

Revista de la Sociedad Mexicana de
Biotechnología
y Bioingeniería A.C.

Año 2023 Volumen 27, Número 2
ISSN 0188-4786



Sociedad Mexicana de
Biotechnología y Bioingeniería



MESA DIRECTIVA

2022 – 2024

Dra. Romina Rodríguez Sanoja
Presidenta

Dr. Luis Bernardo Flores Cotera
Vicepresidente

Dra. Beatriz Ruiz Villafán
Secretaria

Dra. María Dolores Reyes Duarte
Tesorero

Dr. Manuel Alejandro Lizardi Jiménez
Subsecretario

M. en C. Karina Adames Beas
Vocal Profesional

Biol. Teresa Elizabeth Mtz Oropeza
Vocal Estudiante

EDITORIA

Dra. María Soledad Córdova Aguilar
UNAM

Co-editor

Dr. Jorge Gracida
UAQ

COMITÉ EDITORIAL

Dra. Aurora Antonio Pérez
Dra. Silvia Armenta Jaime
Dr. Adelfo Escalante Lozada
Dr. Luis Bernardo Flores Cotera
Dr. Pablo Gortáres Moyoroqui
Dr. Daniel Guillén Santos
Dra. Claudia Patricia Larralde Corona
Dra. Itzel López Rosas
Dra. Isadora Martínez Arellano
Dra. Silvia Andrea Moreno Mendieta
Dr. Jaime Ortega López
Dra. Andrea Sabido Ramos
Dra. Georgina Sandoval
Dra. Elda Patricia Segura Cenicerros
Dra. Gabriela Sepúlveda Jiménez
Dra. María Eugenia de la Torre
Dra. Virginia Villacruz
Dra. Beatriz Ruiz Villafán
Dra. Claudia Rodríguez-Almazán

Formación y edición

Pas. QA Mariana Espinoza Tapia

ISSN 0188-4786, revista cuatrimestral publicada por la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C. incluida en PERIÓDICA, índice de Revista Latinoamericanas en Ciencias (CICH-UNAM), en LATINDEX (Sistema Regional de Información en Línea para Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal), los artículos se encuentran en Google Académico. Certificado de Licitud de Título en trámite y Certificado de Licitud de Contenido en trámite. Reserva de derechos de Título 04-1999-082516265000-101. Los conceptos que en ella aparecen son responsabilidad exclusiva de los autores. Se prohíbe la reproducción total o parcial de su contenido sin previa autorización por escrito del Comité editorial. Toda correspondencia deberá enviarse a Km. 23.5 Carretera Federal México-Cuernavaca, Av. Cipreses s/n, Col. San Andrés Totoltepec, C.P. 14400, Alcaldía Tlalpan, Ciudad de México. o a la siguiente dirección electrónica revista_biotecnologia@smbb.mx.

Índice

Instrucciones para los autores 4

Editorial 8

Artículos

Uso de consorcios microbianos en biorremediación marina: Una revisión
Calderón-Pazos, Ana Paola, Ortega Ferron, Pablo, Castillo Carvajal Laura Catalina 9

Development of polymeric fibers by centrifugal spinning process and their potential to adhere and proliferate human fibroblast cells
Mariano Del Toro-Barbosa, Karina Asunción Parra-Ocampo, Héctor Pool, Eduardo Arturo Elizalde-Peña, Joel Briones, María José Rivas-Arreola 21

Revisión de los factores sigma en *Escherichia coli* y su potencial como dianas para el mejoramiento de producción de proteínas recombinantes
Diego Alonso Echánove-Cuevas y Guillermo Gosset-Lagarda 29

Solventes eutécticos profundos naturales (NaDES) y sus posibles roles en la biología de las plantas
Mariana Ruesgas-Ramon, Karlina García-Sosa, Luis Manuel Peña 49

Instrucciones para los autores

Guía de Autores

La revista puede recibir trabajos de investigación original, así como de revisión en los campos de la Biotecnología y Bioingeniería. Todos los manuscritos serán sujetos a revisión por al menos dos miembros del Comité Editorial y deberán contar con una recomendación de aceptación para ser publicados.

Los idiomas en los que se puede publicar en la revista son el español y el inglés.

Los trabajos se escribirán en hoja tamaño carta (21.6 cm x 27.6 cm). Los márgenes aplicados a todo el manuscrito serán de 2.5 cm para los extremos superior e inferior, así como 3 cm de cada lado. Las páginas deberán estar numeradas en la parte inferior y central de cada hoja.

Para evitar errores innecesarios se recomienda usar el corrector de gramática y ortografía del procesador de palabras. Se recomienda que los trabajos completos tengan un máximo de 25 páginas, escritas con un interlineado de 1.5 renglones, incluyendo las tablas y figuras. Las publicaciones en la revista Biotecnología están exentas de costo para los autores.

Cuando corresponda, se recomienda el uso de abreviaturas para referirse a unidades de tiempo (h, min, s), de volumen (l, ml, μ l), de peso (kg, g, mg, μ g), ADN, ARN y otras comúnmente aceptadas en la literatura científica.

Los trabajos de investigación original pueden tocar cualquiera de los diversos campos que cultivan la biotecnología y la bioingeniería, desde aspectos fundamentales hasta sus aplicaciones, incluyendo: Enzimas y Biocatálisis, Microbiología, Biotecnología Agrícola y Vegetal, Biotecnología Marina, Alimentos y bebidas, Biotecnología farmacéutica, Biotecnología Ambiental, Bioingeniería y fermentaciones, Bioenergía y biocombustibles, Biología de sistemas y bioinformática, Biología sintética, Nanobiotecnología y biomateriales, Ingeniería metabólica, Omicas, Bioseguridad y Bioética.

Tanto los trabajos de investigación original como las revisiones deberán apegarse al siguiente formato:

1. El título del manuscrito se escribirá en negritas con letra Arial o equivalente tamaño 14. El título deberá estar centrado y ser conciso e informativo. Evite el uso de abreviaciones y fórmulas.

Instrucciones para los autores

2. El nombre de los autores ocupará los siguientes renglones escribiendo el nombre y primer apellido de cada participante. Se usará letra Arial o equivalente tamaño 12. Los nombres de los participantes deberán estar centrados, señalando con un asterisco el autor responsable de la publicación. En el siguiente renglón con letra itálica Arial del mismo tamaño, se incluirá la dirección postal de la institución de adscripción de los autores, así como la dirección de correo del autor corresponsal. Si el responsable fuera un estudiante, deberá incluir una carta del tutor o director del trabajo autorizándolo.
3. Se deberá añadir un Resumen de no más de 250 palabras en español y el correspondiente Abstract en inglés.
4. Se incluirán entre 3 a 6 Palabras clave: que permitan clasificar el artículo en una base de datos. Estas palabras deberán de incluirse en español y en inglés (Key words).
5. Si el texto inicia con el nombre de algún subtema, éste de pondrá como primera línea en cursivas con letra Arial o equivalente tamaño 10. Después en el siguiente renglón se iniciará el texto descriptivo usando letra Arial o equivalente tamaño 10. El texto deberá ser escrito con un interlineado de 1.5 renglones. Se deberá dejar un espacio de un renglón al inicio de una sección o subtema nuevo. Los géneros y especies deberán escribirse en letras itálicas.
6. Las figuras deberán numerarse con arábigos, correlativamente en orden de aparición en el texto. No se integrarán al texto, sino al final del manuscrito. No obstante, para facilitar el trabajo de edición, se recomienda indicar la ubicación de las mismas en el momento en que son mencionadas por primera vez en el texto. Las figuras deben incluir un breve título explicativo en la parte inferior de la misma. Si es necesario incluir fotos, éstas se deberán designar como figuras.
7. Las tablas también se numerarán con arábigos ubicados en la parte superior de las mismas e incluirán un breve título explicativo. Las notas en las tablas deberán ser indicadas con letras minúsculas en superíndice. La ubicación de las tablas será señalada en el texto, pero se anexarán en hojas separadas y al igual que las figuras, al final del manuscrito.
8. La información dada como referencias bibliográficas deberá permitir a los lectores llegar con facilidad a la fuente de información original. En el texto del trabajo, las referencias se citan por autor y año entre paréntesis redondos. Por ejemplo: “Martínez & García (1999) han demostrado que...”, o bien, “Datos recientes (Martínez & García, 1999) han demostrado que...”. Si la cita posee varios autores se escribirá como sigue: “Gutiérrez et al. (2003), han demostrado...” O bien: “Datos recientes (Gutiérrez et al., 2003) han mostrado...”

Instrucciones para los autores

Si la cita es una página de Internet, la dirección URL deberá escribirse completa y entre paréntesis directamente en el texto.

9. La lista de Referencias se deberá escribir con el mismo tipo de letra del texto principal (Arial tamaño 10) y con sangría francesa de acuerdo con el siguiente formato:

Artículos:

Bayegan AH, Clote P (2020) RNAmountAlign: Efficient software for local, global, semiglobal pairwise and multiple RNA sequence/structure alignment. PLoS ONE 15(1): e0227177. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227177>.

Libros:

Ullrich M (2009) Bacterial Polysaccharides: Current Innovations and Future Trends. Horizon Scientific Press, Norwich.

Capítulos de libros:

Sánchez S & Demain AL (2009) Metabolic regulation and overproduction of primary metabolites. In: Encyclopedia of Industrial Biotechnology. Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology (EIB). Flickinger MC (ed). John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ. pp. 396-458.

Patentes:

Fenical WH, Jensen PR & Kwon HC (2009) Polyol macrolide antitumor-antibiotics from the marine actinomycete strain CNQ140. US patent 7,521,414.

Congresos y reuniones:

Reyes N, Domínguez RM, Islas I & Solís S (2007) Inducción diferencial por pH y temperatura del complejo pectinolítico producido por células inmovilizadas de *Aspergillus HL*. XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Morelia Mich. México. OIII-12.

Instrucciones para los autores

Sitios en internet:

CAZY, Carbohydrate-Active Enzymes Database. (<http://www.cazy.org/>)

Tesis de pre y posgrado:

Cárdenas C (2009) Evaluación del uso biotecnológico de la semilla de *Ditaxis heterantha* para la producción de safranal. Tesis Maestría en Ciencias Bioquímicas. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. pp. 1-78.

Cada autor es responsable de la precisión de las citas que emplea.

Una vez que ha sido revisado y aceptado su trabajo, los autores deberán enviar una carta de cesión de los Derechos de Autor, de manera que la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería pueda hacer uso del artículo aceptado, o parte de él, con fines de divulgación y difusión de la actividad científica y tecnológica. En ningún caso, dichos derechos afectan la propiedad intelectual que es propia de los autores, para usar la totalidad o parte de ese artículo con fines no lucrativos.

Los trabajos se someten en línea en la página electrónica de la Sociedad Mexicana de Biotecnología, en la dirección <https://smbb.mx/publicaciones/publicacion-de-articulo/>. Al momento de recibirlo, se enviará un acuse de recibo al autor correspondiente. La dirección para mantener comunicación con el editor es: revista_biotecnologia@smbb.mx y marisol.cordova@icat.unam.mx.

Una vez aceptados, los trabajos son editados y enviados a los autores para su corrección. En esta condición no se permitirán cambios sustanciales en el contenido de los mismos sin la aprobación del editor en jefe. Una vez aprobada la prueba, el trabajo se publicará en línea y podrá ser consultado en la página de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería AC <http://www.smbb.com.mx/>.

Editorial

En mayo de 2023 se publicó en el Diario Oficial de la Federación (DOF) el decreto por el que se expide la Ley General en Materia de Humanidades, Ciencias, Tecnologías e Innovación. Este indica que su objetivo es garantizar el derecho humano a la ciencia conforme a los principios de universalidad, interdependencia, indivisibilidad y progresividad. Con la expedición de esta ley se crea el Sistema Nacional de Humanidades, Ciencias, Tecnologías e Innovación, y además se instaura el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías. Esta promulgación introduce modificaciones significativas en el marco normativo y en la formulación y conducción de la política nacional en materia de humanidades, ciencias, tecnologías e innovación. Estos cambios han generado preocupación e inquietud en la comunidad científica y tecnológica del país, la cual se ha expresado enfáticamente en diversos seminarios y foros de análisis sobre las implicaciones de esta nueva ley, así como publicado reflexiones críticas respecto a las repercusiones en la estructura y funcionamiento del CONAHCYT.

Es importante trabajar en conjunto en foros colegiados para evitar que la política científica establecida afecte o limite la independencia académica. Debemos continuar generando soluciones pertinentes a las problemáticas nacionales, pero respetando el avance científico y tecnológico en el país. Existen diversas formas de participar, por lo que invitamos a todos nuestros socios a hacerlo.

En este número de la revista *BioTecnología* se incluyen cuatro trabajos de revisión e investigación. Se presenta una recopilación de información actual sobre las estrategias en biorremediación marina y los consorcios microbianos utilizados. En otro trabajo se expone la generación de diversas formulaciones de nanofibras utilizando el proceso de hilado centrífugo. Se propone la producción a gran escala de fibras con arreglos que permitan la adhesión, proliferación, maduración y diferenciación celular para aplicarse en la regeneración de tejidos. Asimismo, se presenta una revisión extensa de los fenotipos que surgen de los cambios de estructura o expresión de los factores sigma en *E. coli* y el potencial que representan para el mejoramiento de cepas para producción de proteína recombinante. Finalmente, se muestra un trabajo sobre los solventes eutécticos profundos naturales y su papel en los procesos fisiológicos que ocurren en las plantas, incluyendo la resistencia a factores abióticos como bajas temperaturas, estrés hídrico y la falta de luz.

Recuerden, tenemos una cita del 11 al 15 de septiembre 2023 en Azul Ixtapa: **XX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería**. Información, inscripciones y hospedaje en <https://smbb.ecodsavirtual.com/SMBB>.

Dra. María Soledad Córdova Aguilar
marisol.cordova@icat.unam.mx

Uso de consorcios microbianos en la biorremediación marina: una revisión

Calderón-Pazos, Ana Paola ¹□, Ortega Ferron, Pablo ¹□,
Castillo Carvajal Laura Catalina ²*

¹ Licenciatura en Biotecnología, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Anáhuac México campus Norte

² Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Anáhuac México campus Norte

□Estos autores contribuyeron de igual forma a esta investigación.

*Autor de correspondencia

laura.castillo@anahuac.mx

Resumen

Los ambientes marinos están expuestos a contaminantes provenientes de múltiples fuentes, principalmente antropogénicas. Estas son una amenaza para la biodiversidad, la calidad del agua, productividad y la supervivencia de los ecosistemas marinos. La biorremediación surge como respuesta viable para la eliminación de los contaminantes gracias a su compatibilidad ecológica y rentabilidad, se trata de una tecnología emergente que utiliza organismos vivos para eliminar contaminantes. El objetivo de la revisión es recopilar la información actual sobre las estrategias en uso para la limpieza de los mares, además de observar los consorcios microbianos empleados y proponer uno basado en las revisiones teóricas. La biorremediación marina ha sido una técnica exitosa y muy utilizada en la limpieza de los océanos, debido a su compatibilidad con los ciclos biogeoquímicos, haciéndola una tecnología amigable y sustentable. Las estrategias más utilizadas en biorremediación marina son aquellas basadas en el aprovechamiento de microorganismos degradadores. Entre los microorganismos más utilizados, por su actividad y eficiencia, están las bacterias, de los géneros *Bacillus spp.* y *Pseudomonas spp.*, por su actividad degradadora frente a distintos compuestos. Los consorcios microbianos juegan un papel importante y funcionan como estrategia viable debido a que la diversidad metabólica en éstos ayuda a la eliminación de varios contaminantes al mismo tiempo. La biorremediación marina requiere de cooperación y abordajes de distintos puntos de vista ya que las herramientas disponibles son muchas, pero también lo son los contaminantes y daños.

Palabras clave: *biorremediación marina, consorcios microbianos, contaminación marina, biotecnología, consorcios bacterianos*

Abstract

Marine environments are exposed to pollutants from multiple sources, mainly anthropogenic. These are a threat to biodiversity, water quality, productivity, and the survival of marine ecosystems. Bioremediation emerges as a viable response to the elimination of contaminants, thanks to its ecological compatibility and profitability, it is an emerging technology that uses living organisms to eliminate pollutants. The objective of this review is to collect information on the strategies for cleaning the oceans, observe the microbial consortia used, and propose one based on the theoretical revisions. Marine bioremediation has been a successful and widely used technique in cleaning the oceans, due to its compatibility with biogeochemical cycles, making it a friendly and sustainable technology. The most used strategies in marine bioremediation are those based on the use of degrading microorganisms. Among the most used microorganisms, due to their activity and efficiency, are bacteria, mainly of the genus *Bacillus spp.* and *Pseudomonas spp.*, for their degrading activity against different compounds. Microbial consortia emerge as a viable strategy because their metabolic diversity in them helps eliminate several contaminants at the same time. Marine bioremediation requires cooperation and approaches from different points of view since the available tools are many, but so are the pollutants and damages.

Keywords: *marine bioremediation, microbial consortia, marine pollution, biotechnology, bacterial consortia*

Introducción

Los ambientes marinos están constantemente expuestos a contaminación proveniente de varias fuentes, como aguas residuales industriales y domésticas, escorrentía, combustión, etc., que afectan la biodiversidad, calidad del agua y la productividad de los ecosistemas marinos (Dell' Anno et al., 2021; Kumar & Prasannamedha, 2021). La principal herramienta utilizada para el manejo de la contaminación marina a lo largo de la historia han sido medidas regulatorias o legislativas para controlar la cantidad de contaminantes introducidos a este ecosistema. Sin embargo, en la actualidad se han tenido que aplicar tecnologías basadas en tratamientos físicos y químicos para la restauración de mares y océanos. La biorremediación surge como una alternativa viable para la eliminación de contaminantes en mares y océanos debido a su compatibilidad ecológica y rentabilidad económica (Frid & Caswell, 2017; Ławniczak et al., 2020). La biorremediación es una tecnología emergente que utiliza microorganismos, plantas o enzimas microbianas para eliminar contaminantes en el ambiente (Singh et al., 2019).

El objetivo de esta revisión es el de proporcionar información actual sobre las estrategias de biorremediación que se están utilizando en la limpieza de los mares. Además de revisar los consorcios microbianos que están siendo empleados en la actualidad.

Contaminación de mares y océanos

La definición de *contaminación marina* más aceptada en ambientes académicos y políticos fue dada por las Naciones Unidas en 1990 y es: "La introducción por el hombre, directa o indirectamente, de sustancias o energía en el medio marino (incluidos los estuarios) que causan efectos perjudiciales tales como daños a los recursos vivos, peligros para la salud humana, obstáculo para las actividades marinas, incluida la pesca, el deterioro de la calidad del agua de mar y la reducción de los atractivos naturales" (GESAMP, 1990).

Una amplia variedad de actividades terrestres contribuyen a la descarga de contaminantes en el mar, ya sea directamente, o mediante el transporte por los ríos y la atmósfera (GESAMP, 1990). Las 5 vías principales de

entrada de los contaminantes son: (1) escorrentía, (2) entrada fluvial, (3) vertidos y descargas de barcos, (4) descargas directas de tuberías, y (5) deposiciones atmosféricas (Kennish, 2017). Los residuos antropogénicos más comunes en los ecosistemas marinos alrededor del mundo son materiales de dragado, aguas residuales, descargas industriales y municipales y plásticos. Estos residuos contienen una gran variedad de contaminantes entre los que destacan los metales pesados, hidrocarburos de petróleo, y otras sustancias, muchas de las cuales provienen de plásticos ya que de entre todos los contaminantes marinos los plásticos representan hasta el 80%. Hablando de los plásticos específicamente, estos vienen acompañados de compuestos químicos como el bisfenol-A y los bifenilos policlorados que se desprenden en grandes cantidades a medida que los plásticos se van convirtiendo en microplásticos. Esto provoca una contaminación de carácter químico y físico ya que estos microplásticos son consumidos por animales que posteriormente llegarán a los humanos, causando una toxicidad severa. Algunos estudios realizados por organizaciones como el grupo Dalberg Advisors y la organización independiente de conservación World Wild Fund for Nature, muestran que el plástico que se desarrolló hasta antes del año 2000 es idéntico al que se desarrolló hasta el 2016, la contaminación que podemos observar en los océanos, al igual que en el suelo y otras zonas acuíferas se debe al mal manejo de los residuos de este producto, lo que actualmente le aporta "características omnipresentes en la naturaleza", de acuerdo a los resultados de estas organizaciones (Kennish, 2017; Molina et al., 2021, Vinayaka KS & Kadkol S, 2022).

Biorremediación marina

La biorremediación marina ha surgido como una alternativa viable y eficiente para la restauración y restablecimiento de ecosistemas marinos (Dell' Anno et al., 2021). En la actualidad, esta técnica ha sido la más exitosa y preferida para la eliminación de contaminantes en océanos alrededor del mundo debido a su compatibilidad de la biorremediación con los ciclos biogeoquímicos lo que hace a esta tecnología sustentable y amigable con el ambiente.

Otras ventajas de estas estrategias son su adaptabilidad y bajo costo. La biorremediación marina se basa en el aprovechamiento de las capacidades metabólicas de células vivas o sus componentes biológicos para alcanzar la degradación de contaminantes orgánicos complejos en sus componentes más sencillos y menos tóxicos como dióxido de carbono, agua, compuestos inorgánicos, etc. Existe un gran número de factores que afectan la efectividad de la biorremediación en estos ecosistemas, entre ellos encontramos la naturaleza y estructura del contaminante, solubilidad en el agua, biodisponibilidad, biodegradabilidad, concentración de metabolito y sustrato, oxígeno, salinidad, temperatura, pH, y la actividad de la población microbiana endémica (Paniagua, 2015).

Los microorganismos marinos son esenciales para la salud del medio ambiente y la del hombre. Ellos participan en ciclos biogeoquímicos, en las cadenas tróficas y, en general, en la degradación y producción de compuestos para el mantenimiento del equilibrio en el ecosistema. Éstos poseen una diversidad genética y bioquímica inmensa debido a las cambiantes condiciones ambientales que deben soportar en sus ecosistemas (Sivaperumal et al., 2017). Los ecosistemas marinos reciben una gran variedad de contaminantes por lo que la estrategia de biorremediación marina debe de ser la adecuada para lidiar con esta diversidad. Entre las estrategias más comunes para labiorremediación en mares se encuentran las enfocadas en el aprovechamiento de microorganismos degradadores, algunas de ellas son la adición de compuestos específicos para estimular la capacidad degradadora de microorganismos autóctonos (bioestimulación) y la adición de especies microbianas específicas con capacidad biodegradadora (bioaumentación) (Dell' Anno et al., 2021). Cuando se considera la aplicación de estrategias de bioaumentación para la degradación de hidrocarburos de petróleo, se ha observado que el uso de consorcios microbianos es más efectivo que el uso de una sola cepa, ya que diferentes grupos de bacterias pueden metabolizar diferentes grupos de hidrocarburos (Hosokawa et al., 2009; Varjani, 2017) y otros contaminantes mediante la

producción de enzimas degradadoras (Fuentes et al., 2014) y biosurfactantes (Souza et al., 2014). Un consorcio microbiano se define como “una asociación natural de dos o más poblaciones microbianas, de diferentes especies, que actúan conjuntamente como una comunidad en un sistema complejo, donde todos se benefician de las actividades de los demás” (Ochoa & Montoya, 2010). Las especies bacterianas más utilizadas para la degradación de contaminantes en mares y océanos pertenecen a los géneros *Alcaligenes spp.*, *Achromobacter spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Alteromonas spp.*, *Arthrobacter spp.*, *Burkholderia spp.*, *Bacillus spp.*, *Enterobacter ssp.*, *Flavobacterium spp.* y *Pseudomonas spp.* (Ojuederie & Babalola, 2017; Xu et al., 2018).

Biorremediación de metales pesados

Los metales pesados son contaminantes persistentes en los ecosistemas marinos debido a su alta toxicidad. Metales pesados como el plomo (Pb), cadmio (Cd), mercurio (Hg), cromo (Cr), zinc (Zn), níquel (Ni), cobre (Cu) y arsénico (As) son citotóxicos a bajas concentraciones, además de que se acumulan en sistemas biológicos ocasionando estrés oxidativo. Estos compuestos son de los contaminantes más difíciles de eliminar por su baja o nula biodegradabilidad (Ojuederie & Babalola, 2017). Algunos microorganismos son importantes en procesos de eliminación de metales pesados de los ecosistemas gracias a su capacidad de secuestrar, precipitar o cambiar el estado de oxidación de varios metales pesados (Ojuederie & Babalola, 2017). Ciertas especies bacterianas de los géneros *Bacillus spp.*, *Pseudomonas sp.*, *Sporosarcina spp.*, *Enterobacter sp.* y *Kocuria sp.*, hongos del género *Aspergillus spp.* y levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* han reportado eficiencias de remoción del 99% de As, 98.3% de Pb, 85.4% de Cd y 5.6% de Cu (Kang et al., 2016). Otras bacterias marinas se han propuesto para la biorremediación de metales pesados, siendo los principales organismos descomponedores de los océanos, tales como *Pseudomonas fluorescens*, *Dechloromonas aromatica*, *Alcanivorax borkumensis*, *Methylibium petroleiphilum*, *B. subtilis* y *Phanerochaete chrysosporium* (Husain et al., 2022). Otros microorganismos comúnmente utilizados en la biorremediación de metales pesados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Microorganismos usados comúnmente en la biorremediación de metales pesados.(Husain et al., 2022).

Tipo de microorganismo	Metal pesado removido
Bacterias	
<i>Kocuria flava</i>	Cu
<i>Sporosarcina ginsengisoli</i>	As
<i>Pseudomonas veronii</i>	Cd, Zn, Cu
<i>Pseudomonas putida</i>	Cr
<i>Enterobacter cloacae B2-DHA</i>	Cr
<i>Bacillus subtilis</i>	Cr
Hongos	
<i>Aspergillus versicolor</i>	Ni, Cu
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Pb
<i>Gloeophyllum sepiarium</i>	Cr
<i>Rhizopusoryzae</i>	Cr
Levaduras	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Pb, Cd

Biorremediación de desechos industriales orgánicos

Las actividades industriales son esenciales para el desarrollo económico de un país, además de ser una de las principales fuentes de contaminación de los ecosistemas marinos. Los desechos industriales son considerados como peligrosos para organismos vivos y el medio ambiente gracias a la elevada toxicidad de la gran variedad de contaminantes que contienen. Entre los contaminantes orgánicos más comunes encontramos colorantes, materia orgánica, pesticidas, entre otros. (Bharagava et al., 2020) En una primera instancia, el trabajo de Alves Licursi et al. (2021), en donde se desarrolló un consorcio efectivo para el tratamiento de Remazol Brilliant Blue R (RBBR) un colorante proveniente de la industria textil, principalmente para su detoxificación y decoloración. En el ensayo realizado se diseñó un consorcio compuesto por varias cepas específicas de microorganismos que demostraron tener una

efectividad del 52% en temas de detoxificación y hasta 86% en los ensayos de decoloración con concentraciones de hasta 500 ppm. Se comprobó un proceso de biosorción y por medio de análisis meta transcriptómicos se demostró que la decoloración y degradación subsecuente de RBBR se hizo a partir de una acción coordinada de oxidasas, oxigenasas e hidrolasas. El consorcio constaba de *Mucor racemosus* CBMAI 847, *Marasmiellus spp.* CBMAI 1062, *B. subtilis* CBMAI 707 y *Dietzia maris* CBMAI 705 (Alves Licursi et al., 2021). Otras actividades industriales relacionadas con la acuicultura también tienen un efecto considerable en cuanto a la calidad del agua y el bienestar de los ecosistemas. En este caso se observa particularmente al cultivo de camarón. Una importante actividad económica practicada desde el inicio de la década de los 60, ha enfrentado problemas relacionados con la alimentación excesiva, la sobreproducción y el constante aumento de la materia orgánica

producida por la excreta de los camarones. Además de esto el exceso de nitrógeno provoca un deterioro de la calidad de agua por la acumulación de amonio, nitritos y nitratos, los cuales tienen efectos tóxicos para la biota, lo que en torno acaba por afectar el pH, la concentración de oxígeno disuelto e incluso promueve la proliferación de microorganismos no deseados. Y es que los contaminantes provenientes de esta práctica vienen en varias formas, el alimento de los camarones, sus excretas, camarones muertos, amoniaco, urea, entre otros, los cuales acaban siendo vertidos en vías fluviales y eventualmente llegan al mar. Para corregir esto se realizó un estudio probando 4 consorcios microbianos, demostrando la versatilidad de estas herramientas, entre los microorganismos utilizados había bacterias tales como *B. subtilis*, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus plantarum*, pero también se utilizó a *Saccharomyces cerevisiae*, al hongo *Trichoderma harzianum* y a algunas microalgas, que en realidad resultaron ser las más efectivas, estas fueron *Chlamydomonas sp.*, *Desmodesmus sp.*, y *Chlorella sp.* Este consorcio compuesto por microalgas autóctonas resultó tener un efecto muy bueno en la remediación del agua, llevando sus niveles a un punto donde incluso se podía reutilizar y se remediaba la mala calidad que esta suele tener por la actividad acuícola del cultivo de camarón (Navarrete et al., 2022).

Otro grupo importante de contaminantes orgánicos presentes en aguas residuales industriales son los pesticidas los cuales, en conjunto con otros tipos de químicos utilizados en la protección de cultivos, están compuestos por organofosfato, organoclorado, carbamato, piretroides, reguladores de crecimiento, neonicotinoides entre otros. El elevado uso de estos productos químicos sintéticos ha elevado su presencia en cuerpos de agua salados como mares y océanos debido a su persistencia y fácil migración desde su punto de origen para así contaminar suelos y otros ecosistemas de forma local y global (Carvalho, 2017). Para la eliminación de estos compuestos se ha propuesto la utilización de bacterias con capacidad degradadora de los ya mencionados compuestos químicos. Se ha demostrado que *Bacillus spp.*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas spp.* y *Serratia marcescens* tienen un metabolismo eficiente para la degradación de pesticidas organofosforados con reportes de un

55% de degradación por *Pseudomonas spp.*, 70% para *S. marcescens*, 73.5% en *Bacillus spp.* y *P. agglomerans* con 68.6% de degradación (alta concentración de clorpirifos) (Hernández et al., 2016; Morrillo, 2018; Piraban & Rincón, 2018).

Otras bacterias como *Pseudomonas putida*, *Acinetobacter spp.* y *Arthrobacter spp.* son eficientes para la degradación de Cyhalofop Buty presente en pesticidas, llegando a degradar hasta el 100% de este compuesto, comprobado por cromatografía líquida y espectrofotometría (Morrillo, 2018). Otro de los agentes bacterianos más descritos para la biorremediación de pesticidas son las actinobacterias, por lo que se han propuesto consorcios enteros de una sola especie, pero distintas cepas para el tratamiento de distintos compuestos químicos. Una propuesta en particular es el uso de *Streptomyces spp.* A2, A5, A11 y M7 para la degradación de lindano, clordano y metoxicloro, ya que demostraron tener extremadamente alta capacidad de degradación en el caso del clordano y el metoxicloro, degradando 99.8% y 99.5%, aunque para el lindano es bastante menor, con solo un 40.4% de remoción (Raimondo et al., 2017).

Biorremediación de hidrocarburos del petróleo
Los hidrocarburos del petróleo constituyen el principal grupo de contaminantes marinos. La creciente evidencia sobre su persistencia, toxicidad, mutagenicidad y carcinogenicidad enfatiza la necesidad de su remoción de ecosistemas marinos (Dash et al., 2012; Dell'Anno et al., 2021).

Estos son estructuras con 2 o más anillos de benceno adheridos en varias configuraciones estructurales (Lawal, 2017). Este contaminante proviene de una variedad de fuentes, son ampliamente utilizados en la industria agrícola, por lo que suelen estar en los alimentos, además de que son liberados de la quema de combustibles fósiles y de carbón (Lawal, 2017). Hay varios reportes que establecen la eficacia de las diferentes agrupaciones de microorganismos con la capacidad de degradar hidrocarburos de petróleo. Bacterias como *Sphingobium spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Klebsiella aerogenes*, *Sphingomonas spp.*, *Mycobacterium spp.*, *Terrabacter spp.*, *Rhodococcus spp.*, han presentado eficiencias de degradación de hasta el 90% (Chiriví et al., 2020; Lugo, 2017; Macchi,

2018) y por eso han sido utilizadas en distintos consorcios para degradar varios tipos de hidrocarburos de petróleo. *B. subtilis* ha mostrado potencial en la degradación de hidrocarburos de petróleo, principalmente n-alcanos de cadena larga (Gudiña et al., 2013; Tao et al., 2017). También se ha reportado la capacidad de esta especie de degradar compuestos aromáticos volátiles del petróleo como benceno, tolueno y xileno en un 82, 62 y 65% respectivamente, y eso es de manera natural, ya que también se observó que con nutrientes y peróxido de hidrógeno las eficiencias de degradación subían a 93, 72 y 80% respectivamente (Mukherjee & Bordoloi, 2012). Además de esto, Gudiña et al. (2013) reportaron que la capacidad productora de biosurfactantes lipopéptidos de *B. subtilis* promueve la degradación de hidrocarburos tóxicos al disminuir la tensión interfacial entre el contaminante y la fase acuosa para aumentar la biodisponibilidad del petróleo a los microorganismos degradadores (Gudiña et al., 2013). Por otro lado, *P. aeruginosa* es capaz de degradar de forma eficiente hidrocarburos de n-alcanos de bajo y alto peso molecular e hidrocarburos aromáticos policíclicos con una eficiencia de hasta un 91% y 98% respectivamente en condiciones in vitro (Medić et al., 2020; Rehman et al., 2021). Medić et al. (2020) reportan que la degradación de hidrocarburos por parte de esta bacteria es un proceso dependiente de los surfactantes producidos por la misma cepa. *P. aeruginosa* produce una mezcla de biosurfactantes, ramnolípidos y exopolisacáridos que facilitan la emulsificación de los hidrocarburos. Específicamente se seleccionó la cepa san ai por su propiedad halotolerante, metalotolerante, hidrocarbonoclásticas y alcalófilos. En la literatura se menciona la buena eficiencia degradadora de petróleo que tiene el co-cultivo de *B. subtilis* y *P. aeruginosa* en medio líquido, llegando a degradar hasta 57.56% (Ghorbannezhad et al., 2022; Mukherjee & Bordoloi, 2012; Pari et al., 2019; Safitri et al., 2018).

También se ha reportado la capacidad degradadora de diversos hidrocarburos de petróleo de la bacteria *A. baumannii*. Han sido propuestas como herramientas de biorremediación debido a que las bacterias del género *Acinetobacter* spp. son capaces de utilizar una gran variedad de sustratos como fuente de carbono además de crecer en un

amplio rango de temperaturas a diferentes pHs y ser productoras de biosurfactantes (Kämpfer, 2014). Se ha reportado la propiedad degradadora de bacterias de este género aisladas de muestras de agua y tierra contaminada con hidrocarburos de petróleo en todo el mundo, proporcionando resultados como 80.4% y 73.9% de degradación, además de otros buenos resultados bajo diferentes condiciones, siempre reportando alta eficiencia (Huang et al., 2013; Macaya et al., 2019; Nafian et al., 2016; Nkem et al., 2016). Se ha descrito que *A. baumannii* degrada hasta un 58.24% el petróleo crudo (Zhang et al., 2021) y 95.9% los alcanos del petróleo (Nkem et al., 2016).

También se han reportado hongos con la capacidad mineralizar estos compuestos, especies como *Phanerochaete chrysosporium*, *Phanerochaete laevis*, otros miembros del género *Phanerochaete* spp. y otros géneros como *Penicillium* spp., *Chrysosporium* spp. y *Aspergillus* spp. donde se observó la capacidad de *A. niger* de reducir hasta en un 84% estos compuestos, y en porcentajes menores tenemos a *P. chrysosporium* con 52% y *Penicillium* spp. siendo de los más bajos con solo 16.45% de actividad frente a hidrocarburos de petróleo (Lugo, 2017; Saucedo, 2016)

En la literatura se ha reportado que los consorcios microbianos con mayor eficiencia de remoción de hidrocarburos de petróleo en ecosistemas marinos son aquellos que contienen bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* spp., *Rhodococcus* spp., *Acinetobacter* spp. y *Bacillus* spp. (Perdigão, 2021). Leal et al. (2018) describe una buena capacidad degradadora de diesel de un consorcio compuesto por dos cepas de *A. baumannii*, una de *P. aeruginosa*, una de *B. subtilis*, y una última cepa de *Ochrobactrum anthropi* pudiendo degradar hasta el 55% de los hidrocarburos presentados (Leal et al., 2018). El uso de consorcios microbianos compuestos de hongos y bacterias es muy común, aunque también se emplean otros microorganismos con capacidad de biodegradación como levaduras de los géneros *Candida* spp., *Rhodotorula* spp., *Exophiala* spp., *Cryptococcus* spp., y especies en específico como *Komagataella pastoris*, *Debaryomyces hansenii* y *Saccharomyces cerevisiae* (Ide et al., 2020; O'Connor et al., 2013; Padilla et al., 2021; Syed et al., 2010). Se ha reportado que el uso de consorcios de levaduras,

Artículos

enriquecidos con nanopartículas de óxido de zinc demostró ser eficiente en la degradación de benceno(a)pireno al elevar el metabolismo de las células alcanzando una degradación máxima del 76% (Padilla et al., 2021).

Biorremediación auxiliada por biosurfactantes

Los biosurfactantes son compuestos orgánicos que contienen un segmento polar y otro no polar, por lo que su solubilidad parcial les permite ocupar la interfase para así reducir la tensión superficial e interfacial y facilitar el proceso de biodegradación (Landa, 2017). Hay una amplia cantidad de bacterias que producen estos metabolitos entre los que se encuentran *Pseudomonas spp.*, *Bacillus spp.*, *Rhodococcus spp.*, *Nocardia spp.*, *Serratia spp.*, entre otros (Landa, 2017; Pérez et al., 2010; Temitope et al., 2021). Algunos géneros de hongos productores de biosurfactantes son *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.*, *Fusarium spp.*, y *Ustilago spp.* (Alves Sanches et al., 2021; Barrionuevo, 2017; Becerra & Horna, 2016; Landa, 2017). También hay algunas levaduras productoras de

biosurfactantes como *Candida spp.* y *Yarrowia spp.* (Becerra & Horna, 2016; Landa, 2017). En otros estudios se ha observado que la adición de surfactantes en los consorcios microbianos puede aumentar la biodegradación y reducir eficazmente la cantidad de petróleo crudo en la superficie del agua de mar, lo que en torno ayuda al desarrollo de sistemas mejorados de biorremediación marina. Un candidato importante es *Sapindus saponaria*, productor de saponinas, un surfactante natural que puede modificar la membrana bacteriana y reduce la hidrofobicidad de las células, el cual cambia el comportamiento cinético de las células, lo que entonces podría resultar ventajoso en el tratamiento de áreas contaminadas con petróleo crudo. Además de surfactantes, la adición de biocarbón ha demostrado ser un poderoso estimulante en la actividad degradativa de algunos consorcios microbianos (Zhang & Zhang, 2022). En la Tabla 2, se presentan las condiciones ambientales a las cuales, los consorcios han demostrado ser eficientes para la remoción de contaminantes.

Tabla 2. Condiciones ambientales y contaminantes blanco de diferentes consorcios microbianos.

Consorcio/microorganismos	Condiciones ambientales (temperatura, oxígeno, pH)	Contaminante que degradan	Referencia
<i>Viridibacillus arenosi</i> , <i>Sporosarcina soli</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> y <i>E. cloacae</i>	30°C Condiciones aerobias pH 7	Metales pesados	Kang et al., 2016
<i>Mucor racemosus</i> , <i>Marasmiellus spp.</i> , <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Dietzia maris</i>	28°C Condiciones aerobias pH 8	Colorante RBBR	Alves Licursi et al., 2021
<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> y <i>Lactobacillus plantarum</i>	30°C Condiciones aerobias pH 6	Desechos industriales orgánicos	Navarrete et al., 2022
<i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Ochrobactrum anthropi</i>	30°C Condiciones aerobias pH 4.2-4.9	Múltiples hidrocarburos	Leal et al., 2018
<i>Chlamydomonas sp.</i> , <i>Desmodesmus sp.</i> y <i>Chlorella sp.</i>	20-25°C OD ¹ : 3 mg/L pH 6-9	Desechos industriales orgánicos	Navarrete et al., 2022

¹ OD: oxígeno disuelto

Conclusión

Esta revisión busca explorar las estrategias actuales aplicadas a uno de los principales problemas de contaminación, analizando los principales contaminantes de los ecosistemas marinos, desde hidrocarburos hasta pesticidas, y qué relaciones microbióticas pueden ser utilizadas para la biorremediación de estos ecosistemas. La biorremediación es una tecnología relativamente nueva que tiene gran potencial para la eliminación de contaminantes de mares y océanos, algo evidente después del análisis de este trabajo. Estos son sólo algunos ejemplos de la capacidad y versatilidad que ofrecen los consorcios microbianos en temas de biorremediación.

Referencias

- Alves Licursi VG, Cabral L, Ramos Otero IV, Ferro M, Uemura de Faria A, Maia de Oliveira V, Bacci M, & Durães Sette L (2021) Marine associated microbial consortium applied to RBBR textile dye detoxification and decolorization: Combined approach and metatranscriptomic analysis. *Chemosphere* 267(129190). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129190>
- Alves Sanches M, Galvão Luzeiro I, Alves Cortez AC, Simplício de Souza É, Melchionna Albuquerque P, Kumar Chopra H, & Braga de Souza JV (2021) Production of biosurfactants by ascomycetes. *International Journal of Microbiology* 2021, 11. <https://doi.org/10.1155/2021/6669263>
- Barrionuevo MR (2017) Producción de biosurfactantes bacterianos para su uso en procesos de biotratamiento de efluentes industriales con contenido en metales. Tesis de doctorado en en Química Biológica. Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires Argentina. https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis_n6463_Barrionuevo.pdf
- Becerra L, Horna M (2016) Isolation of biosurfactant producing microorganisms and lipases from wastewaters from slaughterhouses and soils contaminated with hydrocarbons. *Scientia agropecuaria* 7(1):23–31. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2016.01.03>
- Bharagava RN, Saxena G, Mulla SI (2020) Introduction to industrial wastes containing organic and inorganic pollutants and bioremediation approaches for environmental management. En *Bioremediation of Industrial Waste for Environmental Safety* (pp. 1–18). Springer Singapore.
- Carvalho FP (2017) Pesticides, environment, and food safety. *Food and Energy Security* 6(2):48–60. <https://doi.org/10.1002/fes3.108>
- Chiriví Salomón JS, Fajardo Gómez CA, Gómez Rodríguez LA, Delgado Tovar SD (2020) Biorremediación de hidrocarburos saturados y aromáticos policíclicos. En *Revisión y panorama nacional de la biorremediación microbiana*. Escuela de Ciencias Agrícolas (ed.).
- Dash HR, Mangwani N, Chakraborty J, Kumari S, Das S (2013) Marine bacteria: potential candidates for enhanced bioremediation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97(2):561–571. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4584-0>
- Dell' Anno F, Rastelli E, Sansone C, Brunet C, Ianora A, Dell' Anno A (2021) Bacteria, fungi and microalgae for the bioremediation of marine sediments contaminated by petroleum hydrocarbons in the omics era. *Microorganisms* 9(8):1695. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081695>
- Frid CLJ, Caswell BA (2017) *Marine Pollution*. Oxford University Press.
- Fuentes S, Méndez V, Aguila P, Seeger M (2014) Bioremediation of petroleum hydrocarbons: catabolic genes, microbial communities, and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98(11):4781–4794. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5684-9>

Artículos

GESAMP (1990) Report of the Twentieth Session. <http://www.gesamp.org/publications/report-of-the-20th-session>

Ghorbannezhad H, Moghimi H, Dastgheib SMM (2022) Biodegradation of high molecular weight hydrocarbons under saline condition by halotolerant *Bacillus subtilis* and its mixed cultures with *Pseudomonas* species. *Scientific Reports* 12(1):13227. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-17001-9>

Gudiña EJ, Pereira JFB, Costa R, Coutinho JAP, Teixeira JA, Rodrigues L R (2013) Biosurfactant-producing and oil-degrading *Bacillus subtilis* strains enhance oil recovery in laboratory sand- pack columns. *Journal of Hazardous Materials* 261:106–113. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.06.071>

Hernández Ruiz GM, Álvarez Orozco NA, Ríos Osorio LA (2016) Biorremediación de organofosforados por hongos y bacterias en suelos agrícolas: revisión sistemática. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 18(1):139. https://doi.org/10.21930/rcta.vol18_num1_art:564

Hosokawa R, Nagai M, Morikawa M, Okuyama H (2009) Autochthonous bioaugmentation and its possible application to oil spills. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25(9):1519–1528. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0044-0>

Huang L, Xie J, Lv BY, Shi XF, Li GQ, Liang FL, Lian JY (2013) Optimization of nutrient component for diesel oil degradation by *Acinetobacter beijerinckii* ZRS. *Marine Pollution Bulletin* 76(1–2):325–332. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.03.037>

Husain R, Vikram N, Yadav G, Kumar D, Pandey S, Patel M, Khan NA, Hussain T (2022) Microbial bioremediation of heavy metals by Marine bacteria. En *Development in Wastewater Treatment*

Research and Processes. Elsevier. pp. 177–203

Ide Pérez MR, Fernández López MG, Sánchez Reyes A, Leija A, Batista García RA, Folch Mallol J L, Sánchez Carbente MDR (2020) Aromatic hydrocarbon removal by novel extremotolerant *Exophiala* and *Rhodotorula* spp. From an oil polluted site in Mexico. *Journal of Fungi* 6(3):135. <https://doi.org/10.3390/jof6030135>

Kämpfer P (2014) *Acinetobacter*. En *Encyclopedia of Food Microbiology*. Elsevier. pp. 11–17. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-384730-0.00002-1>

Kang CH, Kwon YJ, So JS (2016) Bioremediation of heavy metals by using bacterial mixtures. *Ecological Engineering* 89:64–69. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.01.023>

Kennish MJ (2017) *Practical handbook of estuarine and marine pollution*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780203742488>

Kumar PS, Prasannamedha G (2021) Biological and chemical impacts on marine biology. En *Modern Treatment Strategies for Marine Pollution*. Elsevier. pp. 11–27. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-822279-9.00006-3>

Landa Faz MCA (2017) *Producción y aplicación de un biosurfactante producido por el consorcio microbiano para la biorremediación de suelos agrícolas contaminados con endosulfán*. Tesis Doctorado en Ciencias Biotecnológicas. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. <https://repositorio.cinvestav.mx/bitstream/handle/cinvestav/3418/SSIT0016561.pdf?sequen ce=1>

Lawal AT (2017) Polycyclic aromatic hydrocarbons. A review. *Cogent Environmental Science* 3(1):1339841. <https://doi.org/10.1080/23311843.2017.1339841>

Ławniczak Ł, Woźniak Karczewska M, Loibner AP, Heipieper HJ, Chrzanowski Ł (2020) Microbial degradation of hydrocarbons-basic principles for bioremediation: A review. *Molecules* 25(4):856.

<https://doi.org/10.3390/molecules25040856>

6

Leal PL, Pinheiro Dadalto S, Fernandes RCR, Queiroz MELR, Tótola MR (2018) Enrichment of population density of a bacterial consortium during bioremediation of a soil under successive contaminations with diesel oil. *Acta scientiarum. Biological sciences* 40(1):36904.

<https://doi.org/10.4025/actascibiols.v40i1.36904>

Lugo Mancilla LL (2017) Interpretación conceptual del estado actual de la biorremediación realizada por microorganismos sobre hidrocarburos aromáticos policíclicos derivados del petróleo. Universidad de Manizales.

Macaya CC, Méndez V, Durán RE, Aguila Torres P, Salvà Serra F, Jaén Luchoro D, Moore ERB, Seeger M (2019) Complete genome sequence of hydrocarbon-degrading halotolerant *Acinetobacter radioresistens* DD78, isolated from the Aconcagua River mouth in central Chile. *Microbiology Resource Announcements* 8(33). <https://doi.org/10.1128/MRA.00601-19>

Macchi M (2018) Desarrollo de consorcios bacterianos con alta eficiencia de degradación de PAH para su aplicación a la recuperación de suelos crónicamente contaminados. Tesis doctoral. Universidad Nacional de La Plata. Buenos Aires, Argentina.

<http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/665>

53

Medić A, Lješević M, Inui H, Beškoski V, Kojić I, Stojanović K, Karadžić I (2020) Efficient biodegradation of petroleum n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons by polyextremophilic *Pseudomonas aeruginosa* strain with multidegradative capacity. *RSC Advances*

10(24):14060–14070.

<https://doi.org/10.1039/c9ra10371f>

Molina Castro RE, Gómez Ronquillo WJ, Cruz Lozado J (2021) Contaminación marina por desechos plásticos en países del perfil costero del Pacífico Sur, 2016-2021. *Polo de Conocimiento* 6(5):458–478. <https://doi.org/10.23857/pc.v6i5.2671>

Morrillo Zambrano PA (2017) Caracterización de consorcios microbianos con capacidad biorremediadora de pesticidas piretroides (Cipermetrina), organofosforados (Clorpurifos) y N-(fosfometil) glicina (GLIFOSATO). Tesis Maestría en Gestión Ambiental. Universidad Técnica Estatal de Quevedo. <https://repositorio.uteq.edu.ec/bitstream/43000/5041/1/T-UTEQ-015.pdf>

Mukherjee AK, Bordoloi NK (2012) Biodegradation of benzene, toluene, and xylene (BTX) in liquid culture and in soil by *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains and a formulated bacterial consortium. *Environmental Science and Pollution Research International* 19(8):3380–3388. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-0862-8>

Nafian F, Gharavi S, Soudi MR (2016) Degenerate primers as biomarker for gene-targeted metagenomics of the catechol 1, 2-dioxygenase-encoding gene in microbial populations of petroleum-contaminated environments. *Annals of Microbiology* 66(3):1127–1136. <https://doi.org/10.1007/s13213-016-1197-3>

Navarrete Álava J, Noles Aguilar P, Delgado Villafuerte C, Hernández de Guerrero N, Guerrero Ríos R (2022) Biorremediación de efluentes del cultivo de camarón por medio de consorcios microbianos autóctonos y microalgas nativas en Manabí, Ecuador. *AquaTechnica* 4(1):53–65. <https://doi.org/10.33936/at.v4i1.4635>

Nkem BM, Halimoon N, Yusoff FM, Johari WLW, Zakaria MP, Medipally SR, Kannan N (2016) Isolation, identification and diesel-oil biodegradation capacities of indigenous hydrocarbon-degrading strains of *Cellulosimicrobium cellulans* and

Artículos

Acinetobacter baumannii from tarball at Terengganu beach, Malaysia. Marine Pollution Bulletin 107(1):261–268.
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.03.060>

Ochoa Carreño DC, Montoya Restrepo A (2010) Consorcios microbianos: una metáfora biológica aplicada a la asociatividad empresarial en cadenas productivas agropecuarias. Revista de la Facultad de Ciencias Económicas de la Universidad Militar Nueva Granada 18.
<http://www.scielo.org.co/pdf/rfce/v18n2/v18n2a04.pdf>

O'Connor STF, Lan J, North M, Loguinov A, Zhang L, Smith MT, Gu AZ, Vulpe C (2012) Genome-wide functional and stress response profiling reveals toxic mechanism and genes required for tolerance to Benzo[a]pyrene in *S. cerevisiae*. Frontiers in Genetics 3:316.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2012.00316>

Ojuederie O, Babalola O (2017) Microbial and plant-assisted bioremediation of heavy metal polluted environments: A review. International Journal of Environmental Research and Public Health 14(12):1504.
<https://doi.org/10.3390/ijerph14121504>

Padilla Garfías F, Silvia Sánchez N, Calahorra M, Peña A (2021) Levaduras degradadoras de hidrocarburos aromáticos policíclicos. Revista de Educación Bioquímica 40(4):178–188.
<https://www.medigraphic.com/pdfs/revedu/bio/reb-2021/reb214d.pdf>

Paniagua Michel J (2015) Marine bioremediation - A sustainable biotechnology of petroleum hydrocarbons biodegradation in coastal and marine environments. Journal of bioremediation & biodegradation 6(2).
<https://doi.org/10.4172/2155-6199.1000273> ,

Pari P, Thillipan M, Queenie A (2019) Bioremediation of Oil Sludge using Pseudomonas Aeruginosa, Bacillus Subtilis and Brassica Juncea. International Journal of Engineering Research & Technology

8(10).
<https://www.ijert.org/research/bioremediation-of-oil-sludge-using-seudomonas-aeruginosa-bacillus-subtilis-and-brassica-iuncea-IJERTV8IS100306.pdf>

Pérez Vargas J, Anaya Reza O, Chang Solis CK, Membrillo Venegas IL, Calva Calva G (2010) Producción de biosurfactantes por bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno crecidas en hidrocarburos. Revista CENIC. Ciencias Químicas 41:1–9.
<https://www.redalyc.org/pdf/1816/181620500027.pdf>

Piraban Ramírez D, Rincón Martínez D (2018) Propuesta de un proceso de biorremediación bacteriana en suelos empleados para el cultivo de arroz en Paz de Ariporo a partir de una revisión bibliográfica. Tesis Licenciatura en Ingeniería Ambiental. Universidad El Bosque. Bogotá, Colombia.
https://repositorio.unbosque.edu.co/bitstream/handle/20.500.12495/3292/Piraban_Ram%C3%ADrez_Daniela_2018.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Raimondo EE, Fuentes MS, Benimeli CS (2017) Biorremediación de una mezcla de plaguicidas por actinobacterias: Empleo de un consorcio de actinobacterias para remover una mezcla de plaguicidas organoclorados en distintos sistemas. Editorial Académica Española.
<https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/158751>

Rehman R, Ali MI, Ali N, Badshah M, Iqbal M, Jamal A, Huang Z (2021) Crude oil biodegradation potential of biosurfactant-producing Pseudomonas aeruginosa and Meyerozyma sp. Journal of Hazardous Materials 418(126276):126276.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126276>

Safitri RM, Mangunwardoyo W, Ambarsari H (2018) Biodegradation of diesel oil hydrocarbons using Bacillus subtilis InaCC B289 and Pseudomonas aeruginosa InaCC B290 in single and mixed cultures. AIP Conference Proceedings.

<https://doi.org/10.1063/1.5062737>

Saucedo Martínez BC (2016) Bioestimulación de suelo contaminado con 60,000 ppm de aceite residual automotriz con detergente, extracto fúngico, H₂O₂, solución mineral y fitorremediación por *Sorghum vulgare* con *Penicillium chrysogenum* y *Aspergillus niger*. Tesis Maestría en Ciencias en Ingeniería Ambiental. [Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, México.

http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/bitstream/handle/DGB_UMICH/4748/FIQ-M-2016-1512.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Singh P, Kumar A, Borthakur A (2019) Abatement of environmental pollutants: Trends and strategies. Elsevier Science Publishing.

Sivaperumal P, Kamala K, Rajaram R (2017) Bioremediation of industrial waste through enzyme producing marine microorganisms. *Advances in Food and Nutrition Research* 80:165–179.

<https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.10.006>

Souza EC, Vessoni Penna TC, de Souza Oliveira RP (2014) Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: An overview. *International Biodeterioration & Biodegradation* 89:88–94.

<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.01.007>

Syed K, Doddapaneni H, Subramanian V, Lam YW, Yadav JS (2010) Genome-to-function characterization of novel fungal P450 monooxygenases oxidizing polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs).

Biochemical and Biophysical Research Communications 399(4):492–497.

<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.07.094>

Tao K, Liu X, Chen X, Hu X, Cao L, Yuan X (2017) Biodegradation of crude oil by a defined co-culture of indigenous bacterial consortium and exogenous *Bacillus subtilis*. *Bioresource Technology*

224:327–332.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.073>

Temitope KK, Ayanfemi AA, Rebecca OK, Hannah AY, Lawrence EJ, Ayanbukola AA, Adewumi AK, Samson Thompson O, Martha OI, Ayomide AO, Ayodeji OP, Oluwadamilare T (2021) Biosurfactant producing abilities of some bacteria isolated from bitumen contaminated soils. *Open Journal of Environmental Biology* 6(1):26–34.

<https://doi.org/10.17352/ojeb.000023>

Varjani SJ (2017) Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresource Technology* 223:277–286.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.037>

Vinayaka KS & Kadkol S (2022) Biological Approaches to Controlling Pollutants, Advances in bioremediation of organometallic pollutants: strategies and future road map. In: *Biological Approaches to Controlling Pollutants Advances in Pollution Research*. Elsevier Inc. pp. 233-239

Xu X, Liu W, Tian S, Wang W, Qi Q, Jiang P, Gao X, Li F, Li H, Yu H (2018) Petroleum hydrocarbon-degrading bacteria for the remediation of oil pollution under aerobic conditions: A perspective analysis. *Frontiers in Microbiology* 9:2885.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02885>

Zhang T, Zhang H (2020) Microbial Consortia Are Needed to Degrade Soil Pollutants. *Microorganisms* 10(2):261.

<https://doi.org/10.3390/microorganisms10020261>

Zhang X, Kong D, Liu X, Xie H, Lou X, Zeng C (2021) Combined microbial degradation of crude oil under alkaline conditions by *Acinetobacter baumannii* and *Talaromyces* sp. *Chemosphere* 273(129666):129666.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129666>

Development of polymeric fibers by centrifugal spinning process and their potential to adhere and proliferate human fibroblast cells

Desarrollo de fibras poliméricas por el proceso de hilado por centrifugación y su potencial para la adhesión y proliferación de fibroblastos humanos

Mariano Del Toro-Barbosa¹, Karina Asunción Parra-Ocampo¹, Héctor Pool², Eduardo Arturo Elizalde-Peña², Joel Briones³, María José Rivas-Arreola^{1,*}

¹ Materials Laboratory, Department of Mechanical Engineering. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey. Monterrey. N.L., México.

² Research and Postgraduate Directorate of the Faculty of Engineering, Universidad Autónoma de Querétaro. Santiago de Querétaro, Qro. México.

³Materials characterization laboratory, Photonics Department. Centro de Investigaciones en Óptica, A.C.. León, Gto., México.

mariajose.rivas@iberopuebla.mx

Abstract

Since regenerative medicine is highly dynamic and it is under continuous evolution, one of the challenge points to the development of new materials is the potential to mimic the extracellular matrix (ECM) and biocompatibility within living organisms. The main objective of this study is the development of polymeric fibers based on mixtures of Polylactic Acid (PLA), Carboxymethylcellulose (CMC) and Chitosan (CH) of different molecular weights through the centrifugal force spinning process (CSP). The morphology, the diameter, as well as the migration of JB/3T3 human fibroblast cells on the obtained microfibers were evaluated by scanning electron microscopy (SEM). Biological determinations, such as cell adhesion and proliferation, were evaluated by the MTT assay at 24 and 144 h. These tests were used as functionality and biocompatibility parameters of the obtained meshes. The results showed that CSP is a good method to produce well-shaped and handle-resistant fibers with diameters not exceeding 8 μm . In addition, the results of cell adhesion and proliferation indicated that the viability in the fibers improved by up to 25% after the evaluation hours, which suggests that the polymer mixtures used could benefit fibroblast cell migration and recreation of the MEC. In the case of the arrangement and diameter of the fibers obtained, it is suggested that this can facilitate the transport of nutrients and cellular waste. Finally, the results obtained indicate that CSP is an efficient method to produce microfibers on a large scale with possibilities of being used within the biomedical area.

Keywords: Biocompatibility, cell adhesion, cell viability, copolymers, fibers, centrifugal spinning.

Resumen

El desafío actual apunta al desarrollo de nuevos materiales con el potencial de recrear la matriz extracelular (MEC) y que posean una alta biocompatibilidad dentro de los organismos vivos. Se presenta el desarrollo de fibras poliméricas a base de mezclas de Ácido Poliláctico (PLA), Carboximetilcelulosa (CMC) y Quitosano (CH) de diferentes pesos moleculares mediante el proceso de hilado por fuerza centrífuga (CSP). La morfología, el diámetro, así como la migración de células de fibroblastos humanos JB/3T3 sobre las microfibras obtenidas se evaluaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Las determinaciones biológicas, como la adhesión y proliferación celular se evaluaron por el ensayo MTT a 24 y 144 h, estas pruebas se utilizaron como parámetros de funcionalidad y biocompatibilidad de las mallas obtenidas. Los resultados mostraron que CSP es un buen método para producir fibras bien formadas y resistentes a la manipulación con diámetros que no exceden las 8 μm . Además, los resultados de adhesión y proliferación celular indicaron que

la viabilidad en las fibras mejoro hasta en un 25% al pasar las horas de evaluación, o que sugiere que las mezclas de polímeros utilizadas podrían beneficiar la migración de las células de fibroblastos y la recreación de la MEC. En el caso del arreglo y diámetro de las fibras obtenidos se sugiere que esto puede facilitar el transporte de nutrientes y desechos celulares. Finalmente, los resultados obtenidos indican que CSP es un eficiente método para producir microfibras a gran escala con posibilidades de ser utilizadas dentro del área de biomédica.

Palabras clave: Biocompatibilidad, adhesión celular, viabilidad celular, copolímeros fibras, hilado por centrifugación.

Introduction

Lately, it has been observed that multiple advances within the area of biomaterials have revolutionized the field of tissue regeneration (TR) (Hélary *et al.*, 2015). For example, the creation of innovative medical approaches based on metallic, polymeric, ceramic, and composite materials have been used to fulfill specific functionalities such as bone substitutes (Wang *et al.*, 2012), scaffolds for nerve regeneration (Koh *et al.*, 2010), wound dressing for skin repair (Dumville *et al.*, 2013), controlled delivery systems (Zhang *et al.*, 2013), among others. Due to the fact that the perfect biomaterial does not exist, the common interest lies in the creation of new and smart devices that possess the capacity to generate a positive effect in the final host, such as mimicking ECM, assisting in the repair of an organ/tissue, and complying at the same time, high biocompatibility and zero toxicity, mutagenicity or genotoxicity (Wang, 2013). In this way, polymers have gained recognition among researchers to formulate new biomedical approaches, such as scaffolds, due to their tunable properties which allow them to have vast applications within biomedicine, pharmaceutical, cosmetic, and food, among other research areas (Zhang *et al.*, 2020; Miletić *et al.*, 2019; Ulery *et al.*, 2011). Ideally, a polymeric device for TR must show ideal chemical composition, physical structure, and mechanical properties to support cell attachment, proliferation, differentiation, and neo-tissue genesis (Koosha *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2002;) also, tunable degradation rates and nontoxic leachable products give them the necessary attributes to be considered for this type of applications (Ulery *et al.*, 2011).

There are different fiber fabrication technologies with biomedical applications, the

most widely used is electrospinning; this is because it allows obtaining fibers on a nano scale with relative ease (Zhou & Gong, 2008). Electrospinning is based on the effect of electrostatic force on materials that are generally polymers, the materials used respond to electrostatic charge by forming a cone that can expel small jets of the material and result in fibers of various sizes, which can even measure a few nanometers (Vaseashta, 2009). By the other hand, centrifugal spinning is a technology based on the production of fibers using centrifugal force rather than electric field forces. Many of the polymers used for the manufacture of nanofibers and microfibras are dissolved in nonpolar solvents, the sensitivity that these can present to the electric field is one of the limitations of electrospinning, and despite the fact that it is a technology widely used for research, the production of fibers at large scale by this method is quite limited (McEachin & Lozano, 2012; Sarkar *et al.*, 2010).

Although biocompatibility of polymeric biomaterials can be easily enhanced by implementing different methods for surface modification (Guney *et al.*, 2013), low mechanical strength and high rates of degradation have directly influenced the low application of certain polymers in TR (Sabir *et al.*, 2009). To overcome these issues, it has been opted for the creation of co-polymers and hybrid materials that exhibit controlled physicochemical and biological functions, while at the same time are able to mimic the hybrid and well-organized polymer nanostructure of the ECM (Watt & Huck, 2013). Natural polymers (gelatin, collagen, chitosan, cellulose, alginate etc.) have advantages over synthetic polymers, such as they may have properties that are specific to attach certain cells, and to ease the production of adhesion proteins or growth factors, also

may being highly biocompatible (Corradini *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2005; Chung *et al.* 2002). For these reasons, the aim of this work was to formulate co-polymer fibers based on mixtures of chitosan (CH), carboxymethyl cellulose (CMC), and polylactic acid (PLA) using a barely new method, the centrifugal spinning process (CSP). Physicochemical and biological characterization (including cellular adhesion and cytotoxic parameters) was determined in order to identify the formulation with the adequate adhesion and biocompatibility properties to be considered as a new and applicable alternative scaffold within TR.

Materials and methods

Materials

Chitosan of medium molecular weight (CHMMW), chitosan of low molecular weight (CHLMW), Carboxymethyl cellulose (CMC), Polylactic acid (PLA), chloroform (CHL), Dulbelco's modified Eagle's medium (DMEM), Fetal Bovine Serum (FBS), Phosphate Buffer Solution (PBS) pH=7.2, ampicillin-

streptomycin solution (1X), trypsin, citric acid, and Sigma-Aldrich cell growth determination kit (CGD1) were acquired from Sigma Aldrich. All chemicals and reagents used were of analytical grade or suitable for cell culture.

BJ/3T3 human fibroblast were purchased from the American Type Culture collection (ATCC, USA), and were cultured in an 10% FBS and 1% antibiotic supplemented DMEM in and were maintained at 37 °C in 95% air/5% CO₂ conditions. Culture media was changed every 2-3 days.

Methods

Preparation of fiber solutions

PLA, CH and CMC stock solutions were prepared by dissolving polymers into different solvents. PLA solution was prepared by dissolving the polymer in a 10% (v/v) chloroform solution; then CH and CMC solution were prepared by dissolving powders, independently, in a 4% (w/v) aqueous citric acid solution. All mixtures were stirred at room temperature until polymers were totally dissolved. Then PLA, CMC and CH stock solution were mixed in proportion established in Table 1.

Table 1. Stock and experimental solutions used for the manufacture of fibers by the centrifugal spinning process.

Key	Solution	Concentration
CHLMWI	CHLMW in PLA	2.5% v/v
CHLMWII		5.0% v/v
CHMMWI	CHMMW in PLA	0.5% v/v
CHMMWII		2.5% v/v
CHMMWIII*		5.0% v/v
CMCI*	CMC in PLA	2.5% v/v
CMCII*		3.0% v/v
CMCIII		5.0% v/v

Fiber preparation

About 1.5 mL of experimental solutions were loaded into a Fiberio® Fiberlab® L1000 equipment with a needle of 30G x ½ (PrecisionGlide). The equipment was operated at a controlled room temperature of 18 °C, heat was applied until a stable

experimental solutions temperature of 70 ± 1 °C was achieved, and the distance between the needle tip and the collector was fixed at 14 cm. All solutions were spun at 6000 rpm for 5 min, and then spun at 9000 rpm for 1 minute. Fibers were manually collected using a metal frame of 5x5 cm. The membrane obtained was dried at 80 °C to remove traces of the solvent.

Collected fibers were stored in sealed petri dishes at room temperature until used.

Fiber's characterizations

Scanning electron microscope

Morphology, fiber diameter, and aspect of developed fibers were determined using a scanning electron microscope (SEM; Jeol JSM-6010LA, USA). Fiber diameter distribution was determined through the analysis of micrographs using the JOEL integrated software of the microscope.

Bioactivity evaluations

Cell culture preparation

BJ/3T3 human fibroblast cell line was cultured on 25 cm² flask with DMEM supplemented with 10% FBS, 10 units/mL penicillin, 10 µg/mL streptomycin and maintained 24 h in 95% air/5% CO₂ at 37 °C conditions. Cell subculture was carried out when a 75% cell confluence was observed.

In vitro cell culture

Firstly, meshes of developed fibers were cut in 5x5 mm squares and were pre-incubated in a 96-well plate containing supplemented DMEM for about 1 h; then, samples were subjected to sterilization by UV radiation during 20 min. Subsequently, they were washed 10 times with PBS solution containing 10 units/mL penicillin and 10 µg/mL streptomycin. Finally, fibers were rinsed with DMEM containing phenol red until no color change was observed in the medium's color.

Cell viability by MTT assay

MTT assay was performed to determine the cell viability on polymeric devices through the cell growth determination kit (sigma CGD1), following supplier's instructions. JB/3T3 cells subculture was carried out by enzymatic digestion (trypsin/EDTA solution); then, cells were seeded in triplicate at 10 x 10⁴ cells in each well containing pre-treated polymer fiber meshes. Plates were incubated at 37 °C during 24 and 144 h in a 95% air/5% CO₂ conditions. After incubation period, cell medium was removed and MTT solution was added to each well, and plate was incubated for 4 more hours in same mentioned conditions. Cell viability was determined by UV-Vis spectra of formazan complex at 565 nm in a microplate reader; cell growth percentage was determined from the material-response for each selected fiber. All data points were performed in duplicate and repeated independently at least three times for statistical evaluation (mean ± standard deviations).

Results and discussions

Morphology of fibers

Results showed that CMCI, CMCII and CHMMWII generated a mesh with fibers strong enough to be collected and with potential applications for cell adhesion. With the same amount of volume introduced, the mixtures with CHLMW formed thin and fragile fibers that made the collection difficult. In general, the mixtures with CHMMW and CMC allowed the formation of meshes with the obtained fibers. Elongated droplets were found in fibers obtained from CMCI and CMCII (Figs. 1-2).

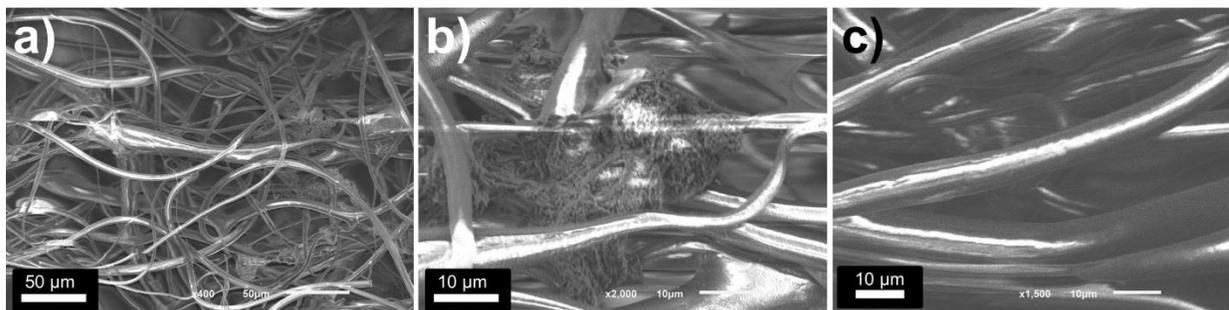


Fig. 1. Morphological evaluations by SEM of fibers produced with mixtures of CMCI. a) 50 µm. b) 10 µm. c) 10 µm.

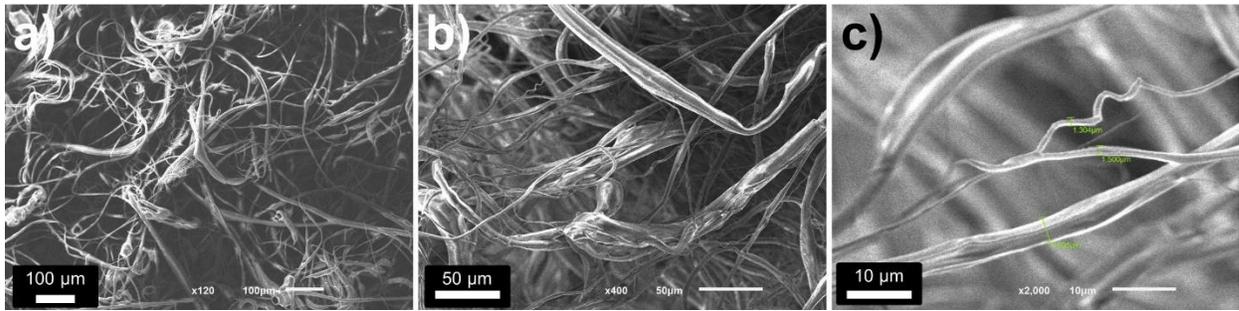


Fig. 2. Morphological evaluations by SEM of fibers produced from mixtures of CMCII. a)100 μ m. b)50 μ m. c)10 μ m.

Under the specified operating conditions, it was observed that at lower concentration of PLA, finer fibers with greater distribution of diameter were found (Fig. 3).

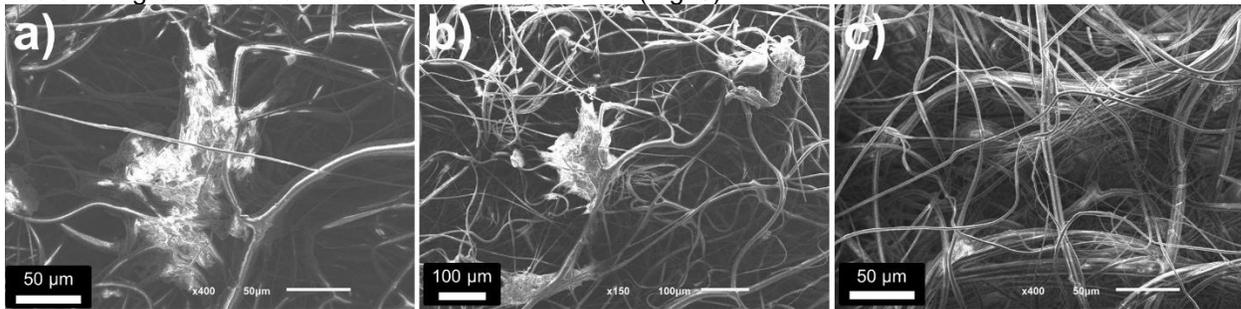


Fig. 3. Morphological determinations by SEM of fibers produced from mixtures of PLA. a)50 μ m. b)100 μ m. c)0 μ m.

Bioactivity determinations

The determinations of the average diameter in produced fibers indicated the following tendency, CMCII > CHMMWII > CMCI. Where the smallest diameter was obtained with the CMCII solution, $2.1 \pm 1.4 \mu\text{m}$, and the bigger was CMCI $7.9 \pm 1.9 \mu\text{m}$ (Table 2).

Table 2. Average diameter fiber using a Scanning Electron Microscope (SEM).

Sample	Diameter (μm)
CMCI	$7.9 \pm 1.9^*$
CMCII	$2.1 \pm 1.4^*$
CHMMWII	$4.2 \pm 1.5^*$

*All experiments were performed twice in triplicate

Viability assays were carried out to demonstrate the cell adhesion ability and biocompatibility of the developed fibers with different percentages of CMC and CH. Results indicated that after incubation times of 24 and 144 h, JB/3T3 fibroblast can attach to the fiber

in the next order: CMCI > CHMMWII > CMCII, as shown in Table 3. It was observed that fibers containing 2.5% of CMC demonstrated to possess the best ability to adhere cells, let them proliferate and differentiate in comparison to those formulations containing $\geq 3.0\%$ of CC (CMCII) and even better than those fibers containing exclusively CH. Viability assay indicated that CMCI formulations induce more increment in cell proliferation after 3 days in comparison to CMCII. Conversely, according to our findings, those formulations containing concentrations of 5.0 % of CMC presented negative implications in cell adhesion by retarding the fibroblast maturation and proliferation. MTT assay results express a measure of cell

Table 3. MTT assay, % viability of BJ/3T3 fibroblasts.

Sample	% viability (24 h)	%viability (144 h)
CMCI	$110.9 \pm 13.6^*$	$125.0 \pm 11.1^*$
CMCII	$78.6 \pm 16.0^*$	$108.4 \pm 9.1^*$
CHMMWII	$104.7 \pm 13.8^*$	$109.3 \pm 13.4^*$

*All experiments were performed twice in triplicate

viability from 3T3 cultured onto mat fibers. It was observed that MTT assay values increased during the evaluation time by up to 25%, indicating that the mat of fibers evaluated had no significant cytotoxic effects and could support cell proliferation, since mitochondrial activity is maintained over time.

Discussion

Fibers (at micro and nanoscale) have gained attention for different application, including scaffolds, mainly because they are formed in the same order and diameter, which could enhance their cell-matrix interactions by resembling the ECM environment (Chae *et al.*, 2013).

Fibers with lower diameter distribution were found in CMCI (Fig. 1). It has been reported that properties of CH (such as degree of deacetylation) in certain conditions (e.g. solvents, temperature) may frequently hinder the formation of fibers and nanofibers by the electrospinning method (Savitri *et al.*, 2014; Nam *et al.*, 2010). However, our results showed that the CSP is a good choice for preparing fibers with a chitosan portion in the specified conditions and operating method. These results are of great importance because it has been reported that CSP is a new and alternative method that can be used for producing several types of fibers and nanofibers from various materials at high speed and low cost (Huang *et al.*, 2019; Zhang & Lu, 2014).

Also, it was observed that there was a great thickness variability on those fibers obtained with CMCI mixtures. However, stretched droplets were found on the obtained fibers. A possible explanation is that formulations created with 5% of CMC may have excess of COO⁻ groups, which could generate an acidic environment for fibroblasts (Novotna *et al.*, 2013), causing a significant decay ($P \leq 0.05$) in cell viability in comparison to control after 24 h. However, after 3 days of incubation it was observed that cell viability increased, indicating that cells may have adapted to the acidic environment and then proliferated. On the other hand, CHMMVII based formulations demonstrated that induced good cell adhesion after 24 h was achieved, and cell viability

slightly increased during 72 h (from 104 to 109 %), which indicate that CH formulations presented a good biocompatibility with fibroblasts. Our findings are in agreement with those studies that have demonstrated that CH has the ability to reinforce the microstructure and/or to modify the surface of medical devices/scaffolds developed at low CH concentrations ($\leq 1.0\%$), creating the ideal microenvironment of porosity for rapid adhesion and cell proliferation (Tan *et al.*, 2000).

Conclusion

The main objective of this work was to generate various nanofiber formulations using a not so conventional method, the centrifugal spinning process (CSP). Results indicated that CSP has the ability to produce fibers with diameter that can range between 2 to 9 μm , approximately. These diameters and their arrangement may confer different properties that influence the ability to adhere and allow JB/3T3 cells to proliferate. In TR, good biocompatibility of new materials and novel medical devices is often evaluated by *in vitro* cell responses, where results shouldn't indicate any cytotoxicity effect and should provide the adequate surface properties for the cell attachment, proliferation, maturation, and differentiation. Cell viability of JB/3T3 cells was increased 25% when were cultured onto mat fibers, according to these statements, we could suggest that those fiber formulated with 2.5% of CMC and 0.5 % of CH may provide the ideal microenvironment for JB/3T3 cell adhesion. Our results indicate that CSP is a good non-conventional and non-expensive method to produce biocompatible CMC and natural polymer-based microfibers in large scale, that could be used as novel formulations within the tissue regeneration, biomedical products, even drug delivery system field in a near future.

Acknowledgments

To Dr. Alex Elias Zuñiga for the facilities provided for the use of equipment of the Centro de Innovación en Diseño y Tecnología, Department of Mechanical Engineering, ITESM, Campus Monterrey.

Interest conflict

The authors declare that does not exist an interest conflict.

References

Chae T., Yang H., Leung V., Ko F. & Troczynski T. 2013. Novel biomimetic hydroxyapatite/alginate nanocomposite fibrous scaffolds for bone tissue regeneration, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 24:1885–1894. <https://doi.org/10.1007/s10856-013-4957-7>

Chen G., Ushida T., Tateishi T. 2002. Scaffold design for tissue engineering, *Macromol. Biosci.* 2: 67–77. [https://doi.org/10.1002/1616-5195\(20020201\)2.2<67::AID-MABI67>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/1616-5195(20020201)2.2<67::AID-MABI67>3.0.CO;2-F)

Chung, T.W., Yang, J. Akaike, T., Cho, K.Y., Nah, J., Kim, S.I. & Cho, C.S. (2002). Preparation of alginate/galactosylated chitosan scaffold for hepatocyte attachment. *Biomaterials*, 23(14), 2827-2834. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(01\)00399-4](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00399-4)

Corradini, E., Curti, P.S., da Silva González, R., Pereira, A.G.B., Dragunski, D.C., Martins, A.F., & Muniz, E.C. (2017). Preparation of polymeric mats through electrospinning for technological uses. *Recent Advances in Complex Functional Materials: From Design to Application*, 83-128. https://doi.org/10.1007/978-3-319-53898-3_4

Dumville J. C., Deshpande S., O'Meara S. & Speak K. 2013. Hydrocolloid dressings for healing diabetic foot ulcers. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2:CD009099. Guney A., Kara F., Ozgen O., Aksoy E. A., Hasirci V. & Hasirci N. 2013. Surface modification of polymeric biomaterials, *Biomater. Surf. Sci.* 89–158. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD009099>
pu

Hélary C. & Desimone M. F. 2015. Recent advances in biomaterials for tissue engineering and controlled drug delivery, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 16: 635–645. Huang Y., Song J., Yang C., Long, Y., & Wu H. 2019. Scalable manufacturing and

applications of nanofibers. *Materials Today*, 28: 98-113. <http://dx.doi.org/10.2174/138920101607150427112208>

Koh H. S., Yong T., Teo W. E., Chan C. K., Puhaindran M. E., Tan T. C., Lim A., Lim B. H. & S. Ramakrishna. 2010. In vivo study of novel nanofibrous intra-luminal guidance channels to promote nerve regeneration. *J. Neural Eng.* 7, 46003. <https://doi.org/10.1088/1741-2560/7/4/046003>

Koosha M., Raoufi M. & Moravvej H. 2019. One-pot reactive electrospinning of chitosan/PVA hydrogel nanofibers reinforced by halloysite nanotubes with enhanced fibroblast cell attachment for skin tissue regeneration. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 179: 270-279. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.03.054>

Li, M., Mondrinos, M.J., Gandhi, M.R., Ko, F.K., Weiss, A.S., & Lelkes, P.I. (2005). Electrospun protein fibers as matrices for tissue engineering. *Biomaterials*, 26(30), 5999-6008. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.03.030>

Liu X., Holzwarth J.M. & Ma P.X. 2012. Functionalized synthetic biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering, *Macromol. Biosci.* 1:, 911–919. <https://doi.org/10.1002/mabi.201100466>

McEachin, Z., & Lozano, K. (2012). Production and characterization of polycaprolactone nanofibers via forcespinning™ technology. *Journal of Applied Polymer Science*, 126(2), 473-479. <https://doi.org/10.1002/app.36843>

Miletić A., Pavlič B., Ristić I., Zeković Z. & Pilić B. 2019. Encapsulation of fatty oils into electrospun nanofibers for cosmetic products with antioxidant activity. *Applied Sciences*, 9(15): 2955. <https://doi.org/10.3390/app9152955>

Nam Y. S., Park W. H., Ihm D. & Hudson S.M. 2010. Effect of the degree of deacetylation on the thermal decomposition of chitin and chitosan nanofibers, *Carbohydr. Polym.* 80: 291-295.

<http://dx.doi.org/10.1016%2Fj.carbpol.2009.1.1.030>

Novotna K., Havelka P., Sopuch T., Kolarova K., Vosmanska V., Lisa V., Svorcik V. & Bacakova L. 2013. Cellulose-based materials as scaffolds for tissue engineering, *Cellulose*. 20: 2263–2278. <https://doi.org/10.1007/s10570-013-0006-4>

Sabir M. I., Xu X. & Li L. 2009. A review on biodegradable polymeric materials for bone tissue engineering applications, *J. Mater. Sci.* 44: 5713–5724. <https://doi.org/10.1007/s10853-009-3770-7>

Sarkar, K., Gomez, C., Zambrano, S., Ramirez, M., de Hoyos, E., Vasquez, H., & Lozano, K. (2010). Electrospinning to forcespinning™. *Materials today*, 13(11), 12-14. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(10\)70199-1](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(10)70199-1)

Savitri E., Juliastuti S.R., Handaratri A. & Roesyadi A. 2014. Degradation of chitosan by sonication in very-low-concentration acetic acid, *Polym. Degrad. Stab.* 110, 344–352. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2014.09.010>

Tan W., Krishnaraj R. & Desai T. A. 2000. Influence of chitosan on cell viability and proliferation in three dimensional collagen gels, in: *Proc. 22nd Annu. Int. Conf. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.(Cat. No. 00CH37143)*. IEEE. 1509–1524. <https://doi.org/10.1109/IEMBS.2000.898029>

Ulery B. D., Nair L. S. & Laurencin C.T. 2011. Biomedical applications of biodegradable polymers. *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* 49: 832–864. <https://doi.org/10.1002/polb.22259>

Vaseashta, A. 2009. Controlled formation of multiple Taylor cones in electrospinning process. *Appl Phys Lett*, 90, 093115. <https://doi.org/10.1063/1.2709958>

Wang V, Boerman O.C., Sariibrahimoglu K., Li Y., Jansen J.A. & Leeuwenburgh S.C.G. 2012. Comparison of micro-vs. nanostructured colloidal gelatin gels for sustained delivery of osteogenic proteins: Bone morphogenetic protein-2 and alkaline phosphatase. *Biomaterials*. 33: 8695–8703. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.08.024>

Wang X. 2013. Overview on biocompatibilities of implantable biomaterials, *Adv. Biomater. Sci. Biomed. Appl. Biomed. Lazineca, R., Ed.* 111–155. <http://dx.doi.org/10.5772/53461>

Watt F.M. & Huck W.T.S. 2013. Role of the extracellular matrix in regulating stem cell fate. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14: 467. <https://doi.org/10.1038/nrm3620>

Zhang Y., Wang Z. & Gemeinhart R.A. 2013. Progress in microRNA delivery. *Journal of controlled release*, 172(3), 962-974. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.09.015>

Zhang X. & Lu Y. 2014. Centrifugal spinning: an alternative approach to fabricate nanofibers at highspeed and low cost. *Polym. Rev.* 54: 677–701. <https://doi.org/10.1080/15583724.2014.935858>

Zhang C., Li Y., Wang P. & Zhang H. 2020. Electrospinning of nanofibers: Potentials and perspectives for active food packaging. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(2): 479-502. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12536>

Zhou, F., & Gong, R. (2008). Manufacturing technologies of polymeric nanofibers and nanofiber yarns. *Polym Int*, 57, 837-845. <https://doi.org/10.1002/pi.2395>

Revisión de los factores sigma en *Escherichia coli* y su potencial como dianas para el mejoramiento de producción de proteínas recombinantes

Diego Alonso Echánove-Cuevas y Guillermo Gosset-Lagarda*

Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Morelos, Cuernavaca, México CP: 62210

guillermo.gosset@ibt.unam.mx

Abstract

A potentially useful strategy for the development of recombinant protein production strains is the modification of global transcription factors of the host, which allows the alteration of the expression of several genes with the modification of only a few regulatory genes. However, the present scientific literature does not include an in-depth review that explores the potential of applying these strategies in *Escherichia coli*'s sigma factors. In the project described in this paper, a bibliographical review was performed on the different phenotypes that arise when sigma factors are altered in structure or expression in *E. coli*, and their potential for strain development for recombinant protein production. The method consisted of the use of the *Scopus* search tool to make individual searches of each of the sigma factors. Each search contained at least the variables of the name of *E. coli*, the sigma factor, the type of modification on the factor, and, optionally, the phenotype that was obtained or sought after. The results and discussion analyze the explored and yet-to-explore potential of each sigma factor and some areas of opportunity for future research. The use of the gathered information, in conjunction with metabolic engineering, gene editing, and synthetic biology could provide us with the ability to understand and influence the complex metabolic space, its relationship with the transcriptome, and the production of recombinant proteins in *E. coli* and other bacteria.

Keywords: *Sigma factors, E. coli, Recombinant protein production*

Resumen

Una estrategia potencialmente útil para la generación de cepas para producción de proteína recombinante consiste en modificar los factores de transcripción globales del hospedero, lo que permite alterar la expresión de muchos genes, modificando solo algunos reguladores. Sin embargo, en la bibliografía científica actual no existe una revisión que explore a profundidad el potencial de aplicar estas estrategias en los factores sigma de *Escherichia coli*. En el presente trabajo se elaboró una revisión bibliográfica de los fenotipos que surgen de los cambios de estructura o expresión de los factores sigma en *E. coli* y el potencial que representan para el mejoramiento de cepas para producción de proteína recombinante. El método de revisión consistió en el uso de la herramienta “+” realizando búsquedas individuales para cada uno de sus factores sigma. Cada búsqueda contenía como mínimo las variantes del nombre de *E. coli*, el factor sigma, el tipo de modificación al factor y, opcionalmente, el fenotipo que se busca. En los resultados y discusión se explora el potencial explorado y no explorado de cada factor sigma y algunas áreas de oportunidad para futuras investigaciones. La utilización de la información analizada, junto con herramientas de control metabólico, biología sintética y de ingeniería genética, podrían brindarnos la capacidad de entender e influenciar de nuevas formas el complejo espacio metabólico, su relación con el transcriptoma y la producción de proteínas recombinantes tanto en *E. coli* como en otras bacterias.

Palabras clave: *Factores sigma, E. coli, Producción de proteína recombinante*

Introducción

La producción de Proteína Recombinante (PR) es una tecnología ampliamente practicada para el desarrollo de las ciencias biológica y biomédica, así como en la industria química, biotecnológica y farmacéutica. En la gran mayoría de los casos, las PR son producidas cultivando organismos bien estudiados bajo condiciones controladas, lo que facilita la homogeneidad de los compuestos producidos y la optimización de los procesos. De todos los hospederos usados a través de la historia para la producción de PR, el más estudiado y frecuentemente seleccionado es la bacteria *Escherichia coli* (Rosano & Ceccarelli, 2014). Aunque es cierto que *E. coli* es muy útil para la producción de PR, la adecuada selección de hospedero es solo una de las estrategias disponibles para optimizar el proceso. Para esto existen diversas estrategias como lo son utilizar sistemas de expresión inducibles, manipulando las condiciones del cultivo, fusionar proteínas para mejorar su solubilidad realizando coexpresión con otras proteínas, el uso de diversos vectores de expresión, mejorar la regeneración de cofactores y muchas otras (Duzenli & Okay, 2020; Gopal & Kumar, 2013; Mahalik et al., 2014).

Un número importante de las estrategias disponibles para optimizar la producción de proteína recombinante requieren de la modificación, introducción o inactivación de genes específicos cuyos productos tienen un efecto directo o indirecto en el crecimiento del organismo, la síntesis de la proteína, su estabilidad o la facilidad con que pueda ser purificada. Utilizar este acercamiento para optimizar la producción de proteína puede ser muy útil, pero tiene la gran limitante de que las modificaciones normalmente se deben realizar de forma individual y secuencial, por lo que se vuelve un proceso tardado y complejo (Alper & Stephanopoulos, 2007; Mahalik et al., 2014). Por lo tanto, una metodología que permita realizar modificaciones en la expresión de múltiples genes de forma simultánea tiene el potencial de optimizar eficientemente, y en poco tiempo, el fenotipo de las cepas en cuestión. Esto se puede lograr a través de la modificación de los factores de transcripción.

Las técnicas de modificación de factores de transcripción buscan generar fenotipos complejos alterando la transcripción a nivel genómico. Es decir, se aprovecha la maquinaria intrínseca de las células para controlar un gran número de genes al mismo tiempo o en respuesta a un mismo estímulo (los factores globales de transcripción) y los modifica para permitir grandes cambios en la transcripción con la mínima inversión de tiempo. Esto puede implicar diversas modificaciones como mutaciones puntuales, deleciones completas o métodos más complejos que involucren una serie de procesos de selección como lo es la ingeniería de maquinaria global de transcripción, o gTME por sus siglas en inglés (Alper & Stephanopoulos, 2007). Los factores de transcripción que son de especial interés para este tipo de estrategias son los factores sigma.

Los factores sigma son subunidades disociables de la ARN polimerasa (ARNP) en bacterias. Esta subunidad multidominio permite reconocer los promotores en el ADN y que se dé la unión de alta afinidad entre la holoenzima ARNP y su sitio específico en el ADN. Así mismo, juega un papel esencial en la iniciación de la transcripción (Paget, 2015). Los factores sigma funcionan como factores de transcripción generales que establecen uno de los primeros niveles de regulación global de la transcripción en bacterias, teniendo en conjunto miles de regiones de unión en el ADN (Cho et al., 2014; Tripathi et al., 2014; Davis et al., 2017). Estructuralmente las subunidades sigma se pueden clasificar en dos familias, la familia σ^{70} y la familia σ^{54} , basándose en su homología con las correspondientes subunidades sigma de *E. coli*, las cuales son estructuralmente distintas entre ellas, pero su funcionamiento es esencialmente el mismo (Paget, 2015).

En *E. coli* se han descrito 7 factores sigma: σ^{70} (*rpoD*), σ^{54} (*rpoN*), σ^{38} (*rpoS*), σ^{32} (*rpoH*), σ^{28} (*fliA*), σ^{24} (*rpoE*), y σ^{19} (*fecI*), siendo *rpoD* el factor sigma principal o de "housekeeping" y el resto, factores sigma alternativos (Cho et al., 2014; Treviño-Quintanilla et al., 2013). Debido a la importancia de cada factor sigma en la regulación de distintos genes enfocados a una variedad de procesos celulares, éstos han sido estudiados de diversas formas para

entender su función celular, las interacciones entre los factores sigma y los cambios fenotípicos que pueden ocurrir cuando se realizan modificaciones en dichos factores. Sin embargo, la gran cantidad de estudios dificulta entender las implicaciones de modificar cada factor de transcripción, por lo que una revisión concisa de esta información sería útil si se planea utilizar estrategias que modifiquen dichos genes con el objetivo de generar cepas de producción de PR. En este trabajo, se busca explorar bibliográficamente las alteraciones fenotípicas que surgen al modificar la secuencia, los niveles de expresión o eliminar los factores sigma de *E. coli*, así como su utilidad para la producción de proteína recombinante.

Materiales y metodos

Revisión bibliográfica y análisis de información

Para la búsqueda de fuentes bibliográficas se utilizó la herramienta de búsqueda y base de datos de artículos científicos llamada Scopus (<https://www.scopus.com/>) en idioma inglés. El método de búsqueda consistió en usar combinaciones de filtros basados en la presencia de ciertas palabras en el título, resumen o palabras clave de los artículos. Dentro de los filtros, las palabras fueron unidas con el operador booleano OR y en búsquedas con más de un filtro, los filtros fueron unidos con el operador booleano AND u OR según fuera el caso. Las palabras dentro de un filtro se unieron con un operador booleano OR porque son palabras equivalentes para el objetivo que se busca, un ejemplo de esto es filtrar para obtener resultados referentes al factor sigma rpoD, cuyo filtro debe incluir todas las variaciones en que se puede nombrar a rpoD evitando que se pierdan documentos que lo nombren de una u otra forma.

Los filtros fueron diseñados de forma jerárquica para poder estructurar las búsquedas de forma sencilla. Esta jerarquía se manejó en 4 niveles: el filtro raíz, los troncales, los rama y, por último, los filtros terminales. El filtro raíz es utilizado en todas las búsquedas y delimita los resultados a aquellos asociados a *Escherichia coli*. Los filtros troncales delimitan a un determinado

factor sigma, es decir, que existe un filtro específico por cada factor sigma. Los filtros rama delimitan el tipo de modificación en el gen que se investigó en cada estudio, como delecciones del gen, mutaciones en la secuencia o cambios en expresión y por último la aplicación de ingeniería de factores globales de transcripción. Finalmente se tienen los filtros terminales, los cuales especifican el fenotipo que se ve afectado por los cambios en los factores sigma, siendo en total 6 filtros referentes a resistencia a estrés, tasa de crecimiento, asimilación de nitrógeno, uso de fuentes de carbono, respuesta a presión osmótica y producción de metabolitos y proteínas. La escritura detallada de cada filtro se puede observar a continuación:

- **Filtro raíz:** (TITLE-ABS-KEY (“E. coli” OR “Escherichia coli”))
- **Filtros troncales:**
 - o RpoD: (TITLE-ABS-KEY (“rpoD” OR “ σ 70” OR “sigma 70” OR “ σ D”))
 - o RpoN: (TITLE-ABS-KEY (“rpoN” OR “ σ 54” OR “sigma 54” OR “ σ N”))
 - o RpoS: (TITLE-ABS-KEY (“rpoS” OR “ σ 38” OR “sigma 38” OR “ σ S”))
 - o RpoH: (TITLE-ABS-KEY (“rpoH” OR “ σ 32” OR “sigma 32” OR “ σ H”))
 - o FliA: (TITLE-ABS-KEY (“fliA” OR “ σ 28” OR “sigma 28” OR “ σ F”))
 - o RpoE: (TITLE-ABS-KEY (“rpoE” OR “ σ 24” OR “sigma 24” OR “ σ E”))
 - o Fecl: (TITLE-ABS-KEY (“fecl” OR “ σ 19” OR “sigma 19” OR “ σ fecl”))
- **Filtros rama:**
 - o Rama A: TITLE-ABS-KEY (“deletion” OR “deficient” OR “absent” OR “defective”)
 - o Rama B: TITLE-ABS-KEY (“mutant” OR “mutation” OR “overexpression” OR “underexpression”)
 - o Rama C: TITLE-ABS-KEY (“gTME” OR “Global transcription machinery engineering”)
- **Filtros terminales:**
 - o T1: TITLE-ABS-KEY (“Resistance” OR “Tolerance” OR “Resistant” OR “Tolerant”)
 - o T2: TITLE-ABS-KEY (“growth” OR “growth rate”)
 - o T3: TITLE-ABS-KEY (“nitrogen source” OR “n source” OR “Nitrogen”)
 - o T4: TITLE-ABS-KEY (“Carbon source” OR

“C source” OR “acetate” OR “Carbon”)o T5:
TITLE-ABS-KEY (“high concentration” OR
“osmotic pressure” OR “high osmolarity” OR
“high NaCl” OR “high glucose”)
o T6: TITLE-ABS-KEY (“Protein production”
OR “metabolite production” OR “polymer
production” OR “antibody production”)

Por lo tanto, un ejemplo de una búsqueda con filtro terminal 2 de la rama A del factor sigma RpoD sería:

TITLE-ABS-KEY (“rpoD” OR “ σ^{70} ” OR “sigma 70” OR “ σ^D ”) AND TITLE-ABS-KEY (“E. coli” OR “Escherichia coli”) AND TITLE-ABS-KEY (“deletion” OR “deficient” OR “absent” OR “defective”) AND TITLE-ABS-KEY (“growth” OR “growth rate”).

En un sondeo inicial, se realizó una búsqueda uniendo todos los filtros troncales con el operador OR y uniendo el filtro raíz con el operador AND. Esta búsqueda mostró todos los documentos en la biblioteca que mencionan a *Escherichia coli* y a alguno de sus 7 factores sigma. Posterior a esto se realizaron las búsquedas jerárquicas por cada factor sigma. En estas búsquedas todos los filtros se unen entre ellos utilizando el operador AND. Primero se inicia con el filtro raíz y el filtro troncal del factor sigma de interés. Después, se agrega de forma separada cada uno de los filtros rama. Si los resultados de alguna de las búsquedas con el filtro rama supera los 100 documentos, se agrega de forma separada cada filtro terminal. En el caso de que la búsqueda con filtro rama y terminal supere los 100 documentos, se restringirá la búsqueda a los 100 documentos de publicación más recientes.

A partir de los documentos seleccionados, se realizó una lectura rápida del resumen para eliminar cualquier documento que no fuera pertinente al tema. Estos documentos no pertinentes surgen a raíz del uso de operadores OR en las búsquedas. Estos operadores permiten dar una cierta laxitud al algoritmo que evita que no se consideren artículos por no seguir estrictamente todos los parámetros, pero a su vez provoca que se agreguen artículos no pertinentes que sí mencionan alguna de las palabras seleccionadas para los filtros, pero no se adentran al tema que concierne a este trabajo.

Finalmente, cuando surgieron dudas específicas acerca de las funciones asociadas a cada factor sigma o cuestiones sobre la esencialidad de los genes, se realizaron búsquedas de forma directa al tema utilizando las herramientas de Google Scholar (<https://scholar.google.com/>) o *Scopus*.

Resultados

Al realizar una búsqueda general que incluye el filtro raíz y todos los filtros troncales de cada factor sigma en *E. coli* unidas con el operador OR, se encuentran 3,902 documentos. Esto representa el acervo completo de donde se obtendrá la bibliografía para este trabajo. En la **Tabla 1** se muestran el número de documentos para cada búsqueda troncal y rama. A continuación, se detallará la información más importante obtenida para cada factor sigma.

Factor σ^{70} (*rpoD*)

La proteína σ^{70} o RpoD es el principal factor sigma de *E. coli* y es responsable de la transcripción de la mayoría de los genes que son expresados cuando esta bacteria crece en fase exponencial (Shimada et al., 2014). En un estudio realizado por Cho *et al.* en 2014 se identificaron experimentalmente 1,643 sitios de unión por parte de RpoD en el ADN y se tienen registradas 1,130 unidades de transcripción dentro de su regulón en *E. coli*, convirtiéndolo en el factor sigma que controla la expresión del mayor número de genes en dicha bacteria (Keseler et al., 2021). El gen que codifica a este factor de transcripción ha sido identificado como esencial en medio complejo (LB) y medio mínimo, probablemente esto no se deba a que RpoD realice de forma directa alguna acción metabólica o estructural necesaria para la viabilidad celular, sino a que es un factor que permite la expresión de algunos genes esenciales que sí tiene estas actividades directas, por lo cual resulta imposible generar una cepa sin el gen *rpoD* (Cho et al., 2014; Goodall et al., 2018).

Aun siendo esencial, se han podido estudiar las características de cepas con diversos tipos de mutaciones en el gen *rpoD*, como es el caso de fenotipos de resistencia a diferentes tipos de estrés, afectaciones en el crecimiento de la

bacteria y mejoras en los parámetros de producción de algunos metabolitos y proteínas. En la literatura consultada, diferentes grupos han podido generar cepas de *E. coli* cuyos genotipos con sustituciones y deleciones de aminoácidos en RpoD dan lugar a fenotipos de resistencia a pH ácidos de 3.17 y 4.6 (Gao et al., 2016; Harden et al., 2015); aumento de tolerancia a kanamicina de hasta una concentración 4 veces mayor que el control (El Houry et al., 2019; Mogre et al., 2017); capacidad de sobrevivir a presiones hidrostáticas altas de hasta 800 MPa (Gayán et al., 2020), y resistencia a diferentes disolventes o compuestos orgánicos (etanol, butanol, ciclohexano y SDS) con cepas sobreviviendo y creciendo a concentraciones mayores al doble del máximo tolerable para las cepas control (Alper & Stephanopoulos, 2007; Si et al., 2016; Zhang et al., 2015).

No todos los cambios en RpoD conllevan fenotipos útiles. Una sustitución única de aminoácidos puede lograr reprimir genes asociados a la biosíntesis de nucleótidos y trehalosa, utilización de aminoácidos y metabolismo de carbono. La disminución de la expresión de *rpoD* puede provocar un fenotipo similar al de la respuesta estricta y, como ya fue mencionado, su deleción total inhibe su sobrevivencia por completo (Gao et al., 2016; Magnusson et al., 2003; Pletnev et al., 2020; Singh et al., 2011). Aún con estos ejemplos, algunos estudios han logrado mejorar la tasa de crecimiento de cepas con impedimentos en el crecimiento (específicamente cepas de genoma reducido y en ausencia del sistema de fosfotransferasa) al expresar factores RpoD con sustituciones de ciertos

aminoácidos (Aguilar et al., 2012; Choe et al., 2019).

En cuanto a fenotipos de producción, la mayoría de los casos relevantes en la literatura científica utilizaron métodos de gTME. Se han obtenido mejoras en la producción de licopeno, de ácido hialurónico y L-tirosina con aumentos del título de 7%, 34% y 14%, respectivamente. En el caso del licopeno, el estudio no describe la mutante, pero en los otros dos casos, ambos fueron productos de factores RpoD truncados, con solo los dominios estructurales 3 y 4 (Alper & Stephanopoulos, 2007; Santos et al., 2012; Yu et al., 2008).

En el caso específico de producción de PR, se han realizado dos estudios de gTME donde se han generado mutantes de *rpoD* con mejoras en la producción de proteína. Por un lado, se aumentó 400% el rendimiento de la producción del receptor de neurotensina 1 de ratas (NTR1) que en la cepa silvestre. Dicho factor sigma contenía únicamente la sustitución de un aminoácido (Tomatis et al., 2019). En el otro estudio, se aumentó la producción de anticuerpos IgG hasta un título de 130 mg/L (el más alto reportado para dichos anticuerpos en *E. coli*) en una mutante con sustituciones de aminoácidos y regiones truncadas de RpoD (McKenna et al., 2019). De la revisión realizada, fue evidente que se pueden obtener cepas con fenotipos útiles a través de modificaciones en secuencia o expresión del factor sigma. Pero en la bibliografía disponible, ninguna de las modificaciones mejoró el crecimiento o la utilización de nutrientes en condiciones sin estrés previo.

Tabla 1: Documentos encontrados en las búsquedas iniciales para cada factor sigma de *E. coli*.

Factor sigma	Filtro troncal	Rama A	Rama B	Rama C
FecI	58	10	28	0
RpoE	337	77	169	0
FliA	227	29	113	0
RpoH	585	125	308	0
RpoS	1,462	382	816	0
RpoN	534	108	222	0
RpoD	1,393	233	516	5

Para fenotipos de resistencia a estrés o de producción de metabolitos o proteína recombinante, en cambio, se encontraron diversos ejemplos de cepas con *rpoD* mutado. De manera interesante, no parece existir una región alterada en común y se han encontrado ejemplos con sustituciones de aminoácidos individuales y múltiples, así como delección de pocos residuos o de regiones enteras. Cabe resaltar que la alteración que se repitió en más de una ocasión fue tener a RpoD truncado con solo las regiones 3 y 4 conservadas, aunque en ninguna investigación se ha encontrado una explicación mecanística que explique por qué esta modificación estructural provoca el fenotipo resultante.

Factor σ^{54} (*rpoN*)

RpoN de *E. coli* es considerada la proteína arquetipo de la familia σ^{54} y es estructural y funcionalmente diferente al resto de los factores sigma de la familia σ^{70} . Entre las diferencias se puede encontrar que RpoN necesita la acción de proteínas activadoras para poder iniciar la transcripción (Merrick, 1993; Bonocora et al., 2015). Se han identificado a través de análisis ChIP-chip, 180 sitios de unión a ADN en *E. coli* por parte de RpoN, aunque hay estimaciones por medio de análisis ChIP-seq que sugieren que podrían existir más de 250 sitios de unión y los datos en Ecocyc detallan que contiene 55 unidades de transcripción en su regulón (Keseler et al., 2021).

El gen *rpoN* no es esencial y se han observado distintos fenotipos interesantes en cepas de *E. coli* con delección, sobreexpresión o mutaciones en este factor sigma. Se han obtenido cepas capaces de resistir hasta 2 horas de exposición a pH = 2, obteniendo cultivos de 9.56×10^3 cfu/mL en cepas con delección total de *rpoN* comparado con 10 cfu/mL en el control. Cabe resaltar que esta resistencia fue observada en la fase exponencial del crecimiento, pero no en fase estacionaria (Mitra et al., 2012, 2014; Riordan et al., 2010). También hay ejemplos de resistencia a valores de pH alcalinos (10), pero no ha sido estudiado a fondo (Hamdallah et al., 2018). A su vez, se han obtenido cepas resistentes a novobiocina (por inactivación con transposones) y al bromuro de cetiltrimetilamonio por delección de 4 aminoácidos en RpoN (Milija et al., 1999; Nakata et al., 2010).

Se ha observado que la delección total de *rpoN* puede tener impacto sobre la tasa de crecimiento y la utilización de recursos como fuente de carbono y nitrógeno.

Entre estos efectos encontramos la relación del factor con el sistema de fosfotransferasa y las condiciones limitantes de carbono y nitrógeno (Kumar & Shimizu, 2010; Löffler et al., 2017; B. S. Powell et al., 1995); disminución de la velocidad de crecimiento en medio mínimo (García, 2020); auxotrofia para glutamina e incapacidad de procesar acetato (Milija et al., 1999; Nakata et al., 2010; Reitzer & Schneider, 2001); efectos negativos en la motilidad y un aumento en la capacidad de formación de biopelículas (Belik et al., 2008; Dong et al., 2011; Zhao et al., 2010). Es interesante señalar que los resultados de García en 2020 resultan contradictorios a los de otros autores, pues García reporta que la mutante con delección en *rpoN* mostró una disminución de la tasa de crecimiento, contrario a una ausencia total que se reporta debido a la auxotrofia para glutamina.

En cuanto a aspectos de producción de metabolitos, *rpoN* no ha sido explorado con la misma profundidad que *rpoD* para mejorar o generar cepas de producción. Sin embargo, existen 3 ejemplos de cepas con mejoras en producción a través de modificaciones en la actividad de *rpoN*. Un caso es el aumento de producción de un copolímero de lactato y 3-hidroxibutirato (P(LA-co-3HB)) a través de la delección total del factor (Kadoya et al., 2015); la expresión de sintasas de policétido a través de la sobreexpresión del factor (Stevens et al., 2013); y por último un aumento de 900% de la tasa de producción de hidrógeno por la sustitución de aminoácidos en un activador de RpoN (Sanchez-Torres et al., 2009).

En toda la bibliografía analizada para RpoN, la mayoría de los fenotipos útiles encontrados surgen a partir de delecciones totales del gen, lo cual no se observa en *rpoD* porque es esencial. Así mismo, no se han encontrado fenotipos asociados a la modificación de expresión o delección de *rpoN* con un aumento en la producción de proteína recombinante. Esto no significa que no sea viable, pues abre la posibilidad de utilizar otros mecanismos para obtener mutantes de *rpoN* y explorar su utilidad para la producción de PR.

Factor σ^{38} (*rpoS*)

RpoS es el principal factor sigma involucrado en la expresión genética durante la fase estacionaria y la respuesta general a condiciones de estrés en *E. coli* (Battesti et al., 2011, 2015). Este factor de transcripción tiene el mayor número de sitios de unión de todos los factores sigma de *E. coli*, sin contar a RpoD, con 903 sitios de unión y 228 unidades de transcripción registradas en Ecocyc. La función de RpoS es la expresión de genes para la respuesta a distintos tipos de estrés, entre ellos podemos encontrar hiperosmolaridad, estrés oxidativo, bajas o altas temperaturas, inanición, disminuciones de pH y parece tener un papel en aspectos de virulencia en cepas patógenas (Weber et al., 2005; Mata et al., 2017; Guo et al., 2019). Este gen no es considerado esencial por lo que se han generado cepas que carecen de él o este se encuentra mutado (Dong & Schellhorn, 2009; Goodall et al., 2018).

Como es de esperarse dado su papel en la expresión de genes asociados a estrés, se ha observado que se pueden obtener cepas resistentes a distintos tipos de estrés al alterar la secuencia y expresión de este factor sigma. La sobreexpresión de RpoS ha conferido resistencia a condiciones ácidas debajo de pH 4 causadas por una diversidad de ácidos, y se ha observado que también aumenta la sobrevivencia a desafíos de pH 2 (Bak et al., 2014; Gaida et al., 2013; Jin et al., 2009; Run & Tian, 2018). Aunado a esto, la sobreexpresión también puede generar resistencia a n-butanol (1% v/v), presión hidrostática alta (800 MPa), estrés oxidativo por H₂O₂, altas temperaturas (54 °C), alta concentración de NaCl (2.5 M) y estrés múltiple (Appukuttan et al., 2016; Gayán et al., 2020; Xu et al., 2021). De manera contraria, un estudio encontró que la expresión reducida del factor sigma aumenta la resistencia a un pH alcalino de 9 (Hamdallah et al., 2018). Inserciones a través de transposón también han generado cepas con alteraciones en la secuencia de *rpoS* de *E. coli* con una resistencia a la inanición de hasta 9 días de cultivo (Conter et al., 2001). Por otro lado, la delección total del gen tiene efectos negativos en la resistencia a antibióticos y a la presión osmótica alta (Cebrián et al., 2015; Padgen et al., 2020; Stasic et al., 2012; Tkachenko et al., 2017).

Con respecto cepas con eliminación del gen *rpoS* o su funcionalidad, han mostrado diferentes fenotipos, entre ellos: tasa de crecimiento específico máximo y afinidad a la glucosa igual o mayor en condiciones limitantes de carbono con respecto a la silvestre tanto en medios complejos (LB) como mínimos minerales (Franchini et al., 2015); en condiciones sin limitaciones de carbono, una caída en la densidad óptica de los cultivos en medio LB y medio mineral (M9) (García, 2020); una disminución significativa de unidades formadoras de colonia en medios carentes de nitrógeno para mutantes con *rpoS* inactivado (Kabir et al., 2004); en la cepa JWK2711 se redujo el tiempo para llegar a la fase estacionaria, disminuyó el crecimiento máximo e inhabilitó la utilización de acetato. Contradictoriamente, se ha reportado que la delección de *rpoS* en la cepa JW5437 alivia el efecto de sobre flujo metabólico y suprime la acumulación de acetato en condiciones de alta concentración de glucosa (Rahman et al., 2006; Suryadarma et al., 2012). Otros efectos encontrados han sido la mejora de biosíntesis de aminoácidos proteínogénicos a través de carbono derivado de metanol en cepas con sobreexpresión de *rpoS* (Bennett et al., 2020).

La delección total de *rpoS* tiene efectos positivos en la producción de ciertos metabolitos como el 1-propanol, del polímero P(LA-co-3HB) y triptófano (Ding et al., 2021; Jun Choi et al., 2012; Kadoya & Kodama, 2015). En cuanto a la producción de proteínas, se han encontrado cambios (tanto en el aumento como disminución) en la expresión de *rpoS* en cepas con mejoras en la PPR S (Landberg et al., 2020; Weikert et al., 2000). Por otro lado, la utilización de segmentos 5' del promotor de *rpoS* o induciendo la expresión de RpoS en fase exponencial puede aumentar la expresión de proteína recombinante (Kang et al., 2008; Mulyanti et al., 2021) pero, únicamente se reporta un caso donde se explora específicamente la modificación de *rpoS* a través de su inactivación por inserción del transposón 10 para la producción de proteína recombinante (específicamente beta galactosidasa) y se logró un aumento del cuádruple de la actividad volumétrica de la enzima recombinante con respecto a la silvestre (Chou et al., 1996).

Algo que resalta de este factor sigma es la gran cantidad de fenotipos que se han encontrado para los 3 parámetros buscados (resistencias, crecimiento y producción) y que gran parte de ellos surgen por cambios en la expresión, ya sea un aumento, disminución o completa carencia. Aunque es claro debido a su papel en la respuesta a estrés, estos resultados muestran que alterar la expresión de *rpoS* tiene un buen potencial de generar cepas con fenotipos interesantes, y que la alteración de su estructura no ha sido estudiada a fondo, lo cual posibilita interesantes.

Factor σ^{32} (*rpoH*)

RpoH es el factor sigma encargado de regular los genes de respuesta a choque térmico por señales citoplasmáticas (a diferencia de RpoE). Entre los genes que se encuentran en su regulón con 99 unidades de transcripción (el cual incluye 312 sitios de unión a ADN en *E. coli*) se han identificado distintas proteínas chaperonas y proteasas (Solís, 2001; Narberhaus & Balsiger, 2003; Nonaka et al., 2006; Cho et al., 2014; Keseler et al., 2021).

Los niveles intracelulares de este factor de transcripción se mantienen muy bajos durante el crecimiento a 30° C y aumentan al incrementarse la temperatura a 42 °C, este factor sigma se acumula en grandes cantidades para dirigir la ARN polimerasa a los promotores de genes de choque térmico.

En su mayoría, las mutaciones de *rpoH* parecen tener efectos deletéreos en el crecimiento o aumentan la sensibilidad a distintos tipos de estrés. Solo en 2 estudios se sugiere que su sobreexpresión puede generar resistencia a presión hidrostática y choque térmico (Gayán et al., 2016, 2020). Distintos estudios sobre genes esenciales (como los realizados para la biblioteca Keio, PEC o TraDIS) muestran que *rpoH* es un gen esencial (Goodall et al., 2018). Sin embargo, en la determinación de la esencialidad de los genes en cada biblioteca se utilizan ciertas condiciones de crecimiento de las cepas mutantes como una temperatura de 37 °C. En el caso de *rpoH*, se ha observado que una célula de *E. coli* sí puede ser viable con una delección en este gen si ésta crece en temperaturas iguales o menores a 20 °C o con mutaciones de supresión de la letalidad (Zhou et al., 1988).

En algunos estudios se sugiere que mutantes con delección total en *rpoH* sí pueden crecer a temperaturas mayores a 20 °C (Díaz-Acosta et al., 2006; Rowbury & Goodson, 1993), pero sería importante evaluar si las cepas utilizadas no tuvieran alguna de estas mutaciones supresoras de esencialidad.

La delección de *rpoH* genera cepas con crecimiento más lento y con una temperatura mínima de crecimiento de 10 °C, son sensibles a choque térmico y a estrés oxidativo, pero solo durante fase exponencial (Díaz-Acosta et al., 2006). Además de lo mencionado, se ha descrito que cepas donde se altera la secuencia de *rpoH* son hipersensibles a la presencia de antibióticos, luz UV, etanol, metales pesados, pH ácido, y estrés oxidativo (Zhou et al., 1988; Solís, 2001; Rowbury & Goodson, 1993; Kogoma & Yura, 1992; J. K. Powell & Young, 1991; LaRossa et al., 1995).

Existen pocos estudios donde se encontraron mejoras en la producción a través de cambios en la actividad o estructura de este factor sigma. En uno, se aumentó el título del policétido 6-deoxi-eritronolida B a través de la sobreexpresión de *rpoH* (Yang et al., 2015). Así mismo, se logró suprimir la proteólisis de una proteína de fusión heteróloga con la mutación sin sentido *rpoH165* (Goldberg et al., 1989). Finalmente, la producción de 5 proteínas heterólogas distintas fue mejorada hasta 8 veces la concentración de la silvestre a través de la mutación de sustitución del aminoácido Arg-268-Cys denominada *rpoH358* (Obukowicz et al., 1992). Cabe mencionar que estos estudios sobre producción de PR tienen más de 25 años de ser publicados y no parecen existir nuevas publicaciones en el tema. En contraste con los factores ya revisados, los fenotipos útiles encontrados para cambios en estructura y expresión de *rpoH* son pocos (5) y dos de ellos fueron hallazgos al estudiar cepas mutantes, y no estudios donde se exploraba la modificación de *rpoH*. Aunque es poca la evidencia, existen indicios de que se pueden obtener efectos positivos si se altera la expresión o secuencia del factor y éstas se centran en aspectos de resistencia a estrés y producción de metabolitos o proteínas, pero su delección total parece provocar un fenotipo muy frágil.

Factor σ^{28} (*fliA*)

FliA es conocido como el factor sigma de quimiotaxis y síntesis de flagelo (Kundu et al., 1997; Shimada et al., 2017). Se han identificado 51 sitios de unión al ADN en el genoma de *E. coli* con 34 unidades de transcripción registradas en Ecocyc, además que el factor controla la transcripción de 6 operones de clase 3 para la síntesis de flagelo (entre ellos está el gen de las subunidades de flagelina), componentes del motor, y factores reguladores de la quimiotaxis (Cho et al., 2014; Fitzgerald et al., 2014; Keseler et al., 2021). Este gen no es esencial y se han observado distintas características en cepas con ausencia del gen *fliA* como lo es la carencia de flagelo, la falta de síntesis de pili tipo 1, la incapacidad de formación de biopelículas y una falta de motilidad (Wood et al., 2006; Claret et al., 2007; Zhao et al., 2007). Los cambios de fenotipo en las cepas con cambios en expresión y secuencia en *fliA* han sido menos explorados que en los otros factores sigma ya mencionados, y en su mayoría estos estudios son específicamente sobre aspectos de motilidad. Sin embargo, estos cambios de motilidad pueden ser positivos, pues una sustitución de aminoácido en FliA (R220W) puede provocar una plasticidad notoria para aumentar la velocidad de nado y la tasa de crecimiento del cultivo (Yi & Dean, 2016). Además de esto, se ha observado que la delección de *fliA* confiere ventajas en el crecimiento de *E. coli* y disminuye la muerte celular basal sin presencia de estrés exógeno. Esto parece solo ocurrir en medios líquidos con agitación, y esta ventaja se elimina o revierte en medios sólidos, semisólidos o donde la movilidad representa una ventaja (Fontaine et al., 2007). En temas de producción, se ha reportado únicamente que la cepa CWML2 derivada de MG1655 (la cual presenta características favorables para la producción de proteína recombinante, como lo es una tasa de crecimiento específica mayor, incrementos en los rendimientos de biomasa y mayor resistencia a distintos tipos de estrés) muestra un aumento en la expresión de *fliA* comparada con la cepa silvestre, lo que le confiere cambios favorables en la motilidad (Weikert et al., 2000). Para el caso de este factor sigma, no se encontró ningún fenotipo asociado a la resistencia a algún tipo de estrés y los fenotipos útiles para producción de PR encontrados a partir de la modificación en la expresión o secuencia de este gen han sido limitados.

En todo caso, parece ser que su potencial es mayor si se buscan características que modifiquen motilidad, crecimiento y formación de biopelículas.

Factor σ^{24} (*rpoE*)

RpoE es uno de los factores sigma de función extracitoplasmática, es decir, que se encuentra en el citoplasma unido a la membrana interna acoplado a un sistema transmembranal que responde a estímulos del ambiente. Los productos de los genes controlados por RpoE se requieren para el correcto plegamiento de proteínas de membrana externa, biosíntesis de fosfolípidos y lipopolisacáridos, transducción de señales, y la expresión de proteínas de membrana interna y externa (Solís, 2001; Egler et al., 2005; Hayden & Ades, 2008). Se han identificado 65 regiones promotoras para RpoE y 82 unidades de transcripción en su regulón (Cho et al., 2014; Keseler et al., 2021). RpoE es considerado como esencial en colecciones de mutantes como Keio o en el programa TraDIS debido a que al eliminar este gen cesa la transcripción de genes esenciales para el crecimiento celular y estabilidad de la membrana. Sin embargo, se han observado mutaciones que suprimen la esencialidad del gen *rpoE* como lo es la sobreexpresión de *ptsN* y *yhbW*, los cuales codifican para una proteína reguladora de la actividad y/o expresión de transportadores de potasio en el sistema PTS y una monooxigenasa sin función definida, respectivamente (Hayden & Ades, 2008; Goodall et al., 2018).

Existe poca evidencia de cepas con cambios en la secuencia en *rpoE* con mejoras en resistencia a estrés, pues al contrario la mayoría de las mutantes en este factor sigma son más sensibles. Cuando esto se ha reportado resulta por una sobreexpresión de RpoE que elimina algún fenotipo sensible a temperatura o estrés en la membrana causada por mutaciones en otros genes (Egler et al., 2005; Hart et al., 2019; Ono et al., 2009; Vidovic et al., 2018; Warr et al., 2021). Solamente en un caso se menciona una mutación de sustitución de aminoácido llamada *rpoE_S2R* la cual parece permitir una respuesta más rápida al estrés periplásmico, pero en el estudio se sugiere que esta mutación en *E. coli* la vuelve hiperreactiva a estrés de baja intensidad, disminuyendo su capacidad de sobrevivencia (Konovalova et al., 2016).

También se estableció una participación de RpoE en la regulación de condiciones limitantes de nitrógeno y carbono al mismo tiempo, midiendo la transcripción de genes en su regulón (Löffler et al., 2017). Éstos son los principales puntos relevantes que fueron encontrados en la bibliografía disponible y no existen estudios que evalúen la producción de proteína u otros metabolitos. A falta de estudios donde se explore la mutación azarosa del factor RpoE y la utilización de mutaciones supresoras de su esencialidad, el potencial que se observa en este factor como diana de modificaciones para producción de PR es reducido.

Factor σ^{19} (*fecI*)

El factor sigma FecI es el segundo factor sigma extracitoplasmático de *E. coli*. FecI tiene la función de dirigir la transcripción de los operones *fecABCDE* y *fecIR* que son necesarios para el transporte de citrato férrico. El factor de transcripción es activado por la presencia de citrato férrico en el medio y su actividad es permitida en condiciones de inanición por hierro (Braun et al., 2003; Moraleda-Muñoz et al., 2019). Solo se han identificado 7 sitios de unión de este factor sigma en el genoma de *E. coli* y una sola unidad de transcripción, y su expresión solo es regulada por RpoD y RpoS mientras que no regula a ningún factor sigma (Cho et al., 2014; Keseler et al., 2021).

En algunos estudios donde se han generado cepas con delección en *fecI*, se muestra una ausencia de FecA (la proteína transmembranal receptora de citrato férrico que induce la actividad de FecR y FecI) y no se lograba inducir la expresión de genes *fec* de transporte, aún en condiciones de ausencia de hierro (Ochs, Angerer, et al., 1995; Ochs, Veitinger, et al., 1995).

Mutantes sin este factor sigma parecen crecer de la misma forma que una cepa silvestre (García, 2020). Además de esta alteración fenotípica esperada, se ha encontrado que cepas con delección en *fecI* muestran una mayor producción del polímero P(LA-co-3HB) que la cepa silvestre (5.7 g/L y 5.3 g/L respectivamente) aunque muestran una disminución en la proporción de unidades de lactato (medido como el porcentaje del peso total) en el polímero con peso molecular variable (Kadoya & Kodama, 2015). Así mismo, sobreexpresar FecI ha mostrado un aumento en

la transcripción de genes heterólogos como *oxyB* lo que sugiere que puede regular positivamente la transcripción de otros clústeres de genes biosintéticos (Stevens et al., 2013). Aun siendo el factor sigma con el regulón más pequeño, se lograron encontrar algunas características interesantes al eliminar y sobreexpresar este factor sigma. Esto señala que, aunque el tamaño de su regulón limita el impacto que tienen las alteraciones en su secuencia y expresión del gen, aún se pueden obtener fenotipos útiles.

Discusión

Potencial de los factores sigma como dianas para el mejoramiento de cepas de producción

En primer lugar, RpoD muestra tener un alto potencial como diana de modificaciones para la formación de cepas de producción. Esto se demuestra ya que existen ejemplos donde su modificación, mediante cambios a la secuencia del gen, mejora las concentraciones de proteína producida. Además de esto, también se pueden obtener cepas con cambios en la resistencia a distintas formas de estrés que pueden llegar a darse durante un proceso de producción.

Cabe resaltar que la mayoría de estas cepas han sido obtenidas a través de gTME (genera mutaciones aleatorias por medio de PCR propensa a errores), lo cual tiene la gran ventaja de poder ser aplicado a las cepas de producción ya existentes, mejorando el rendimiento en la producción de muchos productos biotecnológicos. Sin embargo, esta no es una técnica racional, por lo que sería importante la exploración de las mutaciones específicas de los genes que provocan los fenotipos deseados.

Potencialmente, se podría explorar a mayor profundidad alteraciones en estructura y expresión que no sigan los métodos de gTME. Así mismo, se podrían llevar las aplicaciones de gTME y otros fenotipos aún más lejos, por ejemplo: se sabe que se puede generar un fenotipo de resistencia múltiple utilizando dos factores sigma distintos en la misma bacteria, pero agregar la utilización de circuitos genéticos sintéticos para activar la expresión de un alelo de *rpoD* bajo ciertas condiciones y la de un *rpoD* distinto con un estímulo específico, entonces se podría controlar el cambio fenotípico global. Una limitante de la exploración de mutantes de *rpoD* es que su delección resulta complicada ya que

controla funciones esenciales, por lo que no se han reportado casos de fenotipos en ausencia de este factor. Entre todos los factores sigma, éste es el más estudiado en la aplicación de su modificación y con un mayor potencial, pero no es el único que debería ser explorado.

En segundo lugar, la generación de mutaciones y deleciones de los factores RpoS y RpoN ya han sido exploradas. Su delección, sobreexpresión, o mutación genera fenotipos que tienen mayor resistencia a ciertas condiciones o una mayor producción de ciertos metabolitos. En el caso específico de la producción de PR, no existe información específica sobre los efectos que podrían provocar modificaciones en RpoN o en su expresión, aunque las mejoras en producción de otros metabolitos y su influencia en la utilización de fuentes de nitrógeno puede indicar una potencial utilidad en PPR y abre la puerta a nuevas investigaciones.

Para RpoS, en cambio, sí existen ejemplos donde modificando el gen se obtienen cepas con fenotipo favorable para la producción de PR, sin embargo, la mayoría de estas modificaciones en el factor sigma no han sido el objetivo del estudio sino más bien, un hallazgo fortuito, a excepción del estudio de Chou y colaboradores en 1996 con su estudio de la producción de galactosidasa. Un caso especialmente llamativo es el de Mulyanti *et al.* en 2021, donde el cambio favorable para producción de PR se obtuvo al unir el gen de *rpoS*, bajo un promotor de *rpoD*, con esto se indujo su expresión en fase exponencial (Mulyanti *et al.*, 2021). Esto amplía las posibles aplicaciones de estos factores sigma.

Dadas las interacciones que se han encontrado entre estos dos factores sería importante que los estudios en producción de PR que modifiquen la expresión de uno de ellos tengan en cuenta la actividad de ambos. Además de eso, no se ha explorado el potencial de aplicar gTME y otras herramientas de evolución dirigida a estos factores sigma. Dada la evidencia ya existente de los fenotipos que se pueden generar en cada factor sigma, y en especial la predominancia en expresión que muestra el regulón de RpoS en fase estacionaria, existe un alto potencial en ser explorados como posibles dianas para la formación de cepas de producción.

A diferencia de los otros factores sigma ya mencionados, RpoE y RpoH han sido muy poco explorados en lo concerniente a cepas de producción debido a los efectos deletéreos de su alteración y a que estos genes son esenciales en condiciones de crecimiento a 37 °C. Específicamente en el caso de *rpoH*, en la búsqueda bibliográfica se logró encontrar ejemplos de experimentos, aunque realizados hace ya varias décadas, donde *rpoH* podía ser eliminado y *E. coli* era viable a temperaturas menores a 20 °C. Aunado a dicho hallazgo, se localizaron dos ejemplos donde mutantes de *rpoH* tenían fenotipos que aumentaban la producción de metabolitos y PR, pero estos estudios se realizaron hace más de 25 años y no se encontró algún seguimiento experimental más actualizado (Goldberg *et al.*, 1989; Obukowicz *et al.*, 1992). A su vez, para *rpoE* se encontró que en ciertas cepas de *E. coli* el gen no es esencial, y puede ser eliminado.

Ambos casos abren la posibilidad de investigar a mayor profundidad las mutantes de estos genes. Además de esto, la fuerte relación que se ha observado entre los regulones de estos factores sigma y la expresión de proteínas chaperonas, la regulación de otros procesos metabólicos como la glucosilación de lípidos, el desarrollo de mutaciones puntuales, y la temperatura de crecimiento, continúan resaltando a estos dos genes como buenas opciones para la investigación de cepas de producción. Sin embargo, las dificultades presentes debido a los efectos deletéreos de sus mutantes son un obstáculo que aún deben de ser abordados a mayor profundidad.

Por último, los factores con regulón más pequeño, FecI y FliA, mostraron repercusiones menores en sus mutantes comparadas con los demás factores sigma. Aunque los cambios generados por la eliminación de estos genes pueden ser menores en comparación, sí podrían llegar a ser importantes, especialmente en el caso de *fliA* debido a su papel en la motilidad y su relación con el regulón de RpoS. Por lo tanto, su potencial como diana de mutaciones para la generación de cepas de producción es menor a cualquier otro factor sigma, pero el efecto reducido que tiene sobre la viabilidad celular y el crecimiento, lo vuelve un objeto de estudio interesante pues tienen el potencial de liberar espacio metabólico, reduciendo los recursos celulares invertido en la producción de flagelo en condiciones donde no son necesarias (como un

cultivo por agitación), lo que podría beneficiar la producción de PR.

Perspectivas y futuros experimentos

La bibliografía revisada muestra que existen muchos otros temas y experimentos por explorar. Dentro de éstos sugerimos tres perspectivas interesantes que podrían ser investigadas en el futuro. En primer lugar, dirigir la aplicación de gTME a otros factores sigma diferentes a RpoD. Esto surge de observar la utilidad que ha mostrado esta técnica en la generación de fenotipos útiles; sin embargo, para *E. coli* solo ha sido aplicada a RpoD como se muestra en la **tabla 1**. A futuro, incluso se podría buscar aplicar gTME en más de un factor sigma a la vez, permitiendo alteraciones que potencialmente afecten todo el transcriptoma de *E. coli*. Además de esto, se pueden aprovechar los hallazgos en algunos factores sigma y observar si éstos se pueden aplicar a los demás. Como ejemplo, explorar si la generación de factores sigma truncados que conserven solo las regiones 3 y 4, como se ha observado repetidamente para RpoD, puede ser útil para otros factores sigma de la misma familia estructural.

Otro tema interesante es la profundización en las cepas con deleciones en estos factores sigma. Por un lado, realizar múltiples deleciones para encontrar cuál es el mínimo de factores sigma necesarios para la sobrevivencia de *E. coli*, puede ser una estrategia rápida para generar un sistema de célula mínima no basado en un genoma mínimo, sino en un transcriptoma mínimo, puesto que las alteraciones de gran magnitud serán sobre la transcripción de los genes. Por otro lado, la dinámica de interacción a través de competición por la ARNP que caracteriza a los factores sigma podría ser explotada a través de la deleción de estos factores o el control de su expresión y actividad. Esto se podría utilizar para potenciar los efectos de factores sigma mutantes, ya que el traslape de los regulones llega a tener un cierto efecto amortiguante. Por ejemplo, si se reduce fuertemente la expresión de RpoS, la fuerte competencia que este factor puede generar con los más de 800 genes que comparte con RpoD se vería reducida, por lo tanto, podríamos esperar que las mutaciones en el gen *rpoD* tengan efectos más drásticos.

Por último, en combinación con herramientas de biología sintética, la alta pleiotropía que generan las mutantes de factores sigma, produciendo fuertes alteraciones fenotípicas a través de la mutación de un solo gen, abre la posibilidad de controlar el fenotipo de una sola cepa a través de la expresión de distintas mutantes en distintos tiempos de crecimiento. De ser posible, esta herramienta nos daría la capacidad no solo de controlar la inducción de genes para la producción de ciertos metabolitos o proteínas en una cepa de producción, y también de inducir junto con ellos el fenotipo que genere las condiciones celulares óptimas para dicha producción.

Conjuntando la ingeniería de factores sigma con herramientas de control dinámico de metabolismo, se podría potenciar el control que se ejerce sobre el estado metabólico de la célula. Ejemplos de esto podrían ser la utilización de ARN de interferencia, o proteínas conocidas como antisigmas para suprimir transitoriamente la actividad de ciertos factores sigma, o acoplar la activación de sigmas mutados con circuitos de biología sintética que reaccionen a señales ambientales o metabólicas.

Conclusiones

La producción de PR es y seguramente continuará siendo uno de los procesos biotecnológicos de mayor importancia a nivel mundial. Esto provoca que exista un gran número de artículos científicos del tema, lo cual es especialmente el caso en cepas tan utilizadas como *E. coli* y en genes con impacto tan amplio en el fenotipo como los factores sigma. En el presente trabajo se realizó una revisión sistemática de la bibliografía disponible sobre los fenotipos útiles para la producción de PR que se han observado en *E. coli* por la modificación en estructura o expresión de sus siete factores sigma. Además, se propuso una estrategia experimental para evaluar el potencial de cada factor sigma en la producción de PR. Se encontró que RpoD presenta un alto potencial que ha sido explorado y demostrado en diversos experimentos, y puede continuar siendo utilizado para generar cepas de producción. RpoS y RpoN muestran un alto potencial explorado en menor medida, lo cual abre una interesante línea de investigación. Por otro lado, aunque es menor el potencial de RpoE y RpoH es que los casos anteriores, ha sido apenas abordado debido a las restricciones en el crecimiento.

Sin embargo, existen indicios de que estos obstáculos podrían ser superados. Finalmente, los factores Fecl y FliA mostraron el menor potencial, probablemente debido al tamaño de su regulón en comparación con el resto, pero su facilidad de ser eliminado sin causar problemas en el crecimiento también tiene interesantes aplicaciones.

La utilización de herramientas biosintéticas y de ingeniería genética acopladas a estos conocimientos podrían brindarnos la capacidad de entender e influenciar de nuevas formas el complejo espacio metabólico y su relación con el transcriptoma, tanto en *E. coli* como en otras bacterias. Esto tiene el potencial de ser sumamente útil para la producción de PR y de otros metabolitos y, sobre todo, muy interesante.

Agradecimientos

Se agradece el apoyo del donativo CONACyT A1-S-8646.

Referencias

- Aguilar, C., Escalante, A., Flores, N., de Anda, R., Riveros-McKay, F., Gosset, G., Morett, E., & Bolívar, F. (2012). Genetic changes during a laboratory adaptive evolution process that allowed fast growth in glucose to an *Escherichia coli* strain lacking the major glucose transport system. *BMC Genomics*, *13*(1), 385. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-385>
- Alper, H., & Stephanopoulos, G. (2007). Global transcription machinery engineering: A new approach for improving cellular phenotype. *Metabolic Engineering*, *9*(3), 258-267. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2006.12.002>
- Appukkuttan, D., Singh, H., Park, S.-H., Jung, J.-H., Jeong, S., Seo, H. S., Choi, Y. J., & Lim, S. (2016). Engineering synthetic multistress tolerance in *Escherichia coli* by using adeinococcal response regulator, DR1558. *Applied and Environmental Microbiology*, *82*(4), 1154–1166. <https://doi.org/10.1128/AEM.03371-15>
- Bak, G., Han, K., Kim, D., & Lee, Y. (2014). Roles of *rpoS*-activating small RNAs in pathways leading to acid resistance of *Escherichia coli*. *MicrobiologyOpen*, *3*(1), 15–28. <https://doi.org/10.1002/mbo3.143>
- Battesti, A., Majdalani, N., & Gottesman, S. (2011). The RpoS-mediated general stress response in *Escherichia coli*. *Annual Review of Microbiology*, *65*(1), 189–213. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090110-102946>
- Battesti, A., Majdalani, N., & Gottesman, S. (2015). Stress sigma factor RpoS degradation and translation are sensitive to the state of central metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(16), 5159–5164. <https://doi.org/10.1073/pnas.1504639112>
- Belik, A. S., Tarasova, N. N., & Khmel', I. A. (2008). Regulation of biofilm formation in *Escherichia coli* K12: Effect of mutations in the genes HNS, STRA, LON, and RPON. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, *23*(4), 159–162. <https://doi.org/10.3103/S0891416808040010>
- Bennett, R. K., Agee, A., Gerald Har, J. R., von Hagel, B., Siu, K.-H., Antoniewicz, M. R., & Papoutsakis, E. T. (2020). Triggering the stringent response enhances synthetic methanol utilization in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*, *61*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2020.04.007>
- Bonocora, R. P., Smith, C., Lapierre, P., & Wade, J. T. (2015). Genome-scale mapping of *Escherichia coli* σ_{54} reveals widespread, conserved intragenic binding. *PLOS Genetics*, *11*(10), e1005552. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005552>
- Braun, V., Mahren, S., & Ogierman, M. (2003). Regulation of the Fecl-type ECF sigma factor by transmembrane signalling. *Current Opinion in Microbiology*, *6*(2), 173–180. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(03\)00022-5](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00022-5)
- Cebrián, G., Arroyo, C., Condón, S., & Mañas, P. (2015). Osmotolerance provided by the alternative sigma factors σ_B and *rpoS* to *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* is solute dependent and does not result in an increased growth fitness in NaCl containing media. *International Journal of Food*

Microbiology, 214, 83–90.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.07.011>

Cho, B.-K., Kim, D., Knight, E. M., Zengler, K., & Palsson, B. O. (2014). Genome-scale reconstruction of the sigma factor network in *Escherichia coli*: Topology and functional states. *BMC Biology*, 12(1), 4.
<https://doi.org/10.1186/1741-7007-12-4>

Choe, D., Lee, J. H., Yoo, M., Hwang, S., Sung, B. H., Cho, S., Palsson, B., Kim, S. C., & Cho, B.-K. (2019). Adaptive laboratory evolution of a genome-reduced *Escherichia coli*. *Nature Communications*, 10(1), 935.
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-08888-6>

Chou, C.-H., Bennett, G. N., & San, K.-Y. (1996). Genetic manipulation of stationary-phase genes to enhance recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 50(6), 636–642.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19960620\)50:6<636::AID-BIT4>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19960620)50:6<636::AID-BIT4>3.0.CO;2-L)

Claret, L., Miquel, S., Vieille, N., Ryjenkov, D. A., Gomelsky, M., & Darfeuille-Michaud, A. (2007). The flagellar sigma factor FliA regulates adhesion and invasion of Crohn disease-associated *Escherichia coli* via a cyclic dimeric GMP-dependent pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 282(46), 33275–33283.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M702800200>

Conter, A., Gangneux, C., Suzanne, M., & Gutierrez, C. (2001). Survival of *Escherichia coli* during long-term starvation: Effects of aeration, NaCl, and the rpoS and osmC gene products. *Research in Microbiology*, 152(1), 17–26.
[https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(00\)01164-5](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(00)01164-5)

Davis, M. C., Kesthely, C. A., Franklin, E. A., & MacLellan, S. R. (2017). The essential activities of the bacterial sigma factor. *Canadian Journal of Microbiology*, 63(2), 89–99.
<https://doi.org/10.1139/cjm-2016-0576>

Díaz-Acosta, A., Sandoval, M. L., Delgado-Olivares, L., & Membrillo-Hernández, J. (2006). Effect of anaerobic and stationary phase growth conditions on the heat shock and oxidative stress responses in *Escherichia coli* K-12. *Archives of Microbiology*, 185(6), 429–438.
<https://doi.org/10.1007/s00203-006-0113-9>

Ding, D., Bai, D., Li, J., Mao, Z., Zhu, Y., Liu, P., Lin, J., Ma, H., & Zhang, D. (2021). Analyzing the genetic characteristics of a tryptophan-overproducing *Escherichia coli*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 44(8), 1685–1697.
<https://doi.org/10.1007/s00449-021-02552-4>

Dong, T., & Schellhorn, H. E. (2009). Global effect of RpoS on gene expression in pathogenic *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL933. *BMC Genomics*, 10(1), 349.
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-349>

Dong, T., Yu, R., & Schellhorn, H. (2011). Antagonistic regulation of motility and transcriptome expression by RpoN and RpoS in *Escherichia coli*: Antagonistic control by RpoS and RpoN. *Molecular Microbiology*, 79(2), 375–386.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07449.x>

Duzenli, O., & Okay, S. (2020). Promoter engineering for the recombinant protein production in prokaryotic systems. *AIMS Bioengineering*, 7(2), 62–81.
<https://doi.org/10.3934/bioeng.2020007>

Egler, M., Grosse, C., Grass, G., & Nies, D. H. (2005). Role of the extracytoplasmic function protein family sigma factor RpoE in metal resistance of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 187(7), 2297–2307.
<https://doi.org/10.1128/JB.187.7.2297-2307.2005>

El Khoury, J. Y., Maure, A., Gingras, H., Leprohon, P., & Ouellette, M. (2019). Chemogenomic screen for imipenem resistance in Gram-negative bacteria. *MSystems*, 4(6).
<https://doi.org/10.1128/mSystems.00465-19>

Fitzgerald, D. M., Bonocora, R. P., & Wade, J. T. (2014). Comprehensive mapping of the *Escherichia coli* flagellar regulatory network. *PLoS Genetics*, 10(10), e1004649.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004649>

Fontaine, F., Stewart, E. J., Lindner, A. B., & Taddei, F. (2007). Mutations in two global regulators lower individual mortality in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 071202153222001
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05988.x>

- Franchini, A. G., Ihssen, J., & Egli, T. (2015). Effect of global regulators RpoS and cyclic-AMP/CRP on the catabolome and transcriptome of *Escherichia coli* K12 during Carbon- and energy-limited growth. *PLoS ONE*, *10*(7), e0133793. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133793>
- Gaida, S. M., Al-Hinai, M. A., Indurthi, D. C., Nicolaou, S. A., & Papoutsakis, E. T. (2013). Synthetic tolerance: Three noncoding small RNAs, DsrA, ArcZ and RprA, acting supra-additively against acid stress. *Nucleic Acids Research*, *41*(18), 8726–8737. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt651>
- Gao, X., Jiang, L., Zhu, L., Xu, Q., Xu, X., & Huang, H. (2016). Tailoring of global transcription sigma D factor by random mutagenesis to improve *Escherichia coli* tolerance towards low-pHs. *Journal of Biotechnology*, *224*, 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.03.012>
- García, E. (2020). *Caracterización de mutantes en factores sigma de Escherichia coli*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Gayán, E., Cambré, A., Michiels, C. W., & Aertsen, A. (2016). Stress-induced evolution of heat resistance and resuscitation speed in *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43888. *Applied and Environmental Microbiology*, *82*(22), 6656–6663. <https://doi.org/10.1128/AEM.02027-16>
- Gayán, E., Van den Bergh, B., Michiels, J., Michiels, C. W., & Aertsen, A. (2020). Synthetic reconstruction of extreme high hydrostatic pressure resistance in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*, *62*, 287–297. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2020.09.008>
- Goldberg, I., Salerno, A. J., Patterson, T., & Williams, J. I. (1989). Cloning and expression of a collagen-analog-encoding synthetic gene in *Escherichia coli*. *Gene*, *80*(2), 305–314. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(89\)90294-1](https://doi.org/10.1016/0378-1119(89)90294-1)
- Goodall, E. C. A., Robinson, A., Johnston, I. G., Jabbari, S., Turner, K. A., Cunningham, A. F., Lund, P. A., Cole, J. A., & Henderson, I. R. (2018). *The essential genome of Escherichia coli K-12*. *9*(1), 18.
- Gopal, G. J., & Kumar, A. (2013). Strategies for the production of recombinant protein in *Escherichia coli*. *The Protein Journal*, *32*(6), 419–425. <https://doi.org/10.1007/s10930-013-9502-5>
- Guo, Y., Li, Y., Zhan, W., Wood, T. K., & Wang, X. (2019). Resistance to oxidative stress by inner membrane protein ElaB is regulated by OxyR and RpoS. *Microbial Biotechnology*, *12*(2), 392–404. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13369>
- Hamdallah, I., Torok, N., Bischof, K. M., Majdalani, N., Chadalavada, S., Mdluli, N., Creamer, K. E., Clark, M., Holdener, C., Basting, P. J., Gottesman, S., & Slonczewski, J. L. (2018). Experimental evolution of *Escherichia coli* K-12 at High pH and with RpoS induction. *Applied and Environmental Microbiology*, *84*(15). <https://doi.org/10.1128/AEM.00520-18>
- Harden, M. M., He, A., Creamer, K., Clark, M. W., Hamdallah, I., Martinez, K. A., Kresslein, R. L., Bush, S. P., & Slonczewski, J. L. (2015). Acid-Adapted Strains of *Escherichia coli* K-12 obtained by experimental evolution. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(6), 1932–1941. <https://doi.org/10.1128/AEM.03494-14>
- Hart, E., O'Connell, A., Tang, K., Wzorek, J., Grabowicz, M., Kahne, D., & Silhavy, T. (2019). Fine-tuning of sigma E activation suppresses multiple assembly-defective mutations in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *201*(11), e000745-18.
- Hayden, J. D., & Ades, S. E. (2008). The extracytoplasmic stress factor, σ E, is required to maintain cell envelope integrity in *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, *3*(2), e1573. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001573>
- Jin, Y., Watt, R. M., Danchin, A., & Huang, J. (2009). Small noncoding RNA GcvB is a novel regulator of acid resistance in *Escherichia coli*. *BMC Genomics*, *10*(1), 165. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-165>
- Jun Choi, Y., Hwan Park, J., Yong Kim, T., & Yup Lee, S. (2012). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of 1-propanol. *Metabolic Engineering*, *14*(5), 477–486. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2012.07.006>
- Kabir, Md. S., Sagara, T., Oshima, T., Kawagoe, Y., Mori, H., Tsunedomi, R., & Yamada, M. (2004). Effects of mutations in the rpoS gene on cell viability and global gene expression under

Artículos

nitrogen starvation in *Escherichia coli*. *Microbiology*, 150(8), 2543–2553. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27012-0>

Kadoya, R., & Kodama, Y. (2015). Enhanced cellular content and lactate fraction of the poly(lactate-co-3-hydroxybutyrate) polyester produced in recombinant *Escherichia coli* by the deletion of s factor RpoN. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 119(4), 427–429.

Kadoya, R., Kodama, Y., Matsumoto, K., & Taguchi, S. (2015). Indirect positive effects of a sigma factor RpoN deletion on the lactate-based polymer production in *Escherichia coli*. *Bioengineered*, 6(5), 307–311.

Kang, Z., Wang, Q., Zhang, H., & Qi, Q. (2008). Construction of a stress-induced system in *Escherichia coli* for efficient polyhydroxyalkanoates production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79(2), 203–208. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1428-z>.

Keseler, I. M., Gama-Castro, S., Mackie, A., Billington, R., Bonavides-Martínez, C., Caspi, R., Kothari, A., Krummenacker, M., Midford, P. E., Muñoz-Rascado, L., Ong, W. K., Paley, S., Santos-Zavaleta, A., Subhraveti, P., Tierrafría, V. H., Wolfe, A. J., Collado-Vides, J., Paulsen, I. T., & Karp, P. D. (2021). The EcoCyc Database in 2021. *Frontiers in Microbiology*, 12, 711077. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.711077>.

Kogoma, T., & Yura, T. (1992). Sensitization of *Escherichia coli* cells to oxidative stress by deletion of the rpoH gene, which encodes the heat shock sigma factor. *Journal of Bacteriology*, 174(2), 630–632. <https://doi.org/10.1128/jb.174.2.630-632.1992>.

Konovalova, A., Schwalm, J. A., & Silhavy, T. J. (2016). A suppressor mutation that creates a faster and more robust σ E envelope stress response. *Journal of Bacteriology*, 198(17), 2345–2351. <https://doi.org/10.1128/JB.00340-16>

Kumar, R., & Shimizu, K. (2010). Metabolic regulation of *Escherichia coli* and its gdhA, glnL, gltB, D mutants under different carbon and nitrogen limitations in the continuous culture. *Microbial Cell Factories*, 9(1), 8. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-8>

Kundu, T. K., Kusano, S., & Ishihama, A. (1997). Promoter selectivity of *Escherichia coli* RNA polymerase σ F holoenzyme involved in transcription of flagellar and chemotaxis genes. *Journal of Bacteriology*, 179(13), 4264–4269.

Landberg, J., Wright, N., Wulff, T., Herrgard, M., & Nielsen, A. (2020). CRISPR interference of nucleotide biosynthesis improves production of a single-domain antibody in *Escherichia coli*. 117(12), 3835–3848.

LaRossa, R., Smulski, D., & Van Dyk, T. (1995). Interaction of lead nitrate and cadmium chloride with *Escherichia coli* K-12 and *Salmonella typhimurium* global regulatory mutants. *Journal of Industrial Microbiology*, 14, 252–258.

Löffler, M., Simen, J. D., Müller, J., Jäger, G., Laghrami, S., Schäferhoff, K., Freund, A., & Takors, R. (2017). Switching between nitrogen and glucose limitation: Unraveling transcriptional dynamics in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 258, 2–12. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.04.011>

Magnusson, L. U., Nyström, T., & Farewell, A. (2003). Underproduction of ζ 70 Mimics a Stringent Response. *Journal of Biological Chemistry*, 278(2), 968–973. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209881200>

Mahalik, S., Sharma, A. K., & Mukherjee, K. J. (2014). Genome engineering for improved recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 13(1), 177. <https://doi.org/10.1186/s12934-014-0177-1>

Mata, G. M. S. C., Ferreira, G. M., & Spira, B. (2017). RpoS role in virulence and fitness in enteropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, 12(6), e0180381. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180381>

McKenna, R., Lombana, T. N., Yamada, M., Mukhyala, K., & Veeravalli, K. (2019). Engineered sigma factors increase full-length antibody expression in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*, 52, 315–323. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.12.009>

Merrick, M. J. (1993). In a class of its own σ the RNA polymerase sigma factor σ^{54} (σ^N). *Molecular Microbiology*, 10(5), 903–909. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb00961.x>

- Milija, J., Lilic, M., Janjusevic, R., Jovanovic, G., & Savic, D. J. (1999). TRNA synthetase mutants of *Escherichia coli* K-12 are resistant to the gyrase inhibitor novobiocin. *Journal of Bacteriology*, *181*, 5.
- Mitra, A., Fay, P. A., Morgan, J. K., Vendura, K. W., Versaggi, S. L., & Riordan, J. T. (2012). Sigma factor N, liaison to an ntrC and rpoS dependent regulatory pathway controlling acid resistance and the LEE in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, *7*(9), e46288. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046288>
- Mitra, A., Fay, P. A., Vendura, K. W., Alla, Z., Carroll, R. K., Shaw, L. N., & Riordan, J. T. (2014). σ^N -dependent control of acid resistance and the locus of enterocyte effacement in enterohemorrhagic *Escherichia coli* is activated by acetyl phosphate in a manner requiring flagellar regulator FlhDC and the σ^S antagonist FliZ. *MicrobiologyOpen*, *3*(4), 497–512. <https://doi.org/10.1002/mbo3.183>
- Mogre, A., Veetil, R. T., & Seshasayee, A. S. N. (2017). Modulation of global transcriptional regulatory networks as a strategy for increasing kanamycin resistance of the translational elongation factor-G mutants in *Escherichia coli*. *G3 Genes/Genomes/Genetics*, *7*(12), 3955–3966. <https://doi.org/10.1534/g3.117.300284>
- Moraleda-Muñoz, A., Marcos-Torres, F. J., Pérez, J., & Muñoz-Dorado, J. (2019). Metal-responsive RNA polymerase extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Molecular Microbiology*, *112*(2), 385–398. <https://doi.org/10.1111/mmi.14328>
- Mulyanti, D., Soewandhi, S. N., & Riani, C. (2021). Insertion of prpoD_rpoS fragment enhances expression of recombinant protein by dps auto-inducible promoter in *Escherichia coli*. *Molecular Biology Reports*, *48*(8), 5833–5845. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06562-z>
- Nakata, K., Koh, M. M., Tsuchido, T., & Matsumura, Y. (2010). All genomic mutations in the antimicrobial surfactant-resistant mutant, *Escherichia coli* OW66, are involved in cell resistance to surfactant. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *87*(5), 1895–1905. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2638-8>
- Narberhaus, F., & Balsiger, S. (2003). Structure-function studies of *Escherichia coli* RpoH (σ_{32}) by In Vitro linker insertion mutagenesis. *Journal of Bacteriology*, *185*, 8.
- Nonaka, G., Blankschien, M., Herman, C., Gross, C. A., & Rhodius, V. A. (2006). Regulon and promoter analysis of the *E. coli* heat-shock factor, σ_{32} , reveals a multifaceted cellular response to heat stress. *2006*, *20*, 1176–1789.
- Obukowicz, M. G., Staten, N. R., & Krivi, G. G. (1992). Enhanced heterologous gene expression in novel rpoH mutants of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, *58*(5), 1511–1523. <https://doi.org/10.1128/aem.58.5.1511-1523.1992>.
- Ochs, M., Angerer, A., Enz, S., & Braun, V. (1995). Surface signaling in transcriptional regulation of the ferric citrate transport system of *Escherichia coli*: Mutational analysis of the alternative sigma factor FecI supports its essential role in fec transport gene transcription. *Molecular Genetics and Genomics*, *250*, 455–465.
- Ochs, M., Veitinger, S., Kim, I., Weiz, D., Angerer, A., & Braun, V. (1995). Regulation of citrate-dependent iron transport of *Escherichia coli*: FecR is required for transcription activation by FecI. *Molecular Microbiology*, *15*(1), 119–132. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02226.x>
- Ono, K., Kutsukake, K., & Abo, T. (2009). Suppression by enhanced RpoE activity of the temperature-sensitive phenotype of a degP ssaA double mutant in *Escherichia coli*. *Genes & Genetic Systems*, *84*(1), 15–24. <https://doi.org/10.1266/ggs.84.15>
- Padgen, M. R., Lera, M. P., Parra, M. P., Ricco, A. J., Chin, M., Chinn, T. N., Cohen, A., Friedericks, C. R., Henschke, M. B., Snyder, T. V., Spremo, S. M., Wang, J.-H., & Matin, A. C. (2020). EcAMSat spaceflight measurements of the role of σ s in antibiotic resistance of stationary phase *Escherichia coli* in microgravity. *Life Sciences in Space Research*, *24*, 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.lssr.2019.10.007>

- Paget, M. (2015). Bacterial Sigma Factors and Anti-Sigma Factors: Structure, Function and Distribution. *Biomolecules*, 5(3), 1245–1265. <https://doi.org/10.3390/biom5031245>.
- Pletnev, P., Pupov, D., Pshanichnaya, L., Esyunina, D., Petushkov, I., Nesterchuk, M., Osterman, I., Rubtsova, M., Mardanov, A., Ravin, N., Sergiev, P., Kulbachinskiy, A., & Dontsova, O. (2020). Rewiring of growth-dependent transcription regulation by a point mutation in region 1.1 of the housekeeping σ factor. *Nucleic Acids Research*, 48(19), 10802–10819. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa798>
- Powell, B. S., Court, D. L., Inada, T., Nakamura, Y., Michotey, V., Cui, X., Reizer, A., Saier, M. H., & Reizer, J. (1995). Novel proteins of the phosphotransferase system encoded within the rpoN operon of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 270(9), 4822–4839. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.9.4822>
- Powell, J. K., & Young, K. D. (1991). Lysis of *Escherichia coli* by r-Lactams which bind penicillin-binding proteins Ia and Ib: Inhibition by heat shock proteins. *Journal of Bacteriology*, 173, 6.
- Rahman, M., Hasan, M. R., Oba, T., & Shimizu, K. (2006). Effect of rpoS gene knockout on the metabolism of *Escherichia coli* during exponential growth phase and early stationary phase based on gene expressions, enzyme activities and intracellular metabolite concentrations. *Biotechnology and Bioengineering*, 94(3), 585–595. <https://doi.org/10.1002/bit.20858>
- Reitzer, L., & Schneider, B. L. (2001). Metabolic context and possible physiological themes of σ 54-dependent genes in *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65, 23.
- Riordan, J. T., Tietjen, J. A., Walsh, C. W., Gustafson, J. E., & Whittam, T. S. (2010). Inactivation of alternative sigma factor 54 (RpoN) leads to increased acid resistance, and alters locus of enterocyte effacement (LEE) expression in *Escherichia coli* O157: H7. *Microbiology*, 156, 719–730.
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in microbial systems. *Frontiers in Microbiology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00341>.
- Rowbury, R. J., & Goodson, M. (1993). PhoE porin of *Escherichia coli* and phosphate reversal of acid damage and killing and of acid induction of the CadA gene product. *Journal of Applied Bacteriology*, 74(6), 652–661. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1993.tb05199.x>
- Run, S., & Tian, P. (2018). Improved tolerance of *Escherichia coli* to propionic acid by overexpression of sigma factor RpoS. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 54(3), 288–293. <https://doi.org/10.1134/S0003683818030122>.
- Sanchez-Torres, V., Maeda, T., & Wood, T. K. (2009). Protein engineering of the transcriptional activator FhIA to enhance hydrogen production in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(17), 5639–5646. <https://doi.org/10.1128/AEM.00638-09>
- Santos, C. N. S., Xiao, W., & Stephanopoulos, G. (2012). Rational, combinatorial, and genomic approaches for engineering L-tyrosine production in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(34), 13538–13543. <https://doi.org/10.1073/pnas.1206346109>
- Shimada, T., Tanaka, K., & Ishihama, A. (2017). The whole set of the constitutive promoters recognized by four minor sigma subunits of *Escherichia coli* RNA polymerase. *PLoS ONE*, 12(6), e0179181. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179181>
- Shimada, T., Yamazaki, Y., Tanaka, K., & Ishihama, A. (2014). The whole set of constitutive promoters recognized by RNA Polymerase RpoD holoenzyme of *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, 9(3), e90447. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090447>
- Si, H.-M., Zhang, F., Wu, A.-N., Han, R.-Z., Xu, G.-C., & Ni, Y. (2016). DNA microarray of global transcription factor mutant reveals membrane-related proteins involved in n-butanol tolerance in *Escherichia coli*. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1), 114. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0527-9>

- Singh, S. S., Typas, A., Hengge, R., & Grainger, D. C. (2011). *Escherichia coli* σ 70 senses sequence and conformation of the promoter spacer region. *Nucleic Acids Research*, 39(12), 5109–5118. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr080>.
- Solís, M. (2001). *Análisis del gen regulador de la respuesta da estrés por calor, rpoH, en cepas de Escherichia coli aisladas de diferentes hospederos* [Maestra en Ciencias (Biología Celular)]. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Stasic, A. J., Wong, A. C. L., & Kaspar, C. W. (2012). Osmotic and desiccation tolerance in *Escherichia coli* O157:H7 requires rpoS (σ 38). *Current Microbiology*, 65(6), 660–665. <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0210-8> *Chemical Science and Engineering*, 6(2), 152–157. <https://doi.org/10.1007/s11705-012-1287-0>.
- Tkachenko, A. G., Kashevarova, N. M., Tyuleneva, E. A., & Shumkov, M. S. (2017). Stationary-phase genes upregulated by polyamines are responsible for the formation of *Escherichia coli* persister cells tolerant to netilmicin. *FEMS Microbiology Letters*, 364(9). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx084>
- Tomatis, P. E., Schütz, M., Umudumov, E., & Plückthun, A. (2019). Mutations in sigma 70 transcription factor improves expression of functional eukaryotic membrane proteins in *Escherichia coli*. *Scientific Reports*, 9(1), 2483. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39492-9>
- Treviño-Quintanilla, L., Freyre-González, J., & Martínez-Flores, I. (2013). Anti-Sigma Factors in *E. coli*: Common Regulatory Mechanisms Controlling Sigma Factors Availability. *Current Genomics*, 14(6), 378–387. <https://doi.org/10.2174/1389202911314060007>
- Tripathi, L., Zhang, Y., & Lin, Z. (2014). Bacterial Sigma Factors as Targets for Engineered or Synthetic Transcriptional Control. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2014.00033>
- Vidovic, S., Medihala, P., Dynes, J. J., Daida, P., Vujanovic, V., Hitchcock, A. P., Shetty, D., Zhang, H., Brown, D. R., Lawrence, J. R., & Korber, D. R. (2018). Importance of the RpoE Regulon in Maintaining the Lipid Bilayer during Antimicrobial Treatment with the Polycationic Agent, Chlorhexidine. *PROTEOMICS*, 18(3–4), 1700285. <https://doi.org/10.1002/pmic.201700285>
- Warr, A. R., Giorgio, R. T., & Waldor, M. K. (2021). Genetic analysis of the role of the conserved inner membrane protein CvpA in enterohemorrhagic *Escherichia coli* resistance to deoxycholate. *Journal of Bacteriology*, 203(6). <https://doi.org/10.1128/JB.00661-20>.
- Weber, H., Polen, T., Heuveling, J., Wendisch, V. F., & Hengge, R. (2005). Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: Σ S-dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. *Journal of Bacteriology*, 187, 1591–1603.
- Weikert, C., Canonaco, F., Sauer, U., & Bailey, J. E. (2000). Co-overexpression of RspAB improves recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*, 2(4), 293–299. <https://doi.org/10.1006/mben.2000.0163>
- Wood, T. K., González Barrios, A. F., Herzberg, M., & Lee, J. (2006). Motility influences biofilm architecture in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72(2), 361–367. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0263-8>
- Xu, G., Xiao, L., Wu, A., Han, R., & Ni, Y. (2021). Enhancing n-butanol tolerance of *Escherichia coli* by overexpressing of stress-responsive molecular chaperones. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 193(1), 257–270. <https://doi.org/10.1007/s12010-020-03417-4>
- Yang, J., Xiong, Z.-Q., Song, S.-J., Wang, J.-F., Lv, H.-J., & Wang, Y. (2015). Improving heterologous polyketide production in *Escherichia coli* by transporter engineering. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(20), 8691–8700. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6718-7>
- Yi, X., & Dean, A. M. (2016). Phenotypic plasticity as an adaptation to a functional trade-off. *ELife*, 5, e19307. <https://doi.org/10.7554/eLife.19307>

Yu, H., Tyo, K., Alper, H., Klein-Marcuschamer, D., & Stephanopoulos, G. (2008). A high-throughput screen for hyaluronic acid accumulation in recombinant *Escherichia coli* transformed by libraries of engineered sigma factors. *Biotechnology and Bioengineering*, 101(4), 788–796. <https://doi.org/10.1002/bit.21947>

Zhang, F., Qian, X., Si, H., Xu, G., Han, R., & Ni, Y. (2015). Significantly improved solvent tolerance of *Escherichia coli* by global transcription machinery engineering. *Microbial Cell Factories*, 14(1), 175. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0368-4>

Zhao, K., Liu, M., & Burgess, R. R. (2007). Adaptation in bacterial flagellar and motility systems: From regulon members to 'foraging'-like behavior in *E. coli*. *Nucleic Acids Research*, 35(13), 4441–4452. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm456>.

Zhao, K., Liu, M., & Burgess, R. R. (2010). Promoter and regulon analysis of nitrogen assimilation factor, σ_{54} , reveal alternative strategy for *E. coli* MG1655 flagellar biosynthesis. *Nucleic Acids Research*, 38(4), 1273–1283. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp1123>

Zhou, Y.-N., Kusukawa, N., Erickson, J. W., Gross, C. A., & Yura, T. (1988). Isolation and characterization of *Escherichia coli* mutants that lack the heat shock sigma factor cr32. *Journal of Bacteriology*, 170, 10.

Solventes eutécticos profundos naturales (NaDES) y su probable función en las plantas

Natural eutectic solvents (NaDES), and their potential role in plants

Mariana Ruesgas-Ramon¹, Karlina García-Sosa¹, Luis Manuel Peña Rodríguez^{1*}

¹Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida
97205, Yucatán, México.

lmanuel@cicy.mx

Tel.: 52+(999)9428330

Fax: 52+ (999) 981 39 00

Resumen

El concepto de solventes eutécticos naturales (NaDES) fue introducido específicamente para hacer referencia a posibles mezclas eutécticas constituidas por metabolitos secundarios resistentes en altas concentraciones en las células vegetales. Este tipo de solventes alternativos en las células podrían ser claves para entender funciones fisiológicas específicas en las plantas, así como la capacidad de ciertos organismos a resistir o aclimatarse a las duras condiciones ambientales (e.g. resistencia al frío y/o a la sequía). Por otro lado, los NaDES podrían estar involucrados en otras funciones biológicas dentro de las células, como las relacionados con la regulación del funcionamiento celular. Aun cuando la elevada complejidad de los sistemas celulares hace difícil comprobar que los NaDES existen en las células, esta teoría ha abierto una interesante perspectiva que ofrece una explicación atractiva para algunos de los fenómenos que ocurren a nivel celular y que de otro modo serían difíciles de entender.

Palabras clave: Solventes eutécticos profundos naturales (NaDES), plantas, regulación celular, solubilización, protección oxidativa.

Abstract

The concept of natural eutectic solvents (NaDES) was introduced to refer to possible eutectic mixtures made up of secondary metabolites in high cell concentrations. This type of alternative solvent in cells could be key to understanding specific physiological functions in plants, as well as the ability of certain organisms to resist or acclimatize to harsh environmental conditions (resistance to cold and/or drought). On the other hand, NaDES could be involved in other biological roles related to the regulation of cell function. Although given the high complexity of cellular systems, proving that NaDES actually exist in cells is challenging, this theory has opened up an interesting perspective that offers an attractive explanation for some phenomena that occur at the cellular level that would otherwise be difficult to explain.

Keywords: Natural eutectic solvents (NaDES), plants, cell regulation, solubilization, oxidative protection.

¿Qué son los DES y los NaDES?

Hace casi dos décadas se reportó por primera vez la posibilidad de formular mezclas a base de urea y cloruro de colina (ChCl), como una alternativa a los ya bien conocidos líquidos iónicos (IL's) (Abbott et al. 2003). Sin embargo, la caracterización de este nuevo tipo de solventes reveló que, aunque comparten propiedades fisicoquímicas de IL's como baja volatilidad y presión de vapor, estabilidad térmica y química y alta viscosidad (Smith, Abbott, and Ryder 2014)(Zhang et al. 2012), ambos tipos de disolventes difieren principalmente en la naturaleza de sus componentes y en sus procesos de formulación (Durand et al. 2020). Este nuevo tipo de disolventes se conoce actualmente como solventes eutécticos profundos o DES (por sus siglas en inglés). Los DES se pueden definir como la combinación de al menos dos componentes capaces de asociarse por medio de interacciones no covalentes (principalmente puentes de hidrógeno), para formar una mezcla líquida que permanece estable a temperatura ambiente. Aun cuando estas interacciones no covalentes involucran principalmente puentes de hidrógeno, también pueden estar presentes fuerzas electrostáticas o enlaces de *Van der Waals*.

Desde la introducción de los DES en 2003, y hasta la actualidad, se han utilizado un gran número de componentes para la síntesis exitosa de este tipo de solventes; los componentes más comúnmente utilizados son el cloruro de colina (ChCl) en combinación con urea, etilenglicol y/o glicerol. Más recientemente se ha reportado la posibilidad de formar combinaciones con estas características utilizando compuestos tales como alcoholes, aminoácidos, ácidos carboxílicos y azúcares (Figura 1; componentes comúnmente utilizados para la preparación de solventes eutécticos profundos) (Ruesgas-Ramon, Figueroa-Espinoza and Durand, 2017). Esta amplia diversidad química de componentes ofrece la posibilidad de ajustar las propiedades fisicoquímicas de los DES, por lo que éstos suelen ser solventes muy versátiles con aplicación en diferentes campos de la investigación como la electroquímica, la catálisis química y/o enzimática, la ciencia de los materiales, y como solventes de

extracción, entre otras (Tang and Ho 2013);(Zhang et al. 2012).

Derivado de las investigaciones sobre DES, Choi *et al.* 2011 introdujeron la palabra "natural" al concepto de DES, al notar que ciertas moléculas simples siempre estaban presentes en cantidades considerables en las células de mamíferos, plantas o microorganismos. Por lo anterior, el término solventes eutécticos profundos naturales (NaDES) se introdujo para referirse, específicamente, a las posibles mezclas eutécticas constituidas por metabolitos secundarios presentes en altas concentraciones en células vivas. Estas mezclas han sido observadas en determinados estadios de la vida de las plantas, donde podrían estar desempeñando funciones fisiológicas específicas. Esta hipótesis ha tomado fuerza después de observar tanto la consistencia, como la apariencia características de secreciones naturales como el néctar, la savia y la miel, cuyas propiedades físicas y el análisis cualitativo y estequiométrico de sus componentes (e.g. azúcares y/o aminoácidos) son muy similares a los descritos para NaDES formulados en laboratorio (Dai et al. 2013)

Los NaDES en las plantas.

Aunque la presencia de los NaDES en la naturaleza no está necesariamente limitada a las células vegetales, varios procesos fisiológicos que ocurren en las plantas, incluyendo la resistencia a factores abióticos como bajas temperaturas, estrés hídrico y la falta de luz, sugieren la existencia de otro tipo de líquido, además de agua, en las células (Choi et al. 2011). De esta forma, la presencia de NaDES dentro de las células vegetales puede explicar las altas concentraciones (hasta 30%) en las que se encuentran moléculas que suelen ser inestables y poco solubles en agua. Lo anterior sugiere que los NaDES podrían estar involucrados no solo en la estabilización, sino también en el almacenamiento de ciertos metabolitos (Jeong et al. 2017) (Bi et al. 2020) (Wikene, Bruzell, and Tønnesen 2015).

Las características fisicoquímicas de los NaDES permitirían establecer una red compleja de interacciones no covalentes bien

Artículos

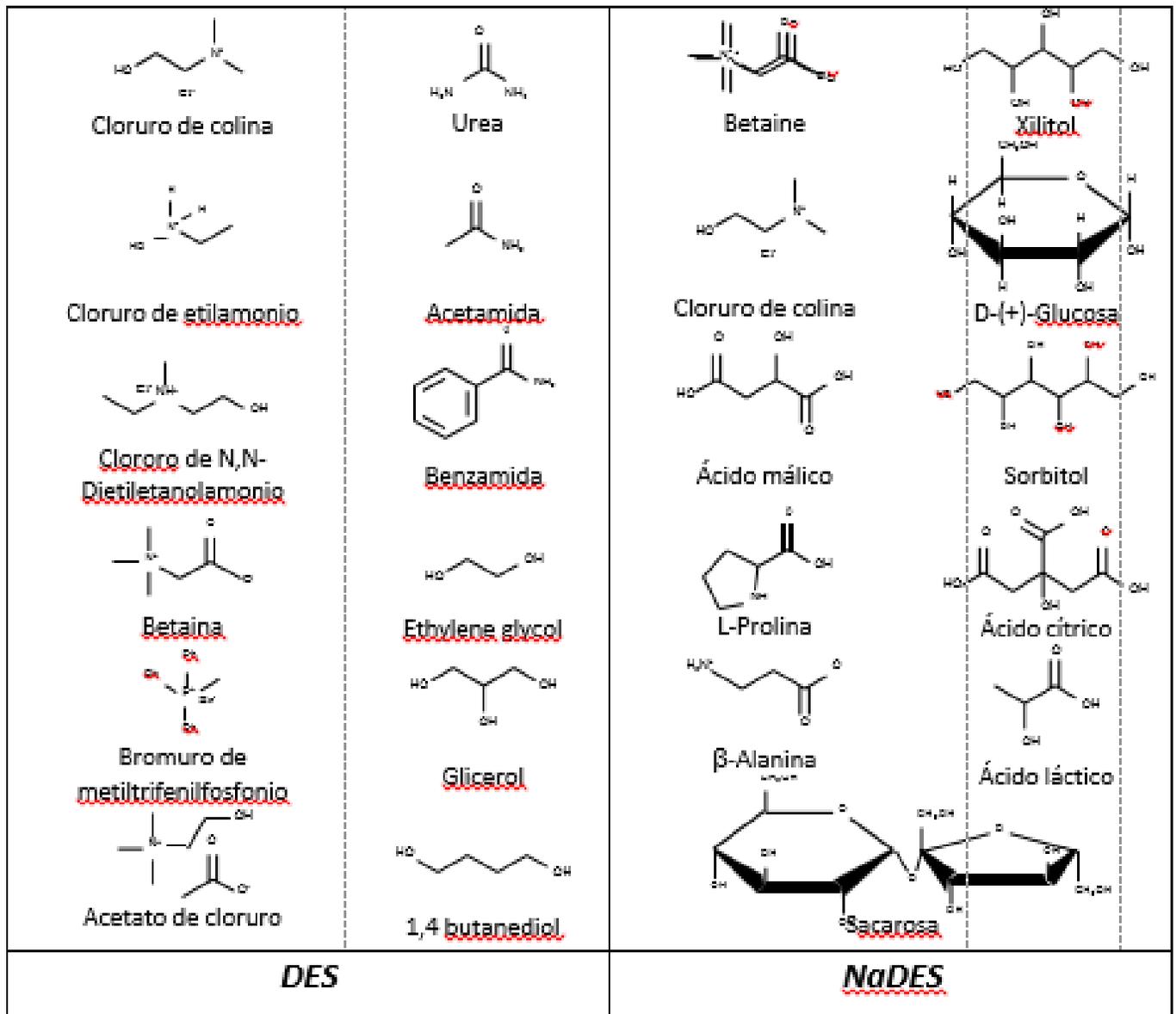


Figura 1. Compuestos comúnmente usados en la preparación de DES y NaDES

organizadas entre los metabolitos y los propios solventes (Verpoorte, Witkamp, and Choi 2021), dando como resultado una disminución en el movimiento de las moléculas, una reducción del contacto en las interfaces, e.g. con el oxígeno en el aire, y, como consecuencia, una menor degradación oxidativa. Los estudios de la solubilización de

pigmentos vegetales como cartamina, rutina, curcumina y algunas antocianinas, caracterizados por su inestabilidad y poca solubilidad en soluciones acuosas, demostraron que soluciones de los pigmentos en diferentes NaDES mostraron una mayor estabilidad aun bajo condiciones de estrés térmico y lumínico.

La presencia de puentes de hidrógeno entre las moléculas de interés y los componentes de los NaDES, detectados por espectrometría de masas y espectroscopia de FTIR (infrarrojo por transformada de Fourier), sugiere que estas interacciones permiten que las moléculas adopten una conformación específica, dando como resultado una mayor fotoestabilidad (Zhao et al. 2015) (Dai, Verpoorte, and Choi 2014) (Grillo et al. 2020) (Jeliński, Przybyłek, and Cysewski 2019). En este mismo sentido, otros estudios han demostrado también la capacidad de los NaDES para solubilizar algunas macromoléculas, entre las que destacan la lignina, proteínas y algunos polisacáridos (Choi et al. 2011)(Dai et al. 2015)(Škulcová et al. 2016)(Kist et al. 2021)(Vigier, Chatel, and Jérôme 2015). Tomando en cuenta lo anterior, la presencia de NaDES en las células vegetales puede explicar como es que algunos metabolitos secundarios de naturaleza lipofílica se biosintetizan dentro de las células vegetales compuestas principalmente por agua (70% w/w). Un ejemplo de lo anterior está dado por el alargamiento de la cadena de polisacáridos donde su disolución debe ocurrir antes de cristalizar o precipitar; en este caso, los NaDES contienen las enzimas y los precursores necesarios para que se produzca el alargamiento, en tanto que los cambios en la composición de los NaDES ponen fin a la biosíntesis (Ramón and Guillena 2019). Recientemente se ha reportado que enzimas como la lacasa son completamente solubles en NaDES, permaneciendo en su estado nativo y, por lo tanto, siendo capaces de catalizar reacciones enzimáticas (Tang and Ho 2013)(Durand et al. 2013). Derivado de estas observaciones, se ha sugerido que la savia de ciertas plantas carnívoras actúa como un NaDES formado por azúcares y polialcoholes, donde las enzimas hidrolíticas útiles para la digestión de los insectos podrían permanecer en su estado nativo (Durand et al. 2020).

Los NaDES como estrategia para explicar la tolerancia de las plantas al estrés abiótico

Las plantas se encuentran continuamente expuestas a estímulos ambientales que son determinantes para su crecimiento y desarrollo.

El déficit de agua es uno de los factores más comunes que provoca estrés en estos organismos y en casos extremos puede comprometer su supervivencia. Sin embargo, la tolerancia al estrés hídrico es un rasgo que existe en la mayoría de las plantas superiores, en tanto que algunas plantas se han adaptado a sobrevivir mediante fenómenos de resurrección (du Toit, Bentley, and Farrant 2021). Si bien estas adaptaciones involucran diferentes reacciones bioquímicas, aún no está claro como es que en etapas de deshidratación y sequía, donde el proceso de la fotosíntesis está limitado, algunas especies sobreviven permaneciendo en reposo hasta la rehidratación, tras lo cual el metabolismo se recupera rápidamente en los tejidos existentes.

Considerando que bajo condiciones de estrés hídrico el contenido de agua en las células vegetales puede reducirse hasta el 10%, los NaDES en la naturaleza podrían desempeñar un papel clave en la capacidad de estos organismos para resistir o aclimatarse a las duras condiciones ambientales, formando parte de un ambiente celular que proporcione estabilidad química, estructural y térmica, y que actúe con una capacidad amortiguadora de la célula y sus orgánulos durante la deshidratación.

Se ha reportado que, en especies tolerantes a diferentes tipos de estrés abiótico, los niveles de azúcares como la sacarosa y aminoácidos como la prolina, asociados con la protección y la estabilización celular en plantas bajo condiciones de estrés hídrico, aumentan considerablemente (du Toit, Bentley, and Farrant 2021), por lo que se ha sugerido que el agua en las células vegetales es reemplazada por componentes asociados en forma de NaDES (e.g. azúcares, aminoácidos y/o ácidos orgánicos), capaces de evitar la cristalización/congelación del agua al interior de las células (Durand et al. 2020). Esto permitiría estabilizar moléculas, enzimas y organelos, permitiendo mantener el estado nativo de las macromoléculas (Choi et al. 2011).

Esta teoría explica cómo es que, en los periodos de deshidratación y sequía, las plantas son capaces no solo de producir y acumular polifenoles, reconocidos por su

capacidad antioxidante y osmoprotectora para protegerse de posibles daños, también de movilizar este tipo de metabolitos en ambientes limitados en agua, manteniendo así su arquitectura molecular (Vanda, Verpoorte, and Klinkhamer 2020). Ejemplos de lo anterior incluyen a *Selaginella bryopteris*, *Sporobolus stapfianus* y *Xerophyta schlecteri*, entre otras especies, donde la concentración de metabolitos como azúcares (e.g. fructuosa, sacarosa, trehalosa), aminoácidos (e.g. prolina, glicina, -alanina) y ácidos orgánicos (e.g. ácido cítrico, ácido málico) no solo aumentó dramáticamente durante el proceso de resurrección (du Toit, Bentley, and Farrant 2021), sino que las proporciones molares de estos metabolitos fueron muy similares a aquellas utilizadas a nivel experimental para la formulación de NaDES (Van Spronsen, J., Witkamp, G. J., Hollman, F., Choi, Y. H., & Verpoorte 2011).

Además de lo mencionado hasta ahora, recientemente, y como consecuencia del estudio de la relación entre los NaDES y el estrés en plantas, se ha propuesto que los NaDES participan en la regulación del funcionamiento celular (Verpoorte, Witkamp, and Choi 2021), incluyendo la organización de nano o microdominios dentro de la célula, en la protección de enzimas o proteínas, “especialmente en situaciones de estrés como anhidrobiosis, alta temperatura, congelación y alta presión hidrostática”, en la promoción de reacciones bioquímicas de enzimas o proteínas incrustadas en membranas, en la estabilización de macromoléculas a través de interacciones agua-soluto o soluto-macromolécula, en el transporte y/o difusión de moléculas o fluidos a través de las membranas y en la conductividad de la célula vegetal. Aun cuando estas evidencias sugieren la posibilidad de que los NaDES puedan formarse dentro de las células, su ubicación no está definida. Sin embargo, la consistencia de algunos organelos ofrece alguna evidencia de cómo y donde podrían formarse, e.g. la composición química de las vacuolas vegetales que incluye sacarosa y ácido málico como sus principales componentes, además de agua. Adicionalmente, y considerando que una de las funciones de estos organelos es el almacenamiento de productos potencialmente tóxicos para la célula, la

presencia de los NaDES podría tener un rol crucial al incrementar la solubilidad de estos metabolitos, formando una capa en la membrana vacuolar interior o, alternativamente, formando un complejo con el compuesto tóxico que aumente su solubilidad en agua (Vanda, Verpoorte, and Klinkhamer 2020) (Ramón and Guillena 2019). Una evidencia adicional de que los NaDES podrían formarse en las vacuolas está dada por el hecho de que es justo en este organelo donde se acumulan importantes concentraciones de productos con actividad antioxidante cuando las plantas se enfrentan a condiciones de sequía, e.g. en el caso de *Myrothamnus flabellifolia*, el ácido 3,4,5-tri-O-galoylquinico, almacenado en las vacuolas, incrementa su concentración hasta en un 50% actuando como un potente amortiguador redox durante condiciones de sequía (Moore et al. 2004).

Por otra parte, la síntesis de antocianinas en plantas expuestas a condiciones de sequía y/o deshidratación también se ha relacionado con protección celular. Las antocianinas son pigmentos que se sintetizan en el citoplasma, cerca de la superficie exterior del retículo endoplásmico (RE), antes de que se reubiquen en vacuolas de almacenamiento y otros organelos. Dado que el nivel de antocianinas reportado en los antocianoplastos suele ser más alto del que permite su solubilidad en agua, se ha sugerido que el RE podría ser un NaDES con enzimas disueltas en el que los sustratos con polaridad media se disuelven preferentemente (Choi et al. 2011) (Vanda, Verpoorte, and Klinkhamer 2020).

Finalmente, dada la alta concentración de agua en las células y el hecho de que en ambientes con concentraciones mayores al 50% (v/v) de agua se produce la ruptura de la superestructura característica de los NaDES, surge la pregunta de cómo es que los NaDES pueden mantenerse. Recientemente se ha sugerido que los componentes capaces de asociarse para formar un NaDES, dentro de las células, podrían converger para interconectarse a escala nanométrica, formando una capa o un cúmulo líquido en diferentes formas o regiones celulares (Durand et al. 2020). Esta teoría se ajusta muy bien a pequeños organelos como los plástidos y las vesículas;

de hecho, estas últimas consisten en un líquido encerrado por una bicapa de fosfolípidos que tiene una composición similar a NaDES, involucrados en el transporte intercelular de metabolitos secundarios como alcaloides (Vanda, Verpoorte, and Klinkhamer 2020).

Evidentemente, y dado la elevada complejidad de los sistemas celulares, la evidencia obtenida hasta ahora es solo indirecta, por lo que comprobar que los NaDES realmente existen en las células resulta desafiante. Sin embargo, esta teoría ha abierto una nueva e interesante perspectiva, que ofrece una explicación atractiva para algunos fenómenos que ocurren a nivel celular, que de otro modo sería complicado de entender.

REFERENCIAS

Abbott, Andrew P et al. 2003. "Novel Solvent Properties of Choline Chloride / Urea Mixtures." *Chemical Communications* 1: 70–71.

Bi, Yanhong et al. 2020. "Highly Efficient Extraction of Mulberry Anthocyanins in Deep Eutectic Solvents: Insights of Degradation Kinetics and Stability Evaluation." *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 66(December 2019): 102512. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102512>.

Choi, Young Hae et al. 2011. "Are Natural Deep Eutectic Solvents the Missing Link in Understanding Cellular Metabolism and Physiology?" *Plant Physiology* 156(4): 1701–5.

Dai, Yuntao et al. 2013. "Natural Deep Eutectic Solvents as New Potential Media for Green Technology." *Analytica Chimica Acta* 766: 61–68. <http://www.elsevier.com/copyright>.

Dai, Yuntao, Robert Verpoorte, and Young hae Choi. 2014. "Natural DESs Providing Enhanced Stability of Natural Colorants from Safflower (*Carthamus Tinctorius*)." *Food Chemistry* 159: 116–21.

Dai, Yuntao, Geert Jan Witkamp, Robert Verpoorte, and Young Hae Choi. 2015.

"Tailoring Properties of Natural Deep Eutectic Solvents with Water to Facilitate Their Applications." *Food Chemistry* 187: 14–19. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.123>.

Durand, Erwann, Jérôme Lecomte, Bruno Baréa, and Pierre Villeneuve. 2013. "Towards a Better Understanding of How to Improve Lipase- Catalyzed Reactions Using Deep Eutectic Solvents Based on Choline Chloride." *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 115.

Durand, Erwann, Pierre Villeneuve, Claire Bourlieu-lacanal, and Frédéric Carrière. 2020. "Natural Deep Eutectic Solvents: Hypothesis for Their Possible Roles in Cellular Functions and Interaction with Membranes and Other Organized Biological Systems." *Advanced in Botanical Reserach*.

Grillo, Giorgio et al. 2020. "Deep Eutectic Solvents and Nonconventional Technologies for Blueberry-Peel Extraction: Kinetics, Anthocyanin Stability, and Antiproliferative Activity." *Antioxidants* 9(11): 1–28.

Jeliński, Tomasz, Maciej Przybyłek, and Piotr Cysewski. 2019. "Natural Deep Eutectic Solvents as Agents for Improving Solubility, Stability and Delivery of Curcumin." *Pharmaceutical Research* 36(116): 1–10.

Jeong, Kyung Min et al. 2017. "Multi-Functioning Deep Eutectic Solvents as Extraction and Storage Media for Bioactive Natural Products That Are Readily Applicable to Cosmetic Products." *Journal of Cleaner Production* 151: 87–95. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.03.038>.

Kist, Jennifer A., Hua Zhao, Katie R. Mitchell-Koch, and Gary A. Baker. 2021. "The Study and Application of Biomolecules in Deep Eutectic Solvents." *Journal of Materials Chemistry B* 9(3): 536–66.

Moore, John P. et al. 2004. "The Predominant Polyphenol in the Leaves of the Resurrection Plant *Myrothamnus Flabellifolius*, 3,4,5 Tri-O-Galloylquinic Acid, Protects Membranes against Desiccation and Free Radical-Induced Oxidation." *Biochemical Journal* 385(1): 301–8. <https://doi.org/10.1042/BJ20040499>.

Ramón, Diego J., and Gabriela Guillena, eds. 2019. *Deep Eutectic Solvents*. Weinheim, Germany: Copyright © 1999-2020 John Wiley & Sons, Inc. All rights reserved. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9783527818488>.

Ruesgas-Ramon, Mariana, Maria Cruz Figueroa-Espinoza, and Erwann Durand. 2017. "Application of Deep Eutectic Solvents (DES) for Phenolic Compounds Extraction: Overview, Challenges, and Opportunities." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65(18): 3591–3601. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jafc.7b01054>.

Škulcová, Andrea et al. 2016. "Deep Eutectic Solvents as Medium for Pretreatment of Biomass." *Key Engineering Materials* 688: 17–24.

Smith, Emma L., Andrew P. Abbott, and Karl S. Ryder. 2014. "Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications." *Chemical Reviews* 114(21): 11060–82.

Van Spronsen, J., Witkamp, G. J., Hollman, F., Choi, Y. H., & Verpoorte, R. 2011. "Process for Extracting Materials from Biological Material."

Tang, Baokun, and Kyung Ho. 2013. "Recent Developments in Deep Eutectic Solvents in Chemical Sciences." *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly* 144(10): 1427–54.

du Toit, S. Francois, Joanne Bentley, and Jill M. Farrant. 2021. "NADES Formation in Vegetative Desiccation Tolerance: Prospects and Challenges." *Advances in Botanical Research* 97(May 2021): 225–52.

Vanda, Henni, Robert Verpoorte, and Peter G L Klinkhamer. 2020. "Natural Deep Eutectic Solvents : From Their Discovery to Their Applications." In *Deep Eutectic Solvents: Synthesis, Properties, and Applications*, eds. Diego J. Ramón and Gabriela Guillena. , 61–81.

Verpoorte, Robert, Geert-Jan Witkamp, and Young Hae Choi, eds. 2021. *Eutectic Solvents and Stress in Plants*. Academic P. London, United Kingdom: Kruze, Zoe.

Vigier, Karine De Oliveira, Gregory Chatel, and François Jérôme. 2015. "Contribution of Deep Eutectic Solvents for Biomass Processing: Opportunities, Challenges, and Limitations." *ChemCatChem* 7(8): 1250–60.

Wikene, Kristine Opsvik, Ellen Bruzell, and Hanne Hjorth Tønnesen. 2015. "Characterization and Antimicrobial Phototoxicity of Curcumin Dissolved in Natural Deep Eutectic Solvents." *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 80: 26–32. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2015.09.013>.

Zhang, Qinghua, Karine De Oliveira Vigier, Sébastien Royer, and François Jérôme. 2012. "Deep Eutectic Solvents: Syntheses, Properties and Applications." *Chem. Soc. Rev.* 41(21): 7108–46. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22806597>.

Zhao, Bing Yi et al. 2015. "Biocompatible Deep Eutectic Solvents Based on Choline Chloride: Characterization and Application to the Extraction of Rutin from *Sophora Japonica*." *ACS Sustainable Chemistry and Engineering* 3(11): 2746–55.



www.smbb.com.mx