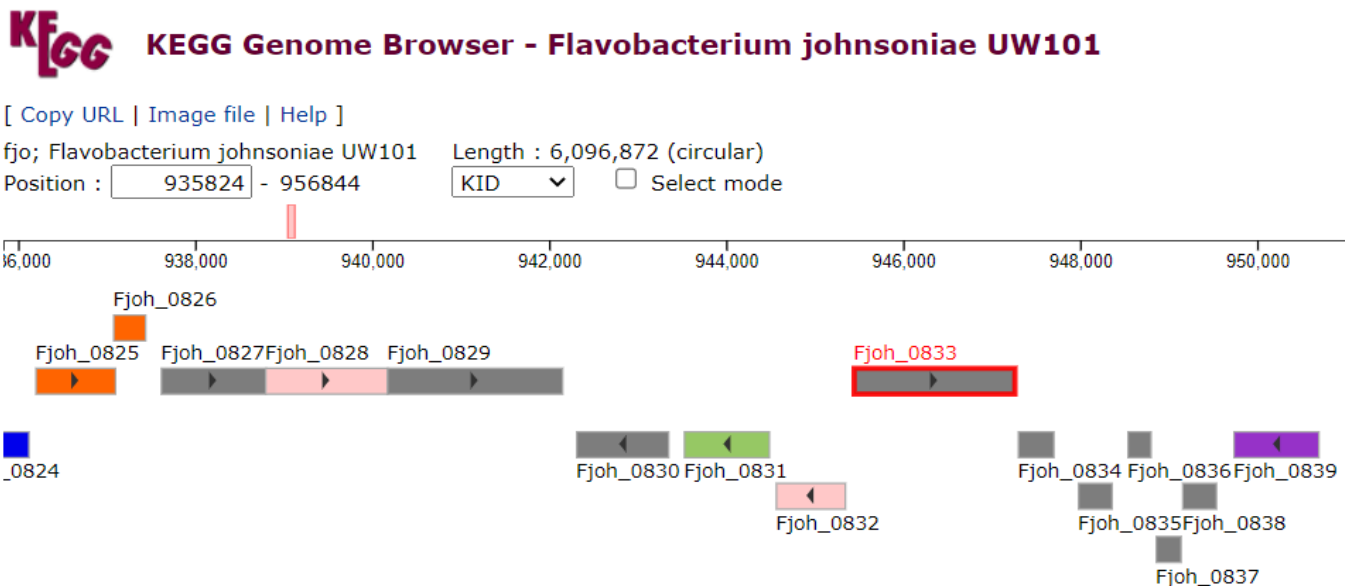


Figura 9.- Mapa de la región genómica de *F. johnsoniae* que contiene el gen *fjoh_0833*. El gen flanqueante río arriba *fjoh_0832* es anotado como codificando una exodesoxirribonucleasa posiblemente relacionado en procesos de reparación/escisión del

DNA. Los genes flanqueantes del *fjoh_0834* al *fjoh_0838*, río abajo son anotados como proteínas hipotéticas. Figura tomada de KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, los colores mostrados de cada gen representan categorías funcionales, utilizados en mapas de vías metabólicas globales y mapas genómicos. Gris: ninguna categoría, naranja; Metabolismo de otros aminoácidos, azul: Metabolismo de carbohidratos, rosa pálido: Procesamiento de la información genética, verde pálido; Procesos celulares.

Síntesis del fosfolípido fosfatidiletanolamina (PE)

Se realizó un alineamiento múltiple con la secuencia de aminoácidos de la fosfatidilserina sintasa de *S. meliloti* (Sohlenkamp *et al.*, 2004) (ID de acceso: CAC45701) en KEGG, utilizando como filtros el código de nuestro organismo modelo “*Flavobacterium johnsoniae* UW101”. La proteína codificada por el gen *fjoh_2598* mostró un 17.7% de identidad y fue el mejor candidato a codificar una proteína involucrada en la síntesis de PE en *F. johnsoniae*. El gen tiene un tamaño de 891 bp y su ID de acceso es: ABQ05625.1 (Fig. 10).

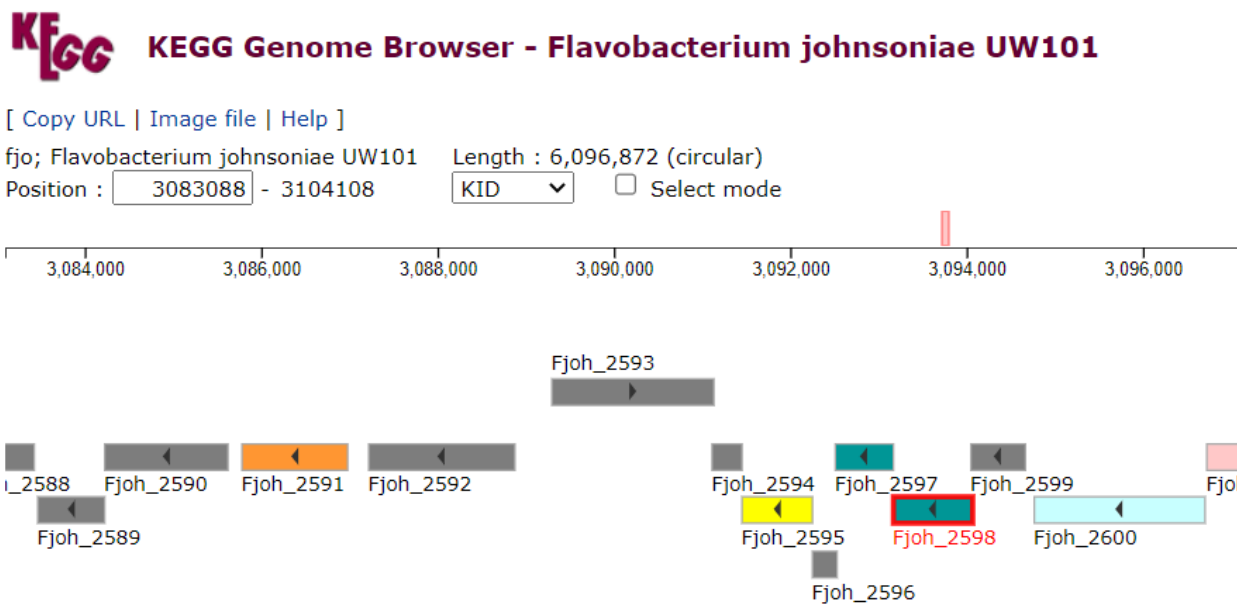


Figura 10.- Mapa de la región genómica de *F. johnsoniae* que contiene el gen *fjoh_2598*. El gen flanqueante río arriba *fjoh_2597* es anotado como fosfatidilserina

descarboxilasa relacionado en procesos de biosíntesis de fosfatidiletanolamina. Río abajo se encuentra el gen *fjoh_2599* anotado como codificando una proteína hipotética con función desconocida. Figura tomada de KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, los colores mostrados de cada gen representan categorías funcionales, utilizados en mapas de vías metabólicas globales y mapas genómicos. Gris: ninguna categoría, naranja; Metabolismo de otros aminoácidos, amarillo; Procesamiento de información ambiental, azul turquesa; metabolismo de los lípidos, azul pálido; Familias de proteínas, rosa pálido; Procesamiento de la información genética.

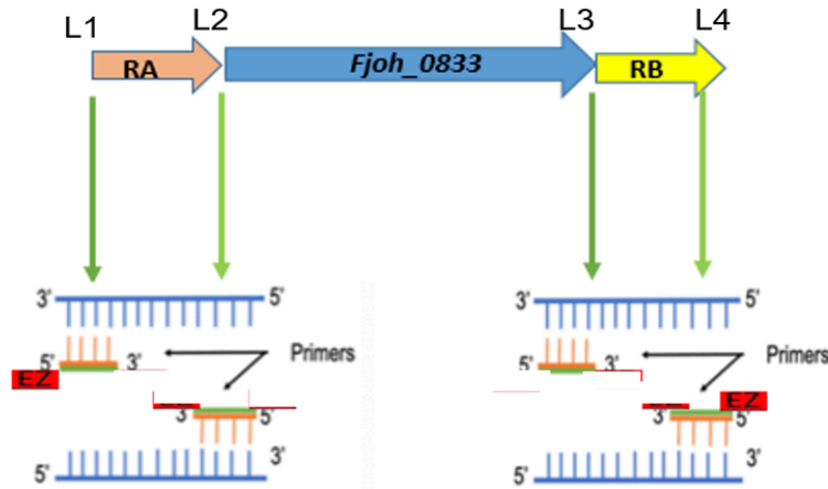
2.- Construcción de mutantes sencillas deficientes en *fjoh_0833* o *fjoh_2598*

Se diseñaron cebadores (oligos) río arriba (L1 y L2) y río abajo (L3 y L4) de los genes (*fjoh_0833* y *fjoh_2598*) (anexo 1). Los oligos L1 y L2 amplifican un fragmento de 1 kb de ADN genómico río arriba del gen en cuestión (RA). De manera similar, los cebadores L3 y L4 amplifican aproximadamente 1 kb de ADN genómico río abajo del gen de interés (RB) (Fig. 11, A). El oligo L3 presenta una parte complementaria al oligo L2, lo que permite hacer una segunda reacción de PCR con el primer y el segundo producto de PCR como moldes, utilizando los oligos L1 y L4, así obteniendo un tercer fragmento de PCR de 2 kb que junta ambas regiones flanqueando el gen de interés (Fig. 11 B).

Este tercer fragmento de PCR se digirió con las enzimas de correspondientes (anexo 1) para subclonar en el vector suicida pYT354 (Zhu et al., 2017) obteniendo pYT01 (pYT354/tercer fragmento de PCR) (Fig. 11, C). Se transformó el plásmido pYT01 a la cepa *E. coli* S17-1 (protocolo 2.1 y 2.2) y posteriormente a través de un cruce diparental, se introdujo el plásmido pYT01 a la cepa silvestre de *F. johnsoniae* siguiendo el protocolo 2.3. de esta sección. Los transconjugantes se seleccionaron en medio MC que contenía eritromicina para seleccionar recombinantes individuales en un primer paso. El plásmido pYT354 contiene el gen *sacB* (Zhu et al., 2017), que confiere sensibilidad a la sacarosa a muchas bacterias. Después, los recombinantes individuales se colocaron en condiciones no selectivas (precultivo líquido) en medio complejo durante un día antes de sembrarlos en medio MC sólido que contenía sacarosa a una concentración de 12,5 % (peso/vol). Por lo tanto, con condiciones de crecimiento en alto contenido

de sacarosa se seleccionó en favor de recombinantes dobles y de la pérdida de las secuencias del vector de pYT354 del genoma bacteriano.

A PCR de 1 kb río arriba (rosa) y 1 kb río abajo (amarillo) del gen de interés (*Fjoh_0833* o *Fjoh_2598*, en azul) hecho con las enzimas correspondientes (EZ, rojo).



C Mutantes por deleción del gen de interés en el genoma de *F. johnsoniae* con el plásmido suicida pYT354.

- Fragmento de PCR **rio arriba (RA)** y **rio abajo (RB)** del gen de interés se clonará en el plásmido suicida.



Figura 11.- Esquema general de metodología que se siguió para la construcción del mutante en el gen de interés.

2.1.- Obtención de células quimiocompetentes de cepas de *E. coli* con CaCl₂

El siguiente protocolo se obtuvo y se modificó de Morrison, 1977.

1. Crecer la cepa de interés de *E. coli* en medio LB sólido con los antibióticos apropiados.
2. Inocular una colonia aislada en 10 ml de medio LB, e incubar con agitación toda la noche (16 h aproximadamente).
3. Incubar el cultivo en hielo por 20 min.
4. NOTA. Enfriar también todas las soluciones a emplear en hielo.
5. Centrifugar a 4,000 g (4 °C) por 15 min. Desechar el sobrenadante.
6. Resuspender las células suavemente en 250 ml de 0.1 M de MgCl₂.
7. Centrifugar a 4,000 g (4 °C) por 15 min. Desechar el sobrenadante.
8. Resuspender las células con suavidad en 250 ml de 0.1 M de CaCl₂, e incubar en hielo por 20 min.
9. Centrifugar a 4,000 g (4 °C) por 15 min. Desechar el sobrenadante.
10. Resuspender las células con suavidad en 50 ml de 0.1 M de CaCl₂ + 15% glicerol (vol/vol).
11. Alicuotar (100 µl) en tubos eppendorf estériles enfriados previamente y depositarlos en hielo.
12. Almacenar a -80 °C.

2.2.- Transformación de *E. coli*

A 200 µl de células competentes de la cepa de *E. coli* S17-1 se agregaron 10 µl de la reacción de ligación, y las células se incubaron 30 minutos en hielo.

A las células se les aplicó un choque térmico de 42 °C por 2 minutos y se incubaron nuevamente en hielo por 5 minutos.

Luego se agregó 1 ml de medio LB estéril y se incubaron a 37 °C en agitación durante 1 h. Posteriormente, se plaquearon 100 µl de cada transformación en placas de medio sólido con su respectivo antibiótico (Tabla 2).

2.3.- Obtención de colonias transconjugantes de la bacteria de interés.

Conjugación

La cepa receptora se sembró en cajas de medio MC y se creció por 72 h a 30 °C, posteriormente se cultivaron las cepas requeridas en matraces de 125 ml con 30 ml de medio MC líquido con sus respectivos antibióticos (Tabla 2) por 16 h, en agitación a 300 rpm a 30 °C. También se creció la cepa donadora en cajas de medio LB por 72 h a 30 °C. Posteriormente se cultivaron las cepas requeridas en matraces de 125 ml con 30 ml de medio LB líquido con sus respectivos antibióticos (Tabla 2) por 16 h, en agitación a 300 rpm a 30 °C.

- Cepa receptora: sin antibiótico
- Cepa donadora: *E. coli* S17-1 con el plásmido a movilizar y antibióticos correspondientes (Tabla 2)

Se mezclaron en tubos Eppendorf 1 ml de cultivo de la cepa receptora, y 250 µl de cultivo de la cepa donadora y se centrifugaron por 4 minutos a 4,000 rpm. Se lavaron las células 3 veces con medio LB líquido sin antibiótico. Posteriormente las células se resuspendieron en 100 µl de medio LB líquido sin antibiótico y se distribuyeron por goteo en una placa de LB sin antibiótico. Las cajas se incubaron por 24 h a 30 °C.

3.- Identificación de candidatas a tener la mutación por delección del gen de interés

Las primeras candidatas con el plásmido suicida integrado (recombinantes sencillas) se seleccionaron basado en la resistencia a eritromicina conferida por el

plásmido suicida. Posteriormente se seleccionaron las candidatas a recombinantes dobles en medio con sacarosa y se evaluaron con base a su perfil lipídico. Se realizó un “Marcaje de lípidos con [^{14}C] acetato” siguiendo el protocolo 3.1 de esta sección, se extrajeron los lípidos siguiendo el protocolo 3.2 y después se analizaron por TLC con el protocolo 3.3 y 3.4.

3.1.- Marcaje de lípidos con [^{14}C] acetato o [^{14}C] ornitina

Esta técnica se utiliza para marcar los lípidos para posteriormente analizar e identificarlos. El [^{14}C] acetato entra a la célula, se convierte en [^{14}C] acetil-CoA y es incorporado en ácidos grasos. De esta manera se pueden marcar todos los lípidos que contienen ácidos grasos. El marcaje utilizando [^{14}C] ornitina (Fig. 4), conlleva a un marcaje específico de los lípidos de ornitina.

Pre- Cultivo:

Se realizaron cultivos líquidos con los antibióticos correspondientes (Tabla 2) en tubos de vidrio de 5 ml para cada colonia seleccionada, y se incubaron a 30 °C, en agitación de 300 rpm por 16 h.

Cultivo:

En un tubo desechable de plástico de 5 ml, se recolectó 1.5 ml del cultivo de interés, se adicionaron 1 ml de medio MC sin antibiótico y 10 μl [^{14}C] acetato. Se incubó a 30 °C, en agitación de 300 rpm durante 16 h.

3.2.- Extracción de lípidos

Se recolectó 2.5 ml de cada cultivo y se centrifugó por 2 minutos a 13,000 rpm. Se desechó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 100 μl de agua tridestilada. Se añadió 375 μl de metanol:cloroformo (2:1, vol/vol), se mezcló por medio de un agitador tipo vórtex y se dejó en reposo durante 10 a 40 minutos.

Posteriormente se añadieron 125 µl de cloroformo y 125 µl de agua tridestilada, se mezcló y se centrifugó 3 minutos a 11,000 rpm (Bligh et al., 1959). Se transfirió la fase orgánica con los lípidos (fase inferior) a otro tubo y se dejaron evaporar los solventes orgánicos a temperatura ambiente o en un concentrador Eppendorf modelo 5300.

3.3.- Cromatografía en capa fina (TLC)

Los lípidos extraídos se disolvieron en 50 µl de metanol:cloroformo (1:1, vol/vol) y se separaron por medio de TLC en placas de sílica gel 60 (Merck), en una o dos dimensiones utilizando las fases móviles correspondientes (anexo 5.3). Antes de iniciar la corrida de las placas de sílica, se dejó la fase móvil en la cámara por lo menos 15 min. Posteriormente se corrieron las placas por 50 minutos aproximadamente, hasta la absorción casi total por capilaridad de la fase móvil y se dejaron secar por 24 h.

3.4.- Detección de lípidos marcados

Las placas se expusieron con pantallas de fosfoimager durante 2 días y se revelaron con ayuda de un fosfoimager Molecular Dynamics, modelo 820.

4.- Confirmación de mutantes

A los candidatos a mutantes que revelaban fenotípicamente la ausencia del lípido de interés, se les confirmó la delección del gen por medio de un PCR. Se extrajo su ADN genómico, se realizó un PCR con los oligos L1 y L4 (anexo 1) y posteriormente los productos de PCR se visualizaron en un gel de electroforesis (anexo 5.1).

Para el caso de la mutante deficiente en la formación de lípido de ornitina

En el caso de la cepa silvestre se esperaba la amplificación de un fragmento de 3.8 kb que corresponde a las regiones flanqueantes (fragmento de 1 kb río arriba, más el fragmento de 1 kb río abajo, más el fragmento del gen 1.8 kb). Sin embargo, para una mutante con delección del gen *fjoh_0833* se esperaba la amplificación de un fragmento de 2 kb.

Para el caso de la mutante deficiente en la formación de fosfatidiletanolamina

En el caso de la cepa silvestre se esperaba la amplificación de un fragmento de 2.8 kb que corresponde a las regiones flanqueantes (fragmento de 1 kb río arriba y fragmento de 1 kb río abajo) más el fragmento del gen (0.8 kb). En el caso de una mutante con delección del gen *fjoh_2598* se esperaba la amplificación de un fragmento de 2 kb.

5.- Complementación de la mutante deficiente en la formación de lípidos de ornitina

El gen candidato se amplificó por PCR y se clonó en el plásmido de expresión pCP23 con las enzimas de restricción correspondientes (anexo 2). El plásmido se transformó a la cepa *E. coli* S17-1 (protocolo 2.1 a 2.2) y se realizó una conjugación biparental utilizando la cepa mutante como cepa receptora siguiendo el protocolo 2.3. La composición lipídica de los transconjugantes se comprobó por medio de una TLC en dos dimensiones (protocolo 3.1 a 3.4).

6.- Caracterización de las mutantes

6.1.- Antibiograma

Las cepas mutantes y la cepa silvestre de *F. johnsoniae* se cultivaron con agitación a 30 °C en cultivos de 5 ml en medio MM líquido (anexo 4) hasta llegar a una

densidad óptica de 1.1 a 620 nm. De estos cultivos, 100 µl se transfirieron a tubos con 5 ml de medio NM semisólido (8 g de agar por litro), cuya temperatura se había ajustado a 42 °C en un baño de agua. Los tubos se agitaron brevemente y el medio se vertió en placas NM estándar precalentadas. Después de esperar unos minutos para permitir que se solidifique el medio semisólido, se colocaron cuatro discos de papel (Oxoid) que contenían diferentes antibióticos en cada placa. Las placas se incubaron a 30 °C por 3 días y después se midió el diámetro de los halos que rodean cada disco de papel. Se evaluaron los antibióticos trimetoprima, cloranfenicol, vancomicina, neomicina, kanamicina, eritromicina, clindamicina, estreptomina, nitrofurantoína, tobramicina, ácido nalidíxico, gentamicina, tetraciclina, bacitracina y ampicilina.

6.2.- Ensayos de motilidad

Las mutantes y la cepa silvestre de *Flavobacterium* se estriaron en una caja Petri con medio sólido MC (anexo 4) sin antibiótico y crecieron por 3 días a 30 °C. Posteriormente se inoculó un poco de muestra con un asa en el centro de una placa con medio sólido MM y la placa se incubó de 3 a 4 días a 30 °C para posteriormente visualizar su deslizamiento.

6.3.-Efecto del pH del medio sobre la motilidad y la composición lipídica

Se hicieron ensayos de motilidad siguiendo el protocolo 6.2 pero en este caso utilizando cajas Petri con medio MM ajustado a diferentes pH (5, 6, 7, 8 y 9). Después de incubar las cajas se raspó el halo de movimiento y las células se resuspendieron en 1.5 ml de medio líquido MM como volumen final. Los lípidos se extrajeron y se analizaron siguiendo los protocolos 3.2 y 3.3, para después teñirlos con primulina (anexo 5.2).

6.4.-Efecto de diferentes concentraciones de nutrientes en el medio sobre la motilidad y la composición lipídica

Se hicieron ensayos de motilidad como descrito en el protocolo 6.2 utilizando medio MM con diferentes concentraciones de nutrientes. Se evaluaron diferentes diluciones del medio MM (1:2, 1:3, 1:5). Después de incubar las cajas se raspó el halo de gliding y las células se resuspendieron en 1.5 ml de medio líquido MM como volumen final. Los lípidos se extrajeron y se analizaron siguiendo los protocolos 3.2 y 3.3, para después teñirlos con primulina (anexo 5.2).

6.5.- Efecto de diferentes concentraciones de NaCl sobre la motilidad y la composición lipídica

Se hicieron ensayos de motilidad como descrito en el protocolo 6.2 utilizando medio MM con diferentes concentraciones de NaCl (0.327 M, 1 M, 1.5 M, 2.0 M). Después de incubar las cajas se raspó el halo de movimiento y las células se resuspendieron en 1.5 ml de medio líquido MM como volumen final. Los lípidos se extrajeron y se analizaron siguiendo los protocolos 3.2 y 3.3, para después teñirlos con primulina (anexo 5.2).

RESULTADOS

A continuación, solo se mencionan los resultados obtenidos de la mutante en el gen *fjoh_0833* de *Flavobacterium*, ya que no se logró construir una mutante en el gen *fjoh_2598*. Las posibles razones se plantean en la discusión.

Se obtuvo la mutante en el lípido de ornitina en *F. johnsoniae*, siguiendo los protocolos de la sección de metodología general. Por medio de un alineamiento múltiple de proteína (BLASTP) con el genoma de nuestro modelo de estudio y una proteína homóloga OlsF de *S. proteamaculans*, proteína ya identificada como responsable de la síntesis de lípidos de ornitina en *S. proteamaculans*, se propuso como candidato a el gen *fjoh_0833* con 30% de identidad, dicho gen presenta un tamaño de 1803 bp y su ID de acceso es: ABQ03867.1 (Fig. 9), posteriormente se mutó del genoma de *F. johnsoniae* por medio del plásmido suicida pYT354 que tiene resistencia a eritromicina y contiene el gen *sacB*, cabe mencionar que *F. johnsoniae* solo tiene un cromosoma circular por lo que la ubicación del gen *fjoh_0833* se encuentra entre 944 kb y 948 kb de este cromosoma. A continuación se detallan los resultados obtenidos de la construcción de la mutante en lípidos de ornitina de *F. johnsoniae*, siguiendo los protocolos de la metodología general.

Identificación de mutantes con delección del gen *fjoh_0833* y deficientes en la formación de OL

Entre las candidatas a recombinantes dobles de *F. johnsoniae* se buscaron candidatas sensibles a eritromicina, las cuales pudieran tener la mutación por delección del gen *fjoh_0833*, recordando que en la primera recombinación, *F. johnsoniae* tenía en su cromosoma al plásmido pYT354 con los sitios flanqueantes del gen a mutar confiriendo resistencia a eritromicina, sin embargo para lograr la selección de las candidatas a recombinantes dobles, se dio tratamiento con sacarosa, ya que este plásmido contiene el gen *sacB* (gen sensible a sacarosa)

por lo cual, se escindió todo el plásmido, perdiendo así la resistencia eritromicina junto con el gen *fjoh_0833*, logrando tener una recombinación homóloga y posibles candidatas a mutantes de dicho gen.

Los cultivos de estas candidatas se crecieron en presencia de [¹⁴C] ornitina, la cual se incorpora de manera específica en OLs. Posteriormente se extrajeron los lípidos y se separaron por cromatografía en capa fina (TLC) en una dimensión. Las candidatas 2 y 5 no producían OL (Fig. 12). Por medio de un PCR se verificó que estas candidatas presentaron la delección en el gen *fjoh_0833*. Utilizando ADN genómico de ambas candidatas como templado, se amplificó un fragmento de 2 kb mientras que a partir de ADN genómico de la cepa silvestre (WT) se amplificó un fragmento de 3.8 kb que corresponde a la amplificación del gen *fjoh_0833* (1.8 kb) más las regiones flanqueantes del mismo. Esto indica que ambas candidatas poseen la mutación deseada y se tomó a la mutante 5 para hacer las posteriores caracterizaciones. Esta mutante se llamó MALO 01 (Fig. 13).

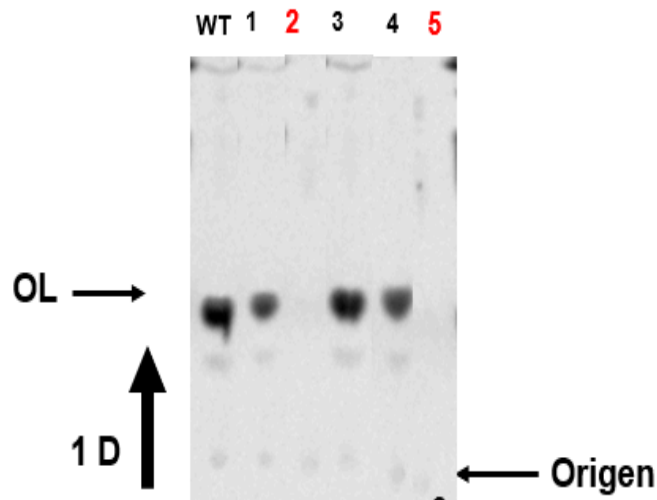


Figura 12.- Identificación de mutantes que no sintetizan OL. TLC en una dimensión de lípidos marcados con [¹⁴C] ornitina y extraídos de candidatas a tener la delección del gen *fjoh_0833* en *F. johnsoniae*. Carril WT: Cepa silvestre. Carriles 1,3,4: Candidatas que producen OL. Carriles 2 y 5: Candidatas que no producen OL.

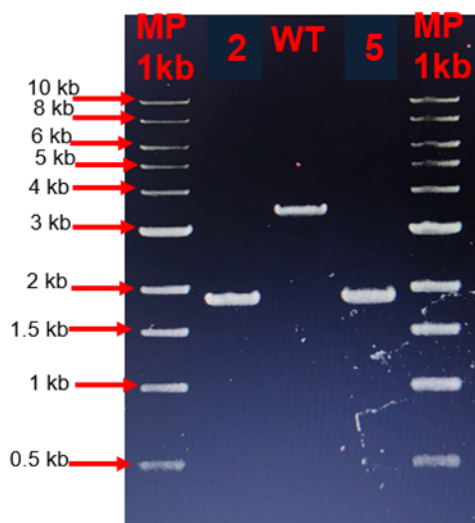


Figura 13.- Confirmación de la delección del gen *fjoh_0833* en mutantes que no producen OL. Gel de agarosa al 1% de fragmentos de DNA amplificado por PCR a partir de ADN genómico de cepas de *F. johnsoniae*. Carriles 1 y 5: Marcador de peso molecular de 1 kb DNA Ladder. Carril 3: WT, fragmento de ADN de 3.8 kb corresponde al gen *fjoh_0833* (1.8 kb), río arriba (1 kb) y río abajo (1 kb). Carriles 2 y 4: Mutantes en OL, se nombra la mutante 5 como MALO 01, fragmento de DNA de 2 kb que corresponde al gen río arriba (1 kb) y río abajo (1 kb).

Caracterización de la mutante MALO 01 deficiente en la formación de lípidos de ornitina de *F. johnsoniae*.

-Crecimiento y composición lipídica de la mutante MALO 01 en los medios de cultivo MM y MC

La mutante MALO 01 y la cepa silvestre (WT) de *F. johnsoniae* se cultivaron en los medios MC (medio de carne, de alto nutriente) y MM (medio de movilidad, de bajo nutriente) (anexo 4, Fig. 14). Se observó un ligero retraso en el crecimiento de MALO 01 con respecto a la WT en medio MC, sin embargo, a las 25 h MALO 01 alcanzó la D.O de la WT. En medio MM se observó un mayor retraso en el crecimiento las primeras 10 h de la mutante con respecto a la WT, a las 25 h el retraso se redujo, pero no llegó a alcanzar a la WT. Al evaluar el perfil lipídico de

WT y MALO 01 en medio MC y MM en una TLC de dos dimensiones (Fig. 15), se observó que, en los dos medios de cultivo evaluados, MALO 01 no produjo OL ni SGL. Además, se notó un aumento de PE en comparación con la WT. A partir de las TLC, se cuantificó la composición lipídica con el programa ImageQuant 5.2 (Tabla 3). En la mutante MALO 01 se detectó 5.9 veces más PE en medio MM y 1.35 veces más PE en medio MC con respecto a la WT. También se observó un incremento de los ácidos grasos (FA) en la mutante MALO 01, en medio MM se produjeron 13.8 veces más y en medio MC se produjeron 4.7 veces más de FA comparado con la WT. La evaluación del perfil lipídico y composición en estos dos medios de cultivo tiene la finalidad ver el comportamiento en un medio con alto nutriente MC y un medio con bajo nutriente MM.

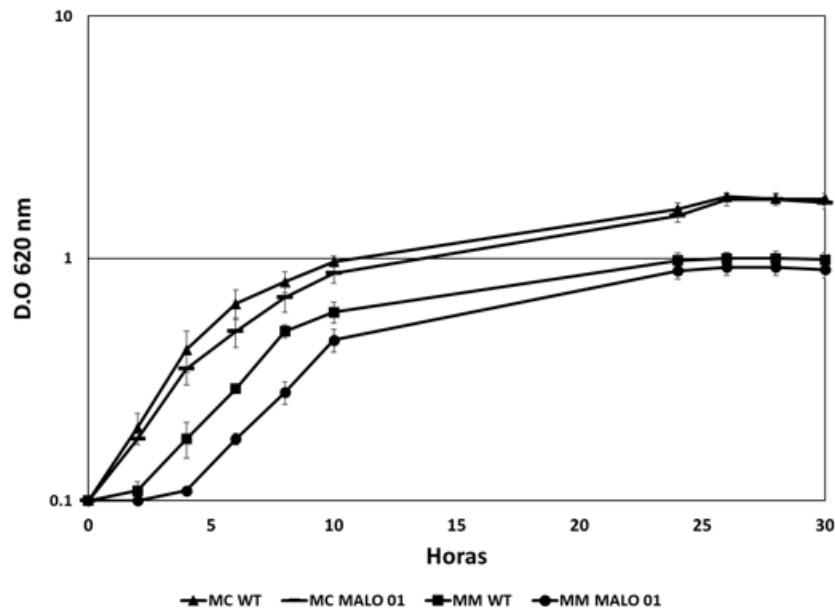


Figura 14.- La mutante MALO 01 muestra un retraso de crecimiento en medio MM y MC. Curvas de crecimiento de *F. johnsoniae* WT y la mutante MALO 01 en medio MC y MM. Eje X: Tiempo en horas, Eje Y: Densidad óptica a 620 nm, WT: *F. johnsoniae* cepa silvestre, MALO 01: *F. johnsoniae* $\Delta fjoH_{0833}$, MM: Medio de movilidad, MC: Medio con extracto de carne.

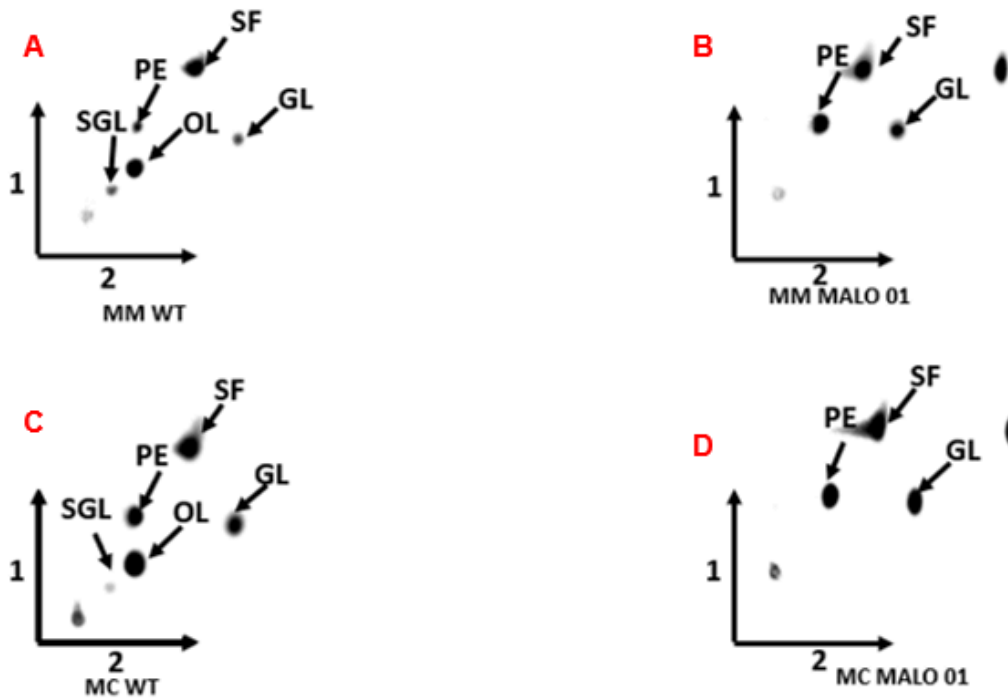


Figura 15.- TLC en dos dimensiones de lípidos marcados con acetato [^{14}C] de cepas de *F. johnsoniae*. Fosfatidiletanolamina (PE); Lípido de ornitina (OL); Sulfonolípido (SF); Lípido de glicina (GL); Lípido de serina glicina (SGL); A.- WT (*F. johnsoniae* cepa silvestre) en medio MM (Medio de movilidad); B.- MALO 01 (*F. johnsoniae* $\Delta fjoH_0833$) en medio MM; C.-WT en medio MC (Medio con extracto de carne); D.-MALO 01 en medio MC.

Tabla 3.- Comparación de la composición de lípidos de la mutante MALO 01 y la cepa WT de *F. johnsoniae*. Los lípidos fueron marcados con [¹⁴C] acetato y cuantificados con el programa ImageQuant 5. Fosfatidiletanolamina (PE). Lípido de ornitina (OL) Sulfonolípido (SF). Lípido de glicina (GL). Lípido de glicina serina (SGL). Sin datos o nada detectado (ND), WT: *F. johnsoniae* cepa silvestre, MALO 01: *F. johnsoniae* $\Delta fjoH_0833$, MM: Medio de movilidad, MC: Medio con extracto de carne.

Lípidos	WT MC	MALO 01 MC	WT MM	MALO 01 MM
SF	20.36 ± 0.67	24.49 ± 0.7	38.96 ± 0.12	40.39 ± 0.54
GL	17.84 ± 0.64	16.97 ± 0.31	12.61 ± 0.19	14.13 ± 0.41
PE	23.94 ± 0.1	32.35 ± 0.26	3.87 ± 0.3	22.86 ± 0.19
SGL	1.6 ± 0.3	ND	8.31 ± 0.1	ND
OL	30.72 ± 0.5	ND	34.61 ± 0.35	ND
FA	5.53 ± 0.1	26.18 ± 0.5	1.63 ± 0.12	22.62 ± 0.32

-Análisis de la composición lipídica de la mutante MALO 01 y la mutante complementada en los medios de cultivo MM y MC

Se evaluó el perfil lipídico de la mutante MALO 01 con el plásmido pcP23 vacío y con el plásmido pcP2301 (Tabla 1) en los medios MM y MC (anexo 4) en una TLC de dos dimensiones (Fig. 16). En ambos medios de cultivo evaluados, MALO 01 con plásmido vacío no produjo OL ni SGL, a diferencia de MALO 01 complementada con el gen *fjoH_0833* en *trans*, que recupera la producción de OL y SGL en ambas condiciones (Fig. 16-A), por lo que se comprueba la complementación del gen *fjoH_0833* en MALO 01 y se confirma la participación del producto del gen *fjoH_0833* en la síntesis de OL y de SGL.

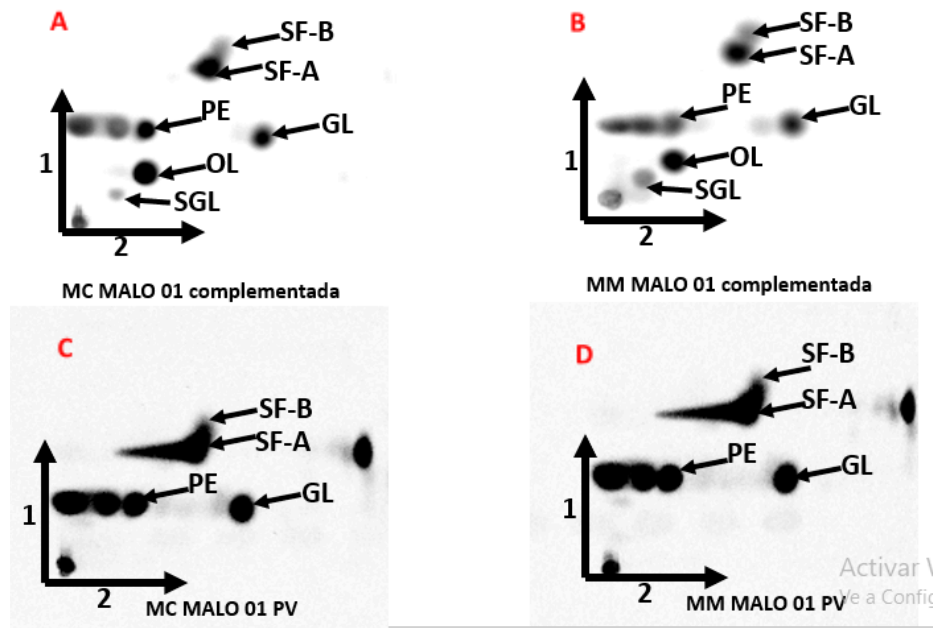


Figura 16.- Análisis lipídico de la complementación de la mutante MALO 01. A.- MALO 01 complementada (MALO 01-C): MALO 01/pcP23/*fjoh_0833* en medio con extracto de carne (MC). B.- MALO 01-C en medio de movilidad (MM). C.- MALO 01 PV: MALO 01/pcP23 (Mutante con plásmido vacío) en medio MC. D.-MALO 01 PV en medio MM. Fosfatidiletanolamina (PE). Lípido de ornitina (OL) Sulfonolípido (SF). Lípido de glicina (GL). Lípido de glicina serina (SGL).

-La mutante MALO 01 muestra un perfil de resistencia a antibióticos diferente al de la cepa silvestre.

Modificaciones de la composición lipídica de una célula pueden afectar la permeabilidad de la membrana y de esta manera afectar la susceptibilidad de la misma a antibióticos y otros xenobióticos. Se realizó un antibiograma con discos de papel Oxoid de la mutante MALO 01 y la cepa silvestre de *F. johnsoniae*. Se

observó que la mutante MALO 01 es más sensible que la cepa silvestre a vancomicina, neomicina, kanamicina, gentamicina, ácido nalidíxico y tetraciclina. Por otro lado, MALO 01 muestra una mayor resistencia que la cepa silvestre a cloranfenicol, nitrofurantoína y ampicilina (Fig. 17).

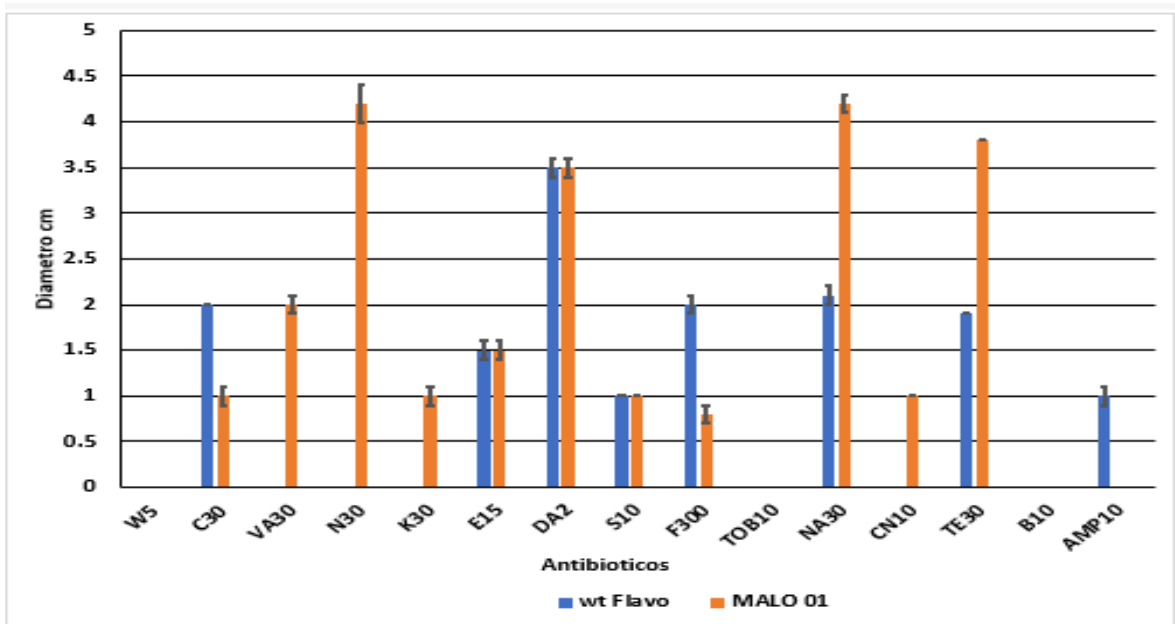


Figura 17.- La mutante MALO 01 muestra un perfil de resistencia diferente en comparación con la cepa silvestre de *F. johnsoniae*. Antibiograma obtenido con discos de papel (Oxoid). Eje x: Antibióticos en discos de papel (Oxoid), Eje Y: Diámetro en cm del halo de inhibición por cada disco de antibiótico, la medición se hizo con regla, cada experimento se realizó por triplicado, WT: *F. johnsoniae* cepa silvestre, MALO 01: *F. johnsoniae* $\Delta fjoH_{0833}$, MC: Medio con extracto de carne. W5: trimetoprima 5; C30: cloranfenicol 30; VA30: vancomicina 30; N30: neomicina 30; K30: kanamicina 30; E15: eritromicina 15; DA2: clindamicina 2; S10: estreptomicina 10; F300: nitrofurantoína 300; TOB10: tobramicina 10; NA30: ácido nalidíxico 30; CN10: gentamicina 10; TE30: tetraciclina 30; B10: bacitracina 10; AMP10: ampicilina 10.

-La mutante MALO 01 muestra una motilidad por deslizamiento (gliding) reducido

Se evaluó la capacidad de gliding de la mutante MALO 01 con respecto a la cepa silvestre de *F. johnsoniae* (WT) midiendo el diámetro del área ocupada por

las células. Después de cuatro días, el diámetro de movimiento final de la WT fue de 6.3 cm \pm 0.7 (Fig. 18-A), y el diámetro de la mutante MALO 01 fue de 1.3 cm \pm 0.2 (Fig. 18-B). Esto indica que la ausencia de OLS reduce el movimiento por gliding de MALO 01, también se puede notar un aumento de un pigmento amarillo que probablemente es zeaxantina en la mutante MALO 01 que quizás también se deba a esta falta de gliding (Fig. 18).

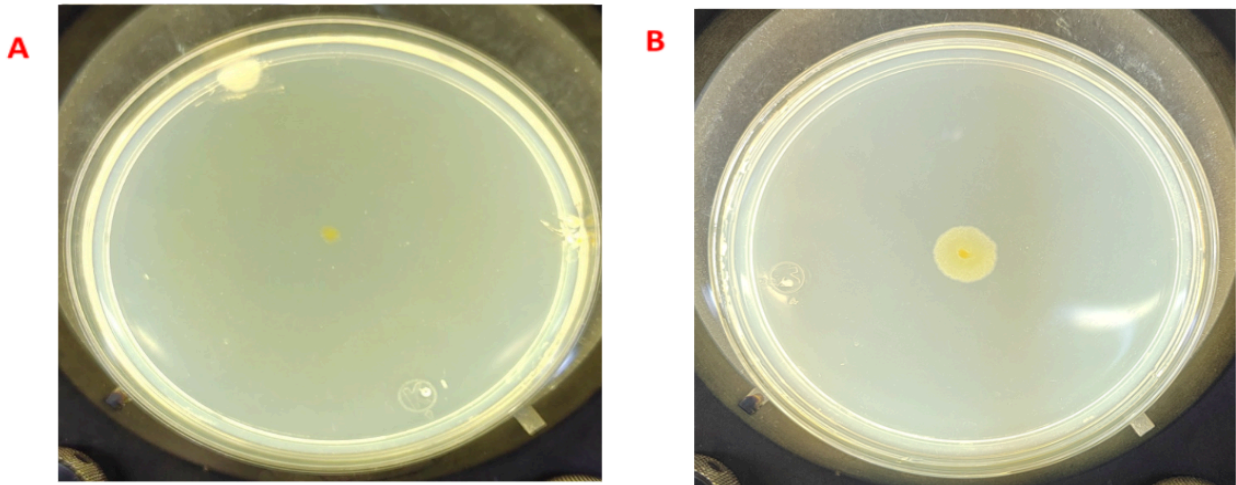


Fig. 18 La mutante MALO 01 muestra una motilidad por deslizamiento (gliding) reducida. Movimiento por gliding de *F. johnsoniae* en medio MM después de cuatro días. A.- *F. johnsoniae* cepa silvestre (WT) en medio MM ; B.- MALO 01 (*F. johnsoniae* Δf_{joh_0833}) en medio MM. MM: medio de movilidad.

-Ensayo de motilidad por gliding de la mutante de *F. johnsoniae* MALO 01 (Δf_{joh_0833}) complementada

Se evaluó la capacidad de gliding de la mutante de *F. johnsoniae* deficiente en el gen *fjoh_0833* (MALO 01) con el plásmido pcP23 vacío (MALO 01 PV) y MALO 01 con el plásmido pcP23 y el gen *fjoh_0833* clonado (MALO 01-C). Las cajas Petri se incubaron por cuatro días. La mutante MALO 01-C recuperó la

motilidad por gliding (Fig. 19, A), mientras que, la mutante MALO 01 con el plásmido vacío mostró una motilidad por gliding reducida (Fig. 19, B).

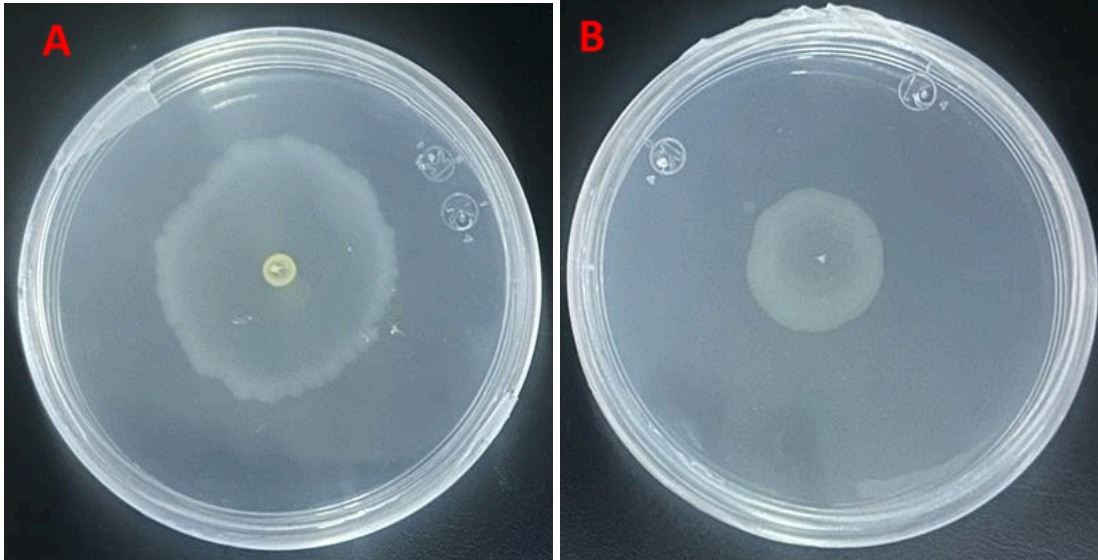


Figura 19.- La mutante MALO 01, complementada con el gen *fjoh_0833* en *trans* muestra una recuperación de la motilidad por gliding. Movimiento por gliding de la mutante MALO 01 derivada de *F. johnsoniae* UW101 en cajas Petri con medio MM después de cuatro días. **(A)** MALO 01-C: MALO 01/pcP23/ *fjoh_0833*; **(B)** MALO 01 PV: MALO 01/pcP23 (Mutante con plásmido vacío), MM: medio de movilidad.

-La cepa silvestre de *F. johnsoniae* y la mutante MALO 01 muestran la mayor motilidad por gliding a pH 8

Se evaluó la capacidad de gliding en medio MM ajustado a diferentes pH (5,6,7,8 y 9) de la cepa silvestre de *F. johnsoniae* y de la mutante MALO 01. En medio MM a pH 5, 5.5 o 9 tanto WT como MALO 01 no presentaron movimiento (Tabla 4). A los pH 7.5 y 8 la WT mostró la mayor capacidad de gliding. La mutante MALO 01 mostró una capacidad de gliding muy reducido en un rango de pH 7 a 8.5 con un máximo a pH 8. Se rasparon las células de las cajas Petri, posteriormente se extrajeron y analizaron los lípidos para cada pH evaluado. No

se observaron diferencias fenotípicas en el perfil lipídico, tanto de la cepa WT (Fig. 20, A y C), como de MALO 01 (Fig. 20, B y D).

Tabla 4. Capacidad de gliding de la cepa mutante de *F. johnsoniae* deficiente en la formación de OL (MALO 01) y de cepa silvestre de *F. johnsoniae* (WT) en medio MM a diferentes pH. Diámetro presentado en promedio en cm \pm desviación estándar evaluado después de 4 días. (anexo 5.4 para ver los buffers ocupados)

Medio MM ajustado al pH	WT (Diámetro en cm)	MALO 01 (Diámetro en cm)
5	-	-
5.5	-	-
6	0.8 \pm 0.1	0.7 \pm 0.2
6.5	1.7 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1
7	2.9 \pm 0.1	1.3 \pm 0.2
7.5	3.7 \pm 0.3	1.4 \pm 0.1
8	5.2 \pm 0.2	1.9 \pm 0.1
8.5	2.1 \pm 0.1	1.3 \pm 0.2
9	-	-

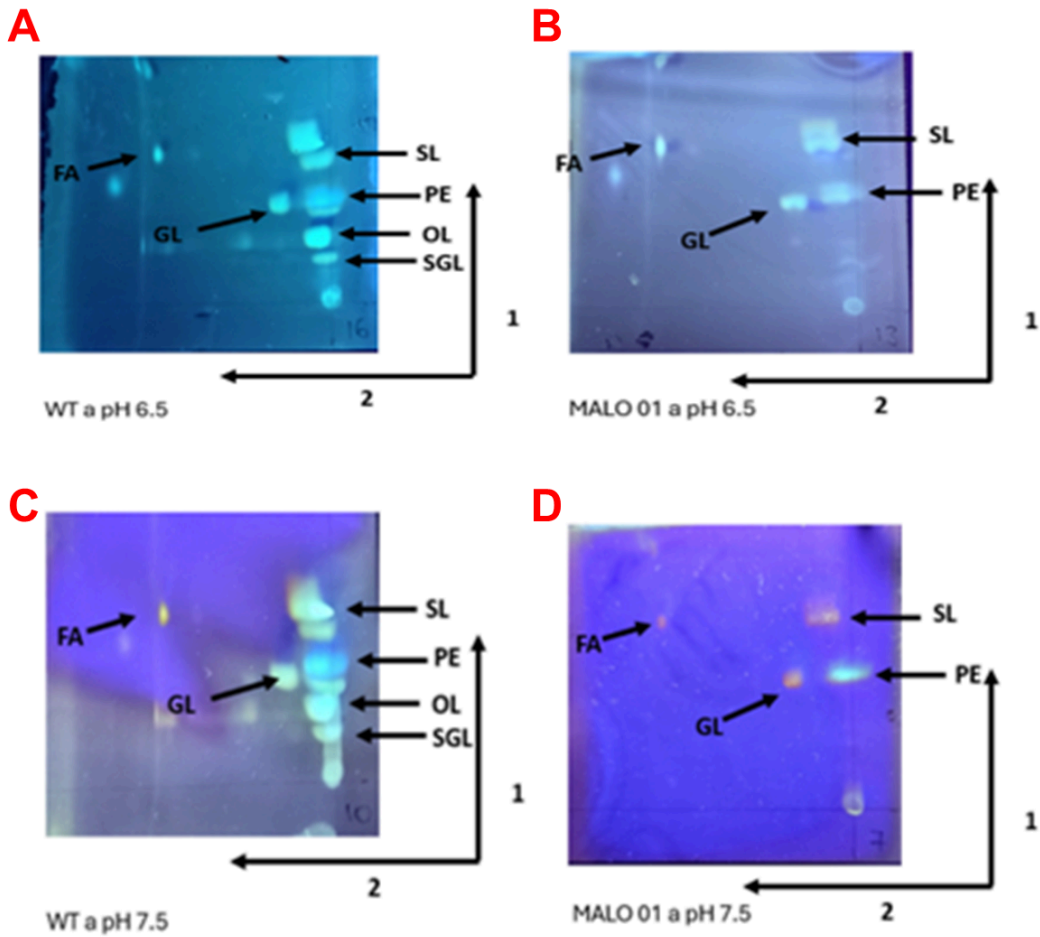


Figura 20.- TLC en dos dimensiones de lípidos totales extraídos de bacterias recuperadas de ensayos de gliding en medio MM sólido a pH 6.5 o 7.5. (A) WT: *F. johnsoniae* cepa silvestre a pH 6.5, (B) MALO 01 a pH 6.5, (C) WT a pH 7.5, (D) MALO 01 a pH 7.5. Fosfatidiletanolamina (PE), lípido de ornitina (OL), sulfonolípido (SF), lípido de glicina (GL), lípido de glicina serina (SGL). Las placas de TLCs fueron teñidas con primulina y reveladas con luz UV.

-La motilidad por gliding de *F. johnsoniae* aumenta en medio de cultivo diluido

Se evaluó la capacidad de gliding de la cepa silvestre de *F. johnsoniae* y de la mutante MALO 01 en diferentes diluciones del medio de cultivo. Se utilizaron diferentes diluciones del medio MM (1:1, 1:2, 1:4, 1:8) a pH de 7.5. La cepa silvestre aumenta su capacidad de gliding en medio de cultivo diluido llegando a un aumento del 60% en un medio de cultivo diluido 1:8 (Fig. 21, A y B). Por otra parte, se encontró que MALO 01 reduce su motilidad aún más cuando se crece en medio de cultivo diluido (Fig. 21, C y D) (Tabla 5). También se aislaron las bacterias de las cajas Petri, se extrajeron los lípidos y se separaron por TLC. Comparando los perfiles lipídicos no se observaron diferencias significativas entre los perfiles de lípidos.

Tabla 5. Comparación de la capacidad de gliding de la mutante MALO 01 y de la cepa silvestre de *F. johnsoniae* (WT) en diferentes diluciones de medio MM. Las cajas Petri fueron evaluadas después de 4 días. Diámetro presentado en promedio en cm \pm desviación estándar.

Medio MM: dilución	WT (Diámetro en cm)	MALO 01 (Diámetro en cm)
1:1	5.0 \pm 0.1	1.4 \pm 0.1
1:2	5.5 \pm 0.1	1.3 \pm 0.1
1:4	6.5 \pm 0.3	0.8 \pm 0.1
1:8	8.2 \pm 0.2	0.9 \pm 0.6

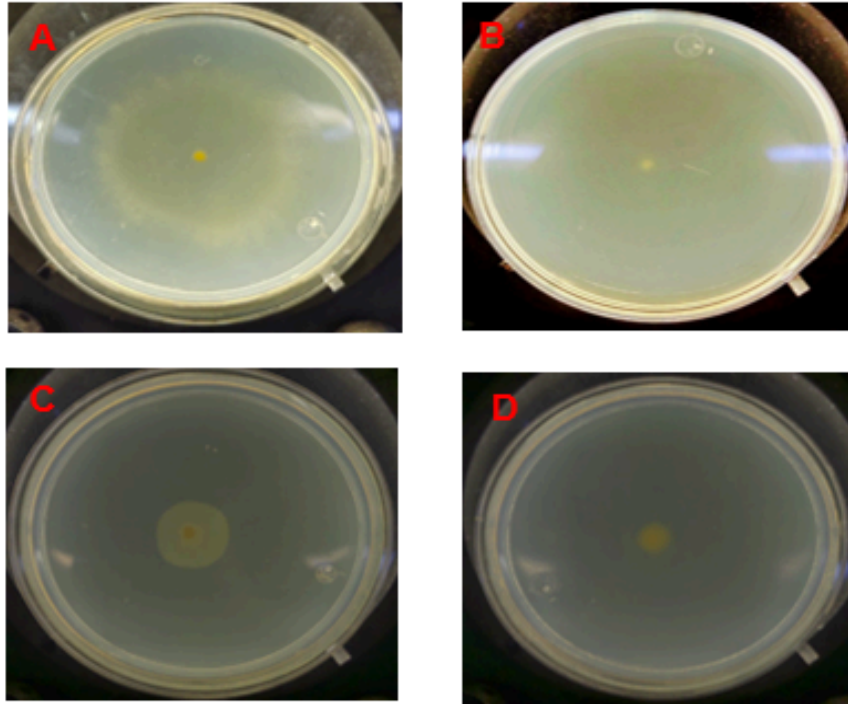


Fig. 21 La motilidad por gliding de *F. johnsoniae* aumenta en medio de cultivo diluido. La motilidad de las cepas fue evaluada a los cuatro días. A.- *F. johnsoniae* (WT), en medio MM dilución 1:1. B.- WT, en medio MM dilución 1:8. C.- *F. johnsoniae* MALO 01, en medio MM dilución 1:1. D.- MALO 01 en medio MM dilución 1:8.

-La concentración de NaCl en el medio de cultivo afecta la motilidad por gliding de *F. johnsoniae*

Se evaluó la capacidad de gliding de la cepa silvestre de *F. johnsoniae* y de la mutante MALO 01 deficiente en la formación de OLs en medio MM suplementado con diferentes concentraciones de NaCl (0.037, 0.1, 0.15, y 0.2 M) después de cuatro días. La motilidad por gliding de la cepa silvestre WT se redujo drásticamente a mayores concentraciones de sal. A 0.037 M de NaCl se redujo su motilidad 2.5 veces y a 0.15 M se redujo su motilidad 7.5 veces. La mutante MALO 01 muestra una motilidad reducida en todas las condiciones de NaCl probadas (Tabla 6). De manera interesante, se encontró que tanto la cepa silvestre como la mutante MALO 01 tenían una motilidad más reducida a 0.2 M de NaCl a los 4

días, por lo que se evaluaron hasta los 12 días en esta concentración (Tabla 7, datos con *).

Los niveles individuales de algunos lípidos sí presentaron cambios tanto en la WT como en la mutante cuando se incrementaron las concentraciones de NaCl (Tabla 7 y Fig. 22)

La cepa silvestre incrementó los niveles de lípidos de glicina conforme se incrementaron las concentraciones de NaCl, en concreto, los niveles que produjo a 0.2 M fueron hasta casi 3 veces más que cuando creció a 0.375 M (Fig. 22 A y C). Por otro lado, los niveles del lípido de serina glicina disminuyeron mientras se incrementaron las concentraciones de sal, incluso hasta no ser detectados a 0.2 M de NaCl (Fig. 22 A, C y Fig. 23 A).

Por su parte, en la mutante MALO 01 también se observan algunos cambios en los niveles de los lípidos de membrana conforme se aumenta la concentración de NaCl. Por ejemplo, se observa un claro aumento de GL al aumentar la concentración de sal a 0.037M (Fig. 22 B, D), además de un aumento de la producción de ácidos grasos (FA), específicamente a 0.15 M (Tabla 7 y Fig. 23, B).

Tabla 6. Comparación de la capacidad de gliding de la mutante MALO 01 y de la cepa silvestre de *F. johnsoniae* (WT) en diferentes concentraciones de NaCl. Las cajas Petri fueron evaluadas después de 4 días. *el estudio de motilidad con 0.2 M de NaCl, se realizó después de 12 días, ya que a los 4 días no había observado crecimiento. Diámetro presentado en promedio en cm \pm desviación estándar.

NaCl (M)	WT (Diámetro en cm)	MALO 01 (Diámetro en cm)
0	6.3 \pm 0.7	1.3 \pm 0.02
0.037	2.5 \pm 0.1	1.1 \pm 0.1
0.1	1.4 \pm 0.2	1.0 \pm 0.2
0.15	0.8 \pm 0.1	1.1 \pm 0.1
*0.2	1.4 \pm 0.1	1.3 \pm 0.1
0.4	-	-
0.8	-	-

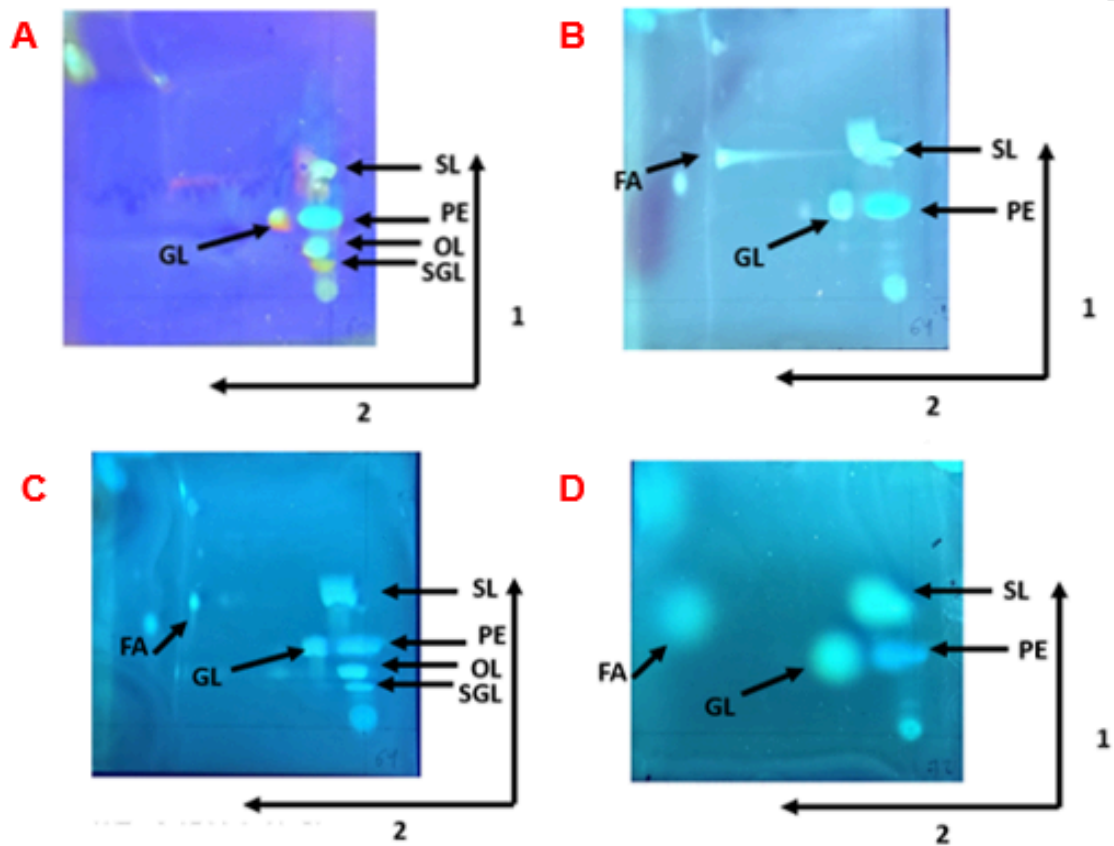


Figura 22.- TLC en dos dimensiones de lípidos totales extraídos de bacterias crecidas en medio MM sólido con diferentes concentraciones de NaCl. Las placas de TLC fueron teñidas con primulina. Fosfatidiletanolamina (PE), lípido de ornitina (OL), sulfonolípido (SF), lípido de glicina (GL), lípido de glicina serina (SGL). A.- WT: *F. johnsoniae* cepa silvestre, en medio MM con 0.037 M de NaCl. B.-MALO 01 en medio MM con 0.037 M de NaCl C.- WT, en medio MM con 0.15 M de NaCl. D.-MALO 01, en medio MM con 0.15 M de NaCl.

Tabla 7. Comparación de la composición de lípidos de cepas de *F. johnsoniae* sometidos por 4 días a diferentes concentraciones de NaCl. Los lípidos se cuantificaron con el programa ImageQuant 5. Fosfatidiletanolamina (PE), lípido de ornitina (OL), sulfonolípido (SF), lípido de glicina (GL), lípido de glicina serina (SGL). WT: *F. johnsoniae* cepa silvestre, MALO 01: *F. johnsoniae* Δf_{joh_0833} , MM: Medio de movilidad, -: sin datos.

*El estudio de motilidad con 0.2 M de NaCl se realizó después de 12 días, ya que a los 4 días no se había observado crecimiento.

	WT	MALO 01	WT	MALO 01	WT	MALO 01	WT	MALO 01	WT	MALO 01	WT	MALO 01
	SF		PE		GL		FA		OL		SGL	
Sin NaCl	39.0 ± 0.1	40.4 ± 0.5	3.9 ± 0.3	22.9 ± 0.2	12.6 ± 0.2	14.1 ± 0.4	1.6 ± 0.1	22.6 ± 0.3	34.6 ± 0.4	-	8.3 ± 0.1	-
0.375M	38.1 ± 1.0	29.4 ± 0.4	21.4 ± 0.1	21.0 ± 0.1	13.6 ± 0.4	35.2 ± 0.1	-	14.3 ± 0.4	20.5 ± 0.7	-	8.4 ± 0.6	-
0.1M	31.8 ± 1.0	37.9 ± 1.3	22.1 ± 0.01	24.3 ± 0.2	17.6 ± 0.5	24.1 ± 0.2	7.3 ± 0.2	13.6 ± 1.1	14.4 ± 0.3	-	6.8 ± 0.9	-
0.15M	31.0 ± 0.3	41.2 ± 0.9	23.3 ± 1.2	19.0 ± 0.1	28.9 ± 0.1	18.1 ± 0.4	6.4 ± 0.3	21.7 ± 0.8	8.2 ± 0.2	-	2.2 ± 0.8	-
*0.2M	26.7 ± 0.2	38.2 ± 0.2	20.4 ± 0.4	31.9 ± 0.1	36.8 ± 1.1	19.5 ± 0.6	-	10.5 ± 0.7	16.1 ± 1.0	-	-	-

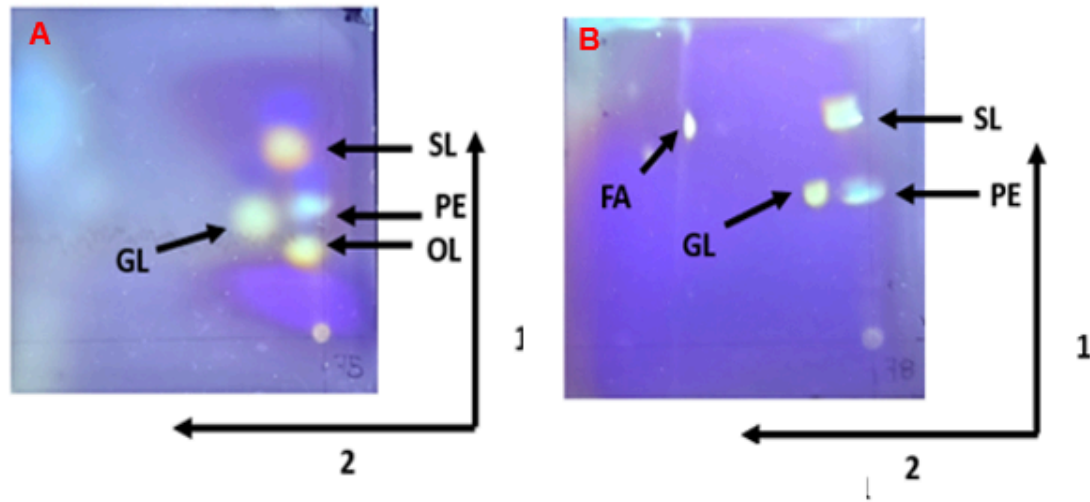


Figura 23.- TLC en dos dimensiones de lípidos extraídos de bacterias crecidas en medio MM sólido con diferentes concentraciones de NaCl. Las capas de TLC fueron teñidas con primulina. Fosfatidiletanolamina (PE), lípido de ornitina (OL), sulfonolípido (SF), lípido de glicina (GL), lípido de glicina serina (SGL). A.- WT: *F. johnsoniae* cepa silvestre, en medio MM con 0.2 M de NaCl. B.-MALO 01: *F. johnsoniae* Δ *fjoh_0833, en medio MM con 0.2 M de NaCl.*

DISCUSIÓN

Las membranas bacterianas están compuestas principalmente por proteínas y lípidos. Estos lípidos frecuentemente son glicerofosfolípidos, como es el caso de la muy estudiada *E. coli* (Madigan et al., 2009). Existen otras bacterias que contienen además de los glicerofosfolípidos lípidos sin fósforo. Estos últimos en algunos casos pueden formar la mayoría de los lípidos de membrana, como es el caso de *F. johnsoniae*. *F. johnsoniae* contiene la fosfatidiletanolamina (PE) como único fosfolípido en su membrana, presentando mayoritariamente lípidos libres de fosfato como sulfonolípidos (SF), lípidos de ornitina (OL), lípidos de glicina (GL) y lípidos de serina glicina (SGL) (Sohlenkamp & Geiger, 2016). En este trabajo, utilizando alineamiento de secuencias proteicas, identificamos al gen *fjoh_0833* como posible responsable de la biosíntesis del lípido de ornitina (OL) en *F. johnsoniae*. Posteriormente construimos una mutante por delección del gen *fjoh_0833* y la nombramos MALO 01, dicha mutante fue caracterizada en su perfil lipídico, resistencia a diversos antibióticos, estrés osmótico y en su capacidad de motilidad por gliding.

El análisis del perfil de lípidos de la mutante MALO 01 demuestra que no puede producir OL ni en medio con extracto de carne ni en medio de movilidad. De manera interesante tampoco pudo detectarse la presencia de SGL en esta mutante, mientras que la cepa silvestre si lo produjo bajo las mismas condiciones. De hecho, la mutante MALO 01 produjo de 5 a 11 veces más ácidos grasos libres que la cepa silvestre en medio MC y MM, respectivamente. También observamos otro recambio de lípidos en *F. johnsoniae* WT al someterse a 0.2 M de NaCl en medio MM. En dicha concentración, la cepa silvestre deja de sintetizar el lípido de serina glicina (SGL) y aumenta casi 3 veces el lípido de glicina. Bertrand y colaboradores (Bertrand *et al.*, 2016) observaron en *S. meliloti* que al crecer en un medio con una alta concentración de sal, la bacteria presenta una reducción en serina y un aumento significativo de glicina y cisteína, moléculas clasificadas como osmoprotectores. En dicho estudio los aminoácidos se extrajeron de nódulos de legumbres, y se estudiaron concentraciones de sal en el orden de magnitud de

mM, es decir, no se sometió a un estrés elevado como es el caso de nuestro estudio. Podríamos hipotetizar que el aumento del lípido de glicina en *Flavobacterium* en esta condición de alta salinidad se deba a una mayor síntesis del aminoácido precursor glicina, y la reducción del lípido de serina glicina se deba a una reducción de serina, todo esto como una estrategia de adaptación al estrés osmótico. Sin embargo, esta relación entre la proporción de síntesis de lípidos y aminoácidos no se ha comprobado (Bertrand *et al.*, 2016; Ragaey *et al.* 2022).

Trabajos previos han mostrado la capacidad bacteriana para reemplazar lípidos de membrana en condiciones específicas de estrés. Un caso bien estudiado es el de *E. coli* cuando se crece a distintas temperaturas. Cuando se disminuye la temperatura de crecimiento, *E. coli* incrementa la cantidad de ácidos grasos insaturados para ajustar la fluidez de la membrana. En el caso opuesto, cuando se incrementa la temperatura, la bacteria aumenta los ácidos grasos saturados (Sohlenkamp & Geiger, 2016). Un reporte interesante es el de *R. tropici* que cuando crece bajo condiciones de acidez activa el operón *lpiA/atvA* que en consecuencia lleva a producir el lípido catiónico lisil-PG (LPG), el cual se ha demostrado tener un papel importante en la resistencia a péptidos catiónicos y antibióticos (Sohlenkamp & Geiger, 2016). Por otro lado, en diversas bacterias se ha demostrado que cuando crecen en condiciones de alta osmolaridad aumentan la producción del lípido CL, la cual controla la actividad del osmosensor ProP que a su vez desencadena la producción de prolina para contener contra la presión osmótica (Sohlenkamp & Geiger, 2016). Otro caso bien estudiado es el de *S. meliloti*, que cuando crece en medio con altos nutrientes produce glicerofosfolípidos, tales como PE, PG, o PC (Sohlenkamp *et al.*, 2004). Sin embargo, cuando la bacteria crece en condiciones de limitación de fosfato, los lípidos con fósforo disminuyen significativamente y se comienzan a producir lípidos libres de fósforo, tales como un sulfolípidos, OL y diacilgliceril-*N,N,N*-trimetilhomoserina (DGTS) (Zavaleta-Pastor *et al.*, 2010). Los reemplazos de fosfolípidos por lípidos sin fósforo o viceversa se han estudiado en diversos organismos: en *Saccharomyces cerevisiae* lograron reemplazar funcionalmente a nivel membranal a PC con DGTS (Riekhof *et al.*, 2014), además

en una mutante de *Agrobacterium tumefaciens* que no produce OL se incrementa la producción de PE considerablemente (Vences-Guzmán *et al.*, 2013). Por lo tanto, considerando las características de carga y de tamaño, se sugiere que los fosfolípidos PE, PG y PC pueden ser reemplazados funcionalmente (y viceversa) por OL, SF y DGTS, respectivamente (Sohlenkamp & Geiger, 2016). Estos resultados sugieren que podría haber un recambio lipídico en la mutante MALO 01 como una estrategia de la bacteria para compensar la pérdida de OL, recompensándolo con PE.

Caracterizando la mutante deficiente en la formación de OL, se observó que MALO 01 muestra diferentes niveles de sensibilidad a varios de los antibióticos analizados, mostrando resistencia únicamente a cloranfenicol, nitrofurantoína y ampicilina. Gran parte de los antibióticos probados a los cuales MALO 01 no muestra resistencia son clasificados como aminoglucósidos (ej. Neomicina, Kanamicina, Estreptomicina, Tobramicina, Gentamicina) los cuales tienen carga positiva y generalmente son atraídos a las cargas negativas de la membrana, frecuentemente de los grupos fosfatos de los fosfolípidos (Halawa *et al.*, 2024). En la mutante MALO 01 el nivel de PE aumenta de 24% a 32% en medio MC con respecto de la cepa silvestre, lo que podría sugerir que también aumenta el blanco de estos antibióticos en esta mutante repercutiendo negativamente en su resistencia. Por otro lado, MALO 01 mostró resistencia a cloranfenicol, el cual ingresa a la bacteria de forma pasiva debido a sus propiedades liposolubles. Probablemente ante la ausencia de OL y SGL, el aumento de PE (un lípido de volumen cónico) provoca un cambio en la rigidez de la membrana, por lo tanto complicaría la integración de estos antibióticos. Por su parte tanto la ampicilina como la nitrofurantoína, un β -lactámico y un nitrofurano, respectivamente, se integran a través de porinas, conocido como transporte activo. Cambios en las porinas de la membrana externa tanto de *E. coli* como de *K. pneumoniae* le permiten resistir a la nitrofurantoína (Khamari & Bulangonda, 2024). Se podría sugerir que al existir un rearrreglo en la membrana de *F. johnsoniae* afectaría la conformación de las porinas de membrana externa, como sucede en otros casos con sistemas de dos componentes que se alteran al existir un cambio a nivel de

membrana (Geiger *et al.*, 2021), permitiéndole a MALO 01 disminuir la incorporación tanto de la nitrofurantoína como de la ampicilina con respecto de la cepa silvestre.

Debido a que *F. johnsoniae* es un modelo de estudio de la motilidad por gliding, nos resultó importante estudiar el gliding en ausencia de OL. Por ello, se puso a prueba la capacidad de motilidad de la mutante MALO 01 en medio MM comparado con la cepa silvestre. Se observó que la mutante fue afectada en la motilidad por gliding al someterla a diferentes estreses abióticos. Específicamente, observamos que *Flavobacterium* (WT) aumenta su capacidad por gliding a medida que se somete a un medio menos nutritivo a partir de la dilución de un medio de movilidad MM, siendo la dilución máxima 1:8. Por otro lado, también observamos que cuando utilizamos estrés abiótico de sal, *Flavobacterium* disminuye su capacidad por gliding gradualmente a medida que aumentamos la concentración NaCl en medio MM. Con este resultado se abren nuevas interrogantes en el presente trabajo, donde se plantea probar un medio de composición sencilla con nutrientes y sal controlados para realmente descartar o comprobar que el aumento en la motilidad por gliding se deba a una disminución de nutrientes y no por la misma reducción de concentración de sal que se da en las diluciones analizadas en el estudio de bajos nutrientes. Sin embargo, no descartamos que el OL pueda tener relación en estos dos tipos de estrés abiótico ya que puede estar involucrado en el funcionamiento del sistema de secreción tipo IX (T9SS). *F. johnsoniae* requiere una alta motilidad de sus adhesinas a través de la membrana para ejecutar adecuadamente el gliding y a su vez las adhesinas requieren del T9SS para poder ser transportadas a la superficie bacteriana (Mcbride and Nakane, 2015). Adicionalmente, se sugiere que la membrana externa debería ser flexible y fluida para permitir la motilidad de las adhesinas de manera correcta (Cao & Wall, 2020). Un estudio en *F. johnsoniae* descubrió que mutantes que no producen SF se ven afectadas en la resistencia a diversos antibióticos y a pesar de que crece normalmente en medio líquido, presenta afectaciones en el gliding (Vences-Guzmán *et al.*, 2021). Observamos que, ante la ausencia de los SF los niveles de OL aumentaron considerablemente. El estudio mencionado sugiere que

la presencia del SF es necesaria ya sea para el funcionamiento correcto de los componentes de la membrana externa o directamente del T9SS. Por lo tanto, se podría sugerir que ante la ausencia de OL en la mutante MALO 01, esta no podría ensamblar la maquinaria del T9SS de manera correcta por lo que en consecuencia su motilidad se ve comprometida, reduciéndose 5 veces.

Como segunda parte de nuestro proyecto, hipotetizamos que el gen *fjoh_2598* de *F. johnsoniae*, está probablemente implicado en la biosíntesis del lípido fosfatidiletanolamina (PE). Hasta ahora no hemos obtenido la mutante deficiente de PE siguiendo el protocolo propuesto en materiales y métodos. Dicho lípido podría ser esencial para la sobrevivencia de la bacteria, ya que dentro de la gama de lípidos PE es el único fosfolípido que *F. johnsoniae* contiene en sus membranas, lo que podría reforzar nuestra hipótesis. Los glicerofosfolípidos desempeñan un papel importante en bacterias Gram-negativas y Gram positivas, principalmente se les atribuye un papel estructural en la membrana celular bacteriana, sin embargo también están implicados en diversos procesos celulares esenciales. Por otro lado, los amino lípidos son más comunes en condiciones de estrés ambiental, pudiendo desempeñar papeles más selectivos como la relación con la patogenicidad o su participación en convertir la membrana menos negativa ya que algunos de ellos presentan carga neutra. Por un lado, se ha estudiado el papel que tiene PE en diversos mecanismos de sobrevivencia bacteriana, y por otro lado, tampoco se ha reportado alguna bacteria que carezca de fosfolípidos en su membrana (Sohlenkamp & Geiger, 2016).

PERSPECTIVAS

Queda por comprobar la hipótesis de que el glicerofosfolípido PE es esencial para *F. johnsoniae* y por ende el gen *fjoh_2598*, probablemente implicado en la biosíntesis del lípido fosfatidiletanolamina (PE), no se puede deletar. Se podrá introducir un gen codificando para una fosfatidilserina sintasa no homóloga a *F. johnsoniae* y posteriormente se vuelve a intentar construir la mutante en el gen *fjoh_2598*.

También se sugiere hacer un estudio comparativo de la cepa silvestre de *F. johnsoniae* y de la mutante MALO 01 en un medio con nutrientes y sal controlados para comprobar si el aumento en la motilidad por gliding se deba a una disminución de nutrientes o a una baja concentración de sal.

CONCLUSIONES:

- El gen *fjoh_0833* está implicado en la síntesis de OL en *F. johnsoniae*. Una mutante deficiente de dicho gen es incapaz de formar OL. Dada la homología con OlsF de *S. proteomaculans* se predice que se trata de una sintasa de OL.
- La ausencia de OL afecta la motilidad por gliding de *F. johnsoniae*. Se plantean algunas hipótesis sobre esto: 1) que el OL se requiere directamente para el gliding, 2) que en ausencia de los OLs el complejo del T9SS no se puede ensamblar adecuadamente y por lo tanto las adhesinas no se transfieran a la superficie bacteriana, 3) que las adhesinas no tengan una motilidad adecuada.
- La ausencia de OL causa una mayor sensibilidad a diversos antibióticos en *F. johnsoniae*, posiblemente por un cambio en la permeabilidad de la membrana y por los ajustes correspondientes que hace la bacteria.
- Ante la ausencia de OL, los niveles de PE incrementan en la mutante MALO 01 de *F. johnsoniae* hasta 5.9 veces más en medio MM y 1.35 veces más en medio MC respecto de la WT.
- Podrían existir ciertas condiciones de crecimiento donde *F. johnsoniae* reemplaza al OL por PE, ya que en carga neta son lípidos similares.
- Al aumentar la concentración de sal en el medio, la capacidad de gliding de *F. johnsoniae* WT disminuye hasta 2.5 veces, mientras que la mutante MALO 01 mantiene su capacidad de gliding reducida en estas condiciones.
- En altas concentraciones de sal mayores a 0.2 M de NaCl *F. johnsoniae* WT suspende la producción de SGL y aumenta hasta tres veces más la producción de GL, mientras que en MALO 01 aumentan el GL 3 veces más a 0.375 M de NaCl.

- El GL y el SGL podrían estar implicados en la resistencia al estrés osmótico en *F. johnsoniae*
- El gen *fjoh_2598* de *F. johnsoniae* podría estar implicado en la síntesis de PE como fosfatidilserina sintasa en *F. johnsoniae*.

ANEXOS

1.- Oligos y enzimas de restricción utilizados para la construcción de mutantes por delección con el plásmido suicida pYT354

El sitio de restricción de cada enzima utilizada se marca con su color correspondiente, para cada caso.

1.1.- Oligos para la construcción de la mutante de delección en el gen *fjoh_0833* de *F. johnsoniae*.

RIO ARRIBA *fjoh083301* ACT ACG GGT ACC ACT AGT CAA GAA CAA TAC CAA ACT TTA CTC
AAT CTC
KpnI SpeI

RIO ARRIBA *fjoh083302* ACT ACG GGA TCC CGA ATT TAA TCT CCA TCT CAT CCA AAA TTC
BamHI

RIO ABAJO *fjoh083303* ACT ACG GGA TCC ACG CTG ATA AAG ATT TTA TTT TTG ATG AAG
BamHI

RIO ABAJO *fjoh083304* ACT ACG AAG CTT CTC GAG GCT TAT TGT AGT CTC GCT AAT ATA
TTT TGG
HindIII, XhoI

1.2.- Oligos para mutante de delección en el gen *fjoh_0833* (PE) de *F. johnsoniae*

RIO ARRIBA *Fjo259801* ACT ACG GAA TTC ACT AGT GAG CAC GAA AGT GAA TAC
GCA GGA ACT CCT

EcoRI, SpeI

RIO ABAJO *Fjo259802* ACT ACG GGA TCC TGC TGT ACA GTA AAG TGC CAA ATA
AAA TCG Bamh1

RIO ARRIBA *Fjo259803* ACT ACG GGA TCC GAT ATC TAT TGG CTG CAA AAT CTT
GTG CAG Bamh1

RIO ABAJO *Fjo259804* ACT ACG CTG CAG CTC GAG ATT TTG ATG TTA GCG AAT
TGA TAA TTT CTA
PstI, XhoI

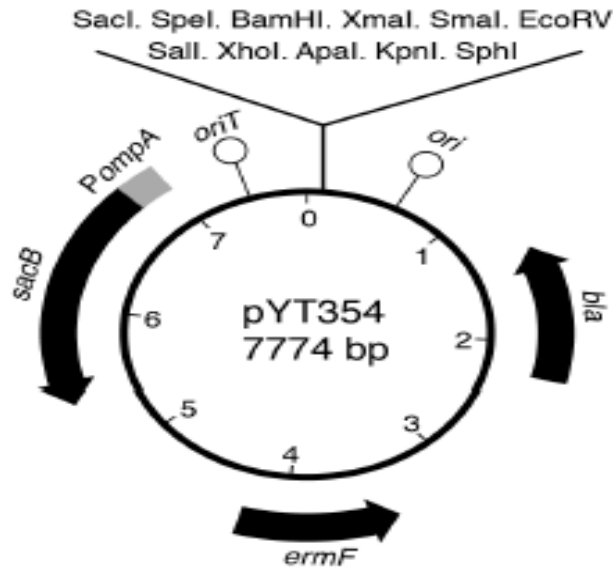


Figura 24.- Mapa del plásmido suicida pYT354.

2.- Oligos y enzimas de restricción utilizados para la complementación de la mutante deficiente en la formación de OL con el plásmido de expresión pCP23

Se muestran los sitios de restricción de cada enzima utilizada remarcados con su respectivo color en cada oligo utilizado:

RA fjoh0833F ACT ACG **GGA TCC** atg ggt tta gtt acc gcg aaa gaa gtt gca
BamHI

RB fjoh0833R ACT ACG **CTG CAG** cta atc ttc ttt ttc aga taa ttt acg ctc
PstI

3.-Oligos y enzimas de restricción para la complementación de la primera recombinante del lípido de fosfatidiletanolamina con el plásmido de expresión pCP23

Se muestran los sitios de restricción de cada enzima utilizada remarcados con su respectivo color en cada oligo utilizado:

PssAcoliF act acg **ggt acc** atg ttg tca aaa ttt aag cgt aat aaa cat
KpnI

PssAcoliR act acg **gga tcc** tta cag gat gcg gct aat taa tcg gtc gat

Enzima utilizada: **BamHI**

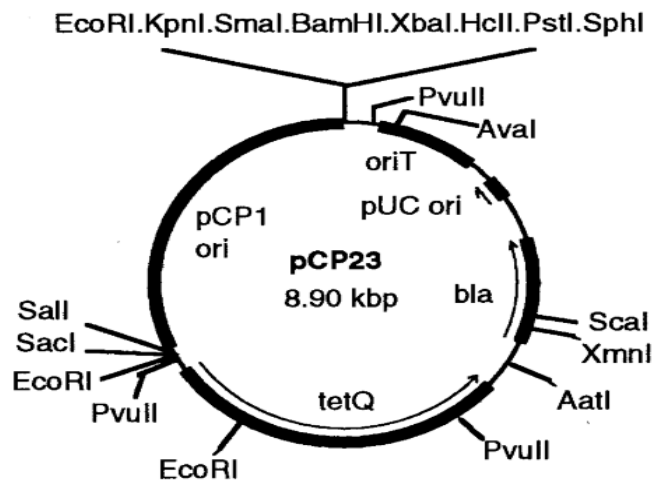


Figura 25.- Mapa del plásmido de expresión pCP23 para comprobar la funcionalidad del gen de interés.

4.-MEDIOS DE CULTIVO

Tabla 8.- Medios de Cultivo

Medios de cultivo para <i>F. johnsoniae</i>	Composición
Medio de Carne (MC): Utilizado como medio de crecimiento estándar	10 g de peptona, 10 g de extracto de carne, ajustado a un pH 7 y 15 g de agar por litro (Stanier, 1947).
Medio de Movilidad (MM): Utilizado como medio para observar el movimiento deslizante o gliding	7 g de extracto de levadura, 3.3 g de casitona, Tris-HCl 3.3 mM, ajustado a un pH 7.5 y 15 g de agar por litro (Liu <i>et al.</i> , 2007).
Medios de cultivo para <i>E. coli.</i>	

Medio Luria-Bertani (LB): Utilizado como medio de crecimiento estándar	5 g extracto de levadura, 10 g de peptona de caseína, 10 g NaCl y en caso de medio sólido agar – agar 15 g por litro
---	--

5.-Buffers y soluciones

5.1.-Electroforesis de ADN

Buffer de carga 6X: 0.25% azul de bromofenol, 0.25% xilencianol FF, 40% sacarosa

TAE 10X: (0.04 M Tris, 1% ácido acético, 0.05 EDTA, pH 8)

5.2.-Tinción con Primulina

25 mg de primulina en 10 ml de acetona y 40 ml de H₂O

5.3.-Sistema de solventes para cromatografía en capa fina (TLC)

Primera dimensión

cloroformo/metanol/hidróxido de amonio (140:60:10, vol/vol/vol)

Segunda dimensión

cloroformo/metanol/ácido acético glacial/acetona/agua (130:10:10:20:3, vol/vol/vol/vol/vol)

5.4.-Buffer para ajustar el pH del medio de cultivo

Tabla 9.- Buffers con distinto rango de pH para cultivo microbiano

Buffer	Rango de pH	pH a evaluar
MES	5.0-6.7	5, 5.5
Bis-Tris	5.8-7.2	6, 6.5
PIPES	6.1-7.5	7
Tris-HCl	7.0-9.0	7, 7.5, 8
Carbonate- Bicarbonato	9.2-10.6	9

LITERATURA CITADA

- Adams, A.** (2019) Progress, challenges, and opportunities in fish vaccine development. *Fish Shellfish Immunology*, **90**, 210-214. doi: [10.1016/j.fsi.2019.04.066](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.04.066).
- Aktas, M., Danne, L., Möller, P., & Narberhaus, F.** (2014) Membrane lipids in *Agrobacterium tumefaciens*: biosynthetic pathways and importance for pathogenesis. *Frontiers in Plant Science*, **5**, 109. doi: [10.3389/fpls.2014.00109](https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00109)
- Angulo-Rodríguez, A.A., Galindo-Uriarte, A.R., Avendaño-Palazuelos, R.C., & Pérez-Angulo, C.** (2012) BIOLOGIA CELULAR (1° edición). Culiacán, Sinaloa, Mexico, UAS-DGEP: 30
- Barbier, P., Rochat, T., Mohammed, H.H., Wiens, G.D., Bernardet, J.F., Halpern, David., Duchaud, E., & McBride, M.J.** (2020) The Type IX Secretion System Is Required for Virulence of the Fish Pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Applied and Environmental Microbiology*, **86**(16), e00799-20. doi: [10.1128/AEM.00799-20](https://doi.org/10.1128/AEM.00799-20).
- Bernardet, J.F., Segers, P., Vancanneyt, M., Berthe, F., Kersters, K., & Vandamme, P.** (1996) Cutting a Gordian knot: emended classification and description of the genus *Flavobacterium*, emended description of the family *Flavobacteriaceae*, and proposal of *Flavobacterium hydatis* nom. nov. (basonym, *Cytophaga aquatilis* Strohl and Tait 1978). *International Journal of Systematic Bacteriology*, **46**(1), 128-148. [No PubMed record available]
- Bertrand, A., Bipfubusa, M., Dhont, C., Chalifour, F., Drouin, P., & Beauchamp, C.J.** (2016) Rhizobial strains exert a major effect on the amino acid composition of alfalfa nodules under NaCl stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, **108**, 344-352. doi: [10.1016/j.plaphy.2016.08.002](https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.08.002)
- Bligh, E.G. & Dyer, W.J.** (1959) A rapid method of total lipid extraction and Purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, **37**(8), 911-917. doi: [10.1139/o59-099](https://doi.org/10.1139/o59-099)
- Cao, P., & Wall, D.** (2020) The Fluidity of the Bacterial Outer Membrane Is Species Specific: Bacterial Lifestyles and the Emergence of a Fluid Outer Membrane. *Bioessays*, **42**(8), e1900246. doi: [10.1002/bies.201900246](https://doi.org/10.1002/bies.201900246)
- Denich, T.J., Beaudette, L.A., Lee, H., & Trevors, J.T.** (2003) Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes. *Journal of Microbiological Methods*, **52**(2), 149–182. doi: [10.1016/s0167-7012\(02\)00155-0](https://doi.org/10.1016/s0167-7012(02)00155-0)
- Gao, J.L., Weissenmayer, B., Taylor, A.M., Thomas-Oates, J., López-Lara, I.M., & Geiger, O.** (2004) Identification of a gene required for the formation of

lyso-ornithine lipid, an intermediate in the biosynthesis of ornithine-containing lipids. *Molecular Microbiology*, **53** (6), 1757-1770. doi: [10.1111/j.1365-2958.2004.04240.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04240.x)

Geiger, O., González-Silva, N., López-Lara, I.M., & Sohlenkamp, C. (2010) Amino acid-containing membrane lipids in bacteria. *Progress in Lipid Research*, **49** (1):46-60. doi: [10.1016/j.plipres.2009.08.002](https://doi.org/10.1016/j.plipres.2009.08.002)

Geiger, O., Röhrs, V., Weissenmayer, B., Finan, T.M., & Thomas-Oates, J.E. (1999) The regulator gen *phoB* mediates phosphate stress-controlled synthesis of the membrane lipid diacylglyceryl-*N,N,N*-trimethylhomoserine in *Rhizobium* (*Sinorhizobium*) *meliloti*. *Molecular Microbiology*, **32** (1), 63-73. doi: [10.1046/j.1365-2958.1999.01325.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01325.x)

Geiger, O., Sohlenkamp, C., Vera-Cruz, D., Medeot, D.B., Martínez-Aguilar, L., Sahonero-Canavesi, D.X., Weidner, S., Pühler, A., & López-Lara, I.M. (2021) ExoS/ChvI Two-Component Signal-Transduction System Activated in the Absence of Bacterial Phosphatidylcholine. *Frontiers in Plant Science*, **12**, 678976. doi: [10.3389/fpls.2021.678976](https://doi.org/10.3389/fpls.2021.678976)

González-Silva, N., López-Lara, I.M., Reyes-Lamothe, R., Taylor, A.M., Sumpton, D., Thomas-Oates, J., & Geiger, O. (2011) The Dioxygenase-Encoding *olsD* Gene from *Burkholderia cenocepacia* Causes the Hydroxylation of the Amide-Linked Fatty Acyl Moiety of Ornithine-Containing Membrane Lipids. *Biochemistry*, **50**(29), 6396-6408. doi: [10.1021/bi200706v](https://doi.org/10.1021/bi200706v)

Halawa, E.M., Fadel, M., Al-Rabia, M.W., Behairy, A., Nouh, N.A., Abdo, M., Olga, R., Fericean, L., Atwa, A.M., El-Nablaway, M., & Abdeen, A. (2024) Antibiotic action and resistance: updated review of mechanisms, spread, influencing factors, and alternative approaches for combating resistance. *Frontiers in Pharmacology*, **14**, 1305294. doi: [10.3389/fphar.2023.1305294](https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1305294)

Khamari, B., & Bulagonda, E.P. (2025) Unlocking Nitrofurantoin: Understanding Molecular Mechanisms of Action and Resistance in Enterobacterales. *Medical Principles and Practice*, **34**(2), 121-137. doi: [10.1159/000542330](https://doi.org/10.1159/000542330)

Kim, S.K., Park, S.J., Li, X.H., Choi, Y.S., Im, D.S., & Lee, J.H. (2018) Bacterial ornithine lipid, a surrogate membrane lipid under phosphate-limiting conditions, plays important roles in bacterial persistence and interaction with host. *Environmental Microbiology*, **20**(11), 3992-4008. doi: [10.1111/1462-2920.14430](https://doi.org/10.1111/1462-2920.14430)

Könneke, M. & Widdel, F. (2013) Effect of growth temperature on cellular fatty acids in sulphate-reducing bacteria. *Environmental Microbiology*, **5**(11), 1064-70. doi: [10.1046/j.1462-2920.2003.00499](https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00499)

Kunze, B., Bedorf, N., Kohl, W., Höfle, G., & Reichenbach, H. (1989) Myxochelin A, a new iron-chelating compound from *Angiococcus disciformis*

(*Myxobacterales*). Production, isolation, physico-chemical and biological properties. *The Journal of Antibiotics (Tokyo)*, **42**(1), 14-7. doi: [10.7164/antibiotics.42.14](https://doi.org/10.7164/antibiotics.42.14)

LaFrentz, B.R., García, J.C., Waldbieser, G.C., Evenhuis, J.P., Loch, T.P., Liles, M.R., Wong, F.S., & Chang, S.F. (2018) Identification of Four Distinct Phylogenetic Groups in *Flavobacterium columnare* With Fish Host Associations. *Frontiers in Microbiology*, **9**, 452. doi: [10.3389/fmicb.2018.00452](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00452)

López-Lara, I.M., Sohlenkamp, C., & Geiger, O. (2003) Membrane lipids in plant-associated bacteria: their biosyntheses and possible functions. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **16** (7), 567-579. doi: [10.1094/MPMI.2003.16.7.567](https://doi.org/10.1094/MPMI.2003.16.7.567)

Liu, J., McBride, M. J., & Subramaniam, S. (2007). Cell surface filaments of the gliding bacterium *Flavobacterium johnsoniae* revealed by cryo-electron tomography. *Journal of bacteriology*, **189**(20), 7503–7506. doi: [10.1128/JB.00957-07](https://doi.org/10.1128/JB.00957-07)

Liu, X., Orenday Tapia, L., & Deme, J.C. (2025) A new paradigm for outer membrane protein biogenesis in the Bacteroidota. *Nature*. Online ahead of print. doi:[10.1038/s41586-025-09532-8F](https://doi.org/10.1038/s41586-025-09532-8F)

Lund, P., Tramonti, A., & De Biase, D. (2014) Coping with low pH: molecular strategies in neutralophilic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, **38**(6), 1091–1125. doi: [10.1111/1574-6976.12076](https://doi.org/10.1111/1574-6976.12076)

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Bender, K.S., Buckley, D.H., Stahl D.A. & Brock T. (2015). Brock biology of microorganisms (14th Edition). *Pearson Educación*. ISBN: 9788490352793

Mandrell, R.E. & Apicella, M.A. (1993) Lipo-oligosaccharides (LOS) of mucosal pathogens: molecular mimicry and host-modification of LOS. *Immunobiology*, **187**(3-5), 382–402. doi: [10.1016/S0171-2985\(11\)80352-9](https://doi.org/10.1016/S0171-2985(11)80352-9)

McBride, M.J., & Nakane, D. (2015) *Flavobacterium* gliding motility and the type IX secretion system. *Current Opinion in Microbiology*, **28**, 72-7. doi: [10.1016/j.mib.2015.07.016](https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.07.016)

McBride, M.J., Xie, G., Martens, E.C., Lapidus, A., Henrissat, B., Rhodes, R.G., Goltsman, E., Wang, W., Xu, J., Hunnicutt, D.W., Staroscik, A.M., Hoover, T.R., Cheng, Y.Q., & Stein, J.L. (2009) Novel Features of the Polysaccharide-Digesting Gliding Bacterium *Flavobacterium johnsoniae* as Revealed by Genome Sequence Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, **7**(21), 6864–6875. doi: [10.1128/AEM.01495-09](https://doi.org/10.1128/AEM.01495-09)

Morrison, D.A. (1977) Transformation in *Escherichia coli*: Cryogenic preservation of competent cells. *Journal of Bacteriology*, **132**(1), 349-351. doi: [10.1128/jb.132.1.349-351.1977](https://doi.org/10.1128/jb.132.1.349-351.1977)

- Moser, R., Aktas, M., Fritz, C., & Narberhaus, F.** (2014) Discovery of a bifunctional cardiolipin/phosphatidylethanolamine synthase in bacteria. *Molecular Microbiology*, **92**(5), 959-72. doi: [10.1111/mmi.12603](https://doi.org/10.1111/mmi.12603)
- Mukhina, T., Pabst, G., Ruyschaert, J.M., Brezesinski, G., & Schneck, E.** (2022) pH-Dependent physicochemical properties of ornithine lipid in mono- and bilayers. *Physical Chemistry Chemical Physics*, **24**(37), 22778-22791. doi: [10.1039/d2cp01045c](https://doi.org/10.1039/d2cp01045c)
- Murakami, S., Okada, U., & van Veen, H.W.** (2020) Tripartite transporters as mechanotransmitters in periplasmic alternating-access mechanisms. *FEBS Letters*, **594**(23), 3908-3919. doi: [10.1002/1873-3468.13929](https://doi.org/10.1002/1873-3468.13929)
- Nakane, D., Sato, K., Wada, H., McBride, M.J., & Nakayama, K.** (2013) Helical flow of surface protein required for bacterial gliding motility. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **110**(27), 11145-11150. doi: [10.1073 / pnas.1219753110](https://doi.org/10.1073/pnas.1219753110)
- Nakayama, H., Kurokawa, K., & Lee, B.L.** (2012) Lipoproteins in bacteria: structures and biosynthetic pathways. *The FEBS Journal*, **279**(23), 4247-68. doi: [10.1111/feb.12041](https://doi.org/10.1111/feb.12041)
- Neidhardt, F.C.** (1996) *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology (2nd Edition). *American Society for Microbiology*, 58-87.
- Nelson, S.S., Bollampalli, S., & McBride, M.J.** (2008) *SprB* Is a Cell Surface Component of the *Flavobacterium johnsoniae* Gliding Motility Machinery. *Journal of Bacteriology*, **190**(8), 2851–2857. doi: [10.1128/JB.01904-07](https://doi.org/10.1128/JB.01904-07)
- Parsons, J.B., & Rock, C.O.** (2013) Bacterial Lipids: Metabolism and Membrane Homeostasis. *Progress in Lipid Research*, **52**(3), 249-76. doi: [10.1016/j.plipres.2013.02.002](https://doi.org/10.1016/j.plipres.2013.02.002)
- Pate, J.L.** (1988) Gliding motility in procaryotic cells. *Canadian Journal of Microbiology*, **34**(4), 459-465. doi: [10.1139/m88-079](https://doi.org/10.1139/m88-079)
- Raetz, C.R.** (1990) Biochemistry of endotoxins. *Annual Review of Biochemistry*, **59**, 129-70. doi: [10.1146/annurev.bi.59.070190.001021](https://doi.org/10.1146/annurev.bi.59.070190.001021)
- Raetz, C.R., Reynolds, C.M., Trent, M.S., & Bishop, R.E.** (2007) Lipid A modification system in gram-negative bacteria. *Annual Review of Biochemistry*, **76**, 295-329. doi: [10.1146/annurev.biochem.76.010307.145803](https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.010307.145803)
- Ragaey, M.M., Sadak, M.S., Dawood, M.F.A., Mousa, N.H.S., Hanafy, R.S., & Latef, A.A.H.A.** (2022) Role of Signaling Molecules Sodium Nitroprusside and Arginine in Alleviating Salt-Induced Oxidative Stress in Wheat. *Plants (Basel)*, **11**(14), 1786. doi: [10.3390/plants11141786](https://doi.org/10.3390/plants11141786)

Reichenbach, H. (1989) Genus I. *Cytophaga* Winogradsky 1929, 577AL emend." In: J.T. Staley, M.P. Bryant, N. Pfennig and J.G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, **3**, 2015-2050. [No PubMed record available]

Riekhof, W.R., Naik, S., Bertrand, H., Benning, C., & Voelker, D.R. (2014) Phosphate starvation in fungi induces the replacement of phosphatidylcholine with the phosphorus-free betaine lipid diacylglyceryl-*N,N,N*-trimethylhomoserine. *Eukaryotic Cell*, **13**(6), 749–57. doi: [10.1128/EC.00004-14](https://doi.org/10.1128/EC.00004-14)

Rock, C.O. (2008) Chapter 3. Fatty acid and phospholipid metabolism in prokaryotes. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes* (5th Edition). Elsevier, 59-96. doi: [10.1016/B978-044453219-0.50005-2](https://doi.org/10.1016/B978-044453219-0.50005-2)

Shibata, S., Tahara, Y. O., Katayama, E., Kawamoto, A., Kato, T., Zhu, Y., Nakane, D., Namba, K., Miyata, M., McBride, M. J., & Nakayama, K. (2023). Filamentous structures in the cell envelope are associated with bacteroidetes gliding machinery. *Communications biology*, **6**(1), 94. doi:[10.1038/s42003-023-04472-3](https://doi.org/10.1038/s42003-023-04472-3)

Shrivastava, A., Rhodes, R.G., Pochiraju, S., Nakane, D., & McBride, M.J. (2012) *Flavobacterium johnsoniae* RemA Is a Mobile Cell Surface Lectin Involved in Gliding. *Journal of Bacteriology*, **194**(14), 3678-3688. doi: [10.1128 / JB.00588-12](https://doi.org/10.1128/JB.00588-12)

Simon, R., Priefer, U., & Pühler, A. (1983) A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Nature Biotechnology*, **1**, 784-791. doi: [10.1038/nbt1183-784](https://doi.org/10.1038/nbt1183-784)

Sohlenkamp, C., & Geiger, O. (2016) Bacterial membrane lipids: diversity in structures and pathways. *FEMS Microbiology Reviews*, **40**(1), 133-59. doi: [10.1093/femsre/fuv008](https://doi.org/10.1093/femsre/fuv008)

Sohlenkamp, C., de Rudder, K.E., & Geiger, O. (2004) Phosphatidylethanolamine Is Not Essential for Growth of *Sinorhizobium meliloti* on Complex Culture Media. *Journal of Bacteriology*, **186**(6), 1667–1677. doi: [10.1128/JB.186.6.1667-1677.2004](https://doi.org/10.1128/JB.186.6.1667-1677.2004)

Speare, D.J., Markham, R.J., Despres, B., Whitman, K., & MacNair, N. (1995) Examination of Gills from Salmonids with Bacterial Gill Disease using Monoclonal Antibody Probes for *Flavobacterium Branchiophilum* and *Cytophaga Columnaris*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **7**(4), 500-5. doi: [10.1177/104063879500700413](https://doi.org/10.1177/104063879500700413)

Stanier, R.Y. (1947) Studies on Nonfruiting *Myxobacteria*: I. *Cytophaga johnsoniae*, n.sp., a Chitin-decomposing *Myxobacterium*. *Journal of Bacteriology*, **53**(3), 297–315. doi: [10.1128/JB.297-315.1947](https://doi.org/10.1128/JB.297-315.1947)

Studier, F.W. (1991) Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *Journal of Molecular Biology*, **219**(1), 37–44. doi: [10.1016/0022-2836\(91\)90855-z](https://doi.org/10.1016/0022-2836(91)90855-z)

Ulrich, L.E., Koonin, E.V., & Zhulin, I.B. (2005) One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. *Trends in Microbiology*, **13**(2), 52-56. doi: [10.1016/j.tim.2004.12.006](https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.12.006)

Vancanneyt, M., Segers, P., Torck, U., Hoste, B., Bernardet, J.F., Vandamme, P., & Kersters, K. (1996) Reclassification of *Flavobacterium odoratum* (Stutzer 1929) Strains to a New Genus, *Myroides*, as *Myroides odoratus* comb. nov. and *Myroides odoratimimus* sp. Nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **46**, 926-932. doi: [10.1099/00207713-46-4-926](https://doi.org/10.1099/00207713-46-4-926)

Vance, D.E. & Vance, J.E. (2008) Functional roles of lipids in membranes. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes* (5th Edition). Amsterdam, The Netherlands, *Elsevier*. 1-37.

Vences-Guzmán, M.A. (2014) Estudios sobre las modificaciones que pueden sufrir los lípidos de ornitina en bacterias de la familia *Rhizobiaceae*. Tesis de Doctorado UNAM, 15-36.

Vences-Guzmán, M.Á., Geiger, O., & Sohlenkamp, C. (2012) Ornithine lipids and their structural modifications: from A to E and beyond. *FEMS Microbiology Letters*, **335**(1), 1–10. doi: [10.1111/j.1574-6968.2012.02623.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2012.02623.x)

Vences-Guzmán, M.Á., Guan, Z., Bermúdez-Barrientos, J.R., Geiger, O., & Sohlenkamp, C. (2013) *Agrobacteria* lacking ornithine lipids induce more rapid tumour formation. *Environmental Microbiology*, **15**(3), 895-906. doi: [10.1111/j.1462-2920.2012.02867.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02867.x)

Vences-Guzmán, M.Á., Guan, Z., Escobedo-Hinojosa, W.I., Bermúdez-Barrientos, J.R., Geiger, O., & Sohlenkamp, C. (2015) Discovery of a bifunctional acyltransferase responsible for ornithine lipid synthesis in *Serratia proteamaculans*. *Environmental Microbiology*. *Environmental Microbiology*, **17**(5), 1487-96. doi: [10.1111/1462-2920.12562](https://doi.org/10.1111/1462-2920.12562)

Vences-Guzmán, M.Á., Guan, Z., Ormeño-Orrillo, E., González-Silva, N., López-Lara, I.M., Martínez-Romero, E., Geiger, O., & Sohlenkamp, C. (2011) Hydroxylated ornithine lipids increase stress tolerance in *Rhizobium tropici* CIAT899. *Molecular Microbiology*, **79**(6), 1496–1514. doi: [10.1111/j.1365-2958.2011.07535.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07535.x)

Vences-Guzmán, M.Á., Peña-Miller, R., Hidalgo-Aguilar, N.A., Vences-Guzmán, M.L., Guan, Z., & Sohlenkamp, C. (2021) Identification of the *Flavobacterium johnsoniae* cysteate-fatty acyl transferase required for capnine

synthesis and for efficient gliding motility. *Environmental Microbiology*, **23**(5), 2448-2460. doi: [10.1111/1462-2920.15445](https://doi.org/10.1111/1462-2920.15445)

Wadhwa, N., & Berg, H.C. (2022) Bacterial motility: machinery and mechanisms. *Nature Reviews Microbiology*, **20**(3), 161-173. doi: [10.1038/s41579-021-00626-4](https://doi.org/10.1038/s41579-021-00626-4)

Weissenmayer, B., Gao, J.L., López-Lara, I.M., & Geiger, O. (2002) Identification of a gene required for the biosynthesis of ornithine-derived lipids. *Molecular Microbiology*, **45** (3), 721-733. doi: [10.1046/j.1365-2958.2002.03043.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03043.x)

Yang S, Wang K, & Hu Y. (2025) Studies on Two Convergently Evolved Cysteate Synthases in Sulfonolipid Biosynthesis. *ACS Chem Biol*. Published online. doi:[10.1021/acscchembio.5c00142](https://doi.org/10.1021/acscchembio.5c00142)

Yanisch-Perron, C., Vieira, J., & Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, **114**(1), 103-19. doi: [10.1016/0378-1119\(92\)90710-7](https://doi.org/10.1016/0378-1119(92)90710-7)

Zavaleta-Pastor, M., Sohlenkamp, C., Gao, J.L., Guan, Z., Zaheer, R., Finan, T.M., Raetz, C.R., López-Lara, I.M., & Geiger, O. (2010) *Sinorhizobium meliloti* phospholipase C required for lipid remodeling during phosphorus limitation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **107**(1), 302–307. doi: [10.1073/pnas.0912930107](https://doi.org/10.1073/pnas.0912930107)

Zhu, Y., Thomas, F., Larocque, R., Li, N., Duffieux, D., Cladière, L., Souchaud, F., Michel, G., & McBride, M.J. (2017) Genetic analyses unravel the crucial role of a horizontally acquired alginate lyase for brown algal biomass degradation by *Zobellia galactanivorans*. *Environmental Microbiology*, **19**(6), 2164-2181. doi: [10.1111 / 1462-2920.13699](https://doi.org/10.1111/1462-2920.13699)



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Instituto de
Investigación en
Ciencias
Básicas y
Aplicadas



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

POSGRADO EN CIENCIAS

Cuernavaca, Mor., a 22 de abril de 2026

DRA. LINA ANDREA RIVILLAS ACEVEDO
COORDINADORA DEL POSGRADO EN CIENCIAS
PRESENTE

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la tesis titulada: ESTUDIO DE LA SÍNTESIS Y FUNCIÓN DE LOS LÍPIDOS DE MEMBRANA DE *Flavobacterium johnsoniae*, que presenta la L.C. Maritza Lorena Vences Guzmán (10062682), para obtener el título de Maestría en Ciencias.

Dirección de tesis: Dr. Christian Sohlenkamp

Unidad Académica: Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas (IICBA)

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN
Dra. Verónica Mercedes Narváez Padilla CIDC - UAEM	APROBADO
Dr. Armando Hernández Mendoza CIDC - UAEM	APROBADO
Dr. Marco Antonio Rogel Hernández CCG - UNAM	APROBADO
Dr. Ramón Suárez Rodríguez CEIB - UAEM	APROBADO
Dra. Cinthia Ernestina Nuñez López IBT - UNAM	APROBADO



Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209, Edificio 65
Tel. (777) 329 70 00, Ext. 6011 / posgradoenciencias@uaem.mx

UAEM
RECTORÍA
2023-2029



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANO INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

ARMANDO HERNANDEZ MENDOZA | Fecha:2026-04-22 02:45:35 | FIRMANTE

wXa2rhYCMVfiEo/u/sZOoxOGFEoek6ExjEC3WSXkjU8xlt1aXcK1/aulxnq5BD8p08cmqBMBea+ICSeOYjKcv9KPtabajZtIYA722IM1u2TkVpM5zBmZurrSK9xJ7IkVvnEbBH42r0YAblYuu32hYspDORzxBEdeTtKWY8O4Wo/7UrFuCTYI2cwxezcGNtyE5IpZo0aKd9sPYY3YyY63TDDMYEzibDF3Vmtl5J/qkdD/9aHhSIOOQOxGR0sF/tMT0TJFrg+lo5WN/U0I7SdL GKNSIAAqsGvLsT3uOoip43/vtqvHym0hf7GdWFWvV4XCmASXe2Dk46tR3+Y12XaHmA==

VERONICA MERCEDES NARVAEZ PADILLA | Fecha:2026-04-22 08:17:49 | FIRMANTE

Sjq245I529Lj3cC5WdOvD1DOz0oijOP99BUSYVMYs5IUUKvta1HXWM+WxBlh+xa4XJrVW8jvgzpvUF+opXEOEEmCkMs5wmXTS1zR+wCglaR278+k7Lh+n5+uZgxkwJ/9hqLNk8js94lrGG9bhmh3OXABph5O5t74N0vbgGtW0nfpJYD8MfM2UuYi+3la/Dkq6vJO7n2b3JhMc+30oLD3Lou6bBw/hwYqbuqPMapQK7YL9BEBoohn+RgA+8Gt34n1UCHSfQvRlpo1TMXQyS8RrOE2Tg04cW/A2HCCcqhythz5QFHaUoDGqbHF+rh75Husxa6/JV0gqkWelu4z9vH9Q==

RAMON SUAREZ RODRIGUEZ | Fecha:2026-04-22 08:24:13 | FIRMANTE

hvZLEXPYKwqokKpRgkBsyzMqJ/x2N7OJu8Glnh7jbJBPID1ynzPUrwnbtfUI3A7Xh9/pV5kjk7DyVO491jauv9+1WdriG0CJSsU/b7HAFDLjbcoldYI5ol/qEYyR6HK9gmbpwzWM1aC0L1X8OOlaIMCXNnPAQ0g+8ulWO20P9NksrzjtDSy5Jhbzh7ovnnclungjCQI60F8AH897vdMmAKvYikCY1Klub8Ekpuy0cywA7ATOKFzt0uY1qmy1y7CI9c3ZF7wpw5xiEX5ZmlNtXb0z79b2UiGVgr7TUDD8yyuqqlp++Qg+oL9chWGwT19+N1OjHrYZOYZPzkXvlg==

CINTHIA ERNESTINA NUÑEZ LOPEZ | Fecha:2026-04-22 10:17:36 | FIRMANTE

RpMipFdbRg1zTid3mGDQde9ZIUukOSwbTGlt+YvyPRLNuPjrtKf1wUfClk+CLJah43OEzBq1W3SfEQi4e+2yGstnb43kyBiaPAYF9sX5B0nvIV1dfO9k5fP411bJ6ghRjJdKboS0morryUnhI8+2RO5tvlstdtD2S1UCwTYIfZIRhHNFbnZG8IBDpf9Go+V8zxTP2Fzmz9uUFBsoPNAL8qu0h6tGXnZFkvZ0FOt1Puj+MBNnotOT9T4c3LCYgpVEZGCKSkCqmaW9GXwXis71+ElrU99vb4cc88kbCMVpRRaUfUiuG3ECHWsl2LHXAlp8ZOVcZr6469dbyk+C4p0hogeJQ==

MARCO ANTONIO ROGEL HERNÁNDEZ | Fecha:2026-04-22 11:58:19 | FIRMANTE

HS8X1wFmfjbd3JIZFnaezYx7IBGbbWpTI+shdWE4V6VQEQN3Y2MAVILGccv2JXaVsqbkiarF5SHhXVvyXa/RDOsWjRPd3qYnksbJMzR3jC0CIY3D25snTHjMR5D7VzEvnXxJS7h+TNI60nkVq9vHLkAlj19tzSE3BlkYPZu/Yv3qUpSwhEUUQ1Zk/jPOrZwiq5lxeyigYA20u09WAqldx8+ZKIE4THCUA+0NNpc9pouWrZ6jklx8ZhZ5byrpaEvvjklWxXeoMYguKQSQQ6K4s+7XSIIeAyadTWUUU00N564GpgU3lWGGw+9D471XSr7kVYxsTmW4gOWHdry9qA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



bunUFoq5X

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/ZbZtE3wot9gSwxAN6AimVEfLAu9H26W>

