

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular**



**CATABOLISMO DE LOS  
POLIHIDROXIALCANOATOS EN LA BACTERIA  
DEPREDADORA "*BDELLOVIBRIO  
BACTERIOVORUS*": APLICACIONES  
BIOTECNOLÓGICAS Y DISEÑO DE NUEVOS  
SISTEMAS PARA LA EXTRACCIÓN DE  
BIOPLÁSTICO EN CULTIVOS BACTERIANOS**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

Virginia Martínez López

Bajo la dirección de la doctora

María Auxiliadora Prieto Jiménez

**Madrid, 2013**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



**CATABOLISMO DE LOS POLIHIDROXIALCANOATOS EN LA BACTERIA  
DEPREDADORA *Bdellovibrio bacteriovorus*: APLICACIONES  
BIOTECNOLÓGICAS Y DISEÑO DE NUEVOS SISTEMAS PARA LA  
EXTRACCIÓN DE BIOPLÁSTICO EN CULTIVOS BACTERIANOS**

TESIS DOCTORAL

**VIRGINIA MARTÍNEZ LÓPEZ**

DIRECTORA:

**MARÍA AUXILIADORA PRIETO JIMÉNEZ**

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS

**Madrid, 2012**



# ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>1. Bacterias depredadoras de bacterias</b>	3
1.1. <i>Bdellovibrio</i> y organismos similares (BALOs)	5
1.1.1. Ciclo de vida depredador de <i>Bdellovibrio bacteriovorus</i>	7
1.1.2. Cepas independientes de presa	11
1.2. Potencial terapéutico y biotecnológico de las bacterias depredadoras	14
<b>2. El papel del PHA en la fisiología microbiana</b>	15
2.1. Características generales de los polihidroxicanoatos (PHAs)	16
2.2. El ciclo del PHA: Síntesis y degradación de PHA	19
2.2.1. Síntesis de PHA	20
2.2.2. Degradación intracelular de PHA	23
2.2.3. Degradación extracelular de PHA	24
2.3. Función del PHA en la comunidad microbiana	27
<b>3. Producción industrial de PHA</b>	28
3.1. Aplicaciones de los PHAs	29
3.2. El proceso de producción de PHA	30
<b>II. OBJETIVOS</b>	33
<b>III. RESULTADOS</b>	37
<b>1. Identificación y caracterización de una nueva despolimerasa de mcl-PHA como parte del arsenal hidrolítico del depredador <i>B. bacteriovorus</i> HD100</b>	40

2. Mejora de la eficiencia biológica de <i>B. bacteriovorus</i> HD100 cuando preda sobre bacterias productoras de PHA	57
3. Autólisis celular controlada como sistema de procesamiento para la recuperación de mcl-PHA en <i>Pseudomonas putida</i> KT2440	85
<b>IV. DISCUSIÓN INTEGRADORA</b>	103
1. Importancia fisiológica de la degradación del PHA en <i>B. bacteriovorus</i> HD100	106
1.1. Producción de PhaZ <sub>Bd</sub> en el ciclo de vida depredador de <i>B. bacteriovorus</i> HD100	109
1.2. Influencia del contenido de PHA de la presa en la eficacia biológica de <i>B. bacteriovorus</i> HD100	110
2. Degradación periplásmica del PHA	113
3. Aplicaciones biotecnológicas: producción industrial de PHAs y de compuestos enantiopuros	118
3.1. Mejora de los sistemas de procesamiento de biomasa bacteriana para la producción industrial de PHA	119
3.2. Sistemas de producción de oligómeros y monómeros enantiopuros	123
<b>V. CONCLUSIONES</b>	126
<b>VI. BIBLIOGRAFÍA</b>	131
<b>ANEXOS</b>	157
1. The PHA Depolymerase Engineering Database: A systematic analysis tool for the diverse family of polyhydroxyalkanoate (PHA) depolymerases	159
2. Patente PCTES2010070858: Sistema de autólisis celular para el procesamiento de la biomasa bacteriana en la producción de polihidroxialcanoatos en <i>P. putida</i> KT2440	170
3. Patente 5120193/MAD: Procedimiento de fermentación para la producción de PHA y derivados que comprende la utilización de predadores bacterianos	175

## ABREVIATURAS

ACS 1	acil-CoA sintetasa 1
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosín nucleósido trifosfato
BALOs	<i>Bdellovibrio</i> y organismos similares ( <i>Bdellovibrio and like organisms</i> )
CAT	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
CoA	Coenzima A
DED	Base de datos de despolimerasas ( <i>PHA Depolymerase engineering database</i> )
EDTA	Etilendiaminotetraacetato
Ejh	Holina del fago EJ-1 de <i>Streptococcus pneumoniae</i>
Ejl	Enzima lítica del fago EJ-1 de <i>S. pneumoniae</i>
GAPs	Proteínas de unión a gránulo ( <i>granule associated proteins</i> )
GC	Cromatografía de gases
h	Hora
HI	Independiente de presa ( <i>host independent</i> )
kb	1000 pares de bases
kDa	1000 dalton
LB	Medio <i>Lysogeny Broth</i>
mcl-PHA	polihidroxialcanoato de cadena media ( <i>medium-chain length PHA</i> )
min	Minuto
NADP	Fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH(+H <sup>+</sup> )	Fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido reducido

## Abreviaturas

---

ORF	<i>Open reading frame</i>
pb	Pares de bases
PHA	Polihidroxialcanoato
PhaC1	Polimerasa de PHA
PhaZ <sub>Bd</sub>	Despolimerasa de mcl-PHA de <i>B. bacteriovorus</i> HD100
PhaZ <sub>GK13</sub>	Despolimerasa de mcl-PHA de <i>Pseudomonas fluorescens</i> GK13
PhaZ <sub>KT</sub>	Despolimerasa de mcl-PHA de <i>Pseudomonas putida</i> KT2442
PHB	Polihidroxi butirato
P(HO-co-HH)	Poli-3-(hidroxioctanoato-co-hidroxi hexanoato)
RHA	( <i>R</i> )-3-hidroxiácido
RHA-CoA	( <i>R</i> )-3-hidroxiacil-CoA
scl-PHA	Polihidroxialcanoato de cadena corta ( <i>short-chain length</i> PHA)
SDS	Sodium dodecil sulfato



# I. INTRODUCCIÓN



## 1. Bacterias depredadoras de bacterias

La depredación es un tipo de interacción biológica en la que un individuo (el depredador) se alimenta de otro (la presa) para subsistir. Se trata de un tipo de relación interespecífica, es decir, que se da entre organismos de distintas especies, muy común en la naturaleza, incluyendo también el mundo microbiano. Dentro de este último, la depredación bacteriana es un modo de interacción según el cual un organismo depredador ataca y consume a una bacteria presa. Esta relación resulta interesante tanto desde un punto de vista ecológico como evolutivo, ya que las interacciones entre organismos han jugado un papel fundamental en la diversificación y organización de la vida (Thompson, 1999). Además, los microorganismos (bacterias y arqueas) están involucrados en todos los ciclos biogeoquímicos, por lo que el impacto de la depredación en la estructura y función de las comunidades bacterianas, su biodiversidad y la dinámica poblacional es de vital importancia (Jurgens, 2007; Jurkevitch y Davidov, 2007).

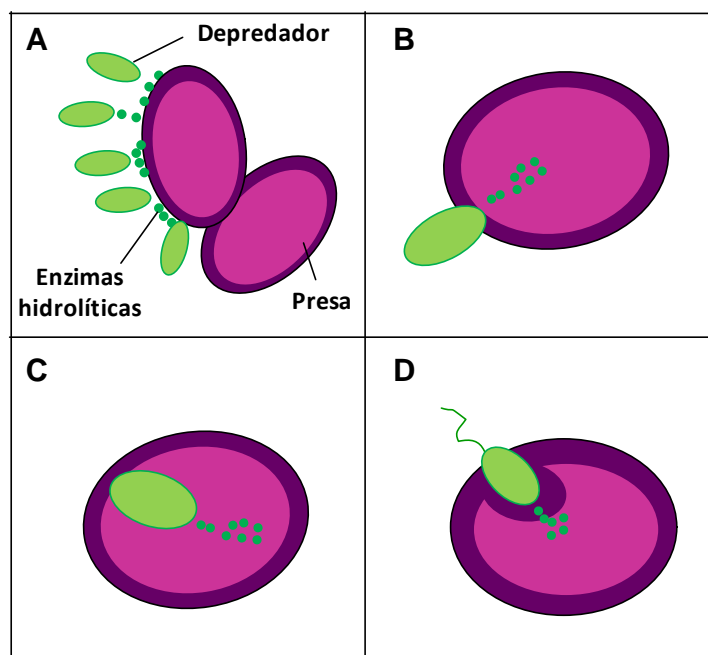
Los principales grupos de depredadores de bacterias que se conocen son los metazoos, los protistas, las bacterias depredadoras y los bacteriófagos (Jurgens, 2007). En general, los dos primeros están formados por organismos eucariotas fagotróficos que engloban en su interior la bacteria presa, mientras que los dos segundos penetran y se multiplican en el interior de la misma.

Las bacterias depredadoras de otras bacterias poseen una amplia distribución en la naturaleza, tanto en hábitats terrestres como acuáticos, incluyendo ambientes extremos (Pineiro *et al.*, 2004) o anaerobios (Guerrero *et al.*, 1986). Este tipo de bacterias muestran diferentes fenotipos y adaptaciones metabólicas, pudiendo ser depredadores obligados (incapaces de replicar en ausencia de presa) o facultativos (no dependientes de la presencia de una presa). Además, estas bacterias depredadoras utilizan diversas estrategias de depredación (Figura 1) (Martin, 2002), las cuales se pueden clasificar, en función de su interacción con la presa, de la siguiente manera:

- **A) Depredación en grupo**, llevada a cabo por depredadores facultativos, mediante la secreción de enzimas hidrolíticas al medio extracelular, degradando así las bacterias cercanas. A diferencia de los demás tipos de

depredación, no requiere interacciones célula-célula. Ejemplos: *Myxococcus* y *Lysobacter* (Dworkin, 1999; Jurkevitch y Davidov, 2007).

- **B) Depredación epibiótica**, en la que el depredador permanece anclado a la pared de la célula presa, desde donde degrada sus componentes a medida que crece y se divide por fisión binaria. Ejemplos: depredadores obligados como *Vampirococcus* (Guerrero *et al.*, 1986) y *Micavibrio* (Davidov *et al.*, 2006).
- **C) Invasión citoplásmica o diacitosis**, en la que el depredador crece y se divide en el citoplasma de la presa. Este tipo de depredación ha sido únicamente descrito en *Daptobacter*, un depredador anaeróbico facultativo que crece sobre especies de *Chromatium* (Guerrero *et al.*, 1986).
- **D) Depredación periplásmica**, en la que los depredadores invaden el espacio periplásmico de la presa, donde se establecen y degradan el contenido intracelular mientras crecen y se dividen. Esta estrategia de invasión periplásmica es característica del grupo de depredadores obligados denominado *Bdellovibrio* y organismos similares (BALOs, “*Bdellovibrio* and like organisms”), que constituye el grupo de bacterias depredadoras mejor estudiado hasta la fecha (Jurkevitch y Davidov, 2007).



**Figura 1. Estrategias de depredación de las bacterias depredadoras. A) Depredación en grupo. B) Depredación epibiótica. C) Invasión citoplásmica. D) Depredación periplásmica.**

A pesar de las evidentes diferencias entre los cuatro tipos de depredación descritos, los límites entre ellos son bastante difusos, ya que un mismo microorganismo puede compaginar más de una estrategia de depredación (Jurkevitch y Davidov, 2007). Además, algunas cepas de *Bdellovibrio* desarrollan una depredación de tipo epibiótica en vez de periplásmica, y se mantienen ancladas a la membrana externa de la presa mientras se dividen por fisión binaria, como por ejemplo *Bdellovibrio* sp. JSS (Koval y Hynes, 1991).

Evolutivamente, se ha sugerido que la depredación entre bacterias está ligada a la simbiosis y al origen de la célula eucariota. La Teoría Endosimbiótica Seriada propuesta por Lynn Margulis hace más de cuatro décadas (Margulis, 1970) describe la aparición de las células eucariotas como consecuencia de la sucesiva incorporación estable de diferentes bacterias de vida libre. Una de las mayores críticas al origen de la mitocondria y los orgánulos eucariotas mediante procesos de simbiosis entre procariontes era la ausencia de mecanismos de incorporación de células, tipo fagocitosis, en estos últimos. Sin embargo, la localización periplásmica de *Bdellovibrio* o la citoplásmica de *Daptobacter*, indican el potencial bacteriano para penetrar en otras bacterias, proponiendo la depredación bacteriana como parte fundamental del proceso de la evolución de la célula eucariota (Guerrero *et al.*, 1986; Davidov y Jurkevitch, 2009).

### **1.1. *Bdellovibrio* y organismos similares (BALOs)**

Los depredadores procariontes se conocen desde la década de los sesenta, cuando se descubrió y aisló por primera vez *Bdellovibrio* (Stolp y Starr, 1963). El grupo de los BALOs está formado por bacilos curvados Gram-negativos de pequeño tamaño, aeróbicos y altamente móviles, depredadores obligados de otras bacterias Gram negativas. Fueron aislados por primera vez a partir de muestras de suelo (Stolp y Starr, 1963) pero son ubicuos en la naturaleza, habiendo sido encontrados tanto en ambientes acuáticos como terrestres, incluyendo ambientes hipersalinos (Pineiro *et al.*, 2004) y biofilms (Kadouri y O'Toole, 2005), así como en heces de mamíferos (Kelley *et al.*, 1997; Schwudke *et al.*, 2001). Hasta la fecha, las presas empleadas para aislar y

caracterizar *Bdellovibrio* pertenecen exclusivamente al filo Proteobacteria, siendo principalmente *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp., y *Erwinia* spp. para hábitats terrestres y de agua dulce, y *Vibrio parahaemolyticus* para hábitats marinos (Jurkevitch y Davidov, 2007). Dependiendo de la cepa empleada como presa, la eficiencia de la depredación es diferente; de hecho, se ha determinado que en poblaciones de presas heterogéneas, *Bdellovibrio* infecta unas presas más eficientemente que otras (Rogosky et al., 2006). En la Tabla 1 se muestra un análisis del rango de presas de nuevos *Bdellovibrios* aislados de suelo y rizosfera, y de la cepa *B. bacteriovorus* 109J (Jurkevitch et al., 2000).

La mayoría de los BALOS pertenecen a la clase de las delta proteobacterias, dentro del orden *Bdellovibrionales*, el cual comprende dos familias diferentes: *Bdellovibrionaceae* y *Bacteriovoraceae* (Davidov y Jurkevitch, 2004). Una excepción es un miembro del grupo de los BALOs denominado *Micavibrio* spp., que ha sido clasificado como alfa proteobacteria (Davidov et al., 2006).

**Tabla 1. Rango de presa de las cepas de *Bdellovibrio* BEP2, BRP4, SRP1, TRA2 y 109J.** Adaptada de (Jurkevitch et al., 2000).

<b>Presa</b>	<b>BEP2</b>	<b>BRP4</b>	<b>SRP1</b>	<b>TRA2</b>	<b>109J</b>
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58	–	–	–	+	–
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> IDI	+	+	–	–	–
<i>Azospirillum brasilense</i>	–	–	–	–	–
<i>Bacillus megaterium</i>	–	–	–	–	–
<i>Chromobacterium violaceum</i>	+	+	+	–	+
<i>Enterobacter agglomerans</i>	+	+	–	+	+
<i>Erwinia amylovora</i>	+	+	–	–	–
<i>Erwinia carotova</i> subsp. <i>carotova</i> 24	+	+	–	–	+
<i>Erwinia carotova</i> subsp. <i>carotova</i> 2	–	–	–	–	–
<i>E. coli</i>	+	+	–	–	+
<i>Pseudomonas corrugata</i>	+	+	+	–	+

---

<i>Pseudomonas maltophilia</i>	-	-	-	-	+
<i>P. putida</i>	-	-	+	-	+
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato	+	+	+	-	+
<i>Rhizobium cicer</i>	-	-	+	-	+
<i>Rhizobium etli</i>	-	-	-	+	-
<i>Rhizobium tropici</i>	-	-	-	+	-
<i>Sinorhizobium melitoli</i> Rm41	-	-	-	+	-
<i>Sinorhizobium melitoli</i> AK 631	-	-	-	+	-
<i>Serratia marcescens</i>	-	-	-	-	+
<i>Vibrio fluvialis</i>	-	-	-	-	-
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. vesicatoria	+	+	+	-	-

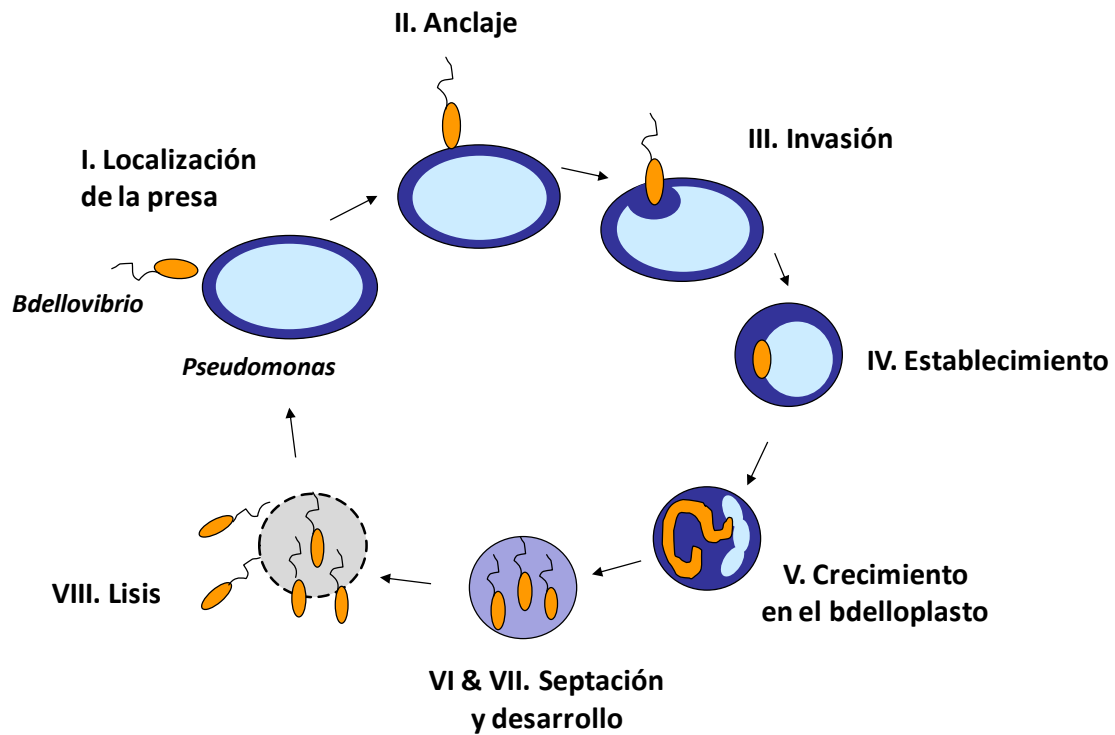
---

### 1.1.1. Ciclo de vida depredador de *Bdellovibrio bacteriovorus*

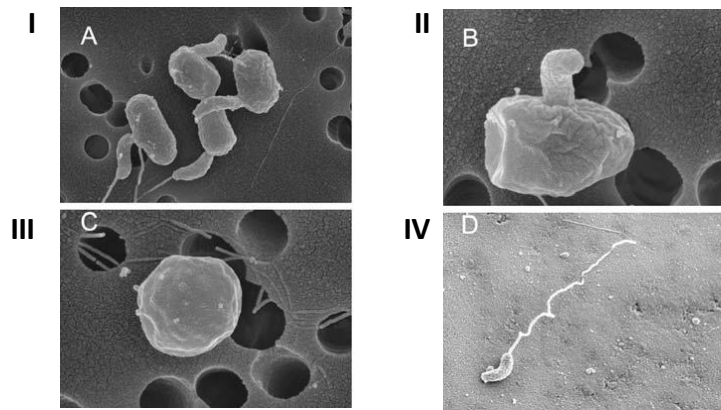
Los BALOs presentan un ciclo de vida dimórfico, que alterna entre una fase extracelular móvil no reproductiva y una fase de crecimiento intraperiplásmica en el interior de otras bacterias Gram-negativas. Dentro de este grupo de bacterias depredadoras, la cepa *B. bacteriovorus* HD100 es el miembro mejor caracterizado así como el único del género *Bdellovibrio* en ser secuenciado (Rendulic *et al.*, 2004). Debido a que esta Tesis Doctoral se centra en el estudio de *B. bacteriovorus* HD100, a continuación se describe de manera detallada el peculiar ciclo de vida de esta bacteria depredadora.

El ciclo de vida predador de *B. bacteriovorus* en una típica célula presa consta de dos fases de crecimiento bien diferenciadas: una fase de vida móvil no reproductiva denominada fase de ataque, y una fase de crecimiento en la cual *Bdellovibrio* penetra en el periplasma de la bacteria presa donde crece, replica su ADN y se divide en células individuales. Finalmente, el proceso de multiplicación culmina con la lisis del huésped y la consecuente liberación los nuevos *Bdellovibrios* al medio extracelular para atacar futuras presas. Su ciclo de vida se detalla en la siguiente figura (Figura 2).

A



B



**Figura 2. Ciclo de vida de *B. bacteriovorus* HD100.** A) Representación esquemática de las fases del ciclo de vida de *Bdellovibrio* en una típica célula presa: I) Localización de la presa: *Bdellovibrio* es impulsado hacia la célula mediante movilidad flagelar y quimiotaxis; II) Anclaje: *Bdellovibrio* colisiona con la célula huésped; III) Invasión: la movilidad flagelar desaparece según *Bdellovibrio* entra en el periplasma de su presa; IV) Establecimiento: la bacteria depredadora se estabiliza en el periplasma del huésped; V) Crecimiento en el bdelloplasto: la presa se va redondeando debido a la modificación de la pared celular y *Bdellovibrio* continúa creciendo en el periplasma y replica su ADN. VI) Septación: *Bdellovibrio* detecta que el citoplasma de la presa está exhausto, y se divide en células individuales. VII) Desarrollo: *Bdellovibrio* sintetiza el flagelo, que le permite nadar en el bdelloplasto. VIII) Lisis: la membrana celular de la presa se rompe y los nuevos *Bdellovibrios* se liberan para atacar futuras presas. El proceso completo de multiplicación de *Bdellovibrio* conlleva una media de 4 h. B) Micrografías electrónicas de las

fases del ciclo de vida de *B. bacteriovorus* HD100 empleando *E. coli* K12 como presa: I) Anclaje de las células de *Bdellovibrio* a la bacteria presa; II) Penetración en la presa; III) Bdelloplastos conteniendo *Bdellovibrio* creciendo en su interior; IV) Célula de *Bdellovibrio* liberada tras la lisis de la bacteria presa. Adaptado de (Strauch *et al.*, 2007).

Los *Bdellovibrios* en fase de ataque no se pueden replicar de manera autónoma, y para ello deben encontrar e infectar una célula huésped. En esta fase, la célula de *Bdellovibrio* es de pequeño tamaño (0,2 a 0,5  $\mu\text{m}$ ) y presenta un único flagelo polar envainado que rige el movimiento natatorio, permitiéndole alcanzar velocidades de unas  $60 \mu\text{m s}^{-1}$  (Lambert *et al.*, 2012). Cabe resaltar, que a pesar de su pequeño tamaño, *B. bacteriovorus* HD100 posee un genoma de 3,78 Mb, el cual codifica potencialmente 3.584 proteínas, y carece de plásmidos (Rendulic *et al.*, 2004). En esta fase de ataque se desconoce qué tipo de señales pueden atraer a las células de *Bdellovibrio* hacia regiones con alta densidad de células presa. La ausencia de genes relacionados con el mecanismo de “quorum sensing” en el genoma de *B. bacteriovorus* HD100 (Rendulic *et al.*, 2004), indica la falta de respuesta frente a la acumulación de moléculas señal generadas por poblaciones de la presa. Sin embargo, se ha sugerido la existencia de procesos de quimiotaxis frente a oxígeno y aminoácidos (Straley y Conti, 1974; LaMarre *et al.*, 1977; Straley *et al.*, 1979). Algunos autores han encontrado que la interrupción del gen codificante de una proteína quimiotáctica aceptora de metilo (MCP) en la cepa *B. bacteriovorus* 109J disminuye la eficiencia en la depredación (Lambert *et al.*, 2003). Estas observaciones indican que *Bdellovibrio* puede dirigir su movimiento hacia regiones con alta densidad de células presa.

El anclaje al huésped tiene lugar por el extremo no flagelado y es un proceso reversible, en el que la célula de *Bdellovibrio* es capaz de liberarse de nuevo. Sin embargo, tras un proceso de “reconocimiento” que lleva unos minutos, el anclaje se hace irreversible quedando firmemente unido a la célula huésped. *Bdellovibrio* provoca la formación de un pequeño poro en la membrana externa de la presa (Fenton *et al.*, 2010) a través del cual penetra en el espacio periplásmico de la misma. La penetración en la célula presa requiere una gran acción enzimática por parte del depredador, el cual en un primer momento libera principalmente peptidasas y glicanasas encargadas de degradar el peptidoglicano (Thomashow y Rittenberg, 1978a;

1978b). Son numerosos los trabajos que demuestran la implicación de las fibras del pili del depredador en estos procesos de anclaje y penetración en la presa (Evans *et al.*, 2007; Lambert *et al.*, 2008; Mahmoud y Koval, 2010).

Una vez dentro de la presa, la pared celular de la misma se deteriora debido a la actividad hidrolítica de *Bdellovibrio*, el cual se establece en el espacio periplásmico formando el bdelloplasto, una estructura esférica y osmóticamente estable limitada por la membrana externa de la presa. A partir de esta etapa, la fase de crecimiento del depredador se hace más evidente ya que la célula de *Bdellovibrio* se elonga formando una larga estructura espiral, y el ADN se replica múltiples veces. Aunque la membrana citoplásmica de la presa no es atravesada por el depredador, se hace porosa y permite el escape de constituyentes celulares. *Bdellovibrio* secreta nucleasas para hidrolizar el ADN (Matin y Rittenberg, 1972; Rosson y Rittenberg, 1979) y el ARN (Hespell y Odelson, 1978). Esta actividad hidrolítica permite al depredador crecer a partir de la presa con valores de  $Y_{ATP}$  (rendimiento de masa celular, en gramos de peso seco, por mol de ATP) superiores al de la mayoría de bacterias. Esta eficiencia se debe en parte a la capacidad de *Bdellovibrio* para asimilar los nucleótidos de la presa conservando los enlaces fosfato ricos en energía (Rittenberg y Hespell, 1975). *Bdellovibrio* también es capaz de asimilar los ácidos grasos de la presa, incorporando algunos directamente a lípidos (Kuenen y Rittenberg, 1975). Carece de capacidad para catabolizar carbohidratos y presenta numerosas deficiencias en las rutas metabólicas de aminoácidos, pero es un organismo fuertemente proteolítico capaz de utilizar péptidos y aminoácidos de la presa como fuente de carbono y energía (Rendulic *et al.*, 2004). En la etapa final del ciclo de crecimiento, la célula de *Bdellovibrio* se divide por fisión múltiple dando lugar a las células hijas, generalmente entre 5 y 8, dependiendo del tamaño celular del huésped (Kessel y Shilo, 1976). Por último, se sintetizan los flagelos de las células hijas y se lisan los restos de la pared celular de la presa, liberando de esta manera los nuevos *Bdellovibrios* en fase de ataque al medio ambiente en búsqueda de nuevas presas (Lambert *et al.*, 2006b). A pesar de que el crecimiento de *Bdellovibrio* culmina con la lisis celular de la presa, cabe resaltar que una pequeña población residual de la misma siempre permanece intacta. Por el momento, no se ha encontrado ninguna mutación determinada que induzca el desarrollo de resistencias

en la presa aunque sí se han descrito cambios fenotípicos que provocan una resistencia de tipo reversible a la depredación (Shemesh y Jurkevitch, 2004).

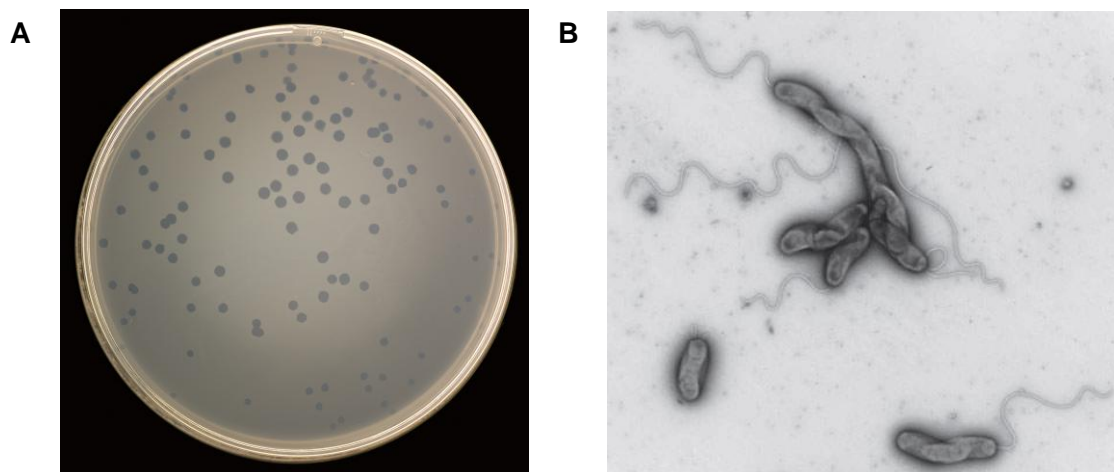
En líneas generales, *Bdellovibrio* exhibe un metabolismo extremadamente eficaz, dependiente de la degradación programada y gradual de los contenidos de la presa. Como se ha detallado, emplea estrategias diversas para preda eficientemente, tales como quimiotaxis, movilidad, adhesión y un arsenal hidrolítico que utiliza en tres estados diferentes de su ciclo de vida: la entrada en la bacteria presa, la degradación de polímeros y componentes celulares, y la salida del bdelloplasto. Según ha revelado el análisis genómico de esta bacteria depredadora, además de numerosas enzimas hidrolíticas (20 genes codifican DNAasas, 9 RNAasas, 15 lipasas, 10 glucanasas, al menos 150 peptidasas y proteasas y 89 genes hidrolíticos más), posee múltiples copias de genes que codifican proteínas de la membrana externa, de los pili y del flagelo, además de gran cantidad de sistemas de transporte (empleados para transportar los sustratos desde el citoplasma de la presa a la célula de *Bdellovibrio*) y sistemas de secreción (exclusivamente de tipo I y II) (Rendulic *et al.*, 2004).

El estilo de vida único que muestra *Bdellovibrio* ha despertado el interés de la comunidad científica por su relevancia a la hora de desentrañar la fisiología y el metabolismo de las bacterias depredadoras, así como por el papel que ejercen en las comunidades bacterianas y en los procesos evolutivos. Asimismo, el estudio de esta bacteria depredadora resulta interesante debido a sus posibles aplicaciones terapéuticas (ver apartado 1.2. “Potencial biotecnológico de las bacterias depredadoras” de la *Introducción*).

### **1.1.2. Cepas independientes de presa**

A pesar de que los BALOs son depredadores obligados, en el laboratorio se pueden aislar cepas mutantes independientes de presa (cepas HI). La mayoría de las cepas HI son facultativas y mantienen la capacidad de invadir otras bacterias, aunque las placas de lisis resultantes son más turbias y de menor tamaño. Las cepas HI exhiben una amplia diversidad de fenotipos en cuanto a características morfológicas y fisiológicas (Figura 3). Curiosamente, el ciclo de vida de estos mutantes crecidos en ausencia de presa mantiene el patrón de crecimiento característico de los BALOs

silvestres, con una fase de crecimiento filamentososa seguida de una división por fisión múltiple y diferenciación de las células hijas (Barel y Jurkevitch, 2001; Medina y Kadouri, 2009). Por todo ello, los mutantes HI resultan modelos atractivos para utilizar en el laboratorio y evitar así las complicaciones vinculadas a los co-cultivos de los BALOs silvestres con las correspondientes cepas presa.



**Figura 3. Crecimiento de *B. bacteriovorus* en el laboratorio. A)** Crecimiento de la cepa silvestre de *B. bacteriovorus* HD100 sobre una superficie cubierta de células presa (*P. putida* KT2442) (esta Tesis). Las placas de lisis formadas son, en apariencia, semejantes a las producidas por una infección de bacteriófagos. **B)** Cepas mutantes de *Bdellovibrio* independientes de presa creciendo de manera axénica. En la imagen se aprecia la diferente morfología que presentan estas células HI. Adaptado de (Sockett, 2009).

Cabe destacar el primer trabajo en el que se identificó la zona del genoma de *Bdellovibrio* involucrada en la transformación de cepas silvestres en cepas HI, y que los autores designaron *locus hit* (*host-interaction*) (Cotter y Thomashow, 1992b). En paralelo, estos mismo autores desarrollaron el primer protocolo de conjugación diseñado para transferir ADN de *E. coli* a *Bdellovibrio* (Cotter y Thomashow, 1992a). Mediante esta técnica, comprobaron que la complementación de los mutantes HI con el gen *hit* salvaje restauraba la capacidad de formar grandes placas de lisis (Cotter y Thomashow, 1992a). En función de la frecuencia de obtención de los mutantes HI, se clasifican en: (i) mutantes de tipo I: se obtienen sólo cuando el medio es suplementado con extractos celulares (crecimiento saprófito) y la frecuencia de aparición es elevada;

y (ii) mutantes de tipo II: son capaces de crecer en medios ricos sin necesidad de extractos celulares (crecimiento axénico) y su frecuencia de aparición es menor (Thomashow y Cotter, 1992b). Sin embargo, análisis posteriores de mutantes HI han demostrado que algunos de ellos no presentan mutaciones en el gen *hit* (Barel y Jurkevitch, 2001; Medina *et al.*, 2008). Por tanto, la mutación del gen *hit* no es esencial, aunque muchas de las cepas HI aisladas tienden a adquirirla, quizás como un mecanismo para establecer un crecimiento en ausencia de presa más robusto. Por otro lado, la secuenciación del genoma de *B. bacteriovorus* HD100 ha localizado el gen *hit* formando parte del *cluster* génico responsable de la formación del pili tipo IV (crucial en los procesos de anclaje e invasión), aunque aún no se ha podido asignar ninguna función concreta a este *locus* (Rendulic *et al.*, 2004; Schwudke *et al.*, 2005).

Muchas de las nuevas investigaciones actuales buscan resolver las incógnitas que plantea el proceso de la independencia de presa, el cual no se ha esclarecido completamente aún. En este sentido, se están llevando a cabo análisis transcripcionales comparativos entre cepas salvajes y cepas HI (Lambert *et al.*, 2010) o la secuenciación de genomas de mutantes HI (Wurtzel *et al.*, 2010; Roschanski *et al.*, 2011). Por otro lado, las deficiencias metabólicas de los BALOs hacen suponer que en la naturaleza el crecimiento dependiente de presa sea más abundante que el axénico. La existencia de cepas HI en el medio ambiente parece ser ventajosa únicamente en el caso de que esta capacidad de crecer en ausencia de presa sea reversible, puesto que co-cultivos de *Bdellovibrios* silvestres y *Bdellovibrios* HI con bacterias presa conlleva siempre a la eliminación de las cepas HI (Varon y Shilo 1980; Strauch *et al.*, 2007).

El trabajo pionero de Cotter y Thomashow (1992a,b) permitió el desarrollo de nuevas técnicas para la manipulación genética de *Bdellovibrio*, tales como la construcción de mutantes *knock out*, mediante el uso de plásmidos suicidas incapaces de replicar en el depredador (plásmidos del grupo IncQ). Esta técnica de mutagénesis se ha empleado para identificar los genes implicados en la interacción depredador-presa, concluyendo, por ejemplo, que mutaciones que afectan a la movilidad, penetración o quimiotaxis de *Bdellovibrio* influyen en su interacción con la presa (Lambert *et al.*, 2003; Lambert *et al.*, 2006b; Medina *et al.*, 2008; Tudor *et al.*, 2008; Lambert *et al.*, 2011). En la Tabla 2 figuran los principales plásmidos utilizados hasta la

fecha para la generación de mutantes en *Bdellovibrio*. Estas técnicas junto con técnicas de proteómica (Dori-Bachash *et al.*, 2008) y el análisis de genomas (Rendulic *et al.*, 2004; Wurtzel *et al.*, 2010) están permitiendo en la actualidad el estudio de *Bdellovibrio* a un nivel molecular.

**Tabla 2. Plásmidos empleados en la literatura para la manipulación genética de *Bdellovibrio*.**

Plásmido	Origen de replicación	Referencias
pSET151 (6,2 kb)	ori pMB1	Bierman <i>et al.</i> , 1992; Lambert <i>et al.</i> , 2003
pSSK10 (6,4 kb)	ori R6K	Steyert y Pineiro, 2007
pMMB206 (9,3 kb)	ori RSF1010	Morales <i>et al.</i> , 1991; Steyert y Pineiro, 2007
pRL27 (4 kb)	ori R6K	Larsen <i>et al.</i> , 2002; Tudor <i>et al.</i> , 2008
pSUP202 (7,8 kb)	ori RSF1010	Roschanski y Strauch, 2010
pK18 <i>mobsacB</i> (5,7 kb)	ori ColE1	Schafer <i>et al.</i> , 1994; Roschanski <i>et al.</i> , 2011

## 1.2. Potencial terapéutico y biotecnológico de las bacterias depredadoras

*Bdellovibrio* puede reducir poblaciones bacterianas rápidamente (incluyendo patógenos de humanos y animales), convirtiéndose así en un candidato interesante para potenciales aplicaciones terapéuticas; de hecho ha sido denominado “el antibiótico vivo” (Sockett y Lambert, 2004). A diferencia de los antibióticos, las cepas bacterianas encapsuladas y los *biofilms* no constituyen un obstáculo para el ataque de *Bdellovibrio* (Koval y Bayer, 1997; Kadouri y O'Toole, 2005). El uso de este depredador para minimizar poblaciones microbianas se vislumbra como una técnica terapéutica factible ya que no invade células de mamíferos, y de hecho ha sido aislado de heces humanas, indicando su presencia en el intestino (Schwudke *et al.*, 2001). En consecuencia, *Bdellovibrio* se propone como un potencial agente terapéutico

antibiótico y probiótico (Sockett y Lambert, 2004; Dwidar *et al.*, 2012). Recientemente, un estudio liderado por Elizabeth Sockett ha demostrado por primera vez la aplicación de *Bdellovibrio* como agente terapéutico en aves de corral infectadas por *Salmonella enterica* (Atterbury *et al.*, 2011).

Además de aplicaciones terapéuticas, otros trabajos han demostrado su posible utilidad en la industria alimentaria, reduciendo la contaminación bacteriana en las maquinarias empleadas (Fratamico y Cooke, 1996) o en la agricultura, como agentes de biocontrol (Scherff, 1973). Además, tal y como se ha indicado anteriormente, el análisis genómico de *B. bacteriovorus* HD100 ha revelado el complejo repertorio de enzimas hidrolíticas de esta bacteria (Rendulic *et al.*, 2004). *Bdellovibrio* constituye, por tanto, un amplio reservorio de enzimas diferentes y de interés industrial por sus potenciales aplicaciones biotecnológicas (Jurkevitch y Davidov, 2007). En este sentido, uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral ha sido la caracterización de una nueva despolimerasa de PHA en *B. bacteriovorus* HD100 de gran interés en el sector industrial. Además, el conocimiento derivado del estudio de esta despolimerasa a largo del ciclo de vida depredador de *Bdellovibrio* ha permitido el desarrollo de diversas estrategias novedosas para el uso de esta bacteria depredadora como herramienta biotecnológica en la producción industrial de PHAs y derivados enantiopuros. Sobre la base de estos objetivos, a continuación se describen de manera detallada los PHAs y su papel en la fisiología microbiana.

## **2. El papel del PHA en la fisiología microbiana**

Los PHAs constituyen una familia de poliésteres biodegradables y biocompatibles, sintetizados de forma natural por una gran variedad de microorganismos en condiciones de desequilibrio nutricional. Estos biopolímeros se acumulan en forma de gránulos de reserva y están compuestos de ácidos (*R*)-3-hidroxicarboxílicos (RHAs). En condiciones ambientales favorables, pueden ser degradados a los correspondientes monómeros u oligómeros, que son empleados como fuente de carbono y energía. Dependiendo del organismo, la producción de PHA

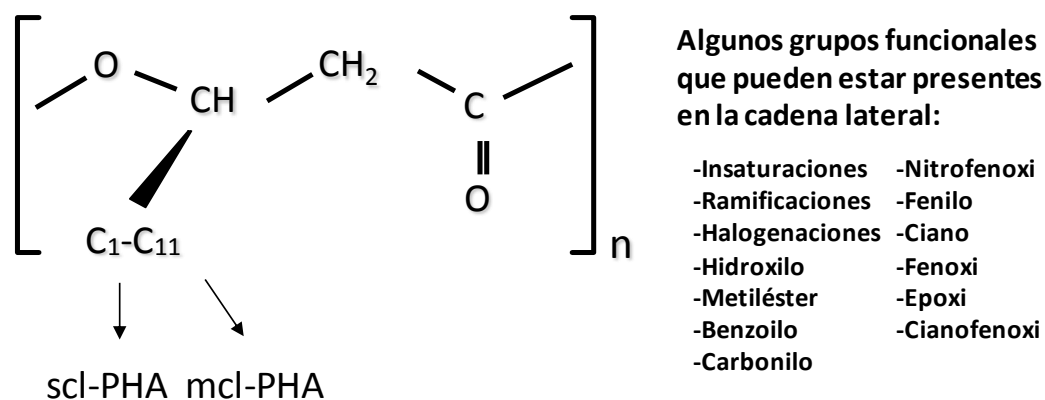
puede alcanzar niveles de hasta el 90% del peso seco de la célula (revisado en Madison y Huisman, 1999; Jendrossek y Handrick, 2002; Luengo *et al.*, 2003; Prieto *et al.*, 2007).

Además del interés derivado de su aplicación industrial como bioplásticos (ver apartado 4. “Producción industrial de PHA” de la *Introducción*), los PHAs han despertado interés debido a su importancia a la hora de dilucidar la fisiología celular y el metabolismo microbiano. La capacidad para sintetizar y/o catabolizar PHA se ha descrito en especies de los tres grandes dominios de la vida: arqueas, bacterias y eucariotas, incluyendo organismos metabólicamente muy diversos (p. ej., aerobios, anaeróbios, fotosintetizadores) y presentes en una gran variedad de nichos ecológicos, con diferentes formas de vida (p. ej., especies de vida libre, parásitos, simbioses y comunidades microbianas) (Zinn *et al.*, 2001; Luengo *et al.*, 2003; Kadouri *et al.*, 2005; Castro-Sowinski *et al.*, 2010; Chen, 2010). También se han detectado genes relacionados con el PHA en depredadores como *Bdellovibrio* (Dori-Bachash *et al.*, 2008), pero hasta esta Tesis Doctoral no se había estudiado su función en este tipo de bacterias. El hecho de que el metabolismo de los PHAs esté tan ampliamente distribuido en la naturaleza, unido al hecho de que los genes *pha* han estado sujetos a un proceso de transferencia horizontal entre distintos grupos filogenéticos, apoya la hipótesis de que la producción de PHA supone algún tipo de ventaja para los microorganismos que lo acumulan de manera natural (Kadouri *et al.*, 2005; Kalia *et al.*, 2007; Castro-Sowinski *et al.*, 2010).

### **2.1. Características generales de los polihidroxicanoatos (PHAs)**

Los PHAs son poliésteres lineales en los que la variabilidad reside en la longitud y naturaleza de la cadena lateral de cada monómero, así como en la proporción en que se encuentre cada tipo de monómero en el polímero final. Un esquema de la estructura general se muestra en la Figura 4. En función del número de carbonos que conformen la cadena lateral de los monómeros, los PHAs se clasifican en dos tipos principales: los PHAs de cadena corta (scl-PHA), compuestos por monómeros con 4 o 5 átomos de carbono, y los de cadena media (mcl-PHA), constituidos por monómeros con 6 a 14 átomos de carbono. Los diferentes PHAs identificados hasta la fecha son

polímeros lineales compuestos de RHAs exclusivamente de la configuración *R* (Madison y Huisman, 1999). Además de la longitud, la naturaleza química de la cadena lateral también influye en las propiedades del poliéster. Hasta el momento, se han descrito una gran variedad de PHAs, con cadenas laterales lineales, ramificadas, saturadas, insaturadas, de tipo aromático, etc. (Figura 4) (Steinbüchel *et al.*, 1992; Steinbüchel y Valentin, 1995). La presencia de grupos funcionales en la cadena lateral (p. ej., halogenados, carboxil, hidroxil, epoxi, fenoxi, cianofenoxi, nitrofenoxi, tiofenoxi, metiléster, etc.) abre nuevas expectativas a la síntesis de polímeros a la carta con nuevas propiedades estructurales y físico-químicas. Estos biopolímeros funcionalizados resultan excelentes candidatos para el desarrollo de una nueva generación de materiales dado que son susceptibles de sufrir modificaciones químicas posteriores a sus síntesis (Hazer y Steinbüchel, 2007; Rehm, 2010; Escapa *et al.*, 2011). A su vez, los PHAs se clasifican de acuerdo con la naturaleza de sus unidades monoméricas; si el polímero está formado por solo un tipo de monómeros se denomina homopolímero, mientras que si está constituido por unidades monoméricas de distinta naturaleza se denomina heteropolímero o co-polímero (Madison y Huisman, 1999).

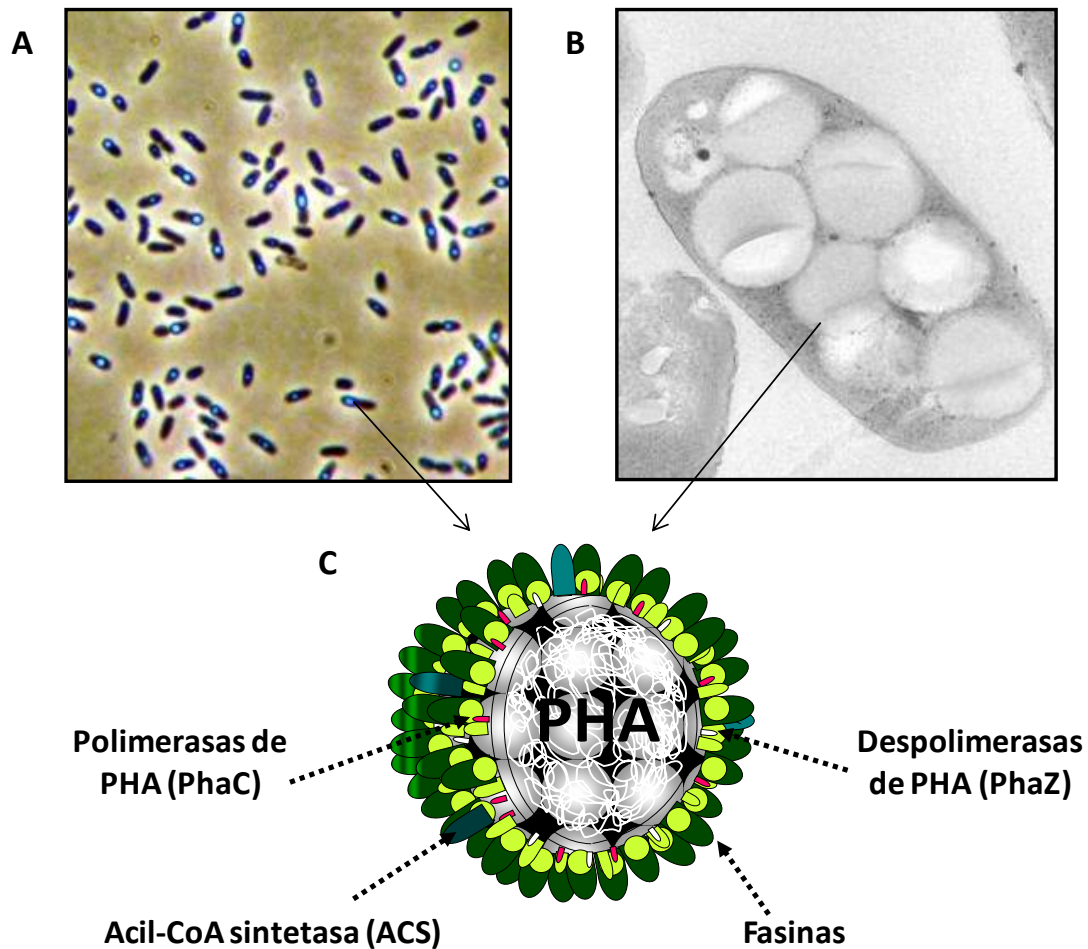


**Figura. 4. Representación esquemática de la estructura química de una subunidad de PHA y variabilidad de la cadena lateral.** Según la longitud de la cadena lateral se puede distinguir entre PHA de cadena corta (scl-PHA) y PHA de cadena media (mcl-PHA). La longitud y naturaleza de las cadenas laterales del PHA así como su variabilidad monomérica varían en función del sustrato o mezcla de sustratos empleados en la fermentación.

Tanto los scl-PHAs como los mcl-PHAs son polímeros termoplásticos y se comportan de forma similar a los plásticos derivados del petróleo. Sin embargo,

debido a su diferente composición monomérica, estos dos tipos de polímeros difieren en sus propiedades mecánicas y físico-químicas, tales como rigidez, fragilidad, cristalinidad, elasticidad, punto de fusión, temperatura de transición vítrea y resistencia a solventes orgánicos. En concreto, los scl-PHAs son polímeros rígidos y quebradizos, y poseen un alto grado de cristalinidad (Sudesh *et al.*, 2000), mientras que los mcl-PHAs presentan temperaturas de fusión y de transición vítrea menores, una cristalinidad limitada y una gran flexibilidad (Huisman *et al.*, 1991; Sudesh *et al.*, 2000).

Dentro de la bacteria, los PHAs se acumulan en forma de inclusiones citoplásmicas formando gránulos de naturaleza hidrofóbica, rodeados por una monocapa de fosfolípidos y por proteínas implicadas en el metabolismo del polímero denominadas GAPs (*granule associated proteins*) (Prieto *et al.*, 2007). La Figura 5 detalla las GAPs caracterizadas hasta la fecha en *Pseudomonas*, un género ampliamente estudiado debido a su gran potencial biotecnológico en áreas como la producción de PHAs. Las principales GAPs de *Pseudomonas* son las polimerasas o sintasas del PHA, involucradas en la síntesis del polímero; las despolimerasas de PHA encargadas de la degradación intracelular del polímero; las fasinias, que son el componente principal de las GAPs y poseen un papel crucial en la segregación de los gránulos entre las células hijas durante la división celular, además de una función estructural y reguladora (Prieto *et al.*, 1999; Moldes *et al.*, 2004; Galán *et al.*, 2011); y por último, la acil-CoA sintetasa 1 (ACS 1), encargada de activar los productos de la despolimerización del PHA en intermediarios CoA, convirtiéndolos de nuevo en sustratos de las polimerasas (ver apartado 2.2.1. "Síntesis de PHA" de la *Introducción*) (Ruth *et al.*, 2008; de Eugenio *et al.*, 2010a). El número y tamaño de los gránulos, así como su disposición y estructura macromolecular dependen del organismo productor y de las condiciones de producción (Madison y Huisman, 1999; Galán *et al.*, 2011).



**Figura 5. El gránulo de PHA.** **A)** Microfotografía al microscopio de contraste de fases de *P. putida* KT2442 acumulando gránulos de PHA, los cuales se ven como estructuras intracelulares refringentes. **B)** Microfotografía al microscopio electrónico de transmisión; los gránulos se observan como inclusiones citoplásmicas esféricas de tamaño variable. **C)** Representación esquemática del gránulo de PHA. El gránulo está compuesto por el polímero de PHA recubierto por una monocapa fosfolipídica (en gris en el esquema) en la que se integran proteínas de unión al gránulo o GAPs. Las principales GAPs son la polimerasa y la despolimerasa intracelular, las fasinas y la acil-CoA sintetasa 1.

## 2.2. El ciclo del PHA: síntesis y degradación de PHA

Los trabajos relacionados con el estudio del metabolismo, la bioquímica y la fisiología de los PHAs han sido numerosos en las últimas décadas (de Eugenio *et al.*, 2010a,b; Escapa *et al.*, 2012b; Galán *et al.*, 2011; Poblete-Castro *et al.*, 2012). Se puede afirmar que las rutas metabólicas implicadas en el metabolismo de los PHAs son muy complejas y varían en función del origen filogenético y del nicho ecológico del microorganismo productor (Jendrossek y Handrick, 2002; Prieto *et al.*, 2007; Castro-Sowinski *et al.*, 2010).

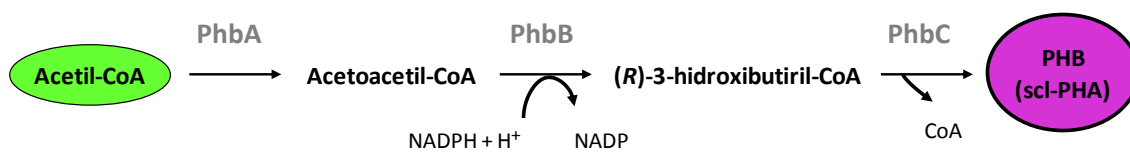
Actualmente, se ha establecido un nuevo modelo metabólico en *P. putida* KT2442 según el cual la síntesis y la degradación del PHA se producen de manera simultánea, y el flujo neto en una u otra dirección depende de las necesidades metabólicas globales de la célula. De esta manera, los procesos de síntesis y degradación intracelular de los PHAs (considerados a menudo como procesos independientes) se encuentran formando parte de un ciclo continuo (Ren *et al.*, 2009; de Eugenio *et al.*, 2010a). Las tres enzimas clave en el ciclo del PHA en *P. putida* KT2442 son la polimerasa, encargada de sintetizar el polímero utilizando 3-hidroxiacil-CoAs (RHA-CoAs), la despolimerasa intracelular, que libera los monómeros que forman el polímero (RHAs) y la acil-CoA sintetasa 1, que activa los RHAs liberados en la despolimerización a RHA-CoAs, susceptibles de ser reincorporados a la síntesis de polímero (Ruth *et al.*, 2008; Ren *et al.*, 2009; de Eugenio *et al.*, 2010a). La acción coordinada de estas actividades enzimáticas da lugar al ciclo del PHA, que actúa como un ciclo metabólico amortiguador capaz de canalizar el flujo de carbono y energía dentro de la célula en respuesta a cambios ambientales (Escapa *et al.*, 2012b). Estos trabajos ponen de manifiesto que el PHA no es un mero reservorio de fuente de carbono y energía, sino que juega un papel crucial en el mantenimiento del balance celular del carbono y la energía en las bacterias que lo producen.

### 2.2.1. Síntesis de PHA

Las rutas de biosíntesis de los PHAs difieren en función del microorganismo estudiado, dando lugar a la acumulación de polímeros de tipo scl-PHA o mcl-PHA. En ambos casos, las polimerasas de PHA ensamblan los monómeros solubles para sintetizar el polímero insoluble, con la correspondiente liberación de una molécula de CoA (Rehm, 2003; Stubbe *et al.*, 2005).

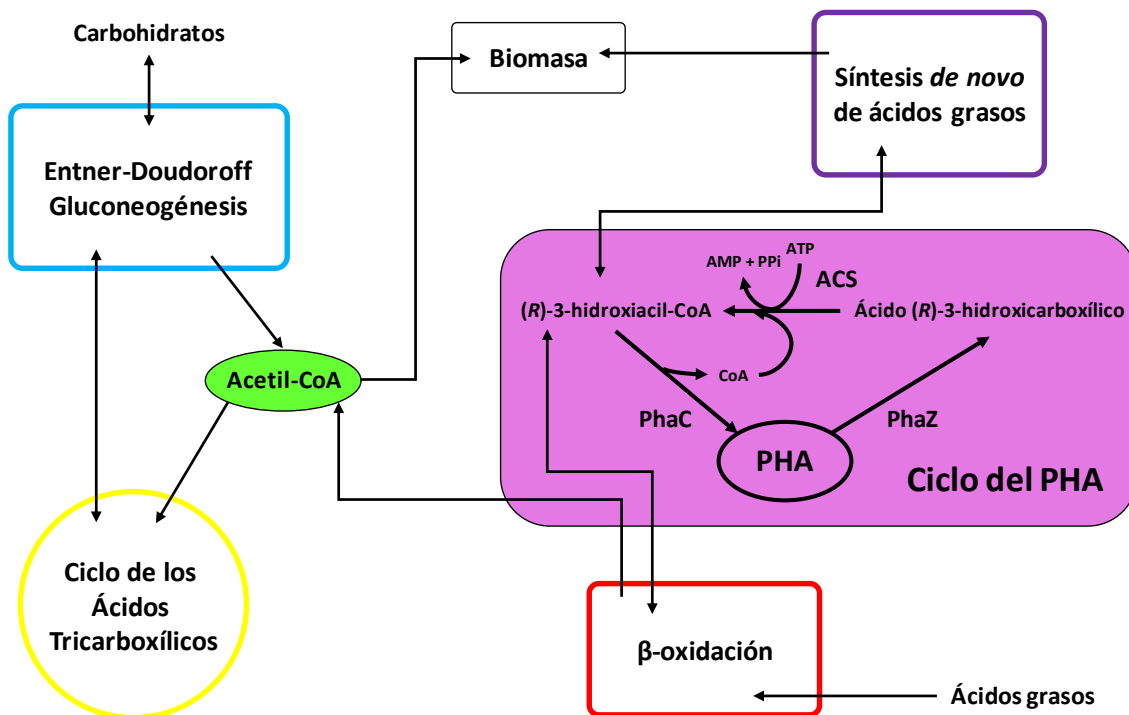
El scl-PHA más abundante en bacterias y más estudiado hasta la fecha es el poli-(3-hidroxiбутирато) (PHB), cuya ruta específica de síntesis ha sido ampliamente investigada en la cepa bacteriana *Ralstonia eutropha* H16, recientemente reclasificada como *Cupriavidus necator* H16 (Poehlein *et al.*, 2011). Este polímero se sintetiza a partir de acetil-CoA en una serie de tres reacciones consecutivas. Como se muestra en

la Figura 6, en primer lugar se acoplan dos moléculas de acetil-CoA, generando acetoacetil-CoA en una reacción de condensación catalizada por una  $\beta$ -cetoacil-CoA tiasa (PhbA). A continuación, el acetoacetil-CoA generado es reducido estereoselectivamente dando (*R*)-3-hidroxiacetil-CoA en una reacción catalizada por la acetoacetil-CoA reductasa dependiente de NADPH (PhbB). Finalmente, los monómeros de (*R*)-3-hidroxiacetil-CoA son polimerizados por la acción de una polimerasa de PHB (PhbC) (Peoples y Sinskey, 1989; Madison y Huisman, 1999).



**Figura 6. Esquema de la ruta de biosíntesis de PHB en *R. eutropha*.** El PHB es sintetizado a partir del acetil-CoA en 3 pasos sucesivos gracias a la acción de una  $\beta$ -cetoacil-CoA tiasa (PhbA), una acetoacetil-CoA deshidrogenasa (PhbB) y una polimerasa de PHB (PhbC).

En el caso del mcl-PHA, el sustrato de las polimerasas son los RHA-CoAs (Kraak *et al.*, 1997; de Roo *et al.*, 2000). En las especies del género *Pseudomonas* estos monómeros se pueden obtener a partir de las rutas de la  $\beta$ -oxidación y síntesis *de novo* de ácidos grasos (Lageveen *et al.*, 1988; Huijberts *et al.*, 1992) (Figura 7). Además, se ha comprobado que los monómeros que forman el polímero presentan cadenas laterales de igual longitud que el ácido graso empleado como sustrato o acortadas en un número par de átomos de carbono (Lageveen *et al.*, 1988; Durner *et al.*, 2001). Esta correlación estructural sugiere que los ácidos grasos pueden incorporarse al PHA directamente a través de intermediarios de la  $\beta$ -oxidación sin necesidad de ser completamente oxidados a acetil-CoA. Por lo tanto, en estos microorganismos la ruta de síntesis de PHA es una rama de la  $\beta$ -oxidación, y la PHA polimerasa debe competir por sus sustratos con las enzimas del catabolismo de los ácidos grasos. De hecho, en distintas cepas de *P. putida* se ha observado que la producción de PHA se incrementa notablemente en mutantes defectivos en la  $\beta$ -oxidación, presumiblemente al haber más sustratos disponibles para las polimerasas de PHA (Olivera *et al.*, 2001a; Olivera *et al.*, 2001b; Prieto *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2011; Escapa *et al.*, 2012a).



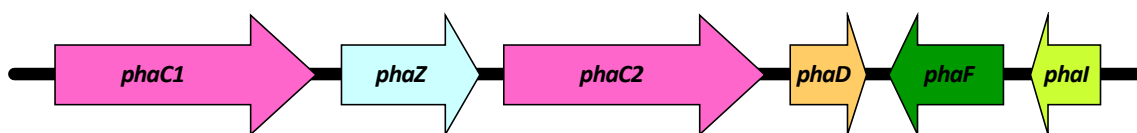
**Figura 7.** Esquema de las rutas del metabolismo central del carbono interconectadas con el ciclo del PHA en *P. putida*. Las rutas centrales del metabolismo del carbono convergen en el intermediario central RHA-CoA, clave en la síntesis de PHA. El ciclo del PHA es un proceso continuo de síntesis y degradación del polímero en el que la acil-CoA sintetasa 1 activa los monómeros que resultan de la despolimerización en intermediarios CoA (RHA-CoA), que son sustratos para la propia polimerasa o para las enzimas del metabolismo de ácidos grasos ( $\beta$ -oxidación y síntesis *de novo*).

La síntesis de PHA también se puede producir a partir de carbohidratos. En este caso, la síntesis del polímero está relacionada con la síntesis *de novo* de ácidos grasos, ya que los carbohidratos son metabolizados por las rutas centrales del catabolismo para dar acetil-CoA, el cual es empleado como sustrato principal en la ruta biosintética de los ácidos grasos. En *Pseudomonas*, cuando la fuente de carbono empleada para el crecimiento y producción de PHA no es un ácido graso, y por lo tanto su naturaleza no está químicamente relacionada con los RHA-CoAs, la composición final del poliéster es independiente de la fuente de carbono empleada y el polímero está compuesto mayoritariamente por monómeros de tipo 3-hidroxidecanoato (Haywood *et al.*, 1990; Timm y Steinbüchel, 1990; Escapa *et al.*, 2012a).

### 2.2.2. Degradación intracelular de PHA

En condiciones de limitación de carbono, el PHA acumulado por la célula puede ser hidrolizado y empleado como fuente de carbono y energía (Prieto *et al.*, 2007). La hidrólisis del polímero en estas condiciones está catalizada por enzimas intracelulares con actividad despolimerasa, que permanecen asociadas al gránulo de PHA (Figura 5) (Steinbüchel y Valentin, 1995; Foster *et al.*, 1996; Jendrossek y Handrick, 2002; de Eugenio *et al.*, 2007; de Eugenio, 2009).

La degradación intracelular de PHA es un proceso escasamente estudiado a pesar de la importancia que tiene en la adaptación y supervivencia en ausencia de otras fuentes de carbono/energía (ver apartado 3. “Función del PHA en la comunidad microbiana” de la *Introducción*) (Tal y Okon, 1985; Okon y Itzigsohn, 1992; Kadouri *et al.*, 2005). Este tipo de degradación ha sido estudiado en dos microorganismos productores de scl-PHA: *Rhodospirillum rubrum*, donde se describió por primera vez la degradación intracelular de scl-PHA (Merrick y Doudoroff, 1964) y *R. eutropha* H16, capaz de llevar a cabo hasta dos ciclos de división celular a partir del PHA previamente acumulado (Handrick *et al.*, 2000). La despolimerización intracelular de mcl-PHA se ha descrito únicamente en la especie *P. putida*, concretamente en las estirpes GPo1 (Huisman *et al.*, 1991; Ren *et al.*, 2005) y KT2442 (de Eugenio *et al.*, 2007; de Eugenio *et al.*, 2010a). La única despolimerasa intracelular de mcl-PHA caracterizada hasta la fecha es la de *P. putida* KT2442 (PhaZ<sub>KT</sub>) (de Eugenio *et al.*, 2007; 2008). PhaZ<sub>KT</sub> se localiza asociada a los gránulos de PHA, y es la única enzima responsable de la movilización intracelular del polímero (de Eugenio *et al.*, 2007). El gen que codifica la despolimerasa PhaZ<sub>KT</sub> se localiza dentro del *cluster* de genes responsable de la síntesis de mcl-PHA de *P. putida* KT2442, concretamente entre las dos polimerasas, responsables de la síntesis del polímero, PhaC1 y PhaC2 (Figura 8). Además, el *cluster* está compuesto por el gen phaD, que codifica un regulador transcripcional de la familia TetR, y los genes phal y phaF, que codifican las fasinas (Figura 8). Recientemente, nuestro grupo ha descrito la regulación específica mediada por phaD que dirige la expresión de los genes del *cluster pha* en *P. putida* KT2442 (de Eugenio *et al.*, 2010b).



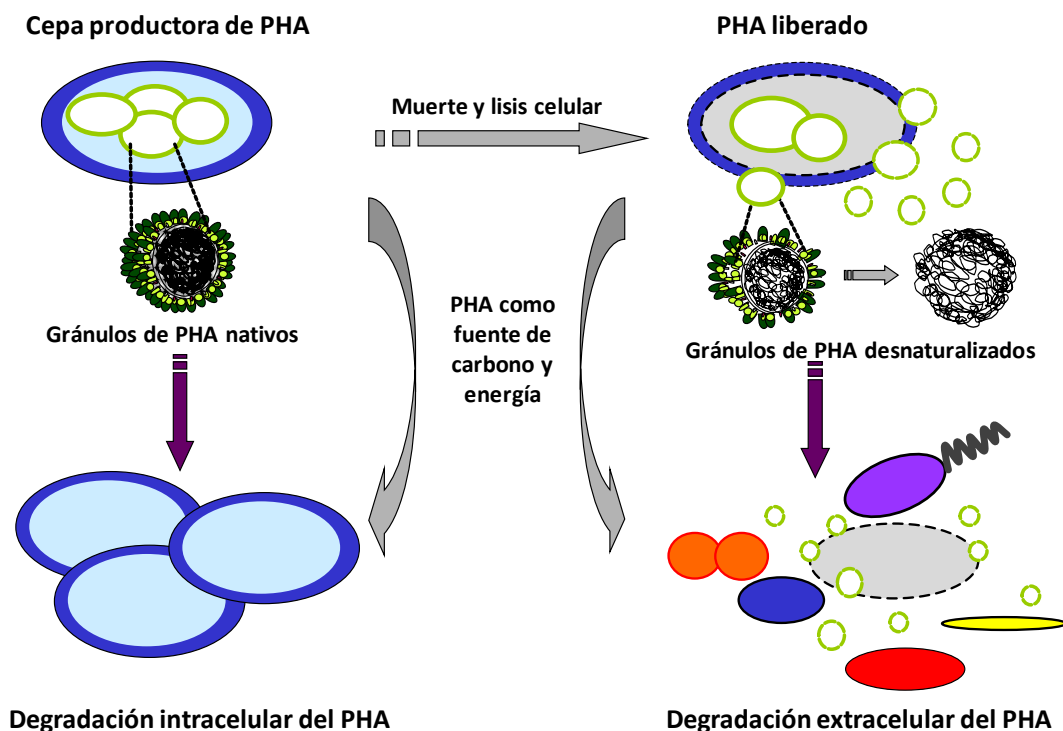
**Figura 8. Esquema de la organización de los genes que codifican las principales enzimas involucradas en el ciclo del PHA.** Los genes *phaC1* y *phaC2* codifican dos polimerasas y están separados por el gen *phaZ* que codifica la despolimerasa intracelular. El gen *phaD* codifica un regulador transcripcional y los genes *phaF* y *phal*, que codifican dos fasinias y se transcriben en dirección opuesta.

### 2.2.3. Degradación extracelular de PHA

La degradación de PHA por bacterias también puede llevarse a cabo mediante un proceso de hidrólisis que tiene lugar en el exterior celular (Jendrossek y Handrick, 2002). Este tipo de degradación del PHA tiene por objeto utilizar un polímero exógeno empleándolo como fuente de energía y carbono. En una comunidad microbiana, el polímero proviene de la lisis celular de otros microorganismos productores, cuyos gránulos de PHA son entonces liberados al entorno. La hidrólisis extracelular de PHA tiene lugar mediante despolimerasas extracelulares específicas que son secretadas al medio, donde hidrolizan el PHA hasta productos solubles que son finalmente incorporados por la célula (Figura 9). Dependiendo de la despolimerasa empleada, los productos de hidrólisis pueden ser monómeros, una mezcla de monómeros y dímeros o de oligómeros. Finalmente, los productos de la hidrólisis del PHA son metabolizados por la célula generando energía y/o biomasa.

Al contrario que ocurre con las despolimerasas intracelulares, numerosos estudios han descrito la purificación y/o caracterización de despolimerasas extracelulares de PHA (Jendrossek y Handrick, 2002). Estas despolimerasas extracelulares tienen características bioquímicas, estructurales y funcionales diferentes de las despolimerasas intracelulares (de Eugenio *et al.*, 2007; 2008). En parte, esto es debido a la distinta conformación estructural del sustrato, es decir, del PHA dentro y fuera de la célula. Según los estudios realizados en scl-PHA, el polímero se encuentran en estado amorfo dentro de la célula y no existe una disposición ordenada de las cadenas (Jendrossek y Handrick, 2002). El PHA en este estado se denomina PHA nativo y como se ha explicado anteriormente, los gránulos están

cubiertos por una capa de fosfolípidos y proteínas. No obstante, tras ser extraído de la célula, la capa de proteínas y fosfolípidos se daña o se pierde, y el scl-PHA tiende a cristalizar, con las cadenas de polímero dispuestas de forma ordenada. El poliéster en este estado tiende a adoptar una estructura parcialmente cristalina, en la que zonas cristalinas coexisten con otras amorfas, y se denomina PHA desnaturalizado (Jendrossek y Handrick, 2002). Las regiones cristalinas del polímero son responsables de su resistencia mecánica, mientras que las amorfas lo son de su flexibilidad y elasticidad. El nivel de cristalización depende de la estructura química y por tanto es diferente en scl-PHA y mcl-PHA. Aunque ambos son muy similares en su estructura química, el mcl-PHA es esencialmente amorfo incluso cuando se extrae del interior celular, probablemente debido a la secuencia aleatoria de unidades presente en la macromolécula, ya que se trata de un heteropolímero (Abraham *et al.*, 2001).



**Figura 9. Tipos de degradación de PHA.** La degradación intracelular se lleva a cabo por despolimerasas intracelulares de las bacterias productoras del PHA. La degradación extracelular se lleva a cabo por despolimerasas extracelulares que son secretadas por otros microorganismos al medio, donde degradan el PHA proveniente de la lisis de los organismos productores.

Como ya se ha comentado, las despolimerasas de PHA se clasifican en función del tipo de degradación que catalizan (intra o extracelulares) y del sustrato de la reacción (scl-PHA o mcl-PHA). Cabe resaltar que de forma paralela al desarrollo de esta Tesis Doctoral, se ha construido una base de datos de despolimerasas de PHA (DED) (<http://www.ded.uni-stuttgart>) en la Universidad de Stuttgart en colaboración con nuestro grupo (Knoll *et al.*, 2009) (Anexo 1). Esta base de datos constituye una herramienta útil para identificar *in silico* nuevas despolimerasas de PHA, clasificarlas, o predecir sus características bioquímicas, y diseñar así variantes con propiedades mejoradas. Está constituida por casi 600 secuencias de posibles despolimerasas de PHA, clasificadas en ocho superfamilias en función de la similitud en secuencia. En este estudio, se ha verificado que la capacidad para degradar scl-PHA está ampliamente distribuida entre las bacterias, mientras que las despolimerasas de mcl-PHA son menos frecuentes, encontrando tan solo tres especies del género *Pseudomonas* (Knoll *et al.*, 2009) (Anexo 1). La gran similitud entre las secuencias de aminoácidos de estas despolimerasas, así como las características comunes que muestran, sugiere la posibilidad de que haya existido transferencia horizontal de genes que codifican despolimerasas de mcl-PHA entre estas cepas bacterianas (Kim *et al.*, 2007). La única despolimerasa extracelular de mcl-PHA clonada y caracterizada al inicio de esta Tesis Doctoral es la despolimerasa de *P. fluorescens* GK13 (PhaZ<sub>GK13</sub>) (Schirmer *et al.*, 1993; Schirmer y Jendrossek, 1994; Gangoiti *et al.*, 2010). Por todo ello, resulta interesante el estudio de nuevas despolimerasas de mcl-PHA procedentes de géneros diferentes a *Pseudomonas*. En este sentido, uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral es caracterizar una nueva despolimerasa de mcl-PHA identificada en la bacteria depredadora *B. bacteriovorus* HD100. Muy recientemente, se han caracterizado nuevas despolimerasas de mcl-PHA en *S. venezuelae* SO1 (Santos *et al.*, 2012), *S. roseolus* SL3 (Gangoiti *et al.*, 2012) y en la bacteria termófila *Thermus thermophilus* HB8 (Papaneophytou *et al.*, 2011). Esta última también comparte la mayor parte de las características comunes entre las despolimerasas anteriormente citadas, con la salvedad de que al proceder de una bacteria termofílica, presenta una temperatura óptima de actividad significativamente más elevada (70°C) (Papaneophytou *et al.*, 2011).

### 2.3. Función del PHA en la comunidad microbiana

Como se ha comentado anteriormente, una gran variedad de microorganismos de diferentes nichos ecológicos acumulan gránulos de PHA en determinadas condiciones. Las principales implicaciones que el metabolismo del PHA tiene sobre la eficacia biológica (*fitness*) de estos microorganismos se resumen en la Figura 10 (Castro-Sowinski *et al.*, 2010). Clásicamente los PHAs se han definido como biopolímeros de reserva de fuente de carbono y energía, movilizables ante cambios medioambientales. Sin embargo, las funciones del PHA van más allá de ser una mera reserva y se han relacionado con la adaptación y supervivencia en nichos ecológicos muy competitivos en los que las condiciones nutricionales son altamente cambiantes, como suelos y rizosfera (Tal y Okon, 1985; Okon y Itzigsohn, 1992; Kadouri *et al.*, 2005). La capacidad de acumular PHA ha sido relacionada también con la resistencia a diferentes tipos de estrés ambiental: incluyendo frío y calor, radiaciones UV, desecación, presión osmótica, y diferentes solventes y compuestos químicos (Dawes y Senior, 1973; Matin *et al.*, 1979; Tal y Okon, 1985; Ruiz *et al.*, 2001; Kadouri *et al.*, 2003; Ruiz *et al.*, 2004).

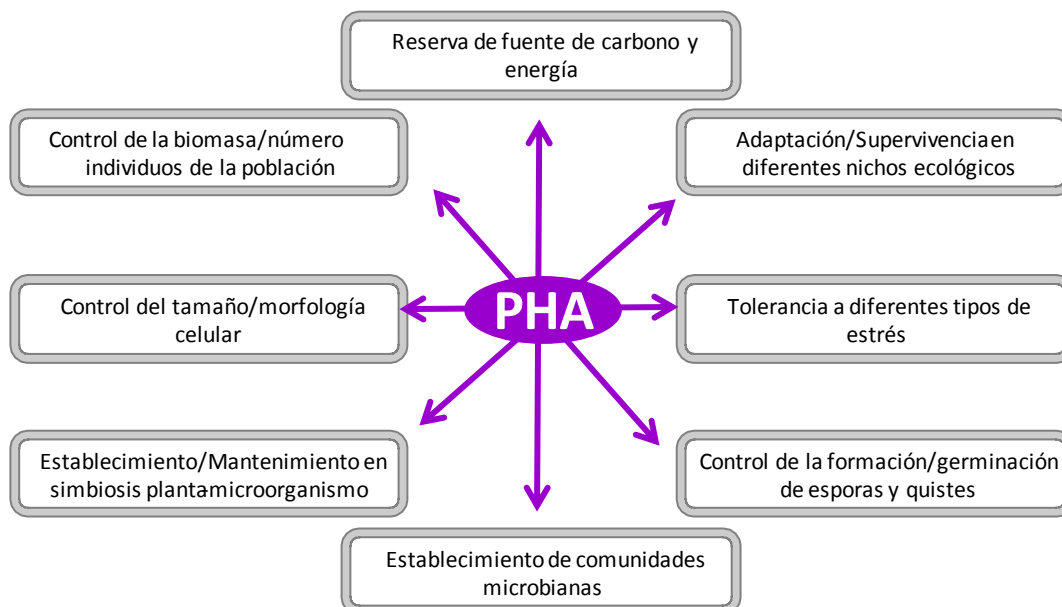


Figura 10. Esquema de las principales implicaciones del metabolismo de PHA en la fisiología de las bacterias.

Además, se ha señalado que el PHA podría mediar en las señales que desencadenan, tanto la formación y germinación de esporas, como la producción de quistes en diferentes especies (Emeruwa y Hawirko, 1973; Segura *et al.*, 2003; Valappil *et al.*, 2007). El metabolismo del PHA se ha relacionado a su vez con las interacciones entre microorganismos que tienen lugar en la formación de *biofilms* y tapetes microbianos (Rothermich *et al.*, 2000; Pham *et al.*, 2004; Villanueva *et al.*, 2007; Campisano *et al.*, 2008), así como en las relaciones de tipo simbiote que se establecen entre plantas y microorganismos de la rizosfera (Tal y Okon, 1985; Povolo *et al.*, 1994; Cevallos *et al.*, 1996; Ludwig *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2007b). Por último, se ha demostrado recientemente que la producción de PHA condiciona la morfología celular al controlar la distribución de la biomasa en función del número y tamaño de las células (de Eugenio *et al.*, 2010a; Escapa *et al.*, 2012b). En este contexto, unos de los objetivos de esta Tesis Doctoral es estudiar las implicaciones de la degradación del PHA en la fisiología de una bacteria depredadora como *Bdellovibrio*.

### 3. Producción industrial de PHA

El desarrollo de la biotecnología ha posibilitado, entre otras numerosas aplicaciones, la búsqueda de soluciones a uno de los problemas más importantes de la industria actual generado por el uso masivo de los plásticos derivados del petróleo o polímeros sintéticos producidos mediante procesos no sostenibles, difíciles de eliminar del medio ambiente debido a su gran estabilidad y baja tasa de degradabilidad. A pesar de ello, su producción mundial en el año 2011 alcanzó los 280 millones de toneladas, ya que son la base de muchos productos de alto consumo en la sociedad moderna. Como consecuencia del problema de contaminación medioambiental y del incremento del precio del crudo, la generación de bioplásticos constituye una alternativa real y viable al empleo de polímeros sintéticos (Luengo, *et al.*, 2003; Gavrilescu y Chisti, 2005; Chen, 2009).

Los PHAs son biopolímeros termoplásticos y desde el punto de vista mecánico se comportan de forma similar a los plásticos convencionales, con la ventaja frente a éstos de ser de origen renovable, biodegradables y biocompatibles, y por ello poseen

gran interés industrial debido a su posible aplicación como bioplásticos (ver apartado 3.1. “Aplicaciones de los PHAs” de la *Introducción*). En comparación con otros bioplásticos disponibles en el mercado, es importante destacar las siguientes características diferenciales de los PHAs: (i) es posible generar más de 150 monómeros diferentes de PHA, por lo que las propiedades de estos plásticos pueden modificarse en función de la aplicación; (ii) son completamente biodegradables; (iii) la polimerización ocurre durante la fermentación, en un único proceso, de forma que las materias primas son transformadas en un solo paso; (iv) su producción es completamente sostenible, puesto que las fuentes de carbono empleadas son de origen renovable (Steinbüchel y Valentin, 1995; Prieto *et al.*, 2007; Chen, 2010). Además, como ya se ha comentado anteriormente, existe la posibilidad de incrementar el valor de estos polímeros por funcionalización, y producir así polímeros novedosos con propiedades inusuales y que no se pueden obtener por síntesis química (Hazer y Steinbüchel, 2007; Rehm, 2010; Escapa *et al.*, 2011). Por estas razones, los PHAs constituyen excelentes candidatos para sustituir a los polímeros sintéticos. La implantación de este tipo de biopolímeros en el mercado de forma competitiva exige una reducción de los costes de producción, debido al bajo coste que aún mantiene la síntesis de los polímeros plásticos derivados del petróleo (Luengo *et al.*, 2003; Prieto *et al.*, 2007). En este sentido, uno de los principales objetivos de esta Tesis Doctoral es el diseño y desarrollo de sistemas de producción de PHAs que disminuyan el coste final del proceso de producción del bioplástico, favoreciendo así su explotación a escala comercial.

### **3.1. Aplicaciones de los PHAs**

Las aplicaciones de los PHAs, y de sus derivados, están ampliamente documentadas a nivel industrial, médico, farmacéutico, agrícola y medioambiental (Philip *et al.*, 2007; Chen, 2009; Gao *et al.*, 2011; Rai *et al.*, 2011). El interés de estos polímeros radica fundamentalmente en su posible aplicación como biomateriales, bien en la industria del plástico (como alternativa a los plásticos de la industria petroquímica) o en la biomedicina (en la generación de materiales de sutura,

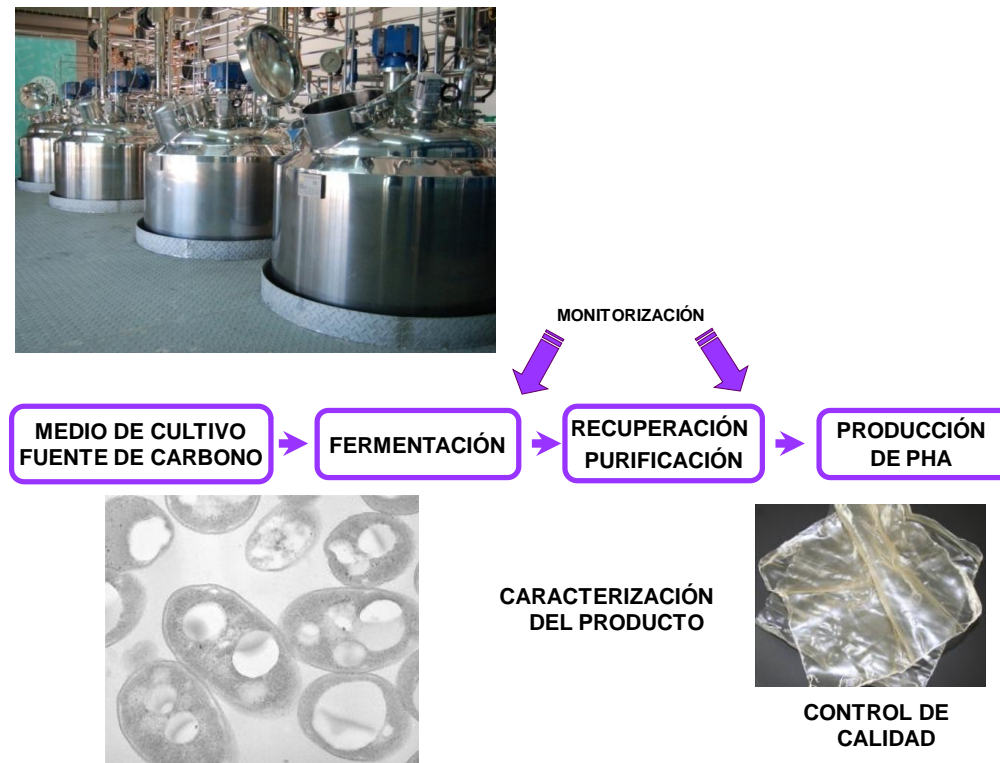
implantes o sistemas de liberación de fármacos) (Zinn *et al.*, 2001; Prieto *et al.*, 2007; Chen, 2009).

Además del uso de los PHAs como biomateriales, estos polímeros son una fuente potencial de intermediarios quirales dada la naturaleza enantiopura de los monómeros de RHA que los constituyen. Estos compuestos quirales son de gran utilidad como precursores de productos de alto valor añadido en la industria farmacéutica y son difíciles de conseguir en estado puro mediante procesos químicos (Chen y Wu, 2005; Ren *et al.*, 2005, de Eugenio *et al.*, 2010a). De esta manera, los avances en el conocimiento de la biodegradación del polímero y de las despolimerasas de PHA son importantes por sus posibles aplicaciones biotecnológicas, tanto a nivel de eliminación de residuos derivados del uso del polímero, como en la producción de compuestos quirales. Por ello, la caracterización de una nueva despolimerasa de PHA es uno de los objetivos fundamentales de esta Tesis.

### **3.2. El proceso de producción de PHA**

Debido a que uno de los objetivos principales de esta Tesis Doctoral es el desarrollo de sistemas para la extracción y recuperación del mcl-PHA producido mediante fermentación bacteriana, a continuación se describen las principales etapas para la producción industrial de PHA. El coste total del proceso depende de varios factores tales como la fuente de carbono, el proceso de fermentación en sí mismo y el proceso de recuperación del polímero (Figura 11). Específicamente, se ha descrito que cada uno de estos factores supone un 30% del coste total de la producción de PHA (Sun *et al.*, 2007; Elbahloul y Steinbüchel, 2009).

La producción industrial de PHA aún mantiene un alto coste de producción en comparación con los plásticos convencionales. En este sentido, diferentes investigaciones han abordado el abaratamiento de los costes totales en la producción de PHA a través de diversas aproximaciones, tales como el aprovechamiento de subproductos industriales o el empleo de fuentes de carbono más baratas (Braunegg *et al.*, 1998; Koller *et al.*, 2010; Gómez *et al.*, 2012; Escapa *et al.*, 2012a), la mejora de los ratios de crecimiento y producción de PHA (Chen, 2010; Follonier *et al.*, 2012) o el desarrollo de sistemas alternativos de recuperación y purificación del polímero



**Figura 11. Esquema de la producción microbiana de PHA a escala industrial.** Las fases principales del proceso de producción de PHA son la selección de las materias primas, la fermentación bacteriana, y la recuperación, purificación y caracterización del polímero resultante.

(Jacquel *et al.*, 2008; Kunasundari y Sudesh, 2011). Con respecto a estos últimos, se han descrito una gran variedad de técnicas de rotura celular, que incluyen métodos de disrupción mecánica, química o enzimática. La principal desventaja de estos métodos es que en su mayoría requieren el uso de grandes cantidades de disolventes orgánicos, cócteles enzimáticos o detergentes, que además de ser contaminantes encarecen el proceso de producción (Jacquel *et al.*, 2008; Elbahloul y Steinbüchel, 2009). Por estas razones, el diseño de sistemas que faciliten la extracción del PHA bacteriano de forma competitiva y ecológica es la clave para que disminuya de forma radical el coste final del producto y para que estos procesos sean competitivos, si bien requiere de un importante esfuerzo en el desarrollo y la optimización de cada una de las etapas.



## **II. OBJETIVOS**



El objetivo general de esta Tesis Doctoral ha sido el estudio del catabolismo del PHA en la bacteria depredadora *B. bacteriovorus* HD100 y así como el desarrollo y validación de nuevas herramientas biotecnológicas en el campo de la producción industrial de PHAs.

Los objetivos particulares son los siguientes:

- Identificación y caracterización bioquímica de la despolimerasa de mcl-PHA de *B. bacteriovorus* HD100, PhaZ<sub>Bd</sub>.
- Estudio de PhaZ<sub>Bd</sub> en el ciclo de vida depredador de *B. bacteriovorus*.
- Efecto de la actividad despolimerizante de PhaZ<sub>Bd</sub> en el desarrollo *B. bacteriovorus* predando sobre cepas de *P. putida* KT2442 acumulando PHA.
- Aplicaciones biotecnológicas de la degradación de PHA en *B. bacteriovorus*: producción de PHAs y de monómeros enantiopuros.
- Desarrollo de nuevos sistemas de extracción del PHA de cultivos bacterianos para la producción industrial de PHA.



### **III. RESULTADOS**

Esta Tesis se presenta bajo el formato de artículos publicados. La sección de resultados es una sucesión de artículos que contienen las respuestas a los objetivos específicos planteados. El desarrollo experimental preciso para dar respuesta a algunos de estos objetivos ha sido abordado en los artículos presentados.



**1. Identificación y caracterización bioquímica de una nueva despolimerasa de mcl-  
PHA como parte del arsenal hidrolítico del depredador *B. bacteriovorus* HD100**



# Identification and Biochemical Evidence of a Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoate Depolymerase in the *Bdellovibrio bacteriovorus* Predatory Hydrolytic Arsenal

Virginia Martínez,<sup>a</sup> Fernando de la Peña,<sup>a</sup> Javier García-Hidalgo,<sup>b</sup> Isabel de la Mata,<sup>b</sup> José Luis García,<sup>a</sup> and María Auxiliadora Prieto<sup>a</sup>

Department of Environmental Biology, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid, Spain,<sup>a</sup> and Department of Biochemistry and Molecular Biology I, Faculty of Biology, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain<sup>b</sup>

The obligate predator *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 shows a large set of proteases and other hydrolases as part of its hydrolytic arsenal needed for its predatory life cycle. We present genetic and biochemical evidence that open reading frame (ORF) Bd3709 of *B. bacteriovorus* HD100 encodes a novel medium-chain-length polyhydroxyalkanoate (mcl-PHA) depolymerase (PhaZ<sub>Bd</sub>). The primary structure of PhaZ<sub>Bd</sub> suggests that this enzyme belongs to the  $\alpha/\beta$ -hydrolase fold family and has a typical serine hydrolase catalytic triad (serine-histidine-aspartic acid) in agreement with other PHA depolymerases and lipases. PhaZ<sub>Bd</sub> has been extracellularly produced using different hypersecretor Tol-pal mutants of *Escherichia coli* and *Pseudomonas putida* as recombinant hosts. The recombinant PhaZ<sub>Bd</sub> has been characterized, and its biochemical properties have been compared to those of other PHA depolymerases. The enzyme behaves as a serine hydrolase that is inhibited by phenylmethylsulfonyl fluoride. It is also affected by the reducing agent dithiothreitol and nonionic detergents like Tween 80. PhaZ<sub>Bd</sub> is an endoexohydrolase that cleaves both large and small PHA molecules, producing mainly dimers but also monomers and trimers. The enzyme specifically degrades mcl-PHA and is inactive toward short-chain-length polyhydroxyalkanoates (scl-PHA) like polyhydroxybutyrate (PHB). These studies shed light on the potentiality of these predators as sources of new biocatalysts, such as an mcl-PHA depolymerase, for the production of enantiopure hydroxyalkanoic acids and oligomers as building blocks for the synthesis of biobased polymers.

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are optically active biopolyesters composed of *R*-3-hydroxy fatty acids, which represent a complex class of storage polyesters. A wide variety of taxonomically different groups of microorganisms (domains *Bacteria* and *Archaea*) produce intracellular homopolymers or copolymers containing different alkyl groups at the beta position in aerobic and anaerobic environments (36, 37, 42). At present, PHAs are classified into two major classes, short-chain-length PHAs (scl-PHA) with C<sub>4</sub> and C<sub>5</sub> monomers and medium-chain-length PHAs (mcl-PHA) with C<sub>6</sub> to C<sub>14</sub> monomers (37). PHAs are accumulated as inclusions in the bacterial cytoplasm in response to inorganic nutrient limitations and play a role as a sink for carbon and reducing equivalents and in synchronizing global metabolism to the availability of resources in PHA-producing microorganisms (16). It is now evident that intracellular accumulation of PHAs enhances the survival of several bacteria under environmental stress conditions imposed in water or soil (6, 27, 35).

PHAs can be catabolized by many microorganisms through extracellular or intracellular processes depending on the PHA localization (11, 12, 26). Intracellular PHA can be hydrolyzed by intracellular depolymerases, which are permanently associated to the PHA granule (11, 49). Their hydrolytic activity is controlled by the carbon demand of the PHA producer cells (10, 11, 18, 19, 26). The study of the physiological role of intracellular depolymerases in the mcl-PHA metabolism in *Pseudomonas putida* was recently addressed, demonstrating that the intracellular depolymerase PhaZ plays a fundamental role in the bacterial carbon metabolism by maintaining the PHA turnover, where synthesis and mobilization constitute a continuous and simultaneous cycle (10, 11, 45, 61).

Extracellular PHA can be utilized as a carbon and energy

source by PHA producer or nonproducer microorganisms. This PHA is released to the medium by producer microorganisms after death, and the granules spread into the environment can be hydrolyzed by secreted PHA depolymerases of microbial origin into water-soluble oligomers and monomers that can be used as a carbon source (26). The ability to degrade extracellular scl-PHA is more widespread among bacteria than the ability to degrade mcl-PHA. Thus, many extracellular scl-PHA depolymerases have been characterized in depth over the last decade, and a considerable number of genes have been identified (1, 3, 4, 24, 26, 29, 40). The prototype of extracellular mcl-PHA depolymerases is that of *Pseudomonas fluorescens* GK13 (here PhaZ<sub>GK13</sub>) (21, 26, 52).

Based on the analysis of the PHA depolymerase database (29), we identified a potential extracellular mcl-PHA depolymerase-coding sequence from the complete genome of *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 (open reading frame [ORF] Bd3709). *Bdellovibrio* and related organisms known as BALOs (*Bdellovibrio* and like organisms) (8, 55) are obligate bacterial predators ubiquitously found in the environment. The predator *B. bacteriovorus* HD100 is a highly motile Gram-negative deltaproteobacterium that invades the periplasm of other Gram-negative bacteria. This predator undergoes a complex life cycle in the periplasm of the prey, which

Received 4 April 2012 Accepted 11 June 2012

Published ahead of print 15 June 2012

Address correspondence to María Auxiliadora Prieto, auxi@cib.csic.es.

Supplemental material for this article may be found at <http://aem.asm.org/>.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AEM.01099-12

**2. Mejora de la eficiencia biológica de *B. bacteriovorus* HD100 cuando preda sobre bacterias productoras de PHA**

Artículo enviado a la revista *Environmental Microbiology*



## Reward for *Bdellovibrio bacteriovorus* for preying on a polyhydroxyalkanoate producer

Virginia Martínez<sup>1</sup>, Edouard Jurkevitch<sup>2</sup>, José Luis García<sup>1</sup>, and María Auxiliadora Prieto<sup>1\*</sup>

Environmental Biology Department, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, C/ Ramiro de Maeztu, 9,  
28040 Madrid, Spain<sup>1</sup>

Department of Plant Pathology and Microbiology, Faculty of Agricultural, Food and Environmental  
Quality Sciences, the Hebrew University of Jerusalem, Rehovot 76100, Israel<sup>2</sup>

### Abstract

*Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 is an obligate predator that invades and grows within the periplasm of Gram-negative bacteria, including mcl-polyhydroxyalkanoate (PHA) producers such as *Pseudomonas putida*. We investigated the impact of prey PHA content on the predator fitness and the potential advantages for preying on a PHA producer. Using a new procedure to control *P. putida* KT2442 cell size we demonstrated that the number of *Bdellovibrio* progeny depends on the prey biomass and not on the viable prey cell number or PHA content. The presence of mcl-PHA hydrolyzed products (monomers, dimers and trimers) in the culture supernatant after predation on *P. putida* KT42Z, a PHA producing strain lacking PhaZ depolymerase confirmed the ability of *Bdellovibrio* to degrade the prey's PHA. Predator motility was significantly higher when growing on PHA accumulating preys. External addition of PHA polymer (latex suspension) to *Bdellovibrio* preying on the PHA minus mutant *P. putida* KT42C1 restored predator movement, suggesting that PHA is a key prey component to sustain predator natatory speed. High velocities observed in *Bdellovibrio* preying on the PHA producing strain were correlated to high intracellular ATP levels of the predator. These effects brought *Bdellovibrio* fitness benefits as predation on PHA producers was more efficient than predation on non-producing bacteria. Accumulating data also indicated that *Bdellovibrio* can be potentially used as a novel lytic system for PHA extraction from accumulating bacteria.



**3. Autólisis celular controlada como sistema de procesamiento para la recuperación de mcl-PHA en *P. putida* KT2440**



# Controlled autolysis facilitates the polyhydroxyalkanoate recovery in *Pseudomonas putida* KT2440

Virginia Martínez,<sup>1</sup> Pedro García,<sup>2</sup> José Luis García<sup>1</sup> and María Auxiliadora Prieto<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Environmental Biology Department, Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid, Spain.

<sup>2</sup>Molecular Microbiology and Infection Biology Department, Centro de Investigaciones Biológicas, and Ciber de Enfermedades Respiratorias, Madrid, Spain.

## Summary

The development of efficient recovery processes is essential to reduce the cost of polyhydroxyalkanoates (PHAs) production. In this work, a programmed self-disruptive *Pseudomonas putida* BXHL strain, derived from the prototype medium-chain-length PHA producer bacterium *P. putida* KT2440, was constructed as a proof of concept for exploring the possibility to control and facilitate the release of PHA granules to the extracellular medium. The new autolytic cell disruption system is based on two simultaneous strategies: the coordinated action of two proteins from the pneumococcal bacteriophage EJ-1, an endolysin (Ejl) and a holin (Ejh), and the mutation of the *tolB* gene, which exhibits alterations in outer membrane integrity that induce lysis hypersensitivity. The *ejl* and *ejh* coding genes were expressed under a *XylS/Pm* monocopy expression system inserted into the chromosome of the *tolB* mutant strain, in the presence of 3-methylbenzoate as inducer molecule. Our results demonstrate that the intracellular presence of PHA granules confers resistance to cell envelope. Conditions to control the cell autolysis in *P. putida* BXHL in terms of optimal fermentation, PHA content and PHA recovery have been set up by exploring the sensitivity to detergents, chelating agents and wet biomass solubility in organic solvents such as ethyl acetate.

## Introduction

Human overpopulation combined with the current lifestyle urges the rational, efficient and sustainable use of natural

resources to produce environmentally friendly plastic materials such as polyhydroxyalkanoic acids (PHAs), whose production/degradation cycle reduces undesirable wastes and emissions (Gavrilescu and Chisti, 2005). PHAs are optically active biopolyesters composed of (*R*) 3-hydroxy fatty acids, which represent a complex class of storage polyesters. They are synthesized by some Archaea and a wide range of Gram-positive and Gram-negative bacteria in aerobic and anaerobic environments (Madison and Huisman, 1999). These biopolymers are accumulated as inclusions (PHA granules) in the bacterial cytoplasm in response to inorganic nutrient limitations, generally, when the microbes are cultured in the presence of an excess carbon source (Madison and Huisman, 1999). At present, PHAs are classified in two major classes: short-chain-length PHAs (scl-PHAs) with C4-C5 monomers and medium-chain-length PHAs (mcl-PHAs) with C6-C14 monomers. Mcl-PHAs are mainly produced by *Pseudomonas* species (revised in Prieto *et al.*, 2007). Because of structural differences, the physical properties of mcl-PHAs are generally quite different from the archetypal polyhydroxybutyrate (PHB) and other scl-PHAs (Gagnon *et al.*, 1992).

Using currently available technology, large-scale production of PHA is suitable with expenditures almost evenly divided between carbon source, fermentation process and separation process (30% each) (Sun *et al.*, 2007; Elbahloul and Steinbüchel, 2009). Because PHAs accumulate intracellularly, the development of an efficient recovery process is indispensable to reduce the total cost of PHAs production (Prieto, 2007). At present, different separation processes have been described, like filtration, froth flotation (van Hee *et al.*, 2006) and continuous centrifugation (Gorenflo *et al.*, 2001). Recovery procedures for mcl-PHA mainly resemble those developed for PHB (Ramsay *et al.*, 1994). PHB recovery using hypochlorite, SDS in an *in situ* extraction process (Thakor *et al.*, 2005), or an enzyme cocktail (de Koning *et al.*, 1997; Kellerhals *et al.*, 1999) have been reported. The disadvantages related to applications of hypochlorite and detergents are the severe reduction in polymer molecular weight and the requirement of extensive washing steps to get rid of detergent residuals respectively. Furthermore, the use of acetone, ethylacetate or hexane extraction of PHAs from

Received 11 August, 2010; accepted 22 November, 2010. \*For correspondence. E-mail [auxi@cib.csic.es](mailto:auxi@cib.csic.es); Tel. (+34) 918373112; Fax (+34) 915360432.

## **IV. DISCUSIÓN INTEGRADORA**



A continuación se presenta una discusión global que trata de integrar las conclusiones alcanzadas en cada uno de los tres capítulos que componen esta Tesis Doctoral. El objetivo de esta sección no es por tanto discutir en profundidad los resultados individuales presentados en los artículos, sino integrar todos los argumentos ya expuestos para obtener una visión global del impacto del catabolismo del PHA sobre la fisiología de *B. bacteriovorus*, así como de las posibles aplicaciones biotecnológicas de esta bacteria depredadora en el campo de los PHAs, comparándolas con otras estrategias diseñadas para la producción industrial de este biopoliéster y sus derivados.

## **1. Importancia de la degradación del PHA en la fisiología de *B. bacteriovorus* HD100.**

Uno de los objetivos principales de esta Tesis Doctoral ha sido el estudio del catabolismo del PHA en *B. bacteriovorus* HD100. Mediante el empleo de *P. putida* KT2442 acumulando gránulos de mcl-PHA como presa para *Bdellovibrio*, se han analizado las repercusiones desde el punto de vista fisiológico que supone la degradación de este polímero para el depredador y su utilización como fuente de carbono y energía. En este sentido, esta Tesis constituye un estudio pionero que aborda la degradación de PHA en el depredador *B. bacteriovorus* HD100, así como el impacto fisiológico que supone esta capacidad (Capítulos 1 y 2).

Como se ha indicado en la *Introducción*, *B. bacteriovorus* HD100 es una bacteria depredadora obligada de otras bacterias Gram negativas. Su ciclo de vida en una típica célula presa ha sido ampliamente estudiado y consta de dos fases de crecimiento bien diferenciadas: una fase de ataque móvil, no replicativa y una fase de crecimiento dentro del periplasma de la bacteria presa donde crece, replica su ADN y se divide en células individuales (Rendulic *et al.*, 2004; Sockett, 2009). Para llevar a cabo la degradación de los componentes celulares de la presa a lo largo del ciclo de vida depredador, el genoma de *B. bacteriovorus* HD100 codifica alrededor de 300 enzimas potencialmente hidrolíticas (Rendulic *et al.*, 2004). Esta densidad de enzimas hidrolíticas es la más elevada de todos los genomas bacterianos secuenciados hasta la fecha, exceptuando el pequeño genoma del endosimbionte *Buchnera aphidicola*, de tan sólo 422 kb en la estirpe BCc (Rendulic *et al.*, 2004; Pérez-Brocal *et al.*, 2006).

Uno de los resultados principales de esta Tesis Doctoral ha sido la identificación de una nueva despolimerasa de mcl-PHA formando parte del arsenal hidrolítico de *B. bacteriovorus* HD100 (Capítulos 1 y 2). Ya se ha señalado que el PHA se acumula como polímero de reserva de carbono y energía por algunas bacterias en caso de desbalance nutricional y es catabolizado ante cambios medioambientales (revisado en Madison y Huisman, 1999; Luengo *et al.*, 2003; Prieto *et al.*, 2007). Las despolimerasas intracelulares forman parte de la maquinaria del ciclo del PHA (de Eugenio *et al.*, 2010). No obstante, la degradación extracelular del PHA también tiene lugar en la

naturaleza (Handrick y Jendrossek, 2002). Por tanto, el PHA juega un papel fundamental tanto en el metabolismo celular de la bacteria productora como en el resto de la comunidad bacteriana. La existencia de una nueva despolimerasa de mcl-PHA en *Bdellovibrio* resulta interesante no sólo por sus posibles aplicaciones biotecnológicas (ver apartado 3. “Producción industrial de PHAs y de compuestos enantiopuros” de la *Discusión Integradora*), sino desde el punto de vista del estudio global de la degradación de PHA en el ecosistema. En concreto, la degradación de mcl-PHA ha sido escasamente estudiada, tanto a nivel intracelular como extracelular, siendo las despolimerasas de *P. putida* KT2442 y *P. fluorescens* GK13 las enzimas prototipo, respectivamente (ver apartado 2. “Degradación periplásmica del PHA” de la *Discusión Integradora*) (Schirmer *et al.*, 1993; 1994; de Eugenio *et al.*, 2007; 2008). Al inicio de esta Tesis, la capacidad de *Bdellovibrio* para invadir y crecer a expensas de bacterias acumulando gránulos de PHA en su interior era desconocida. La identificación de PhaZ<sub>Bd</sub> junto con el hecho de que *Bdellovibrio* sea capaz de crecer predando sobre bacterias productoras de mcl-PHA tales como *P. putida*, abre la puerta a estudios sobre el metabolismo de PHA en bacterias depredadoras (Capítulos 1 y 2). Cabe destacar además, que la acumulación gránulos de PHA confiere ventajas a los microorganismos que lo producen en términos de supervivencia o resistencia a diferentes tipos de estrés ambiental (Castro-Sowinski *et al.*, 2010) (ver apartado 2.3. “Función del PHA en la comunidad microbiana” de la *Introducción*). Además, la presencia del gránulo de mcl-PHA en el interior de *P. putida* KT2440 confiere resistencia a la lisis celular mediada por diversos agentes, químicos y biológicos (Capítulo 3). Sin embargo, se ha comprobado que *B. bacteriovorus* HD100 es capaz de preda sobre *P. putida* KT2442 acumulando gránulos de mcl-PHA (Capítulo 2) (Figura 12), demostrando, por tanto, que la presencia de PHA en el interior de la presa no le confiere resistencia a la depredación. La bacteria presa utilizada durante este trabajo ha sido la cepa *Pseudomonas putida* KT2442, debido a que las bacterias del género *Pseudomonas* han sido ampliamente estudiadas por su capacidad de producción de PHA, entre otras razones (Luengo *et al.*, 2003; Prieto *et al.*, 2007). Entre las bacterias del género *Pseudomonas* de importancia biotecnológica y medioambiental destaca *P. putida*, un microorganismo no patógeno capaz de vivir en suelos, rizosfera y aguas dulces, caracterizado por su amplia versatilidad metabólica (Clarke, 1982; Silby *et al.*,

2011). *P. putida* KT2440 se considera la bacteria modelo en biotecnología ambiental (Nelson *et al.*, 2002; Wackett, 2003; dos Santos *et al.*, 2004). Se trata de la una bacteria Gram negativa aislada del suelo, secuenciada (Nelson *et al.*, 2002) y certificada por el “National Institutes of Health” (NIH) de los Estados Unidos como segura para la clonación y expresión de genes heterólogos. Gracias a esta acreditación *P. putida* KT2440, se ha convertido en un organismo modelo para estudios de biodegradación, adaptación a diversos ambientes y para el desarrollo de herramientas biotecnológicas (Wackett, 2003; dos Santos *et al.*, 2004). La cepa *P. putida* KT2442 es un mutante espontáneo de la estirpe KT2440 resistente a rifampicina (Franklin *et al.*, 1981). En esta Tesis Doctoral, la cepa *P. putida* KT2440 ha sido también seleccionada para el diseño de nuevos sistemas líticos que faciliten la producción industrial de PHAs (Capítulos 2 y 3).

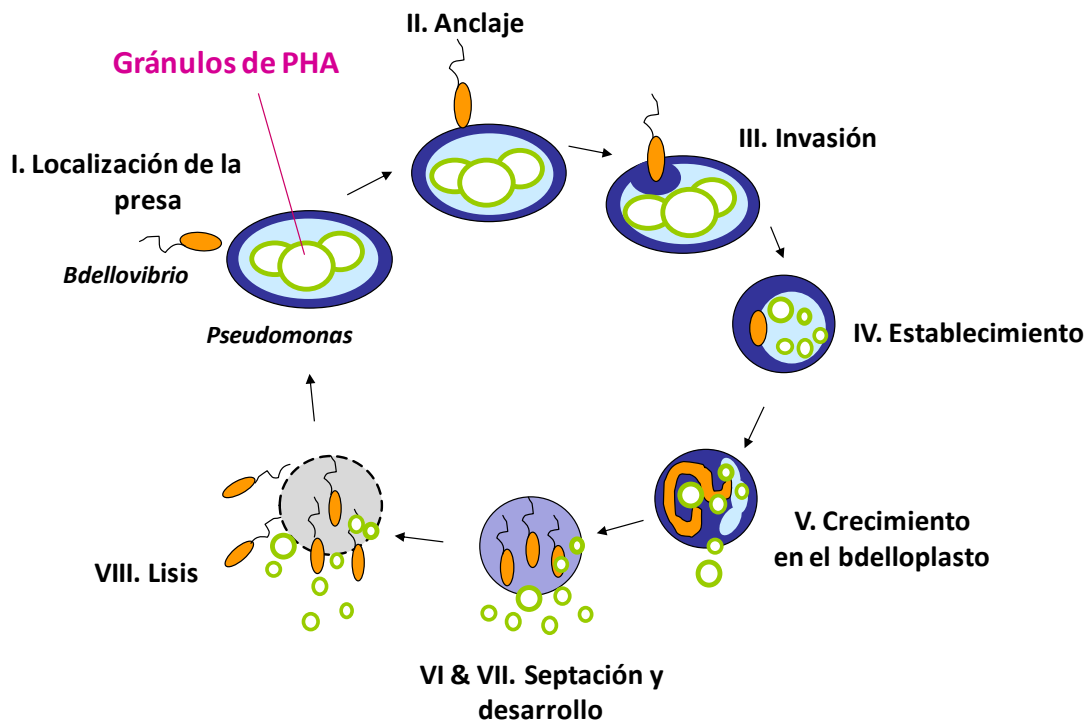


Figura 12. Representación esquemática del ciclo de vida de *B. bacteriovorus* HD100 predando sobre *P. putida* KT2442 acumulando gránulos de PHA en el citoplasma. En las condiciones testadas, *Bdellovibrio* hidroliza parte del mcl-PHA acumulado por la presa, liberando el resto de los gránulos de PHA al medio extracelular (Capítulo 2).

### 1.1. Producción de PhaZ<sub>Bd</sub> en el ciclo de vida depredador de *B. bacteriovorus* HD100

La detección de actividad despolimerasa en los extractos solubles de las cepas de *E. coli* y *P. putida* portadoras del gen *phaZ<sub>Bd</sub>*, ha permitido confirmar la existencia de un gen que codifica una verdadera despolimerasa de mcl-PHA en el genoma de *B. bacteriovorus* HD100. Sin embargo, a pesar de la presencia de un péptido señal en el extremo amino terminal de la secuencia aminoacídica, no se ha detectado actividad despolimerasa en los sobrenadantes de cultivo de las cepas recombinantes expresando la proteína de manera heteróloga. La localización subcelular de PhaZ<sub>Bd</sub> expresada en estas cepas ha revelado la acumulación de la despolimerasa procesada y activa en el espacio periplásmico (Capítulo 1). Este resultado guarda relación con el hecho de que el espacio extracelular del depredador durante su fase de crecimiento es el periplasma de la presa. Ante esta situación, se ha estudiado qué papel desentraña la despolimerasa PhaZ<sub>Bd</sub> en el peculiar ciclo de vida de *Bdellovibrio* (Capítulo 2). El gen *phaZ<sub>Bd</sub>* se expresa de manera constitutiva a lo largo de la fase de crecimiento del depredador, ya sea creciendo sobre cepas de *P. putida* acumulando o sin acumular gránulos de PHA (Capítulo 2). El análisis de esta bacteria muestra diversos patrones de expresión génica según el gen estudiado. Por ejemplo, los genes involucrados en la biosíntesis del flagelo se activan en la fase de ataque y su transcripción decae durante la fase de crecimiento (Lambert *et al.*, 2006a), mientras que genes hidrolíticos como las lipasas, o implicados en la remodelación del peptidoglicano de la presa se expresan de manera constitutiva (Lambert *et al.*, 2009). La producción constitutiva de PhaZ<sub>Bd</sub> es una prueba más del enorme y diverso arsenal de enzimas hidrolíticas que *Bdellovibrio* secreta a lo largo de su ciclo de vida depredador.

La despolimerasa PhaZ<sub>Bd</sub> se produce de manera activa durante el desarrollo de *Bdellovibrio* predando sobre una cepa mutante en la despolimerasa PhaZ<sub>KT</sub>, *P. putida* KT42Z (Capítulo 2). La localización subcelular de PhaZ<sub>Bd</sub> en las condiciones de crecimiento sobre KT42Z no ha sido determinada; sin embargo, se ha descrito que pocas proteínas extracelulares secretadas por *Bdellovibrio* son dirigidas desde el bdelloplasto al medio extracelular, lo que implica que estas proteínas secretadas en el bdelloplasto se localizan en el citoplasma o el periplasma de la presa (Cover *et al.*,

1984). Esta observación junto con el hecho de que PhaZ<sub>Bd</sub> se acumule en el periplasma de *E. coli* o *P. putida* cuando se expresa de manera heteróloga, sugiere la localización de la depolimerasa en el espacio periplásmico de la presa, desde donde podría degradar el PHA de la misma. Además, la detección e identificación de los productos de hidrólisis del PHA en el sobrenadante del co-cultivo (tanto predando sobre *P. putida* KT2442 como sobre KT42Z), confirmaron la degradación del polímero de la presa por parte del depredador (Capítulo 2). Como es de esperar, los productos de hidrólisis detectados son similares a los identificados en las reacciones de hidrólisis *in vitro* con la proteína semipurificada (monómeros, dímeros y trímeros) (Capítulo 1), lo que confirma la actividad despolimerasa de PhaZ<sub>Bd</sub> durante el ciclo de vida de *Bdellovibrio* liberando monómeros y oligómeros de PHA.

De acuerdo con todo lo anteriormente expuesto, uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral ha sido investigar el impacto de la presencia de PHA en la presa durante el desarrollo y crecimiento de *Bdellovibrio*, así como determinar las principales implicaciones que el catabolismo del polímero tiene sobre la eficiencia biológica (*fitness*) del depredador (Capítulo 2). La eficiencia biológica mide la adaptación de un microorganismo en su medio ambiente. En esta Tesis Doctoral se ha estudiado la eficiencia biológica en términos de número, velocidad natatoria y eficiencia en la depredación de nuevas presas, de la progenie de *Bdellovibrio* producida tras preñar sobre cepas de *P. putida* KT2442 en presencia y ausencia de PHA.

### **1.2. Influencia del contenido de PHA de la presa en la eficiencia biológica (*fitness*) de *B. bacteriovorus* HD100.**

Muchas especies bacterianas que *Bdellovibrio* puede emplear como células presa tienen la capacidad de acumular gránulos de PHA (p. ej., *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Enterobacter* etc). Sin embargo, esta posibilidad no ha sido nunca estudiada en bacterias depredadoras, a pesar de la importancia de estas últimas en la diversidad de las comunidades microbianas naturales. De hecho, la depredación es un tipo de interacción biológica, que junto con otros como mutualismo, comensalismo, competencia o parasitismo,

contribuye a mantener el equilibrio ecológico en una población (Jurgens, 2007). Como se ha detallado en la *Introducción*, el metabolismo de los PHAs está ampliamente distribuido en la naturaleza y supone una ventaja para los microorganismos que lo producen (Castro-Sowinski *et al.*, 2010; Kadouri *et al.*, 2005; Kalia *et al.*, 2007). Dado el contexto biológico en el que se puede encontrar *Bdellovibrio* en la naturaleza y la identificación de una despolimerasa de mcl-PHA formando parte de su arsenal hidrolítico (Capítulo 1), se han llevado a cabo estudios de depredación comparada de *Bdellovibrio* sobre bacterias en presencia y ausencia de gránulos de PHA en su interior (*P. putida* KT2442 y KT42C1, respectivamente) (Capítulo 2). Los resultados obtenidos han revelado que el número de progenie del depredador es plenamente dependiente de la biomasa residual de la presa (biomasa libre de PHA), y no del contenido de PHA o del número de células de la misma. No obstante, las células de *Bdellovibrio* crecidas sobre *P. putida* KT2442 y KT42Z acumulando PHA alcanzan una velocidad muy superior a las crecidas sobre el mutante *P. putida* KT42C1 incapaz de producir PHA. Esta diferencia se explica por la capacidad de *Bdellovibrio* para hidrolizar y metabolizar un 25% del contenido inicial del PHA de la presa a lo largo de su ciclo de crecimiento (Capítulo 2). Además, las células de *Bdellovibrio* derivadas de *P. putida* KT42C1, adquieren una velocidad de natación similar a las crecidas sobre la cepa silvestre cuando se añade de manera exógena una solución del polímero al co-cultivo (PHA látex). De estos resultados se puede concluir que el PHA es el componente clave que determina la velocidad alcanzada por *Bdellovibrio*. El mecanismo a través del cual los PHAs liberados tras la hidrólisis del polímero son metabolizados por *Bdellovibrio* se puede explicar por su posible degradación hasta acetyl-CoA, que puede canalizarse hacia el ciclo de los ácidos tricarbóxicos (CAT o ciclo de Krebs) para la obtención de energía (ver la Figura 7 del apartado 2.2.1. "Síntesis de PHA" de la *Introducción*). Estos resultados se apoyan a su vez en los mayores niveles intracelulares de ATP cuantificados en estas mismas células de *Bdellovibrio*. Sin embargo, la progenie alcanzada por *Bdellovibrio* predando durante 24 h sobre *P. putida* acumulando PHA no resulta superior a la obtenida predando sobre *P. putida* KT42C1. Una posible explicación para estos resultados es la ausencia del ciclo del glioxilato en *Bdellovibrio*. La ausencia de la enzima clave en este ciclo, la isocitrato liasa, impide la canalización

de intermediarios hacia la ruta gluconeogénica generando biomasa (Kornberg, 1966; Krebs y Johnson, 1937).

La mayor velocidad de natación de los *Bdellovibrios* crecidos sobre presas acumulando PHA permite una mayor eficiencia en la depredación de nuevas bacterias en ambientes líquidos (Capítulo 2), demostrando la importancia del movimiento de *Bdellovibrio* en la búsqueda de nuevas presas. Además, los altos niveles de ATP cuantificados en estas células de *Bdellovibrio* también contribuyen a una mayor eficiencia en la depredación, facilitando el funcionamiento de transportadores implicados en la secreción de enzimas, en la incorporación de los productos resultantes de la hidrólisis de macromoléculas, o en la posterior síntesis de macromoléculas (Rittenberg y Hespell, 1975; Rendulic *et al.*, 2004). Asimismo, el ATP también es necesario para el funcionamiento de los pili tipo IV, esenciales durante el proceso de anclaje a la célula presa y penetración en el espacio periplásmico (Evans *et al.*, 2007; Lambert *et al.*, 2008; Mahmoud y Koval, 2010).

En resumen, este trabajo proporciona nuevas perspectivas acerca del papel crucial del ciclo del PHA en la fisiología de bacterias depredadoras de bacterias. Se ha determinado que la capacidad para degradar PHA confiere a *Bdellovibrio* ventajas a la hora de localizar nuevas presas y adaptarse a condiciones ambientales desfavorables (Capítulo 2).

A la luz de los resultados derivados de esta Tesis Doctoral se pueden presumir las consecuencias derivadas de la depredación de bacterias productoras de PHA dentro de la comunidad microbiana. El ciclo del PHA permite la síntesis y degradación del poliéster según las necesidades de la bacteria productora. Esta capacidad confiere ventajas en el medio ambiente a estas bacterias, ya que pueden llevar a cabo la degradación del PHA en condiciones de escasez de fuente de carbono o por ejemplo, liberar los RHAs al medio extracelular con objeto de tamponar una situación de pH extremo a la que se ve sometida la célula (Wang *et al.*, 2007b). Como se ha comentado en la *Introducción*, todo ello conlleva a la supervivencia y adaptación en el nicho ecológico cuando las condiciones nutricionales son altamente cambiantes (Tal y Okon, 1985; Okon y Itzigsohn, 1992; Kadouri *et al.*, 2005). Tras la muerte de estos

productores, el PHA es liberado al medio y empleado por otros microorganismos mediante la secreción de despolimerasas extracelulares (Handrick y Jendrosseck, 2002). En este contexto, el impacto de los depredadores en las comunidades bacterianas se ve reflejado en la liberación de gránulos de PHA y RHAs tras la depredación y lisis de bacterias productoras (Capítulo 2). Además, el análisis del genoma de *B. bacteriovorus* HD100 ha revelado la existencia de otra despolimerasa de PHA, en este caso de scl-PHA (ORF Bd2637) (Rendulic *et al.*, 2004; Dori-Bachash *et al.*, 2008; Knoll *et al.*, 2009) (Anexo 1) (Capítulo 1). Esta posible despolimerasa ha sido clasificada dentro de la superfamilia de las despolimerasas extracelulares de scl-PHA con dominio catalítico tipo II en la base de datos de despolimerasas (Knoll *et al.*, 2009) (Anexo 1) y su papel en la fisiología de *Bdellovibrio* ha sido previamente discutido (Dori-Bachash *et al.*, 2008). Experimentos de depredación llevados a cabo en el laboratorio con cepas recombinantes de *E. coli* capaces de acumular PHB, han revelado la capacidad de *Bdellovibrio* para infectar dichas presas y degradar completamente el polímero acumulado. El análisis de los sobrenadantes de estos co-cultivos reveló la acumulación en el medio extracelular de los productos de hidrólisis del PHB, en su mayoría trímeros y tetrámeros, posiblemente debido a la acción de dicha despolimerasa de scl-PHA (resultados no incluidos).

Desde el punto de vista biotecnológico, la liberación de gránulos de PHA y de RHAs al sobrenadante de los co-cultivos durante el ciclo de vida de *Bdellovibrio* predando sobre presas productoras de PHA, abre nuevas perspectivas para el diseño de estrategias de cultivo novedosas para la producción industrial de PHA y de los compuestos quirales que lo conforman (Capítulo 2) (ver apartado 3. “Producción industrial de PHAs y de compuestos enantiopuros” de la *Discusión Integradora*).

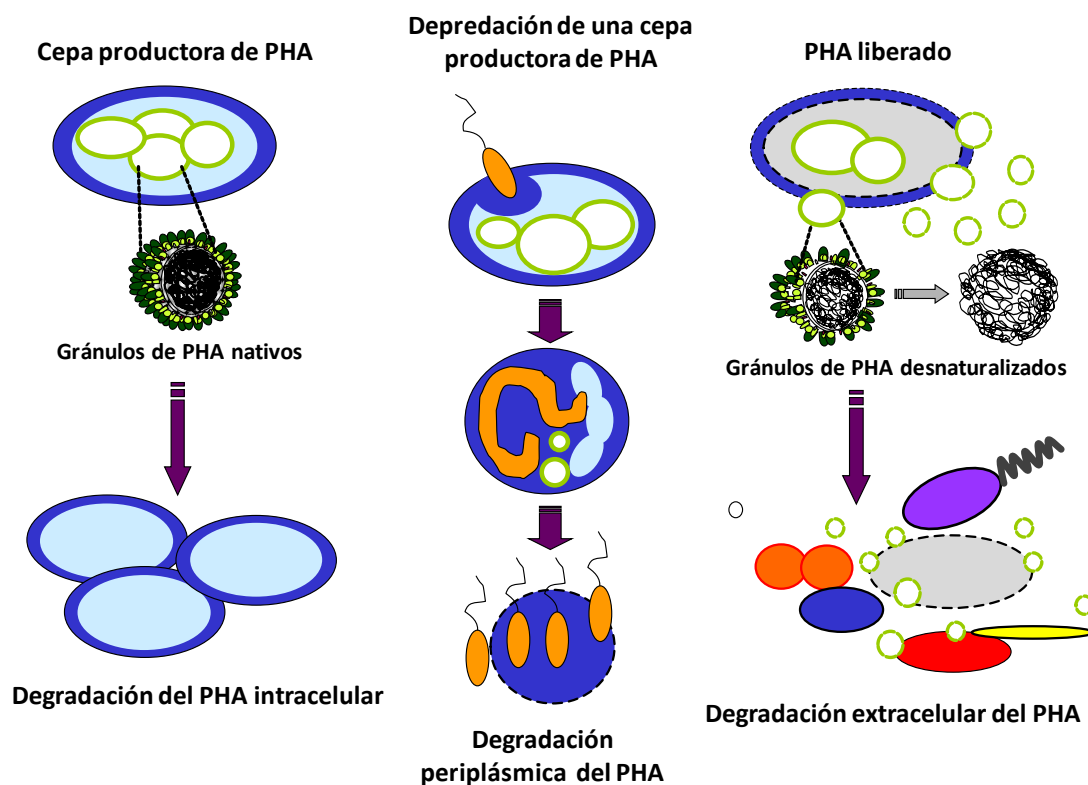
## **2. Degradación periplásmica del PHA.**

Como ya se ha comentado en la *Introducción*, dentro de la degradación de los PHAs hay que diferenciar entre la degradación intracelular y la extracelular, llevadas a cabo gracias a la acción de despolimerasas intracelulares y extracelulares, respectivamente (ver apartado 2. “El papel del PHA en la fisiología microbiana” de la

*Introducción*) (Jendrossek y Handrick, 2002; Knoll *et al.*, 2009) (Anexo 1). Hay que señalar que se ha propuesto una localización periplásmica para la despolimerasa de PHB de *Rhodospirillum rubrum*, PhaZ1<sub>Rru</sub> (Handrick *et al.*, 2004; Sznajder y Jendrossek, 2011). Sin embargo, el significado fisiológico de la localización subcelular de esta despolimerasa permanece desconocido y además, resulta improbable dado que el polímero es acumulado en el citoplasma celular. Asimismo, la identificación de otras despolimerasas intracelulares de scl-PHA en *R. rubrum* cuestiona los resultados, ya que podrían ser las verdaderas causantes de la actividad despolimerasa descrita en la fracción soluble de esta bacteria.

La existencia de una despolimerasa específica de mcl-PHA en el depredador *B. bacteriovorus* HD100 y la capacidad del mismo para degradar el gránulo de PHA acumulado por *P. putida* y emplearlo como fuente de carbono y energía ha sido ampliamente demostrada a lo largo de esta Tesis Doctoral (Capítulos 1 y 2). Estos resultados permiten reconsiderar, entre otras cosas, la actual clasificación de las despolimerasas de PHA e incluir entre las despolimerasas intracelulares y extracelulares, las despolimerasas periplásmicas. De esta manera, se proponen tres tipos de degradación del PHA: la degradación intracelular, la extracelular y la periplásmica (Figura 13)

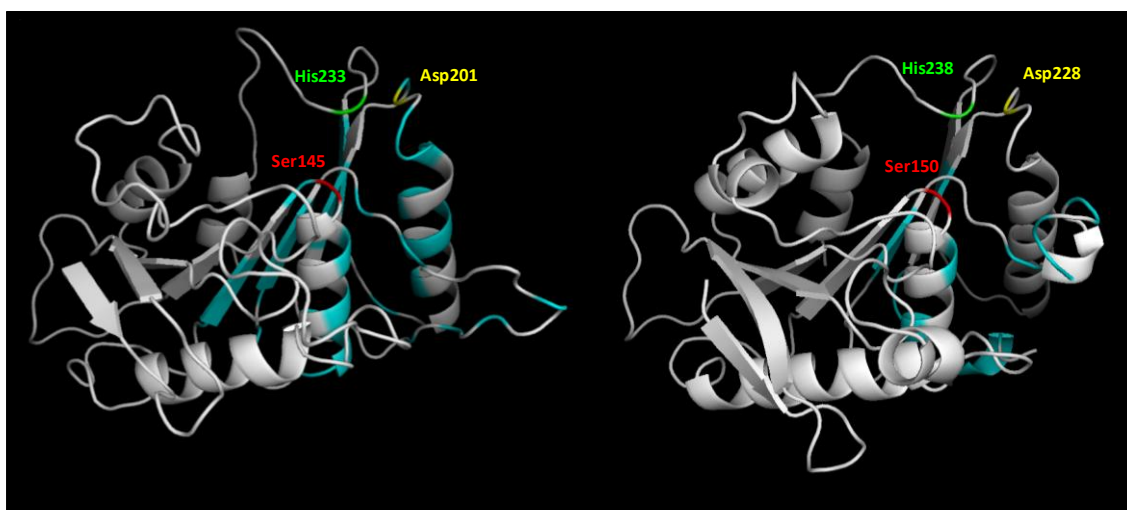
Los genes *pha* han estado sujetos a un proceso de transferencia horizontal entre distintos grupos filogenéticos (Kalia *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2007). El análisis de la secuencia aminoacídica de PhaZ<sub>Bd</sub> reveló la alta similitud existente entre esta despolimerasa y la despolimerasa extracelular prototipo de *P. fluorescens* GK13 (Capítulo 1). Esta observación, unida a la de que *Bdellovibrio* puede crecer a expensas de cepas del género *Pseudomonas*, sugiere la posibilidad de que haya existido transferencia horizontal de genes codificantes para despolimerasas de mcl-PHA entre ambas bacterias. Sin embargo, análisis del contenido en G+C y del uso de codones de la región codificante para PhaZ<sub>Bd</sub> en el genoma de *Bdellovibrio* sugirió una adquisición antigua de este gen. Por otro lado, el análisis de las regiones flanqueantes del gen *phaZ<sub>Bd</sub>* en el genoma de *B. bacteriovorus* HD100 reveló la ausencia de genes relacionados con el metabolismo de PHA en esta bacteria depredadora (Capítulo 1).



**Figura 13. Tipos de degradación del PHA teniendo en cuenta la degradación periplásmica del polímero acumulado por la presa llevada a cabo por *B. bacteriovorus* HD100.** Compárese con la Figura 9 del apartado 2.2.3. “Degradación extracelular de PHA” de la *Introducción*.

Dada la alta similitud de secuencia existente entre PhaZ<sub>Bd</sub> y PhaZ<sub>GK13</sub> se considera necesario un estudio comparativo de la estructura y función de ambas enzimas. Tanto PhaZ<sub>GK13</sub> como PhaZ<sub>Bd</sub> han sido clasificadas dentro de la superfamilia de las despolimerasas extracelulares de mcl-PHA en la base de datos de despolimerasas (Knoll *et al.*, 2009) (Anexo 1). Ambas despolimerasas son altamente específicas de mcl-PHA, y su estructura primaria no presenta una similitud significativa con la de las despolimerasas de scl-PHA, excepto por la caja lipasa (Gly-Ile-Ser-Ser-Gly), también presente en otras serín-hidrolasas, como lipasas, esterases y serín proteasas (Arpigny y Jaeger, 1999) y también por la presencia de algunos residuos conservados en el centro activo (Schirmer *et al.*, 1995). Hasta la fecha, no se ha resuelto la estructura tridimensional de ninguna despolimerasa de mcl-PHA pero sí se ha propuesto un modelo tridimensional para PhaZ<sub>GK13</sub> en comparación con el de la despolimerasa intracelular de mcl-PHA de *P. putida* KT2442, PhaZ<sub>KT</sub> (de Eugenio *et al.*, 2007; 2008)

(Figura 14B). Este modelo confirmó la identidad de los residuos que constituyen la triada catalítica de PhaZ<sub>GK13</sub> y los localizó en la superficie del núcleo  $\alpha/\beta$  hidrolasa. Por consiguiente, se ha llevado a cabo el modelado de la estructura terciaria de PhaZ<sub>Bd</sub> empleándose como modelo la dipeptidil aminopeptidasa IV de *Stenotrophomonas maltophilia* con la que mostraba una identidad del 14% (Nakajima *et al*, 2008) (Figura 14A).



**Figura 14. Representación esquemática del modelo estructural de las despolimerasas extracelulares de mcl-PHA de *B. bacteriovorus* HD100 (A) y *P. fluorescens* GK13 (B).** Se muestra la triada catalítica de las enzimas: serina (Ser, en rojo), Aspártico (Asp, en amarillo) e Histidina (His, en verde). Las posiciones de los residuos corresponden a la proteína madura. En azul se indican los residuos hidrofóbicos que rodean el centro activo.

Según el modelo propuesto para PhaZ<sub>Bd</sub> (Figura 14A), el plegamiento de la enzima se corresponde al modelo  $\alpha/\beta$  hidrolasa en el que es característico un núcleo de láminas  $\beta$  paralelas rodeadas por hélices  $\alpha$ . Asimismo, se confirma que los residuos Ser<sub>145</sub>, Asp<sub>201</sub> e His<sub>233</sub> constituyen la triada catalítica de la enzima, al encontrarse en la superficie del núcleo  $\alpha/\beta$  hidrolasa. Al igual que ocurre en PhaZ<sub>GK13</sub>, estos residuos se encuentran totalmente expuestos al solvente, localizados en una región hidrofóbica implicada posiblemente en la interacción con el polímero. En cuanto a los productos de la reacción, PhaZ<sub>Bd</sub> hidroliza poli (3-hidroxihexanoato-*co*-3-hidroxi octanoato) [P(HH-*co*-HO)], siendo el principal producto de la reacción el dímero de 3-hidroxi octanoato, al igual que ocurre con PhaZ<sub>GK13</sub> (Schirmer *et al.*, 1993; 1994; Gangoiti *et al.*, 2010).

Además de dímeros, PhaZ<sub>Bd</sub> también libera monómeros y trímeros por lo que se ha clasificado como exo-endohidrolasa (Capítulos 1 y 2).

A pesar de la alta similitud entre PhaZ<sub>GK13</sub> y PhaZ<sub>Bd</sub> cabe destacar la notable diferencia en la estructura primaria del péptido señal de ambas despolimerasas. En principio, las secuencias de dichos péptidos (de aproximadamente 20 aminoácidos, de los que varios presentan carga positiva en el extremo amino terminal, además de una secuencia de 10 a 20 aminoácidos hidrofóbicos) indican la secreción de las proteínas vía el sistema de secreción tipo II (SSTII) (Pugsley, 1993). Esta vía también se conoce como sistema general de secreción y tiene lugar en dos etapas. Primeramente, la maquinaria Sec transloca el sustrato con el péptido señal a través de la membrana plasmática, por lo que el SSTII es una vía Sec-dependiente. En una segunda etapa, la proteína pierde el péptido señal y adquiere su conformación nativa en el espacio periplásmico, para posteriormente ser secretada a través de la membrana externa por un complejo sistema multiproteico llamado tipo II o secretón (Pugsley, 1993).

Sin embargo, la baja similitud de la secuencia aminoacídica entre ambos péptidos podría explicar la diferente localización subcelular de las despolimerasas cuando se expresan de manera heteróloga en cepas de *E. coli* o *P. putida*. Como ya se ha indicado anteriormente, a pesar de la existencia del péptido señal, la proteína PhaZ<sub>Bd</sub> procesada se acumula en el espacio periplásmico (Capítulo 1), mientras que PhaZ<sub>GK13</sub> es secretada al medio extracelular (de Eugenio, 2009). Estos resultados se correlacionan a su vez con la detección de la actividad despolimerasa de PhaZ<sub>Bd</sub> en la fracción soluble de los co-cultivos de *Bdellovibrio* creciendo sobre *P. putida* y no en los sobrenadantes (Capítulo 2), ya que la despolimerasa es secretada por el depredador, pero en principio, ésta no se libera desde el periplasma de la presa al medio extracelular.

### 3. Aplicaciones biotecnológicas: producción industrial de PHAs y de compuestos enantiopuros

Como ya se ha comentado en la *Introducción*, los PHAs son una extensa familia de polímeros con diferentes propiedades que han sido ampliamente estudiados en virtud de su naturaleza biodegradable y sus múltiples aplicaciones. Estos biopolímeros presentan gran interés a nivel industrial, médico, farmacéutico, agrícola y medioambiental (Madison y Huisman, 1999; Zinn *et al.*, 2001; Chen y Wu, 2005a; Valappil *et al.*, 2006; Philip *et al.*, 2007; Chen, 2009; Gao *et al.*, 2011; Rai *et al.*, 2011).

Actualmente, como consecuencia del problema de contaminación medioambiental que ha generado el uso de los plásticos convencionales derivados de la industria petroquímica y el incremento del precio del petróleo, se está haciendo una apuesta clara por la implantación de procesos de tipo sostenible para la obtención de energía y la producción de materiales de alto consumo como son los polímeros plásticos como el PHA (Gavrilescu y Chisti, 2005; Chen, 2009; Thompson *et al.*, 2009). Sin embargo, la producción industrial de PHA aún mantiene un alto coste de producción en comparación con los plásticos convencionales. Además, el estudio del PHA no sólo resulta interesante por su utilización como plástico biodegradable, sino por el posible empleo de estos polímeros como fuente de RHAs enantioméricamente puros, los cuales son precursores de productos de alto valor añadido en la industria químico-farmacéutica (Chen y Wu, 2005; Ren *et al.*, 2005; de Eugenio *et al.*, 2010a).

Dado que el PHA es un componente intracelular, resulta indispensable el desarrollo de sistemas de extracción eficaces y sostenibles para abaratar el coste final del bioproducto (Prieto, 2007). Por esta razón, durante la presente Tesis Doctoral se han diseñado sistemas de producción de PHAs y de los intermediarios enantiopuros que los conforman, de tal manera que la extracción del bioproducto resulta menos costosa energéticamente y medioambientalmente menos contaminante, facilitando así el proceso de producción industrial.

### 3.1. Mejora de los sistemas de procesamiento de biomasa bacteriana para la producción industrial de PHA

Como se ha comentado en la *Introducción*, el coste total del proceso de producción de PHA mediante fermentación bacteriana se ve condicionado principalmente por factores como la fuente de carbono empleada, el proceso de fermentación, y la extracción y purificación del polímero (Sun *et al.*, 2007; Elbahloul y Steinbüchel, 2009; Chen, 2010). Con el objetivo de abaratar el coste total de la producción industrial del PHA, muchos de los esfuerzos en la comunidad científica están enfocados hacia la optimización del proceso de extracción del polímero, habiéndose desarrollado una gran variedad de sistemas, mayoritariamente para la extracción de scl-PHA (Jacquel *et al.*, 2008; Kunasundari y Sudesh, 2011). Los principales procesos se resumen en la Figura 14. Varios trabajos han descrito métodos de disrupción mecánica, como la homogenización a alta presión, el uso de perlas de vidrio, o la ultrasonificación (Tamer *et al.*, 1998; Ghatnekar *et al.*, 2002; Hwang *et al.*, 2006). También se ha descrito la recuperación del PHA mediante el uso de disolventes orgánicos como el cloroformo, cloruro de metileno, carbonato de propileno o dicloroetano (Ramsay *et al.*, 1994; Gorenflo *et al.*, 2001; Fiorese *et al.*, 2009). Además, existen métodos de extracción mediante digestión química con hipoclorito sódico o detergentes (Berger *et al.*, 1989; Kim *et al.*, 2003; Thakor *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2011) y digestión enzimática mediante el uso de cócteles enzimáticos (Harrison *et al.*, 1991; de Koning y Witholt., 1997; Kellerhals *et al.*, 1999; Kapritchkoff *et al.*, 2006; Yasotha *et al.*, 2006). Finalmente, se ha conseguido la extracción del polímero mediante estrategias como el fluido supercrítico, la fragilidad celular, la flotación por espuma o la liberación espontánea (Page *et al.*, 1993; Hejazi *et al.*, 2003; Khosravi-Darani *et al.*, 2004; Jung *et al.*, 2005; van Hee *et al.*, 2006). Cabe destacar que pocos trabajos describen sistemas para la extracción de mcl-PHA, y se únicamente se basan en el uso de cócteles enzimáticos o métodos de flotación por espuma (van Hee *et al.*, 2006; Yasotha *et al.*, 2006).

En líneas generales, las principales desventajas de la mayoría de estos métodos son el uso de solventes orgánicos tóxicos y volátiles, que provocan procesos peligrosos, energéticamente poco eficientes y medioambientalmente contaminantes. Asimismo,

los métodos de disrupción mecánicos requieren del empleo de un equipamiento complejo y costoso, además de un gasto de energía. Por último, los procedimientos químicos necesitan del uso de altas cantidades de detergente y agentes quelantes que encarecen los costes de producción y generan contaminantes. Además, en su mayoría, estos métodos de recuperación del PHA se realizan después de pre-tratamientos de la biomasa bacteriana que faciliten la posterior disrupción celular (p.ej., calor, congelación, tratamientos alcalinos o sal), lo que también encarece y complica el proceso de extracción (Williams *et al.*, 1999; Furrer *et al.*, 2007; Jacquel *et al.*, 2008; Elbahloul y Steinbüchel, 2009).

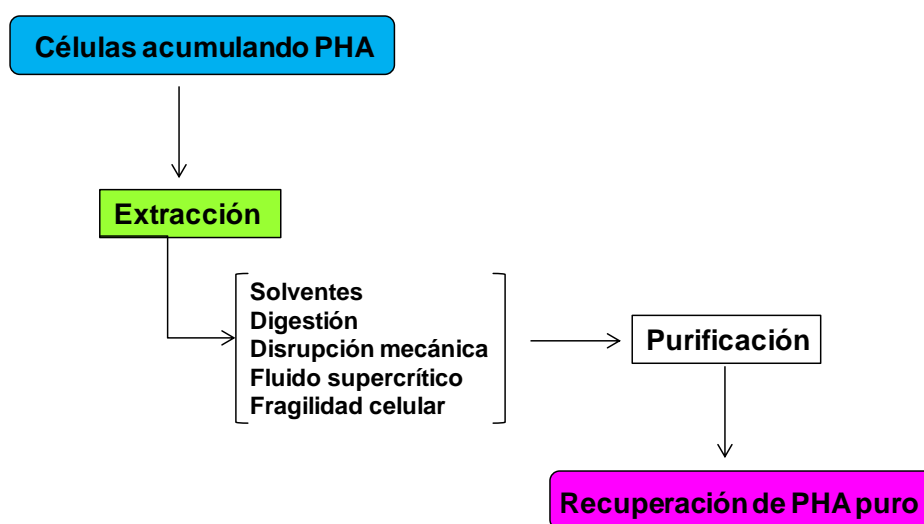


Figura 14. Principales estrategias de purificación de PHA.

La complejidad de los sistemas de extracción de PHA descritos supone un obstáculo para reducir tanto los costes de producción como la contaminación medioambiental a la hora de escalar el proceso a nivel industrial. Por todo ello, el desarrollo de nuevos métodos o procesos para la producción y extracción de PHAs de las bacterias de forma competitiva y ecológica, se ha convertido en un objetivo fundamental para esta actividad industrial.

En este sentido, se ha propuesto el diseño de sistemas que permitan la producción extracelular de los gránulos (Prieto, 2007). Sabirova *et al.* (2006) describieron el depósito extracelular, mediante un mecanismo desconocido, de los

gránulos de PHA producidos por *Alcanivorax borkumensis*. Una alternativa son los sistemas de lisis celular mediante el uso de enzimas líticas. El empleo de genes de bacteriófagos que codifican enzimas líticas para romper células acumulando PHB ha sido descrito en *Bacillus megaterium* (Hori *et al.*, 2002) y en cepas recombinantes de *E. coli* (Fidler y Dennis, 1992; Resch *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 2000). A pesar de que esta tecnología parece ser una de las más eficientes y económicas para recuperar el PHA, no ha sido testada en bacterias productoras de mcl-PHA (Chen, 2010).

Por consiguiente, un objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido el diseño de sistemas de procesado de la biomasa bacteriana que faciliten la producción industrial de mcl-PHA (Capítulos 2 y 3). Estos sistemas permiten la recuperación del PHA de forma competitiva y ecológica, lo que relativiza el coste de producción en relación al precio final del producto. Por un lado, el estudio del ciclo de vida de *Bdellovibrio* predando sobre *P. putida* KT2442 acumulando mcl-PHA ha permitido el diseño de estrategias de cultivo potentes e innovadoras de gran interés para la producción tanto de PHAs como de RHAs enantiopuros (Capítulo 2). Como se ha demostrado, la rápida acción lítica de *Bdellovibrio* conlleva la lisis celular de *P. putida* KT2442 en menos de 15 h, liberando un 50% del PHA acumulado al medio extracelular. La recuperación de prácticamente la totalidad de los gránulos de PHA liberados, con una pureza del 99%, se realizó mediante la disolución de la biomasa húmeda (sin necesidad de pre-tratamientos) en etil acetato y posterior precipitación con metanol (Capítulo 2). Este sistema de extracción está siendo actualmente optimizado en el laboratorio mediante la construcción de un mutante *knock out* de *Bdellovibrio* en el gen *phaZ<sub>Bd</sub>*. A pesar de la rapidez, facilidad y escaso coste económico de este sistema de procesado de la biomasa, hay que tener en cuenta que el proceso de escalado, desde la selección y desarrollo de las cepas adecuadas, pasando por la optimización de los cultivos en matraz y en plantas piloto, hasta llegar a las condiciones óptimas de producción industrial, implica una elevada inversión en concepto de investigación y desarrollo (Chen, 2009). Por el contrario, el sistema autolítico diseñado en *P. putida* KT2440 con el objetivo de facilitar la recuperación del mcl-PHA (Capítulo 3) supone una ventaja a nivel de escalado industrial. Como se ha comentado anteriormente, este tipo de sistemas de extracción no han sido desarrollados en cepas productoras de mcl-PHA. La

cepa de *P. putida* KT2440 diseñada en esta Tesis Doctoral comprende un sistema lítico heterólogo compuesto por una holina (Ejh) y una enzima lítica (Ejl) del fago EJ-1 de *Streptococcus pneumoniae* (Díaz *et al.*, 1996) (Capítulo 3). En la mayoría de los fagos estas proteínas actúan de manera perfectamente coordinada en la rotura de la pared celular del huésped. Los genes que codifican estas proteínas suelen estar contiguos y su transcripción y traducción es tardía, iniciándose sólo cuando los viriones están en su última fase de empaquetamiento dentro del citoplasma bacteriano. Las holinas constituyen un grupo de proteínas fágicas de estructura primaria muy variada pero muy similares en su modo de acción. Son proteínas pequeñas, con dominios transmembranales que se localizan en la membrana citoplásmica formando un poro o agujero que en un momento genéticamente programado permite el paso de la enzima lítica (endolisina) encargada de romper la pared bacteriana y provocar la lisis (Wang *et al.*, 2000).

A pesar de que la expresión del casete Ejh-Ejl en *P. putida* acumulando PHA provoca una disminución de la viabilidad celular, la presencia de los gránulos de PHA confiere resistencia a la lisis, incluso en presencia de determinados agentes químicos (Capítulo 3). Por esta razón, este sistema lítico fue transferido a mutantes de *P. putida* KT2440 en el sistema Tol-pal (Capítulo 3). El complejo Tol-pal está localizado en la envoltura celular de las bacterias Gram-negativas y es crítico para el mantenimiento de su estructura (Figura 8, Capítulo 3). La alteración de estas proteínas conduce a situaciones de debilitamiento de la célula e incremento de la sensibilidad a detergentes o agentes quelantes (Llamas *et al.*, 2000; 2003). La cepa de *P. putida* KT2440 diseñada en esta Tesis facilita la recuperación del PHA mediante la disolución de la biomasa húmeda en etil acetato, tras su incubación con pequeñas cantidades de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y SDS. Este método permite la recuperación de más de un 40% del PHA producido por *P. putida*, con una pureza del 98% (Capítulo 3). El uso de cepas mutantes en el sistema Tol-pal no solo ha permitido el desarrollo de este sistema lítico en *P. putida* KT2440, sino también la liberación al medio extracelular de la despolimerasa PhaZ<sub>Bd</sub> expresada en *E. coli* y *P. putida*, facilitando así su purificación y posterior caracterización, quedando patente la amplia aplicación de estos mutantes. Finalmente, hay que señalar que el uso de estos sistemas líticos no se

restringe únicamente a la producción de PHAs, sino también a otros compuestos de interés producidos mediante fermentación bacteriana.

### 3.2. Sistemas de producción de monómeros y oligómeros enantiopuros

Como se ha comentado anteriormente, los monómeros y oligómeros de PHA son importantes componentes con considerables aplicaciones biotecnológicas. Se ha demostrado que algunos RHAs son compuestos con actividad antimicrobiana, insecticida, antiviral, e incluso se han descrito RHAs como agentes antitumorales como la *hapalosina* y el *ONO-4007* (de Roo *et al.*, 2002). Los RHAs son sintones para la fabricación de vitaminas, aromatizantes, antibióticos y feromonas. Así, por ejemplo, el (*R*)-3-hidroxi-butirato se utiliza para la síntesis de *Tienamicina* y *Captopril* (Ohashi y Hasegawa, 1992) y el (*R*)-4-ciano-3-hidroxi-butirato es un intermediario muy importante en la fabricación del *Lipitor*, un medicamento para el control de los niveles de colesterol (Roth, 2002).

En los últimos años, se han descrito diferentes métodos para la síntesis de RHAs. Por un lado, estas moléculas se pueden sintetizar químicamente, o bien se pueden obtener mediante hidrólisis química del PHA (Chen y Wu, 2005; Ren *et al.*, 2010). Sin embargo, una alternativa más favorable para la obtención de RHAs es la despolimerización enzimática del polímero. En este caso, la hidrólisis del PHA se puede llevar a cabo *in vivo* o *in vitro*. La despolimerización del PHA *in vivo* se basa en la incubación de las bacterias en condiciones que favorecen la liberación de los RHAs al exterior celular, gracias a la actividad de despolimerasas intracelulares (Lee *et al.*, 1999; Ren *et al.*, 2005; Ruth *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007; de Eugenio *et al.*, 2010a). Por otro lado, la despolimerización *in vitro* del polímero se puede llevar a cabo mediante el uso de biocatalizadores celulares o enzimáticos, consistentes en bacterias productoras de despolimerasas extracelulares o bien de las despolimerasas purificadas, respectivamente (de Eugenio *et al.*, 2010; Gangoiti *et al.*, 2010). En este contexto, el estudio de la degradación del PHA en *Bdellovibrio* (Capítulos 1 y 2), ha permitido diseñar estrategias de gran interés para la producción de compuestos quirales. La actividad de PhaZ<sub>Bd</sub> a lo largo del crecimiento de *Bdellovibrio* sobre *P.*

*putida* KT2442 y *E. coli* acumulando PHA, provoca la liberación de RHAs al medio extracelular (Capítulo 2). Este novedoso sistema abre nuevas perspectivas para el diseño de sistemas industriales de producción de compuestos de interés como el PHA o los RHAs mediante el uso de bacterias depredadoras. Además, la despolimerasa de mcl-PHA de *B. bacteriovorus* HD100 caracterizada en esta Tesis es un potencial biocatalizador cuyo uso para la producción de intermediarios enantiopuros podría resultar de interés biotecnológico en la producción industrial de estos compuestos quirales (Capítulo 1) (ver apartado 2. “Degradación periplásmica del PHA” de la *Discusión Integradora*). Por otro lado, el estudio de despolimerasas de PHA resulta también interesante debido a su posible aplicación en la síntesis de polímeros en medio orgánico, tradicionalmente llevada a cabo por enzimas de la familia de las lipasas (Kumar *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2012).

Finalmente, los resultados alcanzados en esta Tesis Doctoral suponen un importante avance para la producción de PHA a nivel industrial y han permitido el desarrollo de dos patentes. En la patente PCTES2010070858 (licenciada por Biopolis S.L.) se describe un sistema de autólisis celular en *P. putida* KT2440 que facilita la extracción y recuperación del gránulo de mcl-PHA acumulado en el interior celular (Anexo 2). La segunda patente está en vías de solicitud, y se refiere al uso de *B. bacteriovorus* HD100 como herramienta biotecnológica para lograr la lisis de cepas productoras de compuestos de interés, como el PHA o los intermediarios enantiopuros (Anexo 3).



## V. CONCLUSIONES



---

El trabajo descrito a lo largo de esta Tesis Doctoral ha dado lugar a las siguientes conclusiones:

1. Se ha demostrado la capacidad de *B. bacteriovorus* HD100 para preda sobre la cepa de *P. putida* KT2442 acumulando gránulos de PHA.
2. La ORF Bd3709 de *B. bacteriovorus* HD100 codifica una exo-endo-despolimerasa específica de mcl-PHA (PhaZ<sub>Bd</sub>) que presenta una estructura típica de  $\alpha/\beta$  hidrolasas.
3. El principal producto de la reacción *in vitro* es el dímero del ácido (R)-3-hidroxi octanoico, aunque también genera los monómeros y los trímeros. Por tanto, la proteína PhaZ<sub>Bd</sub> caracterizada podría utilizarse como biocatalizador para la producción de hidroxiácidos enantiopuros y sus derivados.
4. PhaZ<sub>Bd</sub> se acumula en su forma activa en el espacio periplásmico de las cepas recombinantes de *E. coli* y *P. putida* cuando el gen de la despolimerasa se expresa de manera heteróloga.
5. La despolimerasa PhaZ<sub>Bd</sub> se produce de manera constitutiva durante todo el ciclo de vida de *B. bacteriovorus* cuando preda sobre *P. putida*.
6. La caracterización de PhaZ<sub>Bd</sub> ha permitido reconsiderar la actual clasificación de las despolimerasas de PHA. Se proponen tres tipos de degradación del PHA: la degradación intracelular, la extracelular y la periplásmica.
7. *B. bacteriovorus* hidroliza parcialmente el PHA de la presa *in vivo* generando monómeros y oligómeros de PHA en proporción similar a la identificada en las reacciones de hidrólisis *in vitro* con la proteína purificada.
8. El número de progenie del depredador es plenamente dependiente de la biomasa residual de la presa (biomasa libre de PHA), y no del número de células o del contenido de PHA de la misma.
9. La depredación de cepas productoras de PHA supone una ventaja fisiológica para *B. bacteriovorus* en términos de velocidad natatoria y eficiencia en la depredación de nuevas presas.
10. El conocimiento derivado del estudio del catabolismo de los PHAs en *Bdellovibrio* ha permitido el desarrollo de un nuevo sistema de procesado de la

biomasa bacteriana, consistente en el uso de depredadores para la lisis celular en procesos de fermentación para la generación de bioproductos intracelulares.

11. Se ha desarrollado una cepa recombinante derivada de *P. putida* KT2440 (*P. putida* BXHL) que permite la extracción del PHA de forma controlada mediante la adición de un inductor de la lisis celular.
12. La cepa *P. putida* BXHL es un mutante *tolB* y porta un sistema de autólisis celular insertado en cromosoma compuesto por una holina (Ejh) y una enzima lítica (Ejl) del fago EJ-1 de *S. pneumoniae*.



## **VI. BIBLIOGRAFÍA**



**Abraham, G.A., Gallardo, A., San Román, J., Olivera, E.R., Jodra, R., García, B., Minambres, B., García, J.L. y Luengo, J.M.** (2001) Microbial synthesis of poly(b-hydroxyalkanoates) bearing phenyl groups from *Pseudomonas putida*: chemical structure and characterization. *Biomacromolecules*. 2: 562-567.

**Arpigny, J.L., y Jaeger, K.E.** (1999) Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem. J.* 343: 177-183.

**Atterbury, R.J., Hobley, L., Till, R., Lambert, C., Capeness, M.J., Lerner, T.R., Fenton, A.K., Barrow, P., y Sockett, R.E.** (2011) Effects of orally administered *Bdellovibrio bacteriovorus* on the well-being and *Salmonella* colonization of young chicks. *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 5794-5803.

**Barel, G., y Jurkevitch, E.** (2001) Analysis of phenotypic diversity among host-independent mutants of *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J. *Arch. Microbiol.* 176: 211-216.

**Braunegg, G., Lefebvre, G., y Genser, K.F.** (1998) Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: physiological and engineering aspects. *J. Biotechnol.* 65: 127-161.

**Bierman, M., Logan, R., O'Brien, K., Seno, E.T., Nagaraja Rao, R., y Schoner, B.E.** (1992) Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Gene*. 116: 43-49.

**Burnham, J.C., Collart, S.A., y Highison, B.W.** (1981) Entrapment and lysis of the cyanobacterium *Phormidium luridum* by aqueous colonies of *Myxococcus xanthus* Pco2. *Arch. Microbiol.* 129: 285-294.

**Campisano, A., Overhage, J., y Rehm, B.H.** (2008) The polyhydroxyalkanoate biosynthesis genes are differentially regulated in planktonic- and biofilm-grown *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biotechnol.* 133: 442-452.

**Castro-Sowinski, S., Burdman, S., Matan, O., y Okon, Y.** (2010) Natural functions of bacterial polyhydroxyalkanoates, p. 39-61. *In* Chen, Guo Qiang (ed.), *Plastics from bacteria*, vol. 14. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

**Cevallos, M.A., Encarnación, S., Leija, A., Mora, Y., y Mora, J.** (1996) Genetic and physiological characterization of a *Rhizobium etli* mutant strain unable to synthesize poly- $\beta$ -hydroxybutyrate. *J. Bacteriol.* 178: 1646-1654.

**Chen, G.Q.** (2009) A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. *Chem. Soc. Rev.* 38: 2434-2446.

**Chen, G.Q.** (2010) Plastics completely synthesized by bacteria: polyhydroxyalkanoates, p. 17-37. *In* Chen, G. Q. (ed.), *Plastics from bacteria*, vol. 14. Springer, Berlin Heidelberg.

**Chen, G.Q. y Wu, Q.** (2005) Microbial production and applications of chiral hydroxyalkanoates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67: 592-599.

**Choi, J.L., y Lee, S.Y.** (1997) Process analysis and economic evaluation for poly(3-hydroxybutyrate) production by fermentation. *Bioprocess Eng.* 17: 335-3342.

**Clarke, P.H.** (1982). The metabolic versatility of pseudomonads. *Antonie Van Leeuwenhoek* 48: 105-130.

**Cotter, T.W., y Thomashow, M.F.** (1992a) A conjugation procedure for *Bdellovibrio bacteriovorus* and its use to identify DNA sequences that enhance the plaque-forming ability of a spontaneous host-independent mutant. *J. Bacteriol.* 174: 6011-6017.

**Cotter, T.W., y Thomashow, M.F.** (1992b) Identification of a *Bdellovibrio bacteriovorus* genetic locus, hit, associated with the host-independent phenotype. *J. Bacteriol.* 174: 6018-6024.

**Cover, W.H., Martínez, R.J., y Rittenberg, S.C.** (1984) Permeability of the boundary layers of *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J and its bdelloplasts to small hydrophilic molecules. *J. Bacteriol.* 157: 385-390.

**Davidov, Y., Huchon, D., Koval, S.F., y Jurkevitch, E.** (2006) A new alpha-proteobacterial clade of *Bdellovibrio*-like predators: implications for the mitochondrial endosymbiotic theory. *Environ. Microbiol.* 8: 2179-2188.

**Davidov, Y. y Jurkevitch, E.** (2004) Diversity and evolution of *Bdellovibrio*-and-like organisms (BALOs), reclassification of *Bacteriovorax starrii* as *Peredibacter starrii* gen. nov., comb. nov., and description of the *Bacteriovorax-Peredibacter* clade as *Bacteriovoracaceae* fam. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 1439-1452.

**Davidov, Y., y Jurkevitch, E.** (2009) Predation between prokaryotes and the origin of eukaryotes. *Bioessays* 31: 748-757.

**Dawes, E.A., y Senior, P.J.** (1973) The role and regulation of energy reserve polymers in micro-organisms. *Adv. Microb. Physiol.* 10: 135-266.

**de Eugenio, L.I.** (2009) Estudio bioquímico, genético y fisiológico de la degradación intracelular de polihidroxicanoatos en *Pseudomonas putida*: aplicaciones biotecnológicas. Tesis Doctoral Thesis, Universidad Complutense de Madrid, Madrid.

**de Eugenio, L.I., Escapa, I.F., Morales, V., Dinjaski, N., Galán, B., García, J.L. y Prieto, M.A.** (2010a) The turnover of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas putida* KT2442 and the fundamental role of PhaZ depolymerase for the metabolic balance. *Environ. Microbiol.* 12: 207-221.

**de Eugenio, L.I., Galán, B., Escapa, I.F., Maestro, B., Sanz, J.M., García, J.L. y Prieto, M.A.** (2010b) The PhaD regulator controls the simultaneous expression of the pha genes involved in polyhydroxyalkanoate metabolism and turnover in *Pseudomonas putida* KT2442. *Environ. Microbiol.* 12: 1591-1603.

**de Eugenio, L.I., García, J.L., García, P., Prieto, M.A. y Sanz, J.M.** (2008) Comparative analysis of the physiological and structural properties of a medium chain length polyhydroxyalkanoate depolymerase from *Pseudomonas putida* KT2442. *Eng. Life Sci.* 8: 260-267.

**de Eugenio, L.I., García, P., Luengo, J.M., Sanz, J.M., Roman, J.S., García, J.L. y Prieto, M.A.** (2007) Biochemical evidence that *phaZ* gene encodes a specific intracellular medium chain length polyhydroxyalkanoate depolymerase in *Pseudomonas putida* KT2442: characterization of a paradigmatic enzyme. *J. Biol. Chem.* 282: 4951-4962.

**de Koning, G.J.M., Kellerhals, M., van Meurs, C., y Witholt, B.** (1997) A process for the recovery of poly(hydroxyalkanoates) from pseudomonads. Part 2: process development and economic evaluation. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 17: 15-21.

**de Roo, G., Ren, Q., Witholt, B. y Kessler, B.** (2000) Development of an improved *in vitro* activity assay for medium chain length PHA polymerases based on Coenzyme A release measurements. *J. Microbiol. Methods.* 41: 1-8.

**de Roo, G., M.B. Kellerhals, Q. Ren , B. Witholt and B. Kessler.** (2002). Production of chiral R-3-hydroxyalkanoic acids and R-3-hydroxyalkanoic acid methylesters via hydrolytic degradation of polyhydroxyalkanoate synthesized by pseudomonads. *Biotechnol. Bioeng.* 77:717-722.

**Díaz, E., Munthali, M., Lunsdorf, H., Holtje, J.V., y Timmis, K.N.** (1996) The two-step lysis system of pneumococcal bacteriophage EJ-1 is functional in gram-negative bacteria: triggering of the major pneumococcal autolysin in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 19: 667-681.

**Dori-Bachash, M., Dassa, B., Pietrokovski, S. y Jurkevitch, E.** (2008) Proteome-based comparative analyses of growth stages reveal new cell cycle-dependent functions in the predatory bacterium *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 7152-7162.

**dos Santos, V.A.P.M., Heim, S., Moore, E.R.B., Strätz, M. y Timmis, K.N.** (2004) Insights into the genomic basis of niche specificity of *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* 6: 1264-1286.

**Durner, R., Zinn, M., Witholt, B. y Egli, T.** (2001) Accumulation of poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] in *Pseudomonas oleovorans* during growth in batch and chemostat culture with different carbon sources. *Biotechnol. Bioeng.* 72: 278-288.

**Dwidar, M., Monnappa, A.K. y Mitchell, R.J.** (2012) The dual probiotic and antibiotic nature of *Bdellovibrio bacteriovorus*. *BMB Rep.* 45: 71-78.

**Dworkin, M.** (1999) Fibrils as extracellular appendages of bacteria: their role in contact-mediated cell-cell interactions in *Myxococcus xanthus*. *Bioessays* 21: 590-595.

- Elbahloul, Y., y Steinbüchel, A.** (2009) Large-scale production of poly(3-hydroxyoctanoic acid) by *Pseudomonas putida* GPO1 and a simplified downstream process. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 643-651.
- Emeruwa, A.C., y Hawirko, R.Z.** (1973) Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate metabolism during growth and sporulation of *Clostridium botulinum*. *J. Bacteriol.* 116: 989-993.
- Escapa, I.F., del Cerro, C., García, J.L., y Prieto, M.A.** (2012a) The role of GlpR repressor in *Pseudomonas putida* KT2440 growth and PHA production from glycerol. *Environ. Microbiol.* En prensa. doi:10.1111/j.1462-2920.2012.02790.
- Escapa, I.F., García, J.L., Buhler, B., Blank, L.M., y Prieto, M.A.** (2012b) The polyhydroxyalkanoate metabolism controls carbon and energy spillage in *Pseudomonas putida*. *Environ. Microbiol.* 14: 1049-1063.
- Escapa, I.F., Morales, V., Martino, V.P., Pollet, E., Averous, L., Garcia, J.L., y Prieto, M.A.** (2011) Disruption of beta-oxidation pathway in *Pseudomonas putida* KT2442 to produce new functionalized PHAs with thioester groups. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89: 1583-1598.
- Evans, K.J., Lambert, C., y Sockett, R.E.** (2007) Predation by *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 requires type IV pili. *J. Bacteriol.* 189: 4850-4859.
- Fenton, A.K., Kanna, M., Woods, R.D., Aizawa, S.I., y Sockett, R.E.** (2010) Shadowing the actions of a predator: backlit fluorescent microscopy reveals synchronous nonbinary septation of predatory *Bdellovibrio* inside prey and exit through discrete bdelloplast pores. *J. Bacteriol.* 192: 6329-6335.
- Fidler, S., y Dennis D.** (1992) Polyhydroxyalkanoate production in recombinant *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* 103: 231-235.
- Fiorese, M.L., Freitas, F., Pais, J., Ramos, A.M., de Aragao, G.M.F., y Reis, M.A.M.** (2009) Recovery of polyhydroxybutyrate (PHB) from *Cupriavidus necator* biomass by solvent extraction with 1,2-propylene carbonate. *Eng. Life Sci.* 9: 454-461.
- Follonier, S., Henes, B., Panke, S., y Zinn, M.** (2012) Putting cells under pressure: a simple and efficient way to enhance the productivity of medium-chain-length

polyhydroxyalkanoate in processes with *Pseudomonas putida* KT2440. Biotechnol. Bioeng. 109: 451-461.

**Foster, L.J., Lenz, R.W. y Fuller, R.C.** (1999) Intracellular depolymerase activity in isolated inclusion bodies containing polyhydroxyalkanoates with long alkyl and functional substituents in the side chain. Int. J. Biol. Macromol. 26: 187-192.

**Foster, L.J., Stuart, E.S., Tehrani, A., Lenz, R.W., y Fuller, R.C.** (1996) Intracellular depolymerase and polyhydroxyoctanoate granule integrity in *Pseudomonas oleovorans*. Int. J. Biol. Macromol. 19: 177-183.

**Franklin, F.C., Bagdasarian, M., Bagdasarian, M.M., y Timmis, K.N.** (1981). Molecular and functional analysis of the TOL plasmid pWWO from *Pseudomonas putida* and cloning of genes for the entire regulated aromatic ring *meta* cleavage pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:7458-7462.

**Fratamico, P.M., y Cooke, P.H.** (1996) Isolation of *Bdellovibrios* that prey on *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* species and application for removal of prey from stainless steel surfaces. J. Food Saf. 16: 161-173.

**Furrer, P., Panke, S., y Zinn, M.** (2007) Efficient recovery of low endotoxin medium-chain-length poly([R]-3-hydroxyalkanoate) from bacterial biomass. J. Microbiol. Methods. 69: 206-213.

**Galán, B., Dinjaski, N., Maestro, B., de Eugenio, L.I., Escapa, I.F., Sanz, J.M., García, J.L., y Prieto, M.A.** (2011) Nucleoid-associated PhaF phasin drives intracellular location and segregation of polyhydroxyalkanoate granules in *Pseudomonas putida* KT2442. Mol. Microbiol. 79: 402-418.

**Gangoiti, J., Santos, M., Llama, M.J., y Serra, J.L.** (2010) Production of chiral (R)-3-hydroxyoctanoic acid monomers, catalyzed by *Pseudomonas fluorescens* GK13 poly(3-hydroxyoctanoic acid) depolymerase. Appl. Environ. Microbiol. 76: 3554-3560.

**Gangoiti, J., Santos, M., Prieto, M.A., de la Mata, I., Serra, J.L., Llama, M.J.** (2012) Characterization of a novel subgroup of extracellular mcl-PHA depolymerase from Actinobacteria. Appl. Environ. Microbiol. En prensa. doi:10.1128/AEM.01707-12.

**Gao, X., Chen, J.C., Wu, Q., y Chen, G.Q.** (2011) Polyhydroxyalkanoates as a source of chemicals, polymers, and biofuels. *Curr. Opin. Biotechnol.* 22: 1-7.

**Gavrilescu, M., y Chisti, Y.** (2005) Biotechnology- a sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnol. Adv.* 23: 471-499.

**Ghatnekar, M.S. Pai, J.S. y Ganesh, M.** (2002) Production and recovery of poly-3-hydroxybutyrate from *Methylobacterium* sp V49. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 77: 444-449.

**Gómez, J.G.C., Méndez, B.S., Nikel, P.I., Pettinari, M.J., Prieto, M.A., y Silva, L.F.** (2012) Making green polymers even greener: Towards sustainable production of polyhydroxyalkanoates from agroindustrial byproducts, p. 41-62. *In* Petre, M. (ed.), *Advances in Applied Biotechnology*. InTech, Rijeka, Croatia.

**Guerrero, R., Pedros-Alio, C., Esteve, I., Mas, J., Chase, D., y Margulis, L.** (1986) Predatory prokaryotes: predation and primary consumption evolved in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 2138-2142.

**Handrick, R., Reinhardt, S. y Jendrossek, D.** (2000) Mobilization of poly(3-hydroxybutyrate) in *Ralstonia eutropha*. *J. Bacteriol.* 182: 5916-5918.

**Handrick, R., Reinhardt, S., Kimmig, P., y Jendrossek, D.** (2004) The "intracellular" poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) depolymerase of *Rhodospirillum rubrum* is a periplasm-located protein with specificity for native PHB and with structural similarity to extracellular PHB depolymerases. *J. Bacteriol.* 186: 7243-7253.

**Harrison, S.T. Chase, H.A. y Dennis, J.S.** (1991) The disruption of *Alcaligenes eutrophus* by high pressure homogenisation: key factors involved in the process. *Bioseparation.* 2: 155-166.

**Haywood, G.W., Anderson, A.J., Ewing, D.F., y Dawes, E.A.** (1990) Accumulation of a polyhydroxyalkanoate containing primarily 3-hydroxydecanoate from simple carbohydrate substrates by *Pseudomonas* sp. strain NCIMB 40135. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 3354-3359.

**Hazer, B., y Steinbüchel, A.** (2007) Increased diversification of polyhydroxyalkanoates by modification reactions for industrial and medical applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74: 1-12.

**Hejazi, P. Vasheghani-Farahani, E. y Yamini, Y.** (2003) Supercritical fluid disruption of *Ralstonia eutropha* for poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) recovery. *Biotechnol. Progr.* 19: 1519-1523.

**Hespell, R.B., y Odelson, D.A.** (1978) Metabolism of RNA-ribose by *Bdellovibrio bacteriovorus* during intraperiplasmic growth on *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 136: 936-946.

**Hori, K., Kaneko, M., Tanji, Y., Xing, X.H., y Unno, H.** (2002) Construction of self-disruptive *Bacillus megaterium* in response to substrate exhaustion for polyhydroxybutyrate production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 211-216.

**Huijberts, G.N., Eggink, G., de Waard, P., Huisman, G.W., y Witholt, B.** (1992) *Pseudomonas putida* KT2442 cultivated on glucose accumulates poly(3-hydroxyalkanoates) consisting of saturated and unsaturated monomers. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 536-544.

**Huisman, G.W., Wonink, E., Meima, R., Kazemier, B., Terpstra, P., y Witholt, B.** (1991) Metabolism of poly(3-hydroxyalkanoates) (PHAs) by *Pseudomonas oleovorans*. Identification and sequences of genes and function of the encoded proteins in the synthesis and degradation of PHA. *J. Biol. Chem.* 266: 2191-2198.

**Hwang, K.J., You, S.F., y Don, T.M.** (2006) Disruption kinetics of bacterial cells during purification of poly-hydroxyalkanoates using ultrasonication. *J. Chin. Inst. Chem. Eng.* 37: 209-216.

**Jacquel, N., Lob, C-W., Wei, Y-H., Wu, H-S., y Wang, S.S.** (2008) Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). *Biochem. Eng. J.* 39: 15-27.

**Jendrossek, D., y Handrick, R.** (2002) Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates. *Annu. Rev. Microbiol.* 56: 403-432.

- Jung, I.L., Phyo, K.H., Kim, K.C., Park, H.K., y Kim, I.G.** (2005) Spontaneous liberation of intracellular polyhydroxybutyrate granules in *Escherichia coli*. Res. Microbiol. 156: 865-873.
- Jurgens, K.** (2007) Predation on bacteria and bacterial resistance mechanisms: comparative aspects among different predator groups in aquatic systems. In Jurkevitch, E. (ed.), Predatory Prokaryotes, vol IV. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Jurkevitch, E., y Davidov, Y.** (2007) Phylogenetic diversity and evolution of predatory prokaryotes, p. 11-56. In Jurkevitch, E. (ed.), Predatory Prokaryotes, vol. IV. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Jurkevitch, E., Minz, D., Ramati, B., y Barel, G.** (2000) Prey range characterization, ribotyping, and diversity of soil and rhizosphere *Bdellovibrio* spp. isolated on phytopathogenic bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 66: 2365-2371.
- Kadouri, D., Jurkevitch, E., y Okon, Y.** (2003) Involvement of the reserve material poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in *Azospirillum brasilense* stress endurance and root colonization. Appl. Environ. Microbiol. 69: 3244-3250.
- Kadouri, D., Jurkevitch, E., Okon, Y., y Castro-Sowinski, S.** (2005) Ecological and agricultural significance of bacterial polyhydroxyalkanoates. Crit. Rev. Microbiol. 31: 55-67.
- Kadouri, D., y O'Toole, G.A.** (2005) Susceptibility of biofilms to *Bdellovibrio bacteriovorus* attack. Appl. Environ. Microbiol. 71: 4044-4051.
- Kalia, V.C., Lal, S., y Cheema, S.** (2007) Insight in to the phylogeny of polyhydroxyalkanoate biosynthesis: horizontal gene transfer. Gene 389: 19-26.
- Kapritchkoff, F.M., Viotti, A.P., Alli, R.C., Zuccolo, M., Pradella, J.G., Maiorano, A.E. Miranda, E.A., y Bonomi, A.** (2006) Enzymatic recovery and purification of polyhydroxybutyrate produced by *Ralstonia eutropha*. J. Biotechnol. 122: 453-462.
- Kelley, J.I., Turng, B., Williams, H.N., y Baer, M.L.** (1997) Effects of temperature, salinity, and substrate on the colonization of surfaces in situ by aquatic *Bdellovibrios*. Appl. Environ. Microbiol. 63: 84-90.

**Kessel, M., y Shilo, M.** (1976) Relationship of *Bdellovibrio* elongation and fission to host cell size. *J. Bacteriol.* 128: 477-480.

**Khosravi-Darani, K., Vasheghani-Farahani, E., Shojaosadati, S.A., y Yamini, Y.** (2004) Effect of process variables on supercritical fluid disruption of *Ralstonia eutropha* cells for poly(*R*-hydroxybutyrate) recovery. *Biotechnol. Progr.* 20: 1757-1765.

**Kim, M, Cho, K.S., Ryu, H.W., Lee, E.G., y Chang, Y.K.** (2003) Recovery of poly(3-hydroxybutyrate) from high cell density culture of *Ralstonia eutropha* by direct addition of sodium dodecyl sulfate. *Biotechnol. Lett.* 25: 55-59.

**Kim, D.Y., Kim, H.W., Chung, M.G., y Rhee, Y.H.** (2007) Biosynthesis, modification, and biodegradation of bacterial medium-chain-length polyhydroxyalkanoates. *J. Microbiol.* 45: 87-97.

**Kim, H.J., Kim, D.Y., Nam, J.S., Bae, K.S., y Rhee, Y.H.** (2003) Characterization of an extracellular medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoate) depolymerase from *Streptomyces* sp. KJ-72. *Antonie Van Leeuwenhoek* 83: 183-189.

**Knoll, M., Hamm, T.M., Wagner, F., Martínez, V., y Pleiss, J.** (2009) The PHA Depolymerase Engineering Database: A systematic analysis tool for the diverse family of polyhydroxyalkanoate (PHA) depolymerases. *BMC Bioinformatics* 10: 89.

**Koller, M., Atlić, A., Dias, M., Reiterer, A., y Braunegg, G.** (2010). Microbial PHA production from waste raw materials, p. 85-119. *In* Chen, Guo Qiang (ed.), *Plastics from bacteria*, vol. 14. Springer, Berlin Heidelberg.

**Kornberg, H.L.** (1966) The role and control of the glyoxylate cycle in *Escherichia coli*. *The Biochemical Journal* 99: 1-11.

**Koval, S.F., y Bayer, M.E.** (1997) Bacterial capsules: no barrier against *Bdellovibrio*. *Microbiology* 143: 749-753.

**Koval, S.F., y Hynes, S.H.** (1991) Effect of paracrystalline protein surface layers on predation by *Bdellovibrio bacteriovorus*. *J. Bacteriol.* 173: 2244-2249.

**Kraak, M.N., Smits, T.H., Kessler, B., y Witholt, B.** (1997) Polymerase C1 levels and poly(R-3-hydroxyalkanoate) synthesis in wild-type and recombinant *Pseudomonas strains*. J. Bacteriol. 179: 4985-4991.

**Krebs, H.A., y Johnson, W.A.** (1937) The role of citric acid in intermediate metabolism in animal tissues. Enzymologia. 4: 148-156.

**Kuenen, J.G., y Rittenberg, S.C.** (1975) Incorporation of long-chain fatty acids of the substrate organism by *Bdellovibrio bacteriovorus* during intraperiplasmic growth. J. Bacteriol. 121: 1145-1157.

**Kunasundari, B., y Sudesh, K.** (2011) Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. Express Polymer Letters 5: 620-634.

**Kumar, A., Gross, R.A., y Jendrossek, D.** (2000) Poly(3-hydroxybutyrate)-depolymerase from *Pseudomonas lemoignei*: catalysis of esterifications in organic media. J. Org. Chem. 65: 7800-7806.

**Lageveen, R.G., Huisman, G.W., Preusting, H., Ketelaar, P., Eggink, G., y Witholt, B.** (1988) Formation of polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: effect of substrates on formation and composition of poly-(R)-3-hydroxyalkanoates and poly-(R)-3-hydroxyalkenoates. Appl. Environ. Microbiol. 54: 2924-2932.

**LaMarre, A.G., Straley, S.C., y Conti, S.F.** (1977) Chemotaxis toward amino acids by *Bdellovibrio bacteriovorus*. J. Bacteriol. 131: 201-207.

**Lambert, C., Chang, C.Y., Capeness, M.J. y Sockett, R.E.** (2010) The first bite-profiling the predatosome in the bacterial pathogen *Bdellovibrio*. PLoS One 5: e8599.

**Lambert, C., Evans, K.J., Till, R., Hogley, L., Capeness, M., Rendulic, S., Schuster, S.C., Aizawa, S., y Sockett, R.E.** (2006a) Characterizing the flagellar filament and the role of motility in bacterial prey-penetration by *Bdellovibrio bacteriovorus*. Mol. Microbiol. 60: 274-286.

**Lambert, C., Fenton, A.K., Hogley, L., y Sockett, R.E.** (2011) Predatory *Bdellovibrio* bacteria use gliding motility to scout for prey on surfaces. J. Bacteriol. 193: 3139-3141.

**Lambert, C., Hobley, L., Chang, C.Y., Fenton, A., Capeness, M., y Sockett, L.** (2008) A predatory patchwork: membrane and surface structures of *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Adv. Microb. Physiol.* 54: 313-361.

**Lambert, C., Morehouse, K.A., Chang, C.Y., y Sockett, R.E.** (2006b) *Bdellovibrio*: growth and development during the predatory cycle. *Curr. Opin. Microbiol.* 9: 639-644.

**Lambert, C., Smith, M.C., y Sockett, R.E.** (2003) A novel assay to monitor predator-prey interactions for *Bdellovibrio bacteriovorus* 109 J reveals a role for methyl-accepting chemotaxis proteins in predation. *Environ. Microbiol.* 5: 127-132.

**Lambert, C., Till, R., Hobley, L., y Sockett, R.E.** (2012) Mutagenesis of RpoE-like sigma factor genes in *Bdellovibrio* reveals differential control of *groEL* and two *groES* genes. *BMC Microbiol.* 12: 99.

**Larsen, R.A., Wilson, M.M., Guss, A.M., y Metcalf, W.W.** (2002) Genetic analysis of pigment biosynthesis in *Xanthobacter autotrophicus* Py2 using a new, highly efficient transposon mutagenesis system that is functional in a wide variety of bacteria. *Arch. Microbiol.* 178: 193-201.

**Lee, S.Y., Lee, Y., y Wang, F.L.** (1999) Chiral compounds from bacterial polyesters: Sugars to plastics to fine chemicals. *Biotechnol. Bioeng.* 65: 363-368.

**Ling, Y. Williams, D.R.G., Thomas, C.J., y Middelberg, A.P.J.** (1997) Recovery of poly-3-hydroxybutyrate from recombinant *Escherichia coli* by homogenization and centrifugation. *Biotechnol. Technol.* 11: 409-412.

**Liu, Q., Luo, G., Zhou, X.R., y Chen, G.Q.** (2011) Biosynthesis of poly(3-hydroxydecanoate) and 3-hydroxydodecanoate dominating polyhydroxyalkanoates by  $\beta$ -oxidation pathway inhibited *Pseudomonas putida*. *Metab. Eng.* 13: 11-17.

**Llamas, M.A., Ramos, J.L., y Rodríguez-Herva, J.J.** (2000) Mutations in each of the *tol* genes of *Pseudomonas putida* reveal that they are critical for maintenance of outer membrane stability. *J. Bacteriol.* 182: 4764-4772.

- Llamas, M.A., Ramos, J.L., y Rodríguez-Herva, J.J.** (2003) Transcriptional organization of the *Pseudomonas putida tol-oprL* genes. *J. Bacteriol.* 185: 184-195.
- Lodwig, E.M., Leonard, M., Marroqui, S., Wheeler, T.R., Findlay, K., Downie, J.A., y Poole, P.S.** (2005) Role of polyhydroxybutyrate and glycogen as carbon storage compounds in pea and bean bacteroids. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 18: 67-74.
- Luengo, J.M., García, B., Sandoval, A., Naharro, G., y Olivera, E.R.** (2003) Bioplastics from microorganisms. *Curr. Opin. Microbiol.* 6: 251-260.
- Madison, L.L., y Huisman, G.W.** (1999) Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 21-53.
- Mahmoud, K.K., y Koval, S.F.** (2010) Characterization of type IV pili in the life cycle of the predator bacterium *Bdellovibrio*. *Microbiology* 156: 1040-1051.
- Margulis, L.** (1970) Origin of eukaryotic cells. New Haven, Yale University Press.
- Martin, M.O.** (2002) Predatory prokaryotes: an emerging research opportunity. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 4: 467-477.
- Matin, A., y Rittenberg, S.C.** (1972) Kinetics of deoxyribonucleic acid destruction and synthesis during growth of *Bdellovibrio bacteriovorus* strain 109D on *Pseudomonas putida* and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 111: 664-673.
- Matin, A., Veldhuis, C., Stegeman, V., y Veenhuis, M.** (1979) Selective advantage of a *Spirillum* sp. in a carbon-limited environment. Accumulation of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid and its role in starvation. *J. Gen. Microbiol.* 112:349-355.
- Medina, A.A., y Kadouri, D.E.** (2009) Biofilm formation of *Bdellovibrio bacteriovorus* host-independent derivatives. *Res. Microbiol.* 160: 224-231.
- Medina, A.A., Shanks, R.M., y Kadouri, D.E.** (2008) Development of a novel system for isolating genes involved in predator-prey interactions using host independent derivatives of *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J. *BMC Microbiol.* 8: 33.
- Merrick, J.M., y Doudoroff, M.** (1964) Depolymerisation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate by an intracellular enzyme system. *J. Bacteriol.* 88: 60-71.

**Moldes, C., García, P., García, J.L., y Prieto, M.A.** (2004) In vivo immobilization of fusion proteins on bioplastics by the novel tag BioF. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 3205-3212.

**Morales, V., Bläckman, A. y Bagdasarian, M.** (1991) A series of wide-host-range low-copy-number vectors that allow direct screening for recombinants. *Gene.* 97: 39-47.

**Nakajima, Y., Ito, K., Toshima, T., Egawa, T., Zheng, H., Oyama, H., Wu, Y., Takahashi, E., Kyono, K., y Yoshimoto, T.** (2008) Dipeptidyl aminopeptidase IV from *Stenotrophomonas maltophilia* exhibits activity against a substrate containing a 4-hydroxyproline residue. *J. Bacteriol.* 190: 7819-7829.

**Nelson, K.E., Weinel, C., Paulsen, I.T., Dodson, R.J., Hilbert, H., Martins dos Santos, V.A., Fouts, D.E., Gill, S.R., Pop, M., Holmes, M., Brinkac, L., Beanan, M., DeBoy, R.T., Daugherty, S., Kolonay, J., Madupu, R., Nelson, W., White, O., Peterson, J., Khouri, H., Hance, I., Chris Lee, P., Holtzapple, E., Scanlan, D., Tran, K., Moazzez, A., Utterback, T., Rizzo, M., Lee, K., Kosack, D., Moestl, D., Wedler, H., Lauber, J., Stjepandic, D., Hoheisel, J., Straetz, M., Heim, S., Kiewitz, C., Eisen, J.A., Timmis, K.N., Dusterhoft, A., Tumbler, B., y Fraser, C.M.** (2002) Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* 4: 799-808.

**Ohashi, T. y Hasegawa, J.** (1992). New preparative methods for optically active  $\beta$  hydroxycarboxylic acids. p. 249-268. *In* Sheldrake, G.N., Collins, A.N. y Crosby, J. (ed.), *Chirality in Industry*, vol. I. John Wiley & Sons, New York.

**Okon, Y., y Itzigsohn, R.** (1992) Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate metabolism in *Azospirillum brasilense* and the ecological role of PHB in the rhizosphere. *FEMS Microbiol. Lett.* 103: 131-139.

**Olivera, E.R., Carnicero, D., García, B., Miñambres, B., Moreno, M. A., Canedo, L., Dirusso, C.C., Naharro, G., y Luengo, J.M.** (2001a) Two different pathways are involved in the  $\beta$ -oxidation of *n*-alkanoic and *n*-phenylalkanoic acids in *Pseudomonas putida* U: genetic studies and biotechnological applications. *Mol. Microbiol.* 39: 863-874.

**Olivera, E.R., Carnicero, D., Jodra, R., Miñambres, B., García, B., Abraham, G.A., Gallardo, A., Román, J.S., García, J.L., Naharro, G., y Luengo, J.M.** (2001b) Genetically engineered *Pseudomonas*: a factory of new bioplastics with broad applications. *Environ. Microbiol.* 3: 612-618.

**Page, W.J., y Cornish, A.** (1993) Growth of *Azotobacter vinelandii* UWD in fish peptone medium and simplified extraction of poly-beta-hydroxybutyrate. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 4236-4244.

**Papaneophytou, C.P., Velalia, E.E., y Pantazaki, A.A.** (2011) Purification and characterization of an extracellular medium-chain length polyhydroxyalkanoate depolymerase from *Thermus thermophilus* HB8. *Polym. Degrad. Stab.* 96: 670-678.

**Peoples, O.P., y Sinskey, A.J.** (1989) Poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. Identification and characterization of the PHB polymerase gene (*phbC*). *J. Biol. Chem.* 264: 15298-15303.

**Pérez-Brocal, V., Gil, R., Ramos, S., Lamelas, A., Postigo, M., Michelena, J.M., Silva, F.J., Moya, A., y Latorre, A.** (2006) A small microbial genome: the end of a long symbiotic relationship? *Science.* 314: 312-313.

**Pham, T.H., Webb, J.S., y Rehm, B.H.** (2004) The role of polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa* in rhamnolipid and alginate production as well as stress tolerance and biofilm formation. *Microbiology* 150: 3405-3413.

**Philip, S.E., Keshavarz, T., y Roy, I.** (2007) Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 247: 233-247.

**Pineiro, S.A., Sahaniuk, G.E., Romberg, E., y Williams, H.N.** (2004) Predation pattern and phylogenetic analysis of *Bdellovibrionaceae* from the Great Salt Lake, Utah. *Curr. Microbiol.* 48: 113-117.

**Poblete-Castro, I., Escapa, I.F., Jäger, C., Puchalka, J., Lam, C.M., Schomburg, D., Prieto, M.A., y Martins dos Santos, V.A.** (2012) The metabolic response of *P. putida* KT2442 producing high levels of polyhydroxyalkanoate under single- and multiple-

nutrient-limited growth: highlights from a multi-level omics approach. *Microb. Cell. Fact.* 11: 34-55.

**Poehlein, A., Kusian, B., Friedrich, B., Daniel, R., y Bowien, B.** (2011) Complete genome sequence of the type strain *Cupriavidus necator* N-1. *J. Bacteriol.* 193: 5017.

**Povolo, S., Tombolini, R., Morea, A., Anderson, A.J., Casella, S., y Nuti, M.P.** (1994) Isolation and characterization of mutants of *Rhizobium meliloti* unable to synthesize poly- $\beta$ -hydroxybutyrate. *Can. J. Microbiol.* 40: 823-829.

**Prieto, M.A.** (2007) From oil to bioplastics, a dream come true? *J. Bacteriol.* 189: 289-290.

**Prieto, M.A., Buhler, B., Jung, K., Witholt, B., y Kessler, B.** (1999) PhaF, a polyhydroxyalkanoate-granule-associated protein of *Pseudomonas oleovorans* GPO1 involved in the regulatory expression system for *pha* genes. *J. Bacteriol.* 181: 858-868.

**Prieto, M.A., de Eugenio, L.I., Galán, B., Luengo, J.M., y Witholt, B.** (2007) Synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates, p. 397-428. *In* Ramos, J.L. y Filloux, A. (ed.), *Pseudomonas: a model system in biology*, vol. V. Springer, Berlin, Germany.

**Pugsley, A.P.** (1993). The complete general secretory pathway in Gram negative bacteria. *Microbiol. Rev.* 57: 50-108.

**Rai, R., Keshavarz, T., Roether, J.A., Boccaccini, A.R., y Roy, I.** (2011) Medium chain length polyhydroxyalkanoates, promising new biomedical materials for the future. *Mater. Sci. Eng. R.* 72: 29-47.

**Ramsay, J.A., Berger, E., Voyer, R., Chavarie, C., y Ramsay, B.A.** (1994) Extraction of poly-3-hydroxybutyrate using chlorinated solvents. *Biotechnol. Tech.* 8: 589-594.

**Rehm, B.H.** (2003) Polyester synthases: natural catalysts for plastics. *Biochem. J.* 376: 15-33.

**Rehm, B.H.** (2010) Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. *Nat. Rev. Microbiol.* 8: 578-592.

**Ren, Q., de Roo, G., Ruth, K., Witholt, B., Zinn, M., y Thony-Meyer, L.** (2009) Simultaneous accumulation and degradation of polyhydroxyalkanoates: futile cycle or clever regulation? *Biomacromolecules* 10: 916-922.

**Ren, Q., Grubelnik, A., Hoerler, M., Ruth, K., Hartmann, R., Felber, H., y Zinn, M.** (2005) Bacterial poly(hydroxyalkanoates) as a source of chiral hydroxyalkanoic acids. *Biomacromolecules*. 6: 2290-2298.

**Rendulic, S., Jagtap, P., Rosinus, A., Eppinger, M., Baar, C., Lanz, C., Keller, H., Lambert, C., Evans, K.J., Goesmann, A., Meyer, F., Sockett, R.E., y Schuster, S.C.** (2004) A predator unmasked: life cycle of *Bdellovibrio bacteriovorus* from a genomic perspective. *Science* 303: 689-692.

**Resch, S., Gruber, K. Wanner, G. Slater, S., Dennis, D., y Lubitz, W.** (1998) Aqueous release and purification of poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) from *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 65: 173-182.

**Rittenberg, S.C., y Hespell, R.B.** (1975) Energy efficiency of intraperiplasmic growth of *Bdellovibrio bacteriovorus*. *J. Bacteriol.* 121: 1158-1165.

**Rogosky, A.M., Moak, P.L., y Emmert, E.A.** (2006) Differential predation by *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J. *Curr. Microbiol.* 52: 81-85.

**Roschanski, N., Klages, S., Reinhardt, R., Linscheid, M., y Strauch, E.** (2011) Identification of genes essential for prey-independent growth of *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100. *J. Bacteriol.* 193: 1745-1756.

**Roschanski, N., y Strauch, E.** (2010) Assessment of the mobilizable vector plasmids pSUP202 and pSUP404.2 as genetic tools for the predatory bacterium *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Curr. Microbiol.* 62: 589-596.

**Rosson, R.A., y Rittenberg, S.C.** (1979) Regulated breakdown of *Escherichia coli* deoxyribonucleic acid during intraperiplasmic growth of *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J. *J. Bacteriol.* 140: 620-633.

**Roth, R.B.** (2002). The discovery and development of atorvastatin, a potent novel hypolipidemic agent. *Prog. Med. Chem.* 40: 1-22.

**Rothermich, M.M., Guerrero, R., Lenz, R.W., y Goodwin, S.** (2000) Characterization, seasonal occurrence, and diel fluctuation of poly(hydroxyalkanoate) in photosynthetic microbial mats. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4279-4291.

**Ruiz, J.A., López, N.I., Fernández, R.O., y Méndez, B.S.** (2001) Polyhydroxyalkanoate degradation is associated with nucleotide accumulation and enhances stress resistance and survival of *Pseudomonas oleovorans* in natural water microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 225-230.

**Ruiz, J.A., López, N.I., y Méndez, B.S.** (2004) *rpoS* gene expression in carbon-starved cultures of the polyhydroxyalkanoate-accumulating species *Pseudomonas oleovorans*. *Curr. Microbiol.* 48: 396-400.

**Ruth, K., de Roo, G., Egli, T., y Ren, Q.** (2008) Identification of two acyl-CoA synthetases from *Pseudomonas putida* GPo1: one is located at the surface of polyhydroxyalkanoates granules. *Biomacromolecules.* 9: 1652-1659.

**Ruth, K., Grubelnik, A., Hartmann, R., Egli, T., Zinn, M., y Ren, Q.** (2007) Efficient production of (*R*)-3-hydroxycarboxylic acids by biotechnological conversion of polyhydroxyalkanoates and their purification. *Biomacromolecule.* 8: 279-286.

**Sabirova, J.S., Ferrer, M. Lunsdorf, H. Wray, V. Kalscheuer, R. Steinbuchel, A. Timmis, K.N. y Golyshin, P.N.** (2006). Mutation in a "tesB-like" hydroxyacyl-coenzyme A-specific thioesterase gene causes hyperproduction of extracellular polyhydroxyalkanoates by *Alcanivorax borkumensis* SK2. *J. Bacteriol.* 188: 8452-8459).

**Santos, M., Gangoiti, J., Keul, H., Moller, M., Serra, J.L., y Llama, M.J.** (2012) Polyester hydrolytic and synthetic activity catalyzed by the medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoate) depolymerase from *Streptomyces venezuelae* SO1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* En prensa. doi:10.1007/s00253-012-4210-1.

**Schafer, A., Tauch, A., Jager, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., y Puhler, A.** (1994) Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene.* 145: 69-73.

- Scherff, R.H.** (1973) Control of bacterial blight of soybean by *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Phytopathology*. 63: 400-402.
- Schirmer, A., y Jendrossek, D.** (1994) Molecular characterization of the extracellular poly(3-hydroxyoctanoic acid) [P(3HO)] depolymerase gene of *Pseudomonas fluorescens* GK13 and of its gene product. *J. Bacteriol.* 176: 7065-7073.
- Schirmer, A., Jendrossek, D., y Schlegel, H.G.** (1993) Degradation of poly(3-hydroxyoctanoic acid) [P(3HO)] by bacteria: purification and properties of a P(3HO) depolymerase from *Pseudomonas fluorescens* GK13. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1220-1227.
- Schirmer, A., Matz, C., y Jendrossek, D.** (1995) Substrate specificities of poly(hydroxyalkanoate)-degrading bacteria and active site studies on the extracellular poly(3-hydroxyoctanoic acid) depolymerase of *Pseudomonas fluorescens* GK13. *Can. J. Microbiol.* 41: 170-179.
- Schwudke, D., Bernhardt, A., Beck, S., Madela, K., Linscheid, M.W., Appel, B., y Strauch, E.** (2005) Transcriptional activity of the host-interaction locus and a putative pilin gene of *Bdellovibrio bacteriovorus* in the predatory life cycle. *Curr. Microbiol.* 51: 310-316.
- Schwudke, D., Strauch, E., Krueger, M., y Appel, B.** (2001) Taxonomic studies of predatory *bdellovibrios* based on 16S rRNA analysis, ribotyping and the hit locus and characterization of isolates from the gut of animals. *Syst. Appl. Microbiol.* 24: 385-394.
- Segura, D., Cruz, T., y Espin, G.** (2003) Encystment and alkylresorcinol production by *Azotobacter vinelandii* strains impaired in poly- $\beta$ -hydroxybutyrate synthesis. *Arch. Microbiol.* 179: 437-443.
- Shemesh, Y., y Jurkevitch, E.** (2004) Plastic phenotypic resistance to predation by *Bdellovibrio* and like organisms in bacterial prey. *Environ. Microbiol.* 6: 12-18.
- Silby, M.W., Winstanley, C., Godfrey, S.A., Levy, S.B., y Jackson, R.W.** (2011). *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiol. Rev.* 35: 652-680.

**Snyder, A.R., Williams, H.N., Baer, M.L., Walker, K.E., y Stine, O.C.** (2002) 16S rDNA sequence analysis of environmental *Bdellovibrio*-and-like organisms (BALO) reveals extensive diversity. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 2089-2094.

**Sockett, R.E.** (2009) Predatory lifestyle of *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Annu. Rev. Microbiol.* 63: 523-539.

**Sockett, R.E. y Lambert, C.** (2004) *Bdellovibrio* as therapeutic agents: a predatory renaissance? *Nat. Rev. Microbiol.* 2: 669-675.

**Steinbüchel, A., Hustede, E., Liebergesell, M., Pieper, U., Timm, A., y Valentin, H.** (1992) Molecular basis for biosynthesis and accumulation of polyhydroxyalkanoic acids in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 9: 217-230.

**Steinbüchel, A., y Valentin, H.E.** (1995) Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiol. Lett.* 128: 219-228.

**Steyert, S.R., y Pineiro, S.A.** (2007) Development of a novel genetic system to create markerless deletion mutants of *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 4717-4724.

**Stolp, H., y Starr, M.P.** (1963) *Bdellovibrio bacteriovorus* gen. et sp. n., a predatory, ectoparasitic, and bacteriolytic microorganism. *Antonie Van Leeuwenhoek* 29: 217-248.

**Straley, S.C., y Conti, S.F.** (1974) Chemotaxis in *Bdellovibrio bacteriovorus*. *J. Bacteriol.* 120: 549-551.

**Straley, S.C., LaMarre, A.G., Lawrence, L.J., y Conti, S.F.** (1979) Chemotaxis of *Bdellovibrio bacteriovorus* toward pure compounds. *J. Bacteriol.* 140: 634-642.

**Strauch, E., Beck, S., y Appel, B.** (2007) *Bdellovibrio* and like organisms: potential sources for new biochemicals and therapeutic agents? In Jurkevitch, E. (ed.), *Predatory Prokaryotes*, vol. IV. Springer-Verlag, Heidelberg.

**Stuart, E.S., Foster, L.J., Lenz, R.W., y Fuller, R.C.** (1996) Intracellular depolymerase functionality and location in *Pseudomonas oleovorans* inclusions containing polyhydroxyoctanoate. *Int. J. Biol. Macromol.* 19: 171-176.

**Stubbe, J., Tian, J., He, A., Sinskey, A.J., Lawrence, A.G., y Liu, P.** (2005) Nontemplate-dependent polymerization processes: polyhydroxyalkanoate synthases as a paradigm. *Annu. Rev. Biochem.* 74: 433-480.

**Sudesh, K., Abe, H., y Doi, Y.** (2000) Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Prog. Polym. Sci.* 25: 1503-1555.

**Sun, Z., Ramsay, J.A., Guay, M., y Ramsay, B.A.** (2007) Fermentation process development for the production of medium-chain-length poly-3-hydroxyalkanoates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75: 475-485.

**Sznajder, A., y Jendrossek, D.** (2011) Biochemical characterization of a new type of intracellular PHB depolymerase from *Rhodospirillum rubrum* with high hydrolytic activity on native PHB granules. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89: 1487-1495.

**Tal, S., y Okon, Y.** (1985) Production of the reserve material poly- $\beta$ -hydroxybutyrate and its function in *Azospirillum brasilense* Cd. *Can. J. Microbiol.* 31: 608-613.

**Tamer, M., Moo-Young, M., y Chisti, Y.** (1998) Disruption of *Alcaligenes latus* for recovery of poly( $\beta$ -hydroxybutyric acid): Comparison of high-pressure homogenization, bead milling and chemically induced lysis. *Ind. Eng. Chem. Res.* 37: 1807-1814.

**Thomashow, M.F., y Cotter, T.W.** (1992) *Bdellovibrio* host dependence: the search for signal molecules and genes that regulate the intraperiplasmic growth cycle. *J. Bacteriol.* 174: 5767-5771.

**Thomashow, M.F., y Rittenberg, S.C.** (1978a) Intraperiplasmic growth of *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J: N-deacetylation of *Escherichia coli* peptidoglycan amino sugars. *J. Bacteriol.* 135: 1008-1014.

**Thomashow, M.F., y Rittenberg, S.C.** (1978b) Intraperiplasmic growth of *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J: solubilization of *Escherichia coli* peptidoglycan. *J. Bacteriol.* 135: 998-1007.

- Thompson, J.N.** (1999) The evolution of species interactions. *Science*. 284: 2116-2118.
- Thompson, R.C., Moore, C.J., vom Saal, F.S., y Swan, S.H.** (2009) Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends. *Phil. Trans. R. Soc. B*. 364: 2153-2166.
- Timm, A., y Steinbüchel, A.** (1990) Formation of polyesters consisting of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and other fluorescent pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 3360-3367.
- Tudor, J.J., Davis, J.J., Panichella, M., y Zwolak, A.** (2008) Isolation of predation-deficient mutants of *Bdellovibrio bacteriovorus* by using transposon mutagenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 5436-5443.
- Valappil, S.P., Boccaccini, A.R., Bucke, C., y Roy, I.** (2007) Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive bacteria: insights from the genera *Bacillus* and *Streptomyces*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 91: 1-17.
- Van Hee, P., Elumbaring, C.M.R.A., Van der Lans, R.G.J.M., y Van der Wielen, L.A.M.** (2006) Selective recovery of polyhydroxyalkanoate inclusion bodies from fermentation broth by dissolved-air flotation. *J. Colloid Interface Sci.* 297: 595-606.
- Varon, M., y Shilo, M.** (1980) Ecology of aquatic *Bdellovibrios*. In M.R. Droop and H.W. Jannasch (eds.), *Advances in Aquatic Microbiology*, Vol. II, pp. 1-48. Academic Press, New York.
- Villanueva, L., Navarrete, A., Urmeneta, J., Geyer, R., White, D.C., y Guerrero, R.** (2007) Monitoring diel variations of physiological status and bacterial diversity in an estuarine microbial mat: an integrated biomarker analysis. *Microb. Ecol.* 54: 523-531.
- Wackett, L.P.** (2003) *Pseudomonas putida* - a versatile biocatalyst. *Nat. Biotech.* 21: 136-138.
- Wang, L., Armbruster, W. y Jendrossek, D.** (2007a) Production of medium-chain-length hydroxyalkanoic acids from *Pseudomonas putida* in pH stat. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75: 1047-1053.

**Wang, C., Sheng, X., Equi, R.C., Trainer, M.A., Charles, T.C., y Sobral, B.W.** (2007b) Influence of the poly-3-hydroxybutyrate (PHB) granule-associated proteins (PhaP1 and PhaP2) on PHB accumulation and symbiotic nitrogen fixation in *Sinorhizobium meliloti* Rm1021. *J. Bacteriol.* 189: 9050-9056.

**Wang, I.N., Smith, D.L., y Young, R.** (2000) Holins: the protein clocks of bacteriophage infections. *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 799-825.

**Williams, S.F., Martin, D.P., Horowitz, D.M., y Peoples, O.P.** (1999) PHA applications: addressing the price performance issue: I. Tissue engineering. *Int J. Biol. Macromol.* 25: 111-121.

**Wurtzel, O., Dori-Bachash, M., Pietrokovski, S., Jurkevitch, E., y Sorek, R.** (2010) Mutation detection with next-generation resequencing through a mediator genome. *PLoS One* 5: e15628.

**Yang, Y.H., Brigham, C., Willis, L., Rha, C., y Sinskey, A.** (2011) Improved detergent-based recovery of polyhydroxyalkanoates (PHAs). *Biotechnol. Lett.* 33: 937-942.

**Yasotha, K. Aroua, M.K., Ramachandran, K.B. y Tan, I.K.P.** (2006) Recovery of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (PHAs) through enzymatic digestion treatments and ultrafiltration. *Biochem. Eng. J.* 30: 260-268.

**Yu, H., Yin, J., Li, H., Yang, S., y Shen, Z.** (2000) Construction and selection of the novel recombinant *Escherichia coli* strain for poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) production. *J. Biosci. Bioeng.* 89: 307-311.

