



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**MODIFICACIÓN DE LAS MEMBRANAS BACTERIANAS EN
DIFERENTES FORMAS DE ESTRÉS ABIÓTICO**

INVESTIGACIÓN DOCUMENTAL

TESIS PROFESIONAL

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

ADA STEPHANY OLEA OZUNA

DIRECTOR:

DR. CHRISTIAN SOHLENKAMP

CODIRECTOR:

DR. MIGUEL ÁNGEL VENCES GUZMÁN

CUERNAVACA, MORELOS

2023

AGRADECIMIENTO

Al Dr. Christian Sohlenkamp por aceptarme en esta tesis bajo su dirección, la confianza que deposito en mí, por brindarme su apoyo, sus indicaciones y su orientación para guiarme durante el desarrollo de este proyecto, por todo el tiempo dedicado, por su disponibilidad para resolver dudas amablemente y los conocimientos adquiridos.

Al Dr. Miguel Ángel Vences Guzmán por haberme guiado en este proyecto con sus sugerencias, aportaciones, enseñanzas y por haberme brindado el apoyo para desarrollarme profesionalmente para alcanzar los objetivos perseguidos en mi formación.

A los otros miembros del jurado, al Dr. Ramón Suárez Rodríguez, Dr. José Augusto Ramírez Trujillo, Dr. Fernando Martínez Morales y la Dra. Ma. Carmen Beltrán Núñez, por la revisión de esta tesis, por sus valiosos comentarios y sugerencias.

A la universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM) por haber compartido sus conocimientos a lo largo de la preparación para mi profesión y a la universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por brindarme la oportunidad en este trabajo de titulación y enriquecerme en conocimiento.

DEDICATORIA

Dedico este proyecto principalmente a Dios, por permitirme darme la oportunidad de estudiar la universidad, por siempre guiarme y orientarme.

A mi familia Olea Ozuna por transmitirme sus sabios consejos, quienes han sido mi constante apoyo y motivación en todos mis esfuerzos académicos y personales, les doy las gracias por su amor incondicional, por siempre estar conmigo y sobre todo creer en mí, a ustedes les dedico de todo corazón esta tesis, este logro es también de ustedes, los amo.

“Pon en manos del Señor todas tus obras, y tus proyectos se cumplirán.”

Proverbios 16:3

“Tú eres la única persona que piensa en tu mente. Eres el poder y autoridad en tu mundo.”

Louise Hay

CONTENIDO

CONTENIDO	4
ÍNDICE DE FIGURAS	6
ÍNDICE DE TABLAS	6
ABREVIATURAS	7
RESUMEN.....	9
ABSTRACT.....	9
1. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1 Envoltura celular en bacterias	13
1.2 Diversidad de lípidos de membrana en bacterias	14
1.3 Biosíntesis de glicerofosfolípidos	15
1.3.1 Biosíntesis de ácido fosfatídico y citidina difosfato diacilglicerol	15
1.3.2 Síntesis de fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina en bacterias.....	18
1.3.3 Síntesis de fosfatidilglicerol, cardiolipina y lípidos derivados de ambos.....	20
2.1 Lípidos libres de fósforo.....	22
2.1.1 Biosíntesis de lípidos de ornitina	26
3. JUSTIFICACIÓN.....	29
4. OBJETIVOS	30
4.1 Objetivo general	30
4.2 Objetivos específicos	30
5. METODOLOGÍA.....	31
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
6.1 Remodelación de lípidos de membrana en condiciones de estrés abiótico	32
6.1.1 La limitación de fosfato altera la composición de lípidos de membrana	32

6.1.2 Cambios de temperatura modifican la composición de lípidos de membrana	39
6.1.3 El pH ácido conduce a cambios en la composición de lípidos de membrana.....	44
7. DISCUSIÓN GENERAL.....	51
8. CONCLUSIONES	52
9. PERSPECTIVAS.....	53
10. REFERENCIAS	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diversos estreses ambientales o abióticos a los cuales bacterias pueden estar expuestas.	11
Figura 2. Estructura de la envoltura celular de las bacterias Gram-negativas y Gram-positivas.	14
Figura 3. Estructura de algunos glicerofosfolípidos de membranas en bacterias	15
Figura 4. Síntesis de ácido fosfatídico y CDP-diacilglicerol en bacterias	17
Figura 5. Síntesis de los fosfolípidos PS, PE y PC en bacterias	19
Figura 6. Síntesis de los fosfolípidos aniónicos PG y CL.....	21
Figura 7. Lípidos de membrana libres de fósforo derivados de DAG en bacterias	23
Figura 8. Lípidos de membrana presentes en bacterias que no presentan una estructura de DAG.. ..	25
Figura 9. Biosíntesis de OLs	27
Figura 10. Modificaciones de los OLs	28
Figura 11. Detección de fosfato en <i>E. coli</i>	34
Figura 12. Separación de lípidos en cromatografía en capa fina (TLC)	35
Figura 13. Estructuras de lípidos libres de fósforo en <i>S. meliloti</i>	36
Figura 14. Separación de lípidos de <i>A. tumefaciens</i> en cromatografía en capa fina bidimensional (2D-TLC)	38
Figura 15. Cómo las insaturaciones de los ácidos grasos afectan y el empaquetamiento de los lípidos y las propiedades de la membrana.....	40
Figura 16. Estructuras químicas de los ácidos grasos ramificados <i>iso</i> y <i>antesiso</i> que se pueden encontrar en fosfolípidos de membrana	41
Figura 17. Ácidos grasos mono-insaturados pueden existir en la configuraciones <i>cis</i> o <i>trans</i>	41
Figura 18. Separación de lípidos de <i>R. tropici</i> CIAT899 en 2D-TLC.. ..	43
Figura 19. Ciclopropanación de ácidos grasos insaturados ligados a lípidos de membrana.....	45
Figura 20. Crecimiento de una mutante de <i>R. tropici</i> CIAT 899 deficiente en el gen <i>olsC</i>	47
Figura 21. Caracterización del crecimiento de <i>R. tropici</i> formando diferentes OLs a pH de 7.0 y 4.5	48
Figura 22. Modificación de los OLs por la hidroxilasa <i>OlsD</i> en condiciones de crecimiento a pH 4.0.....	49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de lípidos de membrana de <i>S. meliloti</i>	36
Tabla 2. Composición de lípidos de membrana de <i>A. tumefaciens</i>	44
Tabla 3. Proporciones de ácidos grasos de membrana en cultivos de <i>S. mutans</i> UA159	46

ABREVIATURAS

2D-TLC: two-dimensional thin layer chromatography - cromatografía en capa fina bidimensional

ACP: acyl carrier protein - proteína acarreadora de grupos acilo

ADN: deoxyribonucleic acid - ácido desoxirribonucleico

BCFA: branched-chain fatty acids - ácidos grasos de cadena ramificada

BKD: branched-chain α -keto acid dehydrogenase - α -cetoácido deshidrogenasa de cadena ramificada

CDP: cytidine diphosphate - difosfato de citidina

CDP-DAG: cytidine diphosphate- diacylglycerol - difosfato de citidina-diacilglicerol

CFA: cyclopropane fatty acids - ácidos grasos de ciclopropano

CL: cardiolipin - cardiolipina

CMP: cytidine monophosphate - monofosfato de citidina

DAG: diacylglycerol - diacilglicerol

DGTS: diacylglyceryl *N,N,N*- trimethylhomoserine - diacilgliceril trimetilhomoserina

G3P: *sn*-glycerol-3-phosphate - glicerol-3-fosfato

HOP: hopanoids - hopanoides

LOL: lyso-ornithine lipid - lisolípido de ornitina

LPS: lipopolysaccharides - lipopolisacáridos

ME: outer membrane - membrana externa

MI: inner membrane - membrana interna

OL: ornithine lipids - lípidos de ornitina

P: phosphorus - fósforo

P1: ornithine lipid hydroxylated at carbon 2 of the esterified fatty acid - lípido de ornitina hidroxilado en el carbono 2 del ácido graso esterificado

P2: ornithine lipid hydroxylated at the amino acid ornithine and at carbon 2 of the esterified fatty acid
- lípido de ornitina hidroxilado en el aminoácido ornitina y en el carbono 2 del ácido graso esterificado

PA: phosphatidic acid - ácido fosfatídico

PC: phosphatidylcholine - fosfatidilcolina

Pcs: phosphatidylcholine synthase - fosfatidilcolina sintasa

PE: phosphatidylethanolamine - fosfatidiletanolamina

PG: phosphatidylglycerol - fosfatidilglicerol

PGP: phosphatidylglycerol phosphate - fosfatidilglicerol fosfato

Pi: inorganic phosphate o orthophosphate - fosfato inorgánico

PI: phosphatidylinositol - fosfatidilinositol

PLs: phospholipids - fosfolípidos

PmtA: phospholipid *N*-methyltransferase - fosfolípido *N*-metil-transferasa

S1: unmodified ornithine lipid - lípido de ornitina no modificado

S2: ornithine lipid hydroxylated at the amino acid ornithine - lípido de ornitina hidroxilado en el aminoácido ornitina

SCFA: straight chain fatty acids - ácidos grasos de cadena lineal

SFA: saturated fatty acid - ácido graso saturado

SfLs: sulfonolipids - sulfonolípidos

SLs: sulfolipids - sulfolípidos

TLC: thin layer chromatography - cromatografía en capa fina

UFA: unsaturated fatty acid - ácido graso insaturado

MODIFICACIÓN DE LAS MEMBRANAS BACTERIANAS EN DIFERENTES FORMAS DE ESTRÉS ABIÓTICO

RESUMEN

Las bacterias están expuestas con frecuencia a condiciones ambientales cambiantes. Para hacer frente a estos estreses y sobrevivir, las bacterias han desarrollado diferentes mecanismos de respuesta, y entre ellos se encuentran los cambios en la composición lipídica de su membrana. Estas modificaciones de la membrana cambian las propiedades de la membrana, por ejemplo, su permeabilidad o su fluidez o liberan fosfato de los fosfolípidos de la membrana para otros procesos celulares. Comúnmente, las membranas bacterianas están formadas por glicerofosfolípidos, por ejemplo, fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilglicerol (PG), cardiolipina (CL) y fosfatidilcolina (PC). Sin embargo, condiciones de estrés como los cambios de temperatura, variaciones de pH o limitación de nutrientes conducen a modificaciones de lípidos existentes o al remplazo de glicerofosfolípidos por nuevos lípidos de membrana, como son los glicolípidos (GL), los sulfolípidos (SLs), el diacilglicerol *N,N,N*-trimetilhomoserina (DGTS), los hopanoides (HOP) o los lípidos de ornitina (OLs).

Palabras claves: Membrana bacteriana, glicerofosfolípidos, estrés abiótico, lípidos de ornitina.

ABSTRACT

Bacteria are frequently exposed to changing environmental conditions. To cope with these stresses and survive, bacteria have developed different response mechanisms, among them changes in the composition of membrane lipids. These modifications can change membrane properties, affect fluidity or permeability or allow the liberation of phosphate from membrane phospholipids that can be used for other cellular processes. Commonly, bacterial membranes are made up of glycerophospholipids, for example, phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylglycerol (PG), cardiolipin (CL), and phosphatidylcholine (PC). However, stress conditions such as temperature changes, pH variations or nutrient limitation lead to modifications of existing lipids or the

replacement of phospholipids by new membrane lipids, such as glycolipids (GL), sulfolipids (SLs), diacylglycerol *N,N,N*-trimethylhomoserine (DGTS), hopanoids (HOP) or ornithine lipids (OLs).

key words: Bacterial membrane, glycerophospholipids, abiotic stress, ornithine lipids.

1. INTRODUCCIÓN

Bacterias se han encontrado en prácticamente todos los entornos representando una gran variedad de condiciones: desde temperaturas debajo de cero centígrados hasta temperaturas mayores de 100 centígrados, de valores de pH muy ácidos a alcalinos, en concentraciones altas de metales pesados o de otros compuestos tóxicos, en condiciones de alta o baja salinidad o presión osmótica y en condiciones de presión extrema, por ejemplo. Bacterias capaces de crecer y reproducirse a bajas temperaturas están presentes en el Ártico, Antártida, los glaciares, las regiones alpinas, el mar profundo e incluso en lugares de almacenamiento de alimentos (Margesin *et al.*, 2008). Bacterias que crecen a altas temperaturas se han identificado y caracterizado en fuentes termales, suelos desérticos calientes y humedales salados (Aanniz *et al.*, 2015). Bacterias que crecen en entornos de pH ácido pueden encontrarse en la placa dental, alimentos fermentados, el intestino humano, los compartimentos gástricos de animales, los suelos ácidos, la rizosfera vegetal y las vacuolas líticas dentro de los macrófagos (Lund *et al.*, 2014). Los entornos con concentraciones altas de metales pesados en los que se encuentran bacterias son las fuentes hídricas, los suelos ácidos, las rocas y las minas (Fashola *et al.*, 2016). Las bacterias que enfrentan presión osmótica extrema habitan en agua de mar y lagos salados (Wood, 2015).

También las bacterias que se encuentran en lugares y hábitats que no se consideran extremos están expuestas a cambios y condiciones que frecuentemente son desfavorables y/o estresantes. Estas condiciones de estrés pueden representar una amenaza para su existencia. Las bacterias pueden estar expuestas a estreses bióticos, como la infección por bacteriófagos o estreses abióticos, como cambios de la temperatura, variaciones de pH, deficiencia de nutrientes como el carbono (C), nitrógeno (N), o fósforo (P), exceso de sales, exposición a compuestos tóxicos, metales pesados, estrés osmótico u oxidativo, o la exposición a antibióticos (Fig. 1). Para hacer frente a estas condiciones y cambios desfavorables y sobrevivir, las bacterias han desarrollado diferentes mecanismos de respuesta (Sager *et al.*, 2015; Džidić *et al.*, 2008; Darmon & Leach, 2014; Parsons & Rock, 2013).

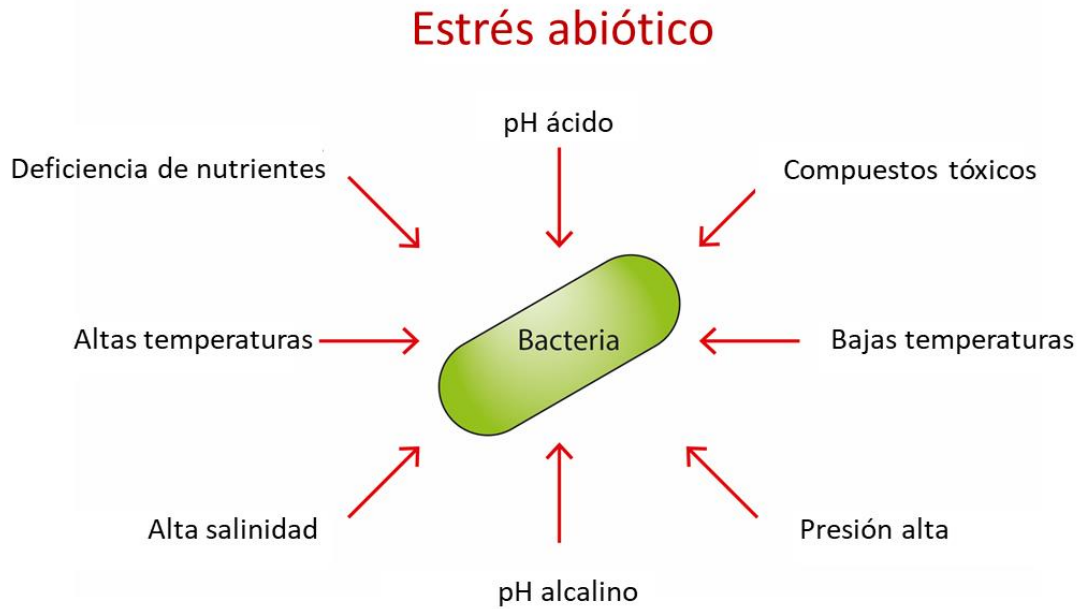


Figura 1. Diversos estreses ambientales o abióticos a los cuales bacterias pueden estar expuestas. Algunos ejemplos son: altas temperaturas, bajas temperaturas, pH ácido, pH alcalino, deficiencia de nutrientes, presencia de compuestos tóxicos, alta salinidad o presión alta.

Las bacterias pueden responder a variaciones de la temperatura del ambiente con la expresión de proteínas de choque térmico, de choque frío o alterando su metabolismo (Georlette *et al.*, 2004). Otro mecanismo de respuesta a variaciones en la temperatura del ambiente son cambios en la saturación o insaturación de los lípidos de la membrana plasmática (Denich *et al.*, 2003). En la respuesta a estrés por acidez, en diferentes bacterias se han descrito estrategias como el bombeo de protones, reparación o protección de macromoléculas, producción de amonio y reacciones de descarboxilación que consumen protones. Estas estrategias causan un aumento del pH intracelular o evitan que disminuya el pH citoplasmático, lo que reduce los efectos nocivos de los protones como el daño al ADN, daño a la membrana, mal plegamiento de las proteínas o la reducción de la actividad enzimática (Lund *et al.*, 2014).

En respuesta a la limitación de fosfato inorgánico (P_i), algunas bacterias expresan el regulón de fosfato (Pho) para optimizar el uso de P_i dentro de la célula (Wanner & Chang 1987). Este regulón incluye genes que codifican transportadores de fosfato de alta afinidad, enzimas que permitan acceder nuevas fuentes de fosfato como fosfatasas secretadas, enzimas para guardar y removilizar fosfato intracelular o enzimas que permitan remodelar la membrana celular. La enzima polifosfato cinasa

(PPK) utiliza el fosfato γ del ATP para sintetizar el polímero polifosfato. El polifosfato puede ser hidrolizado a P_i por exopolifosfatasas (PPX) o por endopolifosfatasas (PNN) (Brown & Komberg, 2004). Fosfatasas como fosfatasa alcalina pueden ser secretadas para hidrolizar compuestos orgánicos y liberar fosfato que puede ser liberado posteriormente por transportadores de alta afinidad. En algunas bacterias se ha descrito que ocurre el reemplazo de sus PLs por lípidos libres de fósforo, probablemente para liberar el fosfato de la membrana y ocuparlo en otros procesos celulares (Ulrich *et al.*, 2005; Minnikin & Abdolrahimzadeh, 1974; Minnikin *et al.*, 1974).

Para sobrevivir en sitios contaminados con metales pesados, algunas bacterias han desarrollado y adoptado diversos mecanismos de desintoxicación, como la biotransformación, la bioacumulación y la biosorción (Fashola *et al.*, 2016). Otro mecanismo es la alteración de la morfología celular, se observó en las bacterias *Pseudomonas putida* y *Enterobacter* sp. (Neumann *et al.*, 2005).

El uso excesivo e indebido de antibióticos en la medicina, agricultura, acuicultura y ganadería ha ocasionado una forma de estrés en las bacterias propiciando resistencia a los antibióticos actualmente utilizados (Gelband *et al.*, 2015). Existe una resistencia intrínseca natural debida a la ausencia o presencia de determinadas estructuras que ocasionan la ineficacia de los antibióticos o debido a la existencia de bombas de extrusión o a la impermeabilidad de la membrana para los antibióticos. Por otro lado, las bacterias pueden adquirir resistencia a través de mutaciones en los genes que codifican enzimas que son los blancos de los antibióticos o que son responsables para la síntesis de los blancos. Resistencia a antibióticos se puede adquirir también a través de transferencia horizontal de genes de resistencia que codifican factores requeridos para la resistencia a los antibióticos (Huemer *et al.*, 2020).

Las bacterias experimentan estrés osmótico cuando la presión osmótica de su entorno es variable, extremadamente baja o alta. La respuesta al estrés osmótico ha sido bien caracterizada en *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y la bacteria del suelo *Corynebacterium glutamicum* (Wood, 2011). Las bacterias responden al estrés osmótico en dos niveles diferentes de regulación: en el nivel de actividad de la proteína, como respuesta inmediata y en el nivel de transcripción de genes, en una escala de tiempo más prolongada (Krämer, 2010).

En este escrito, nos enfocaremos en las modificaciones de lípidos que sufre la membrana celular de bacterias en respuesta a condiciones de estrés abiótico. Primeramente, examinaremos las características estructurales de la envoltura celular bacteriana. Es importante describir la composición

como requisito previo para comprender la diversidad de los lípidos que forman las membranas, así como las vías biosintéticas y la funcionalidad de la membrana durante condiciones ambientales cambiantes que depende del potencial de la célula para ajustar la composición lipídica de su membrana.

1.1 Envoltura celular en bacterias

La envoltura celular bacteriana es una estructura compleja que separa la célula de su entorno y sirve además para proteger a estos organismos del ambiente que es a menudo hostil (Silhavy *et al.*, 2010). Varias propiedades de una célula bacteriana están determinadas por la arquitectura y la composición de su envoltura (Simpson *et al.*, 2015). La envoltura de una célula bacteriana puede contener una o dos membranas y tradicionalmente las bacterias se han clasificado en uno de dos grupos principales, Gram-positivas (monodermas) o Gram-negativas (didermas) (Fig. 2) (Gupta, 2011). La base de la distinción radica en diferencias estructurales fundamentales en la envoltura celular de estos dos grandes grupos de bacterias (Madigan *et al.*, 2015).

Las células bacterianas tienen una membrana citoplasmática también llamada membrana interna (MI) y está frecuentemente compuesta de (glicero)fosfolípidos (PLs). La MI está rodeada por una pared celular de peptidoglicano (Madigan *et al.*, 2015). El grosor de la pared celular varía entre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Las bacterias Gram-positivas tienen una pared celular gruesa, mientras que las bacterias Gram-negativas tienen solo una capa delgada de peptidoglicano. En bacterias Gram-negativas la pared celular delgada está rodeada por una segunda membrana llamada membrana externa (ME) (Fig. 2) (Raetz & Dowhan, 1990). La ME está compuesta comúnmente por PLs en la monocapa interna y lipopolisacáridos (LPS) en la monocapa externa.

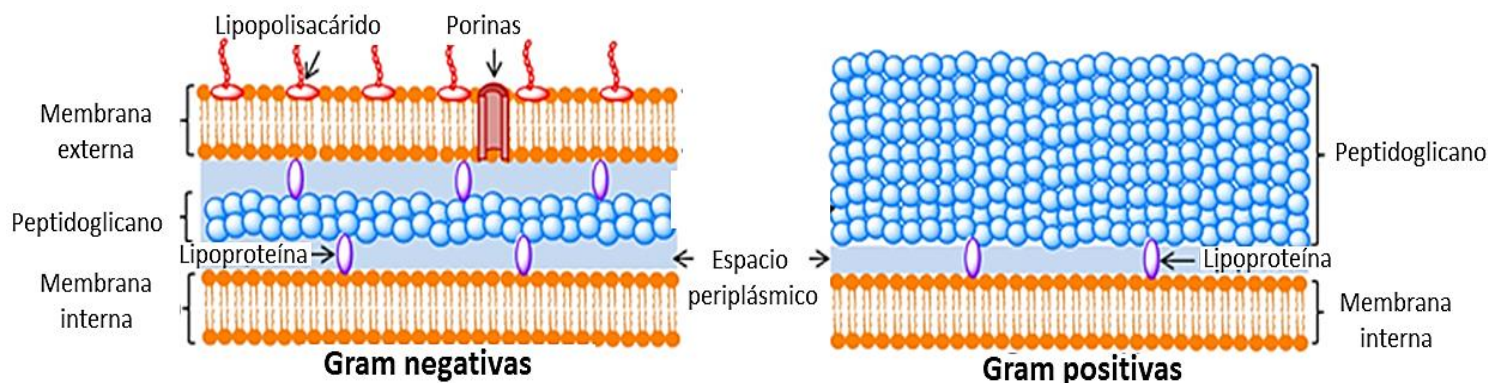


Figura 2. Estructura de la envoltura celular de las bacterias Gram-negativas y Gram-positivas. Las bacterias Gram-negativas presentan las siguientes características: una membrana interna (MI) compuesta principalmente de PLs, una capa delgada de peptidoglicano y una membrana externa (ME) que contiene PLs en la monocapa interna y LPS en la monocapa externa. Entre ambas membranas existe un espacio denominado periplasma. Las bacterias Gram-positivas presentan una membrana citoplasmática de PLs y una pared gruesa de peptidoglicano (Tomada y modificada de Berezin *et al.*, 2017).

1.2 Diversidad de lípidos de membrana en bacterias

Las membranas bacterianas presentan una amplia diversidad de lípidos anfifílicos, es decir, moléculas que poseen una parte polar y una parte hidrofóbica. En la mayoría de los casos y condiciones estudiadas los lípidos anfifílicos son PLs, compuestos por dos ácidos grasos, un residuo de glicerol, un grupo fosfato y un grupo cabeza variable (Fig. 3). Los PLs más comunes en bacterias son fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilglicerol (PG) y cardiolipina (CL). Otros PLs menos frecuentes son fosfatidilserina (PS), derivados metilados de PE, fosfatidilcolina (PC) y fosfatidilinositol (PI) (Sohlenkamp & Geiger, 2016). Además de los PLs, muchas bacterias también pueden formar lípidos de membrana con estructuras muy diferentes y que frecuentemente carecen de fósforo. Ejemplo de ello son: diacilglicerol (DAG), glicolípidos (GL), sulfolípidos (SLs), diacilglicerol-*N,N,N*-trimetilhomoserina (DGTS), hopanoides (HOP) o lípidos de ornitina (OLs) (López-Lara & Geiger, 2017; Geiger *et al.*, 2010a; Vences-Guzmán *et al.*, 2012). Otros lípidos se sugieren están asociados exclusivamente con la ME de muchas bacterias, como lipopolisacáridos (LPS), esfingolípidos (SphLs) o sulfonolípidos (SfLs) (Geiger *et al.*, 2010a). Los lípidos de membrana bacterianas que se han estudiado en detalle son de *E. coli*, *B. subtilis*, *Sinorhizobium meliloti* y *Rhizobium tropici*.

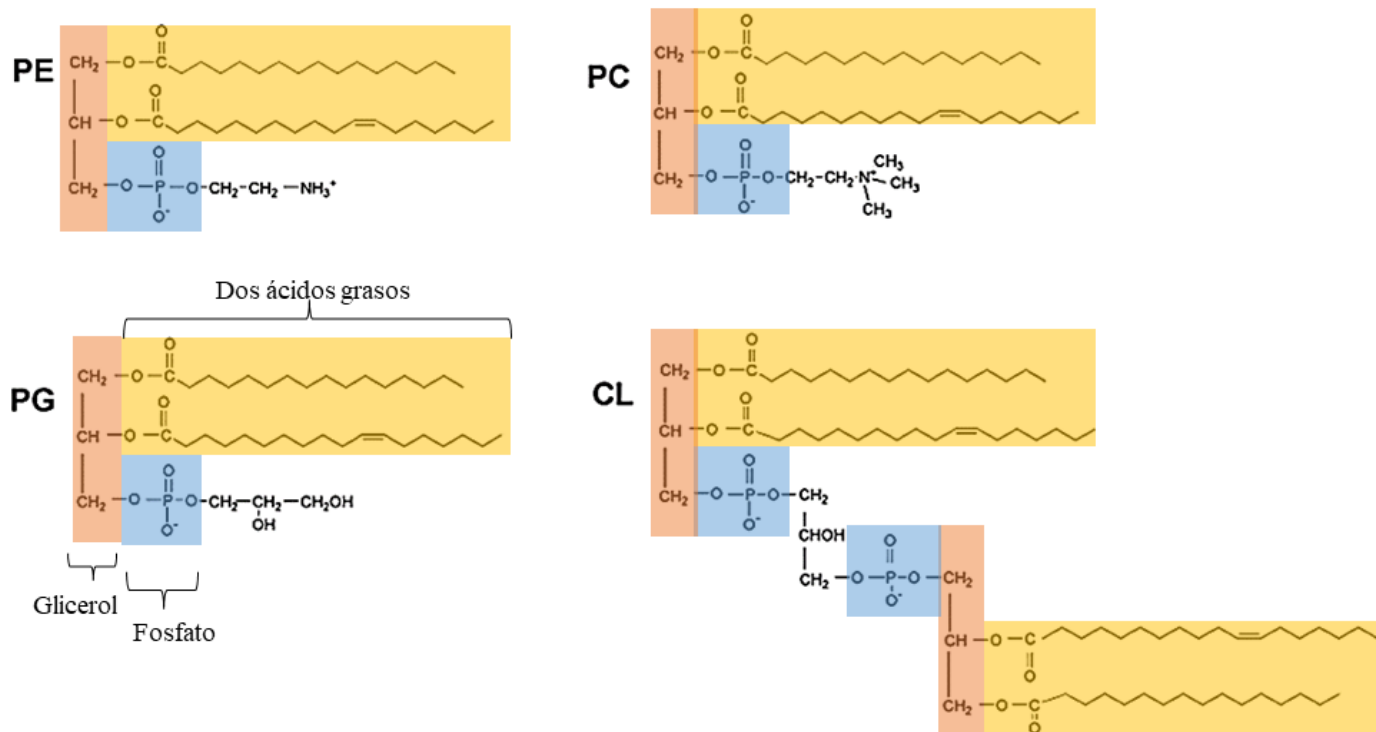


Figura 3. Estructura de algunos glicerofosfolípidos de membranas en bacterias. Fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilglicerol (PG), cardiolipina (CL) y fosfatidilcolina (PC). Los PLs están compuestos por dos ácidos grasos (color amarillo), un residuo de glicerol (color naranja), un grupo fosfato (color azul) y un grupo cabeza variable (Tomada y modifica de Vences-Guzmán, 2014).

1.3 Biosíntesis de glicerofosfolípidos

Diferentes investigaciones han descrito que los lípidos de membrana de bacterias y los cambios en la composición juegan un papel importante en la resistencia a condiciones de estrés abiótico. Para buscar entender la función de las membranas y de los lípidos que los componen, iniciamos con una revisión sobre la síntesis de PLs y otros lípidos de membrana en bacterias.

1.3.1 Biosíntesis de ácido fosfatídico y citidina difosfato diacilglicerol

A continuación, se describen las rutas de biosíntesis de PLs en bacterias. La molécula intermedia en la glucólisis dihidroxiacetona fosfato es convertida en *sn*-glicerol-3-fosfato (G3P) por la enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GpsA) (Fig. 4). Las bacterias también pueden

obtener G3P directamente del medio ambiente empleando el transportador GlpT o mediante la incorporación del glicerol del medio y su posterior fosforilación mediante la porina GlpF y el glicerol quinasa GlpK, respectivamente (Fig. 4) (Yao & Rock, 2013). La síntesis de PLs inicia con la acilación de glicerol-3-fosfato (G3P) en la posición *sn*-1 para generar ácido liso-fosfatídico (LPA). LPA puede formarse por dos vías diferentes. 1) La aciltransferasa PlsB transfiere una cadena de acilo de la acil coenzima A (acil-CoA) a G3P para formar LPA. Esta vía aparentemente está restringida a unas pocas γ -proteobacterias, como *E. coli*. 2) Una segunda vía mucho más ampliamente distribuida en bacterias, involucra dos reacciones separadas a través de las enzimas PlsX y PlsY. PlsX convierte acil-ACP (proteína acarreadora de grupos acilos) en acil-fosfato, que posteriormente es utilizado por PlsY para transferir una cadena de acilo a G3P para formar LPA (Fig. 4) (Yao & Rock, 2013). El ácido fosfatídico (PA) se sintetiza a través de una segunda acilación de G3P en la posición *sn*-2. Esta reacción es realizada por la aciltransferasa PlsC. Posteriormente, el siguiente paso es realizado por la citidina difosfato diacilglicerol (CDP-DAG) sintetasa (CdsA), que utiliza PA y citidina trifosfato como sustratos para producir CDP-DAG, un intermediario clave en la biosíntesis de PLs (Fig. 4) (Rock, 2008).

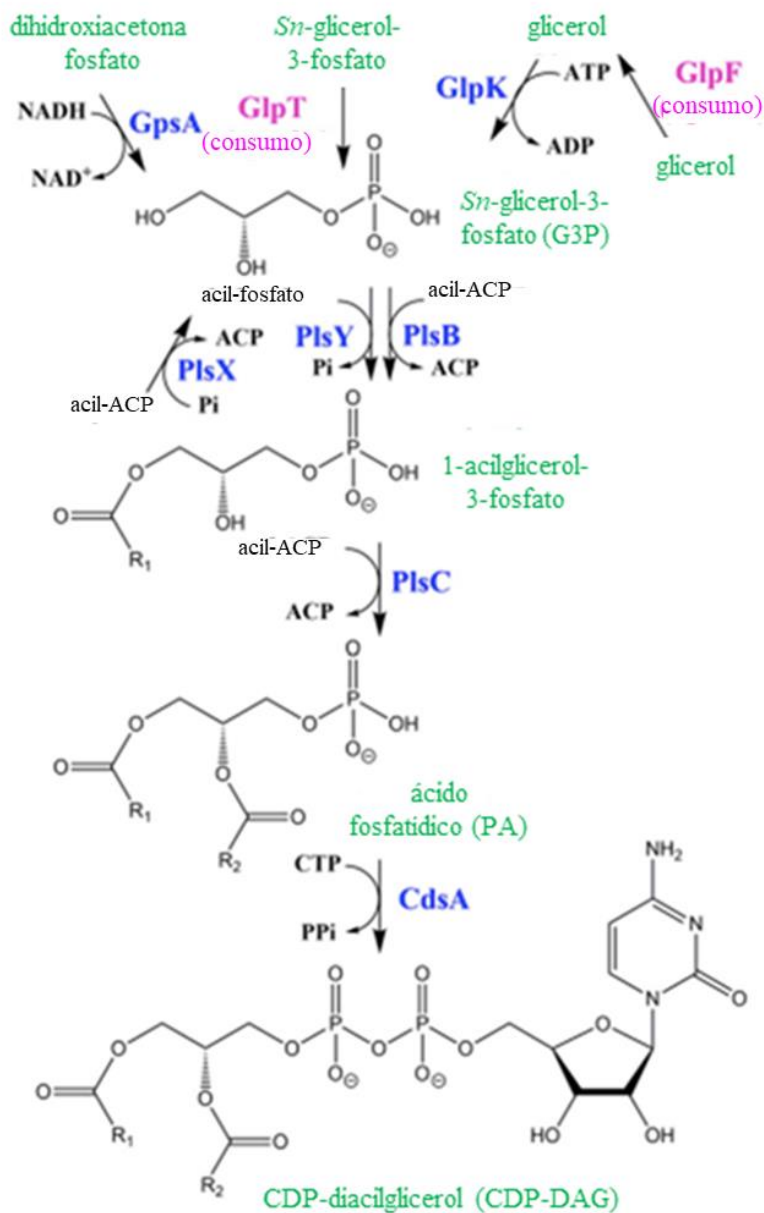


Figura 4. Síntesis de ácido fosfatídico y CDP-diacilglicerol en bacterias. El *sn*-glicerol-3-fosfato es acilado dos veces para producir ácido fosfatídico (PA), posteriormente es activado a CDP-diacilglicerol mediante la enzima CDP-DAG sintasa (CdsA). Fosfatidilglicerofosfato sintasa (GpsA), glicerol quinasa (GlpK), adenosín trifosfato (ATP), difosfato de adenosina (ADP), proteína transportadora de grupos acilos (ACP), fosfatidilinositol (PI), citidina trifosfato (CTP), pirofosfato inorgánico (PPi) (Tomada y modificada de López-Lara & Geiger, 2017).

1.3.2 Síntesis de fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina en bacterias

La PE es un lípido zwitteriónico de membrana común en proteobacterias y otras bacterias. Su síntesis se describió por primera vez en *E. coli* (DeChavigny *et al.*, 1991). En muchas bacterias PE se sintetiza en dos pasos a partir de CDP-DAG. La fosfatidilserina sintasa (Pss) condensa CDP-DAG con el aminoácido L-serina, para formar fosfatidilserina (PS) y citidina monofosfato (CMP). En el segundo paso, la PS descarboxilasa (Psd) descarboxila PS dando como productos PE y CO₂ (Fig. 5) (Rock, 2008). Para la síntesis de PC se han descrito 4 vías. En la vía de metilación (Pmt), PC se sintetiza a través de tres metilaciones continuas de PE, usando el donador de grupos metilo *S*-adenosil-L-metionina (SAM) mediante la enzima fosfatidiletanolamina *N*-metiltransferasa (PmtA), para formar monometil-PE, dimetil-PE y finalmente PC (Fig. 5) (de Rudder *et al.*, 2000). En la vía de PC sintasa (Pcs), la colina se condensa directamente con CDP-DAG para formar PC y CMP (Sohlenkamp *et al.*, 2000). La vía Pcs está ampliamente distribuida en α -proteobacterias y está ausente en β -proteobacterias. Dentro de las γ -proteobacterias, está presente en la mayoría de las especies de *Pseudomonas* y en los géneros *Legionella*, *Halomonas* y *Francisella*, dentro de la δ -proteobacteria solo unas pocas cepas de *Desulfovibrio* presentan un gen *pcs* putativo. Los genes que codifican Pcs también se pueden encontrar fuera de las proteobacterias, la mayoría de las cepas de *Borrelia*, varias *Actinomycetales* y varios *Planctomycetales* tienen Pcs (Geiger & López-Lara., 2013). Otras rutas de síntesis de PC se descubrieron recientemente en *Xanthomonas campestris* y *Treponema denticola*. En *X. campestris* la glicerofosfocolina (GPC) se acila dos veces para obtener PC (Moser *et al.*, 2014a). En *T. denticola* la síntesis de PC es catalizada en tres pasos. Los dos primeros pasos de la vía son catalizados por la enzima bifuncional LicCA responsable de la formación de CDP-colina a partir de colina (Kent *et al.*, 2004). El paso final de la vía que conduce a la formación de PC es catalizado por la enzima 1,2-diacilglicerol colina fosfotransferasa (Ctp) a partir de CDP-colina y diacilglicerol (Vences-Guzmán *et al.*, 2017).

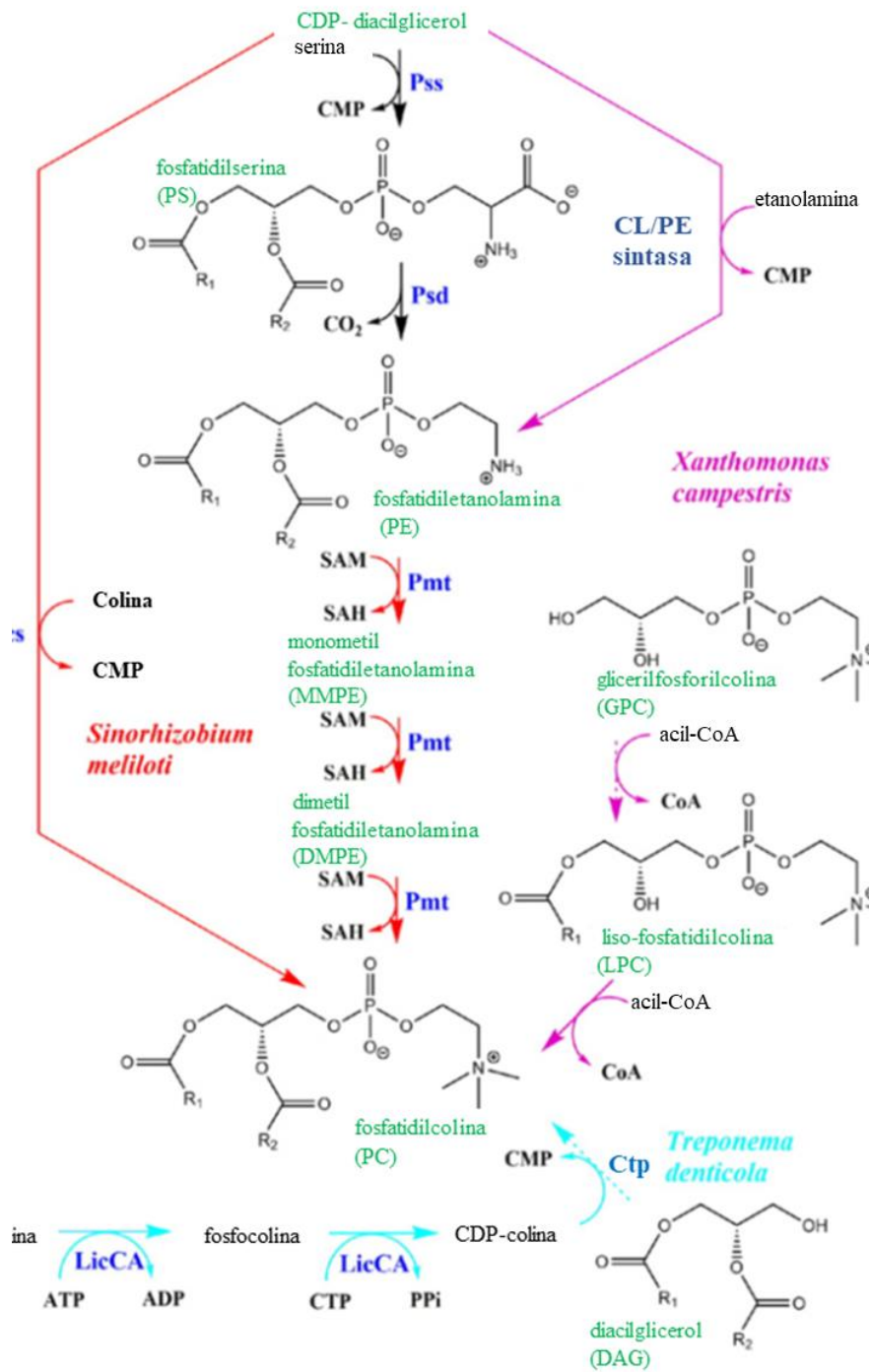


Figura 5. Síntesis de los fosfolípidos PS, PE y PC en bacterias. La síntesis del fosfolípido zwitteriónico PE ocurre en 2 pasos, catalizadas por la fosfatidilserina sintasa (Pss) y la fosfatidilserina descarboxilasa (Psd). Para la síntesis de PC se han descrito 4 vías. Citidina difosfato-diacilglicerol (CDP-DAG), vía de la PC sintasa (Pcs), fosfatidilserina sintasa (Pss), fosfatidilserina (PS), fosfatidilserina descarboxilasa (Psd), fosfatidiletanolamina (PE), *S*-adenosil-L-metionina (SAM), *S*-adenosil-L-homocisteína (SAH), citidina monofosfato (CMP), fosfocolina citidililtransferasa (CTP), cadenas de ácidos grasos (R_1 , R_2) (Tomada y modificada de López-Lara & Geiger, 2017).

1.3.3 Síntesis de fosfatidilglicerol, cardiolipina y lípidos derivados de ambos

El PL aniónico PG se sintetiza en dos pasos a partir de CDP-DAG, primero la fosfatidilglicerofosfato sintasa (PgsA) transfiere *sn*-glicerol-3-fosfato a CDP-DAG, generando fosfatidilglicerofosfato (PGP) y CMP. Después PGP es inmediatamente desfosforilado por una PGP fosfatasa para formar PG (Fig. 6). En *E. coli* se han descrito tres diferentes fosfatasas (PgpA, PgpB y PgpC) que pueden desfosforilar PGP para formar PG (Lu *et al.*, 2011). Finalmente, la CL sintasa ClsA sintetiza CL a partir de dos moléculas de PG. *E. coli* tiene dos más CL sintasas llamadas ClsB y ClsC. ClsC forma CL a partir de PG y PE (Tan *et al.*, 2012). *Streptomyces coelicolor* y otros actinomicetos utilizan la vía eucariota para sintetizar CL a partir de CDP-DAG y PG, formando así CL y CMP (Sandoval-Calderon *et al.*, 2009). En *X. campestris*, una sintasa bifuncional CL/PE sintetiza CL a partir de CDP-DAG y PG, además también puede catalizar la formación de PE dependiente de etanolamina (Moser *et al.*, 2014b).

En *Staphylococcus aureus* se describió que el lípido aniónico PG puede ser convertido en lípido catiónico lisil-PG (LPG). En esta reacción, la lisina se transfiere de un tRNA^{Lys} cargado al grupo de cabeza de glicerol de PG (Gould & Lennarz, 1967; Lennarz *et al.*, 1967; Nesbitt & Lennarz, 1968). El gen que codifica la enzima MprF responsable de la formación de LPG se describió por primera vez también en *S. aureus* durante una selección de mutantes más susceptibles que el tipo silvestre a los péptidos antimicrobianos catiónicos (Peschel *et al.*, 2001). En *Listeria monocytogenes* un aminoacil-PG sintasa se requiere para su formación y si la formación de LPG está alterada en *Listeria*, además se altera la formación de lisil-CL (LCL), lo cual indica que no es necesario una segunda enzima para la transferencia de aminoacilos a CL (Dare *et al.*, 2014). No queda claro si el aminoácido (lisina o alanina) es transferido a CL o si una CL sintasa puede usar la PG aminoacilada como sustrato y convertirla en LCL o alanil-CL (ACL).

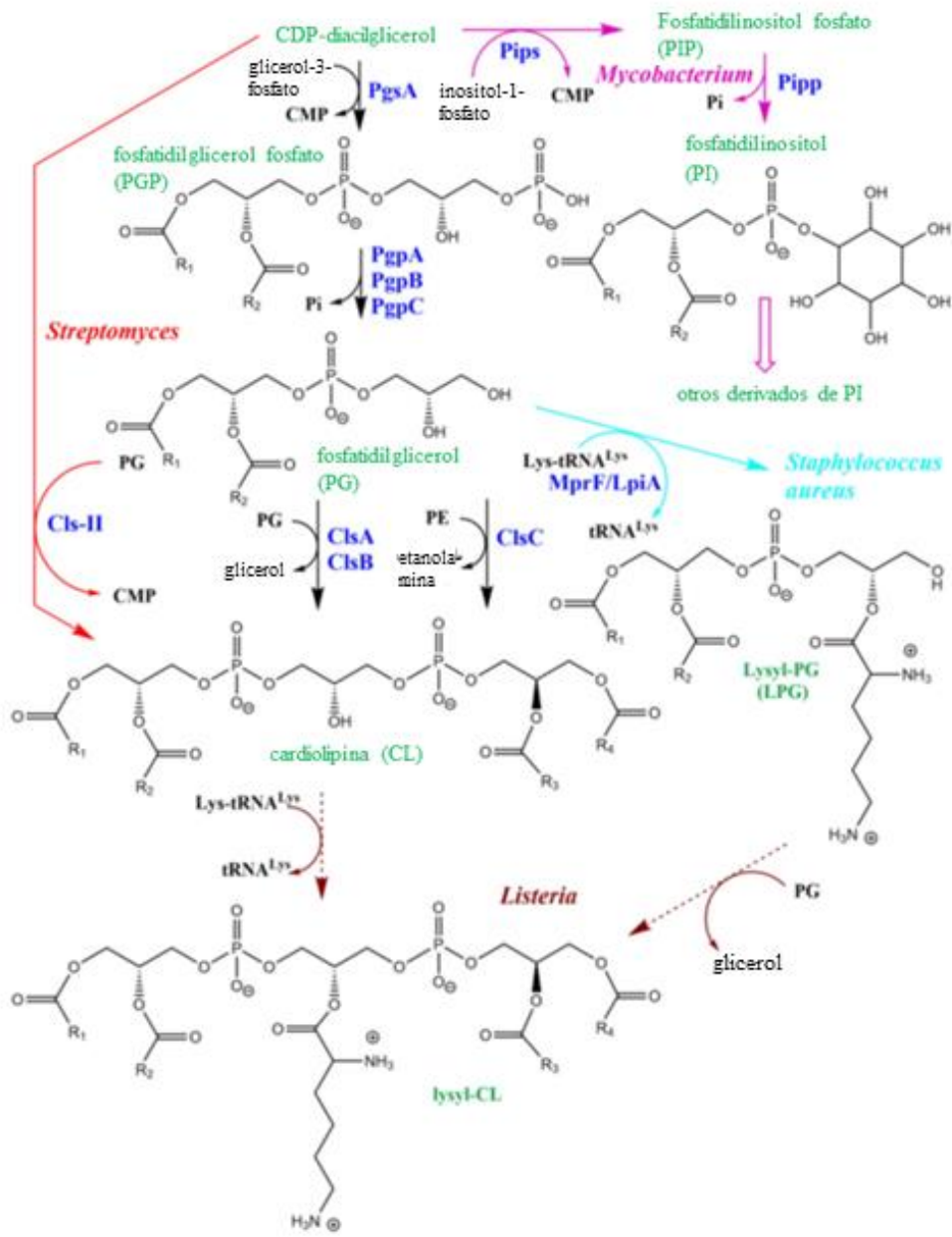


Figura 6. Síntesis de los fosfolípidos aniónicos PG y CL. La síntesis del fosfolípido aniónico PG, inicia con la PgsA, la cual cataliza la condensación de G3P con CDP-DAG, para formar PGP que se desfosforila por una fosfatasa para formar PG. En *E. coli* se caracterizó la enzima ClsA, que sintetiza CL mediante la condensación de dos moléculas de PG, dando como producto CL. Fosfatidilglicerofosfato sintasa (PgsA), fosfatidilglicerol (PG), cardiolipina (CL), fosfatidilinositol 1-fosfato fosfatasa (Pipp) (Tomada y modificada de López-Lara & Geiger, 2017).

2.1 Lípidos libres de fósforo

Durante décadas, el principal modelo para el estudio de la biosíntesis de lípidos de membrana en bacterias ha sido *E. coli*, que acumula tres PLs en su membrana. Anteriormente se pensaba que todas las bacterias tenían la misma composición lipídica. Sin embargo, ahora se sabe que muchas otras bacterias poseen una membrana más compleja y sintetizan otros glicerofosfolípidos tales como: PS, PC o PI (Sohlenkamp & Geiger, 2016). Además de los PLs, las bacterias pueden formar una variedad de lípidos de membrana libres de fósforo a partir de diacilglicerol (DAG). Ejemplo de estos lípidos son GL, SLs y DGTS. Otros lípidos de membrana presentes en bacterias que no presentan una estructura de DAG, son SfLs, SphLs, HOP y los OLs (López-Lara & Geiger, 2017; Geiger *et al.*, 2010ab). Actualmente con el gran número de genomas accesibles se pueden hacer predicciones sobre la distribución de los lípidos.

Los glucosil diacilgliceroles (GL) son glicolípidos de membrana descritos en plantas, animales y bacterias Gram-positivas, pero existen también algunas publicaciones sobre GL en bacterias Gram-negativas. Por ejemplo, en condiciones de crecimiento que limitan el P_i , *Mesorhizobium loti* produce la glicosiltransferasa procesiva Pgt que provoca la formación de GL (Devers *et al.*, 2011). Estos lípidos contienen glucosa o galactosa, en algunos casos también manosa u otros azúcares con diferentes enlaces glucosídicos en su grupo de cabeza (Fig. 7) (Hözl & Dörmann, 2007).

Los SLs, se encuentran principalmente distribuidos en organismos fotosintéticos, desde bacterias hasta plantas (Fig. 7) (Benning, 1998). Se ha demostrado que los SLs son requeridos para el crecimiento de *Rhodobacter sphaeroides* y las cianobacterias en condiciones limitantes de P_i . Se ha mostrado una correlación inversa entre la cantidad de PG y SLs en condiciones de limitación de P_i , sugiriendo que los SLs reemplazan a PG en limitación de P_i (Benning *et al.*, 1993). Ambos lípidos SLs y PG son aniónicos con carga negativa en sus grupos cabeza. El PG es el único PL en las cianobacterias (Wada & Murata, 1998).

Los DGTS constituyen parte de las membranas de los organismos eucariotas inferiores, como algas verdes, musgos, helechos, hongos o amebas (Fig. 7) (Künzler & Eichenberger, 1997; Furlong

et al., 1986). En algunas α -proteobacterias se ha sugerido que en condiciones de limitación de P_i los DGTS reemplazan a PC (Benning *et al.*, 1995; Geiger *et al.*, 1999). Ambos, DGTS y PC son zwitteriónicos a pH fisiológico y pueden ser intercambiables para funciones esenciales en bacterias. La primera α -proteobacteria, en la que se estudió la formación de DGTS fue en *R. sphaeroides* (Benning *et al.*, 1995).

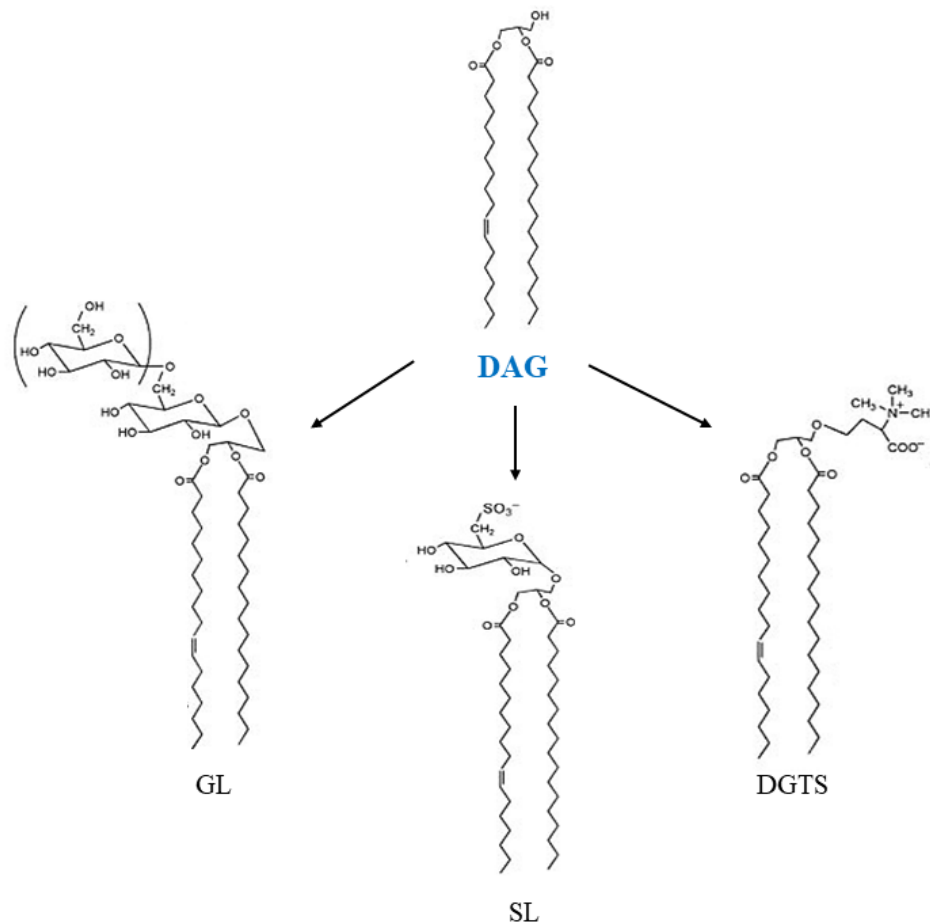


Figura 7. Lípidos de membrana libres de fósforo derivados de DAG en bacterias. Además de los glicerofosfolípidos, muchas bacterias pueden formar lípidos de membrana derivados del diacilglicerol (DAG), que carecen de fósforo en su estructura, entre ellos diferentes glicolípidos, lípidos de sulfolípidos (SL) o diacilgliceril trimetilhomoserina (DGTS). Las rutas para la biosíntesis de glicolípidos, sulfolípidos y DGTS se inician todas con el precursor común DAG (Tomada y modificada de Geiger *et al.*, 2010b).

Los SphLs ocurren solo en unas pocas bacterias, especialmente en algunas bacterias anaerobias, donde parecen reemplazar funcionalmente a otros lípidos de membrana bacteriana. Se ha descrito algunas bacterias Gram-negativas, como sp. *Capsulata*, sp. *adhaerens* y *Sorangium cellulosum* que carecen de LPS en su ME y en su lugar tienen Glico-SphLs como reemplazos funcionales (Kawahara *et al* 2000; Kawahara *et al.*, 2001; Keck *et al*, 2011). También se han identificado en las especies *Sphingomonas* (Kawahara *et al.*, 1991; Kawahara *et al.*, 2002). Varias cepas de la especie *Bacteroides* tienen dos tipos de Fosfo-SphLs, Ceramida-fosfoetanolamina y Ceramida-fosfoglicerol (Fig. 8) (Kato *et al.*, 1995). Se sugiere que la capacidad para formar SphLs está más extendida en α -proteobacterias (*Gluconobacter*, *Granulibacter*, *Caulobacter*) de lo que se pensaba anteriormente, incluso puede estar presente en la β -proteobacteria *Nitrosomonas* y en varias cepas patógenas de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) (Geiger *et al.*, 2010a).

Los SfL son lípidos inusuales que se encuentran en las ME de las bacterias Gram-negativas del filo *Bacteroidetes* (Godchaux & Leadbetter, 1983; Godchaux & Leadbetter, 1988). Los SfLs se pueden describir como una clase inusual de SphLs con un grupo de ácido sulfónico en la base del esfingoide y están relacionados estructuralmente con las ceramidas. Basado en la similitud estructural, se sugirió anteriormente que su biosíntesis podría funcionar de manera análoga (Fig. 8) (Merrill, 2011; Geiger *et al.*, 2010a; Walker *et al.*, 2017). En un estudio se describió la identificación de la cisteato-grasa acil transferasa Fjoh_2419, la cual es requerida para la síntesis de la capnina precursora de SfLs en *Flavobacterium johnsoniae*. La expresión del gen *fjoh_2419* en *E. coli* provocó la formación de una molécula derivada de capnina. En *F. johnsoniae* los mutantes deficientes en *fjoh_2419* carecían de SfL (Vences-Guzmán *et al.*, 2021). Se sugiere que la ruta de los SfL es distinta a la ruta de los SphLs bacterianos porque hay una cetorreductasa que produce capnina después del paso de condensación, en lugar de después del paso de acilación. Sin embargo, la cetorreductasa empleada en el ensayo bioquímico no se validó genéticamente como componente de la vía biosintética de SfL (Liu *et al.*, 2022).

Los HOP son triterpenos pentacíclicos que se encuentran localizados en las membranas de algunas bacterias (Rohmer *et al.*, 1984; Jahnke *et al.*, 1992; Jürgens *et al.*, 1992; Simonin *et al.*, 1996). Los HOP bacterianos pueden ser análogos del colesterol, el cual se encuentra generalmente ausente en bacterias (Fig. 8) (Ourisson *et al.*, 1987; Rohmer *et al.*, 1979). Los HOP se encuentran presentes

en cianobacterias, actinomicetos, algunas α -proteobacterias, β -proteobacterias y δ -proteobacterias (Blumenberg *et al.*, 2009; Seipke & Loria 2009; Welander *et al.*, 2010, Welander *et al.*, 2012; Schmerk *et al.*, 2011; Sáenz *et al.*, 2012; Schmerk *et al.*, 2015).

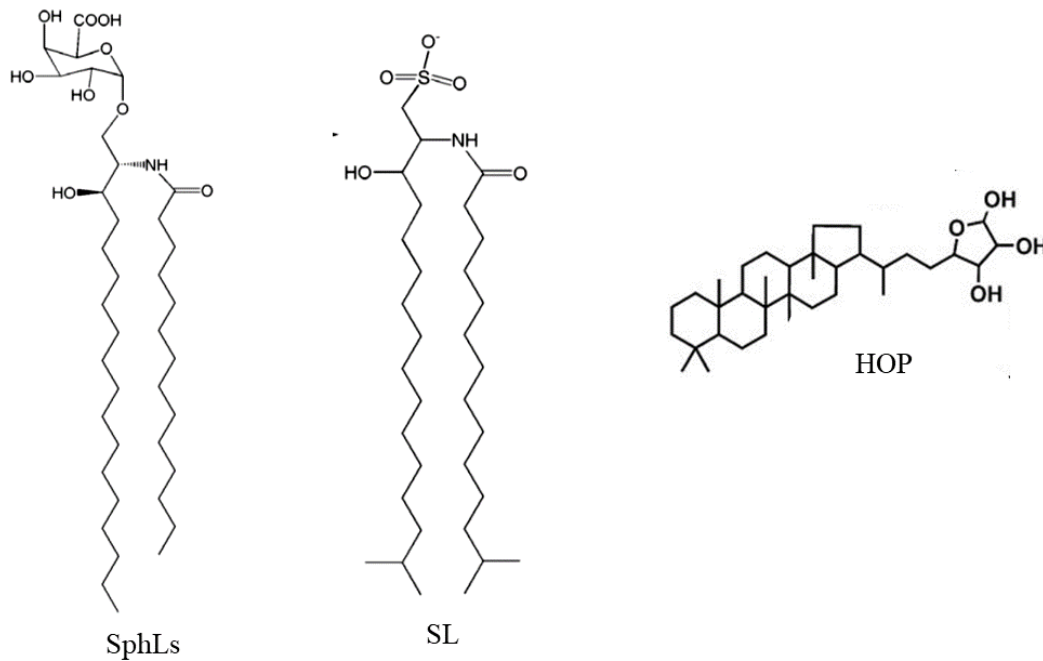


Figura 8. Lípidos de membrana presentes en bacterias que no presentan una estructura de DAG. Se sugiere que SphLs y SfLs están asociados exclusivamente con la ME de muchas bacterias. Los HOP están involucrados en mejorar la estabilidad e impermeabilidad de la membrana bacteriana. Esfingolípidos (SphLs), sulfonolípidos (SfLs) hopanoides (HOP).

2.1.1 Biosíntesis de lípidos de ornitina

Un grupo importante de lípidos libres de fósforo son los aminolípidos que contienen un grupo de cabeza de uno o dos aminoácidos unidos a un ácido graso β -hidroxilado a través de un enlace amida (lisina, glicina, serinaglicina y glutamina). El aminolípido mejor estudiado es el OLs que contiene el aminoácido no proteínogénico ornitina como grupo cabeza (Geiger *et al.*, 2010a; Moore *et al.*, 2016).

Los OLs están ampliamente distribuidos entre las bacterias Gram-negativas y en algunas bacterias Gram-positivas, como las especies de *Mycobacterium* y *Streptomyces*, sin embargo parecen estar ausentes en *Archaea* y *Eukarya* (López-Lara *et al.*, 2003; Geiger *et al.*, 2010a; Vences-Guzmán, 2014). Aunque los OLs pueden estar presentes en ambas membranas de bacterias Gram-negativas, se ha demostrado que las especies *Thiobacillus thiooxidans*, *R. tropici* y *Brucella abortus* los enriquecen en la ME (Dees & Shivery 1982; Vences-Guzmán *et al.*, 2011; Palacios-Chaves *et al.*, 2011). Basados en el análisis de las secuencias del ADN genómico, se estima que aproximadamente el 50% de las especies bacterianas secuenciadas tienen la capacidad de formar OLs constitutivamente o en condiciones específicas de crecimiento (Vences-Guzmán *et al.*, 2015; Sohlenkamp & Geiger, 2016; Córdoba-Castro, 2022).

En *S. meliloti*, los OLs se sintetizan en dos pasos enzimáticos (Fig. 9) (Gao *et al.*, 2004; Weissenmayer *et al.*, 2002). En el primer paso la *N*- aciltransferasa OlsB acila al aminoácido ornitina con un ácido graso 3-hidroxilado formando lisolípido de ornitina (LOL) (Gao *et al.*, 2004). El segundo paso, la *O*-aciltransferasa OlsA realiza una acilación al residuo hidroxilo del primero ácido graso formando OLs (Weissenmayer *et al.*, 2002). En *Serratia proteamaculans* se descubrió una enzima bifuncional llamada OlsF capaz de catalizar las dos reacciones de acilación requeridas para la formación de OLs (Fig. 9) (Vences-Guzmán *et al.*, 2015).

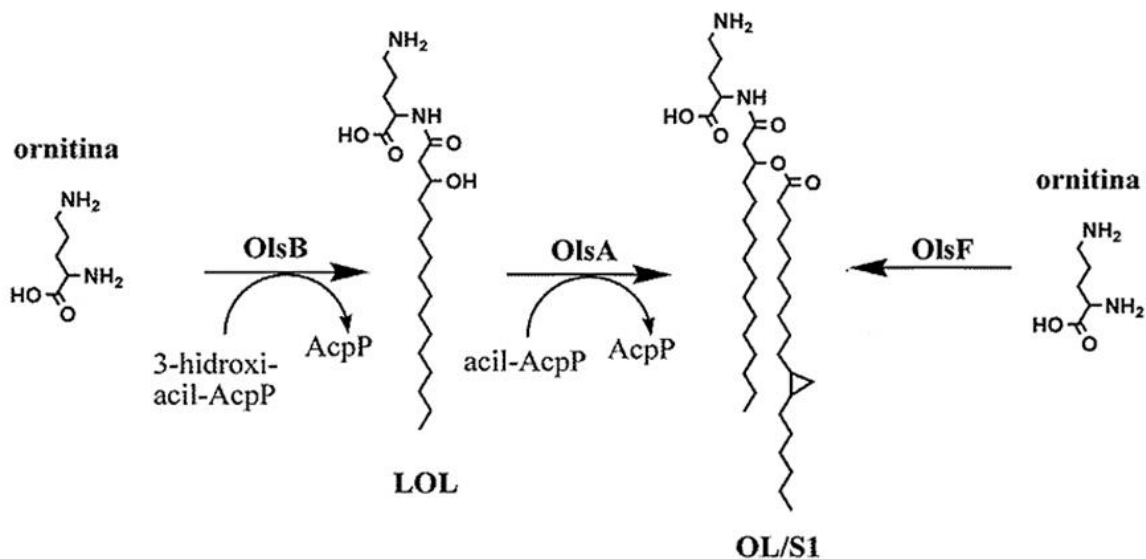


Figura 9. Biosíntesis de OLs. La síntesis de OLs se realiza a partir de dos reacciones enzimáticas: la *N*-aciltransferasa OlsB forma la molécula de liso-lípido de ornitina (LOL), la *O*-aciltransferasa OlsA forma la molécula de OL. Ambas enzimas utilizan la proteína acarreadora de grupos acilo constitutiva (AcpP) como donador de grupos acilo. La enzima bifuncional OlsF puede realizar las actividades enzimáticas de OlsB y OlsA. No se ha determinado cuál es el donador de grupos acilo de la proteína OlsF. (Tomada y modificada de Vences-Guzmán *et al.*, 2012; Vences-Guzmán *et al.*, 2015).

Hasta el momento se han descrito cuatro enzimas que pueden modificar los OLs, tres hidroxilasas y una metiltransferasa (Fig. 10). En *R. tropici* se describió la enzima OlsC, la cual adiciona un grupo hidroxilo en la posición 2 del ácido graso unido por enlace éster (Rojas-Jiménez *et al.*, 2005; Vences-Guzmán *et al.*, 2011). En *Burkholderia cenocepacia* se describió la enzima OlsD, la cual introduce un grupo hidroxilo en la posición 2 del ácido graso unido por enlace amida (González-Silva *et al.*, 2011). En *R. tropici* se identificó OlsE, quien introduce un grupo hidroxilo en el aminoácido ornitina en la posición 4 (Vences-Guzmán *et al.*, 2011; Hölzl *et al.*, 2018). Finalmente, en *Singulisphaera acidiphila* se identificó OlsG que realiza la triple metilación en el grupo amino de la ornitina (Escobedo-Hinojosa *et al.*, 2015). Además, datos bioquímicos y estructurales muestran que existe una enzima en el género *Gluconobacter* y otras bacterias pertenecientes a las *Rhodospirillales* que cataliza la formación de una OL modificada con taurina. En *Gluconobacter cerinus*, los OLs están hidroxilados en la posición C-2 del ácido graso unido a éster y pueden modificarse con un residuo de taurina que está unido a amida al grupo α -carboxilo de ornitina. Este

tauro-OL también se denomina cerilipina por la especie bacteriana de la que se aisló por primera vez (Tahara *et al.*, 1976ab).

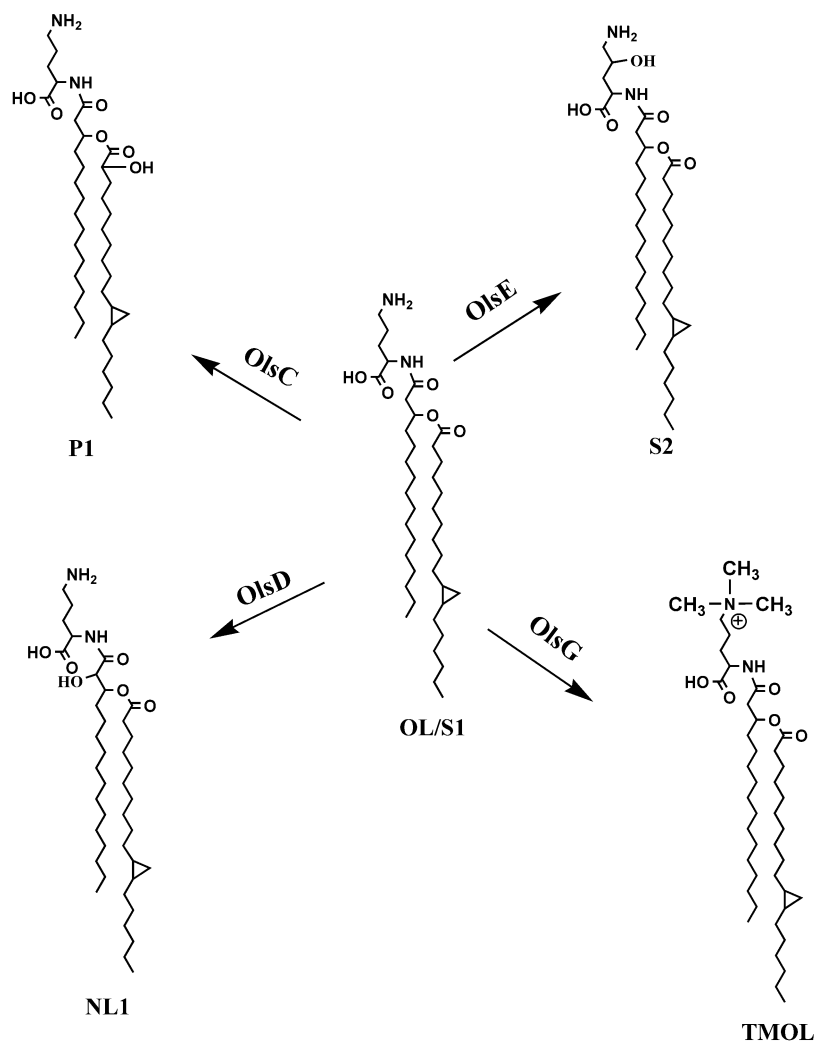


Figura 10. Modificaciones de los OLs. Se han descrito tres OLs hidroxilasas diferentes: OlsC, OlsD, OlsE además de la metiltransferasa OlsG. El OL S1 sin modificar es hidroxilado por OlsC, lo que lleva a la formación del OL P1, puede ser hidroxilado por OlsD, lo que lleva a la formación de OL NL1 o puede ser hidroxilado por OlsE, lo que lleva a la formación de OL S2. El OL S1 puede sufrir 3 metilaciones por OlsG en la cabeza de la ornitina, lo que lleva a la formación de TMOL: *N, N, N*- trimetil lípido de ornitina (Tomada y modificada de Vences-Guzmán *et al.*, 2012; Escobedo-Hinojosa *et al.*, 2015).

3. JUSTIFICACIÓN

Las bacterias utilizan diferentes estrategias para adaptarse a diferentes condiciones ambientales. Esto les permite prosperar en una amplia gama de nichos, y en condiciones ambientales desfavorables que inducen una respuesta de estrés. Para hacer frente a estas tensiones y sobrevivir, las modificaciones de los lípidos de membrana juegan un papel importante en varias condiciones adversas, alterando las propiedades de los lípidos y así las propiedades de las membranas. En este estudio se recopiló información sobre los diferentes mecanismos que utilizan las bacterias para modificar y/o sustituir los lípidos de membrana durante diferentes condiciones de estrés abiótico. Nos enfocamos en los estreses por temperatura, en la respuesta a condiciones de acidez y en la limitación de fosfato en el ambiente, porque existe más información en la literatura sobre estas respuestas.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Entender y describir como diferentes condiciones de estrés abiótico conducen a modificaciones de lípidos en las membranas bacterianas.

4.2 Objetivos específicos

- Entender como la remodelación de lípidos de membrana en bacterias permite resistir condiciones de limitación de fosfato.
- Entender como la remodelación de lípidos de membrana en bacterias permite resistir condiciones de estrés por temperatura.
- Entender como la remodelación de lípidos de membrana en bacterias permite resistir condiciones de estrés por acidez.

5. METODOLOGÍA

Método:

Esta es una investigación de tipo bibliográfico, que se llevó a cabo utilizando información de la literatura relacionada con el tema a investigar.

Técnica:

Una vez recolectada la información, se dispuso a seleccionar la información requerida entre cada una de las fuentes consultadas, en primer orden, libros, se procedió a la lectura de los capítulos de libros que tenían en relación con el tema en cuestión partiendo de temas a nivel más general. Seguidamente se consultaron artículos científicos y artículos de revisión en revistas indexadas avaladas por pares de expertos en el campo para obtener información más específica, se describió la información de los resultados obtenidos del estudio, con el fin de enriquecer nuestra información, aportando mayor ayuda a la investigación. También se consultaron tesis a nivel doctoral a partir de las cuales se realizó una recopilación de trabajos de investigación.

Recursos:

Entre los recursos utilizados para realizar esta investigación, se pueden mencionar las siguientes fuentes de consulta que se realizaron en línea:

- 1. Libros:** Se consultaron libros académicos.
- 2. Análisis de bases de datos:** PubMed y Google Académico.
- 3. Tesis:** Se realizó una recopilación adecuada de trabajos de investigación a nivel doctoral la cuales tenían relación con el tema, que fueron realizadas en la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y una tesis de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Remodelación de lípidos de membrana en condiciones de estrés abiótico

E. coli fue el principal organismo modelo para el estudio de los lípidos de la membrana bacteriana durante muchas décadas. Sus principales lípidos de membrana son los PLs, PE, PG y CL (Rock, 2008). Sin embargo, diferentes especies bacterianas tienen diferentes composiciones de membrana, incluso la composición de membrana de las células que pertenecen a una sola especie no es constante (Sohlenkamp & Geiger, 2016). Las bacterias pueden remodelar la composición de lípidos de su membrana en respuesta a cambios en el medio ambiente. Estas adaptaciones modifican las propiedades de las membranas y permiten que las bacterias sobrevivan a condiciones desfavorables. Las modificaciones de los lípidos de membrana que se producen se pueden dividir en dos tipos: (1) los lípidos existentes pueden ser modificados para obtener una membrana con diferentes propiedades que permita una respuesta rápida a los cambios ambientales. (2) Los lípidos existentes se degradan y se sintetizan de *novo* lípidos con nuevas características que reemplazan a los antiguos (Sohlenkamp & Geiger, 2016).

A continuación, analizaremos cómo se generan las modificaciones de los lípidos de la membrana bacteriana en condiciones de estrés abiótico, como limitación de P_i , cambios de temperatura y pH ácido. En este trabajo se seleccionaron estos estreses debido a que son los más estudiados y porque las bacterias están expuestas frecuentemente a estos tipos de estrés.

6.1.1 La limitación de fosfato altera la composición de lípidos de membrana

La principal forma asimilable del fósforo en las bacterias es el anión ortofosfato (PO_4^{3-}), comúnmente conocido como P_i (Santos-Beneit, 2015). El P_i tiene un papel importante en las células, participa en el metabolismo energético, en la fosforilación de proteínas, y también es un componente estructural de los ácidos nucleicos y los PLs (Yuan *et al.*, 2006). Sin embargo, el P_i presenta una baja disponibilidad debido a su lenta difusión y alta fijación en los suelos, los sedimentos y el agua (Shen *et al.*, 2011). Para adaptarse y sobrevivir a concentraciones limitantes de P_i las bacterias han desarrollado mecanismos fisiológicos y bioquímicos (Santos-Beneit, 2015). En respuesta a la limitación de P_i , las bacterias pueden reducir el tamaño de la reserva de ADN al conservar menos

copias del genoma (Zerulla *et al.*, 2014). Muchas bacterias inducen la expresión de la enzima polifosfato cinasa (PpK), causando la acumulación de polifosfato como reservorio de P_i el cual se puede reutilizar en tiempos de escasez de fosfato. Las enzimas más comunes inducidas ante deficiencia de P_i son, las fosfatasas alcalinas (PhoA), las fosfolipasas (PhoD), las glicerofosfodiéster fosfodiesterasas (GlpQ y UgpQ), las fitasas (PhyC) y las 5'-nucleotidasas (UshA) (Ghorbel *et al.*, 2006; Wanner & Chang, 1987). Algunas bacterias para ahorrar nutrientes pueden reemplazar los ácidos teicoicos (polímeros ricos en P_i que se encuentran localizados en la pared celular de las bacterias Gram-positivas por ácidos teicurónicos (polímeros sin P_i), este mecanismo es regulado por el regulón Pho (Liu *et al.*, 1998).

En *E. coli* el sistema regulador de dos componentes PhoR-PhoB regula la expresión de genes en respuesta a las concentraciones de P_i en el ambiente. Cuando la concentración de P_i ambiental es baja, el sensor quinasa PhoR la detecta y activa el regulador de respuesta y activador transcripcional PhoB por fosforilación (Fig. 11) (Wanner, 1996). Posteriormente PhoB fosforilado se une a cajas Pho en las regiones promotoras para activar la transcripción de genes. En condiciones de saturación de P_i , la proteína PhoU inhibe la actividad de PhoR y PhoR defosforilado ya no fosforila a PhoB; PhoB no fosforilado es incapaz de unirse a las cajas Pho y no activa la transcripción (Figura 11) (Kritmetapak & Kumar, 2021). La mayor parte de los genes relacionados en la captación y el metabolismo de P_i están regulados por PhoB, excepto los genes del sistema de captación de P_i de baja afinidad (Wanner, 1996). Varios de los genes del regulón Pho codifican una secuencia de productos proteicos, como la fosfatasa alcalina y los transportadores de fosfato, que favorecen la adaptación bacteriana a los cambios en las concentraciones ambientales de P_i (Lamarche *et al.*, 2008).

Uno de los procesos celulares inducidos en estas condiciones es la remodelación de membranas. La obtención de P_i degradando los PLs de membrana libera el fósforo contenido en ellos para ser usado en otros procesos celulares, como es la síntesis de ácidos nucleicos (Ulrich *et al.*, 2005; Vences-Guzmán, 2014).

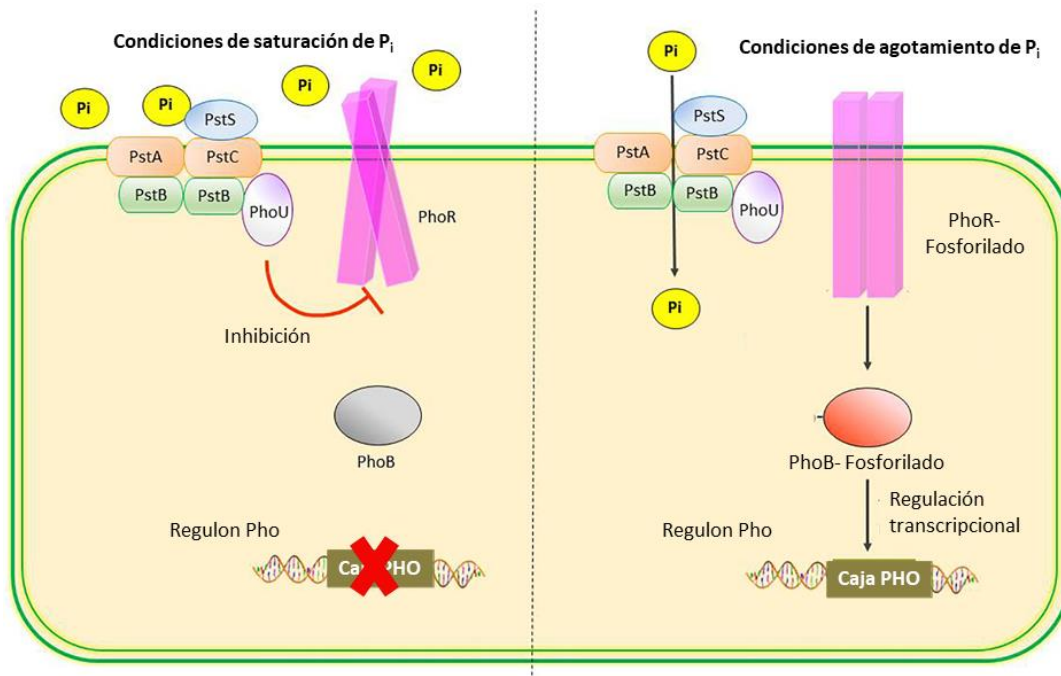


Figura 11. Detección de fosfato en *E. coli*. En condiciones de saturación de P_i, PhoU inhibe la actividad de PhoR, lo que incrementa los niveles de PhoB no fosforilado y la inactivación de los genes del regulón de Pho. En condiciones de agotamiento de P_i, PhoR se activa por autofosforilación que a su vez fosforila PhoB. El PhoB fosforilado actúa como un factor de transcripción que se une a la caja Pho del regulón Pho y regula la transcripción de genes diana implicados en la conservación de P_i (Tomada y modificada de Kritmetapak & Kumar, 2021).

En la bacteria *S. meliloti* cuando se cultiva en medio mínimo con 1.3 mM de P_i sus principales lípidos de membrana son PG, CL, PE, PC (Fig. 12A). En cambio, cuando *S. meliloti* es cultivada bajo condiciones de limitación en 0.02 mM de P_i (Fig. 12B), reemplaza una parte de sus PLs por lípidos de membrana libres fósforo como son DGTS, SLs y OLs (Fig. 13). En estas condiciones, la cantidad relativa de CL se incrementa ligeramente y la de PG se reduce levemente debido al bajo contenido de P_i, mientras que la de los lípidos zwitteriónicos (PE, MMPE, DMPE y PC) disminuye drásticamente (Tabla 1). Por el contrario, las cantidades relativas de los (lípidos I) SLs, (II) OLs, y (III) DGTS aumentan (Fig.12C) (Geiger *et al.*, 1999). Estos lípidos sin fósforo no son necesarios para establecer el estilo de vida simbiótico de *S. meliloti* con la planta huésped, sin embargo, son importantes para un crecimiento óptimo en condiciones que limitan el P_i (López-Lara *et al.*, 2005). En limitación de P_i, se induce la fosfolipasa C PlcP que degrada a los PLs zwitteriónicos. El resultado de la degradación de estos PLs es DAG, que puede ser reutilizado para la biosíntesis de lípidos sin fósforo, como SLs y DGTS (Zavaleta-Pastor *et al.*, 2010).

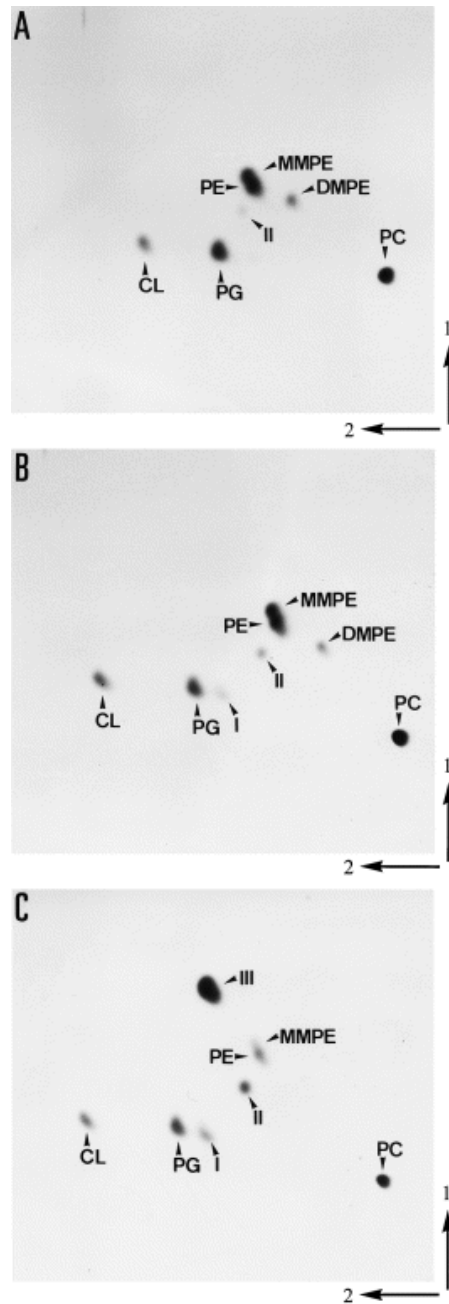


Figura 12. Separación de lípidos en cromatografía en capa fina (TLC). Lípidos marcados con $[^{14}\text{C}]$ -acetato de *S. meliloti* 1021 de tipo silvestre, (A) después del crecimiento en medio mínimo con concentraciones altas (B) y bajas de P_i (C). Los lípidos fosfatidilcolina (PC), dimetilfosfatidiletanolamina (DMPE), monometilfosfatidiletanolamina (MMPE), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilglicerol (PG), cardiolipina (CL), lípidos I (I), lípidos II (II) y lípidos III (III) (Tomada de Geiger *et al.*, 1999).

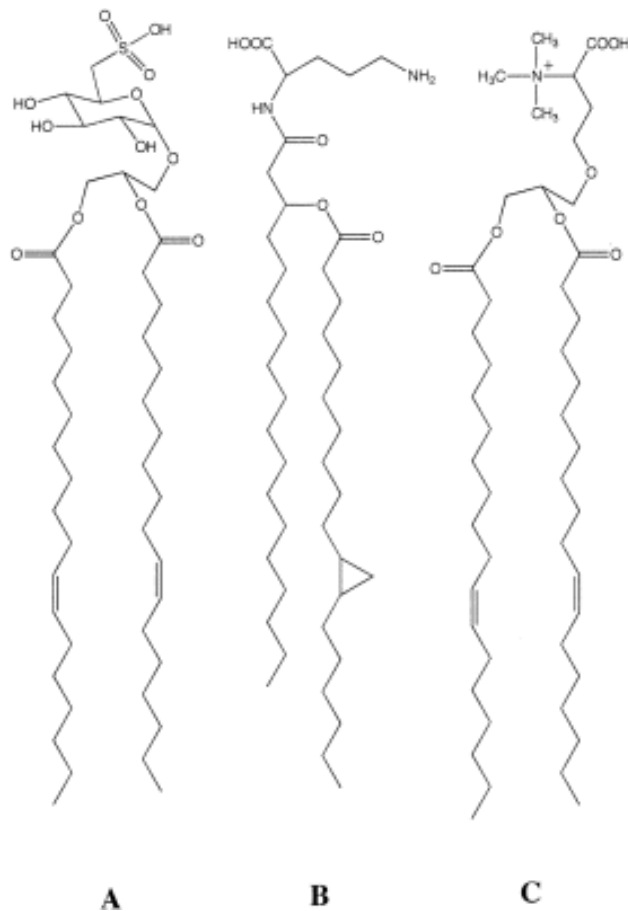


Figura 13. Estructuras de lípidos libres de fósforo en *S. meliloti*. SLs (A), OLs (B) y DGTS (C) (Tomada de Geiger *et al.*, 1999).

Tabla 1. Composición de lípidos de membrana de *S. meliloti*. Cultivado en presencia de P_i (1.3 mM) y bajo P_i (0.02 mM). Fosfatidilglicerol (PG), cardiolipina (CL), fosfatidiletanolamina (PE), monometilfosfatidiletanolamina (MMPE), dimetilfosfatidiletanolamina (DMPE), fosfatidilcolina (PC), sulfolípidos (SL), lípido de ornitina (OL) y diacilgliceril trimetilhomoserina (DGTS) (Tomada y modificada de Geiger *et al.*, 1999).

Lípido	Composición (% de total ^{14}C)		
	Complejo TY	Medio mínimo	
		(+ 1.3mM P_i)	(+ 0.02mM P_i)
PG	18	9.0	6.8
CL	4.3	4.7	6.1
PE+MMPE	35	19.5	8.0
DMPE	4.5	1.7	0.2
PC	37	60.1	10.3
Lípido I (SL)	0.3	2.8	5.4
Lípido II (OL)	0.9	2.2	5.9
Lípido III (DGTS)	0	0	57.3

En condiciones limitantes de P_i la bacteria fotosintética *R. sphaeroides* altera la composición de lípidos de membrana. Se sugirió que PG es reemplazado por SLs, PC por DGTS y PE por OLS. *R. sphaeroides* también produce glucolípidos que tienen en su grupo cabeza glucosa o galactosa durante la limitación de P_i (Benning *et al.*, 1995). En *Pseudomonas fluorescens* y en *Pseudomonas diminuta*, durante la limitación de P_i , los PLs de membrana son reemplazados por GL libres de fósforo y OLS (Minnikin & Abdolrahimzadeh, 1974; Minnikin *et al.*, 1974).

Los GL también presentan un papel fundamental en diversos miembros de las proteobacterias bajo privación de P_i , similar a las cianobacterias y plantas, donde reemplazan los PLs de membrana, para ahorrar el P_i (Hölzl & Dörmann, 2007; Devers *et al.*, 2011; Geske *et al.*, 2013). *Agrobacterium tumefaciens* cuando se cultiva en medios con altas concentraciones de P_i sintetiza diferentes PLs como son PE, MMPE, DMPE, PC, PG y CL y dos formas de OLS (Figura 14A). En cambio, durante la privación de P_i se acumulan cuatro GLs, DGTS y se incrementan los OLS (Figura 14B) (Geske *et al.*, 2013).

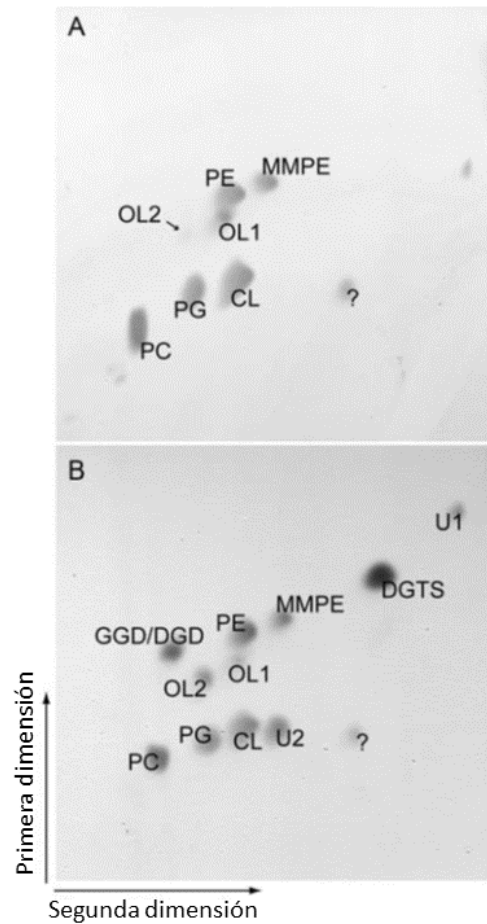


Figura 14. Separación de lípidos de *A. tumefaciens* en cromatografía en capa fina bidimensional (2D-TLC). El tipo silvestre cultivado con altas concentraciones de P_i (A) y con deficiencia de P_i (B). Fosfatidilcolina (PC), monometilfosfatidiletanolamina (MMPE), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilglicerol (PG), cardiolipina (CL), diacilglicerol trimetilhomoserina (DGTS), OL sin modificar (OL1), OL hidroxilado (OL2), glucosilgalactosildiacilglicerol (GGD) y digalactosildiacilglicerol (DGD), GL desconocido (U1 y U2). Los lípidos desconocidos se indican con un signo de interrogación. Para TLC bidimensional, se usó cloroformo/metanol/agua (65:25:4) para la primera dimensión; para la segunda dimensión, la relación de los compuestos solventes se ajustó a una relación cloroformo/metanol/ácido acético/agua de 90:15:10:3,5 para optimizar la separación de U2 y CL (Tomada de Geske *et al.*, 2013).

M. loti cuando crece bajo privación de P_i , acumula GL, DGTS y OLs hidroxilados, y se sugiere que estos lípidos sirven como sustituto de los PLs (Diercks *et al.*, 2015). La bacteria reductora de sulfato *Desulfovibrio alaskensis* G20 cultivada en limitación de P_i , a concentraciones inferiores 10 μ M, presenta tasas de crecimiento más bajas y reemplaza más del 80% de los PLs de su membrana por GL y OLs (Bosak *et al.*, 2016). En *D. alaskensis* se caracterizó que Dde_3661, un homólogo de OlsF, es responsable de la síntesis de OLs durante la limitación de P_i (Bosak *et al.*, 2016).

Vibrio cholerae, agente causal del cólera se demostró que, reemplaza en ambientes bajos de P_i parte de los PLs de su membrana por OLs. Se sugiere que la enzima responsable de la síntesis en esta bacteria es un homólogo de OlsF (VC0489), cuya expresión está directamente regulada por el sistema PhoBR (Barbosa *et al.*, 2018).

En *S. proteamaculans* cultivada en condiciones limitantes de P_i a 12.5 μ M, se observó un aumento de la formación de OLs no modificado (S1). Los OLs se acumularon hasta un 40% de los lípidos de membrana totales (Vences-Guzmán *et al.*, 2015).

6.1.2 Cambios de temperatura modifican la composición de lípidos de membrana

Todos los microorganismos tienen un rango de temperatura en el cual pueden crecer. Para la mayoría de las bacterias, la diferencia entre la temperatura mínima y la temperatura máxima de crecimiento es de aproximadamente 30 °C. La temperatura del ambiente afecta la difusión y el transporte de solutos, la fluidez de la membrana, la cinética enzimática, y las interacciones de los ácidos nucleicos y las proteínas. En bacterias, algunos mecanismos de adaptación a cambios de temperatura son: expresión de proteínas de choque de calor, choque frío o un metabolismo alterado (Georlette *et al.*, 2004). Otro mecanismo es la modificación de la composición de la membrana plasmática para ajustar la fluidez de la membrana, debido a que está implicada en procesos metabólicos y en la cadena de transporte de electrones (Denich *et al.*, 2003; van de Vossenberg *et al.*, 1999). Bacterias como *E. coli* a medida que descienden las temperaturas, introducen insaturaciones que causan torceduras en los ácidos grasos que inhiben el empaquetamiento de lípidos y aumentan la fluidez de la membrana para contrarrestar los efectos de la temperatura baja (Fig. 15) (Sinensky, 1974; Mansilla *et al.*, 2004).

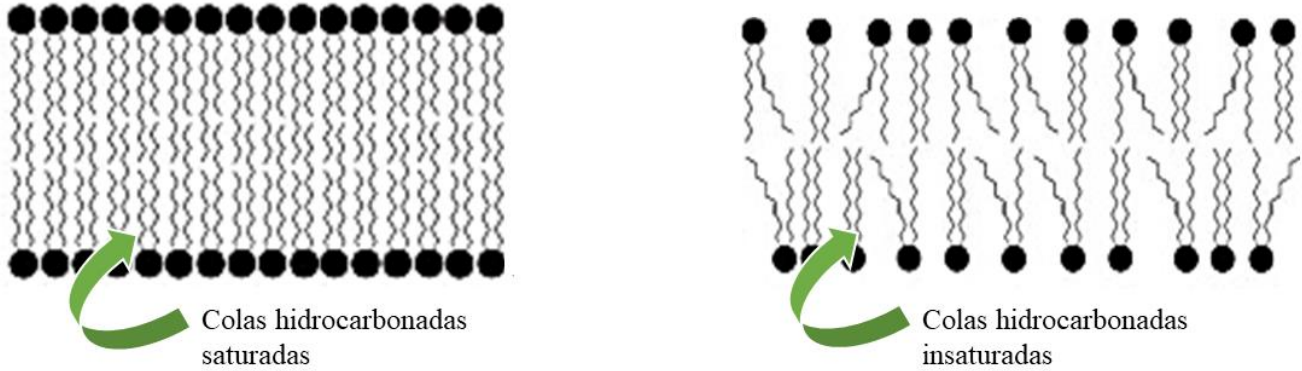


Figura 15. Cómo las insaturaciones de los ácidos grasos afectan y el empaquetamiento de los lípidos y las propiedades de la membrana. Muchas bacterias tienen sistemas de elongación FASII que producen ácidos grasos de cadena lineal saturados (SFA) e insaturados (UFA) (Tomada y modificada de Sastre *et al.*, 2020).

La fluidez de la membrana también se puede modificar por la incorporación de ácidos grasos ramificados, como es el caso de la bacteria Gram-positiva *S. aureus* (Schleifer *et al.*, 1990). Existen los BCFA *iso* y *anteiso*. Una mayor proporción de ácidos grasos ramificados interfiere con el empaquetamiento de los lípidos (Klein *et al.*, 1999; Edgcomb *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2005a). Los ácidos grasos con ramificación *anteiso* tienen un mayor efecto que los ácidos grasos con ramificación *iso* sobre la fluidez la membrana (Fig. 16) (Parsons & Rock 2013; Zhang & Rock, 2008; Annous *et al.*, 1997). Otra consecuencia es una reducción del grosor de la bicapa lipídica (Poger *et al.*, 2014; Mostofian *et al.*, 2019). La α -cetoácido deshidrogenasa de cadena ramificada (BKD) es el complejo enzimático responsable para la catálisis de las primeras etapas de la producción de BCFA. Membranas de la mutante inactivada en la enzima BKD muestran una disminución en la fluidez de la membrana y un impacto negativo en el crecimiento a bajas temperaturas (Singh *et al.*, 2008). La bacteria *B. subtilis* puede regular la fluidez de la membrana mediante estrategias de BCFA y de insaturación (Klein *et al.*, 1999; Weber *et al.*, 2001). Estas alteraciones de membrana han sido bien estudiadas en el patógeno *L. monocytogenes*, para sobrevivir a bajas temperaturas (Zhu *et al.*, 2005ab).

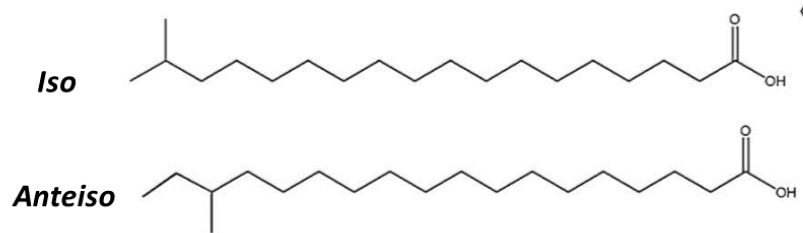


Figura 16. Estructuras químicas de los ácidos grasos ramificados *iso* y *anteiso* que se pueden encontrar en fosfolípidos de membrana. El ácido graso (*iso*) disminuye la fluidez de la membrana, el ácido graso (*anteiso*) aumenta la fluidez de la membrana en comparación con las isocadenas (Tomada y modificada de López-Lara & Geiger, 2019).

En la mayoría de los UFA, la configuración de los dobles enlaces es *cis* en lugar de *trans*. La orientación *cis* tiene un efecto importante en la estructura molecular porque cada doble enlace inserta una curva en la cadena hidrocarbonada (López-Lara & Geiger, 2019). Algunas bacterias han desarrollado mecanismo para cambiar los ácidos grasos *cis*-UFA en *trans*-UFA para adaptarse a los desafíos ambientales (Fig. 17). Los PLs con *trans*-UFAs simulan las propiedades físicas de los PLs que contienen SFAs (Zhang & Rock, 2008). Un incremento de la temperatura desencadena un incremento significativo de los PLs *trans*-UFA (Cronan & Gelmann, 1975). La adaptación bacteriana al aumento de temperatura sobre la producción de *trans*-UFA está bien estudiado en *P. putida* y en *Vibrio sp* (Diefenbach *et al.*, 1992; Okuyama *et al.*, 1990). Los ácidos grasos insaturados y de cadena ramificada aumentan la fluidez de la membrana y cumplen la función de adaptación al estrés térmico (López-Lara & Geiger, 2019).

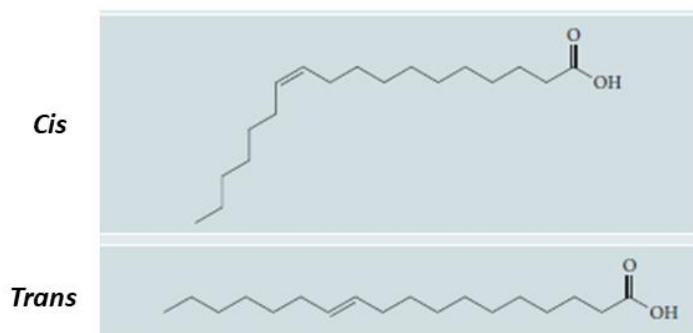


Figura 17. Ácidos grasos mono-insaturados pueden existir en la configuraciones *cis* o *trans*. Los ácidos grasos *trans* imitan los ácidos grasos saturados y brindan resistencia a los solventes y aumentos en la temperatura de crecimiento (Tomada y modificada de Zhang & Rock, 2008).

Se sugiere que la permeabilidad relativamente baja de la ME se puede construir usando lípidos con una alta capacidad de interacciones laterales de puentes de hidrógeno, incluidos LPS, SphLs, SfLs y OLs. No está claro qué ventajas se pueden obtener utilizando estos lípidos, pero puede ser razonable suponer que se puede obtener una mayor flexibilidad a expensas de una menor capacidad de barrera (Nikaido, 2003). Aparentemente, los OLs y especialmente sus formas hidroxiladas juegan un papel en la respuesta al estrés por temperatura. Se sugiere que los enlaces de hidrógeno adicionales deberían dar como resultado la estabilización de la bicapa lipídica y una reducción de la permeabilidad de la membrana, lo que podría explicar la disminución de la resistencia a la temperatura en mutantes que carecen de las hidroxilaciones (Vences-Guzmán, *et al.*, 2011).

En *Burkholderia cepacia* crecido a temperaturas mayores se observa un aumento en las proporciones de especies moleculares de PE y OLs hidroxilados (Taylor *et al.*, 1998). En *R. tropici*, se observó un incremento en la formación de OLs hidroxilados a una temperatura de crecimiento de 30 °C (Fig. 18A) (Vences-Guzmán *et al.*, 2011). Mutantes de *R. tropici*, deficientes en la síntesis de OLs hidroxilados fueron afectados en el crecimiento a temperatura de 42 °C en comparación con el tipo silvestre. La mutante deficiente en *olsE* carecía de los OLs S2 y P2, la mutante deficiente en *olsC* carecía de P1 y P2 y en la doble mutante deficiente en $\Delta olsC\Delta olsE$ los OLs S2, P1 o P2 no se podían detectar (Fig. 18C) (Vences-Guzmán *et al.*, 2011).

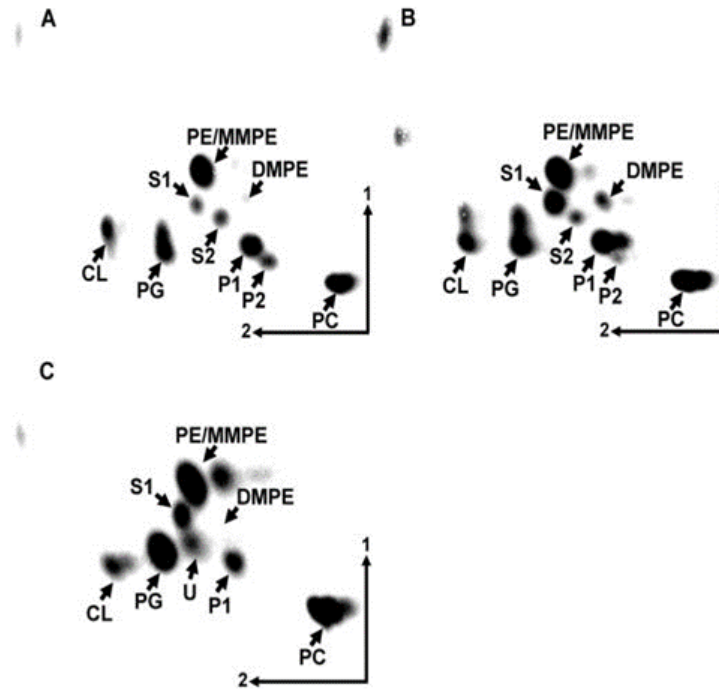


Figura 18. Separación de lípidos de *R. tropici* CIAT899 en 2D-TLC. Las bacterias se cultivaron en medio complejo TY a 30 °C (A), a 37 °C (B), a 42 °C (C). Se indican los PLs, fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilcolina (PC), fosfatidilglicerol (PG), cardiolipina (CL), monometil PE (MMPE), dimetil PE (DMPE) y los lípidos de ornitina (OLs) S1, S2, P1 y P2. U (lípidos desconocidos) (Tomada de Vences-Guzmán *et al.*, 2011).

En *A. tumefaciens* la cantidad relativa de OLs S2 hidroxilado aumenta cuando se cultiva a 15 °C, lo que es una temperatura de crecimiento baja para esta bacteria (Tabla 2). De hecho, parece que todo el OLs está en su forma hidroxilada a una temperatura baja, lo que indica que OlsE es suficientemente activo para cambiar todo OLs S1 en S2 hidroxilado (Vences-Guzmán *et al.*, 2013). En *Pseudopedobacter saltans* la abundancia relativa de OLs hidroxilados aumentan a temperaturas altas, mientras que los lípidos de lisina (LLs) no modificados o LLs hidroxilados aumentan a temperaturas bajas, lo que sugiere que estos lípidos podrían estar involucrados en la respuesta al estrés de temperatura (Moore *et al.*, 2015).

Tabla 2. Composición de lípidos de membrana de *A. tumefaciens*. El tipo silvestre A208, la mutante deficiente en *olsE* MAV07 y la mutante deficiente en *olsB* MAV08 se cultivaron en medio mínimo Sherwood a 30 °C o 15 °C y se marcaron durante 48 h con acetato [¹⁴C]. (Tomada y modificada de Vences-Guzmán *et al.*, 2013).

Composición (% del total ¹⁴ C)						
Lípidos	30° C			15° C		
	A208	MAV07	MAV08	A208	MAV07	MAV08
PC	13.6	14.7	19.3	28.4	34.1	33.3
S1	6.8	20.2	n.d.	n.d.	16.0	n.d.
S2	14.3	n.d.	n.d.	16.8	n.d.	n.d.
PE	29.7	30.8	43.0	39.0	31.3	52.6
PG	12.2	11.5	18.9	11.6	15.0	11.7
CL	23.4	22.8	18.8	4.2	3.6	2.4

Los valores mostrados son valores medios derivados de al menos dos experimentos independientes.

S1: lípido de ornitina sin modificar; S2: lípido de ornitina hidroxilado; nd: no detectado.

6.1.3 El pH ácido conduce a cambios en la composición de lípidos de membrana

Las bacterias activan mecanismos en respuesta al estrés por acidez. Para sobrevivir a estas condiciones desfavorables, han desarrollado un conjunto de mecanismos de resistencia, que incluye el bombeo de protones fuera del citoplasma, la producción de amoníaco, reacciones de descarboxilación que consumen protones, así como las modificaciones de la composición de lípidos de membrana (Kanjee & Houry, 2013; Lund *et al.*, 2014). Entre las modificaciones de los lípidos de membrana más estudiadas se encuentra la formación de ácidos grasos ciclopropano. La capacidad de *E. coli* para sobrevivir a pH 3.0 se correlaciona con el nivel de CFAs en la membrana, donde los ácidos grasos monoinsaturados presente en los PLs de *E. coli* son convertidos en sus derivados de ciclopropano (Brown *et al.*, 1997). La enzima ciclopropano sintasa de ácidos grasos, transfiere un

grupo metilo de *S*-adenosil metionina a moléculas de ácidos grasos insaturados presentes en la MI bacteriana (Fig. 19) (Grogan *et al.*, 1997; Hari *et al.*, 2018). Se ha demostrado que las cadenas de acilo de ciclopropano de la membrana son un factor clave en la tolerancia a los ácidos bacterianos (Chang & Cronan 1999; Yang *et al.*, 2015), las cepas que no presentan estos ácidos grasos son más sensibles a pH ácido (Kim *et al.*, 2005) (Fig. 19).

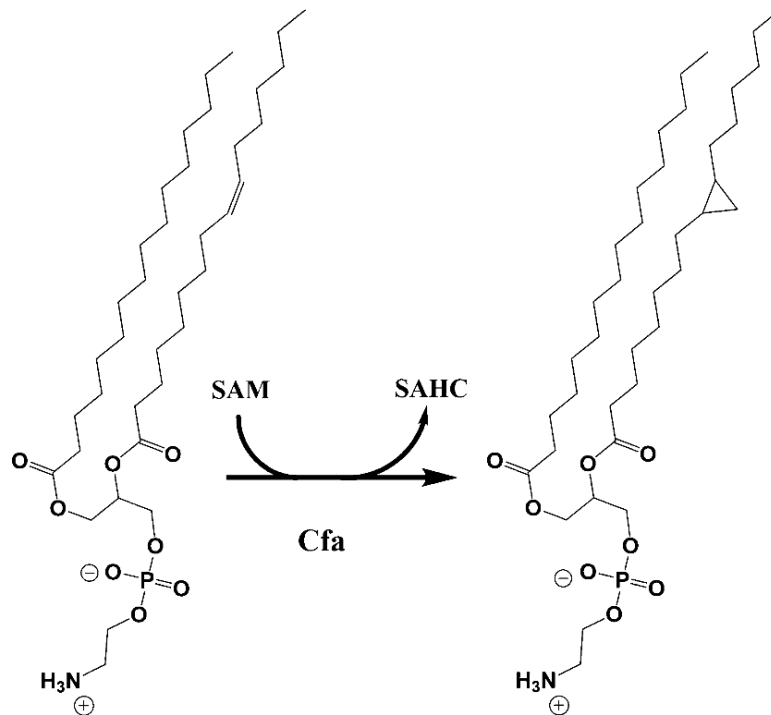


Figura 19. Ciclopropanación de ácidos grasos insaturados ligados a lípidos de membrana. Algunas bacterias pueden convertir ácidos grasos monoinsaturados en ácidos grasos de ciclopropano (CFA), a través de la enzima ciclopropano sintasa de ácidos grasos, utilizando el donador de grupos metilo *S*-adenosilmetionina (SAM). Los CFA son más estables a condiciones de estrés ambiental, como pH bajo (Tomada de Sohlenkamp, 2017).

Se piensa que cambios específicos en la composición de la membrana pueden generar una menor fluidez e interferir con el flujo de protones a través de la membrana. *L. monocytogenes* cultivada en presencia de condiciones ácidas incorpora más SCFA saturados y menos BCFA en sus membranas, disminuyendo así la fluidez de la membrana en respuesta al estrés ácido, posiblemente para reducir la permeabilidad de la membrana para protones (Mastronicolis *et al.*, 2010).

La longitud de las cadenas de los ácidos grasos tiene un papel fundamental en la respuesta al estrés ácido, contribuyen a la disminución de la fluidez de la membrana al alargar sus cadenas de ácidos grasos (Wu *et al.*, 2012). Las bacterias orales *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus salivarius* y *Lactobacillus casei* en respuesta a un pH bajo sufren alteraciones en la composición de su membrana, aumentan los niveles de ácidos grasos monoinsaturados. Como resultado de la acidificación ambiental, se ha demostrado que los ácidos grasos monoinsaturados son esenciales para la supervivencia a pH bajo (Fozo *et al.*, 2004; Fozo & Quivey, 2004b). La bacteria *Streptococcus mutans* que se encuentra normalmente en la cavidad bucal humana, y en respuesta a la acidificación reduce la proporción de los ácidos grasos saturados de 14 y 16 carbonos por ácidos grasos monoinsaturados de cadena larga (18 y 20 carbonos) (Tabla 3). La adaptación de los ácidos grasos de la membrana es un mecanismo común utilizado por las bacterias para resistir al estrés ambiental (Fozo & Quivey, 2004a).

Tabla 3. Proporciones de ácidos grasos de membrana en cultivos de *S. mutans* UA159. Las bacterias se crecieron hasta la fase estacionaria a los valores de pH indicados. Los niveles del ácido graso C18:1 incrementaron de aproximadamente 18% a pH 6.5 a 24% a pH 5.5. Un aumento similar se observó en la proporción del ácido graso C20:1 a los mismos valores de pH, con un aumento de 5.3% a 14% a pH 5.5 (Tomada y modificada de Fozo & Quivey, 2004).

Ácidos grasos	% del total ^a en:		
	pH 6.5	pH 6	pH 5.5
C _{14:0}	12.7 ± 2.5	8.7 ± 1.1	4.8 ± 2.2
C _{14:1}	0.2 ± 0.3	ND ^b	0.1 ± 0.1
C _{16:0}	47.1 ± 3.0	43.3 ± 2.0	38.4 ± 5.6
C _{16:1}	0.4 ± 0.3	2.1 ± 2.7	0.7 ± 0.2
C _{18:0}	5.5 ± 1.2	7.4 ± 1.2	9.1 ± 2.1
C _{18:1}	17.6 ± 1.7	20.1 ± 1.9	24.0 ± 1.8
C _{20:0}	0.1 ± 0.2	0.5 ± 0.5	1.0 ± 0.5
C _{20:1}	5.3 ± 1.9	8.5 ± 1.5	13.7 ± 4.0
otros	11.1 ± 4.8	9.3 ± 3.3	8.3 ± 0.6
C _{14:0} + C _{16:0}	59.7 ± 2.3	52.0 ± 2.5	43.3 ± 7.8
C _{18:1} + C _{20:1}	22.9 ± 3.3	28.6 ± 3.1	37.7 ± 5.6
(C _{14:0} + C _{16:0})/(C _{18:1} + C _{20:1})	2.6 ± 0.4 ^c	1.8 ± 0.3	1.2 ± 0.4

^a Los valores representan porcentajes de ácidos grasos totales y son medias ± desviaciones estándar para tres cultivos independientes.

^b ND, no detectado.

^c Estadísticamente diferente ($P \leq 0.05$) de la proporción en cultivos mantenidos a pH 7 (3.8 ± 0.7).

Otras estrategias que no involucren cambios en las proporciones entre ácidos grasos saturados vs insaturados o ácidos grasos lineales vs ácidos grasos ramificados para responder a las condiciones de pH se han descrito (Sohlenkamp, 2017).

En *R. tropici* la presencia de grupos hidroxilo en los OLs se ha relacionado con una mayor resistencia al estrés por acidez. Mutantes deficientes en el gen *olsC* (899- Δ *olsC*), presentan una disminución de crecimiento en condiciones de pH ácido en comparación con el tipo silvestre (Fig. 20) (Vences-Guzmán *et al.*, 2011).

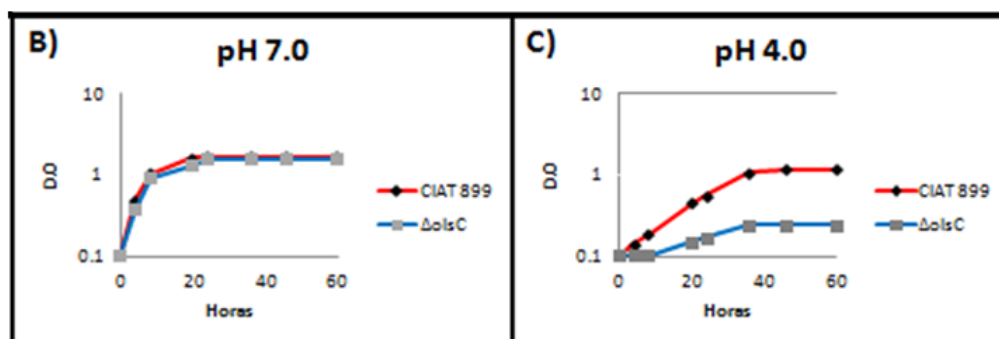


Figura 20. Crecimiento de una mutante de *R. tropici* CIAT 899 deficiente en el gen *olsC*. Crecimiento de la cepa silvestre (CIAT 899) y una mutante deficiente en el gen *olsC* (899- Δ *olsC*), cultivadas a pH 7.0 y a pH 4.0 (Tomada de Julio-Guerrero *et al.*, 2018).

Siguiendo un enfoque de biología sintética se intentó identificar si otras modificaciones de OLs también pueden contribuir a la respuesta a condiciones de estrés por pH ácido en *R. tropici*. Se construyeron cepas de *R. tropici* formando diferentes OLs y se cultivaron a pH 7.0 y a pH 4.5 para ver si la presencia de los diferentes OLs ayudara a crecer en condiciones de acidez. Cuando las cepas fueron cultivadas a pH 7.0, se observó un crecimiento similar en todas las cepas (Fig. 21A). En cambio, a pH 4.5, varias cepas crecieron mejor que la mutante de *R. tropici* que no forma OLs. La cepa que presenta tres modificaciones OlsC/OsE/OlsG muestra un crecimiento superior en comparación a las demás (Fig. 21B). Las combinaciones de las hidroxilaciones y metilaciones de OLs confieren ventajas de crecimiento en condiciones de estrés ácido, en especial las que presentan la enzima OlsC (Vázquez-Almanza, 2022). Sin embargo, la cepa OlsD manifiesta un crecimiento por debajo de la mutante MAV05 que no forma OLs.

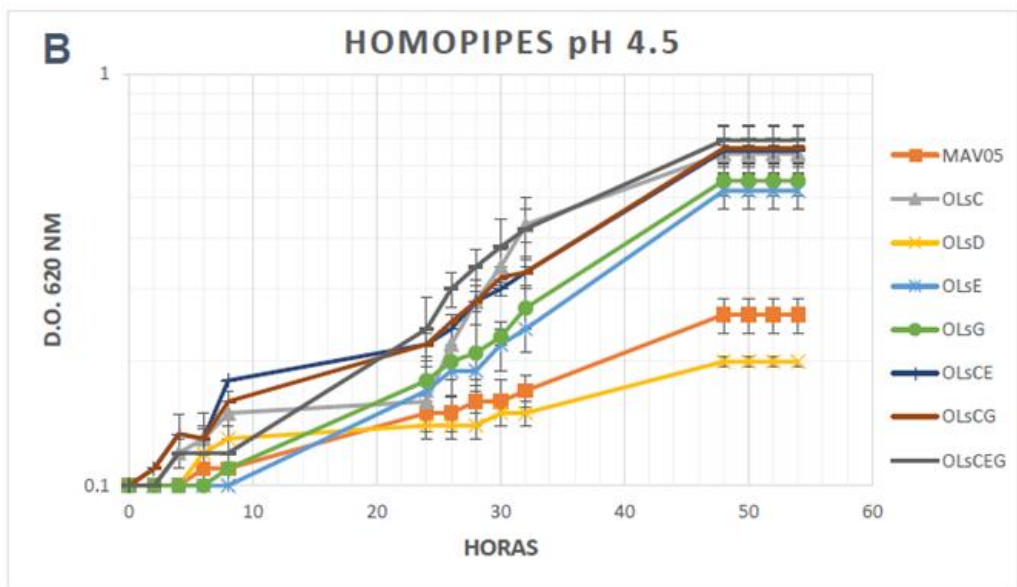
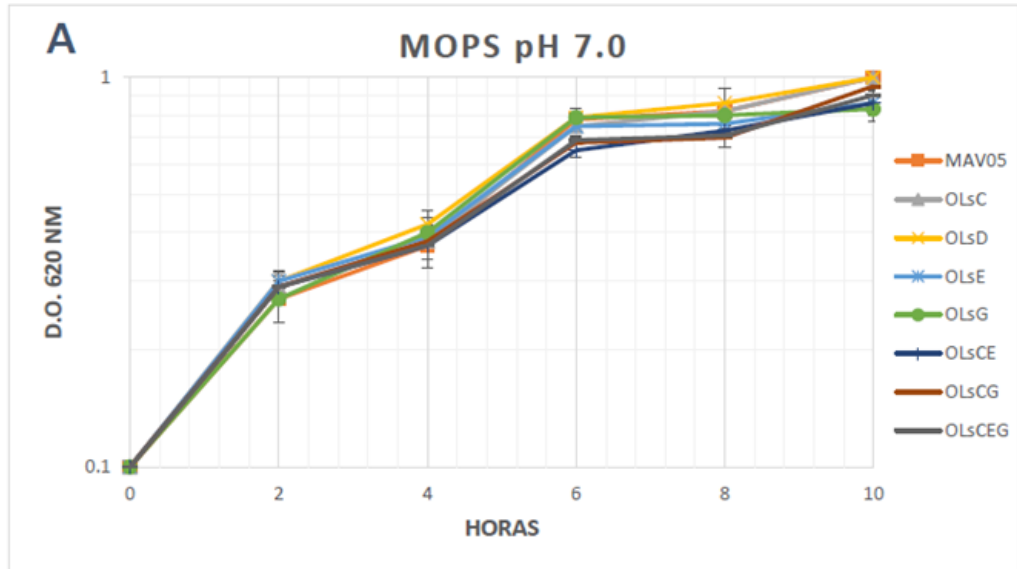


Figura 21. Caracterización del crecimiento de *R. tropici* formando diferentes OLs a pH de 7.0 y 4.5. Las cepas que presentan más de una modificación tienen una ventaja de crecimiento en condiciones de estrés ácido, en comparación con la cepa mutante MAV05 que no forma OLs (Tomada de Vázquez-Almanza, 2022).

Un experimento similar se hizo en la bacteria *A. tumefaciens* donde se analizó el crecimiento en condiciones de estrés por pH ácido de 5.5 y neutro de 7.0. En este caso las modificaciones de los OLS con hidroxilaciones, metilaciones o en combinación, no confieren ventajas de crecimiento a pH ácido (Vázquez-Almanza, 2022).

Otro ejemplo en el cual la presencia o la síntesis de los OLS forman parte de la respuesta de bacterias a condiciones de acidez es en *B. cenocepacia*. Cuando esta bacteria se cultiva en medio complejo a pH 4.0, forma dos compuestos que migran como los OLS NL1 y NL2 en 2D-TLC (Figura 22A). Por el contrario, ni NL1 ni NL2 se forman cuando la mutante deficiente en *olsD* es cultivada en medio complejo a pH 4.0 (Figura 22B) (González-Silva *et al.*, 2011). En otro estudio el crecimiento de mutantes deficientes en la formación de OLS fue afectado levemente de *B. cenocepacia* en condiciones a pH bajo 4.0 en comparación con la cepa silvestre (Córdoba-Castro *et al.*, 2021).

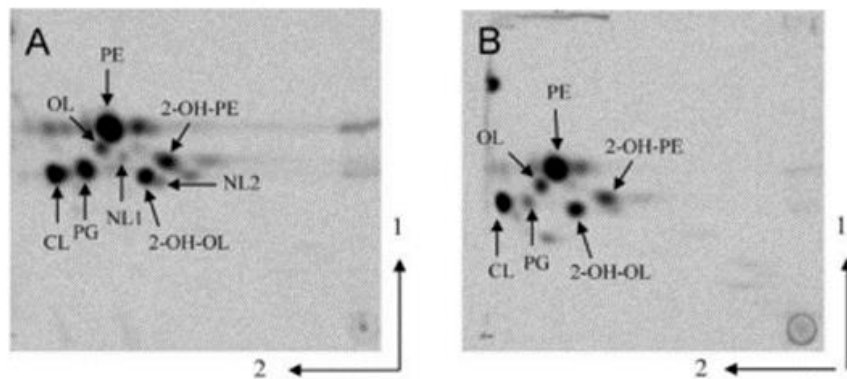


Figura 22. Modificación de los OLS por la hidroxilasa OlsD en condiciones de crecimiento a pH 4.0. Análisis de lípidos marcados con $[^{14}\text{C}]$ acetato por TLCs en dos dimensiones. La cepa silvestre *B. cenocepacia* J2315 (A) y la mutante de *B. cenocepacia* J2315 deficiente en *olsD*. Fosfatidilglicerol (PG), cardiolipina (CL), fosfatidiletanolamina (PE) y lípidos que contienen ornitina (OL), así como los derivados 2-hidroxilados de PE y OL (2-OHPE y 2-OH-OL), OL hidroxilado (NL1, NL2) (Tomada de González-Silva *et al.*, 2011).

La bacteria *Thiobacillus oxidans* es resistente a condiciones de acidez extrema, y se ha especulado que la presencia de OLS en sus membranas incrementa la resistencia a la acidez (Dees & Shively, 1982). También en este caso se sugiere que los grupos hidroxilo adicionales permitan la formación de enlaces de hidrógeno entre los grupos de la cabeza lipídica, aumentando así la

estabilidad de la ME lo que hace que la membrana sea menos fluida y menos permeable a los protones (Nikaido, 2003; Rojas-Jiménez *et al.*, 2005; Vences-Guzmán *et al.*, 2011; Sohlenkamp & Geiger, 2016).

En *S. aureus* se ha demostrado que la proteína del factor de resistencia a múltiples péptidos (MprF) es responsable de la formación de lisilfosfatidilglicerol (lisil-PG) (Oku *et al.*, 2004; Staubitz *et al.*, 2004). Homólogos de MprF llamados LpiA se han identificado en algunas α -proteobacterias como *R. tropici* y *Sinorhizobium medicae* en cribados de mutantes con mayor sensibilidad al ácido (Reeve *et al.*, 1999; Vinuesa *et al.*, 2003). En *R. tropici*, se ha demostrado que forma mínimas cantidades de lisil-PG, cuando se cultiva a pH bajo, y que el gen *lpiA* es necesario para la formación de lisil-PG también en bacterias Gram-negativas y confiere mayor resistencia a la polimixina B en condiciones ácidas de crecimiento (Sohlenkamp *et al.*, 2007). La expresión de *lpiA* también se indujo en *S. meliloti* como parte de la respuesta al pH bajo (Hellweg *et al.*, 2009). Se han descrito ortólogos de MprF en los patógenos oportunistas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecium* o *S. aureus*; en donde demuestran que la ausencia de aminoacil fosfatidil glicerol (aa-PG) provoca una disminución de la resistencia a los péptidos antimicrobianos y a distintas condiciones de estrés, entre ellas el estrés por acidez (Arendt *et al.*, 2012; Hebecker *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 2013; Guerrero-Castro, 2018).

Otro grupo de lípidos de membrana que se ha relacionado con la resistencia a condiciones de estrés por acidez, son los hopanoides. Se ha demostrado que en condiciones de estrés por acidez los HOPs son requeridos para mejorar la estabilidad de la membrana y disminuir su permeabilidad en algunas bacterias, como por ejemplo *Alicyclobacillus acidocaldarius* (Poralla *et al.*, 2000), *Zymomonas mobilis* (Horbach *et al.*, 1991), *Frankia* sp. (Berry *et al.*, 1993) y *S. coelicolor* (Poralla *et al.*, 2000). Mutantes deficientes en la formación de HOP de *B. cenocepacia* y *Rhodopseudomonas palustris* mostraron mayor sensibilidad al pH ácido (Schmerk *et al.*, 2011; Welander *et al.*, 2009).

En *Shigella flexneri* una mutante que carecía de antígeno O de LPS era significativamente más sensible a condiciones ácidas que el tipo silvestre. Esto sugiere que la presencia del LPS completo incrementa la resistencia de *S. flexneri* en condiciones de acidez (Martinić *et al.*, 2011). En un estudio

una mutante del gen *wbcJ* de *Helicobacter pylori*, pierde la capacidad de sintetizar LPS completo, y además se reduce su viabilidad a pH 3.5 (Boot *et al.*, 2002).

Algunas bacterias Gram-negativas como especies del género *Sphingomonas* y otros miembros de la subclase de Alphaproteobacteria, carecen de LPS y parece que los SphL se encuentran en la membrana exterior (Kawasaki *et al.*, 1994; Kawahara *et al.*, 1999). En *Acetobacter malorum* la presencia de SphL está relacionada con una mayor resistencia al estrés por acidez (Ogawa *et al.*, 2010). Se ha demostrado que el contenido de SphL de su membrana aumenta bajo condiciones de crecimiento ácidas (Ogawa *et al.*, 2010). Se sugiere que, en estas condiciones de estrés, los LPS podrían reemplazarse, por SphL.

7. DISCUSIÓN GENERAL

Las bacterias están expuestas con frecuencia a condiciones ambientales cambiantes. Para hacer frente a estos cambios ambientales o estreses y sobrevivir, han desarrollado diferentes mecanismos de respuesta, y entre ellos se encuentran los cambios en la composición lipídica de su membrana. Debido a que no existe una composición típica de lípidos de membrana, no hay una sola adaptación de membrana utilizada por las bacterias en respuesta a cambios abióticos. La exposición de las bacterias a temperaturas altas causa modificaciones de la membrana diferentes en comparación a las modificaciones observadas en las membranas de bacterias expuestas a estrés por acidez o limitación de nutrientes. Además, diferentes bacterias utilizan diferentes estrategias para ajustar la composición de lípidos de sus membranas (Sohlenkamp & Geiger 2016). Estas modificaciones pueden ocurrir mediante la alteración de la estructura de los lípidos de la membrana preexistentes o la síntesis de nuevos lípidos (Parsons y Rock 2013).

Las modificaciones de la membrana cuyos bases moleculares mejor se entienden son por una parte los cambios en la proporción de ácidos grasos saturados vs ácidos grasos insaturados y el remodelaje de la membrana bajo condiciones de limitación de fosfato donde se degradan fosfolípidos y se sintetizan lípidos libres de fosfato, así liberando fosfato que puede ser utilizado en otros procesos celulares. Por otra parte, parece que las respuestas a nivel de modificaciones de lípidos de membrana

son muy diversas en el caso de estrés por acidez, pero parece que un factor común es que las membranas se vuelvan menos fluidas y menos permeables.

A pesar de los avances de los últimos años, aún no se han definido las funciones exactas de las diferentes modificaciones de los lípidos. El estudio de estos lípidos permitirá entender los papeles diversos que juegan en la supervivencia de las bacterias a condiciones de estrés abiótico.

8. CONCLUSIONES

En esta investigación documental se describieron las modificaciones de las membranas bacterianas en respuesta a diferentes formas de estrés abiótico por limitación de P_i , temperatura y por acidez.

- En condiciones de limitación de P_i en el medio de cultivo o en el ambiente que limitan el crecimiento, muchas bacterias reemplazan los PLs por lípidos de membrana que carecen de fósforo en su estructura, incluyen GL, SLs, DGTS y OLs. Se piensa que el fosfato que se libera de los PLs puede ocuparse para otros procesos celulares permitiendo un mayor crecimiento o una mayor sobrevivencia.
- Muchas bacterias responden al estrés por temperaturas bajas con la formación una mayor proporción de ácidos grasos de cadena ramificada (BCFA) y ácidos grasos insaturados (UFA) en los PLs de membrana.
- Muchas bacterias responden al estrés por temperaturas altas con la formación una mayor proporción de ácidos grasos de cadena lineal y ácidos grasos saturados en los PLs de membrana.
- En respuesta a temperaturas elevadas además de la respuesta a nivel de recambio de ácidos grasos se ha descrito la presencia de Ols hidroxilados, cuyos grupos hidroxilo adicionales permiten la formación de puentes de hidrógeno adicionales que limiten la fluidez y la permeabilidad de las membranas.

- En respuesta al estrés ácido se ha descrito dependiendo del organismo modelo estudiado una gran diversidad de respuestas: la formación de CFA a partir de ácidos grasos monoinsaturados, la acumulación de los ácidos grasos insaturados o poliinsaturados, un alargamiento de las cadenas de ácidos grasos de los lípidos de membrana, un incremento en la formación de HOP y lisil-PG, además de modificación de OLs.

9. PERSPECTIVAS

Aclarar la contribución de lípidos con o sin fósforo al buen funcionamiento de las membranas bacterianas en condiciones de limitación de fosfato.

Comprender como la presencia de diferentes OLs afecta la resistencia de las bacterias a estrés abiótico.

10. REFERENCIAS

- Aanniz, T., Ouadghiri, M., Melloul, M., Swings, J., Elfahime, E., Ibjibijen, J., Ismaili, M., & Amar, M. (2015). Thermophilic bacteria in Moroccan hot springs, salt marshes and desert soils. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 46(2), 443–453. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246220140219>
- Annous, B. A., Becker, L. A., Bayles, D. O., Labeda, D. P., & Wilkinson, B. J. (1997). Critical role of anteiso-C15:0 fatty acid in the growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures. *Applied and environmental microbiology*, 63(10), 3887–3894. <https://doi.org/10.1128/aem.63.10.3887-3894.1997>
- Arendt, W., Hebecker, S., Jäger, S., Nimtz, M., & Moser, J. (2012). Resistance phenotypes mediated by aminoacyl-phosphatidylglycerol synthases. *Journal of bacteriology*, 194(6), 1401–1416. <https://doi.org/10.1128/JB.06576-11>
- Barbosa, L. C., Goulart, C. L., Avellar, M. M., Bisch, P. M., & von Kruger, W. (2018). Accumulation of ornithine lipids in *Vibrio cholerae* under phosphate deprivation is dependent on VC0489 (OlsF) and PhoBR system. *Microbiology (Reading, England)*, 164(3), 395–399. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000607>
- Benning C. (1998). Biosynthesis and function of the sulfolipid sulfoquinovosyl diacylglycerol. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, 49, 53–75. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.49.1.53>
- Benning, C., Beatty, J. T., Prince, R. C., & Somerville, C. R. (1993). The sulfolipid sulfoquinovosyldiacylglycerol is not required for photosynthetic electron transport in *Rhodobacter sphaeroides*

- but enhances growth under phosphate limitation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(4), 1561–1565. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.4.1561>
- Benning, C., Huang, Z. H., & Gage, D. A. (1995). Accumulation of a novel glycolipid and a betaine lipid in cells of *Rhodobacter sphaeroides* grown under phosphate limitation. *Archives of biochemistry and biophysics*, 317(1), 103–111. <https://doi.org/10.1006/abbi.1995.1141>
 - Berezin, S., Aviv, Y., Aviv, H., Goldberg, E., & Tischler, Y. R. (2017). Replacing a Century Old Technique - Modern Spectroscopy Can Supplant Gram Staining. *Scientific reports*, 7(1), 3810. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02212-2>
 - Berry, A. M., Harriott, O. T., Moreau, R. A., Osman, S. F., Benson, D. R., & Jones, A. D. (1993). Hopanoid lipids compose the *Frankia* vesicle envelope, presumptive barrier of oxygen diffusion to nitrogenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(13), 6091–6094. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.13.6091>
 - Blumenberg, M., Oppermann, B. I., Guyoneaud, R., & Michaelis, W. (2009). Hopanoid production by *Desulfovibrio bastinii* isolated from oilfield formation water. *FEMS microbiology letters*, 293(1), 73–78. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01520.x>
 - Boot, I. R., Cash, P., & O'Byrne, C. (2002). Sensing and adapting to acid stress. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81(1-4), 33–42. <https://doi.org/10.1023/a:1020565206835>
 - Bosak, T., Schubotz, F., de Santiago-Torio, A., Kuehl, J. V., Carlson, H. K., Watson, N., Daye, M., Summons, R. E., Arkin, A. P., & Deutschbauer, A. M. (2016). System-Wide Adaptations of *Desulfovibrio alaskensis* G20 to Phosphate-Limited Conditions. *PloS one*, 11(12), e0168719. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168719>
 - Brown, J. L., Ross, T., McMeekin, T. A., & Nichols, P. D. (1997). Acid habituation of *Escherichia coli* and the potential role of cyclopropane fatty acids in low pH tolerance. *International journal of food microbiology*, 37(2-3), 163–173. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(97\)00068-8](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(97)00068-8)
 - Brown, M. R., & Kornberg, A. (2004). Inorganic polyphosphate in the origin and survival of species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(46), 16085–16087. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406909101>
 - Chang, Y. Y., & Cronan, J. E., Jr (1999). Membrane cyclopropane fatty acid content is a major factor in acid resistance of *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, 33(2), 249–259. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01456.x>
 - Córdoba-Castro, L. 2022. Estudio sobre el papel de los lípidos de ornitina en bacterias de la familia *Burkholderiaceae*. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México.
 - Córdoba-Castro, L. A., Salgado-Morales, R., Torres, M., Martínez-Aguilar, L., Lozano, L., Vences-Guzmán, M. Á., Guan, Z., Dantán-González, E., Serrano, M., & Sohlenkamp, C. (2021). Ornithine Lipids in *Burkholderia* spp. Pathogenicity. *Frontiers in molecular biosciences*, 7, 610932. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.610932>
 - Cronan, J. E. Jr., and Rock, C. O. (1996). Biosynthesis of membrane lipids. In *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology (2nd edn), eds Neidhardt FC, Curtiss R, Gross CA, Ingraham JL, Lin ECC, Low

- KB, Magasanik B, Reznikoff WS, Riley M, Schaechter M, Umbarger HE (ASM Press, Washington DC), 612-636.
- Cronan, J. E., Jr, & Gelmann, E. P. (1975). Physical properties of membrane lipids: biological relevance and regulation. *Bacteriological reviews*, 39(3), 232–256. <https://doi.org/10.1128/br.39.3.232-256.1975>
 - Dare, K., Shepherd, J., Roy, H., Seveau, S., & Ibba, M. (2014). LysPGS formation in *Listeria monocytogenes* has broad roles in maintaining membrane integrity beyond antimicrobial peptide resistance. *Virulence*, 5(4), 534–546. <https://doi.org/10.4161/viru.28359>
 - Darmon, E., & Leach, D. R. (2014). Bacterial genome instability. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 78(1), 1–39. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00035-13>
 - de Rudder, K. E., López-Lara, I. M., & Geiger, O. (2000). Inactivation of the gene for phospholipid N-methyltransferase in *Sinorhizobium meliloti*: phosphatidylcholine is required for normal growth. *Molecular microbiology*, 37(4), 763–772. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.02032.x>
 - DeChavigny, A., Heacock, P. N., & Dowhan, W. (1991). Sequence and inactivation of the pss gene of *Escherichia coli*. Phosphatidylethanolamine may not be essential for cell viability. *The Journal of biological chemistry*, 266(8), 5323–5332.
 - Dees, C., & Shively, J. M. (1982). Localization of quantitation of the ornithine lipid of *Thiobacillus thiooxidans*. *Journal of bacteriology*, 149(2), 798–799. <https://doi.org/10.1128/jb.149.2.798-799.1982>
 - Denich, T. J., Beaudette, L. A., Lee, H., & Trevors, J. T. (2003). Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes. *Journal of microbiological methods*, 52(2), 149–182. [https://doi.org/10.1016/s0167-7012\(02\)00155-0](https://doi.org/10.1016/s0167-7012(02)00155-0)
 - Devers, E. A., Wewer, V., Dombrink, I., Dörmann, P., & Hölzl, G. (2011). A processive glycosyltransferase involved in glycolipid synthesis during phosphate deprivation in *Mesorhizobium loti*. *Journal of bacteriology*, 193(6), 1377–1384. <https://doi.org/10.1128/JB.00768-10>
 - Diefenbach, R., Heipieper, HJ. & Keweloh, H. (1992). The conversion of *cis* into *trans* unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida* P8: evidence for a role in the regulation of membrane fluidity. *Appl Microbiol Biotechnol* 38, 382–387. <https://doi.org/10.1007/BF00170090>
 - Diercks, H., Semeniuk, A., Gisch, N., Moll, H., Duda, K. A., & Hölzl, G. (2015). Accumulation of novel glycolipids and ornithine lipids in *Mesorhizobium loti* under phosphate deprivation. *Journal of bacteriology*, 197(3), 497–509. <https://doi.org/10.1128/JB.02004-14>
 - Džidić, S., Šuškić, J. i Kos, B. (2008). Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects. *Food Technology and Biotechnology*, 46 (1), 11-21. <https://hrcak.srce.hr/22174>
 - Edgcomb, M. R., Sirimanne, S., Wilkinson, B. J., Drouin, P., & Morse, R. D. (2000). Electron paramagnetic resonance studies of the membrane fluidity of the foodborne pathogenic psychrotroph *Listeria monocytogenes*. *Biochimica et biophysica acta*, 1463(1), 31–42. [https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(99\)00179-0](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(99)00179-0)
 - Escobedo-Hinojosa, W. I., Vences-Guzmán, M. Á., Schubotz, F., Sandoval-Calderón, M., Summons, R. E., López-Lara, I. M., Geiger, O., & Sohlenkamp, C. (2015). OlsG (Sinac_1600) Is an Ornithine Lipid N-

- Methyltransferase from the Planctomycete *Singulisphaera acidiphila*. *The Journal of biological chemistry*, 290(24), 15102–15111. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.639575>
- Fashola, M. O., Ngole-Jeme, V. M., & Babalola, O. O. (2016). Heavy Metal Pollution from Gold Mines: Environmental Effects and Bacterial Strategies for Resistance. *International journal of environmental research and public health*, 13(11), 1047. <https://doi.org/10.3390/ijerph13111047>
 - Fozo, E. M., & Quivey, R. G., Jr (2004a). Shifts in the membrane fatty acid profile of *Streptococcus mutans* enhance survival in acidic environments. *Applied and environmental microbiology*, 70(2), 929–936. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.2.929-936.2004>
 - Fozo, E. M., & Quivey, R. G., Jr (2004b). The fabM gene product of *Streptococcus mutans* is responsible for the synthesis of monounsaturated fatty acids and is necessary for survival at low pH. *Journal of bacteriology*, 186(13), 4152–4158. <https://doi.org/10.1128/JB.186.13.4152-4158.2004>
 - Fozo, E. M., Kajfasz, J. K., & Quivey, R. G., Jr (2004). Low pH-induced membrane fatty acid alterations in oral bacteria. *FEMS microbiology letters*, 238(2), 291–295. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.07.047>
 - Furlong, S. T., Leary, J. A., Costello, C. E., & Dawidowicz, E. A. (1986). Isolation and identification of 1(3),2-diacylglyceryl-(3)-O-4'-(N,N,N-trimethyl)homoserine from the soil amoeba, *Acanthamoeba castellanii*. *Journal of lipid research*, 27(11), 1182–1189.
 - Gao, J. L., Weissenmayer, B., Taylor, A. M., Thomas-Oates, J., López-Lara, I. M., & Geiger, O. (2004). Identification of a gene required for the formation of lyso-ornithine lipid, an intermediate in the biosynthesis of ornithine-containing lipids. *Molecular microbiology*, 53(6), 1757–1770. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04240.x>
 - Geiger, O., González-Silva, N., López-Lara, I. M., & Sohlenkamp, C. (2010a). Amino acid-containing membrane lipids in bacteria. *Progress in lipid research*, 49(1), 46–60. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2009.08.002>
 - Geiger, O., López-Lara, I. M., & Sohlenkamp, C. (2013). Phosphatidylcholine biosynthesis and function in bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1831(3), 503–513.
 - Geiger, O., Röhrs, V., Weissenmayer, B., Finan, T. M., Thomas-Oates, J. E. (1999). The regulator gen phoB mediates phosphate stress-controlled synthesis of the membrane lipid diacylglyceryl-N,N,N-trimethylhomoserine in *rhizobium (sinorhizobium) meliloti*. *Molecular Microbiology* 32 (1), 63–73. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01325.x>
 - Geiger, O., Sohlenkamp, C., & López-Lara, I. M. (2010b). Formation of bacterial membrane lipids: pathways, enzymes, reactions. In *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*.
 - Gelband H., M. Miller-Petrie. (2015). The state of the world's antibiotics 2015. Centre for *Disease Dynamics, Economics & Policy*, CDDEP: Washington, D.C, 1–84.
 - Georlette, D., Blaise, V., Collins, T., D'Amico, S., Gratia, E., Hoyoux, A., Marx, J. C., Sonan, G., Feller, G., & Gerday, C. (2004). Some like it cold: biocatalysis at low temperatures. *FEMS microbiology reviews*, 28(1), 25–42. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2003.07.003>

- Geske, T., Vom Dorp, K., Dörmann, P., & Hölzl, G. (2013). Accumulation of glycolipids and other non-phosphorous lipids in *Agrobacterium tumefaciens* grown under phosphate deprivation. *Glycobiology*, 23(1), 69–80. <https://doi.org/10.1093/glycob/cws124>
- Ghorbel, S., Smirnov, A., Chouayekh, H., Sperandio, B., Esnault, C., Kormanec, J., & Viorolle, M. J. (2006). Regulation of ppk expression and in vivo function of Ppk in *Streptomyces lividans* TK24. *Journal of bacteriology*, 188(17), 6269–6276. <https://doi.org/10.1128/JB.00202-06>
- Godchaux, W., & Leadbetter, E. R. (1988). Sulfonolipids are localized in the outer membrane of the gliding bacterium *Cytophaga johnsonae*. *Archives of microbiology*, 150(1), 42-47.
- Godchaux, W., 3rd, & Leadbetter, E. R. (1983). Unusual sulfonolipids are characteristic of the *Cytophaga-Flexibacter* group. *Journal of bacteriology*, 153(3), 1238–1246. <https://doi.org/10.1128/jb.153.3.1238-1246.1983>
- González-Silva, N., López-Lara, I. M., Reyes-Lamothe, R., Taylor, A. M., Sumpton, D., Thomas-Oates, J., & Geiger, O. (2011). The dioxygenase-encoding *olsD* gene from *Burkholderia cenocepacia* causes the hydroxylation of the amide-linked fatty acyl moiety of ornithine-containing membrane lipids. *Biochemistry*, 50(29), 6396–6408. <https://doi.org/10.1021/bi200706v>
- Gould, R. M., & Lennarz, W. J. (1967). Biosynthesis of aminoacyl derivatives of phosphatidylglycerol. *Biochemical and biophysical research communications*, 26(4), 510-515.
- Grogan, D. W., & Cronan, J. E., Jr (1997). Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 61(4), 429–441. <https://doi.org/10.1128/membr.61.4.429-441.1997>
- Guerrero-Castro, J. 2018. Mecanismos de resistencia a condiciones de estrés por acidez en *Rhizobium tropici* CIAT 899. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Gupta R. S. (2011). Origin of diderm (Gram-negative) bacteria: antibiotic selection pressure rather than endosymbiosis likely led to the evolution of bacterial cells with two membranes. *Antonie van Leeuwenhoek*, 100(2), 171–182. <https://doi.org/10.1007/s10482-011-9616-8>
- Hari, S. B., Grant, R. A., & Sauer, R. T. (2018). Structural and Functional Analysis of *E. coli* Cyclopropane Fatty Acid Synthase. *Structure (London, England : 1993)*, 26(9), 1251–1258.e3. <https://doi.org/10.1016/j.str.2018.06.008>
- Hebecker, S., Arendt, W., Heinemann, I. U., Tiefenau, J. H., Nimtz, M., Rohde, M., Söll, D., & Moser, J. (2011). Alanyl-phosphatidylglycerol synthase: mechanism of substrate recognition during tRNA-dependent lipid modification in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular microbiology*, 80(4), 935–950. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07621.x>
- Hellweg, C., Pühler, A., & Weidner, S. (2009). The time course of the transcriptomic response of *Sinorhizobium meliloti* 1021 following a shift to acidic pH. *BMC microbiology*, 9, 37. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-37>
- Hölzl, G., & Dörmann, P. (2007). Structure and function of glycoglycerolipids in plants and bacteria. *Progress in lipid research*, 46(5), 225–243. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2007.05.001>

- Hölzl, G., Sohlenkamp, C., Vences-Guzmán, M. A., & Gisch, N. (2018). Headgroup hydroxylation by OlsE occurs at the C4 position of ornithine lipid and is widespread in proteobacteria and *bacteroidetes*. *Chemistry and physics of lipids*, 213, 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2018.03.002>
- Horbach, S., Neuss, B., & Sahm, H. (1991). Effect of azasqualene on hopanoid biosynthesis and ethanol tolerance of *Zymomonas mobilis*. *FEMS microbiology letters*, 79(2-3), 347-350. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1991.tb04553.x>
- Huemer, M., Mairpady Shambat, S., Brugger, S. D., & Zinkernagel, A. S. (2020). Antibiotic resistance and persistence-Implications for human health and treatment perspectives. *EMBO reports*, 21(12), e51034. <https://doi.org/10.15252/embr.202051034>
- Jahnke, L. L., Stan-Lotter, H., Kato, K., & Hochstein, L. I. (1992). Presence of methyl sterol and bacteriohopanepolyol in an outer-membrane preparation from *Methylococcus capsulatus* (Bath). *Journal of general microbiology*, 138(8), 1759–1766. <https://doi.org/10.1099/00221287-138-8-1759>
- Jürgens, U. J., Simonin, P., & Rohmer, M. (1992). Localization and distribution of hopanoids in membrane systems of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6714. *FEMS microbiology letters*, 71(3), 285–288. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(92\)90723-2](https://doi.org/10.1016/0378-1097(92)90723-2)
- Kanjee, U., & Houry, W. A. (2013). Mechanisms of acid resistance in *Escherichia coli*. *Annual review of microbiology*, 67, 65–81. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155708>
- Kato, M., Muto, Y., Tanaka-Bandoh, K., Watanabe, K., & Ueno, K. (1995). Sphingolipid composition in *Bacteroides* species. *Anaerobe*, 1(2), 135–139. <https://doi.org/10.1006/anae.1995.1009>
- Kawahara, K., Kubota, M., Sato, N., Tsuge, K., & Seto, Y. (2002). Occurrence of an alpha-galacturonosylceramide in the dioxin-degrading bacterium *Sphingomonas wittichii*. *FEMS microbiology letters*, 214(2), 289–294. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11361.x>
- Kawahara, K., Kuraishi, H., & Zähringer, U. (1999). Chemical structure and function of glycosphingolipids of *Sphingomonas* spp and their distribution among members of the alpha-4 subclass of Proteobacteria. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 23(4-5), 408–413. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900708>
- Kawahara, K., Lindner, B., Isshiki, Y., Jakob, K., Knirel, Y. A., & Zähringer, U. (2001). Structural analysis of a new glycosphingolipid from the lipopolysaccharide-lacking bacterium *Sphingomonas adhaesiva*. *Carbohydrate Research*, 333(1), 87-93.
- Kawahara, K., Moll, H., Knirel, Y. A., Seydel, U., & Zähringer, U. (2000). Structural analysis of two glycosphingolipids from the lipopolysaccharide-lacking bacterium *Sphingomonas capsulata*. *European journal of biochemistry*, 267(6), 1837–1846. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01189.x>
- Kawahara, K., Seydel, U., Matsuura, M., Danbara, H., Rietschel, E. T., & Zähringer, U. (1991). Chemical structure of glycosphingolipids isolated from *Sphingomonas paucimobilis*. *FEBS letters*, 292(1-2), 107–110. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(91\)80845-t](https://doi.org/10.1016/0014-5793(91)80845-t)
- Kawasaki, S., Moriguchi, R., Sekiya, K., Nakai, T., Ono, E., Kume, K., & Kawahara, K. (1994). The cell envelope structure of the lipopolysaccharide-lacking gram-negative bacterium *Sphingomonas paucimobilis*. *Journal of bacteriology*, 176(2), 284–290. <https://doi.org/10.1128/jb.176.2.284-290.1994>

- Keck, M., Gisch, N., Moll, H., Vorhölter, F. J., Gerth, K., Kahmann, U., Lissel, M., Lindner, B., Niehaus, K., & Holst, O. (2011). Unusual outer membrane lipid composition of the gram-negative, lipopolysaccharide-lacking myxobacterium *Sorangium cellulosum* So ce56. *The Journal of biological chemistry*, 286(15), 12850–12859. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.194209>
- Kent, C., Gee, P., Lee, S. Y., Bian, X., & Fenno, J. C. (2004). A CDP-choline pathway for phosphatidylcholine biosynthesis in *Treponema denticola*. *Molecular microbiology*, 51(2), 471–481. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03839.x>
- Kim, B. H., Kim, S., Kim, H. G., Lee, J., Lee, I. S., & Park, Y. K. (2005). The formation of cyclopropane fatty acids in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology (Reading, England)*, 151(Pt 1), 209–218. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27265-0>
- Klein, W., Weber, M. H., & Marahiel, M. A. (1999). Cold shock response of *Bacillus subtilis*: isoleucine-dependent switch in the fatty acid branching pattern for membrane adaptation to low temperatures. *Journal of bacteriology*, 181(17), 5341–5349. <https://doi.org/10.1128/JB.181.17.5341-5349.1999>
- Krämer R. (2010). Bacterial stimulus perception and signal transduction: response to osmotic stress. *Chemical record (New York, N.Y.)*, 10(4), 217–229. <https://doi.org/10.1002/tcr.201000005>
- Kritmetapak, K., & Kumar, R. (2021). Phosphate as a Signaling Molecule. *Calcified tissue international*, 108(1), 16–31. <https://doi.org/10.1007/s00223-019-00636-8>
- Künzler, K., & Eichenberger, W. (1997). Betaine lipids and zwitterionic phospholipids in plants and fungi. *Phytochemistry*, 46(5), 883–892. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(97\)81274-5](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(97)81274-5)
- Lamarche, M. G., Wanner, B. L., Crépin, S., & Harel, J. (2008). The phosphate regulon and bacterial virulence: a regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis. *FEMS microbiology reviews*, 32(3), 461–473. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00101.x>
- Lennarz, W. J., Bonsen, P. P., & van Deenen, L. L. (1967). Substrate specificity of O-L-lysylphosphatidylglycerol synthetase. Enzymatic studies on the structure of O-L-lysylphosphatidylglycerol. *Biochemistry*, 6(8), 2307–2312. <https://doi.org/10.1021/bi00860a005>
- Liu, W., Eder, S., & Hulett, F. M. (1998). Analysis of *Bacillus subtilis* tagAB and tagDEF expression during phosphate starvation identifies a repressor role for PhoP-P. *Journal of bacteriology*, 180(3), 753–758. <https://doi.org/10.1128/JB.180.3.753-758.1998>
- Liu, Y., Wei, Y., Teh, T. M., Liu, D., Zhou, Y., Zhao, S., ... & Zhang, Y. (2022). Identification and Characterization of the Biosynthetic Pathway of the Sulfonolipid Capnine. *Biochemistry*.
- López-Lara, I. M., & Geiger, O. (2017). Bacterial lipid diversity. *Biochimica et biophysica acta. Molecular and cell biology of lipids*, 1862(11), 1287–1299. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.10.007>
- López-Lara, I. M., Gao, J. L., Soto, M. J., Solares-Pérez, A., Weissenmayer, B., Sohlenkamp, C., Verroios, G. P., Thomas-Oates, J., & Geiger, O. (2005). Phosphorus-free membrane lipids of *Sinorhizobium meliloti* are not required for the symbiosis with alfalfa but contribute to increased cell yields under phosphorus-limiting conditions of growth. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 18(9), 973–982. <https://doi.org/10.1094/MPMI-18-0973>

- López-Lara, I. M., Sohlenkamp, C., & Geiger, O. (2003). Membrane lipids in plant-associated bacteria: their biosyntheses and possible functions. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 16(7), 567–579. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2003.16.7.567>
- López-Lara, I.M., Geiger, O. (2019). Formation of Fatty Acids. In: Geiger, O. (eds) Biogenesis of Fatty Acids, Lipids and Membranes. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology . Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-50430-8_5
- Lund, P., Tramonti, A., & De Biase, D. (2014). Coping with low pH: molecular strategies in neutralophilic bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 38(6), 1091–1125. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12076>
- Madigan T. M., Martinko J. M., Beneder K. S., Bunckley D. H., Stahl D. A. (2015). *Biología de los microorganismos*. 14ª ed. Madrid, España: Pearsons.
- Mansilla, M. C., Cybulski, L. E., Albanesi, D., & de Mendoza, D. (2004). Control of membrane lipid fluidity by molecular thermosensors. *Journal of bacteriology*, 186(20), 6681–6688. <https://doi.org/10.1128/JB.186.20.6681-6688.2004>
- Margesin R, Schinner F, Marx J, Gerday C. (2008). Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology. Springer, Berlin/Heidelberg <https://doi.org/10.1007/978-3-540-74335-4>
- Martinić, M., Hoare, A., Contreras, I., & Alvarez, S. A. (2011). Contribution of the lipopolysaccharide to resistance of *Shigella flexneri* 2a to extreme acidity. *PloS one*, 6(10), e25557. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025557>
- Mastronicolis, S. K., Berberi, A., Diakogiannis, I., Petrova, E., Kiaki, I., Baltzi, T., & Xenikakis, P. (2010). Alteration of the phospho- or neutral lipid content and fatty acid composition in *Listeria monocytogenes* due to acid adaptation mechanisms for hydrochloric, acetic and lactic acids at pH 5.5 or lizoic acid at neutral pH. *Antonie van Leeuwenhoek*, 98(3), 307–316. <https://doi.org/10.1007/s10482-010-9439-z>
- Merrill A. H., Jr (2011). Sphingolipid and glycosphingolipid metabolic pathways in the era of sphingolipidomics. *Chemical reviews*, 111(10), 6387–6422. <https://doi.org/10.1021/cr2002917>
- Minnikin, D. E., & Abdolrahimzadeh, H. (1974). The replacement of phosphatidylethanolamine and acidic phospholipids by an ornithine-amide lipid and a minor phosphorus-free lipid in *Pseudomonas fluorescens* NCMB 129. *FEBS letters*, 43(3), 257–260. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(74\)80655-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(74)80655-1)
- Minnikin, D. E., Abdolrahimzadeh, H., Baddiley, J. (1974). Replacement of acidic phospholipids by acidic glycolipids in *pseudomonas diminuta*. *Nature* 249 (5454), 268-269. <https://doi.org/10.1038/249268a0>
- Moore, E. K., Hopmans, E. C., Rijpstra, W. I., Sánchez-Andrea, I., Villanueva, L., Wienk, H., Schoutsen, F., Stams, A. J., & Sinninghe Damsté, J. S. (2015). Lysine and novel hydroxylysine lipids in soil bacteria: amino acid membrane lipid response to temperature and pH in *Pseudopedobacter saltans*. *Frontiers in microbiology*, 6, 637. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00637>
- Moore, E. K., Hopmans, E. C., Rijpstra, W. I., Villanueva, L., & Damsté, J. S. (2016). Elucidation and identification of amino acid containing membrane lipids using liquid chromatography/high-resolution mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM*, 30(6), 739–750. <https://doi.org/10.1002/rcm.7503>

- Moser, R., Aktas, M., & Narberhaus, F. (2014a). Phosphatidylcholine biosynthesis in *Xanthomonas campestris* via a yeast-like acylation pathway. *Molecular microbiology*, *91*(4), 736–750. <https://doi.org/10.1111/mmi.12492>
- Moser, R., Aktas, M., Fritz, C., & Narberhaus, F. (2014b). Discovery of a bifunctional cardiolipin/phosphatidylethanolamine synthase in bacteria. *Molecular microbiology*, *92*(5), 959–972. <https://doi.org/10.1111/mmi.12603>
- Mostofian, B., Zhuang, T., Cheng, X., & Nickels, J. D. (2019). Branched-Chain Fatty Acid Content Modulates Structure, Fluidity, and Phase in Model Microbial Cell Membranes. *The journal of physical chemistry. B*, *123*(27), 5814–5821. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b04326>
- Nesbitt, J. A., 3rd, & Lennarz, W. J. (1968). Participation of aminoacyl transfer ribonucleic acid in aminoacyl phosphatidylglycerol synthesis. I. Specificity of lysyl phosphatidylglycerol synthetase. *The Journal of biological chemistry*, *243*(11), 3088–3095.
- Neumann, G., Veeranagouda, Y., Karegoudar, T. B., Sahin, O., Mäusezahl, I., Kabelitz, N., Kappelmeyer, U., & Heipieper, H. J. (2005). Cells of *Pseudomonas putida* and *Enterobacter sp.* adapt to toxic organic compounds by increasing their size. *Extremophiles : life under extreme conditions*, *9*(2), 163–168. <https://doi.org/10.1007/s00792-005-0431-x>
- Nikaido H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, *67*(4), 593–656. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.593-656.2003>
- Ogawa, S., Tachimoto, H., & Kaga, T. (2010). Elevation of ceramide in *Acetobacter malorum* S24 by low pH stress and high temperature stress. *Journal of bioscience and bioengineering*, *109*(1), 32–36. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.07.007>
- Oku, Y., Kurokawa, K., Ichihashi, N., & Sekimizu, K. (2004). Characterization of the *Staphylococcus aureus* *mprF* gene, involved in lysinylation of phosphatidylglycerol. *Microbiology (Reading, England)*, *150*(Pt 1), 45–51. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26706-0>
- Okuyama, H., Sasaki, S., Higashi, S., & Murata, N. (1990). A trans-unsaturated fatty acid in a psychrophilic bacterium, *Vibrio sp.* strain ABE-1. *Journal of bacteriology*, *172*(6), 3515–3518. <https://doi.org/10.1128/jb.172.6.3515-3518.1990>
- Ourisson, G., Rohmer, M., & Poralla, K. (1987). Prokaryotic hopanoids and other polyterpenoid sterol surrogates. *Annual review of microbiology*, *41*, 301–333. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.41.100187.001505>
- Palacios-Chaves, L., Conde-Álvarez, R., Gil-Ramírez, Y., Zúñiga-Ripa, A., Barquero-Calvo, E., Chacón-Díaz, C., Chaves-Olarte, E., Arce-Gorvel, V., Gorvel, J. P., Moreno, E., de Miguel, M. J., Grilló, M. J., Moriyón, I., & Iriarte, M. (2011). *Brucella abortus* ornithine lipids are dispensable outer membrane components devoid of a marked pathogen-associated molecular pattern. *PloS one*, *6*(1), e16030. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016030>
- Parsons, J. B., & Rock, C. O. (2013). Bacterial lipids: metabolism and membrane homeostasis. *Progress in lipid research*, *52*(3), 249–276. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2013.02.002>
- Peschel, A., Jack, R. W., Otto, M., Collins, L. V., Staubitz, P., Nicholson, G., Kalbacher, H., Nieuwenhuizen, W. F., Jung, G., Tarkowski, A., van Kessel, K. P., & van Strijp, J. A. (2001). *Staphylococcus aureus* resistance

to human defensins and evasion of neutrophil killing via the novel virulence factor MprF is based on modification of membrane lipids with l-lysine. *The Journal of experimental medicine*, 193(9), 1067–1076. <https://doi.org/10.1084/jem.193.9.1067>

- Poger, D., Caron, B., & Mark, A. E. (2014). Effect of methyl-branched fatty acids on the structure of lipid bilayers. *The journal of physical chemistry. B*, 118(48), 13838–13848. <https://doi.org/10.1021/jp503910r>
- Poralla, K., Muth, G., & Härtner, T. (2000). Hopanoids are formed during transition from substrate to aerial hyphae in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *FEMS microbiology letters*, 189(1), 93–95. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09212.x>
- Raetz, C. R., & Dowhan, W. (1990). Biosynthesis and function of phospholipids in *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry*, 265(3), 1235–1238.
- Reeve, W. G., Tiwari, R. P., Woretey, P. S., Dilworth, M. J., Glenn, A. R., & Howieson, J. G. (1999). Constructs for insertional mutagenesis, transcriptional signal localization and gene regulation studies in root nodule and other bacteria. *Microbiology (Reading, England)*, 145 (Pt 6), 1307–1316. <https://doi.org/10.1099/13500872-145-6-1307>
- Rock, C. O. 2008 Fatty acid and phospholipid metabolism in prokaryotes. In: Vance, D. E., and Vance, J. E., editors. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes* (5th Edition). Amsterdam, The Netherlands: Elsevier 59-96.
- Rohmer, M., Bouvier, P., & Ourisson, G. (1979). Molecular evolution of biomembranes: structural equivalents and phylogenetic precursors of sterols. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(2), 847–851. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.2.847>
- Rohmer, M., Bouvier-Nave, P., & Ourisson, G. (1984). Distribution of hopanoid triterpenes in prokaryotes. *Microbiology*, 130(5), 1137-1150.851. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.2.847>
- Rojas-Jiménez, K., Sohlenkamp, C., Geiger, O., Martínez-Romero, E., Werner, D., & Vinuesa, P. (2005). A CIC chloride channel homolog and ornithine-containing membrane lipids of *Rhizobium tropici* CIAT899 are involved in symbiotic efficiency and acid tolerance. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 18(11), 1175–1185. <https://doi.org/10.1094/MPMI-18-1175>
- Sáenz, J. P., Waterbury, J. B., Eglinton, T. I., & Summons, R. E. (2012). Hopanoids in marine cyanobacteria: probing their phylogenetic distribution and biological role. *Geobiology*, 10(4), 311-319.
- Sager, M., Benten, W. P., Engelhardt, E., Gougoula, C., & Benga, L. (2015). Characterization of Biofilm Formation in [*Pasteurella*] *pneumotropica* and [*Actinobacillus*] *muris* Isolates of Mouse Origin. *PloS one*, 10(10), e0138778. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138778>
- Sandoval-Calderón, M., Geiger, O., Guan, Z., Barona-Gómez, F., & Sohlenkamp, C. (2009). A eukaryote-like cardiolipin synthase is present in *Streptomyces coelicolor* and in most actinobacteria. *The Journal of biological chemistry*, 284(26), 17383–17390. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.006072>
- Santos-Beneit F. (2015). The Pho regulon: a huge regulatory network in bacteria. *Frontiers in microbiology*, 6, 402. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00402>
- Sastre, D. E., Basso, L., Trastoy, B., Cifuentes, J. O., Contreras, X., Gueiros-Filho, F., de Mendoza, D., Navarro, M., & Guerin, M. E. (2020). Membrane fluidity adjusts the insertion of the transacylase PlsX to regulate

phospholipid biosynthesis in Gram-positive bacteria. *The Journal of biological chemistry*, 295(7), 2136–2147. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.011122>

- Schleifer, K. H., & Kroppenstedt, R. M. (1990). Chemical and molecular classification of *staphylococci*. *Society for Applied Bacteriology symposium series*, 19, 9S–24S. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1990.tb01794.x>
- Schmerk, C. L., Bernards, M. A., & Valvano, M. A. (2011). Hopanoid production is required for low-pH tolerance, antimicrobial resistance, and motility in *Burkholderia cenocepacia*. *Journal of bacteriology*, 193(23), 6712–6723. <https://doi.org/10.1128/JB.05979-11>
- Schmerk, C. L., Bernards, M. A., & Valvano, M. A. (2011). Hopanoid production is required for low-pH tolerance, antimicrobial resistance, and motility in *Burkholderia cenocepacia*. *Journal of bacteriology*, 193(23), 6712–6723. <https://doi.org/10.1128/JB.05979-11>
- Schmerk, C. L., Welander, P. V., Hamad, M. A., Bain, K. L., Bernards, M. A., Summons, R. E., & Valvano, M. A. (2015). Elucidation of the *Burkholderia cenocepacia* hopanoid biosynthesis pathway uncovers functions for conserved proteins in hopanoid-producing bacteria. *Environmental microbiology*, 17(3), 735–750. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12509>
- Seipke, R. F., & Loria, R. (2009). Hopanoids are not essential for growth of *Streptomyces scabies* 87-22. *Journal of bacteriology*, 191(16), 5216–5223. <https://doi.org/10.1128/JB.00390-09>
- Shen, J., Yuan, L., Zhang, J., Li, H., Bai, Z., Chen, X., Zhang, W., & Zhang, F. (2011). Phosphorus dynamics: from soil to plant. *Plant physiology*, 156(3), 997–1005. <https://doi.org/10.1104/pp.111.175232>
- Silhavy, T. J., Kahne, D., & Walker, S. (2010). The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(5), a000414. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000414>
- Simonin, P., Jürgens, U. J., & Rohmer, M. (1996). Bacterial triterpenoids of the hopane series from the prochlorophyte *Prochlorothrix hollandica* and their intracellular localization. *European journal of biochemistry*, 241(3), 865–871. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.00865.x>
- Simpson, B. W., May, J. M., Sherman, D. J., Kahne, D., & Ruiz, N. (2015). Lipopolysaccharide transport to the cell surface: biosynthesis and extraction from the inner membrane. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 370(1679), 20150029. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0029>
- Sinensky M. (1974). Homeoviscous adaptation--a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71(2), 522–525. <https://doi.org/10.1073/pnas.71.2.522>
- Singh, V. K., Hattangady, D. S., Giotis, E. S., Singh, A. K., Chamberlain, N. R., Stuart, M. K., & Wilkinson, B. J. (2008). Insertional inactivation of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase in *Staphylococcus aureus* leads to decreased branched-chain membrane fatty acid content and increased susceptibility to certain stresses. *Applied and environmental microbiology*, 74(19), 5882–5890. <https://doi.org/10.1128/AEM.00882-08>
- Smith, A. M., Harrison, J. S., Sprague, K. M., & Roy, H. (2013). A conserved hydrolase responsible for the cleavage of aminoacylphosphatidylglycerol in the membrane of *Enterococcus faecium*. *The Journal of biological chemistry*, 288(31), 22768–22776. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.484402>

- Sohlenkamp C. (2017) Membrane Homeostasis in Bacteria upon pH Challenge. In: Geiger O. (eds) *Biogenesis of Fatty Acids, Lipids and Membranes*. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-43676-0_57-1
- Sohlenkamp, C., and Geiger, O. (2016). Bacterial membrane lipids: diversity in structures and pathways. *FEMS microbiology reviews*, 40(1), 133–159. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv008>
- Sohlenkamp, C., de Rudder, K. E., Rohrs, V., López-Lara, I. M., & Geiger, O. (2000). Cloning and characterization of the gene for phosphatidylcholine synthase. *The Journal of biological chemistry*, 275(25), 18919–18925. <https://doi.org/10.1074/jbc.M000844200>
- Sohlenkamp, C., Galindo-Lagunas, K. A., Guan, Z., Vinuesa, P., Robinson, S., Thomas-Oates, J., Raetz, C. R., & Geiger, O. (2007). The lipid lysyl-phosphatidylglycerol is present in membranes of *Rhizobium tropici* CIAT899 and confers increased resistance to polymyxin B under acidic growth conditions. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 20(11), 1421–1430. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-11-1421>
- Staubitz, P., Neumann, H., Schneider, T., Wiedemann, I., & Peschel, A. (2004). MprF-mediated biosynthesis of lysylphosphatidylglycerol, an important determinant in staphylococcal defensin resistance. *FEMS microbiology letters*, 231(1), 67–71. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00921-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00921-2)
- Tahara, Y., Yamada, Y., & Kondo, K. (1976a). A new lysine-containing lipid isolated from *Agrobacterium tumefaciens*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 40(7), 1449-1450.
- Tahara, Y., Yamada, Y., & Kondo, K. (1976b). A new lysine-containing lipid isolated from *Agrobacterium tumefaciens*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 40(7), 1449-1450.
- Taylor, C. J., Anderson, A. J., & Wilkinson, S. G. (1998). Phenotypic variation of lipid composition in *Burkholderia cepacia*: a response to increased growth temperature is a greater content of 2-hydroxy acids in phosphatidylethanolamine and ornithine amide lipid. *Microbiology (Reading, England)*, 144 (Pt 7), 1737–1745. <https://doi.org/10.1099/00221287-144-7-1737>
- Ulrich, L. E., Koonin, E. V., & Zhulin, I. B. (2005). One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. *Trends in microbiology*, 13(2), 52–56. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.12.006>
- van de Vossenberg, J. L., Driessen, A. J., da Costa, M. S., & Konings, W. N. (1999). Homeostasis of the membrane proton permeability in *Bacillus subtilis* grown at different temperatures. *Biochimica et biophysica acta*, 1419(1), 97–104. [https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(99\)00063-2](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(99)00063-2)
- Vázquez-Almanza, W. 2022. Modulando los fenotipos y las características membranales de células bacterianas por ingeniería combinatoria de lípidos de ornitina. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Vences-Guzmán, M. 2014. Estudios sobre las modificaciones que pueden sufrir los lípidos de ornitina en bacterias de la familia *Rhizobiaceae*. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Vences-Guzmán, M. Á., Geiger, O., & Sohlenkamp, C. (2012). Ornithine lipids and their structural modifications: from A to E and beyond. *FEMS microbiology letters*, 335(1), 1–10. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2012.02623.x>

- Vences-Guzmán, M. Á., Guan, Z., Bermúdez-Barrientos, J. R., Geiger, O., & Sohlenkamp, C. (2013). Agrobacteria lacking ornithine lipids induce more rapid tumour formation. *Environmental microbiology*, *15*(3), 895–906. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02867.x>
- Vences-Guzmán, M. Á., Guan, Z., Escobedo-Hinojosa, W. I., Bermúdez-Barrientos, J. R., Geiger, O., & Sohlenkamp, C. (2015). Discovery of a bifunctional acyltransferase responsible for ornithine lipid synthesis in *Serratia proteamaculans*. *Environmental microbiology*, *17*(5), 1487–1496. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12562>
- Vences-Guzmán, M. Á., Guan, Z., Ormeño-Orrillo, E., González-Silva, N., López-Lara, I. M., Martínez-Romero, E., Geiger, O., & Sohlenkamp, C. (2011). Hydroxylated ornithine lipids increase stress tolerance in *Rhizobium tropici* CIAT899. *Molecular microbiology*, *79*(6), 1496–1514. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07535.x>
- Vences-Guzmán, M. Á., Paula Goetting-Minesky, M., Guan, Z., Castillo-Ramirez, S., Córdoba-Castro, L. A., López-Lara, I. M., Geiger, O., Sohlenkamp, C., & Christopher Fenno, J. (2017). 1,2-Diacylglycerol choline phosphotransferase catalyzes the final step in the unique *Treponema denticola* phosphatidylcholine biosynthesis pathway. *Molecular microbiology*, *103*(5), 896–912. <https://doi.org/10.1111/mmi.13596>
- Vences-Guzmán, M. Á., Peña-Miller, R., Hidalgo-Aguilar, N. A., Vences-Guzmán, M. L., Guan, Z., & Sohlenkamp, C. (2021). Identification of the *Flavobacterium johnsoniae* cysteate-fatty acyl transferase required for capnine synthesis and for efficient gliding motility. *Environmental microbiology*, *23*(5), 2448–2460. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15445>
- Vinuesa, P., Neumann-Silkow, F., Pacios-Bras, C., Spaink, H. P., Martínez-Romero, E., & Werner, D. (2003). Genetic analysis of a pH-regulated operon from *Rhizobium tropici* CIAT899 involved in acid tolerance and nodulation competitiveness. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, *16*(2), 159–168. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2003.16.2.159>
- Wada H, Murata N. Membrane lipids in cyanobacteria. In: Siegenthaler P-A, Murata N, editors. *Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics*. Dordrecht: Springer; (1998). pp. 65–81. <https://doi.org/10.1007/0-306-48087-5>
- Walker, A., Pfitzner, B., Harir, M., Schaubeck, M., Calasan, J., Heinzmann, S. S., Turaev, D., Rattei, T., Endesfelder, D., Castell, W. Z., Haller, D., Schmid, M., Hartmann, A., & Schmitt-Kopplin, P. (2017). Sulfonolipids as novel metabolite markers of *Alistipes* and *Odoribacter* affected by high-fat diets. *Scientific reports*, *7*(1), 11047. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10369-z>
- Wanner BL. (1996) Phosphorus assimilation and control of the phosphate regulon. *Escherichia Coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, 2nd edn (Neidhardt F.C. Curtiss R.III Ingraham J.L. Lin ECC Low K.B. Magasanik B. Reznikoff W.S. Riley M. Schaechter M. Umberger H.E., eds), pp. 1357–1381. ASM Press, Washington, DC.
- Wanner, B. L., & Chang, B. D. (1987). The *phoBR* operon in *Escherichia coli* K-12. *Journal of bacteriology*, *169*(12), 5569–5574. <https://doi.org/10.1128/jb.169.12.5569-5574.1987>

- Weber, M. H., Klein, W., Müller, L., Niess, U. M., & Marahiel, M. A. (2001). Role of the *Bacillus subtilis* fatty acid desaturase in membrane adaptation during cold shock. *Molecular microbiology*, 39(5), 1321–1329. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2001.02322.x>
- Weissenmayer, B., Gao, J. L., López-Lara, I. M., & Geiger, O. (2002). Identification of a gene required for the biosynthesis of ornithine-derived lipids. *Molecular microbiology*, 45(3), 721–733. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03043.x>
- Welander, P. V., Coleman, M. L., Sessions, A. L., Summons, R. E., & Newman, D. K. (2010). Identification of a methylase required for 2-methylhopanoid production and implications for the interpretation of sedimentary hopanes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(19), 8537–8542.
- Welander, P. V., Doughty, D. M., Wu, C. H., Mehay, S., Summons, R. E., & Newman, D. K. (2012). Identification and characterization of *Rhodopseudomonas palustris* TIE-1 hopanoid biosynthesis mutants. *Geobiology*, 10(2), 163–177. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4669.2011.00314.x>
- Welander, P. V., Hunter, R. C., Zhang, L., Sessions, A. L., Summons, R. E., & Newman, D. K. (2009). Hopanoids play a role in membrane integrity and pH homeostasis in *Rhodopseudomonas palustris* TIE-1. *Journal of bacteriology*, 191(19), 6145–6156. <https://doi.org/10.1128/JB.00460-09>
- Wood J. M. (2015). Bacterial responses to osmotic challenges. *The Journal of general physiology*, 145(5), 381–388. <https://doi.org/10.1085/jgp.201411296>
- Wood, J. M. (2011). Osmotic stress, p. 133–156 In Storz G., Hengge R.(ed.), Bacterial stress responses.
- Wu, C., Zhang, J., Wang, M., Du, G., & Chen, J. (2012). *Lactobacillus casei* combats acid stress by maintaining cell membrane functionality. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 39(7), 1031–1039. <https://doi.org/10.1007/s10295-012-1104-2>
- Yang, X., Hang, X., Zhang, M., Liu, X., & Yang, H. (2015). Relationship between acid tolerance and cell membrane in *Bifidobacterium*, revealed by comparative analysis of acid-resistant derivatives and their parental strains grown in medium with and without Tween 80. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(12), 5227–5236. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6447-y>
- Yao, J., & Rock, C. O. (2013). Phosphatidic acid synthesis in bacteria. *Biochimica et biophysica acta*, 1831(3), 495–502. <https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2012.08.018>
- Yuan, Z. C., Zaheer, R., Morton, R., & Finan, T. M. (2006). Genome prediction of PhoB regulated promoters in *Sinorhizobium meliloti* and twelve proteobacteria. *Nucleic acids research*, 34(9), 2686–2697. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl365>
- Zavaleta-Pastor, M., Sohlenkamp, C., Gao, J. L., Guan, Z., Zaheer, R., Finan, T. M., Raetz, C. R., López-Lara, I. M., & Geiger, O. (2010). *Sinorhizobium meliloti* phospholipase C required for lipid remodeling during phosphorus limitation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(1), 302–307. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912930107>
- Zerulla, K., Chimileski, S., Näther, D., Gophna, U., Papke, R. T., & Soppa, J. (2014). DNA as a phosphate storage polymer and the alternative advantages of polyploidy for growth or survival. *PloS one*, 9(4), e94819. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094819>

- Zhang, Y. M., & Rock, C. O. (2008). Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nature reviews. Microbiology*, 6(3), 222–233. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1839>
- Zhu, K., Bayles, D. O., Xiong, A., Jayaswal, R. K., & Wilkinson, B. J. (2005a). Precursor and temperature modulation of fatty acid composition and growth of *Listeria monocytogenes* cold-sensitive mutants with transposon-interrupted branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase. *Microbiology (Reading, England)*, 151(Pt 2), 615–623. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27634-0>
- Zhu, K., Ding, X., Julotok, M., & Wilkinson, B. J. (2005b). Exogenous isoleucine and fatty acid shortening ensure the high content of anteiso-C15:0 fatty acid required for low-temperature growth of *Listeria monocytogenes*. *Applied and environmental microbiology*, 71(12), 8002–8007. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8002-8007.2005>



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Licenciatura en Biología

Programa Educativo de Calidad *Acreditado* por el CACEB 2018-2023

Cuernavaca, Morelos a 3 de febrero de 2023

DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES
PRESENTE.

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta el Pasante de Biólogo: **ADA STEPHANY OLEA OZUNA**, con el título del trabajo: **Modificación de las membranas bacterianas en diferentes formas de estrés abiótico.**

En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para optar por la Modalidad de Titulación por Tesis como lo marca el artículo 6° del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

A T E N T A M E N T E
Por una humanidad culta

JURADO REVISOR

FIRMA

PRESIDENTE: DR. RAMÓN SUÁREZ RODRÍGUEZ

SECRETARIO: DR. JOSÉ AUGUSTO RAMÍREZ TRUJILLO

VOCAL: DR. CHRISTIAN SOHLENKAMP

SUPLENTE: DR. FERNANDO MARTÍNEZ MORALES

SUPLENTE: DRA. MA. CARMEN BELTRÁN NÚÑEZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

CHRISTIAN SOHLENKAMP | Fecha:2023-02-04 20:05:17 | Firmante

xG90+zBTHGcGD0AF135tx8MINHYzn4ij0q06ckqOnJOKv8Dop0SmDc9bcTmAVFewtJ9lbM1HO1jbxHfRw7OrK+ULxf/Lok7MThFaN9dZsKlXla8lw5n1WaPpDNS/dw+GEnbwjGglaPjbxP9vFVzoreAPy9PsSQTjctSYkz5XEEvjclhPLtJffxzhCOuwigLQ79au2maF8EYUXDfD1sNsDQNLX1inoLTRG3uMqZxyWZg1MHUoAN7kGqWeU6W7UOjDeXvb7//AWiudGpWIIIBal2W8BRklWxTuaqK+GKVI2Zk4wFyR10mQT4knmzsmc/FjxGX7AZMfLk4qcPyRMnx8BQ==

RAMON SUAREZ RODRIGUEZ | Fecha:2023-02-06 14:27:56 | Firmante

uQMSCNmPlujfQOPc9DgIn1s0t/pAa1oKz5fSIII4doLJ66ItG4YyZkXuRInlRaxOVBoTeG68UPMbMwx3DmjBH73eN5SluEZFEOGVIgHkp0ctsl5eCuMQaEFvcy6sw0oN9K5vN+DVuI9J0GvYXAdyTzR/GpWCCvA77Lam+gvlRbSSmvGnMHOg4SnTCIG5dzWRtrsmB3XAYTsSSUxR+RTIEvYtzHfptDkb9V+mZMHPtTYTB43vFgTB9rMbFbv9va5T1XHpzI0ioGI0iItoYA78JRouLcX0k64okxGfBwy8fUOaLO/os2oHrpaOhe3UNI0z27ImK5PxSRD1j3rcw==

FERNANDO MARTINEZ MORALES | Fecha:2023-02-09 06:43:07 | Firmante

FIUGmlKv17rrkxjA7EJ62x4c6dPLYbGYiknhzBAwsTYtYKLw9+2iQaDOFo7C+HroRH4O70LwfNwRSw/Oj5kjiWAI35itDPGAsb2qkS3WCHPFKEIMBfonNPBZIQo7PZKisuxb6YtKQx029uZAvvDlxQrvKE98miP1B1bH2YKD7DzesSTgMPRwiZfNj3XA2UAbcNvt+9HqX/L6QmpflaZ+OHGJN1vyCOQV6HoXZbud8qfNvgRDN90kvnQQZ1PPAV7e6JMhiXKHrP2S1VWHs4J8Z5XgUpOxe8etmaBrLJXGDroK76RkYosxexiwwEyarLda9wHmT7UFzwXJO2Ndbq4f2w==

JOSE AUGUSTO RAMIREZ TRUJILLO | Fecha:2023-02-09 17:14:31 | Firmante

J57CARrbYX1zxm32Qr/0Hly4NtHaQa0fjHNwxY5aaoujJVT/A6BEa026HPXka0U5rd8pSMNXQjpd4gOmbJV8ZDJt+Jyz7Avb2x1TvS81VJQ3Wog7md40NdKCFx0NLk1pZ4EO WGMlnLNVGNSbvcwRMemZBT6hoNUnTH1OTB0d2Bgioba3a4UWacmr5diOKLGVbZFFDKMNCoSBBw5VodXTRDKfA1C42ci+5FgHwhrEdG/cCYDjXf3+29i3PoB4gYVSw8wQ+RP1BSzW03RyKxv9UEnw7XF+Qa8Zw1VfriUALIQMgn5cfhpSwNpXgTQA9tNYzj2xldYsuaV2Qmxirg==

MA DEL CARMEN BELTRAN NUÑEZ | Fecha:2023-02-10 09:15:32 | Firmante

inhe6pagRnV+wdim3+pm/jJEPHJtQoU30KR4zA4O62W+fr7Zfvd8kCnHkUSKWo/hwy5+J8ASY3QQdSG62YOF589xqK8uuoams/37MQAaBC8v4bMb4NMcn4u+ZS+2tlxZOCHK RZGPQNY5FGenRa76uxLtz/kv+LgRrWvdngzmNFirFDDI2I2w/8iPEsle64hbKysPxW7TtVVS94iiOKYXbb5ro+EZbLJ6dNvdTSLQY9DaTHWfrWn+Yv16KMDWSS37B30bGZ+yWIL LAWMZH62glOYgOTOBHQGeMum0wPP3gjuwSTpAlgykVtOfccJ8q0WY3aqI5U9ZoGm+TVPrTjN1Q==

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



fnjt0S3zC

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/on9ILEPmhHYmc8KfpcatbqLFnHwFrbg>

