

Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Estación Experimental del Zaidín



Universidad de Granada



**Potencial de las bacterias del suelo en la  
rizorremediación de hidrocarburos aromáticos  
policíclicos (PAHs)**

Tesis Doctoral

**Sara Rodríguez Conde**

2011

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Sara Rodríguez Conde  
D.L.: GR 4533-2011  
ISBN: 978-84-694-6260-7



# **Potencial de las bacterias del suelo en la biorremediación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs)**

Memoria que presenta la Licenciada en Biología  
Sara Rodríguez Conde para optar al Título de Doctora

Fdo.: Sara Rodríguez Conde

Vº Bº de La Directora

Fdo.:

Ana Segura Carnicero  
Doctora en Biología  
Investigadora Científica del CSIC

EEZ – CSIC / Universidad de Granada

2011



Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el grupo de Degradación de Tóxicos  
Orgánicos del Departamento de Protección Ambiental de la Estación  
Experimental del Zaidín (CSIC)  
Granada



*I wish I was a neutron bomb, for once I could go off  
I wish I was a sacrifice but somehow still lived on  
I wish I was a sentimental ornament you hung on  
The Christmas tree, I wish I was the star that went on top  
I wish I was the evidence, I wish I was the grounds  
For 50 million hands upraised and open toward the sky*

*I wish I was a sailor with someone who waited for me  
I wish I was as fortunate, as fortunate as me  
I wish I was a messenger and all the news was good  
I wish I was the full moon shining off a Camaro's hood*

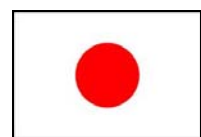
*I wish I was an alien at home behind the sun  
I wish I was the souvenir you kept your house key on  
I wish I was the pedal brake that you depended on  
I wish I was the verb 'to trust' and never let you down*

*I wish I was a radio song, the one that you turned up*

*I wish...*

*I wish...*

*Pearl Jam*



がんばって  
日本!





## Agradecimientos

A mi directora de tesis, Ana Segura, por el tiempo y esfuerzo que me ha dedicado y sobretodo por darme optimismo cuando más lo necesitaba.

A Juan Luis Ramos, por haberme permitido formar parte de su grupo de investigación.

A Cayo Ramos, por su esfuerzo al elaborar el informe de evaluación de esta Tesis, aún en periodo de oposiciones.

A José Luis Gómez y Rosa León, por darme la oportunidad de formar parte de sus grupos de investigación durante la realización de mis prácticas de máster. Gracias por vuestra guía en mis primeros pasos en un laboratorio de investigación.

A Lourdes Luengo, por descubrirme el maravilloso mundo de la Biología. Nunca olvidaré aquellas clases de Biología Molecular con papel, tijeras y fixo.

A mis compis del lab: a Ceci por su amistad y los buenos momentos, a Vanina por sus protocolos y enseñanzas, a Vanessa por su risa en tiempos de agobios, a Lazarillo por sus locuras, a Alicia porque parte de esta Tesis también es tuya. Gracias también a Isa, Ana H, Lola y Fernando.

A los chicos de Manolo y Maribel: a Saray por llevarme por el “mal camino”, a Marta por su optimismo, a Josemi por su energía positiva y a Mary por su arte “granaíno”.

A los chicos de Silvia: a Alejandro por su amistad y enseñanzas, a Daniel por traerme un trocito de Cádiz, a Sophie por su dulzura y ánimos, a Águeda por su compañía en la sala pre-tesis, a Mohamed por ahhh eh eh Si?, Gracias también a Patri.

A los chicos de Juan Luis: a Sandy por su alegría y amistad. Gracias también a Adela, Alí y Carlos.

A los que tienen la suerte de ser ya Doctores: Miguel, Gloria, Amalia, Regina, Hortencia y en especial a Antonio Jesús, por sus paellas y por su seminario de la música.

A todos los que forman parte del grupo “JLR” por vuestra ayuda y compañerismo todos estos años. Gracias también a Pedro porque cuando estás en la puerta, la EEZ tiene luz y a Mari Ángeles por las charlas de las tardes.

Gracias también a todos mis amigos fuera de la EEZ. A mis amigos de Granada: a Guadalupe por ser más que una compi de piso (te voy a echar mucho de menos) y a Fatima por sus clases de inglés y los “tapas-talk”. A mis amigos de Huelva: Rocío y Javi (que ganas de estar en tierras onubenses con vosotros), y a los de Sevilla: Reyes, Araceli, Alberto, Vero, Fátima (que buenos tiempos hemos pasado juntos...).

A mi familia. A mis abuelos por ser unos segundos padres. A mis padres, por enseñarme todo lo que sé y confiar siempre en mí; a papá por ser fuerte cuando más lo necesitábamos y a mamá por su ejemplo de superación. A mis hermanos: a la Rata pelona porque aunque estemos lejos siempre nos tenemos la una a la otra y al Enano porque somos los ¡hermanos pelotas! Os quiero mucho.

A Jose, por ser como eres. Gracias por tu cariño, tu música, tu mundo rosa, por darme ánimos y sobretodo por aguantarme. Qué ganas de irme contigo a Sevilla!!!

Muchas gracias a todos, sin vosotros no habría sido posible.





# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1. Problemática ambiental.....</b>	<b>3</b>
<b>2. Remediación de zonas contaminadas.....</b>	<b>4</b>
2.1. Fitorremediación.....	5
2.2. Rizorremediación.....	7
2.3. Selección del mejor par planta-bacteria para biorremediación.....	8
<b>3. La Rizosfera.....</b>	<b>11</b>
3.1. Exudados radiculares y efecto rizosférico.....	12
3.2. Beneficios de la asociación planta-bacteria para la planta.....	13
3.3. Expresión de genes catabólicos en la rizosfera.....	15
<b>4. Interacción planta-bacteria.....</b>	<b>17</b>
4.1. Colonización bacteriana de semillas.....	18
4.2. Colonización bacteriana de raíces.....	19
<b>5. Hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs).....</b>	<b>20</b>
5.1. Estructura y propiedades fisicoquímicas.....	20
5.2. Origen.....	22
5.2.1. Principales fuentes naturales.....	22
5.2.2. Principales fuentes antropogénicas.....	23
<b>6. Degradación bacteriana de PAHs.....</b>	<b>25</b>
6.1. Degradación de PAHs de bajo peso molecular.....	28
6.2. Genes catabólicos de PAHs de bajo peso molecular.....	30
<b>7. Regulación de rutas de degradación de compuestos aromáticos.....</b>	<b>32</b>
7.1. Regulación específica.....	33
7.1.1. Familia de reguladores NtrC.....	34
7.1.2. Familia de reguladores LysR.....	35
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>37</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
1. Recogida de muestras en zonas contaminadas con PAHs.....	43
2. Aislamiento de ADN total de suelo.....	43
3. Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE).....	44
3.1. Amplificación de la región hipervariable V3 del gen 16S.....	44
3.2. Preparación de geles desnaturizantes.....	45

3.3.	Tinción y visualización de los geles de DGGE.....	46
3.4.	Análisis estadístico de los geles de DGGE.....	46
3.5.	Escisión y secuenciación de las bandas de los geles de DGGE.....	46
4.	Condiciones y medios de cultivo.....	47
4.1.	Medios ricos.....	47
4.2.	Medios mínimos.....	47
4.3.	Condiciones de cultivo.....	48
4.4.	Antibióticos.....	48
5.	Aislamiento e identificación de bacterias degradadoras de fenantreno.....	48
6.	Construcción de árboles filogenéticos.....	49
7.	Cepas microbianas y su conservación.....	49
8.	Antibiogramas.....	51
9.	Detección de la producción de compuestos antimicrobianos y antifúngicos.....	51
10.	Adhesión a superficies bióticas.....	51
10.1.	Esterilización de semillas.....	52
10.2.	Germinación de semillas.....	52
10.3.	Adhesión a semillas y raíces de trébol y mostaza.....	52
10.4.	Adhesión competitiva a raíz de trébol.....	53
11.	Sistemas gnotobióticos.....	53
11.1.	Montaje de sistemas gnotobióticos.....	53
11.2.	Desmontaje de sistemas gnotobióticos.....	53
11.3.	Preparación de exudados radicales de trébol.....	55
12.	Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	55
13.	Aislamiento de ácidos nucleicos.....	54
13.1.	Aislamiento de ADN total bacteriano.....	55
13.2.	Aislamiento de plásmidos de pequeño tamaño.....	56
13.3.	Aislamiento de plásmidos de gran tamaño.....	56
13.4.	Aislamiento de ARN.....	56
14.	Manipulación de ácidos nucleicos.....	57
14.1.	Determinación de la concentración de ADN y ARN.....	57
14.2.	Electroforesis de ADN y ARN en geles de agarosa.....	57
14.3.	Recuperación de fragmentos de ADN de los geles de agarosa.....	58
14.4.	Digestión de ADN con enzimas de restricción.....	58
14.5.	Ligación de ADN.....	59
14.6.	Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa termorresistente (PCR).....	59

14.7. Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa termorresistente acoplada a una reacción de transcripción reversa (RT-PCR).....	61
14.8. Secuenciación de ADN.....	62
15. Plásmidos.....	62
16. Transferencia de plásmidos.....	64
16.1. Transferencia por choque térmico.....	64
16.1.1. Preparación de células competentes.....	64
16.1.2. Transformación.....	65
16.2. Transferencia por electroporación.....	65
16.2.1. Preparación de células electrocompetentes.....	65
16.2.2. Electroporación.....	65
17. Transferencia de ADN a membrana e hibridación por el método “Southern Blot” .....	66
17.1. Transferencia de ADN por capilaridad.....	66
17.2. Marcaje no radiactivo de ADN lineal.....	66
17.3. Prehibridación e hibridación.....	67
17.4. Detección inmunológica.....	68
18. Construcción de mutantes.....	68
18.1. Mutagénesis dirigida (por recombinación homóloga).....	68
19. Medida de la actividad $\beta$ -galactosidasa.....	69
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>71</b>
<b>Capítulo 1.....</b>	<b>73</b>
1. Caracterización microbiológica de las muestras de suelos.....	75
1.1. Análisis de las muestras de suelo de Cenes de la Vega (Granada)....	75
1.2. Análisis de las muestras de suelo de Ribatejada (Madrid).....	78
1.3. Análisis de las muestras de suelo de Palos de la Frontera (Huelva)...	81
2. Aislamiento e identificación de bacterias degradadoras de fenantreno.....	85
3. Análisis filogenético de las bacterias aisladas.....	87
4. Degradación de otros PAHs de bajo peso molecular.....	90
5. Antibiógramas.....	91
6. Selección de las cepas de trabajo.....	92
Discusión.....	94

Capítulo 2.....	99
1. Adhesión y colonización de superficies bióticas.....	101
1.1. Adhesión a semillas.....	101
1.2. Colonización de raíces.....	103
1.3. Crecimiento bacteriano en los sistemas gnotobióticos.....	105
1.4. Adhesión competitiva a raíz de trébol.....	108
2. Eliminación de fenantreno en los sistemas gnotobióticos.....	111
Discusión.....	118
Capítulo 3.....	123
1. Identificación de los genes de degradación de naftaleno y fenantreno en las cepas aisladas.....	125
1.1. Identificación de los genes de degradación en las cepas de la familia Sphingomonadaceae.....	125
1.2. Identificación de los genes de degradación en las cepas del género <i>Burkholderia</i> .....	127
2. Caracterización de las regiones promotoras de los genes de degradación identificados.....	130
2.1. Estudio de la expresión de los genes de degradación de naftaleno y fenantreno en las cepas del género <i>Burkholderia</i> .....	131
2.1.1. Estudio de la expresión de los promotores de las cepas MS3, MR5 y HR3p.....	131
2.1.2. Estudio de la expresión de los promotores de la cepa MS3 en la cepa HR3p y de la cepa HR3p en la cepa MS3.....	134
2.2. Estudio de la expresión de los genes de degradación de naftaleno y fenantreno en la cepa <i>Novosphingobium</i> sp. HS2a.....	135
3. Estudio de la regulación de la ruta de degradación de naftaleno y fenantreno en <i>Burkholderia</i> sp. MS3 y HR3p.....	136
3.1. Análisis <i>in silico</i> de los reguladores transcripcionales PhnR y PhnS.....	136
3.1.1. Estudio de la expresión de los promotores $P_{phnS-MS3}$ , $P_{phnR-MS3}$ y $P_{phnC-MS3}$ en un mutante <i>phnS</i> de la cepa <i>Burkholderia</i> sp. MS3.....	139
Discusión.....	141
DISCUSIÓN GENERAL.....	147
CONCLUSIONES.....	155

<b>ANEXOS.....</b>	<b>159</b>
<b>Anexo 1.....</b>	<b>161</b>
<b>Anexo 2.....</b>	<b>163</b>
<b>Anexo 3.....</b>	<b>165</b>
<b>Anexo 4.....</b>	<b>169</b>
<b>Anexo 5.....</b>	<b>171</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>175</b>





# ÍNDICE DE TABLAS

## Introducción

**Tabla 01.** Artículos sobre eliminación de contaminantes en la rizosfera

**Tabla 02.** Propiedades fisicoquímicas de los 16 PAHs establecidos como contaminantes de eliminación prioritaria por la EPA

**Tabla 03.** Biodegradación de PAHs por microorganismos aerobios

**Tabla 04.** Genotipo de bacterias degradadoras de PAHs de bajo peso molecular

## Materiales y Métodos

**Tabla 01.** Cepas microbianas utilizadas en este trabajo

**Tabla 02.** Oligonucleótidos utilizados en la construcción de plásmidos

**Tabla 03.** Oligonucleótidos utilizados en la identificación de los genes degradativos

**Tabla 04.** Oligonucleótidos utilizados en las RT-PCR

**Tabla 05.** Plásmidos utilizados en este trabajo

**Tabla 06.** Plásmidos construidos en este trabajo

**Tabla 07.** Sondas utilizadas en las hibridaciones ADN-ADN

## Resultados

### Capítulo 1

**Tabla 01.** Muestras recogidas en Granada

**Tabla 02.** Similitud de las secuencias obtenidas a partir de las bandas de DGGE de las muestras de Granada

**Tabla 03.** Muestras recogidas en Madrid

**Tabla 04.** Similitud de las secuencias obtenidas a partir de las bandas de DGGE de las muestras de Madrid

**Tabla 05.** Muestras recogidas en Huelva

**Tabla 06.** Similitud de las secuencias obtenidas de las bandas de DGGE de las muestras de Huelva

**Tabla 07.** Bacterias degradadoras de fenantreno aisladas

**Tabla 08.** Bacterias aisladas capaces de crecer con naftaleno

**Tabla 09.** Antibiogramas de las bacterias aisladas

## **Capítulo 2**

**Tabla 01.** Adhesión a semillas de trébol

**Tabla 02.** Adhesión a raíces de trébol

**Tabla 03.** Colonización de la raíz de plantas de trébol

**Tabla 04.** Inhibición del crecimiento de hongos fitopatógenos

## **Capítulo 3**

**Tabla 01.** Oligonucleótidos diseñados para identificar los genes degradativos

**Tabla 02.** Actividad  $\beta$ -galactosidasa en la cepa *Burkholderia* sp. MS3

**Tabla 03.** Actividad  $\beta$ -galactosidasa en la cepa *Burkholderia* sp. HR3p

**Tabla 04.** Actividad  $\beta$ -galactosidasa en la cepa *Novosphingobium* sp. HS2a

**Tabla 05.** Actividad  $\beta$ -galactosidasa en el mutante PhnS<sup>-</sup> de *Burkholderia* sp. MS3

# ÍNDICE DE FIGURAS

## Introducción

**Figura 01.** Colonización de la raíz de *Lolium multiflorum* por *Pseudomonas putida* PCL1444.

**Figura 02.** Esquema simplificado de una raíz principal

**Figura 03.** Similitud estructural entre contaminantes y productos sintetizados por las plantas

**Figura 04.** Estructura química de intermediarios en las rutas de degradación de compuestos aromáticos en plantas e inductores en las rutas de degradación de contaminantes en bacterias

**Figura 05.** Estructura química de hidrocarburos aromáticos policíclicos

**Figura 06.** Origen de las emisiones a la atmósfera de PAHs en España

**Figura 07.** Oxidación de naftaleno a *cis*-naftaleno dihidrodiol por el sistema multienzimático naftaleno dioxigenasa

**Figura 08.** Esquema de la ruta de degradación de naftaleno en bacterias aerobias

**Figura 09.** Esquema de la ruta de degradación de fenantreno en bacterias aerobias

## Materiales y Métodos

**Figura 01.** Estrategia usada para la generación de mutantes por recombinación homóloga

## Resultados

### Capítulo 1

**Figura 01.** Vista aérea de la zona de muestreo en Granada

**Figura 02.** Análisis mediante DGGE de la muestras de Granada

**Figura 03.** Dendograma de similitud de las muestras recogidas en Granada

**Figura 04.** Vista aérea de la zona de muestreo en Madrid

**Figura 05.** Análisis mediante DGGE de las muestras de Madrid

**Figura 06.** Dendograma de similitud de las muestras recogidas en Madrid

**Figura 07.** Vista aérea de la zona de muestreo en Huelva

**Figura 08.** Análisis mediante DGGE de las muestras de Huelva

**Figura 09.** Dendograma de similitud de las muestras recogidas en Huelva

**Figura 10.** Aspecto del enriquecimiento tras tres días de incubación y formación de halos de solubilización por una de las bacterias aisladas (*Arthrobacter* sp. R7)

**Figura 11.** Árbol filogenético construido a partir de las secuencias de los genes ARNr 16S de las cepas aisladas

## Capítulo 2

**Figura 01.** Adhesión de las nueve cepas seleccionadas a semillas

**Figura 02.** Adhesión de las nueve cepas seleccionadas a raíces

**Figura 03.** Crecimiento de las cepas *Sphingomonas* sp. S1 y *Pseudomonas* sp. S6 en los sistemas gnotobióticos

**Figura 04.** Crecimiento de las cepas de *Sphingobium* y *Novosphingobium* en los sistemas gnotobióticos

**Figura 05.** Crecimiento de las cepas de *Burkholderia* y *P. putida* en los sistemas gnotobióticos

**Figura 06.** Adhesión competitiva frente a *Pseudomonas putida* KT2440

**Figura 07.** Inhibición del crecimiento de hongos fitopatógenos

**Figura 08.** Degradación de fenantreno en los sistemas gnotobióticos en el ensayo realizado en el mes de abril

**Figura 09.** Crecimiento de *Burkholderia* sp. MS3 en los sistemas gnotobióticos en presencia y ausencia de fenantreno en los meses de abril y noviembre

**Figura 10.** Colonización de la raíz de trébol por *Burkholderia* sp. MS3 en los sistemas gnotobióticos en presencia y ausencia de fenantreno en los meses de abril y noviembre

**Figura 11.** Tasa de germinación del trébol en los sistemas gnotobióticos en los meses de abril y noviembre

**Figura 12.** Longitud de la raíz de las plantas de trébol en los sistemas gnotobióticos en los meses de abril y noviembre

**Figura 13.** Longitud del tallo de las plantas de trébol en los sistemas gnotobióticos en los meses de abril y noviembre

**Figura 14.** Crecimiento y colonización de la raíz de trébol por *Novosphingobium* sp. HS2a en los sistemas gnotobióticos en el mes de diciembre

**Figura 15.** Tasa de germinación del trébol en los sistemas gnotobióticos en el mes de diciembre

**Figura 16.** Longitud de la raíz y el tallo de las plantas de trébol en los sistemas gnotobióticos en el mes de diciembre

### Capítulo 3

**Figura 01.** Representación esquemática de los genes *phn* en *Sphingomonas* CHY-1

**Figura 02.** Representación esquemática de los genes *bph* de *Sphingomonas aromaticivorans* F199 y *phn* de *Sphingomonas* sp. LH128

**Figura 03.** Organización de los genes *phn* en *Burkholderia* sp. RP007

**Figura 04.** Esquema de la localización de los oligonucleótidos utilizados para el análisis por PCR de la organización génica de los genes *phn* en las cepas *Burkholderia* sp. MS3 y HR3p

**Figura 05.** Patrón de restricción de los plásmidos extraídos en las cepas *Burkholderia* sp. MS3 y HR3p

**Figura 06.** RT-PCR de los genes *phn* en la cepa *Burkholderia* sp. MS3

**Figura 07.** Actividad  $\beta$ -galactosidasa de los plásmidos pMP220, pPSM, pPCM y pPRM en *Burkholderia* sp. MS3 y pMP220, pPSH, pPCH y pPRH en *Burkholderia* sp. HR3p

**Figura 08.** Actividad  $\beta$ -galactosidasa de los promotores de *Burkholderia* sp. MS3 en la cepa HR3p y de los promotores de *Burkholderia* sp. HR3p en la cepa MS3

**Figura 09.** Secuencia y representación esquemática de los dominios de las proteínas PhnR en las cepas *Burkholderia* sp. MS3 y HR3p

**Figura 10.** Análisis *in silico* de la secuencia intergénica *phnR-phnS*

**Figura 11.** Secuencia y representación esquemática de los dominios de la proteína PhnS de *Burkholderia* sp. MS3

**Figura 12.** Esquema de la construcción del mutante PhnS<sup>-</sup> en *Burkholderia* sp. MS3

**Figura 13.** Esquema de la organización de los genes *phn* y ruta de degradación de naftaleno en *Burkholderia* sp. RP007



## ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido	desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>		ADN complementario
<b>ADNr</b>	ADN	ribosómico
<b>Ant</b>		Antraceno
<b>APS</b>		Persulfato amónico
<b>ARN</b>	Ácido	ribonucleico
<b>ARNP</b>		ARN polimerasa
<b>COPs</b>		Compuestos orgánicos persistentes
<b>CTAB</b>		Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
<b>DEPC</b>		Dietilpirocarbonato
<b>DGGE</b> gradient		Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (del inglés, "Denaturing gel electroforesis")
<b>dNTPs</b>		Desoxinucleótidos trifosfato
<b>D.O.</b>	Densidad	óptica
<b>EDTA</b>		Tetra-acetato de etilendiamina
<b>EPA</b> Environmental		Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (del inglés, "United States Protection Agency")
<b>E-PRTR</b>		Registro Europeo de Emisiones y Transferencias de Contaminantes (del inglés, "The European Pollutant Release and Transfer Register")
<b>H<sub>2</sub>O-DEPC</b>		Agua tratada con DEPC
<b>HPLC</b>		Cromatografía líquida de alta resolución (del inglés, "High-Performance Liquid Chromatography")
<b>HTH</b>		Motivo hélice-giro-hélice (del inglés, "Helix-Turn-Helix")
<b>IARC</b> Agency		Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (del inglés, "International for Research on Cancer")
<b>IHF</b>		Factor de integración del hospedador (del inglés, "Integration Host Factor")
<b>ISP</b>		Proteína sulfoférrica (del inglés, "Iron Sulfur Protein")
<b>ISR</b>		Resistencia sistémica inducida (del inglés, "Induced Systemic Resistance")
<b>IVET</b>		Tecnología de expresión <i>in vivo</i> (del inglés, "In Vitro Expression Technology")
<b>Kb</b>		Kilobase(s)
<b>LB</b>		Medio de cultivo Luria Bertani
<b>Nah</b>		Naftaleno
<b>ONPG</b>		<i>o</i> -Nitrofenilgalactopiranósido



<b>PAHs</b> Hydrocarbons	Hidrocarburos aromáticos policíclicos (del inglés, "Polycyclic Aromatic")
<b>pb</b>	Par(es) de base(s)
<b>PCBs</b>	Bifenilos policlorados (del inglés, "Polychlorinated Bifenils")
<b>PCR</b> (del	Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa termorresistente inglés "Polymerase Chain Reaction")
<b>PDA</b>	Medio de cultivo patata dextrosa agar
<b>PDB</b>	Medio de cultivo patata dextrosa
<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>PGPR</b> Promoting	Rizobacteria promotora del crecimiento vegetal (del inglés, "Plant Growth Rhizobacteria")
<b>Phn</b>	Fenantreno
<b>PRTR-España</b>	Registro Estatal de Emisiones y Fuentes Contaminantes – España (del inglés, "The Pollutant Release and Transfer Register")
<b>p/v</b>	Peso/volumen
<b>RBS</b>	Sitio de unión represor (del inglés, "Repression Binding Site")
<b>RT-PCR</b> Transcription	Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa termorresistente acoplada a una reacción de transcripción reversa (del inglés, "Reverse Polymerase Chain Reaction")
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>TCA</b>	Ciclo de los ácidos tricarbóxicos (del inglés, "Tricarboxylic Acid Cycle")
<b>TEMED</b>	Tetrametiletilendiamina
<b>TGGE</b> Gradient	Electroforesis en gel con gradiente de temperatura (del inglés, "Temperature Gel Electrophoresis")
<b>UAS</b>	Secuencia activadora aguas arriba (del inglés "Upstream Activating Sequences")
<b>UFC</b>	Unidad(es) formadora(s) de colonia(s)
<b>UNEP</b> Nations	Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (del inglés, "United Environment Programme")
<b>U.M.</b>	Unidades Miller
<b>UPGMA</b> Method	Método del promedio aritmético no ponderado (del inglés "Unweighted Pair Group with Arithmetic Mean")
<b>v/v</b>	Volumen/volumen
<b>WHO</b>	Organización Mundial de la Salud (del inglés, "World Health Organization")
<b>X-gal</b>	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido

## **INTRODUCCIÓN**



## 1. PROBLEMÁTICA AMBIENTAL

La vida en la Tierra depende del funcionamiento adecuado de los ciclos biogeoquímicos de los elementos (carbono, nitrógeno, azufre, etc.), pero el aumento de actividad antropogénica ha generado y liberado al medio ambiente una gran cantidad de compuestos químicos que han desajustado el equilibrio de estos ciclos, provocando cambios importantes en la Biosfera. Aunque los cambios más estudiados y publicitados en la actualidad son los climáticos producidos por la liberación de CO<sub>2</sub>, no podemos olvidar los efectos dañinos que la liberación de otros compuestos químicos tóxicos ejerce sobre la Flora, la Fauna y la Biodiversidad en general. La contaminación surge cuando se incorpora al medio ambiente un compuesto que al exceder los niveles tolerables causa directa o indirectamente una inestabilidad, desorden o daño en un ecosistema, en el medio físico o en los seres vivos. Como contaminante se entiende toda sustancia orgánica o inorgánica, natural o sintética que se incorpora al medio causando pérdida de las condiciones normales del medio.

Existen contaminantes ambientales considerados como tales debido a su alta toxicidad aunque sean poco persistentes en el ambiente (por ejemplo los organofosforados) y otros que tienen una toxicidad menos elevada pero que son muy persistentes, es decir tienen una vida media en el medio ambiente muy larga ya que son poco biodegradables. Un ejemplo de contaminantes poco biodegradables son los denominados compuestos orgánicos persistentes (COPs) entre los que se incluyen dioxinas, furanos, bifenilos policlorados (PCBs) e hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs, del inglés "Polycyclic aromatic hydrocarbons"). Todos estos compuestos se caracterizan por ser muy estables químicamente permaneciendo en los ecosistemas durante años.

Las dioxinas y furanos se producen de forma secundaria en el proceso de fabricación de algunos pesticidas, conservantes, desinfectantes y también en la combustión a bajas temperaturas de gasolina con plomo, plástico, papel o madera. Existen varios cientos de estos compuestos que en su mayoría son ligeramente o nada tóxicos. Sin embargo una docena de ellos se encuentran entre las sustancias más tóxicas que se conocen (WHO, IARC; 1997).

Los PCBs constituyen un grupo de unos 200 compuestos químicos sintetizados por el hombre. Debido a su gran estabilidad térmica, así como por su elevada constante dieléctrica, los PCBs se usaron masivamente hasta mediados de la década de 1970 como aislantes para equipos eléctricos. Estos compuestos están considerados según el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente

como uno de los doce contaminantes más nocivos fabricados por el ser humano (UNEP, 1997). Actualmente su uso está prohibido en casi todo el mundo.

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) son generados en actividades dependientes de la industria petroquímica, de la utilización masiva de combustibles de calefacción y automóviles y del aumento en el número de incendios forestales provocados por el hombre. Su toxicidad depende de su estructura química y algunos de ellos están incluidos en las listas de diversas Agencias Medioambientales como contaminantes de eliminación prioritaria (Keith y Telliard, 1979). En general, la contaminación por PAHs se caracteriza por presentarse en zonas muy extensas con unos niveles de contaminación intermedios, en donde se encuentran mezclas complejas de los mismos.

## 2. REMEDIACIÓN DE ZONAS CONTAMINADAS

Debido al aumento de la concentración de contaminantes en distintos ecosistemas y a la concienciación ciudadana, en los últimos años se ha procedido a la descontaminación de diferentes áreas, y para ello se han desarrollado diferentes técnicas de remediación. Centrándonos en la remediación de suelos, entre las técnicas fisicoquímicas más empleadas se encuentran la extracción por vacío, el lavado del suelo con agua, la incineración y la recuperación electrocinética, entre otras (Clark, 1995). Con algunas de estas técnicas se han conseguido resultados muy positivos, sin embargo su elevado coste constituye un problema a tener en cuenta en su empleo, sobre todo cuando el área a tratar es grande y presenta niveles intermedios de contaminación (Cunningham y Ow, 1996). De aquí la necesidad de buscar alternativas económicamente viables. Surge así la biorremediación, que consiste en hacer uso de los microorganismos, plantas o las enzimas derivadas de estos para retornar un medio ambiente alterado a su condición natural.

Entre los tratamientos de biorremediación se incluyen: la bioestimulación, el bioaumentación, el tratamiento en tierra o "landfarming", el compostaje y la fitorremediación. La bioestimulación consiste en la estimulación del crecimiento de las poblaciones microbianas indígenas de un suelo mediante la adición de nutrientes, la regulación de las condiciones redox, el cambio de pH, etc. Este tratamiento es técnico y económicamente costoso y a veces ineficaz (Collera, 1997). El bioaumentación, consistente en la inoculación en el suelo de microorganismos capaces de degradar el contaminante a tratar. A pesar de la gran cantidad de publicaciones que documentan el aislamiento de microorganismos capaces de degradar una amplia variedad de contaminantes (Cerniglia, 1993; Urbance *et al.*, 2003; Parales y Haddock, 2004), la

mayoría de los intentos de reintroducirlos en los suelos a remediar han sido fallidos (Goldstein *et al.*, 1985). Probablemente este resultado se deba al desconocimiento del comportamiento de estos organismos en el medio ambiente. Varios autores (Goldstein *et al.*, 1985; van Veen *et al.*, 1997; Head, 1998) han puesto de manifiesto que factores como el tipo de suelo y su estructura, la temperatura, la escasez de nutrientes, así como la falta de competitividad de los microorganismos introducidos frente a la microflora autóctona influyen en el resultado final del tratamiento. La técnica de “landfarming” se basa en aumentar la oxidación biológica de los contaminantes del suelo por medio de la microbiota natural mediante la adición de fertilizantes, arado y riego. El principal riesgo de este tratamiento es que se puede causar la movilización superficial o subterránea del contaminante. El compostaje es una técnica económicamente viable y exitosa en la mayoría de los casos; consiste en la estimulación de la actividad biodegradadora de las poblaciones microbianas presentes en un suelo contaminado, mediante la adición de compost diseñado “a medida” según las características y requerimientos de cada suelo a tratar y enriquecido en poblaciones microbianas degradadoras de los contaminantes presentes en dicho suelo. Pero en esta técnica, al ser también una “caja negra” desde el punto de vista biológico, hay muchos parámetros que no son controlados y en ocasiones el proceso no funciona bien desconociéndose los motivos de esta falta de eficiencia. Por último, la fitorremediación ha sido definida como el uso de plantas y sus microorganismos asociados para extraer, secuestrar, detoxificar o degradar contaminantes. Una de las técnicas englobadas dentro de la fitorremediación, la fitorrizorremediación (ó rizzorremediación) es el ámbito de trabajo de esta Tesis Doctoral y por tanto, la fitorremediación y rizzorremediación se tratarán más en detalle en el siguiente apartado.

## 2.1. Fitorremediación

La fitorremediación agrupa una serie de procesos que realizan las plantas por sí mismas o en combinación con microorganismos para recuperar las áreas contaminadas y que se enumeran a continuación:

- *Fitoestabilización*: implica el uso de las plantas para inmovilizar los contaminantes presentes en el suelo. La estabilización se puede dar tanto por absorción, acumulación o precipitación en las raíces, y/o por la adsorción en las superficies de estas.
- *Fitovolatilización*: es la captación y transpiración de un contaminante por parte de la planta con su posterior liberación a la atmósfera.

- *Fitoacumulación o fitoextracción*: consistente en el uso de las plantas para eliminar un contaminante a través de su acumulación en los tejidos cosechables. Esta técnica es una de las más utilizadas en la eliminación de metales pesados, ya que éstos no son degradables.
- *Fitorremediación*: consiste en la transformación del contaminante mediante el metabolismo de la planta. El principal problema de esta técnica es que la mayoría de los contaminantes en general, se activan mediante citocromo P<sub>450</sub> monooxigenasas y posteriormente se conjugan con grupos glutatión, glucosílicos o malonilo, pero no se mineralizan.
- *Rizorremediación*: implica la eliminación del contaminante como resultado de la actividad microbiana asociada a la rizosfera de la planta.

La fitorremediación es una solución innovadora y prometedora, sobre todo en el caso de que el área a remediar sea extensa y tenga un nivel de contaminación medio o bajo. Al ser una técnica *in situ* presenta las ventajas de ser respetuosa con el medio ambiente y de no destruir la estructura del suelo (Kuiper *et al.*, 2004a). Para las empresas contaminantes presenta las ventajas de poder utilizar una serie de técnicas agronómicas ya optimizadas que abaratarían el coste de este tratamiento y de que es visualmente atractiva lo que favorecería la imagen pública de la empresa.

Sin embargo, esta estrategia no está exenta de problemas. El primero es que la toxicidad de los contaminantes afecta obviamente al crecimiento y desarrollo de las plantas (van Dillewijn, 2008). Otros inconvenientes, son la posible transformación del contaminante en un intermediario más tóxico (Trenck y Sandermann, 1980; Hughes *et al.*, 1997) o la movilización de los tóxicos a las partes aéreas de las plantas desde donde pueden entrar a formar parte de la cadena trófica más fácilmente.

*A priori*, la utilización de un sólo organismo en el proceso de biorremediación parece la estrategia óptima a seguir por su relativa sencillez. Sin embargo, como se ha señalado anteriormente, la utilización de microorganismos se encuentra con problemas como son la lentitud de los procesos o los gastos económicos y dificultades técnicas que conllevan el bioaumentación o la bioestimulación. Si el organismo a utilizar es una planta, el proceso es más sencillo de monitorizar y controlar, sin embargo las capacidades degradativas de las plantas son mucho más limitadas que las que poseen los microorganismos. Para intentar mejorar estas capacidades vegetales, se han construido plantas transgénicas mediante introducción de genes eucariotas, como los que codifican citocromo P<sub>450</sub> monooxigenasas (Doty *et al.*, 2000), glutatión S-transferasas (Karavangeli *et al.*, 2005) y metalotioneinas (Misra y Gedamu, 1989), y también de genes bacterianos como los codificantes de pentaeritritol tetranitrato

reductasa (French *et al.*, 1999), reductasas de mercurio iónico o liasas organomercuriales (Doty, 2008; van Aken, 2008). Estas plantas representan una buena alternativa en la fitorremediación. Sin embargo hoy en día la liberación al medio ambiente de organismos genéticamente modificados tiene restricciones legales en muchos países.

Por todo esto, la utilización de una combinación planta-microorganismo es una de las estrategias más prometedoras para la eliminación de contaminantes: los microorganismos aportan la versatilidad catabólica de la que carecen las plantas, y las plantas proporcionan los nutrientes y en algunos casos inductores para la actividad de los microorganismos.

## 2.2. Rizorremediación

En la estrategia de rizorremediación los dos organismos implicados obtienen una serie de ventajas. Las bacterias pueden usar los exudados radiculares como fuente de alimento, mientras que las plantas pueden aprovecharse de las capacidades degradativas de los microorganismos para tener un ambiente cercano sin contaminantes. Uno de los artículos clásicos en el campo de la rizorremediación natural es el publicado por Radwan y colaboradores (1995). Estos autores observaron que las raíces de las plantas que estaban creciendo en zonas del desierto de Kuwait contaminadas por petróleo durante la Guerra del Golfo estaban limpias de manchas negras, mientras que la zona de tallo cercana a la arena estaba llena de restos de petróleo. Estos autores demostraron que esto se debió a la eliminación de los compuestos del petróleo por los microorganismos que crecían en la cercanía de la raíz. Desde entonces se han publicado gran cantidad de trabajos enfocados en la rizorremediación (algunos de ellos se indican en la Tabla 01), aunque la mayoría de ellos se han realizado en condiciones de laboratorio y muy pocos describen la eliminación del contaminante en un “escenario real”. Los primeros estudios se enfocaron en la degradación de herbicidas y pesticidas (Hoagland *et al.*, 1994; Jacobsen, 1997; Zablutowicz *et al.*, 1994) y en ellos se sugiere que las plantas están protegidas frente a estos compuestos debido a las bacterias degradativas. En otros trabajos se describe la eliminación de otros compuestos tóxicos como tricloroetileno (Walton y Anderson, 1990), PAHs (Radwan *et al.*, 1995) y PCBs (Brazil *et al.*, 1995).

**Tabla 01. Artículos sobre eliminación de contaminantes en la rizosfera**

Planta	Contaminante	Microorganismo	Referencia
Arroz (cv. Supriya)	Paration	No identificado	Reddy y Sethunathan, 1983



Planta	Contaminante	Microorganismo	Referencia
Mezcla de gramíneas, leguminosas, hierbas y pino	TCE	No identificado	Walton y Anderson, 1990
Gramíneas de praderas	PAHs	No identificado	Aprill y Sims, 1990
Gramíneas de praderas	PAHs	No identificado	Qiu <i>et al.</i> , 1994
Gramíneas y alfalfa	Pireno Antraceno Fenantreno	No identificado	Schwab <i>et al.</i> , 1995
Caña de azúcar (cv. Rex)	PCBs	<i>P. fluorescens</i>	Brazil <i>et al.</i> , 1995
Compuestas y <i>Senecus glaucus</i>	Petróleo	<i>Arthrobacter / Penicillium</i>	Radwan <i>et al.</i> , 1995
Cebada ( <i>Hordeum vulgare</i> )	2,4-D	<i>Burkholderia cepacia</i>	Jacobsen, 1997
Alfalfa y poa alpina	Hexadecano PAHs	No identificado	Nichols <i>et al.</i> , 1997
Trigo ( <i>Triticum aestivum</i> )	2,4-D	<i>Pseudomonas putida</i>	Kingsley <i>et al.</i> , 1994
Álamo ( <i>Populus deltoides nigra</i> )	1,4-dioxano	<i>Actinomycetes</i>	Schnoor <i>et al.</i> , 1998
Trigo	TCE	<i>P. fluorescens</i>	Yee <i>et al.</i> , 1998
Avena, altramuz, colza, eneldo, pimiento, rábano, pino	Pireno	No identificado	Liste y Alexander, 2000
Extracto de raíces de álamo	1,4-dioxano	<i>Actinomycete amycolata</i> sp. CB1190	Kelley <i>et al.</i> , 2001
Maiz ( <i>Zea mays</i> )	3-metilbenzoato	<i>Pseudomonas putida</i>	Ronchel <i>et al.</i> , 2001
Astrágalo ( <i>Astragalus sinicus</i> )	Cd <sup>+</sup>	<i>Mesorhizobium huakuii</i>	Sriprang <i>et al.</i> , 2002
Helecho ( <i>Azolla pinnata</i> )	Gasóleo	No identificado	Cohen <i>et al.</i> , 2002

<sup>a</sup>TCE: tricloroetileno, PAHs: hidrocarburos aromáticos policíclicos, PCBs: bifenilos poli clorados y 2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético. *Obtenido de Kuiper et al., 2004a.*

### 2.3. Selección del mejor par planta-bacteria para biorremediación

La composición de la comunidad bacteriana rizosférica está determinada por factores como la composición de los exudados, la especie y edad de la planta (Shann y Boyle, 1994), el tipo de raíz, así como el tipo de suelo y su historia (Anderson *et al.*, 1993). Para que una estrategia de rizorremediación sea exitosa hay que tener en cuenta todos estos factores, así como otros propios de la bacteria remediadora. Es muy importante que la bacteria sea capaz de establecerse en la rizosfera junto con la microbiota autóctona y que colonice eficientemente las raíces. Kuiper y colaboradores (2001) diseñaron un procedimiento novedoso para seleccionar la mejor combinación

planta-bacteria para llevar a cabo la biorremediación de un suelo contaminado con naftaleno. En primer lugar, se llevó a cabo el aislamiento de rizobacterias de una zona contaminada con PAHs siguiendo una estrategia de doble enriquecimiento en el que se seleccionaron bacterias con capacidades degradativas y de utilización de los exudados radiculares. En segundo lugar, se seleccionó como planta modelo la especie *Lolium multiflorum* (cultivar Balmultra) ya que su sistema radicular es muy ramificado y puede albergar grandes poblaciones de bacterias. Finalmente, en ensayos de biorremediación se comprobó que una de las cepas, *Pseudomonas putida* PCL1444, era capaz de degradar naftaleno asociada a la rizosfera de la planta modelo protegiéndola del efecto tóxico de este compuesto. (Kuiper *et al.*, 2001).



**Figura 01. Colonización de la raíz de *Lolium multiflorum* por *Pseudomonas putida* PCL1444.** Las células de la bacteria aparecen marcadas con la proteína fluorescente roja. Obtenido de Kuiper *et al.*, 2004a.

Siguiendo esta estrategia de doble enriquecimiento, donde se selecciona tanto la capacidad degradativa como la capacidad de interactuar con las plantas, Böltner y colaboradores (2008) aislaron cepas de *Sphingomonas* que degradaban lindano, un pesticida usado frecuentemente, y que eran capaces de establecerse en la rizosfera. En ensayos en invernadero se comprobó que estas cepas eliminaban hasta un 30% del lindano presente en el suelo en un periodo de tres meses.

En estas estrategias de selección de bacterias útiles para la remediación, se pueden buscar también bacterias que posean otras propiedades interesantes. Uno de los problemas más comunes en la biorremediación de suelos es la baja biodisponibilidad del contaminante. Muchos de los contaminantes orgánicos, como por ejemplo los PAHs, son compuestos muy hidrofóbicos de forma que son poco solubles en agua y tienden a complejarse con las partículas del suelo lo que hace que la biodisponibilidad sea muy baja y que disminuya la eficiencia de la biodegradación. Algunas bacterias poseen diferentes mecanismos, como son la secreción de biosurfactantes, la producción de polímeros extracelulares o la formación de biopelículas sobre los cristales de los PAHs, gracias a los cuales son capaces de contrarrestar esta baja disponibilidad (Kuiper *et al.*, 2004b; Wick *et al.*, 2001 y 2002).

Los biosurfactantes son moléculas anfipáticas, que forman micelas cuando su concentración supera la concentración micelar crítica, que es característica de cada compuesto. Los contaminantes hidrofóbicos pueden ser solubilizados en el interior de estas micelas incrementando su transferencia de fase sólida a fase líquida haciéndolos más accesibles para las bacterias. Un grupo importante de biosurfactantes son los glicolípidos, y en particular los rhamnolípidos. Se ha demostrado que estos compuestos son capaces de mejorar las tasas de biodegradación de contaminantes (Zhang y Miller, 1994; Providenti *et al.*, 1995; Shreve *et al.*, 1995; García-Junco *et al.*, 2001 y 2003; Mulligan, 2005; Cui *et al.*, 2008). Por eso, otra estrategia de selección de bacterias para biorremediación que fue seguida por Kuiper y colaboradores (2004a) fue el aislamiento de cepas rizosféricas que producen biosurfactantes. Así, aislaron una cepa de *Pseudomonas putida* de la rizosfera de plantas creciendo en un ambiente contaminado con PAHs que produce dos lipopéptidos, denominados putisolvinas, que aumentan la formación de emulsiones de tolueno. Además, la quimiotaxis es otro factor que puede mejorar la disponibilidad de los PAHs, de forma que la capacidad de las bacterias para moverse en función de gradientes químicos en el suelo puede aumentar las tasas de transferencia de masa mejorando el proceso de biodegradación (Ortega-Calvo *et al.*, 2003).

Otra posible estrategia en biorremediación, es la utilización de microorganismos modificados genéticamente. Existen numerosos estudios en los que la introducción de genes catabólicos, la construcción de "rutas híbridas" y las modificaciones en determinados promotores para incrementar la expresión de los genes de interés se ha utilizado en el contexto de la biorremediación (Ramos *et al.*, 1994). Pero estas modificaciones genéticas en caminadas a la incorporación de una nueva actividad no son las únicas interesantes, sino que también se han construido microorganismos con capacidad remediadora que en ausencia del contaminante no eran capaces de sobrevivir en el medio ambiente (Molina *et al.*, 1998). De esta forma, una vez que el microorganismo ha ejercido su función rizorremediadora no sobreviviría en el suelo. No obstante, la construcción de bacterias que combinan varias características, como la degradación de contaminantes junto con la producción de biosurfactantes o con una buena capacidad colonizadora o promotora del crecimiento vegetal, está aún pendiente. Además, la utilización de microorganismos modificados genéticamente presenta las mismas restricciones, o más, que las de las plantas transgénicas.

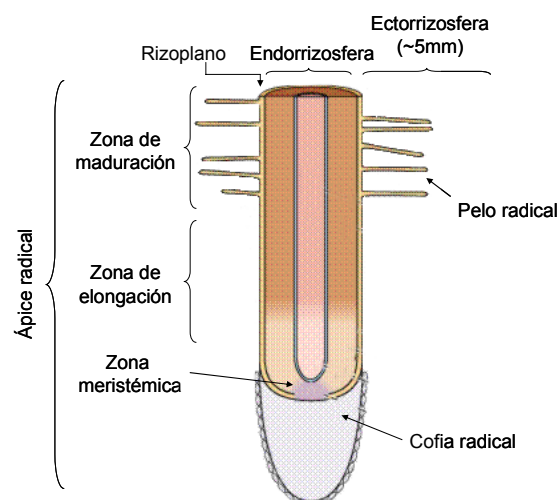
Una observación interesante en el campo de la biorremediación proviene de los experimentos de Barac y colaboradores (2004) en los que se mejoró la capacidad biorremediadora de la cepa *Burkholderia cepacia* L.S.2.4., un colonizador habitual de

altramuz, mediante la transferencia por conjugación del plásmido pTOM (que contiene la ruta de degradación de tolueno). Aunque esta cepa recombinante no era capaz de mantenerse en la rizosfera, el operón *tom* (tolueno monooxigenasa) se transfirió horizontalmente a distintos miembros de la comunidad endófito de la planta (Taghavi *et al.*, 2005) que eran ahora capaces de eliminar el contaminante y de persistir en el ambiente de la planta.

Existen también estudios dedicados a determinar cuáles son las especies de plantas más adecuadas para la rizorremediación y que han demostrado que las gramíneas y leguminosas son muy adecuadas para este proceso (Kuijper *et al.*, 2001; Qiu *et al.*, 1994; Shann y Boyle, 1994). Esto probablemente se debe a que estas plantas poseen un sistema radicular muy ramificado en el que pueden albergar gran cantidad de bacterias.

### 3. LA RIZOSFERA

El término rizosfera fue definido por primera vez en 1904 por el fisiólogo vegetal Lorenz Hiltner (Hiltner, 1904) como la zona inmediatamente adyacente a las raíces que soporta altos niveles de actividad microbiana. Actualmente, el término se ha redefinido como el volumen de suelo que se encuentra bajo la influencia física y biológica de la raíz, y que incluye los tejidos radiculares colonizados por los microorganismos. La extensión física de la rizosfera es difícil de definir pero generalmente se considera que abarca unos pocos milímetros desde la superficie de la raíz (Hawkes *et al.*, 2007; Darrah y Rose, 2007) y se puede dividir en endorrizosfera (endodermis y zona cortical de la raíz), rizoplasma (superficie radicular incluyendo las partículas de suelo fuertemente adheridas) y ectorrizosfera (suelo inmediatamente adyacente a la raíz) (Morgan *et al.*, 2005).



**Figura 02. Esquema simplificado de una raíz principal.** Se muestran las regiones apicales, así como las subdivisiones de la rizosfera. *Adaptado de Purves et al., 1994.*

La rizosfera está sometida a grandes fluctuaciones, algunas de ellas diarias, en el contenido de agua, oxígeno y nutrientes. El contenido de agua del suelo incrementa a lo largo de la noche y sufre disminuciones bruscas durante el día debido a la transpiración de la planta (Ishikawa y Bledsoe, 2000). La tasa de consumo de oxígeno es muy elevada como resultado de la respiración radicular y microbiana (Højberg y Sorensen, 1993). A su vez, la difusión en el suelo es directamente proporcional a la porosidad del mismo e inversamente proporcional a su contenido en agua, pudiéndose generar condiciones de baja concentración o incluso anaerobiosis (Højberg *et al.*, 1999; Hawkes *et al.*, 2007). Por último el pH de la rizosfera es muy variable pudiendo presentar cambios de hasta dos unidades con respecto al suelo rizosférico (Schaller, 1987). Estas variaciones de pH se deben principalmente a la secreción de ácidos orgánicos, extrusión de  $H^+$  y/o  $OH^-$ , respiración y procesos de óxido-reducción llevados a cabo por las raíces y los microorganismos asociados (Hinsinger *et al.*, 2003).

La rizosfera es una región con alto contenido en nutrientes. Se estima que entre el 30-60% del carbono fijado en la fotosíntesis puede ser transportado a la raíz, y que entre el 40-90% de éste se pierde en forma de exudados radiculares o por la respiración radicular (Lynch y Whipps, 1990; Uren, 2007). Los exudados radiculares son ricos en nutrientes como azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos y vitaminas. También contienen otros productos como etileno,  $CO_2$ , iones bicarbonato, enzimas, mucílagos, sideróforos y metabolitos secundarios (Uren, 2007).

### 3.1. Exudados radiculares y efecto rizosférico

La exudación radicular no se distribuye homogéneamente a lo largo de la raíz, sino que es máxima en la esfermosfera (región que rodea a la semilla) y en las zonas más jóvenes de la raíz como son el ápice y las zonas de emergencia de raíces primarias y secundarias (Dandurand *et al.*, 1997; Prikryl y Vancura, 1980; Gransee y Wittenmayer, 2000; Walker *et al.*, 2003; Neumann y Römheld, 2007; Uren, 2007). Además los pelos radicales, que pueden constituir hasta el 77% de la superficie total de la raíz (Parker *et al.*, 2000), presentan también una exudación considerable.

Se ha descrito que en la rizosfera hay más microorganismos y además éstos son más activos metabólicamente que en suelos no vegetados (Campbell y Greaves, 1990; Ramos *et al.*, 2000a, b; Kent y Triplett, 2002), éste es el denominado "efecto rizosférico". Al ser la rizosfera un ambiente rico en nutrientes debido a la exudación radicular, estos compuestos pueden ser utilizados por los microorganismos como fuentes de carbono, nitrógeno, azufre o fósforo y así alcanzar altas densidades celulares en la cercanía de las raíces (Rovira, 1965; Merckx *et al.*, 1986; Smalla *et al.*,

2001; Walker *et al.*, 2003a; Morgan *et al.*, 2005). Se puede llegar a densidades poblacionales de  $10^{10}$  bacterias por gramo de suelo (Foster, 1988; Cavaglieri *et al.*, 2009), esto es, de 2 a 3 órdenes de magnitud mayor que en suelo no rizosférico (Vancura, 1980; Molina *et al.*, 2000). Además las raíces proporcionan una superficie sobre la cual los microorganismos pueden proliferar, constituyen un excelente sistema de transporte, y facilitan el intercambio de oxígeno.

En la actualidad existen discrepancias en cuanto al grado de participación que tienen el suelo y la planta en la conformación de la estructura de la comunidad microbiana en la rizosfera. Algunos estudios indican que la planta ejerce la principal fuerza selectiva modificando la estructura y diversidad microbiana en función de la especie y el genotipo (Grayston y Campbell, 1996; Smalla *et al.*, 2001; Kowalchuk *et al.*, 2002; Andreote *et al.*, 2009; Micallef *et al.*, 2009), del estado nutricional (Yang y Crowley, 2000) y del desarrollo (Cavaglieri, 2009; Houlden, 2008), de las características de la raíz (Yang y Crowley, 2000; van Diepeningen *et al.*, 2005) y de la infección por bacterias patógenas (Yang *et al.*, 2001; Fillion *et al.*, 2004). Incluso se han descrito casos en los que las plantas son capaces de seleccionar determinados genotipos bacterianos que le son beneficiosos en un ambiente determinado (Siciliano *et al.*, 2001). Otros autores resaltan la influencia de la población bacteriana existente en el suelo en cuanto a la conformación de la comunidad microbiana asociada a la raíz (Buyer *et al.*, 2002; de Ridder-Duine, 2005; Fierer y Jackson, 2006). Integrando toda esta información, otros autores señalan que la estructura de la comunidad rizosférica sería el resultado de las complejas interacciones que existen entre la planta, las propiedades físicas del suelo, y la comunidad microbiana presente (Marschner *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2006).

En el contexto de la biorremediación las plantas pueden mejorar las propiedades físicas y químicas del suelo y facilitar el contacto entre los microorganismos asociados a la raíz y el contaminante (Aprill y Sims, 1990; Kingsley *et al.*, 1994; Nichols *et al.*, 1997; Schwab *et al.*, 1995). También se han descrito casos en los que los exudados de las plantas son capaces de solubilizar el contaminante haciéndolo más accesible a la degradación bacteriana o de activar las rutas de degradación del contaminante de los microorganismos (Miya y Firestone, 2001; Kamath *et al.*, 2004).

### 3.2. Beneficios de la asociación planta-bacteria para la planta

El efecto rizosférico se refiere a los beneficios que a un microorganismo le reporta su proximidad a la rizosfera, pero también es cierto que los microorganismos

ejercen ciertos efectos beneficiosos sobre la planta. La capacidad de algunos microorganismos rizosféricos para promover el crecimiento de las plantas es bien conocida. Estas bacterias se denominan rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), y los mecanismos por los cuales ejercen su acción pueden ser directos o indirectos. Entre los mecanismos directos se encuentran la biofertilización y la producción de compuestos fitoestimuladores; y entre los indirectos la actividad biocontrol, y la biorremediación.

La biofertilización consiste en el aporte de nutrientes a la planta por parte de las bacterias. Así, las bacterias pertenecientes a los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* forman nódulos en las raíces de leguminosas en los que convierten el nitrógeno atmosférico en amoníaco que puede ser utilizado por la planta. Otros géneros bacterianos capaces de fijar nitrógeno atmosférico son *Azospirillum* (Holguin y Basahn, 1996), *Pseudomonas* (Desnoues *et al.*, 2003) y *Burkholderia* (Tran Van *et al.*, 2000). Por otro lado, bajas concentraciones de fosfato soluble puede limitar el crecimiento de las plantas. Existen bacterias capaces de solubilizar el fósforo inmovilizado tanto en compuestos orgánicos como en inorgánicos. Algunas de estas bacterias se incluyen en los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* o *Xanthomonas* (Rodríguez y Fraga, 1999; Somers *et al.*, 2004; Rosas *et al.*, 2006).

La otra forma directa de promover el crecimiento vegetal es mediante la producción de compuestos fitoestimuladores. Algunas bacterias son capaces de sintetizar ciertas sustancias reguladoras del crecimiento, como giberelinas, citoquininas y auxinas (Vessey, 2003; Preston, 2004) que estimulan la densidad y longitud de los pelos radicales, aumentando así la cantidad de raíces en las plantas e incrementando a su vez la capacidad de absorción de agua y nutrientes.

La actividad de biocontrol es un mecanismo indirecto de promoción vegetal y consiste en la inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos. La competición por micronutrientes, en particular el hierro, es un mecanismo de biocontrol. La síntesis de sideróforos, moléculas capaces de quelar este metal, se produce en condiciones de escasez de hierro y permite a las bacterias la adquisición de este nutriente (Miethke y Marahiel, 2007), disminuyendo su disponibilidad para los organismos patógenos. Además de la síntesis de sideróforos, la producción de otros metabolitos secundarios con propiedades antimicrobianas o antifúngicas tiene importancia en los mecanismos de biocontrol. Estos mecanismos ejercen un efecto directo de biocontrol, pero también es bien conocido que algunas PGPR pueden proteger a las plantas frente al ataque de patógenos induciendo los mecanismos de resistencia sistémica de la planta (ISR) (Handelsman y Stabb, 1996; Sticher *et al.*, 1997; Bender *et al.*, 1999; Lugtenberg *et al.*, 2002; Haas y Défago, 2005; Morgan *et*

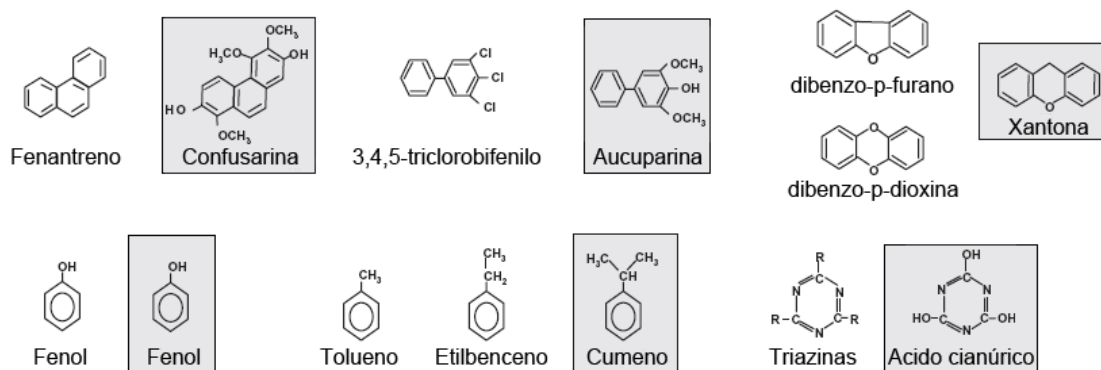
al., 2005; Tian *et al.*, 2007). En este caso la reducción de la enfermedad se debe a una disminución en la colonización y crecimiento del patógeno en los tejidos de la planta (van Loon y Bakker, 2005) causada por la activación de las defensas de las plantas por parte de la rizobacteria.

Por último, otra forma indirecta de promover el crecimiento vegetal es la rizorremediación. En este caso, la planta se beneficia de las capacidades metabólicas de los microorganismos que al degradar los contaminantes, libera a la planta del efecto tóxico de estos compuestos.

### 3.3. Expresión de genes catabólicos en la rizosfera

Se han descrito numerosas bacterias rizosféricas con capacidades degradativas para un amplio rango de contaminantes (Daane *et al.*, 2001, Kuiper *et al.*, 2001; Jussila *et al.*, 2006). Sin embargo para que la estrategia de rizorremediación sea efectiva, no sólo es necesario que las bacterias posean las rutas de degradativas sino que es imprescindible que éstas sean capaces de mantenerse en la rizosfera y que además en estas condiciones expresen los genes catabólicos.

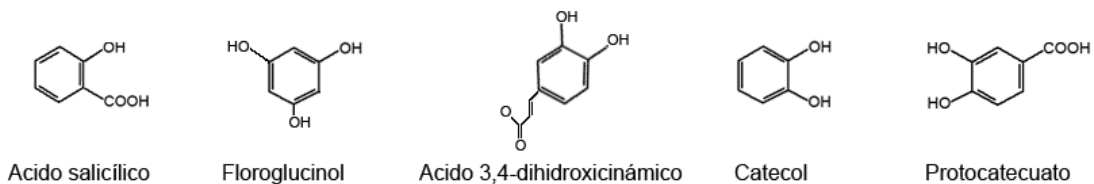
En los exudados radiculares se han detectado compuestos aromáticos cuya estructura química es similar a la de algunos contaminantes, y que podrían actuar como inductores en las rutas de degradación (Figura 03) (Singer *et al.*, 2003). Se ha demostrado que la L-carvona, un compuesto excretado en los exudados de la planta de la menta, actúa como inductor de la ruta de degradación de PCBs en la cepa *Arthrobacter* sp. B1B (Gilbert y Crowley, 1997). Además otros metabolitos secundarios de las plantas, como p-cimeno, limoneno o isopreno también son capaces de inducir esta ruta en *Arthrobacter*.



**Figura 03. Similitud estructural entre contaminantes y productos sintetizados por las plantas.** En gris se muestran los productos sintetizados por las plantas. *Adaptado de Segura et al., 2009.*



Aunque no está claro el papel de los flavonoides en la inducción de la degradación de contaminantes, se ha demostrado que algunas cepas degradadoras de contaminantes pueden crecer utilizándolos como fuente de carbono. Algunas de estas cepas son *Ralstonia eutropha* H850, que es capaz de utilizar hasta 11 flavonoides diferentes; *Burkholderia cepacia* LB400, que utiliza maclurina y miricetina y *Corynebacterium* sp. MB1 capaz de crecer con naringina, catequina, y miricetina (Donnelly *et al.*, 1994). En la degradación de estos flavonoides por parte de las rizobacterias, se producen intermediarios como el resorcinol, floroglucinol, ácido fenilacético, ácidos cinámicos sustituidos y protocatecuato (Figura 04) (Pillai y Swarup, 2002; Shaw *et al.*, 2006). Estos compuestos podrían ser degradados a través de la ruta del  $\beta$ -cetoadipato (Parke *et al.*, 2000) que es común en el catabolismo de muchos compuestos aromáticos. El protocatecuato, además, es un intermediario en la degradación de PAHs en muchos microorganismos (Kim *et al.*, 2008). El salicilato, que induce el sistema de resistencia adquirida en plantas, también es un buen inductor de algunas de las rutas degradativas de PAHs (Shamsuzzaman y Barnsley, 1974; Chen y Aitken, 1999). En otros casos se han descrito compuestos de plantas no aromáticos, como el linoleico, que estimulan la degradación de pireno y benzo(a)pireno en bacterias Gram-positivas (Yi y Crowley, 2007).



**Figura 04. Estructura química de intermediarios en las rutas de degradación de compuestos aromáticos en plantas e inductores en las rutas de degradación de contaminantes en bacterias.** Adaptado de Segura *et al.*, 2009.

A pesar del gran número de artículos en los que se describe una mejora en la degradación del contaminante gracias al uso combinado de plantas y bacterias (Aprill y Sims, 1990; Miya y Firestone, 2001), existen evidencias de que en algunos casos las rutas degradativas podrían no ser activas debido a la represión catabólica ejercida por los exudados de la planta (Rentz *et al.*, 2004). En este caso, al analizar los exudados se observó que la proporción de compuestos fenólicos era relativamente baja en comparación con otros sustratos más fácilmente asimilables (acetato, aminoácidos y glucosa).

#### 4. INTERACCIÓN PLANTA-BACTERIA

En la segunda mitad de este siglo las interacciones entre plantas y bacterias han sido ampliamente analizadas. Sin embargo, estos estudios se han centrado principalmente en las asociaciones de carácter patógeno o saprofítico. En la última década, el estudio de la ecología bacteriana en la rizosfera ha permitido comprender mejor la comunicación bacteriana y su diálogo con las plantas (Kiely *et al.*, 2006; Shaw *et al.*, 2006; Danhorn y Fuqua, 2007).

Los microorganismos se pueden clasificar en patógenos, saprofitos y beneficiosos según el efecto que causan en las plantas. Los microorganismos patógenos atacan las raíces, tallos y hojas de las plantas, mientras que los saprofitos viven sobre el material vegetal muerto desempeñando un papel crucial en la descomposición de la materia orgánica y los ciclos de los elementos. Los microorganismos beneficiosos se pueden, a su vez, clasificar según sus aplicaciones, pudiendo ser biofertilizadores, fitoestimuladores y rizorremediadores, tal y como hemos descrito anteriormente.

Los microorganismos, independientemente de si son beneficiosos o patógenos, a menudo usan los mismos mecanismos en la interacción con las plantas. Es más, muchas de las estrategias usadas en la interacción con las plantas son las mismas que utilizan en la interacción con otros organismos eucariotas como los hongos y el hombre (Lugtenberg y Dekker, 1999; Chin-A-Woeng *et al.*, 2000). Entre los mecanismos bacterianos más comunes implicados en la interacción planta-bacteria están la motilidad (de Weger *et al.*, 1987; Simons *et al.*, 1996), la quimiotaxis (De Weert *et al.*, 2002; Rudrappa *et al.*, 2008), la capacidad para utilizar eficientemente compuestos de los exudados radiculares (Lugtenberg *et al.*, 1999), la capacidad para sintetizar aminoácidos y vitamina B1 (Simons *et al.*, 1997), la presencia del antígeno O del lipopolisacárido (Dekkers *et al.*, 1998b), los sistemas de secreción tipo III y IV (Lugtenberg, *et al.* 2002), y la variación de fase (Dekkers *et al.*, 1998a).

Los beneficios potenciales de la motilidad durante la colonización incluyen una mayor accesibilidad a nutrientes o la posibilidad de alcanzar regiones concretas de la raíz (Turnbull *et al.*, 2001). Así, mutantes defectivos en la motilidad tipo "swimming" de *P. fluorescens* (de Weger *et al.*, 1987, Simons *et al.*, 1996; Dekkers *et al.*, 1998a), *P. chlororaphis* (Chin-A-Woeng *et al.*, 2000) y *P. putida* (Simons *et al.*, 1996) presentan deficiencias en la colonización del ápice radicular de plantas de tomate. Además, variantes hipermóviles de *P. brassicacearum* (Achouak *et al.*, 2004) y de *P. fluorescens* (Martínez-Granero *et al.*, 2006) presentan una mayor eficiencia colonizadora de ápices de raíces que la cepa silvestre.

La quimiotaxis hacia los exudados radiculares, parece ser una característica importante en la colonización de las raíces. En el caso de *Pseudomonas fluorescens* WCS365 los aminoácidos y los ácidos dicarboxílicos presentes en los exudados de tomate son los principales quimioatrayentes (De Weert *et al.*, 2002). En los exudados de *Arabidopsis* otro ácido orgánico, el L-malato, es el principal quimioatrayente para *Bacillus subtilis* FB17 (Rudrappa *et al.*, 2008).

En el caso de la capacidad para usar compuestos presentes en los exudados de la planta, Lugtenberg y colaboradores (1999) encontraron que un mutante de *Pseudomonas fluorescens* WCS365 deficiente en la utilización de ácidos orgánicos como fuente de carbono, está afectado en colonización competitiva mientras que un mutante en la utilización de azúcares no lo está. Los exudados radiculares de tomate tienen un contenido en ácidos orgánicos cinco veces mayor al de azúcares (Lugtenberg *et al.*, 2001), lo que indicaría que los ácidos orgánicos son la principal fuente de carbono de esta cepa en la rizosfera de tomate.

Otros mecanismos de colonización, parecen incluir procesos específicos de reconocimiento entre un determinado tipo de planta y un genotipo bacteriano concreto. Un ejemplo es el caso de *Agrobacterium tumefaciens* 1D1609, aislado originalmente de alfalfa. Esta cepa posee un sistema de bombas de extrusión de isoflavonoides (el operón *ifeABR*) que contribuye a su eficiencia ecológica en la rizosfera de alfalfa reduciendo la acumulación de estos compuestos en el interior celular (Palumbo *et al.*, 1998).

#### 4.1. Colonización bacteriana de semillas

Una forma muy sencilla y económica de inocular las bacterias de interés en un suelo a rizorremediar es suministrarlas cubriendo la superficie de las semillas (Schnoor *et al.*, 1995). Para ello es imprescindible que las bacterias sean capaces de adherirse eficientemente a dicha superficie (Colleran, 1997). En esta unión, apéndices celulares tales como fimbrias, pili de tipo IV y flagelos tienen un papel importante, mostrando un cierto paralelismo con lo que sucede en superficies abióticas, donde son necesarios para la estabilización de la interacción con la superficie y para reducir el efecto de las fuerzas electrostáticas repulsivas entre el sustrato y la superficie celular bacteriana (Pratt y Kolter, 1998; Kierek-Pearseon y Karatan, 2005). Así, mutantes de *P. fluorescens* carentes de flagelo (DeFlaun *et al.*, 1994) y mutantes en los genes *fliA* y *flgL* de *P. putida* (Yousef-Coronado *et al.*, 2008; Rodríguez-Hervá *et al.*, 2009) están afectados en motilidad tipo “swimming” y en la adhesión a semillas. En la adhesión a superficies vegetales también intervienen proteínas de membrana externa. La

importancia de estas proteínas se ha demostrado en *P. putida* KT2440, que requiere de la adhesina LapA para una adhesión eficiente a semillas y una adecuada colonización competitiva de la raíz (Yousef-Coronado *et al.*, 2008). Además, la adhesina LapF, parece tener un papel específico en la interacción con superficies vegetales (Espinosa-Urgel *et al.*, 2000). En *Escherichia coli* O157:H7, la adhesina OmpA es necesaria para la unión a semillas de alfalfa, de forma que un mutante *ompA* presenta sólo el 10% de adhesión respecto a la cepa silvestre (Torres *et al.*, 2005). Además en *P. putida* KT2440, se han descrito otros genes importantes en la adhesión a semillas. Así un mutante *galU*, que en *P. aeruginosa* es defectivo en la síntesis del “core” del lipopolisacárido (Lam *et al.*, 2004), un mutante en el gen *coxE*, que codifica una protohemo farnesil transferasa, y un mutante en el gen *ddcA*, que codifica un polipéptido de membrana de función desconocida, están afectados en la adhesión a semillas de maíz (Yousef-Coronado *et al.*, 2008). Finalmente, en *Enterobacter cloacae* un mutante *pfkA*, defectivo en la enzima fosfofructoquinasa, está afectado en colonización de semillas (Roberts *et al.*, 1999).

#### 4.2. Colonización bacteriana de raíces

La colonización de la raíz es un requisito importante para que el microorganismo ejerza su función durante la estrategia de rizorremediación. La colonización de la rizosfera por bacterias presentes en el suelo puede tener lugar mediante procesos pasivos (ej. a través de flujos de corrientes) o debido a procesos activos de motilidad bacteriana. En este último caso, los exudados participan en las etapas iniciales de la colonización ejerciendo un efecto quimiotáctico. Una vez que las células bacterianas alcanzan la superficie radicular, la adhesión es el primer paso en la colonización de la raíz. Se han llevado a cabo numerosos estudios para determinar las bases moleculares de esta adhesión y aunque los mecanismos implicados aún no están muy claros parece que las proteínas de superficie, los polisacáridos capsulares, y los flagelos participan en este proceso (de Weger *et al.*, 1987; Broek *et al.*, 1998; Dekkers *et al.*, 1998b; de Weert *et al.*, 2002; Capdevila *et al.*, 2004; Rodríguez-Navarro *et al.*, 2007). Para determinar las funciones implicadas en la colonización de la rizosfera tradicionalmente se caracterizaban mutantes deficientes en colonización, sin embargo con la aparición de nuevas técnicas como la “tecnología de expresión *in vivo*” (IVET) (Rainey, 1999; Ramos-González *et al.*, 2005; Barr *et al.*, 2008) o los “microarrays” (Mark *et al.*, 2005; Matilla *et al.*, 2007; Attila *et al.*, 2008) se han podido detectar los genes que se inducen en la rizosfera o por los exudados radiculares. Entre estos se encuentran los genes mencionados anteriormente (de la envuelta celular y genes

con funciones en quimiotaxis, motilidad, etc.) y otra serie de genes que revelan que el ambiente rizosférico es un ambiente estresante para la bacteria, y a la vez en el que hay fuentes de carbono en bajas concentraciones que necesitan un transporte activo. Así se ven inducidos genes de transporte, secreción, metabolismo del ADN, mecanismos de estrés, regulación, metabolismo energético y en la síntesis de proteínas detoxificadoras como la glutatión peroxidasa (Matilla *et al.*, 2007).

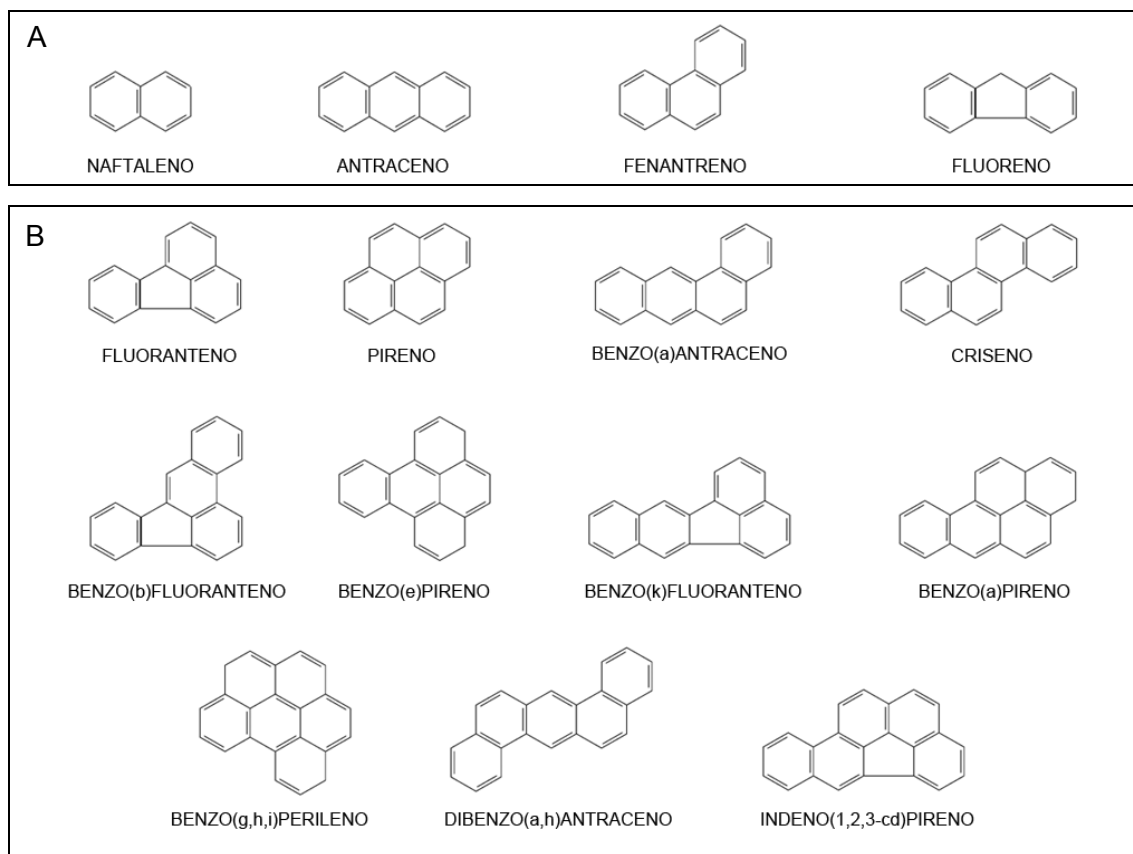
Bacterias pertenecientes a los géneros *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* o *Pseudomonas* son colonizadoras frecuentes en la rizosfera (Sørensen *et al.*, 2001; Somers *et al.*, 2004; Rudrappa *et al.*, 2008). La colonización de la rizosfera tiene lugar de forma muy heterogénea, mostrando preferencias por determinadas áreas que pueden representar sólo el 6% del total de la superficie de la raíz (Lugtenberg y Bloemberg, 2004; Gamalero *et al.*, 2005). Además, se ha demostrado que las rizobacterias tienen una mayor capacidad colonizadora que las bacterias no rizosféricas (Hozore y Alexander, 1991; Lugtenberg y Dekkers, 1999).

## 5. HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (PAHs)

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es el estudio de la degradación de contaminantes en la rizosfera, buscando las mejores cepas bacterianas y las mejores condiciones de biodegradación. Por las características particulares de los PAHs, estos son difíciles de eliminar en el suelo y por tanto uno de estos compuestos, el fenantreno, fue elegido como compuesto modelo para el trabajo de esta Tesis Doctoral. A continuación se exponen algunas de las propiedades de este grupo de compuestos.

### 5.1. Estructura y propiedades fisicoquímicas

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos o PAHs se definen por ser estructuras formadas por dos o más anillos bencénicos. Estos contaminantes han adquirido una notable importancia debido a su persistencia en el medio y a que muchos de ellos son potentes tóxicos, mutágenos y teratógenos (WHO, IARC; 1997), lo que los llevó a ser considerados contaminantes de eliminación prioritaria por la Agencia de Protección del Medio Ambiente de Estados Unidos (EPA) y la Unión Europea (Directiva 2000/60/EC). Además, este grupo de compuestos presenta habitualmente una concentración elevada en zonas sometidas a gran presión humana por lo que son unos excelentes indicadores de la contaminación.



**Figura 05. Estructura química de hidrocarburos aromáticos policíclicos.** A. PAHs de bajo peso molecular. B. PAHs de alto peso molecular.

Las características más importantes que condicionan el comportamiento de los PAHs en el medio ambiente van ligadas a sus propiedades fisicoquímicas (Tabla 02) y éstas vienen determinadas a su vez por la estructura de cada PAH. Es de gran importancia la hidrofobicidad, que aumenta cuanto mayor sea el número de anillos que componen la molécula. Los PAHs se clasifican en base al número de anillos que lo forman en PAHs de bajo peso molecular (2-3 anillos) y PAHs de alto peso molecular (4-más anillos) (Figura 05). Debido a la hidrofobicidad, estos compuestos muestran una fuerte tendencia a adsorberse a las superficies, lo que dificulta su biodegradación y causa su acumulación en la cadena trófica.

**Tabla 02. Propiedades fisicoquímicas de los 16 PAHs establecidos como contaminantes de eliminación prioritaria por la EPA**

Compuesto	PM <sup>a</sup>	Punto fusión (°C)	Punto ebullición (°C)	Solubilidad en agua (mg/l) <sup>b</sup>	log K <sub>ow</sub> <sup>c</sup>	log K <sub>oc</sub> <sup>d</sup>
Naftaleno	128	80	218	30,00	3,37	3,1
Acenaftileno	152	92	265	16,10	4,07	ND
Acenafteno	154	96	279	3,47	4,33	3,8

Compuesto	PM <sup>a</sup>	Punto fusión (°C)	Punto ebullición (°C)	Solubilidad en agua (mg/l) <sup>b</sup>	log K <sub>ow</sub> <sup>c</sup>	log K <sub>oc</sub> <sup>d</sup>
Fluoreno	166	116	298	1,80	4,18	3,9
Fenantreno	178	101	340	1,29	4,46	4,1
Antraceno	178	218	342	0,073	4,45	4,3
Fluoranteno	202	110	375	0,260	5,33	4,3
Pireno	202	150	404	0,135	5,32	4,8
Benzo(a)antraceno	228	159	435	0,014	5,61	4,8
Criseno	228	256	448	0,0006	5,86	4,9
Benzo(b)fluoranteno	252	168	ND	0,0012	6,57	6,2
Benzo(k)fluoranteno	252	217	480	0,00055	6,84	5,6
Benzo(a)pireno	252	179	495	0,0038	6,04	5,3
Dibenzo(a,h)antraceno	278	267	524	0,0005	6,75	6,3
Benzo(g,h,i)perileno	276	278	ND	0,00026	7,23	ND
Indeno(1,2,3-cd)pireno	276	162	ND	0,062	7,66	6,2

<sup>a</sup>PM: Peso molecular. <sup>b</sup>20°C. <sup>c</sup>K<sub>ow</sub>: Coeficiente de partición octanol/agua, indica la proporción de moléculas que existirían en la fase octanol respecto a la fase agua si utilizáramos una mezcla octanol:agua 1:1 como solvente. <sup>d</sup>K<sub>oc</sub>: coeficiente de adsorción de carbono orgánico, nos da la proporción de moléculas de PAHs que se encontrarían en la materia orgánica del suelo respecto a las que encontraríamos en la fase agua, en un suelo saturado de agua. <sup>e</sup>ND: No determinado. *Datos de la tabla según Kästner, 2000.*

## 5.2. Origen

Aunque una parte de los PAHs presentes en el medio ambiente tienen su origen en procesos naturales, la fuente principal son las actividades antropogénicas, las cuales han contribuido al incremento general de las concentraciones en los últimos 100 años (Fernández *et al.*, 2000). En la región noroeste de Estados Unidos se estima que se liberan  $3,9 \times 10^6$  Kg de PAHs por año, de los cuales el 10 % se deposita directamente en suelo, 5% sedimenta en los grandes lagos, 46% es transformado en la atmósfera o transportado fuera de la región y un 44% es adsorbido por la vegetación e incorporado al suelo al final de la estación (Simonich y Hites, 1994). En España durante el año 2008 se registró una emisión de  $3,2 \times 10^4$  Kg de PAHs totales (PRTR-España).

### 5.2.1. Principales fuentes naturales

Las dos principales fuentes de emisión de PAHs en la naturaleza son los incendios forestales y las erupciones volcánicas. Las altas temperaturas que se alcanzan en los magmas volcánicos hacen posible la formación de PAHs,

fundamentalmente de alto peso molecular. Por otro lado, los incendios forestales, con o sin intervención del hombre, son una fuente importante de hidrocarburos aromáticos (Freeman y Cattell, 1990; Pereira *et al.*, 1999; Ribes *et al.*, 2003; Viñas-Diéguez *et al.*, 2006), y en zonas rurales poco urbanizadas e industrializadas pueden ser la principal fuente de contaminación (Yunker *et al.*, 2002). Los compuestos así formados, se asocian habitualmente a materia particulada, llegando a suelos y mares por deposición atmosférica y por escorrentía superficial. Se ha descrito que la concentración de PAHs en suelos está fuertemente influenciada por las cenizas procedentes de la combustión de la madera (Kim *et al.*, 2004). En general, los niveles descritos en sedimentos y cenizas asociados a incendios forestales son bajos, siendo el fenantreno dominante entre los PAHs no sustituidos (Olivella *et al.*, 2006, Vila-Escalé *et al.*, 2007) aunque según las especies vegetales quemadas también pueden predominar pireno y fluoreno (Medeiros y Simoneit, 2008).

Los PAHs se encuentran de forma natural en los combustibles fósiles (crudo de petróleo o carbón) como resultado de una lenta transformación biogénica de la materia orgánica a temperaturas moderadas (100-300° C). Las concentraciones suelen ser bajas (aproximadamente un 1%), y dependen en gran medida del origen del crudo. Este proceso favorece la formación de derivados alquilados, de forma que los PAHs no sustituidos tienen una concentración relativa más baja. En condiciones naturales, la contribución de PAHs al medio por los combustibles fósiles es muy pequeña ya que la mayoría están atrapados bajo profundas capas de roca. Existen algunas masas de petróleo capaces de liberar PAHs a la atmósfera, sin embargo estos depósitos son muy pequeños en número y su contribución apenas es significativa.

### 5.2.2. Principales fuentes antropogénicas

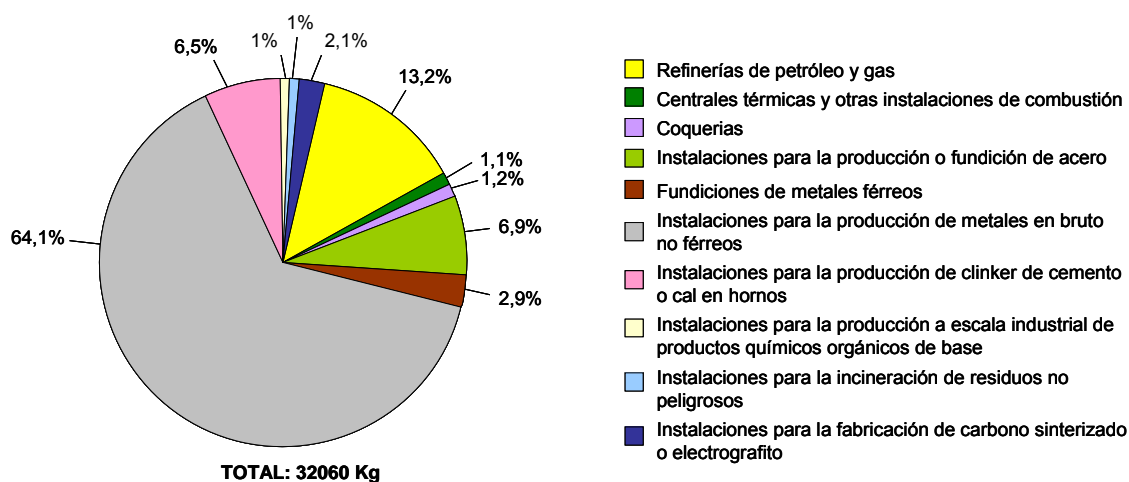
El uso de combustibles fósiles en vehículos a motor representa una importante fuente de emisión de PAHs, ya que las temperaturas que se alcanzan son lo suficientemente altas para convertir el combustible en PAHs vía pirólisis. Se estima que los PAHs liberados por los vehículos a motor representan más del tercio del total de las emisiones totales de estos compuestos. La cantidad emitida depende de muchos factores aunque fundamentalmente del tipo de motor y de la edad del vehículo (Devos *et al.*, 2006; Zielinska *et al.*, 2004). En general los compuestos predominantes que se liberan en los gases de escape de los vehículos de gasolina y diesel, son los compuestos de bajo peso molecular fundamentalmente naftaleno y sus derivados (Devos *et al.*, 2006; Khalili *et al.*, 1995; Marr *et al.*, 1999) aunque también otros como fenantreno, fluoreno y pireno (Pohjola *et al.*, 2004). En menor proporción se emiten



compuestos de mayor peso molecular en fase particulada, principalmente en vehículos de gasolina (Devos *et al.*, 2006; Miguel *et al.*, 1998; Zielinska *et al.*, 2004).

Además del tráfico, la industria es responsable de gran cantidad de los PAHs que son emitidos a la atmósfera (Figura 06). Las plantas de producción de aluminio, representan un proceso industrial históricamente asociado con las emisiones y vertidos de PAHs. En las emisiones de plantas de producción de aluminio noruegas se han descrito altas concentraciones de estos hidrocarburos, siendo fenantreno, fluoreno y pireno los componentes mayoritarios en las emisiones al aire (Naes *et al.*, 1997 y 1998; Oskar Comisión 2002). En otras industrias, como la del hierro, el acero y en plantas de generación de energía también se producen grandes cantidades de estos hidrocarburos, ya que usan procesos en los que se queman carbón, coque y otros combustibles fósiles. Los compuestos característicos en la combustión de carbón son fluoreno, fluoranteno y fenantreno, aunque también se emiten acenaftileno, acenafteno, pireno y criseno (Calvo -Revuelta *et al.*, 1999). Finalmente, las refinerías de petróleo también generan grandes cantidades de PAHs en sus emisiones. El petróleo después de ser extraído es sometido a un proceso llamado de refinación que tiene por objetivo separar, en base al punto de ebullición, las distintas fracciones de hidrocarburos. Es durante este proceso cuando se producen estos hidrocarburos.

También hay que tener en cuenta las incineradoras de residuos industriales y municipales. La incineración es una forma de eliminar y reducir residuos pero el principal inconveniente de este proceso es la emisión de compuestos tóxicos, incluyendo PAHs. La combustión doméstica de madera también ocasiona emisiones relativamente altas de estos compuestos, debido a las deficientes condiciones de combustión en instalaciones anticuadas. Esto puede crear problemas de contaminación del aire a nivel local en zonas de alta densidad de población, especialmente en invierno. En extractos de hollín domésticos se han identificado como componentes principales hidrocarburos de cinco y seis anillos aromáticos (Wornat *et al.*, 2001). Los compuestos de bajo peso molecular, naftaleno, antraceno y fenantreno son demasiado volátiles para condensar en las partículas de hollín. Fenantreno, fluoreno, fluoranteno y pireno representan más del 75% del total de los PAHs liberados en la combustión doméstica en Reino Unido (Lohmann *et al.*, 2000).



**Figura 06. Origen de las emisiones a la atmósfera de PAHs en España.** Datos del año 2008. Obtenido del Registro Estatal de Emisiones y Fuentes Contaminantes (PRTR-España).

Por último la producción de creosota para tratar la madera también es una fuente de PAHs al medio ambiente. Creosota es el nombre usado para describir una mezcla de 200 compuestos químicos, la mayoría de los cuales son hidrocarburos aromáticos (Niqui-Arroyo *et al.*, 2006). Durante años, esta sustancia ha sido utilizada como agente de impermeabilización en hogares, travessas de ferrocarril, postes del tendido eléctrico y telefónico, etc., sin embargo su uso se ha visto restringido con la entrada en vigor de la Directiva 2001/90/CE y su transposición a la legislación española. Los vertidos de las plantas de conservación de la madera, la pintura de barcos, astilleros y estructuras marinas sumergidas basadas en preparaciones de brea son una fuente de PAHs en el medio acuático. Además la entrada de PAHs en el medio acuático se produce por deposición atmosférica, escorrentía superficial, y por los vertidos de petróleo. Estos vertidos son consecuencia inevitable de su transporte, y aunque su número ha descendido desde la década de los 70, constituyen una importante entrada de hidrocarburos al medio marino (Law y Hellou, 1999).

## 6. DEGRADACIÓN BACTERIANA DE PAHs

El principal proceso natural por el cual los PAHs son eliminados de los suelos contaminados es la degradación microbiana, aunque otros procesos como la volatilización o la fotooxidación también contribuyen, si bien en menor medida, a su eliminación (Park *et al.*, 1990). Desde hace varias décadas, se sabe que los hidrocarburos aromáticos policíclicos, especialmente los de 2 a 3 anillos, son sustratos a partir de los cuales las bacterias son capaces de crecer. Sin embargo, se conocen relativamente pocas especies bacterianas capaces de degradar PAHs de alto peso

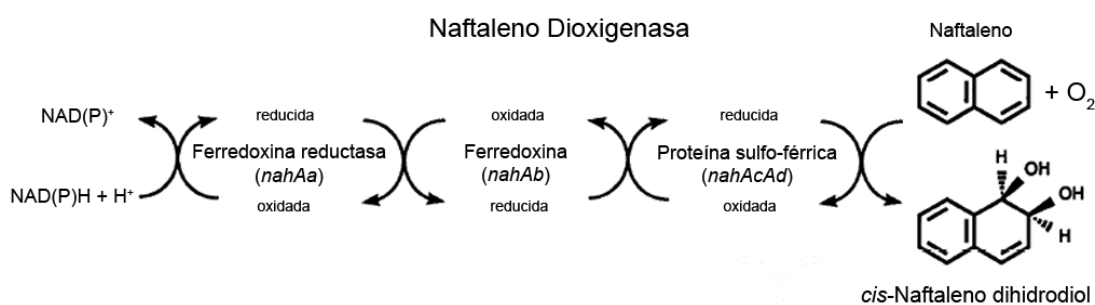
molecular. En la Tabla 03 se muestran algunos de los microorganismos identificados capaces de degradar estos compuestos.

**Tabla 03. Biodegradación de PAHs por microorganismos aerobios**

Cepa	Origen	Sustrato	Referencia
<i>Alcaligenes denitrificans</i>	Cultivo mixto degradador de PAHs	Fluoranteno	Weissenfels <i>et al.</i> , 1990
<i>Bacillus thermoleovorans</i> Hamburg 2	Compost contaminado	Naftaleno	Annweiler <i>et al.</i> 2000
<i>Burkholderia cepacia</i> 2A-12	Suelo contaminado con petróleo	Naftaleno Fenantreno	Kim <i>et al.</i> , 2003
<i>Cycloclasticus</i> W	Sedimento marino	Naftaleno	Geiselbrecht <i>et al.</i> , 1998
<i>Gordonia</i> sp. BS29	Suelo contaminado con petróleo	Fenantreno Antraceno Pireno	Franzetti <i>et al.</i> , 2009
<i>Janibacter anophelis</i> JY11	Suelo contaminado con petróleo	Fenantreno Antraceno Pireno	Zhang <i>et al.</i> , 2009
<i>Mycobacterium</i> sp. 1B	Cultivo bacteriano	Fenantreno Fluoranteno Pireno	Dandie <i>et al.</i> , 2004
<i>Mycobacterium</i> sp. PYR-1	Suelo contaminado con petróleo	Fluoranteno	Sepic <i>et al.</i> , 1998
<i>Neptunomonas naphthovorans</i> NAG-2N-126	Sedimento contaminado con creosota	Naftaleno Fenantreno	Hedlund <i>et al.</i> , 1999
<i>Nocardia otitidiscaviarum</i> TSH1	Suelo contaminado con efluentes de industria petroquímica	Naftaleno	Zeinali <i>et al.</i> , 2008
<i>Pasteurella</i> sp. IFA	Suelo contaminado con petróleo	Fluoranteno	Sepic <i>et al.</i> , 1998
<i>Pseudomonas citronellolis</i> 222A	Suelo contaminado con efluentes de industria petroquímica	Antraceno	Santos <i>et al.</i> , 2008
<i>Pseudomonas paucimobilis</i>	Cultivo mixto degradador de PAHs	Fenantreno	Weissenfels <i>et al.</i> , 1990
<i>Polaromonas naphthalenivorans</i> CJ2	Sedimento contaminado con alquitrán	Naftaleno	Pumphrey y Madsen, 2007
<i>Rhodococcus opacus</i> R7	Suelo contaminado con PAHs	Naftaleno	Di Gennaro <i>et al.</i> , 2001
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> EPA505	Creosota	Fluoreno Naftaleno	Desai <i>et al.</i> , 2008
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> VUN10,010	Suelo de planta de gas natural	Pireno	Boonchan <i>et al.</i> , 1998
<i>Streptomyces griseus</i>	-	Naftaleno	Gopishetty <i>et al.</i> , 2007

Datos de la tabla según Xiao-Ying *et al.*, 2011.

El metabolismo bacteriano implicado en la degradación aerobia de PAHs de bajo peso molecular ha sido ampliamente estudiado. El paso inicial consiste en el ataque de uno de los anillos aromáticos por una dioxigenasa formando el correspondiente *cis*-dihidrodiol. Posteriormente sobre este compuesto actúa una deshidrogenasa formando un intermediario hidroxilado que es atacado por una dioxigenasa extradiólica causando la rotura del anillo. Así se van rompiendo uno a uno los diferentes anillos del compuesto hasta formar un intermediario del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) (Figura 08 y 09). La dioxigenasa inicial más estudiada es la naftaleno dioxigenasa (Kurkela *et al.*, 1988; Parales *et al.*, 2000; Karlsson *et al.*, 2003). Ésta consiste en un sistema enzimático multicomponente formado por: una ferredoxina reductasa, una ferredoxina y una proteína sulfo-férrica (ISP) constituida por una subunidad mayor (ISP  $\alpha$ ) y una menor (ISP  $\beta$ ). El transporte de los electrones se inicia con la transferencia de dos electrones desde una molécula de NAD(P)H hasta la molécula de FAD de la ferredoxina reductasa generando la forma totalmente reducida del FAD, que a su vez, proporciona un electrón al componente ferredoxina. Finalmente estos electrones son transportados hasta el sitio activo de la proteína sulfo-férrica que adiciona una molécula de oxígeno a uno de los anillos de la molécula de naftaleno formando *cis*-naftaleno dihidrodiol (Figura 07).



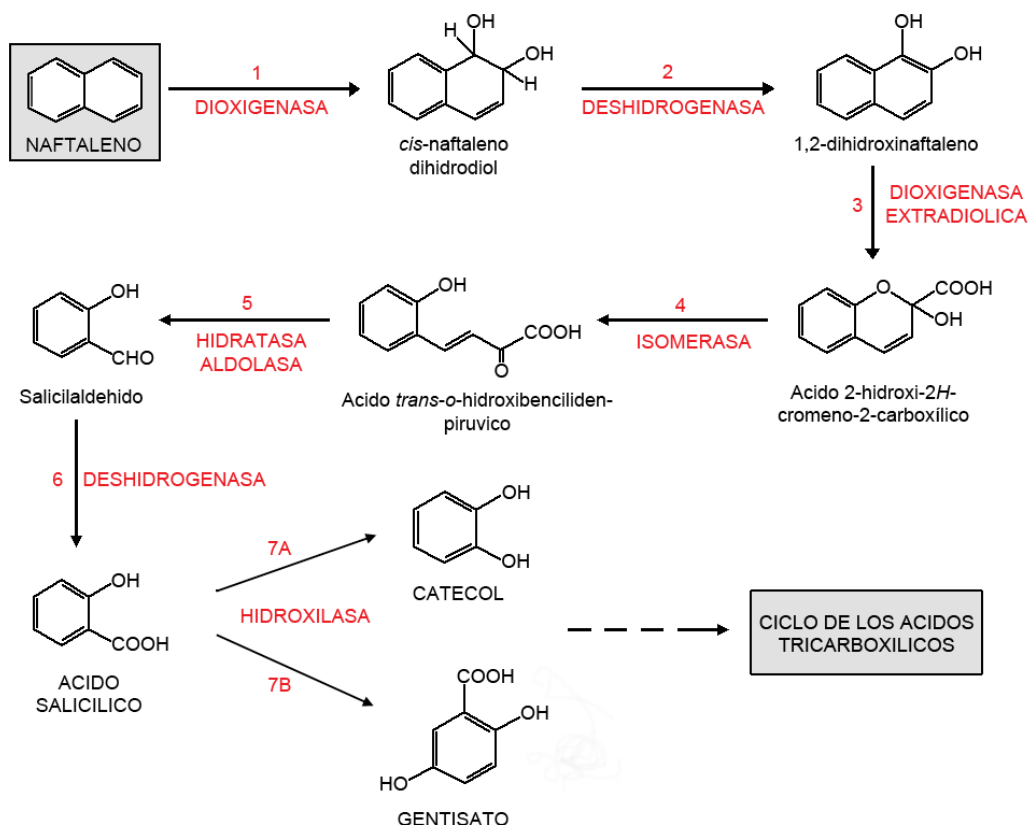
**Figura 07. Oxidación de naftaleno a *cis*-naftaleno dihidrodiol por el sistema multienzimático naftaleno dioxigenasa. Modificado de Simon *et al.*, 1993.**

La degradación de PAHs de alto peso molecular es más compleja. Si bien se conocen bastantes bacterias capaces de degradar PAHs de cuatro anillos, como pueden ser *Pseudomonas* (Mueller *et al.*, 1990), *Alcaligenes* (Weissenfels *et al.*, 1990), *Rhodococcus* (Walter *et al.*, 1991), *Beijerinckia* (Mahaffey *et al.*, 1988), *Mycobacterium* (Kelley *et al.*, 1993; Grosser *et al.*, 1991), *Sphingomonas* (Demanèche *et al.*, 2004) o *Arthrobacter* (Efroymsen y Alexander, 1991; Keuth y Rehm, 1991), se conocen pocas capaces de degradar compuestos con más anillos. La degradación de PAHs de cinco

o más anillos e s m ás compleja y en muchos casos só lo o curre mediante cometabolismo. El cometabolismo consiste en la degradación de un compuesto que normalmente no es bio degradable en presencia de una fuente de carbono adicional. Así por eje mplo se ha descrito la cometabolización de b enzo[a]pireno por bacte rias creciendo en pireno (Keck *et al.*, 1989; Boonchan *et al.*, 2000). Se ha n caracterizado distintos intermediarios en la degradación de estos compuestos, algunos de ellos parecen acumularse sin ser poste riormente degradados, constituyen do lo que se conoce como “dead-end”. Ésto ocurre en cultivos puros, e n cambio en la naturaleza estos compuestos pueden ser el primer paso para una posterior degradación por otros organismos (Keck *et al.*, 1989).

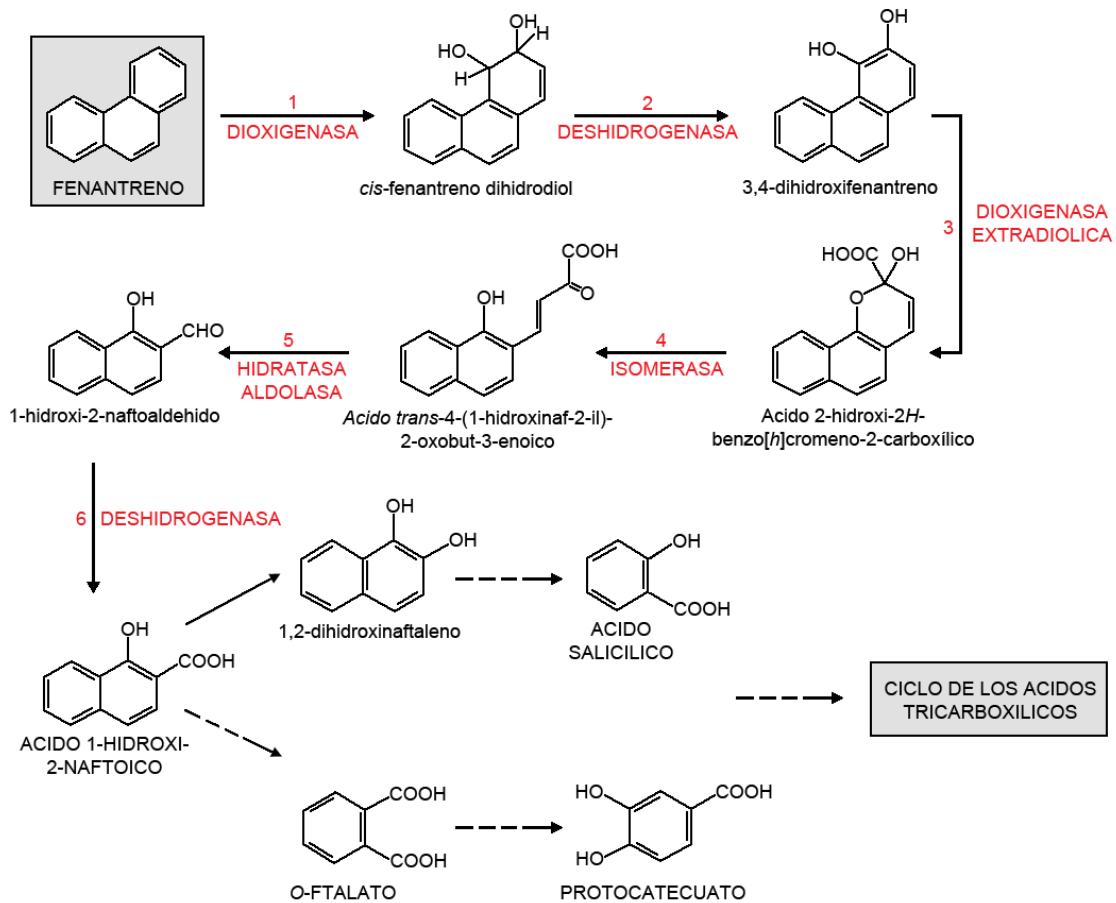
### 6.1. Degradación de PAHs de bajo peso molecular

La degradación de naftaleno ha sido estudia da en detalle sobre todo en bacterias del género *Pseudomonas*, de forma que el mecanismo enzimático implicado, su regulación, así como los plásmidos que contienen las rutas degradativas en estas bacterias están bien caracterizados (Zylstra y Gibson, 1991). Como se ha explicado en el punto anterior, el primer paso de la ruta consiste en la adición de una molécula de oxígeno en la posición 1,2 del anillo aromático para dar *cis*-naftaleno dihidrodiol, paso catalizado por la naftaleno dioxigenasa. E l siguiente paso consiste en la deshidrogenación de la forma dihidrodiol generándose 1,2-dihidroxi-naftaleno sobre el que actúa la 1,2-dihidroxi-naftaleno di oxigenasa produciendo ácido 2-hidroxi-2 *H*-cromeno-2-carboxílico. Posteriormente actúan una isomerasa y una hidratasa-aldolasa formándose salicilalde hído que es transfor mado en salicilato p or la en zima salicilaldehído deshidr ogenasa (Figura 08). Finalmente el salicilato puede ser metabolizado a través de la ruta del catecol o del gentisato hasta in termediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos.



**Figura 08. Esquema de la ruta de degradación de naftaleno en bacterias aerobias.** Modificado de Habe y Omori, 2003.

Otro de los PAHs de bajo peso molecular que se ha estudiado frecuentemente como compuesto modelo es el fenantreno. En *Pseudomonas putida* NCIB9816 y *Pseudomonas fluorescens* 5R se ha observado que las enzimas implicadas en la conversión de fenantreno a salicilato pueden degradar tanto fenantreno como antraceno hasta ácido 1-hidroxi-2-naftóico y ácido 2-hidroxi-3-naftóico respectivamente a través de rutas catabólicas similares (Menn *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 1994). Aunque Pinyakong y colaboradores (2000) sugieren que *Sphingomonas* sp. P2 degrada fenantreno a través de la dioxigenación del anillo en la posición 1,2; la ruta más común es aquella en la que la molécula de oxígeno se introduce en posición 3,4 (Habe y Omori, 2003). En general, el fenantreno es degradado hasta ácido 1-hidroxi-2-naftóico, que posteriormente puede ser metabolizado a través de dos rutas dependiendo de la bacteria. Una de las rutas implica la hidroxilación para formar 1,2-dihidroxi-naftaleno, compuesto que entraría en la ruta de degradación de naftaleno para dar finalmente ácido salicílico. La otra ruta consiste en la rotura del anillo del ácido 1-hidroxi-2-naftóico por una dioxigenasa formándose ácido *trans*-2'-carboxibenzalpirúvico que es metabolizado hasta *o*-ftalato que entraría en la ruta metabólica del protocatecuato (Figura 09).



**Figura 09. Esquema de la ruta de degradación de fenantreno en bacterias aerobias.** Modificado de Habe y Omori, 2003.

## 6.2. Genes catabólicos de PAHs de bajo peso molecular

El metabolismo del n.º a ftaleno ha sido ampliamente estudiado en la cepa *Pseudomonas putida* G7. Esta cepa porta un plásmido autotransferible de 83 Kb (NAH7) que contiene los genes catabólicos (Dunn y Gunsalus, 1973). Estos se organizan en tres operones: uno que codifica las enzimas implicadas en la degradación de naftaleno a salicilato (ruta degradativa superior), otro que codifica las enzimas implicadas en la conversión del salicilato a intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (ruta degradativa inferior) y un último que codifica una proteína reguladora (NahR). Al analizar otros plásmidos implicados en el catabolismo del naftaleno como pWW60-1 en *P. putida* NCIB9816 (Cane y Williams, 1986; Yen y Serdar, 1988; Platt *et al.*, 1995), pDGT1 en *P. putida* NCIB9816-4 (Yen y Serdar, 1988; Serdar y Gibson, 1989a y 1989b) o pKA1 en *P. fluorescens* 5R (Menn *et al.*, 1993), se encontró que todos ellos eran muy similares al plásmido NAH7 de *P. putida* G7. Posteriormente, se identificaron las secuencias de los genes implicados en la

conversión de naftaleno a salicilato en varias cepas de *Pseudomonas*, observándose que la organización de los genes así como la secuencia de nucleótidos eran muy similares (> 90%) a la de los genes *nah* del plásmido NAH7 de la cepa G7. Estos genes se denominaron genes tipo *nah*.

En cambio, en otros géneros como *Ralstonia*, *Comamonas*, *Burkholderia*, *Rhodococcus* o *Nocardioides*, la organización de los genes degradativos así como sus secuencias nucleotídicas difieren de las descritas en las cepas de *Pseudomonas*. En el caso de *Burkholderia* sp. RP007 la dioxigenasa inicial carece de los componentes ferredoxina y ferredoxina reductasa. Además el gen *phnB* que codifica una *cis*-diol dioxigenasa guarda mayor similitud con genes de la ruta de degradación de bifenilol que con los genes tipo *nah* (Laurie y Lloyd-Jones, 1999).

A diferencia de lo que ocurre en otras bacterias Gram-negativas, los miembros del género *Sphingomonas* así como otras especies relacionadas (*Sphingomonadales*) degradan una gran variedad de compuestos aromáticos. Un ejemplo de ello son la cepa *Sphingomonas aromaticivorans* F199, capaz de degradar tolueno, *m*-*p*- y *o*-xileno, bifenilo, naftaleno, fluoreno, salicilato y benzoato (Fredrickson *et al.*, 1991; Fredrickson *et al.*, 1995); y la cepa *Sphingomonas yanoikuyae* B1 capaz de metabolizar 1,2,4-trimetilbenceno, *p*-etiltolueno, *m*- y *p*-xileno, naftaleno, fenantreno y antraceno (Gibson *et al.*, 1973; Zylstra y Kim, 1997). En la actualidad, los mecanismos implicados en esta amplia versatilidad metabólica siguen sin estar claros, sin embargo en la cepa F199 se ha identificado y secuenciado un plásmido (pNL1) de 184 Kb que contiene 13 agrupaciones de genes que parecen codificar enzimas implicadas en la degradación de compuestos aromáticos. Este plásmido contiene siete componentes oxigenasas y sólo un único componente ferredoxina y ferredoxina-reductasa (Romine *et al.*, 1999a). La función de cada dioxigenasa inicial no está clara, y aunque su actividad enzimática no se ha comprobado, parece que la proteína BphA1f codifica la subunidad mayor (ISP $\alpha$ ) de la dioxigenasa inicial de naftaleno (Romine *et al.*, 1999b).

En la Tabla 04 se recogen el genotipo, la localización de los genes degradativos y los sustratos utilizados de algunas cepas degradadoras de PAHs de bajo peso molecular. En muchos de los casos estas bacterias son capaces de crecer tanto con naftaleno como con fenantreno, sin embargo aquellas cepas que degradan fenantreno a través de la ruta de *o*-ftalato (p. ej. las cepas AFK2 y KP7) no son capaces de utilizar naftaleno como fuente de carbono (Habe y Omori, 2003).



**Tabla 04. Genotipo de bacterias degradadoras de PAHs de bajo peso molecular**

Bacteria	Gen	Genotipo	Localización	Sustrato <sup>a</sup>		
				Nah	Phn	Ant
<i>Pseudomonas putida</i> G7	<i>nah</i>	<i>nah</i> (G7)	NAH7	+	/	d / d
<i>P. putida</i> NCIB 9816	<i>nah</i>	<i>nah</i> (G7)	pWW60-1	+	/	+ / d
<i>P. putida</i> NCIB 9816-4	<i>nah</i>	<i>nah</i> (G7)	pDTG1	+	/	d / d
<i>P. putida</i> BS202	<i>nah</i>	<i>nah</i> (G7)	NPL-1	+	/	d / d
<i>P. putida</i> OUS82	<i>pah</i>	<i>nah</i> (G7)	Cromosoma	+	/	+ / d
<i>P. stutzeri</i> AN10	<i>nah</i>	<i>nah</i> (G7)	Cromosoma	+	/	d / d
<i>P. aeruginosa</i> PaK1	<i>pah</i>	<i>nah</i> (G7)	Cromosoma	+	/	- / -
<i>Pseudomonas</i> sp. C18	<i>dox</i>	<i>nah</i> (G7)	Plásmido	+	/	d / d
<i>Ralstonia</i> sp. U2	<i>nag</i>	<i>nag</i> (U2)	Plásmido	+	/	d / d
<i>Comamonas testosteroni</i> GZ42	<i>nah</i>	<i>nag</i> (U2)	Desconocido	+	/	+ / -
<i>C. testosteroni</i> H	<i>pah</i>	<i>nag</i> (U2)	Desconocido	+	/	+ / d
<i>C. testosteroni</i> GZ39	<i>phd</i>	<i>phd</i> (GZ39)	Desconocido	+	/	+ / -
<i>Burkholderia</i> sp. RP007	<i>phn</i>	<i>phn</i> (RP007)	Plásmido	+	/	+ / +
<i>Alcaligenes faecalis</i> AFK2	<i>phn</i>	<i>phn</i> (AFK2)	Plásmido	-	/	+ / d
<i>Rhodococcus</i> sp. NCIMB12038	<i>nar</i>	<i>nar</i> (NCIMB12038)	Desconocido	+	/	d / d
<i>Nocardioides</i> sp. KP7	<i>phd</i>	<i>phd</i> (KP7)	Cromosoma	-	/	+ / d

<sup>a</sup>Nah, Phn y Ant indican naftaleno, fenantreno y antraceno respectivamente. “+” indica crecimiento, “-” indica incapacidad de crecer utilizando dicho sustrato y “d” indica desconocido.

<sup>b</sup>número de acceso de GenBank. Modificado de Habe y Omori, 2003.

## 7. REGULACIÓN DE RUTAS DE DEGRADACIÓN DE COMPUESTOS AROMÁTICOS

Las ventajas que proporcionan a una bacteria una determinada ruta catabólica dependen de una regulación precisa de los promotores que controlan la expresión de los genes codificantes de las distintas actividades enzimáticas. Cuando se utiliza un determinado sustrato como nutriente, las proteínas reguladoras y los promotores regulados son los elementos claves que aseguran un rendimiento adecuado (Díaz y Prieto, 2000). No obstante, la transcripción no sólo depende de la actuación de un regulador específico que responde a una determinada señal, sino que implica mecanismos de regulación global que conectan la actividad de los promotores con el estado energético y metabólico de la célula, silenciando las funciones catabólicas especializadas menos favorables energéticamente hasta que sean necesarias (Cases

y de Lorenzo, 1998). De forma general podemos hablar de dos niveles de regulación que controlan la expresión de rutas de degradación de compuestos aromáticos. La pareja regulador-promotor es el elemento principal de la regulación específica de la ruta, que constituye el primer nivel de regulación. En general, el regulador se une a la región promotora de los genes catabólicos y, en presencia de la molécula inductora, permite o potencia la transcripción de los genes codificantes de las enzimas encargadas de metabolizar el compuesto aromático hasta intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. El inductor puede ser el sustrato de la ruta o un intermediario de ésta. A su vez, el regulador puede actuar como activador transcripcional en presencia del inductor o como represor en ausencia de éste.

El segundo nivel de regulación ajusta la tasa de expresión de los genes catabólicos al estado fisiológico de la célula. Esta regulación está mediada por factores de regulación globales que interactúan con distintas dianas de la maquinaria de transcripción o traducción (Díaz y Prieto, 2000; Morales *et al.*, 2004). El clásico ejemplo de regulación global es el fenómeno de represión catabólica, frecuentemente observado en rutas de degradación de compuestos aromáticos (Prieto *et al.*, 2004; Shingler, 2003). El término represión catabólica describe el fenómeno por el que la presencia de una fuente preferente de carbono en el medio reprime la expresión de ciertos genes y operones, cuyos productos génicos están relacionados con el uso de fuentes alternativas de carbono (Stülke y Hillebrand, 1999). Estos sistemas de regulación global funcionan a través de los canales generales de control, bien mediante los niveles celulares de las distintas formas de holoenzima de ARN polimerasa, a través de la arquitectura de los promotores o modulando la actividad o expresión de los reguladores transcripcionales específicos (Shingler, 2003; Moreno y Rojo, 2008).

### 7.1. Regulación específica

Existen gran variedad de proteínas reguladoras incluidas en distintas familias de reguladores transcripcionales procariontes que controlan la expresión de las rutas catabólicas de degradación de compuestos aromáticos. En la mayoría de los casos, estos reguladores son activadores transcripcionales que interactúan con sus promotores diana a través de dominios de unión a ADN tipo hélice-giro-hélice (HTH) y que inducen la transcripción cuando interactúan con el sustrato aromático o un intermediario de la ruta, que funciona como molécula inductora (Díaz y Prieto, 2000). Algunos de los reguladores transcripcionales de rutas de degradación de compuestos aromáticos pertenecen a la familia NtrC, que catalizan la transición de complejo cerrado a complejo abierto en promotores dependientes de  $\sigma^{54}$ . También encontramos

reguladores pertenecientes a las familias AraC, IclR, FNR, MarR, GntR, que incluyen la mayoría de los represores descritos en el catabolismo de compuestos aromáticos, sistemas de dos componentes y reguladores de la familia LysR.

En los siguientes apartados se tratará con más detalle los reguladores transcripcionales pertenecientes a las familias NtrC y LysR, ya que se han identificado dos reguladores pertenecientes a estas familias que podrían estar implicados en la regulación de la degradación de PAHs en algunas de las cepas bacterianas aisladas en esta Tesis Doctoral.

#### 7.1.1. Familia de reguladores NtrC

La regulación de rutas de degradación de compuestos aromáticos en muchos casos está mediada por reguladores pertenecientes a esta familia (Tropel y van der Meer, 2004). Estos reguladores controlan promotores que son reconocidos por la ARN polimerasa (ARNP) con el factor sigma alternativo  $\sigma^{54}$ . Los reguladores implicados en el metabolismo de compuestos aromáticos se incluyen en un subgrupo denominado reguladores NtrC/XylR, y que se caracterizan por detectar y responder a moléculas efectoras a diferencia de otros miembros de la familia que forman parte de sistemas de dos componentes (Shingler, 1996). La ARNP asociada al factor  $\sigma^{54}$  (ARNP- $\sigma^{54}$ ) forma un complejo estable con las secuencias -12/-24 características de los promotores que regula, pero es incapaz de iniciar la transcripción (Buck y Cannon, 1992a; Popham *et al.*, 1989; Sasse-Dwight y Gralla, 1988). Para ello es necesario la interacción con el regulador y la hidrólisis de ATP, que se crea a porta la energía necesaria al proceso (Weiss *et al.*, 1991). Estos reguladores se unen a las regiones denominadas UASs (del inglés, "Up stream Activating Sequences") que normalmente están localizadas a lo menos 100 pb antes del sitio de unión de la ARNP- $\sigma^{54}$  (Buck y Cannon, 1992b; Buck *et al.*, 1987; Gralla, 1996; Morett y Segovia, 1993; Reitzer y Magasanik, 1986). La interacción entre la ARNP- $\sigma^{54}$  unida a las secuencias -12/-24 y la proteína reguladora asociada a las regiones UASs es facilitada por la curvatura del ADN que en muchos casos está mediada por la unión de la proteína IHF (del inglés, "Integration Host Factor") (Pérez-Martín *et al.*, 1994). Los dos reguladores mejor estudiados son las proteínas XylR y DmpR de *P. putida*. En *P. putida* mt-2 XylR es una de las dos proteínas reguladoras principales de la ruta de degradación de tolueno y xilenos codificada en el plásmido TOL. Este regulador en combinación con la ARNP- $\sigma^{54}$  activa la transcripción de los genes de la ruta "upper" y del gen *xyIS* (Abril *et al.*, 1989; Dixon, 1986; Inouye *et al.*, 1987; Kohler *et al.*, 1989; Ramos *et al.*, 1987). Además de ser un activador transcripcional, XylR reprime su propia expresión ya que la región promotora

de *xyIR* (Pr) y el sitio de unión de XylR en el promotor P<sub>s</sub> del gen *xyIS* están situados en la región intergénica entre *xyIS* y *xyIR* por lo que solapan impidiendo el acceso de la ARNP- $\sigma^{70}$  al promotor de *xyIR* (Pr). DmpR regula la expresión del promotor P<sub>o</sub> activando la expresión de un único operón (*dmpKLMNOPQBCDEFGHI*) implicado en la degradación de fenol presente en el plásmido pVI150 de *Pseudomonas* sp. CF600 (Shingler *et al.*, 1993).

### 7.1.2. Familia de reguladores LysR

Los reguladores transcripcionales de la familia LysR forman el grupo más amplio de reguladores bacterianos (Tropel y van der Meer, 2004). Muchos de ellos son reguladores de rutas de degradación de contaminantes orgánicos (Díaz y Prieto, 2000; Shingler, 2003; Tropel y van der Meer, 2004). Son proteínas muy conservadas y de tamaño similar que controlan multitud de procesos celulares relacionados con la división celular, *quorum sensing*, virulencia, movilidad, fijación de nitrógeno, estrés oxidativo, producción de toxinas, etc. (Maddocks y Oyston, 2008). Además, frecuentemente se han caracterizado como reguladores de rutas de degradación de compuestos aromáticos (Díaz y Prieto, 2000; Shingler, 2003; Tropel y van der Meer, 2004). Estos reguladores funcionan normalmente como activadores de la transcripción de sus promotores, no obstante existen casos en los que actúan como represores (Maddocks y Oyston, 2008) e incluso pueden poseer una función dual, actuando como activadores y represores de la transcripción sobre diferentes promotores diana (Ieva *et al.*, 2005; Bender, 1991; Rosario y Bender, 2005; Liu y Bender, 2007). El gen que codifica el regulador normalmente está localizado cerca y de forma divergente a los genes que regula, pero existen excepciones a esta regla. Por ejemplo el gen que codifica el regulador SalR en *Acinetobacter* sp. ADP1 que es co-transcrito junto con el gen que regula (*salA*) (Jones *et al.*, 2000). El gen *phnS* es co-transcrito en la misma unidad transcripcional que los genes del operón *phnFECDACAdB* implicados en la degradación de naftaleno y fenantreno en *Burkholderia* sp. RP007 (Laurie y Lloyd-Jones, 1999). Todos los reguladores LysR implicados en la degradación de aromáticos actúan activando la transcripción de los genes de la ruta de degradación en presencia de un inductor, y reprimiendo su propia expresión. El regulador se une a una única región, denominada RBS (del inglés, "Repressor Binding Site") desde la que ejerce ambas funciones. Los inductores de este tipo de reguladores suelen ser intermediarios de la ruta que regulan (Coco *et al.*, 1993; Lev eau y van der Meer, 1996; Romero-Arroyo *et al.*, 1995; Rothmel *et al.*, 1990).



**OBJETIVOS**



El objetivo general de esta Tesis Doctoral se encamina al estudio de las interacciones que se producen en la rizosfera de plantas creciendo en ambientes contaminados y sus posibles aplicaciones biotecnológicas. Para alcanzar este objetivo general se propusieron los siguientes objetivos específicos:

1. Aislamiento de bacterias del suelo y rizosféricas con capacidad de degradar fenantreno, situándolas en el contexto de las poblaciones bacterianas mayoritarias existentes en la rizosfera de plantas creciendo en zonas contaminadas con PAHs, y la comparación de estas poblaciones con las de los microorganismos presentes en suelos no vegetados.
2. Análisis de diferentes parámetros de interés en la interacción planta-bacteria (adhesión a semilla y raíz, colonización de la rizosfera, utilización de exudados radiculares, etc.) para el uso de estas bacterias en estrategias de biorremediación.
3. Identificación de los genes de degradación de fenantreno en las bacterias aisladas en el objetivo 1 con el fin de estudiar su regulación y su expresión en presencia de exudados radiculares.





## **MATERIALES Y MÉTODOS**



## 1. RECOGIDA DE MUESTRAS EN ZONAS CONTAMINADAS CON PAHs

Se recogieron muestras de suelo en tres zonas susceptibles de estar contaminadas con PAHs. En la cercanía de una gasolinera en Cenes de la Vega (Granada), en una zona de monte bajo que había sufrido un incendio el verano anterior a la recogida de las muestras (en el límite de las provincias de Madrid y Guadalajara) y en la refinería de CEPSA La Rábida en Palos de la Frontera (Huelva). Las muestras de Granada y de Huelva se recogieron a principios de mayo de 2007 y 2008 respectivamente, mientras que las de Madrid se recogieron a principios de diciembre de 2007.

En cada una de las zonas se seleccionaron varias plantas al azar, y para cada una de ellas se tomaron dos tipos de muestras (de 3-5 g aproximadamente): suelo cercano y suelo rizosférico. Para recoger el suelo rizosférico se extrajo la planta con las raíces y se agitó para eliminar la tierra poco unida, el resto de tierra que quedó adherida a las raíces se consideró suelo rizosférico.

De cada una de las muestras de suelo y rizosfera se tomó un gramo para aislar bacterias de interés, y otro gramo para aislar ADN total. El resto se guardó a -20 °C para su uso posterior.

Las plantas se identificaron en el laboratorio con ayuda del manual "Claves para la determinación de plantas vasculares" (Bonnier y Layens, 1988).

## 2. AISLAMIENTO DE ADN TOTAL DE SUELO

Para la extracción del ADN cromosómico de suelo se usó una combinación de los métodos descritos por Zhou *et al.* (1996) y Porteous *et al.* (1997).

Se pesó un gramo de cada muestra de suelo en tubos Falcon de 15 ml a los que se les añadió 2 ml de buffer de extracción y 0,1 ml de proteinasa K (20 mg/ml). Los tubos se incubaron durante 30 minutos a 37°C y agitación de 200 rpm. Transcurrido este tiempo, se añadieron 0,3 ml de SDS al 20% (p/v) y se incubó en baño a 65°C durante una hora. Seguidamente los tubos se sometieron a centrifugación (4000 g durante 10 minutos) a temperatura ambiente. La fase superior se recogió en un tubo nuevo y el precipitado se sometió de nuevo al proceso de extracción. En este caso, se añadieron 1,5 ml de buffer de extracción y 0,2 ml de SDS al 20% (p/v) y se incubó a 65 °C durante 10 minutos. A continuación se centrifugó a una velocidad de 4000g durante 10 min y la fase superior se unió con la recogida anteriormente. Después se añadió un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó a 6000 g durante 10 min recogiendo la fase acuosa. Para la precipitación de los ácidos nucleicos se añadieron 0,6 volúmenes de isopropanol y se dejó reposar durante

una hora a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se centrifugó a 4000g durante 30 minutos y el precipitado se lavó con etanol al 70% (v/v) frío. Finalmente el ADN se dejó secar y se resuspendió en 0,6 ml de agua bidestilada.

Las muestras obtenidas de esta forma presentaban una coloración marrón oscura, indicando la presencia de ácidos húmicos que podrían inhibir la PCR. Para eliminar estos compuestos se añadieron 75 µl de acetato potásico 5M y 250 µl de PEG 8000 al 40% (p/v) y se dejó precipitando al menos 1 hora a -20°C. Posteriormente se centrifugó a 13000g 15 min y el precipitado obtenido se disolvió en 0,9 ml de solución 2X CTAB. Las muestras se incubaron a 65°C durante 15 min, tras lo cual se añadieron 0,9 ml de cloroformo. Se centrifugó a 13000g otros 10 min y a la fase superior se le añadió 1ml de isopropanol. Para precipitar el ADN se incubó al menos 15 minutos a -20°C. El precipitado obtenido se resuspendió en 450 µl de agua bidestilada y se purificó con columnas Ultracel YM-100 (Millipore, ref. 42413) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN aislado (resuspendido en 30 µl de agua bidestilada estéril) se guardó a 4°C hasta su utilización.

**Buffer de extracción:** Tris-HCl 0,1 M pH 8, EDTA 0,1 M pH 8, fosfato sódico o potásico 0,1 M pH 8, NaCl 1,5 M y CTAB 1%.

**Solución 2X CTAB:** CTAB 2% (p/v), NaCl 1,4 M y EDTA 0,1 M.

### **3. ELECTROFORESIS EN GEL CON GRADIENTE DESNATURALIZANTE (DGGE)**

La electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE) es una de las técnicas empleadas para analizar la diversidad de comunidades microbianas. Con esta técnica, fragmentos de ADN de igual longitud pero con secuencia distinta se pueden resolver electroforéticamente (Fisher y Lerman, 1979).

En los últimos años, el DGGE se ha utilizado para analizar el gen que codifica el ARNr 16S de muestras ambientales. Esta técnica permite la separación de una mezcla heterogénea de genes de 16S amplificados por PCR en un gel de poliacrilamida con un gradiente desnaturalizante químico de formamida y urea.

#### **3.1 Amplificación de la región hipervariable V3 del gen 16S**

A partir de las muestras de suelo recogidas se aisló ADN total. Usando este ADN como molde se realizaron dos PCR secuenciales, de esta forma se obtiene una región amplificada del gen codificante del 16S ARNr adecuada para su análisis mediante electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE). En la primera

PCR se usaron los oligonucleótidos E8F y U1510R (Baker *et al.*, 2003) que amplifican prácticamente la totalidad del gen ARNr 16S. El producto de esta primera reacción se usó como molde para la segunda PCR (de nominada PCR anidada), en la que se usaron los cebadores GC-P1 y P2 (Muzyer *et al.*, 1993). El producto final tiene un tamaño de 234 pb (194 pb + 40 pb de la cola GC) e incluye la región hipervariable V3 del gen que codifica el ARNr 16S.

### 3.2 Preparación de geles desnaturalizantes

Los productos de la PCR anidada se analizaron en geles de poliacrilamida al 10%, de 1mm de grosor y con un gradiente de desnaturalizante de formamida-urea que oscilaba entre el 35% (parte superior del gel) y el 55% (parte inferior del gel). Para la optimización del gradiente, previamente se analizaron las muestras en varios gradientes: 20-60%, 30-60% y 35-55%, estableciéndose este último como el óptimo para una buena separación de las bandas. El 100% de formamida-urea está definido en una concentración de urea de 7M y 40% (v/v) de formamida desionizada.

Las soluciones de acrilamida se prepararon en tampón TAE 1 X (descrito en el apartado 14.2) y su composición fue la siguiente:

**Solución desnaturalizante al 35%:** 10% (v/v) Acrilamida/Bisacrilamida (37,5:1); urea 2,45 M; 14% (v/v) formamida desionizada.

**Solución desnaturalizante al 55%:** 10% Acrilamida/Bisacrilamida (37,5:1); urea 3,85 M; 22% (v/v) de formamida desionizada.

Las soluciones se filtran con filtros de acetato de celulosa de 0,45  $\mu$ m de diámetro de poro (Millipore, ref. SLHA033SS). Una vez preparadas las soluciones de acrilamida se añadieron los agentes polimerizantes (APS y TEMED a una concentración final del 0,01% (v/v)), e inmediatamente después se procedió a la preparación del gel usando el formador de gradiente del sistema "The DCode Universal Mutation Detection System" (Bio-Rad, ref. 170-9080 hasta 170-9104).

El gel se dejó polimerizar dos horas a temperatura ambiente, tras lo cual se cargaron las muestras (todo el producto de la PCR anidada: 50 $\mu$ l). La electroforesis consta de dos pasos, uno primero de dos horas de duración y aplicando un voltaje de 150V y uno segundo a 200V durante cuatro horas. La electroforesis se realizó a una temperatura constante de 60°C.

### 3.3 Tinción y visualización de los geles de DGGE

Se probaron dos tipos de tinción, con nitrato de plata usando el kit “*Bio-Rad Silver Stain*” (Bio-Rad, ref. 161-0443 hasta 161-0447) y por inmersión en una solución de GelRed® (VWR, ref. 730-2958) preparada en agua según las instrucciones del fabricante. Los resultados con las dos tinciones fueron similares, por lo que se optó por utilizar la tinción con GelRed® que requería mucho menos tiempo. Para visualizar las bandas se utilizó el sistema Gel-Doc de Bio-Rad.

### 3.4 Análisis estadístico de los geles de DGGE

Las bandas presentes en cada uno de los carriles se definieron y compararon con el software Uvi-BandMap (Uvitec Cambridge). Una vez definidas todas las bandas de cada gel de DGGE, se construyeron matrices binarias de presencia/ausencia de dichas bandas en cada uno de las muestras, donde 1 indica presencia de la banda en la muestra en cuestión y 0 su ausencia. Para el análisis estadístico se usó el índice de similitud de Raup y Crick (Raup y Crick, 1979). Este índice se define como la probabilidad de que una semejanza seleccionada al azar sea mayor o igual a la semejanza observada. Valores de este índice mayores de 0,95 o menores de 0,05 significan semejanza o diferencia, respectivamente, es decir que no son distribuciones al azar. El cálculo de este índice, así como la construcción de los dendogramas de semejanzas se realizaron con el programa PAST (Hammer *et al.*, 2001). Para la construcción de los dendogramas se usó el algoritmo “unweighted paired-group method with arithmetic mean” (UPGMA).

### 3.5 Escisión y secuenciación de las bandas de los geles de DGGE

Las bandas predominantes de los geles de DGGE se recortaron para su posterior estudio. Los fragmentos recortados se introdujeron en tubos eppendorf a los que se les añadieron 40 µl de agua bidestilada y se dejaron 48 horas a 4°C. Posteriormente se tomaron 2 µl de cada tubo y se llevó a cabo una reamplificación usando los cebadores de la PCR anidada. Los productos de PCR se purificaron con el kit “*QIAquick Gel Extraction Kit*” (QUIAGEN) y posteriormente se enviaron a secuenciar. En aquellos casos en los que no se obtuvieron secuencias, se tomaron 3 µl del ADN y se clonaron en el vector pMBL-T. La ligación se transformó en *E. coli* DH5α (según se indica en el apartado 16.1) y se sembró en placas de LB con Ap y x-gal. Para cada muestra se seleccionaron tres colonias blancas a las que se les extrajo el plásmido con el kit “*Plasmid Miniprep Kit*” (Bio-Rad, ref. 732-6100) y se enviaron a secuenciar.

#### 4. CONDICIONES Y MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo y soluciones fueron esterilizados bajo calor húmedo, en autoclave, siendo sometidos a una temperatura de 121°C y una atmósfera de presión.

##### 4.1 Medios ricos

Como medio líquido de crecimiento habitual de las cepas bacterianas se utilizó el medio rico Luria-Bertani (LB) (Sambrook *et al.*, 1989), cuya composición es la siguiente: bacto-triptona, 10g; extracto de levadura, 5g; NaCl, 10g; H<sub>2</sub>O hasta 1 L. Para la preparación de medio sólido LB, se añadió bacto-agar (Difco, ref. 0140-01), hasta una concentración final del 2% (p/v).

Para las cepas fúngicas el medio líquido utilizado fue PDB (Difco Potato Dextrose Broth, Becton and Dickinson, ref. 254 920) y el medio sólido fue PDA (Difco Potato Dextrose Agar, Becton and Dickinson, ref. 213400) preparados según las especificaciones del fabricante.

##### 4.2 Medios mínimos

Para el cultivo en medio mínimo se empleó una modificación del medio M9 (Sambrook *et al.*, 1989), cuya composición es la siguiente: solución 10xM9 100 mL; solución A9 (goodies), 2,5 ml; MgSO<sub>4</sub> 1M, 1 mL; citrato férrico amónico 6% (p/v), 1 mL; H<sub>2</sub>O hasta 1L.

Para los medios líquidos, como fuentes de carbono se utilizó glucosa 10mM, fenantreno y antraceno en cristales (1 g/l) y naftaleno en cristales (0,5 g/l).

Para añadir fenantreno o antraceno a las placas de medio mínimo, éstos se disolvieron en hexano a una concentración de 2,5% (p/v) y posteriormente se pulverizaron sobre la placa (Kiyohara *et al.*, 1982). El hexano se evapora rápidamente a temperatura ambiente formándose una capa homogénea de fenantreno o antraceno en cristales sobre la superficie de la placa. El naftaleno se añadió en forma de cristales en la tapa de la placa petri que se selló con parafilm. Éste compuesto es muy volátil por lo que pasa rápidamente a fase vapor estando disponible para las bacterias.

**Solución 10X M9:** Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 70g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 30g; NH<sub>4</sub>Cl, 10g; NaCl, 5g; H<sub>2</sub>O hasta 1L.

**Solución A9:** HBO<sub>3</sub>, 300mg; ZnCl<sub>2</sub>, 50mg; CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 10mg; MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 30mg; CoCl<sub>2</sub>, 200mg; NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 20mg; NaMO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 30mg; H<sub>2</sub>O hasta 1L.



#### 4.3 Condiciones de cultivo

Las cepas de *Escherichia coli* se cultivaron a 37°C. El resto de cepas bacterianas y cepas fúngicas se cultivaron a 30°C. Los cultivos líquidos se incubaron con una agitación de 200 rpm en un incubador orbital.

#### 4.4 Antibióticos

Las soluciones de antibióticos de uso común se prepararon a una concentración 1000 veces superior a la concentración final de los ensayos, disolviéndolos en H<sub>2</sub>O destilada, excepto la rifampicina y la tetraciclina que se disolvieron en metanol, y el cloramfenicol que se preparó en etanol. Las soluciones preparadas en H<sub>2</sub>O se esterilizaron por filtración (utilizando filtros estériles de acetato de celulosa de 0,22 µm de diámetro de poro (Millipore, ref. SLGS033SS) y se almacenaron a -20°C. Los antibióticos se utilizaron generalmente a las concentraciones finales indicadas en µg/ml: ampicilina (Ap), 100; cloramfenicol (Cm), 30; Gentamicina (Gm), 10; kanamicina (Km), 25; ácido nalidíxico (Nal), 10; rifampicina (Rif), 20 y tetraciclina (Tc), 10.

### 5. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS DEGRADADORAS DE FENANTRENO

Para aislar bacterias degradadoras de PAHs se prepararon matraces con medio mínimo M9, fenantreno como única fuente de carbono y cicloheximida a una concentración de 4 mg/ml (p/v). A estos matraces se les añadió 1 g de suelo y se incubaron durante 3 días a 30°C y 200 rpm de agitación. Pasado este tiempo, se dejó que la tierra decantara y se tomó 1 ml de este cultivo con el que se inocularon matraces nuevos con el mismo medio. Este proceso se repitió dos veces más tras los cuales se sembraron diluciones seriadas de los cultivos en placas con fenantreno como única fuente de carbono. Se seleccionaron aquellas colonias que formaban halos de solubilización y se obtuvieron los cultivos puros mediante siembra por agotamiento en medio mínimo M9 con fenantreno. Para identificar las bacterias aisladas se extrajo ADN total de cultivos crecidos en medio LB, y mediante PCR se amplificó el gen que codifica el ARNr 16S usando los oligonucleótidos E8F y U1510R. El producto de la PCR se clonó en los vectores pMBL-T<sup>®</sup> o pGEM-T<sup>®</sup> y se transformó en cepas de *E. coli* DH5α. Estos plásmidos se aislaron y se enviaron a secuenciar. La comparación de las secuencias con las bases de datos se realizó con el programa BLAST (Altschul *et al.*, 1990) disponible en el servidor de internet del NCBI.

## 6. CONSTRUCCIÓN DE ÁRBOLES FILOGENÉTICOS

Con las secuencias completas del gen 16S de las bacterias aisladas se construyó un árbol filogenético. El alineamiento de las secuencias se realizó con el software disponible en la página SILVA rRNA database Project ([www.arb-silva.de/aligner](http://www.arb-silva.de/aligner)). El árbol filogenético se construyó a partir de una matriz de distancias aplicando el algoritmo de Jukes-Cantor (Jukes y Cantor, 1969). La matriz de distancias fue analizada mediante el método de Neighbor-Joining con el programa ARB (Ludwig *et al.*, 2004).

## 7. CEPAS MICROBIANAS Y SU CONSERVACIÓN

Los microorganismos utilizados en este trabajo, junto con sus genotipos y características más relevantes se recogen en la Tabla 01.

La conservación a corto plazo se realizó mediante estría en placa, en medios selectivos, almacenados a 4°C durante un periodo máximo de un mes. Para su almacenamiento a largo plazo se mantuvieron congeladas a -80°C con glicerol al 30% (v/v).

**Tabla 01. Cepas microbianas utilizadas en este trabajo**

Cepa	Características	Referencia
<b><i>Pseudomonas</i></b>		
<i>P. putida</i> KT2440	Cm <sup>R</sup>	Franklin <i>et al.</i> , 1981
<i>P. putida</i> G7	Nah <sup>+</sup>	Dunn y Gunsalus, 1979
<i>Pseudomonas</i> sp. S6	Phn <sup>+</sup>	Capítulo 1
<i>Pseudomonas</i> sp. R2	Phn <sup>+</sup>	Capítulo 1
<b><i>Sphingomonas</i></b>		
<i>Sphingomonas</i> sp. S1	Phn <sup>+</sup>	Capítulo 1
<i>Sphingomonas</i> sp. S5	Phn <sup>+</sup> , Nah <sup>+</sup>	Capítulo 1
<i>Sphingomonas</i> sp. R3	Phn <sup>+</sup> ,	Capítulo 1
<i>Sphingomonas</i> sp. R4a	Phn <sup>+</sup> , Nah <sup>+</sup>	Capítulo 1
<i>Sphingomonas</i> sp. HS5g	Phn <sup>+</sup> , Nah <sup>+</sup>	Capítulo 1
<i>Sphingomonas</i> sp. HR2b	Phn <sup>+</sup> , Nah <sup>+</sup>	Capítulo 1
<i>Sphingomonas</i> sp. HR2t	Phn <sup>+</sup> , Nah <sup>+</sup>	Capítulo 1
<i>Sphingomonas</i> sp. HR4a	Phn <sup>+</sup> , Nah <sup>+</sup>	Capítulo 1
<b><i>Sphingobium</i></b>		
<i>Sphingobium</i> sp. HS3p	Phn <sup>+</sup>	Capítulo 1
<i>Sphingobium</i> sp. HS5p	Phn <sup>+</sup> , Nah <sup>+</sup>	Capítulo 1

Cepa	Características	Referencia
<i>Sphingobium</i> sp. HR5a	Phn <sup>+</sup> , Nah <sup>+</sup>	Capítulo 1
<i>Sphingobium</i> sp. HR5b	Phn <sup>+</sup> , Nah <sup>+</sup>	Capítulo 1
<i>Sphingobium</i> sp. HR5r	Phn <sup>+</sup> , Nah <sup>+</sup>	Capítulo 1
<b><i>Novosphingobium</i></b>		
<i>Novosphingobium</i> sp. S7	Phn <sup>+</sup>	Capítulo 1
<i>Novosphingobium</i> sp. HS2a	Phn <sup>+</sup> , Nah <sup>+</sup>	Capítulo 1
<i>Novosphingobium</i> sp. HR1a	Phn <sup>+</sup> , Nah <sup>+</sup>	Capítulo 1
<i>Novosphingobium</i> sp. HR1b	Phn <sup>+</sup> , Nah <sup>+</sup>	Capítulo 1
<i>Novosphingobium</i> sp. HR3g	Phn <sup>+</sup> , Nah <sup>+</sup>	Capítulo 1
<b><i>Burkholderia</i></b>		
<i>Burkholderia</i> sp. MS3	Phn <sup>+</sup> , Nah <sup>+</sup>	Capítulo 1
<i>Burkholderia</i> sp. MS4b	Phn <sup>+</sup> , Nah <sup>+</sup>	Capítulo 1
<i>Burkholderia</i> sp. MS4t	Phn <sup>+</sup> , Nah <sup>+</sup>	Capítulo 1
<i>Burkholderia</i> sp. MR5	Phn <sup>+</sup> , Nah <sup>+</sup>	Capítulo 1
<i>Burkholderia</i> sp. HR3p	Phn <sup>+</sup> , Nah <sup>+</sup>	Capítulo 1
<b><i>Massilia</i></b>		
<i>Massilia</i> sp. HS1b	Phn <sup>+</sup>	Capítulo 1
<i>Massilia</i> sp. HS1t	Phn <sup>+</sup>	Capítulo 1
<b><i>Arthrobacter</i></b>		
<i>Arthrobacter</i> sp. S4	Phn <sup>+</sup> , Nah <sup>+</sup>	Capítulo 1
<i>Arthrobacter</i> sp. R7	Phn <sup>+</sup> , Nah <sup>+</sup>	Capítulo 1
<i>Arthrobacter</i> sp. HS3g	Phn <sup>+</sup> , Nah <sup>+</sup>	Capítulo 1
<i>Arthrobacter</i> sp. HS4-1	Phn <sup>+</sup> , Nah <sup>+</sup>	Capítulo 1
<i>Arthrobacter</i> sp. HS4-2	Phn <sup>+</sup> , Nah <sup>+</sup>	Capítulo 1
<b><i>Mycobacterium</i></b>		
<i>Mycobacterium</i> sp. S3	Phn <sup>+</sup>	Capítulo 1
<b><i>Escherichia coli</i></b>		
DH5 $\alpha$	<i>supE44</i> $\Delta$ <i>lacU169</i> ( $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15) <i>hsdR17</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i>	Hanahan, 1983 y 1985; Bethesda Research Laboratories, 1986)
<b><i>Fusarium</i></b>		
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> CECT 2715		Snyder y Hansen, 1954
<b><i>Ustilago</i></b>		
<i>Ustilago maydis</i> SG200	<i>a1:mfa2</i> <i>bE1</i> <i>bW2</i>	Kämper <i>et al.</i> , 2006

Las abreviaturas Ap<sup>R</sup>, Cm<sup>R</sup> que indican resistencia a ampicilina y cloramfenicol respectivamente. Phn<sup>+</sup>, Nah<sup>+</sup> significan capacidad de utilizar fenantreno y n-afeteno respectivamente como fuente de carbono.

## 8. ANTIBIOGRAMAS

Se sembró 1 ml de los cultivos de las bacterias de interés crecidos durante 24 horas a 30°C y en agitación en placas de medio LB. Las placas se dejaron secar, tras lo cual se colocaron en su superficie los discos con el antibiótico adecuado (bioMérieux). Las placas se incubaron a 30°C durante 2 días o hasta que se observó la formación de un césped. Finalmente se midió el diámetro de los halos de inhibición que se habían formado alrededor de los discos de antibióticos.

## 9. DETECCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS ANTIMICROBIANOS Y ANTIFÚNGICOS

Se analizó la capacidad de las bacterias aisladas para inhibir el crecimiento de *Pseudomonas putida* KT2440. Para ello se tomaron 0,5 ml de un cultivo de *P. putida* KT2440 crecido durante 12-16 horas y se sembraron en placas de LB. A continuación, en estas placas se inocularon 20 µl de un cultivo de la bacteria de interés crecido durante 16-24h. Las placas se incubaron a 30°C durante 2-3 días y se observó si aparecían halos de inhibición en el césped formado por KT2440.

Para la detección rápida de la producción de compuestos antifúngicos, se analizó la capacidad de inhibición del crecimiento de los hongos *Fusarium oxysporum* subsp. *lycopersici* CECT2715 y *Ustilago maydis* por varias de las cepas degradadoras de fenantreno identificadas en los aislamientos iniciales. *Fusarium* se cultivó en placas de medio PDA, en las que el hongo se inoculó en el centro y alrededor, a una cierta distancia, se inoculó una gota de 20 µl del cultivo bacteriano (crecido durante 24 horas en medio LB). Tras una semana de incubación se analizó el crecimiento del micelio. Para *Ustilago* se sembró 1ml de un cultivo líquido en placas de medio PDA en las que también se colocaron las bacterias en gotas. A los dos días se analizó el color del césped formado por el hongo, un color blanquecino es indicativo de una correcta maduración.

## 10. ADHESIÓN A SUPERFICIES BIÓTICAS

En los ensayos de adhesión se han estudiado dos plantas: *Trifolium pratense* conocido como trébol blanco y *Sinapis alba* cuyo nombre común es mostaza blanca. Las cepas bacterianas utilizadas fueron: *Pseudomonas* sp. S6; *Sphingobium* sp. S1, HS5p y HR5a; *Novosphingobium* sp. HS2a y HR1a y *Burkholderia* sp. MS3, MR5 y HR3p. En los ensayos de adhesión competitiva se incluyó la cepa *Pseudomonas putida* KT2440.

### 10.1 Esterilización de semillas

Las semillas se esterilizaron superficialmente, sometiéndolas a 2 lavados con etanol al 70 % (v/v) durante 15 min y otros dos lavados con lejía al 20 % (v/v) también durante 15 min. Seguidamente se lavaron con agua bidestilada agitando intensamente para eliminar completamente la lejía, y finalmente se dejaron secar. Las semillas ya secas se guardaron en oscuridad un máximo de 48 horas hasta su utilización.

### 10.2 Germinación de semillas

Las semillas necesitan un ambiente muy húmedo para germinar, por lo que se prepararon cámaras de germinación en las que el grado de humedad era alto. Estas cámaras de germinación consisten en una placa petri en la que se colocaron dos trozos de papel de filtro circulares estériles, uno en el fondo y otro en la tapadera. Los papeles se humedecieron con agua bidestilada y sobre la tapadera se colocaron las semillas previamente esterilizadas. Las semillas de las dos plantas se dejaron germinar a temperatura ambiente durante 2-3 días.

### 10.3 Adhesión a semillas y raíces de trébol y mostaza

Para cuantificar la adhesión de las bacterias a semillas y raíces se siguió el método descrito por Espinosa-Urgel *et al.*, 2000.

A partir de un cultivo de la bacteria de interés crecido durante 24 horas en medio LB, se preparó una dilución 1/100 en solución M9 1X. Se tomaron 0,1 ml de esta dilución y se añadió a un tubo eppendorf que contenía las semillas o raíces y 0,9 ml de solución M9 1X. Éste se incubó durante una hora a temperatura ambiente para que tuviera lugar la adhesión. En este tiempo, se hicieron diluciones seriadas del cultivo de partida y se sembraron en placas de medio LB, para cuantificar el número de unidades formadoras de colonias (UFC) iniciales. Transcurrida la hora, se eliminó por decantación la solución M9 1X y las semillas o raíces se lavaron tres veces con nueva solución M9 1X agitando con vórtex para eliminar las bacterias no adheridas. Posteriormente, al tubo se le añadió 1 ml de medio LB y 5-7 perlas de vidrio de 3 mm de diámetro, y se agitó durante 30 – 40 segundos con vórtex para despegar las bacterias adheridas. Finalmente se hicieron diluciones seriadas y se sembraron en placas de medio LB, para realizar el conteo de UFC adheridas. Cada uno de estos ensayos se repitió al menos tres veces. Las placas se incubaron a 30°C de 2 a 3 días.

Para los experimentos de adhesión a semillas, se utilizaron seis semillas en el caso del trébol y una en el caso de la mostaza. Para realizar los ensayos de adhesión a raíz, se colocaron en el tubo seis ápices de 3-4 mm de longitud para ambas plantas.

#### 10.4 Adhesión competitiva a raíz de trébol

Los experimentos de adhesión competitiva se realizaron con ápices de raíces de trébol. Se analizó la capacidad de adhesión de las bacterias degradadoras de PAHs aisladas en competencia con *Pseudomonas putida* KT2440. Se inocularon dos cultivos en medio LB, uno con la bacteria a ensayar y otro con *Pseudomonas putida* KT2440, y se dejaron crecer durante 24 horas a 30°C con agitación. Pasado este tiempo, se midió la turbidez ( $DO_{660}$ ) de cada uno de los cultivos y se ajustó a 1 en medio LB. A partir de los cultivos de densidad óptica ajustada se prepararon diluciones 1/100 en solución M9 1X, y de éstas se tomaron 0,1 ml de cada una de las bacterias y se añadieron a un tubo eppendorf que contenía las raíces y 0,8 ml de solución M9 1X. Los tubos se dejaron una hora a temperatura ambiente para que tuviera lugar la adhesión. En este periodo de tiempo se prepararon diluciones seriadas de los cultivos diluidos y se sembraron en placas de LB para contar el número de células iniciales. Transcurrida la hora, se procedió tal y como se describe en el apartado 10.3, con la única diferencia de que en este caso las diluciones se sembraron en medios selectivos para cada una de las cepas.

### 11. SISTEMAS GNTOBIÓTICOS

Para estudiar la asociación de las bacterias aisladas y la planta modelo *Trifolium repens*, así como para analizar las capacidades degradativas de las bacterias en asociación con dicha planta, se diseñaron sistemas gnotobióticos. Estos sistemas consisten en tubos de ensayo de 22 mm de diámetro a los que se les añaden perlas de vidrio de 3 mm de diámetro como soporte, 2 ml de solución acuosa  $H_2O$ -FeEDTA con las bacterias en suspensión y las semillas de la planta.

#### 11.1 Montaje de sistemas gnotobióticos

Se añadieron perlas de vidrio a los tubos de ensayo hasta una altura aproximada de 1,5 cm. Los tubos se cerraron, se esterizaron en autoclave y se dejaron secar en estufa a 65°C durante 24 horas. Se midió la turbidez ( $DO_{660}$ ) de un cultivo de la bacteria de interés crecido durante 24 horas en medio LB, posteriormente las células se lavaron con solución de Fe-EDTA y se ajustó la D.O. a 0,005 en dicha solución. A cada tubo se le añadieron 2 ml de la solución acuosa conteniendo la bacteria y 10 semillas previamente esterilizadas.

Para los ensayos de degradación en estos sistemas, se añadió fenantreno a la solución acuosa. Para ello 24 horas antes del montaje se preparó una suspensión de

cristales de fenantreno en agua destilada a la concentración deseada, y se dejó en agitación durante un día a 30°C y agitación de 200 rpm. En el momento del montaje, se añadió Fe-EDTA a una concentración final de 2,5 mM y las bacterias a la D. O. deseada. A cada tubo de ensayo se le añadieron 2 ml de esta suspensión.

Los tubos se incubaron a temperatura ambiente un máximo de 15 días, ya que a los 20–25 días las plantas de trébol empiezan a marchitarse debido a la carencia de nutrientes.

**Solución H<sub>2</sub>O-FeEDTA:** Fe-EDTA 2,5 mM en agua bidestilada estéril.

## **11.2 Desmontaje de sistemas gnotobióticos**

Todo el desmontaje se realizó en condiciones de esterilidad. En primer lugar se extrajeron las plantas y se colocaron en tubos Falcon de 50 ml a los que se les añadieron 2 ml de agua y perlas de vidrio hasta la marca de 5 ml. Los tubos se agitaron en vórtex durante 30 – 40 segundos para separar las bacterias unidas a las raíces de las plantas. Se recogieron los 2 ml de agua con las bacterias, se hicieron diluciones seriadas y se sembraron en placas de medio LB para hacer el recuento de las UFC. Una vez extraídas las bacterias de las raíces, se recogieron las plantas en placas de petri, se eliminó el exceso de agua con papel de filtro y se midió la longitud del tallo y la raíz. Finalmente, las raíces se cortaron y se introdujeron en tubos eppendorf previamente pesados. El peso húmedo de la raíz se determinó calculando la diferencia de peso de los tubos vacíos y los tubos con las raíces.

Por otro lado, para calcular el número de bacterias en la fracción acuosa de los sistemas gnotobióticos (bacterias no adheridas a la raíz), se recogió el volumen de agua de los tubos de ensayo y se ajustó a 2 ml (que era el volumen inicial que añadimos). De esta forma evitamos que la pérdida de agua por evaporación o debida a las plantas influya en el recuento de las UFC o en la determinación de la concentración de fenantreno. Finalmente se hicieron diluciones seriadas y se sembraron en placas de medio LB. En los casos en los que hubo que determinarse la concentración de fenantreno, se tomaron 0,5 ml de la solución acuosa para su análisis por HPLC.

Se tomaron puntos al inicio (trascorrida 1 hora del montaje) y a los 4, 7 y 14 días. Todas las placas se incubaron a 30°C durante 2-3 días tras los cuales se llevó a cabo el recuento de las unidades formadoras de colonias (UFC).

### 11.3 Preparación de exudados radicales de trébol

Para la preparación de exudados radicales de trébol, las semillas previamente esterilizadas, se germinaron en los sistemas gnotobióticos descritos anteriormente. Las plantas se cultivaron en esterilidad de 4 a 10 días a temperatura ambiente. Para la preparación de los exudados, el mismo día de su utilización se recogió el medio de cultivo en el que estaban germinando y creciendo las plantas.

## 12. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

Para la detección de PAHs se utilizó el sistema HP Agilent 1050 series (Hewlett Packard) con un detector de ultravioleta (400nm). Se utilizó la columna Nova-Pack® C18 Cartridge 4µm, 3.9x150 mm (Waters, ref. WAT036975) con un flujo de 0,850 ml/min. La fase móvil consistió en un gradiente isocrático 50% acetonitrilo, 50% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> en agua al 0,1% (v/v).

Las muestras se prepararon de la siguiente forma: se recogieron 0,5 ml del medio en el que estuvieran creciendo las células y se añadió un volumen de metanol. Se agitó durante 30 – 40 segundos en vórtex para disolver los cristales de fenantreno y todo el volumen (1 ml) se colocó en los viales para su análisis.

## 13. AISLAMIENTO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

### 13.1 Aislamiento de ADN total bacteriano

Se utilizó el método descrito por Ausubel *et al.* (1991) partiendo de 1 ml de cultivo bacteriano. Tras recoger las células por centrifugación y lavarlas con tampón TE, éstas fueron resuspendidas en 567 µl de la misma solución, a la que se añadió posteriormente 30 µl de SDS al 10% (v/v), y 3 µl de proteinasa K (20 mg/ml). Tras 1 hora de incubación a 37°C, se les añadieron 100 µl de NaCl 5 M, agitando vigorosamente, y 80 µl de solución CTAB/NaCl. La mezcla se incubó 10 min a 65°C. Posteriormente se hicieron dos extracciones con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), y una extracción final con cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) para eliminar los posibles restos de fenol. Se añadieron a la fase acuosa 0,6 volúmenes de isopropanol para la precipitación del ADN. Posteriormente se hicieron dos lavados con etanol 70% (v/v). Finalmente el ADN se resuspendió en agua bidestilada estéril y se cuantificó espectrofotométricamente en un equipo NanoDrop ND-1000.

**Tampón TE:** Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 M.

**Solución CTAB/NaCl:** bromuro de hexadeciltrimetilamonio 10% (p/v) en cloruro de sodio 0,7M.



### 13.2 Aislamiento de plásmidos de pequeño tamaño

La cepa bacteriana portadora del plásmido de interés se cultivó con agitación durante 12-16 horas a su temperatura óptima en medio líquido LB con el antibiótico correspondiente. Para la extracción del plásmido se usó el Kit "Plasmid Miniprep Kit" (Bio-Rad, ref. 732-6100) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 13.3 Aislamiento de plásmidos de gran tamaño

El aislamiento de plásmidos de gran tamaño se llevó a cabo siguiendo una modificación del método de lisis alcalina descrito por Zhou *et al.* (1990). Se recogieron 0,5 ml del cultivo bacteriano crecido durante toda una noche mediante centrifugación. Posteriormente se eliminó la mayor parte del sobrenadante y las células se resuspendieron en el líquido remanente. Las muestras se colocaron en hielo y se les añadieron 0,3 ml de solución TENS y ARNasa A (100 µg/ml). Las muestras se neutralizaron con 150 µl de acetato sódico 3 M pH 5.2 y se centrifugaron a 4°C (13000g, 10 min). Las proteínas se eliminaron mediante extracciones sucesivas con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) y cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Finalmente se añadieron 0,6 volúmenes de isopropanol (30 min a -20 °C) y el ADN plasmídico se precipitó centrifugando a 13000g, 10 min a 4°C y se resuspendió en 30 µl de agua bidestilada.

**Solución TENS:** 10mM Tri-HCl pH 8, 1mM EDTA, 0,1N NaOH y SDS 10% (v/v).

### 13.4 Aislamiento de ARN

Para la preparación de ARN se recogieron 10 ml de un cultivo crecido durante 7,5 h en medio mínimo con glucosa y naftaleno como fuentes de carbono. Los cultivos se recogieron en tubos de centrifuga previamente enfriados en nitrógeno líquido. Se eliminó el sobrenadante por centrifugación a 4°C, y los sedimentos celulares se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta la extracción del ARN. La extracción del ARN se llevó a cabo usando el reactivo TRI-Reagent (Ambion, ref. 9738), para ello a las muestras resuspendidas en 0,2 ml de H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> se le añadieron 0,750 ml de este reactivo y se dejaron incubando durante 10 min a 65°C. Pasado este tiempo se centrifugaron a 13000 g a 4°C. Se recogió el sobrenadante, al cual se le añadió 0,2 ml de cloroformo. Los tubos se agitaron vigorosamente, tras lo cual se dejaron reposar durante 5-10 min a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se centrifugaron a 13000g durante 15 min a 4°C. El sobrenadante, donde se encuentra el ARN, se recogió y precipitó mediante la adición de 0,5 ml de isopropanol.

Transcurridos 5-10 min a temperatura ambiente se centrifugó durante 10 min a 13000g a 4°C. Finalmente las muestras se lavaron con etanol al 70%, se dejaron secar en estufa a 37°C y se resuspendieron en 30 µl de agua DEPC.

Para eliminar el ADN presente en las muestras, éstas fueron tratadas con ADNasa I de páncreas bovino. A cada una de las muestras se le añadieron 25 µl de una solución de agua DEPC que contenía 20 U de inhibidor de ARNasas, ditiotreitól (DTT) 4mM, MgCl<sub>2</sub> 40mM y 10U de ADNasa I libre de ARNasas (Roche Applied Science, ref. 04655877001). La mezcla de reacción se incubó durante 1 hora a 37°C.

Durante todo el proceso de extracción es muy importante usar guantes, y cambiarlos frecuentemente. Además hay que usar puntas sin autoclavar obtenidas de una bolsa recién abierta, material de vidrio tratado previamente con cloroformo y soluciones tratadas con dietilpírocarbonato (DEPC) o preparadas en H<sub>2</sub>O tratada con DEPC (H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub>) para evitar la degradación del ARN por ribonucleasas. El H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> se obtiene tras esterilizar por autoclave una solución de DEPC al 0,1% (v/v) en H<sub>2</sub>O incubada previamente al menos durante 60 min a temperatura ambiente y en agitación.

## **14. MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS**

### **14.1 Determinación de la concentración de ADN y ARN**

Para estimar la concentración de ADN de una solución se hizo espectrofotométricamente utilizando el equipo NanoDrop ND-1000. La relación  $A_{260}/A_{280}$  se utilizó para estimar el grado de pureza de la preparación, de forma que los valores de esta relación por debajo de 1,8 se consideraron indicadores de contaminación por proteínas o fenol.

En otros casos, se estimó la concentración mediante electroforesis en gel de agarosa, mediante análisis comparativo con una muestra patrón de concentración conocida.

### **14.2 Electroforesis de ADN y ARN en geles de agarosa**

La electroforesis de ADN se llevó a cabo según Sambrook y colaboradores (1989). Por cada 10µl de muestra a analizar se añadió 1µl de tampón de carga, y la mezcla se depositó en un pocillo del gel de agarosa preparado en tampón Tris/Acetato/EDTA (TAE), sumergido en una cubeta con el mismo tampón. La concentración de agarosa usada varió entre 0,8-2% (p/v) en función del tamaño de los fragmentos que se deseaban separar. Como patrones de peso molecular se usaron

los fragmentos de ADN del fago lambda cortado con la enzima *HindIII*, o una combinación de *HindIII* y *EcoRI* y el marcador comercial VIII (Roche Applied Science, ref. 11336045001). La separación se realizó por electroforesis horizontal sumergida a un voltaje de 5-10 V/cm.

Para el ARN se siguió este mismo procedimiento con las variaciones siguientes: todo el material de electroforesis se enjuagó previamente en una solución de 1% (p/v) de SDS y se aclaró con una solución autoclavada 1:1000 de DEPC en H<sub>2</sub>O. El tampón TAE se preparó en una solución autoclavada de 1:1000 DEPC en H<sub>2</sub>O. La concentración de la agarosa en el gel fue del 1,5 % (p/v) y se acompañó de SDS 0,1% (p/v). Todo el material de vidrio para preparar las soluciones se trató previamente con cloroformo para eliminar las posibles contaminaciones con ARNasas.

Las moléculas de ADN se tiñeron por inmersión del gel en una solución de GelRed® 1 X (VWR, ref. 730-2958), posteriormente el gel se lavó con agua para eliminar el exceso de tinción. El ARN se tiñó añadiendo 1µl de una solución de GelRed® 30X a la muestra. Los ácidos nucleicos se visualizaron mediante la exposición del gel a luz ultravioleta (245nm). Las imágenes se recogieron en una videocámara acoplada a una impresora térmica, utilizando el equipo Gel-Doc de Bio-Rad.

La composición de los tampones y soluciones empleados en este procedimiento fue la siguiente:

**Tampón TAE 1X:** Tris-base 4,84g; ácido acético glacial 1,14ml; EDTA-Na<sub>2</sub> 0,5M pH 8 2ml y H<sub>2</sub>O hasta 1 litro. Este tampón se preparó a partir de una solución 50 veces concentrada y esterilizada en autoclave.

**Tampón de carga:** glicerol al 30% (v/v), azul de bromofenol 0,3% (p/v) y xilencianol 0,3% (p/v).

### **14.3 Recuperación de fragmentos de ADN de los geles de agarosa**

Para la extracción de fragmentos de ADN de agarosa se utilizó el sistema comercial “QIAquick Gel Extraction Kit” (QIAGEN, ref. 28706), siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **14.4 Digestión de ADN con enzimas de restricción**

Las digestiones de ADN con enzimas de restricción se realizaron en las condiciones óptimas para cada enzima indicadas por el fabricante. Las reacciones contenían habitualmente 0,5–10 µg de ADN, 0,1 volúmenes del tampón de restricción

correspondiente suministrado por la casa comercial (10 volúmenes con centrado) y 0,5– 1 unidades de la enzima de restricción, en volúmenes finales de 20 µl completados con agua bidestilada estéril.

Las digestiones de plásmidos se llevaron a cabo incubando las mezclas de reacción durante 2 horas a la temperatura indicada por el fabricante, mientras que las restricciones de ADN cromosómico se incubaron 12–16 horas.

#### **14.5 Ligación de ADN**

Para la ligación de moléculas de ADN se partió de plásmidos lineales (pMBL-T<sup>®</sup>, pGEM-T<sup>®</sup>) o linearizados por digestión con enzimas de restricción en sitios compatibles para la ligación. En aquellos casos en los que el vector se linearizó con enzimas de restricción, éste se trató con fosfatasa alcalina para evitar su recircularización. Para ello al ADN lineal se le añadió 1 unidad de fosfatasa alcalina (Roche Applied Science, ref. 04898 133001) por cada 5–10 pmoles de extremos 5'. A la mezcla se le añadió 0,1 volúmenes del tampón de defosforilación suministrado por el fabricante y se incubó durante media hora a 37°C. Finalmente la reacción se detuvo por calor (10 minutos a 65°C).

Para llevar a cabo la ligación, el vector lineal y el fragmento de ADN correspondiente se mezclaron en una proporción adecuada. Se añadió también 0,1 volumen de tampón de ligación (suministrado por el fabricante) y una unidad de ADN ligasa del fago T4 y se llevó a un volumen final de 10-15 µl con agua bidestilada estéril. La mezcla se incubó a 16°C durante 12-14 horas, tras las cuales se introdujo en la cepa adecuada por alguno de los métodos descritos en el apartado 16.

#### **14.6 Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa termorresistente (PCR)**

Este método se utilizó para la amplificación de fragmentos de ADN del cromosoma, para el análisis de colonias obtenidas tras la transformación de ligaciones (para encontrar de forma rápida clones con los fragmentos de interés), y para la amplificación de fragmentos a los que se les añadió sitios de restricción adecuados flanqueando los fragmentos de ADN de interés. La reacción estándar de amplificación contenía: ADN molde (0,2 ng de ADN cromosómico o 10 pg de ADN plasmídico), oligonucleótidos (25 – 50 moles), 0,1 volúmenes del tampón de la Taq ADN-polimerasa (KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, Tris-HCl 10 mM p H 9), dNTPs 25-50 µg de cada uno, Taq ADN-polimerasa 0,1 U/25µl y H<sub>2</sub>O hasta un volumen final de 25µl.

Las condiciones estándar de la reacción de amplificación fueron las siguientes: tras una desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min, se realizaron 30 ciclos en las siguientes condiciones: 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 50°C (temperatura de hibridación) y un minuto para cada 1 Kb de ADN del fragmento que queremos amplificar a 72°C, tras los cuales se hizo una extensión final a 72°C durante 7 minutos. La temperatura de hibridación varió en función de la temperatura de fusión de los oligonucleótidos utilizados. Cuando la reacción estándar no resultó satisfactoria, se combinaron distintas modificaciones en la concentración de MgCl<sub>2</sub> (incrementándola a 3 mM) y/o se añadieron ciertos compuestos en la mezcla de reacción, como por ejemplo soroalbúmina bovina (0,5 - 1 mM) o DMSO al 5% (v/v). Cuando fue necesario, el producto de la amplificación se purificó utilizando el sistema comercial "QIAquick Gel Extraction Kit" (QUIAGEN, ref. 28704) para eliminar los oligonucleótidos y dNTPs incorporados.

Los oligonucleótidos utilizados en la construcción de plásmidos se muestran en la Tabla 02, y los empleados en la identificación de los genes degradativos de las cepas aisladas en la Tabla 03.

**Tabla 02. Oligonucleótidos utilizados en la construcción de plásmidos**

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Enzima de restricción	Plásmido
PphnAc - For	<u>GGAATTC</u> CAGGCGGCTCCTTTC	EcoRI	pPSM / pPSH
PphnAc - Rev	GCTGCAGCACCGATCGATTGAC	PstI	pPSM / pPSH
PphnAc II - For	<u>GGAATTC</u> ATGGGCCGAATTGCAC	EcoRI	pPCM / pPCH
PphnAc II - Rev	GCTGCAGTCGCCATCTTGTCTC	PstI	pPCM / pPCH
PromIR - For	<u>GCTGCAGC</u> AGGCGGCTCCTTTC	PstI	pPRM / pPRH
PromIR - Rev	<u>GGAATTC</u> CACCGATCGATTGAC	EcoRI	pPRM / pPRH
PromAf - For	<u>GGAATTC</u> AGAACGCCAGCGTCA	EcoRI	pPBH
PromAf - Rev	GCTGCAGCCTGCCGCGACAAGAT	PstI	pPBH
mutS - For	ACGTGTCAGCACTCGTTACC	-	pMSMΩKm
mutS - Rev	GATGGCTGTCGACCACCAAT	-	pMSMΩKm
mutR - For	AACGCCAAGCACCGGTT	-	pMRMΩKm
mutR - Rev	AGGACTATGCGAGCTAC	-	pMRMΩKm

La secuencia reconocida por la enzima de restricción se indica mediante subrayado.

**Tabla 03. Oligonucleótidos utilizados en la identificación de los genes degradativos**

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Cepa	Referencia
ndoB-65F	CGATGAAGAACTTTTCCA	<i>Pseudomonas putida</i> NCIB9816	Kurkela <i>et al.</i> , 1988
ndoB-1290R	CAGCCCAGTTGGAGCTGCTG		
phnA1a-12F	ACCACACTCGTAGACACTG	<i>Sphingomonas</i> sp. CHY-1	Demanèche <i>et al.</i> , 2004
phnA1a-1353R	GCTGCAGTCATTCGGCCGCGTTG		
bph1	CATCGTCGCTTTTCGAGCGTT	<i>Sphingomonas aromaticivorans</i> F199	Romine <i>et al.</i> , 1998
bph2	TCTGGGACGGTCCGGACGGT		
phnAc-128F	ACGCATGAATGCGCTATTCC	<i>Burkholderia</i> sp. RP007	Laurie y Lloyd-Jones, 1999
phnAc-987R	ACGTCAATACCTCGGTC		

#### 14.7 Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa termorresistente acoplada a una reacción de transcripción reversa (RT-PCR)

Con las muestras de ARN libre de ADN se llevaron a cabo reacciones de amplificación utilizando el kit “*The Titan One Tube RT-PCR Kit*” (Roche Applied Science, ref. 11939823001) utilizando los oligonucleótidos adecuados para cada caso. Se incluyeron controles positivos y negativos en cada experimento. Las condiciones generales de amplificación fueron: 50°C 1 h; 94°C, 2min; y luego 30 ciclos de 94°C, 30 seg; 53°C, 30 seg; 68°C, 1min. Los productos de RT-PCR se separaron en geles de agarosa, y se tiñeron y visualizaron tal como se indica en el apartado 14.2.

**Tabla 04. Oligonucleótidos utilizados en las RT-PCR**

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Tamaño del fragmento amplificado
1F (P1800F)	AGTCCGCGTAAGTCGTCATT	616 pb
1R (P2415R)	GTTGACGCTACGAAGATTGC	
2F (P3269F)	GCGCCGACCTGTATTGGCTA	520 pb
2R (P3788R)	TCAGCCGCCTTGAGCAGGAT	
3F (P4679F)	CTCCGGCCATGCGTATCTAT	562 pb
3R (P5240R)	GTTACGCGCGGAATCGATCA	
4F (P5974F)	CCTATCACATTGCGCCAGAA	631 pb
4R (P6604R)	AGGCGCTCGACAATGATTGC	
5F (P7271F)	TTGCGGCTGCGGTTATATGG	765 pb
5R (P8035R)	CCATGCTCAACGTGATGAA	

Nombre	Secuencia (5' →3')	Tamaño del fragmento amplificado
6F (P9284F)	GGTTAATGCGCGTAGCAATG	832 pb
6R (P10115R)	CGCCGGTAATGATAGTGACA	

#### 14.8 Secuenciación de ADN

La secuenciación de ADN se realizó en la Unidad de Genómica y Síntesis de DNA del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra” (CSIC) y en Secugen SL. Las muestras se prepararon según las especificaciones de cada centro.

### 15. PLÁSMIDOS

En la Tabla 05 se muestran los plásmidos utilizados en este trabajo junto con sus características más relevantes. A continuación se describen con más detalle las características de algunos de estos plásmidos.

**Tabla 05. Plásmidos utilizados en este trabajo**

Plásmido	Características	Referencia
pGEM-T	Ap <sup>R</sup> , vector de clonaje para fragmentos de PCR	Promega
pMBL-T	Ap <sup>R</sup> , vector de clonaje para fragmentos de PCR	Dominion-mbl
pHP45ΩKm	Ap <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> ; oriColE1, porta el interposón ΩKm	Fellay <i>et al.</i> , 1987
pMP220	Tc <sup>R</sup> ; IncP, amplio espectro de huésped, porta un gen <i>lacZ</i> sin promotor	Spaink <i>et al.</i> , 1987

**pGEM-T<sup>®</sup> y pMBL-T<sup>®</sup>:** son vectores que se usan para ligar productos de PCR. Estos vectores son cortados con *EcoRV* y se les añade una timidina en cada extremo 3' para mejorar la eficiencia de ligación. Estos vectores están basados en pUC18, y contienen el origen de replicación del fago filamentoso f1 y pueden ser utilizados para producir ADN de cadena sencilla. El plásmido contiene los promotores T7 y SP6 de la ARN polimerasa flanqueando el sitio de clonación múltiple, dentro de la región codificante del péptido-α de la enzima β-galactosidasa. La inactivación mediante inserción del péptido-α permite identificar directamente los clones recombinantes mediante selección de color.

**pHP45Ω-Km:** plásmido de aproximadamente 4,6 Kb derivado de pBR322. Fuente del interposón Ω-Km, que se puede escindir como un fragmento de restricción *EcoRI*, *HindIII* o *BamHI* (Fellay *et al.*, 1987). El interposón Ω-Km posee un gen de

resistencia a kanamicina flanqueado por el terminador transcripcional del gen  $\lambda$  32 del fago T4D obtenido del plásmido pMJK4-18 (Krisch y Selzer, 1981) y por codones de terminación de la traducción en las tres fases de lectura, obtenidos del plásmido pKTH604 (Pettersen *et al.*, 1983). La eficiencia de esta secuencia como sitio de terminación de la transcripción para la ARN polimerasa se ha demostrado mediante experimentos *in vivo* e *in vitro* (Prentki y Krisch, 1984). El plásmido pHP45  $\Omega$ Km confiere resistencia a ampicilina y kanamicina.

**pMP220:** plásmido de aproximadamente 10,5 Kb derivado del vector pTJS75 (Schmidhauser y Helinski, 1985) perteneciente al grupo de incompatibilidad IncP. Posee el sitio de clonación múltiple (MCS) de pIC20H (Marsh *et al.*, 1984) y contiene el gen *lacZ* de *E. coli* sin promotor y con el sitio de unión al ribosoma del gen *cat* (que codifica la enzima cloramfenicol acetiltransferasa). La clonación de promotores delante del gen *lacZ* permite medir la expresión de los mismos como actividad  $\beta$ -galactosidasa (Spaink *et al.*, 1987). Confiere resistencia a tetraciclina.

Los plásmidos construidos en este trabajo se describen detalladamente en la siguiente tabla:

**Tabla 06. Plásmidos construidos en este trabajo**

Plásmido	Características	Referencia
pPSM	Fusión transcripcional del promotor de <i>phnS</i> a <i>lacZ</i> en el plásmido pMP220; región promotora (529 pb) amplificada por PCR en la cepa MS3 introduciendo los sitios de restricción <i>EcoRI-PstI</i> .	Capítulo 3
pPSH	Fusión transcripcional del promotor de <i>phnS</i> a <i>lacZ</i> en el plásmido pMP220; región promotora (530 pb) amplificada por PCR en la cepa HR3p introduciendo los sitios de restricción <i>EcoRI-PstI</i> .	Capítulo 3
pPRM	Fusión transcripcional del promotor de <i>phnR</i> a <i>lacZ</i> en el plásmido pMP220; región promotora (529 pb) amplificada por PCR en la cepa MS3 introduciendo los sitios de restricción <i>PstI-EcoRI</i> .	Capítulo 3
pPRH	Fusión transcripcional del promotor de <i>phnR</i> a <i>lacZ</i> en el plásmido pMP220; región promotora (530 pb) amplificada por PCR en la cepa HR3p introduciendo los sitios de restricción <i>PstI-EcoRI</i> .	Capítulo 3
pPCM	Fusión transcripcional del promotor de <i>phnC</i> a <i>lacZ</i> en el pMP220; región promotora (458 pb) amplificada por PCR en la cepa MS3 introduciendo los sitios de restricción <i>EcoRI-PstI</i> .	Capítulo 3



Plásmido	Características	Referencia
pPCH	Fusión transcripcional del promotor de <i>phnC</i> a <i>lacZ</i> en el plásmido pMP220; región promotora (458 pb) amplificada por PCR en la cepa HR3p introduciendo los sitios de restricción <i>EcoRI-PstI</i> .	Capítulo 3
pPBH	Fusión transcripcional del promotor de <i>bphA1</i> a <i>lacZ</i> en el plásmido pMP220; región promotora (505 pb) amplificada por PCR en la cepa HS2a introduciendo los sitios de restricción <i>EcoRI-PstI</i> .	Capítulo 3
pMRM $\Omega$ Km	Posee un fragmento de 920 pb del gen <i>phnR</i> amplificado en MS3 y clonado en el plásmido pMBL. Posee el interposón $\Omega$ -Km del plásmido pHP45 $\Omega$ -Km.	Capítulo 3
pMSM $\Omega$ Km	Posee un fragmento de 432 pb del gen <i>phnS</i> amplificado en MS3 y clonado en el plásmido pMBL. Posee el interposón $\Omega$ -Km del plásmido pHP45 $\Omega$ -Km.	Capítulo 3

## 16. TRANSFERENCIA DE PLÁSMIDOS

### 16.1 Transferencia por choque térmico

Existen una serie de estrategias que nos permiten introducir plásmidos o fragmentos de ADN, en células que han sido tratadas previamente mediante una serie de técnicas que las hacen susceptibles de admitir ADN extraño, adquiriendo un estado que se denomina competente. Estas estrategias se llevan a cabo en cepas de *E. coli*.

#### 16.1.1 Preparación de células competentes

Para preparar células competentes existen distintos métodos, en este caso usamos una variación del método descrito por Cohen *et al.* (1972).

Partimos de un cultivo que haya estado creciendo durante 12 h a 37°C con agitación, en LB suplido con su antibiótico correspondiente. De éste se inocularon 0,5 ml en 100ml de LB en un matraz de 500 ml (es importante que exista suficiente aireación). Cuando el cultivo alcanzó la fase exponencial de crecimiento (DO<sub>660</sub> de 0,4 – 0,5), se recogieron las células mediante centrifugación a 4°C y se resuspendieron en 50 ml de una solución de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M frío. Las células se incubaron durante una hora en hielo en cámara fría y con agitación orbital. Transcurrido este tiempo, se volvieron a recoger las células por centrifugación y se resuspendieron en 10 ml de solución de CaCl<sub>2</sub> dejándose cuatro horas más en agitación. Finalmente se añadió glicerol hasta el 20% (v/v) y se prepararon alícuotas de 0,2 ml en tubos eppendorf. Las células se guardaron a -80°C un máximo de tres meses.

### 16.1.2 Transformación

Se siguió el método descrito por Nishimura *et al.* (1990). Una alícuota de la suspensión celular preparada anteriormente, mantenida a  $-80^{\circ}\text{C}$ , y a la que se le añadió el ADN plasmídico que queríamos transformar, se dejó en hielo durante 20 min. Pasado este tiempo, se aplicó un choque térmico a la mezcla: sometíendola a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 40 segundos y luego frío (se introduce el tubo en hielo) durante 3 min. Posteriormente se añadió 1 ml de medio LB y se dejó a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 1 h con agitación a 200 rpm. Durante este tiempo tiene lugar la expresión de genes, entre los que se encuentran los de resistencia al antibiótico del plásmido introducido. Las células transformantes se seleccionaron recreciéndolas en placas de LB con el antibiótico adecuado durante 12h a  $37^{\circ}\text{C}$ .

## 16.2 Transferencia por electroporación

Este método es el que hemos utilizado para transformar todas las cepas utilizadas en este trabajo a excepción de *E. coli* (que se transformó mediante choque térmico).

### 16.2.1 Preparación de células electrocompetentes

El método utilizado es una modificación del descrito por Choi *et al.* (2006).

Se recogió 1 ml del cultivo crecido en LB durante 12 h a  $30^{\circ}\text{C}$ . Seguidamente se hicieron dos lavados para eliminar las sales del medio, para ello las células se centrifugaron a 12000 rpm 1 min y se resuspendieron en 1 ml de sacarosa 0,3 M fría. Después de los lavados, las células se resuspendieron en 0,1 ml de la solución de sacarosa y se mantuvieron en hielo hasta el pulso eléctrico.

### 16.2.2 Electroporación

Se añadieron 10-50 ng de ADN plasmídico a las células electrocompetentes. Se dejaron 1 minuto en hielo y posteriormente se transfirieron a una cubeta de electroporación de 1mm de anchura previamente enfriada. La muestra se sometió a un pulso eléctrico de 18 kV/cm en un electroporador modelo EC100 (E-C Apparatus Corporation). Rápidamente se resuspendieron en un 1 ml de medio LB y se incubaron a  $30^{\circ}\text{C}$  y 200 rpm durante dos horas. Las células transformantes se seleccionaron recreciéndolas en placas de LB con el antibiótico adecuado durante 12h a  $30^{\circ}\text{C}$ .

## **17. TRANSFERENCIA DE ADN A MEMBRANA E HIBRIDACIÓN POR EL MÉTODO “SOUTHERN BLOT”**

La técnica utilizada es la indicada en el libro de métodos “Current protocols in molecular biology” (Ausubel *et al.*, 1991).

### **17.1 Transferencia de ADN por capilaridad**

Las muestras de ADN digeridas con enzimas de restricción y separado en un gel de agarosa al 0,8% (p/v), se transfirió por capilaridad a una membrana de nylon cargada positivamente (Roche Applied Science, ref. 11417240001). Tras la electroforesis el gel fue sumergido en una solución de HCl 0,2 N durante 15 minutos hasta que se produjo el viraje del colorante azul de bromofenol a amarillo. Este tratamiento introduce mellas en el ADN depurinándolo, lo cual facilita su transferencia. El ADN se desnaturalizó introduciendo el gel en una solución de NaOH 0,5 M hasta que se observó de nuevo el viraje del indicador de amarillo a azul, y posteriormente se renaturalizó introduciéndolo durante 30 min en una solución de Tris- HCl 1M pH 7,5; NaCl 1,5M.

Sobre un cristal se colocó una tira de papel de filtro, del mismo ancho que el gel, cuyos extremos quedaban sumergidos en la solución de transferencia 10X SSC colocada en un reservorio inferior. Sobre el papel se colocó el gel en posición invertida y sobre éste la membrana, sobre la cual se colocaron varias capas de papel de filtro, otro cristal y un peso de 0,5 Kg. Así la solución de transferencia ascendió por capilaridad a través del gel arrastrando el ADN hasta la membrana, donde quedó retenido. La transferencia se realizó durante 12-16 horas. Transcurrido este tiempo, la membrana se lavó con 10X SSC durante 5 minutos para eliminar posibles restos de agarosa y se dejó secar sobre un papel de filtro.

Para asegurar la adhesión de las moléculas de ADN a la membrana de nylon, ésta se expuso durante tres minutos a luz ultravioleta. Las membranas se conservaron secas a temperatura ambiente selladas en bolsas de plástico hasta su utilización.

**Tampón 10X SSC:** 1,5 M NaCl, 0,5 M citrato sódico pH 7.

### **17.2 Marcaje no radiactivo de ADN lineal**

Las sondas de ADN se marcaron con digoxigenina mediante PCR usando DIG-11-dUTP (Roche Applied Science, ref. 11093088910). La proporción dTTP: DIG-11-dUTP utilizada fue 9:1. La mezcla de reacción contenía: 0,05 – 1 µg de ADN molde, 1 mM de cebador, 2,5 µl de tampón Taq ADN-polimerasa (10X), 0,2 mM de dATP, dCTP

y dGTP, 0,18 mM de dTTP, 0,02 mM de DIG-11-dUTP, 1 U de Taq ADN-polimerasa y H<sub>2</sub>O bidestilada hasta un volumen final de 25 µl.

### 17.3 Prehibridación e hibridación

Se utilizó un horno de hibridación modelo FHB400 (Techne Hybrigen). Se mantuvo la membrana con solución de prehibridación durante 1-2 horas a 65°C (20 ml de solución por cada 100 cm<sup>2</sup> de membrana). Transcurrido este tiempo, se retiró la solución de prehibridación y se añadió la sonda marcada y desnaturalizada disuelta en solución de prehibridación. La hibridación duró 12-16 horas a 65°C. El lavado de las membranas se realizó en las siguientes condiciones de fuerza iónica y temperatura: dos lavados de 10 minutos cada uno a temperatura ambiente en 2 X SSC suplementado con 0,1 % (p/v) de SDS y dos lavados de 15 min a 65°C en 0,1X SSC con 0,1% (p/v) de SDS.

Para hibridaciones en condiciones poco restrictivas, la temperatura se bajó hasta los 50-55°C, y en algunos casos los dos últimos lavados se realizaron con soluciones de mayor fuerza iónica (1X SSC y 0,1% (p/v) de SDS) a 45°C.

**Solución de prehibridación:** 5X SSC, 0,1% (p/v) N-laúrlsarcosina (sal sódica), 0,02% (p/v) SDS, 0,5 % (p/v) agente bloqueante (Roche Applied Science, ref. 11096176001), H<sub>2</sub>O hasta un volumen final de 20 ml.

En la Tabla 07 se muestran las sondas empleadas así como los oligonucleótidos y cepas utilizados para su síntesis.

**Tabla 07. Sondas utilizadas en las hibridaciones ADN-ADN**

Sonda	Oligonucleótidos	Secuencias	Cepa
nahAc	ndoB - 65F ndoB - 1290R	CGATGAAGAACTTTTCCA CAGCCAGTTGGAGCTGCTG	<i>Pseudomonas putida</i> G7
phnA1a	phnA1a - 12F phnA1a - 1353R	ACCACACTCGTAGACACTG TCATTCGGCCGCGTTG	<i>Sphingomonas</i> sp. HR1a
bph	bph1 bph2	CATCGTCGCTTTTCGAGCGTT TCTGGGACGGTCCGGACGGT	<i>Novosphingobium</i> sp. HS2a
phnAc	phnAc - 128F phnAc - 987R	ACGCATGAATGCGCTATTCC ACGTCAATACCTCGGTC	<i>Burkholderia</i> sp. MS3
phnS	phnS - For 394 phnS - 3530R	AGCATAACCCTTACGC ATGGCCCGGTGTTATTG	<i>Burkholderia</i> sp. MS3
phnR	phnR - 45F phnR - 1860	TCGATAGCGTAACTGTG ACGAAAGGAGCCGCTG	<i>Burkholderia</i> sp. MS3

## 17.4 Detección inmunológica

Esta reacción se realizó con el sistema “ *DIG DNA Labeling and Detection Kit*” (Roche Applied Science) siguiendo las indicaciones del fabricante. La membrana se lavó con la solución tampón 1, y se incubó en 100 ml de solución tampón 2 durante 30 minutos. A continuación la membrana se lavó con tampón 1 y se incubó con 20 ml de solución de anticuerpo (antidigoxigenina-fosfatasa alcalina conjugado) diluido en tampón 1 durante 30 minutos. Posteriormente se realizaron dos lavados de 15 min con 100 ml de tampón 1 para eliminar el exceso de anticuerpo no unido. A continuación, la membrana se equilibró con 20 ml de solución tampón 3 durante 2 minutos y finalmente se incubó con 10 ml de la solución colorante durante 1-16 horas en oscuridad. La reacción se detuvo lavando con 50 ml de H<sub>2</sub>O durante 5 minutos.

**Tampón 1 (pH 7):** Tris-HCl pH 8 100mM, NaCl 150 mM.

**Tampón 2:** agente bloqueante 0,5% (p/v) en tampón 1.

**Tampón 3 (pH 9,5):** Tris-HCl pH 8 100mM, NaCl 100mM, Mg<sub>2</sub>Cl 50 mM.

**Solución de anticuerpo:** anticuerpo antidigoxigenina-fosfatasa alcalina conjugado preparado en 20 ml de tampón 1 a una concentración final de 150 mU/ml.

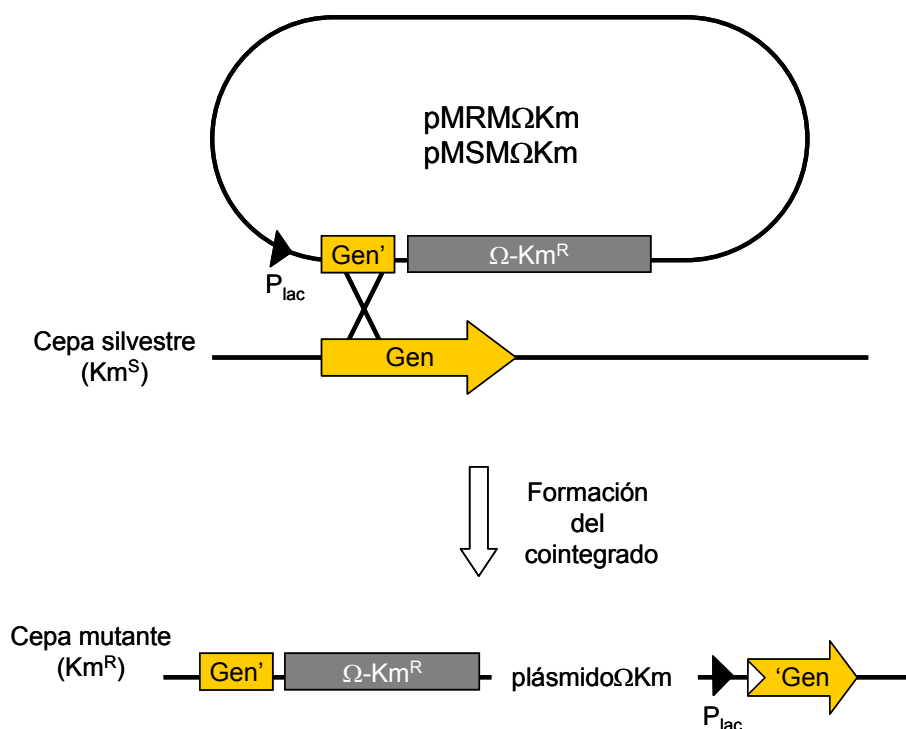
**Solución colorante:** 45µl de solución azul de nitrotetrazolio (NBT), 35 µl de solución 5-bromo-4cloro-3indolilfosfato (BCIP) y tampón 3 hasta un volumen final de 10 ml.

## 18. CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES

### 18.1 Mutagénesis dirigida (por recombinación homóloga)

Para la construcción de mutantes de *Burkholderia* sp. MS3 se siguió una modificación del método descrito por Llamas *et al.* (2003). Para ello se clonaron en el vector pMBL-T parte de los genes que interesaban mutar (al menos 400 pb) y el interposón  $\Omega$ -Km del plásmido pHP45 $\Omega$ Km. Los plásmidos resultantes, que no son capaces de replicar en *Burkholderia*, se introdujeron en las cepas de interés mediante electroporación. Posteriormente, se seleccionaron aquellas colonias que eran capaces de crecer en presencia de Km y mediante hibridación de Southern se comprobó que efectivamente tenían interrumpido el gen de interés.

En la Figura 01 se muestra un esquema de la estrategia empleada en la construcción de los mutantes.



**Figura 01. Estrategia usada para la generación de mutantes por recombinación homóloga.** Adaptado de Llamas et al., 2003.

## 19. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD $\beta$ -GALACTOSIDASA

La medida de la actividad  $\beta$ -galactosidasa se realizó en células permeabilizadas según el método descrito por Miller (1972). Este método se basa en una reacción colorimétrica en la que el  $\alpha$ -nitrofenil- $\beta$ -galactopiranosido (ONPG), sustrato incoloro de la  $\beta$ -galactosidasa, es hidrolizado por el enzima produciendo galactosa y  $\alpha$ -nitrofenol. Éste último compuesto es de color amarillo y su concentración puede determinarse espectrofotométricamente.

A partir de cultivos celulares incubados a 30°C durante 24 horas se inocularon nuevos cultivos a una  $DO_{660}$  inicial de 0,1 en medio mínimo M9 con glucosa como fuente de carbono. Inmediatamente se añadió el inductor, y los cultivos se incubaron a 30°C y agitación de 200 rpm. Se recogieron muestras de volumen variable (entre 0,050 y 2 ml) para determinar la actividad  $\beta$ -galactosidasa. Las muestras se tomaron cada 2 horas y a las 7,5 (tiempo en el que se encuentra el máximo de actividad) y 24 h tras la adición del inductor. Para la permeabilización de las células se usó cloroformo y SDS al 0,1% (p/v), y posteriormente se añadieron 800  $\mu$ l de tampón Z pH 7 y 200  $\mu$ l de solución de ONPG. La mezcla de reacción se incubó a 30°C hasta la aparición de color (entre 2 minutos y un máximo de 30 minutos). La reacción se detuvo añadiendo 2 ml de una solución de  $Na_2CO_3$  0,5 M. La concentración de  $\alpha$ -nitrofenol se determinó espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 420 nm ( $A_{420}$ ). También se midió

la absorbancia de cada muestra a 550 nm ( $A_{550}$ ) para corregir la contribución de turbidez debida al material celular.

Todos los inductores se usaron a una concentración final de 5 mM, excepto el naftaleno que se añadió a 2,5 mM. Naftaleno, fenantreno y ácido 1-hidroxi-2-naftóico se añadieron directamente en cristales mientras que el resto de compuestos se añadieron en disolución acuosa. En el caso de los exudados radicales de trébol, a cada matraz se le añadió 1 ml de exudados recogidos en el día.

Rutinariamente, los ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa se realizan por triplicado. La actividad  $\beta$ -galactosidasa, expresada en Unidades Miller, se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad } \beta\text{-galactosidasa} = \{[A_{420} - (1,7 \times A_{550})] / (t \times V \times DO_{660})\} \times 1000$$

donde "t" representa el tiempo de reacción en minutos y "V" el volumen de cultivo en mililitros usado en la permeabilización.

**Tampón Z (pH 7):** 60 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 40 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM KCl, 1 mM  $\text{MgSO}_4$  y 50 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol.

**Solución de ONPG:** 4 mg/ml de *o*-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido en tampón fosfato 0,1 M pH 7. Esta solución se mantuvo estable a 4°C y en oscuridad durante 3 semanas aproximadamente.

**RESULTADOS**





## **CAPÍTULO 1**



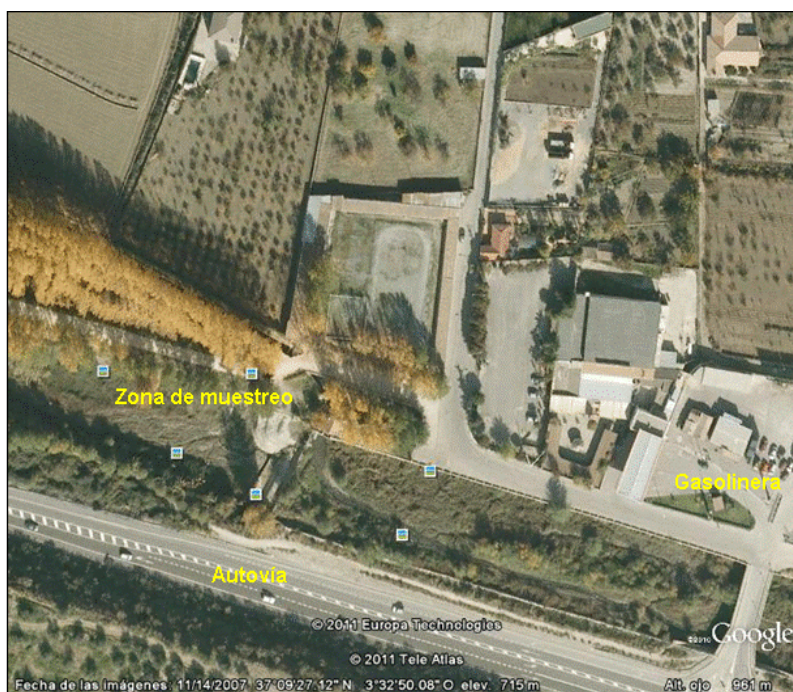
## 1. CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DE LAS MUESTRAS DE SUELOS

Como ya se ha descrito en el apartado Materiales y Métodos, se recogieron muestras de suelo de tres zonas. En la cercanía de una gasolinera en Cenes de la Vega (Granada), en una zona de monte bajo que había sufrido un incendio el verano anterior a la recogida de las muestras (en el límite de las provincias de Madrid y Guadalajara) y en la refinería de CEPSA “La Rábida” en Palos de la Frontera (Huelva).

En cada una de las zonas muestreadas se seleccionaron varias plantas y para cada una de ellas se recogieron dos tipos de muestras: de suelo cercano a dicha planta y de su rizosfera.

### 1.1 Análisis de las muestras de suelo de Cenes de la Vega (Granada)

Las muestras de Cenes de la Vega (Granada), se recogieron a finales de junio de 2007 en la zona cercana a la Acequia Gorda construida en 1073 por Ahmed ben Jalaf. La zona se caracteriza por tener una vegetación continua de tipo herbáceo y con predominancia de álamos como especie arbórea. De esta zona ( $37^{\circ} 9'N$   $3^{\circ} 52'O$ ), además de las muestras de suelo cercano a la planta y de rizosfera, se tomó una muestra de un suelo alejado de la zona vegetada. Esta zona se eligió para la extracción de muestras debido a la presencia de una gasolinera y a la cercanía de la autovía a Sierra Nevada, dos posibles fuentes de PAHs.



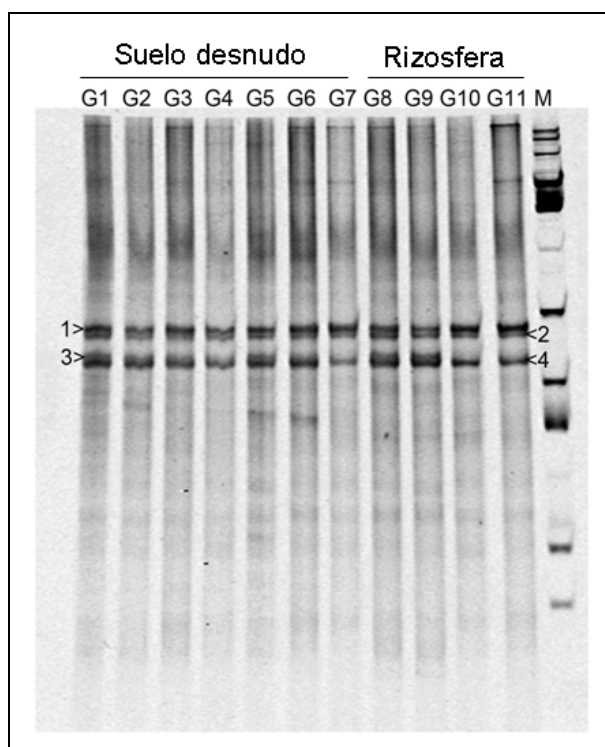
**Figura 01.** Vista aérea de la zona de muestreo en Granada. La foto fue tomada en el mes de noviembre del 2007. Adaptado de Google Earth.

En la Tabla 01 se enumeran las diferentes muestras recogidas en esta zona, así como la nomenclatura utilizada en los geles de DGGE.

**Tabla 01. Muestras recogidas en Granada**

Nombre	Localización	Nombre	Localización	Planta
G1	Suelo sin vegetar			
G2	Suelo	G8	Rizosfera	<i>Agrostis castellana</i>
G3	Suelo			<i>Populus alba</i>
G4	Suelo	G9	Rizosfera	Planta sin identificar
G5	Suelo			<i>Taraxacum officinale</i>
G6	Suelo	G10	Rizosfera	<i>Trifolium pratense</i>
G7	Suelo			<i>Ranunculus repens</i>

El ADN genómico total de cada muestra se extrajo según se indica en la sección de Materiales y Métodos, a amplificándose posteriormente fragmentos de 194 pb que incluían la región hipervariable V3 del gen codificante del ARNr 16S. La banda de amplificación obtenida para cada muestra se analizó mediante electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE).



**Figura 02. Análisis mediante DGGE de las muestras de Granada.** El nombre de cada carril se corresponde con el nombre de cada muestra. Carril M: marcador.

En la imagen se aprecian claramente cuatro bandas mayoritarias que representarían las bacterias dominantes en la población. Estas cuatro bandas aparecen en todas las muestras, incluida aquella tomada de una zona alejada de la vegetación (G1). Sin embargo, también en la imagen se aprecian varias bandas con menor intensidad, algunas de las cuales sí tienen distinta movilidad entre las muestras. Las bandas mayoritarias se extrajeron del gel, se reamplificaron y secuenciaron. Las bandas minoritarias no se consiguieron reamplificar, probablemente debido a la baja concentración de ADN en el gel. Los resultados de la secuenciación se muestran en la Tabla 02.

**Tabla 02. Similitud de las secuencias obtenidas a partir de las bandas de DGGE de las muestras de Granada**

Banda	Similitud (%) <sup>a</sup>	Secuencia de mayor similitud (nº acceso de GenBank) <sup>c</sup>
1	99	Uncultured $\delta$ -proteobacterium (FJ568409)
2	95	<i>Halomonas</i> sp. (DQ358684)
3	98	Uncultured Rhizobiales bacterium (HM799096)
4	95	<i>Sphingopyxis</i> sp. (AB524074)

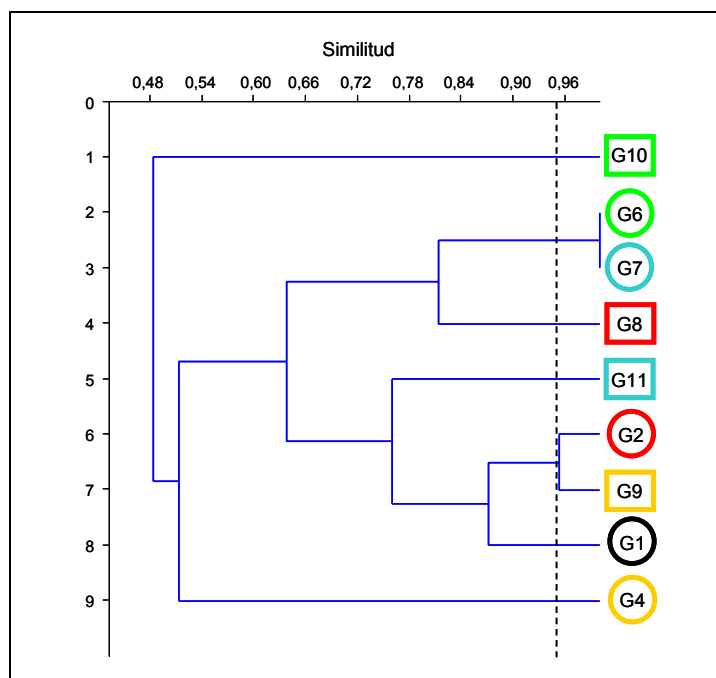
<sup>a</sup>Similitud (%) entre secuencias comparadas con las disponibles en la base de datos GenBank.

<sup>c</sup>Los números de acceso de las secuencias al GenBank se indican entre paréntesis. La secuencia de estas bandas se recoge en el Anexo 1.

Para analizar el conjunto de las bandas del gel de DGGE se llevó a cabo un análisis bioinformático con el programa Uvi-Band Map. Este programa es capaz de detectar, además de las bandas mayoritarias de los geles de DGGE, aquellas menos intensas que se corresponden con grupos minoritarios. Con los datos obtenidos se realizó un análisis de presencia/ausencia de las distintas bandas en las diferentes muestras y a partir de éste, se construyó una matriz de similitud usando el índice de Raup-Crick con el programa de análisis estadístico PAST (Hammer *et al.*, 2001). A partir de la matriz se obtuvieron los dendrogramas de similitud usando el algoritmo “unweighted paired-group method with arithmetic mean” (UPGMA). Valores de similitud mayores al 0,95 indican que las muestras son iguales y menores al 0,05 que las muestras son distintas.

En el gel de DGGE de las muestras de Cenes de la Vega, se identificaron y analizaron un total de cuarenta y nueve bandas diferentes. Como se indicó previamente, las muestras de suelo van desde G1 a G7 y las de rizosfera desde G8 a G11. Como se observa en la Figura 03, tan sólo las muestras G6-G7 y G2-G9 cumplieron con los criterios de similitud descritos anteriormente, lo que nos permite concluir que estas muestras son iguales. Tres de estas muestras provienen de suelo

desnudo (G2, G6 y G7) y una de la rizosfera de una planta (G9). Para el resto de las muestras los índices de similitud no son lo suficientemente altos como para poder decir que son muestras iguales, ni lo suficientemente bajos como para concluir que son esencialmente distintas. Sí podemos establecer algunos grupos arbitrarios entre los que se encuentran por un lado G6, G7 y G8 con una similitud del 0,82 y por otro lado G1, G2, G9 y G11 con 0,76 de similitud. Las muestras G4 y G10 no se agrupan dentro de ninguno de estos dos subgrupos ya que son las más diferentes. En resumen, las distintas muestras se agrupan en dos subgrupos principales independientemente de si se tratan de muestras de suelo desnudo o rizosférico, por lo que parece que en este caso la rizosfera no tendría influencia en la conformación de las poblaciones mayoritarias en las muestras de suelo analizadas.



**Figura 03. Dendrograma de similitud de las muestras recogidas en Granada.** Las muestras de suelo (círculos) y rizosfera (rectángulos) de una misma planta se indican con el mismo color. La línea de puntos indica una similitud de 0,95.

## 1.2 Análisis de las muestras de suelo de Ribatejada (Madrid)

Estas muestras se tomaron a principios de noviembre de 2007 en el término municipal de Ribatejada, provincia de Madrid, limítrofe con la provincia de Guadalajara (40° 40'N 3° 22'O). Esta es una zona típica de monte bajo, caracterizada por la presencia de encinas como especie arbórea predominante y también retama, espino y gramíneas. En el momento de la recogida de las muestras, la zona todavía mostraba signos evidentes del incendio que se produjo en el verano de 2006, con arbustos semi-

calcinados y restos vegetales que maduros por el suelo, aunque tenía ya claros signos de recuperación, como es una abundante vegetación herbácea. Esta zona se eligió por haber sufrido un incendio en fechas anteriores a la recogida de muestras.



**Figura 04. Vista aérea de la zona de muestreo en Madrid.** La línea azul divide las provincias de Madrid (izquierda de la foto) y Guadalajara (parte de derecha de la foto). La foto fue tomada en el mes de febrero de 2009. *Adaptado de Google Earth.*

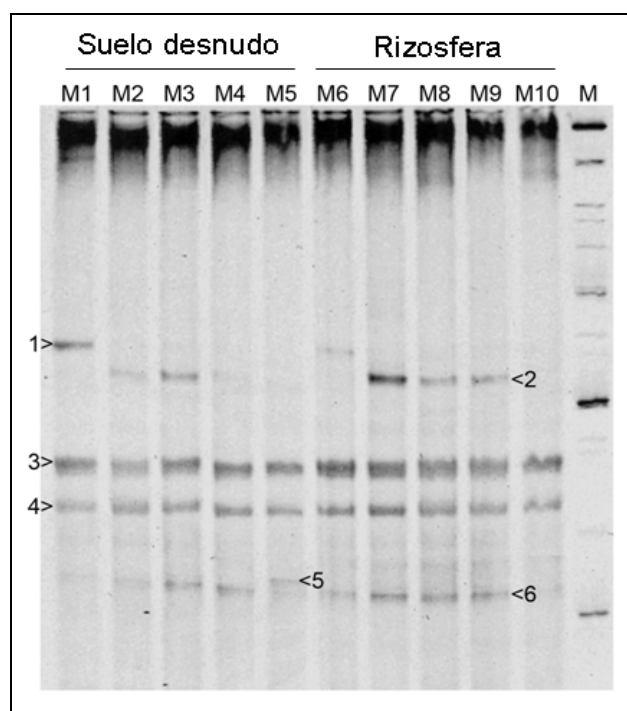
Las muestras seleccionadas en esta zona se recogen en la Tabla 03. Debido a la gran cantidad de especies herbáceas presentes en la zona, en este muestreo fue prácticamente imposible localizar una muestra de suelo totalmente aislado, sin vegetar.

**Tabla 03. Muestras recogidas en Madrid**

Nombre	Localización	Nombre	Localización	Planta
<b>M1</b>	Suelo	<b>M6</b>	Rizosfera	Gramíneas
<b>M2</b>	Suelo	<b>M7</b>	Rizosfera	<i>Retama sphaerocarpa</i>
<b>M3</b>	Suelo	<b>M8</b>	Rizosfera	<i>Rhamnus lycioides</i>
<b>M4</b>	Suelo	<b>M9</b>	Rizosfera	<i>Avena barbata</i>
<b>M5</b>	Suelo	<b>M10</b>	Rizosfera	<i>Quercus ilex</i>

Al igual que en el caso anterior, el ADN total del suelo se extrajo de las distintas muestras, se amplificó la región hipervariable V3 el gen codificante del ARNr 16S y se analizó la diversidad bacteriana mediante DGGE.





**Figura 05. Análisis mediante DGGE de las muestras de Madrid.** El nombre de cada carril se corresponde con el nombre de cada muestra. Carril M: marcador.

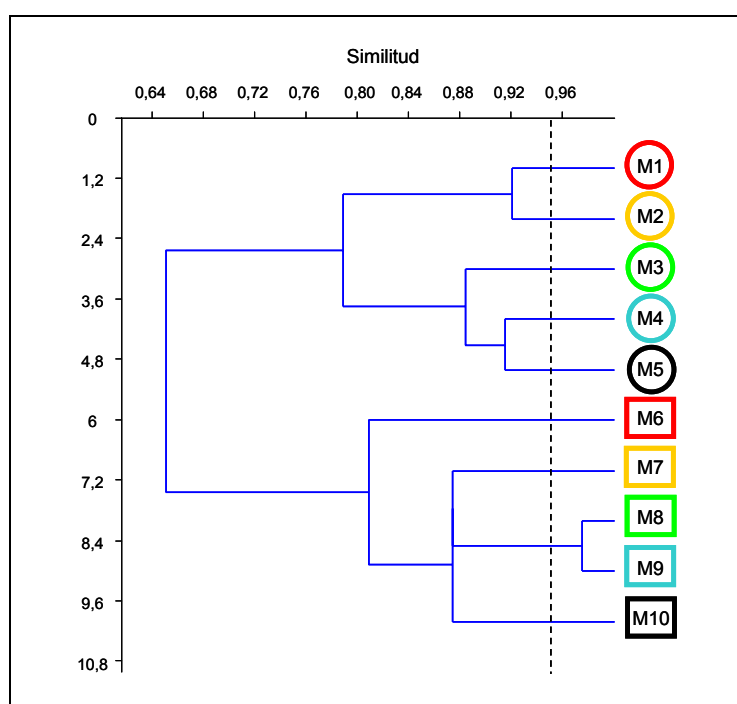
En los gels de DGGE de Madrid se apreciaban también una serie de bandas mayoritarias que eran compartidas por todas las muestras, independientemente de su origen, sin embargo, había otras bandas intensas que sólo se apreciaban en algunas de las muestras (por ejemplo, bandas 1, 2, 5 y 6). La secuenciación de estas bandas mayoritarias nos permitió identificar algunas de las poblaciones bacterianas predominantes en estos suelos (Tabla 04).

**Tabla 04. Similitud de las secuencias obtenidas a partir de las bandas de DGGE de las muestras de Madrid**

Banda	Similitud (%) <sup>a</sup>	Secuencia de mayor similitud (nº acceso de GenBank) <sup>c</sup>
1	100	<i>Pseudomonas moraviensis</i> (AY970952)
2	98	<i>Acidobacteria bacterium</i> (HM062413)
3	100	<i>Pseudomonas cedrina</i> subsp. <i>fulgida</i> (HQ432807)
4	92	<i>Burkholderia mimosarum</i> (AY752953)
5	84	<i>Acidobacteria bacterium</i> (EU185178)
6	98	Uncultured <i>Sphingomonas</i> sp. (DQ923856)

<sup>a</sup>Similitud (%) entre secuencias comparadas con las disponibles en la base de datos GenBank.  
<sup>c</sup>Los números de acceso de las secuencias al GenBank se indican entre paréntesis. La secuencia de estas bandas se recoge en el Anexo 1.

En el análisis bioinformático de los geles de DGGE de las muestras de Madrid, se identificaron y analizaron un total de catorce bandas diferentes. En este caso, las muestras de suelo van desde M1 a M5 y las de rizosfera de M6 a M10. Como se observa en el dendograma de similitud (Figura 06), las muestras se agrupan en dos ramas principales. El primer grupo, con una similitud de 0,79; incluye todas las muestras de suelo, mientras que el segundo incluye todas las muestras de rizosfera (similitud de 0,81). Aunque los valores de similitud están por debajo de 0,95; queda claro que las muestras de suelo se parecen más entre sí que a las de rizosfera, por lo que parece que en este caso la rizosfera sí estaría ejerciendo cierta influencia en las poblaciones bacterianas estudiadas.



**Figura 06. Dendograma de similitud de las muestras recogidas en Madrid.** Las muestras de suelo (círculos) y rizosfera (rectángulos) de una misma planta se indican con el mismo color. La línea de puntos indica una similitud de 0,95.

### 1.3 Análisis de las muestras de suelo de Palos de la Frontera (Huelva)

Las muestras de suelos de Huelva fueron tomadas a principios de mayo de 2008 en la cercanía de la refinería “La Rábida” (CEPSA) en el término municipal de Palos de la Frontera (37° 10'N 6° 5 3'O). El suelo de esta zona se caracteriza por ser arenoso y con bajo contenido hídrico, y las especies vegetales que se encontraron eran en su mayoría herbáceas adaptadas a estas condiciones poco favorables. Además hay que destacar que en esta zona las plantas se disponían unas aisladas de las otras.



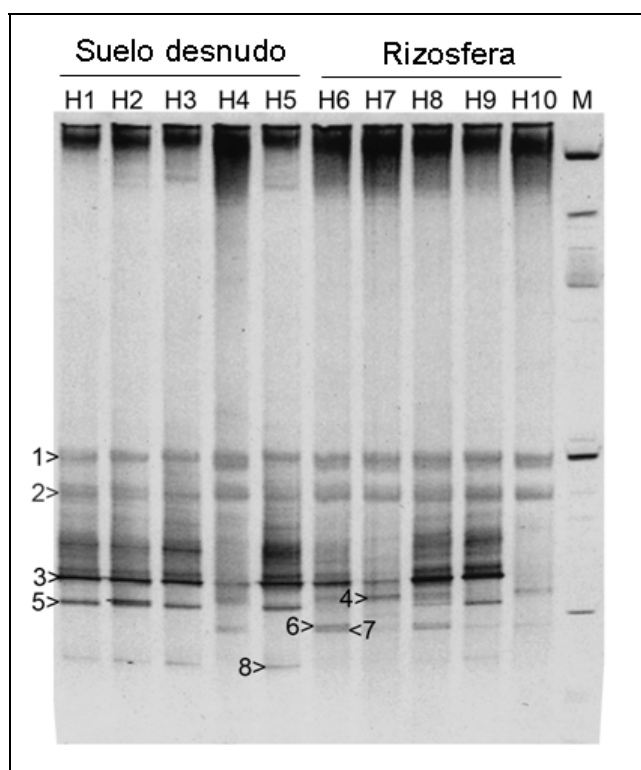
**Figura 07. Vista aérea de la zona de muestreo en Huelva.** La foto fue tomada en el mes de agosto de 2007. Adaptado de Google Earth.

Las muestras se tomaron en el margen de la carretera que lleva a la entrada principal de la planta industrial de CEPSA. En total se recogieron diez muestras que se enumeran a continuación (Tabla 05).

**Tabla 05. Muestras recogidas en Huelva**

Nombre	Localización	Nombre	Localización	Planta
H1	Suelo	H6	Rizosfera	<i>Plantago lanceolata</i>
H2	Suelo	H7	Rizosfera	<i>Equium vulgare</i>
H3	Suelo	H8	Rizosfera	<i>Anthemis tinctoria</i>
H4	Suelo	H9	Rizosfera	<i>Chamaemelum mixtum</i>
H5	Suelo	H10	Rizosfera	<i>Arctotheca calendula</i>

Con estas muestras se procedió como en los casos anteriores, se extrajo el ADN total de las muestras de suelo, se amplificó la región hipervariable V3 del gen codificante del ARNr 16S y se analizó mediante DGGE. En la Figura 08 se muestran los resultados de este análisis.

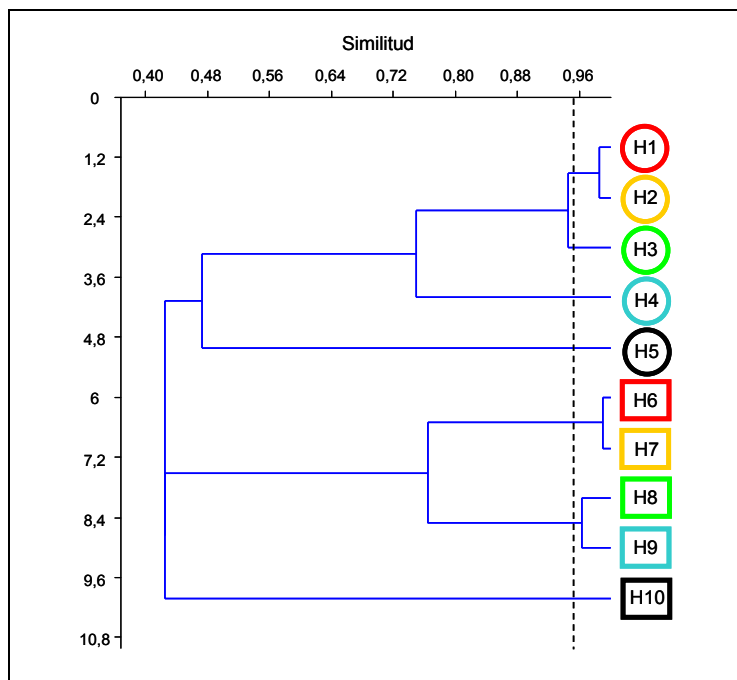


**Figura 08. Análisis mediante DGGE de las muestras de Huelva.** El nombre de cada carril se corresponde con el nombre de cada muestra. Carril M: marcador.

En este caso, al igual que ocurría en el análisis por DGGE de las muestras de Madrid, en la mayoría de los carriles el perfil de las bandas más intensas era similar, sin embargo se podían apreciar diferencias en el patrón de dichas bandas. En algunos casos, también se apreciaban diferencias en cuanto a la intensidad relativa de las bandas, lo que sugiere un cambio cuantitativo en el ADN de las bacterias.

En el análisis bioinformático, se identificaron un total de veintiocho bandas distintas entre las diferentes muestras. Las muestras de suelo van desde H1 a H5 y las de rizosfera van desde H6 a H10. En el dendograma de similitud (Figura 09) se observan tres ramas principales. La primera incluye todas las muestras de suelo que entre sí guardan una similitud relativamente baja (0,47) pero si descartamos la muestra H5, que es la más diferente, el resto de muestras guardan una similitud del 0,75. Además dentro de este grupo las muestras H1 y H2 se pueden considerar iguales ya que presentan un índice de similitud superior a 0,95. En la segunda rama se incluyen únicamente muestras de rizosfera (H6, H7, H8 y H9) que guardan entre sí una similitud del 0,77. Además las muestras H6-H7 y las H8-H9 presentan una similitud mayor de 0,95 por lo que se puede decir que estas muestras son iguales entre sí. Por último la muestra H10 se agrupa por separado (similitud con el resto de 0,42). En este caso, como en el de Madrid, las muestras de suelo y rizosfera se

agrupan juntas y aunque la similitud no llega al 0,95; las muestras de rizosfera guardan una similitud lo suficientemente alta (0,77) como para concluir que la rizosfera podría tener cierta influencia en las poblaciones bacterianas estudiadas. Por último si analizamos las muestras H5 y H10, observamos que presentan una similitud baja entre sí (0,42) y con el resto de muestras. Por lo que parece que la zona en la que se recogieron dichas muestras difiere del resto, y que además la rizosfera de la planta (*Arctotheca calendula*) estaría ejerciendo cierta influencia sobre las poblaciones microbianas.



**Figura 09. Dendrograma de similitud de las muestras recogidas en Huelva.** Las muestras de suelo (círculos) y rizosfera (rectángulos) de una misma planta se indican con el mismo color. La línea de puntos indica una similitud de 0,95.

Al igual que en los casos anteriores, determinamos la secuencia de estas bandas mayoritarias para conocer mejor la estructura de las poblaciones dominantes en las muestras aisladas (Tabla 06).

**Tabla 06. Similitud de las secuencias obtenidas de las bandas de DGGE de las muestras de Huelva**

Banda	Similitud (%) <sup>a</sup>	Secuencia de mayor similitud (nº acceso de GenBank) <sup>c</sup>
1	99	<i>Burkholderia</i> sp. (HM461178)
2	92	Uncultured soil bacterium (GU598931)
3	99	<i>Burkholderia multivorans</i> (EF427758)
4	96	Uncultured <i>Sphingomonas</i> (DQ923856)

Banda	Similitud (%) <sup>a</sup>	Secuencia de mayor similitud (nº acceso de GenBank) <sup>c</sup>
5	99	<i>Methilobacterium rhodesianum</i> (GU430671)
6	92	<i>Arthrobacter</i> sp. (FJ006834)
7	95	Micrococcaceae bacterium (AY177727)
8	100	<i>Burkholderia</i> sp. (HQ441255)

<sup>a</sup>Similitud (%) entre secuencias comparadas con las disponibles en la base de datos GenBank.

<sup>c</sup>Los números de acceso de las secuencias al GenBank se indican entre paréntesis. La secuencia de estas bandas se recoge en el Anexo 1.

## 2. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS DEGRADADORAS DE FENANTRENO

Para aislar bacterias degradadoras de PAHs, se usó fenantreno como compuesto modelo ya que es uno de los más frecuentes en las emisiones de las principales fuentes de PAHs, y también porque presenta unas características fisicoquímicas intermedias entre los PAHs de bajo peso molecular y los de alto peso molecular.

Para aislar las bacterias de interés, se tomó un gramo de suelo de cada muestra y se realizaron enriquecimientos utilizando medio mínimo M9 con fenantreno como única fuente de carbono. Se realizaron varios subcultivos en medio líquido y posteriormente se sembraron en placas del mismo medio sobre las que se pulverizó una solución de fenantreno en hexano. Tanto en los cultivos realizados en medio líquido como en las placas, se observaba un cambio de coloración del medio (anaranjado) tras 2-3 días de incubación. Además en las placas se observaba la aparición de áreas transparentes (halos de solubilización) alrededor de algunas colonias, lo que es indicativo de la transformación del compuesto (Kiyohara *et al.*, 1982). Se seleccionaron aquellas bacterias que formaban halos de solubilización y que presentaban distinta morfología de colonia (tamaño, coloración, etc.). Mediante siembra por agotamiento se obtuvieron cultivos puros.

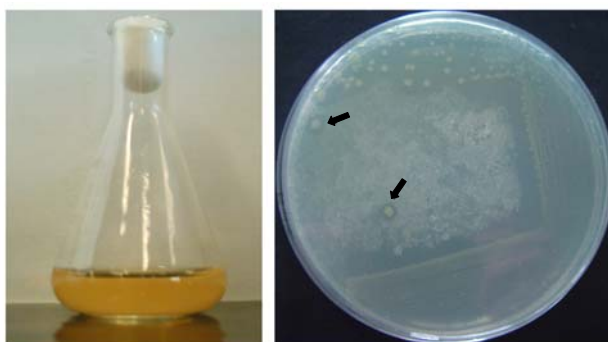


Figura 10. Aspecto del enriquecimiento tras tres días de incubación (izquierda) y formación de halos de solubilización por una de las bacterias aisladas (*Arthrobacter* sp. R7). En la imagen de la derecha las flechas indican los halos de solubilización de fenantreno.

Las bacterias aisladas se identificaron mediante amplificación y secuenciación del gen que codifica el ARNr 16S. En la siguiente tabla se muestran las bacterias degradadoras de fenantreno aisladas en cada una de las muestras.

**Tabla 07. Bacterias degradadoras de fenantreno aisladas**

Zona	Nombre	Muestra	Bacteria degradadora
GRANADA	G1	Suelo sin vegetar	
	G2	Suelo cercano <i>Agrostis castellana</i>	<i>Sphingomonas</i> sp. S1
	G3	Suelo cercano <i>Populus alba</i>	<i>Arthrobacter</i> sp. S4
	G4	Suelo cercano planta sin identificar	
	G5	Suelo cercano <i>Taraxacum officinale</i>	
	G6	Suelo cercano <i>Trifolium pratense</i>	<i>Mycobacterium</i> sp. S3 <i>Pseudomonas</i> sp. S6
	G7	Suelo cercano <i>Ranunculus repens</i>	<i>Sphingomonas</i> sp. S5 <i>Novosphingobium</i> sp. S7
	G8	Rizosfera <i>Agrostis castellana</i>	<i>Arthrobacter</i> sp. R7
	G9	Rizosfera planta sin identificar	
	G10	Rizosfera <i>Trifolium pratense</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. R2 <i>Sphingomonas</i> sp. R3
	G11	Rizosfera <i>Ranunculus repens</i>	<i>Sphingomonas</i> sp. R4a
MADRID	M1	Suelo sin vegetar	
	M2	Suelo cercano <i>Retama sphaerocarpa</i>	
	M3	Suelo cercano <i>Rhamnus lycioides</i>	<i>Burkholderia</i> sp. MS3
	M4	Suelo cercano <i>Avena barbata</i>	<i>Burkholderia</i> sp. MS4b <i>Burkholderia</i> sp. MS4t
	M5	Suelo cercano <i>Quercus ilex</i>	
	M6	Rizosfera mezcla de gramíneas	
	M7	Rizosfera <i>Retama sphaerocarpa</i>	
	M8	Rizosfera <i>Rhamnus lycioides</i>	
	M9	Rizosfera <i>Avena barbata</i>	
	M10	Rizosfera <i>Quercus ilex</i>	<i>Burkholderia</i> sp. MR5
HUELVA	H1	Suelo cercano <i>Plantago lanceolata</i>	<i>Massilia</i> sp. HS1b <i>Massilia</i> sp. HS1t
	H2	Suelo cercano <i>Equium vulgare</i>	<i>Novosphingobium</i> sp. HS2a
	H3	Suelo cercano <i>Anthemis tinctoria</i>	<i>Sphingobium</i> sp. HS3p <i>Arthrobacter</i> sp. HS3g
	H4	Suelo cercano <i>Chamaemelum mixtum</i>	<i>Arthrobacter</i> sp. HS4-1 <i>Arthrobacter</i> sp. HS4-2
	H5	Suelo cercano <i>Arctotheca calendula</i>	<i>Sphingobium</i> sp. HS5p <i>Sphingomonas</i> sp. HS5g

Zona	Nombre	Muestra	Bacteria degradadora
	H6	Rizosfera <i>Plantago lanceolata</i>	<i>Novosphingobium</i> sp. HR1a <i>Novosphingobium</i> sp. HR1b
	H7	Rizosfera <i>Equium vulgare</i>	<i>Sphingomonas</i> sp. HR2b <i>Sphingomonas</i> sp. HR2t
	H8	Rizosfera <i>Anthemis tinctoria</i>	<i>Burkholderia</i> sp. HR3p <i>Novosphingobium</i> sp. HR3g
	H9	Rizosfera <i>Chamaemelum mixtum</i>	<i>Sphingomonas</i> sp. HR4a
	H10	Rizosfera <i>Arctotheca calendula</i>	<i>Sphingobium</i> sp. HR5a <i>Sphingobium</i> sp. HR5b <i>Sphingobium</i> sp. HR5r

Nomenclatura: A las cepas aisladas en Madrid se les puso el identificador “M”, a las de Hue lva “H”, mientras que a las de Granada no se les puso ningún identificador. Además a las bacterias aisladas en las muestras de suelo desnudo se les añadió una “S” en el nombre, y a las provenientes de la rizosfera de las plantas una “R”.

De un total de treinta y tres cepas aisladas dieciocho pertenecen al subgrupo de las  $\alpha$ -Proteobacterias (géneros *Sphingomonas* (8), *Sphingobium* (5) y *Novosphingobium* (5)), siete a las  $\beta$ -Proteobacterias (géneros *Burkholderia* (5) y *Massilia* (2)), dos a las  $\gamma$ -Proteobacterias (género *Pseudomonas*) y seis al subgrupo Actinobacteria (géneros *Arthrobacter* (5) y *Mycobacterium* (1)). El grupo más representado es el grupo de las  $\alpha$ -Proteobacterias que incluye el 54,5 % de las cepas aisladas, esto concuerda con otros estudios que indican que el orden Sphingomonadales es el mayor grupo de bacterias degradadoras de PAHs presentes en muchos sitios contaminados (Pinyakong *et al.*, 2000; Bastiaens *et al.*, 2000). En el caso de las muestras de Madrid, llama la atención que sólo se aislaron cuatro cepas y todas ellas pertenecientes al género *Burkholderia*.

### 3. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LAS BACTERIAS AISLADAS

Tras el análisis del gen codificante del ARNr 16S de las distintas cepas aisladas, se alinearon las distintas secuencias con la herramienta disponible en la página SILVA rRNA database project ([www.arb-silva.de/aligner](http://www.arb-silva.de/aligner)). Posteriormente se construyó el árbol filogenético usando el programa ARB (Ludwig *et al.*, 2004). El árbol se construyó mediante el método de Neighbour-joining, y las distancias filogenéticas entre secuencias se calcularon usando el algoritmo de Jukes-Cantor (Jukes y Cantor, 1969).

Si analizamos el árbol filogenético (Figura 11), se observa que la mayoría de las bacterias aisladas se organizan en un mismo grupo en función del género al que pertenecen independientemente de la zona en la que se aislaron, es el caso de las cepas de *Novosphingobium*, *Pseudomonas* y *Massilia*. En otros casos, las cepas se



organizan en dos subgrupos en función de la zona del aislamiento, es lo que ocurre con las cepas pertenecientes a los géneros *Burkholderia* y *Arthrobacter*. En el caso de las cepas de *Burkholderia* si además nos fijamos en otras de las características analizadas en las cepas (crecimiento en otros PAHs y antibiogramas) (Tablas 08 y 09), parece que la separación en dos subgrupos se debe a que las bacterias MS3, MS4b, MS4t y MR5 podrían ser en realidad la misma cepa, mientras que H R3p sería otra distinta. En el caso de las cepas de *Arthrobacter* esto no es así, ya que las cepas S4 y R7, ambas aisladas de la provincia de Granada y que se organizan en el mismo grupo, presentan grandes diferencias en las resistencias a los distintos antibióticos mientras que las cepas aisladas en Huelva presentan resistencias muy similares pero se subdividen a su vez en otros dos subgrupos.

Las cepas del género *Sphingomonas* aisladas se asignaron a este género por similitud de secuencia del ARNr 16S con las secuencias de GenBank. Sin embargo en el árbol se organizan en dos grupos cuyas cepas más relacionadas son *Sphingobium chungbukense* y *Sphingobium abikonense*. Este resultado se explica porque en el año 2001 el género *Sphingomonas* se subdividió en cuatro géneros: *Sphingomonas*, *Sphingobium*, *Novosphingobium* y *Sphingopyxis* ya que incluía especies bastante diversas en términos de sus características filogenéticas y ecológicas.

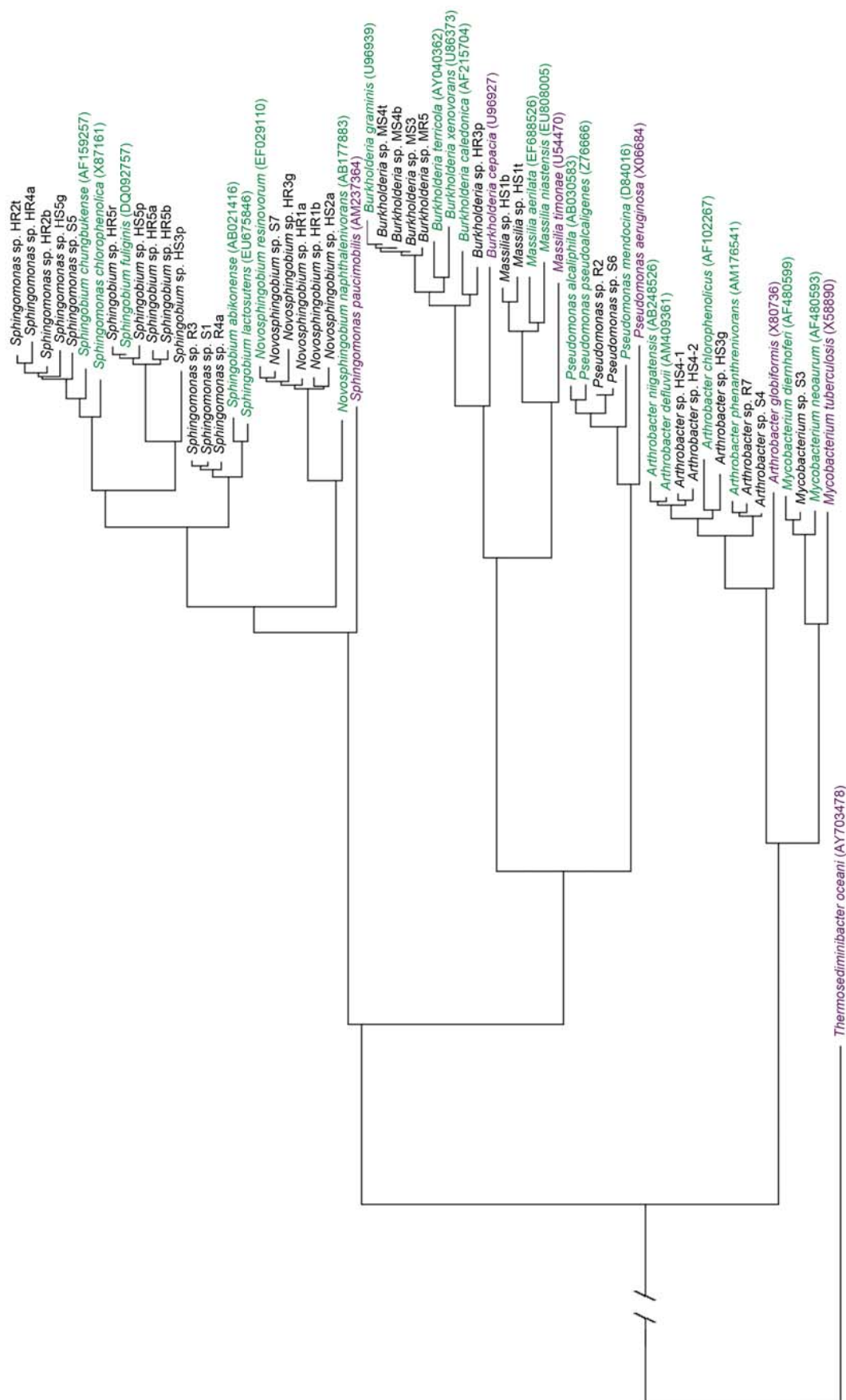


Figura 11. Árbol filogenético construido a partir de las secuencias completas de los genes ARNr 16S de las cepas aisladas (en negro) y secuencias disponibles en el GenBank (en verde o violeta si se trata de la cepa tipo del género). El árbol tiene como raíz a *Thermosediminibacter oceani*.

El árbol se construyó utilizando la base de datos LTP102\_SSU disponible en la página SILVA rRNA database Project, y que incluye más de 1200000 secuencias de ARNr 16S. Hay que destacar que las cepas más cercanas a las bacterias aisladas en muchos casos se corresponden con bacterias degradadoras de compuestos orgánicos. Es el caso de *Sphingobium chungbukense* (compuestos aromáticos) (Kim *et al.*, 2000), *Sphingobium fuliginis* (Prakash y Lal, 2006), *Arthrobacter phenantrenivorans* (Kallimanis *et al.*, 2007) (fenantreno), *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (nitrobenceno) (Nishino y Spain, 1993) y *Arthrobacter chlorophenolicus* (4-clorofenol) (Westerberg *et al.*, 2000).

Un aspecto importante que queremos resaltar es que las cepas de *Mycobacterium*, *Pseudomonas* y *Burkholderia* aisladas del suelo se encuentran alejadas filogenéticamente, según su secuencia de ARNr 16S, de las especies patógenas incluidas en sus géneros.

#### 4. DEGRADACIÓN DE OTROS PAHs DE BAJO PESO MOLECULAR

Se estudió la capacidad de las bacterias aisladas para degradar otros PAHs de bajo peso molecular como son naftaleno y antraceno. Para ello se analizó el crecimiento de las bacterias en placas de medio mínimo con naftaleno en fase vapor y el crecimiento y formación de halos de solubilización alrededor de las colonias en placas de medio mínimo en las que se pulverizó antraceno disuelto en hexano.

**Tabla 08. Bacterias aisladas capaces de crecer con naftaleno**

Bacteria	Bacteria
<i>Sphingomonas</i> sp. S5	<i>Burkholderia</i> sp. MS3
<i>Sphingomonas</i> sp. R4a	<i>Burkholderia</i> sp. MS4b
<i>Sphingomonas</i> sp. HS5g	<i>Burkholderia</i> sp. MS4t
<i>Sphingomonas</i> sp. HR2b	<i>Burkholderia</i> sp. MR5
<i>Sphingomonas</i> sp. HR2t	<i>Burkholderia</i> sp. HR3p
<i>Sphingomonas</i> sp. HR4a	<i>Massilia</i> sp. HS1t
<i>Sphingobium</i> sp. HS5p	<i>Massilia</i> sp. HS1b
<i>Sphingobium</i> sp. HR5a	<i>Arthrobacter</i> sp. S4
<i>Sphingobium</i> sp. HR5b	<i>Arthrobacter</i> sp. R7
<i>Sphingobium</i> sp. HR5r	<i>Arthrobacter</i> sp. HS3g
<i>Novosphingobium</i> sp. HS2a	<i>Arthrobacter</i> sp. HS4-1
<i>Novosphingobium</i> sp. HR1a	<i>Arthrobacter</i> sp. HS4-2
<i>Novosphingobium</i> sp. HR1b	
<i>Novosphingobium</i> sp. HR3g	

Ninguna de las bacterias aisladas presentó crecimiento ni formación de halo de degradación en placas de medio mínimo con antraceno tras siete días de incubación. En el caso del naftaleno de las treinta y tres cepas aisladas veintiséis (Tabla 08) son

capaces de crecer usándolo como única fuente de carbono. Todas las cepas aisladas de los géneros *Burkholderia*, *Massilia* y *Arthrobacter* crecen usando este compuesto. En el caso de las  $\alpha$ -Proteobacterias sólo dos cepas de *Sphingomonas* (S1 y R3), una cepa de *Sphingobium* (HS3p) y una cepa de *Novosphingobium* (S7) no degradan este compuesto. Las cepas aisladas pertenecientes a los géneros *Mycobacterium* y *Pseudomonas* no fueron capaces de crecer usando nafta leno como única fuente de carbono.

## 5. ANTIBIOGRAMAS

Se realizaron antibiogramas para conocer las resistencias naturales a los antibióticos de uso más común en el laboratorio para así determinar cuáles eran los antibióticos que podían ser usados en la discriminación de cepas en posteriores ensayos de mutagénesis, adhesión y colonización a superficies bióticas, etc.

Los antibiogramas se realizaron mediante el método de difusión en disco. Los discos con el antibiótico de interés se colocaron sobre la superficie de una placa de LB sólido inoculada con una cantidad suficiente de células para formar un césped. Tras 2 - 3 días de crecimiento se midió el diámetro del halo de inhibición. Los resultados se muestran en la Tabla 09. En el caso de la cepa *Sphingobium* sp. HS3p no se pudo realizar este ensayo ya que no llegaba a formar un césped en la placa.

**Tabla 09. Antibiogramas de las bacterias aisladas**

Bacteria	Ap 10 <sup>a</sup>	Gm 10 <sup>b</sup>	Sm 10 <sup>c</sup>	Km 30 <sup>d</sup>	Rf 30 <sup>e</sup>	Pip 100 <sup>f</sup>
<i>Pseudomonas</i> sp. S6	R	11	13	13	17	9
<i>Pseudomonas</i> sp. R2	R	15	R	13	13	11
<i>Sphingomonas</i> sp. S1	13	21	9	37	19	15
<i>Sphingomonas</i> sp. S5	R	11	13	13	17	9
<i>Sphingomonas</i> sp. R3	R	15	R	15	11	11
<i>Sphingomonas</i> sp. R4a	R	15	23	15	11	13
<i>Sphingomonas</i> sp. HS5g	25	43	R	44	50	36
<i>Sphingomonas</i> sp. HR2b	22	34	R	32	34	22
<i>Sphingomonas</i> sp. HR2t	20	37	R	36	50	40
<i>Sphingomonas</i> sp. HR4a	27	38	R	38	46	26
<i>Sphingobium</i> sp. HS3p	-	-	-	-	-	-
<i>Sphingobium</i> sp. HS5p	R	60	R	30	28	R
<i>Sphingobium</i> sp. HR5a	R	52	R	R	45	R
<i>Sphingobium</i> sp. HR5b	R	47	R	18	45	17
<i>Sphingobium</i> sp. HR5r	R	54	R	42	42	10

Bacteria	Ap 10 <sup>a</sup>	Gm 10 <sup>b</sup>	Sm 10 <sup>c</sup>	Km 30 <sup>d</sup>	Rf 30 <sup>e</sup>	Pip 100 <sup>f</sup>
<i>Novosphingobium</i> sp. S7	R	17	15	13	15	15
<i>Novosphingobium</i> sp. HS2a	18	30	R	27	35	26
<i>Novosphingobium</i> sp. HR1a	14	25	R	28	37	20
<i>Novosphingobium</i> sp. HR1b	32	31	28	22	52	28
<i>Novosphingobium</i> sp. HR3g	11	26	R	25	35	17
<i>Burkholderia</i> sp. MS3	R	25	33	29	21	21
<i>Burkholderia</i> sp. MS4b	R	27	33	29	23	21
<i>Burkholderia</i> sp. MS4t	R	27	33	29	27	21
<i>Burkholderia</i> sp. MR5	R	27	29	29	21	21
<i>Burkholderia</i> sp. HR3p	10	19	10	12	23	10
<i>Massilia</i> sp. HS1t	20	29	22	30	25	26
<i>Massilia</i> sp. HS1b	R	17	13	15	25	12
<i>Arthrobacter</i> sp. S4	21	R	25	R	25	R
<i>Arthrobacter</i> sp. R7	R	15	13	9	23	13
<i>Arthrobacter</i> sp. HS3g	22	12	12	10	39	26
<i>Arthrobacter</i> sp. HS4-1	27	18	16	15	35	27
<i>Arthrobacter</i> sp. HS4-2	25	18	18	13	38	28
<i>Mycobacterium</i> sp. S3	9	R	11	25	25	R

a, b, c, d, e, f Tamaño del halo de inhibición en mm para ampicilina (Ap) 10 µg, g entamicina (Gm) 10 µg, estreptomycin (Sm) 10 µg, kanamicina (Km) 30 µg, rifampicina (Rf) 30 µg y piperacilina (Pip) 100 µg respectivamente. Se ha considerado que la bacteria es resistente (R) cuando no se observó halo de inhibición o su diámetro era tan pequeño o difuso que no se pudo medir.

## 6. SELECCIÓN DE LAS CEPAS DE TRABAJO

Debido al gran número de cepas aisladas (treinta y tres), se seleccionaron un total de 16 cepas para su posterior uso. Cuando fue posible, se seleccionaron cuatro representantes de cada género de cada una de las zonas de estudio, dos de ellos aislados de suelo no rizosférico y otros dos de suelo rizosférico. Las cepas seleccionadas fueron *Pseudomonas* sp. S6, *Sphingomonas* sp. S1, *Sphingomonas* sp. S5, *Sphingobium* sp. HS5p, *Novosphingobium* sp. HS2a, *Burkholderia* sp. MS3, *Arthrobacter* sp. S4, *Arthrobacter* sp. HS3g y *Mycobacterium* sp. S3 de las muestras de suelo desnudo, y *Sphingomonas* sp. R3, *Sphingomonas* sp. R4a, *Sphingobium* sp. HR5a, *Novosphingobium* sp. HR1a, *Burkholderia* sp. MR5, *Burkholderia* sp. HR3p y *Arthrobacter* sp. R7 de las muestras de rizosfera. Con estas cepas se realizaron los ensayos de adhesión a semillas de trébol (Capítulo 2) y en algunas de ellas se identificaron los genes implicados en la degradación de fenantreno (Capítulo 3).

Finalmente, por su capacidad de adhesión a las semillas de trébol así como por el interés de las tasas de degradación, se seleccionaron un total de nueve cepas: *Pseudomonas* sp. S6, *Sphingomonas* sp. S1, *Sphingobium* sp. HS5p, *Novosphingobium* sp. HS2a, *Burkholderia* sp. M S3, *Sphingobium* sp. HR5a, *Novosphingobium* sp. HR1a, *Burkholderia* sp. MR5 y *Burkholderia* sp. HR3p. Además se incluyó la cepa *Pseudomonas putida* KT2440 como cepa de referencia en los ensayos de adhesión y colonización de semillas y raíces ya que es una buena colonizadora de rizosfera de varias plantas (Molina *et al.*, 2000; Espinosa-Urgel *et al.*, 2002).

## DISCUSIÓN

Los cambios ambientales pueden influir en la biodiversidad, y por tanto en los procesos fundamentales de los ecosistemas (Loreau *et al.*, 2001; Hooper *et al.*, 2005). Cada vez está más reconocido que una mayor comprensión sobre estos cambios ayudaría a predecir, y en algunos casos evitar, la degradación del ecosistema. Los suelos son sistemas complejos que juegan un papel fundamental en la producción de biomasa, en los ciclos biogeoquímicos y en la biodisponibilidad de nutrientes. Sus características funcionales pueden verse alteradas por distintos motivos, entre ellos, actividades antrópicas tales como enmiendas orgánicas, utilización de fertilizantes y pesticidas o vertidos industriales o municipales, así como por la deposición atmosférica de contaminantes. Estas alteraciones en sus características funcionales incluyen la modificación de las poblaciones microbianas presentes. Sin embargo, los procesos de adaptación microbiana a cambios ambientales son complejos, interviniendo multitud de factores, sobre los que de momento existe bastante desconocimiento. Aun así, resulta evidente que aquellos microorganismos que puedan adaptarse mejor a las nuevas condiciones serán los que predominen en la comunidad.

En el ámbito de la biorremediación cabe destacar dos observaciones fundamentales. La primera es que en ambientes contaminados suele haber microorganismos capaces de mineralizar (o al menos transformar) estos compuestos (Kästner *et al.*, 1994; Radwan *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2004), aunque el papel que juegan estas poblaciones indígenas en la remediación de suelos contaminados no está todavía bien establecido. La segunda observación es que entre los factores que contribuyen a la modificación de las poblaciones bacterianas en el suelo se encuentran las plantas, que pueden jugar un papel fundamental en la selección de genotipos bacterianos en su rizosfera (Duineveld *et al.*, 2001; Walker *et al.*, 2003a; Hartmann *et al.*, 2009). Hasta el momento, pocos estudios han considerado cómo la vegetación ejerce presión sobre las comunidades microbianas y cómo la diversidad vegetal podría afectar indirectamente a algunas funciones de los ecosistemas llevadas a cabo por estas comunidades (Sutton-Grier *et al.*, 2011). En esta selección, las plantas utilizarían una serie de estrategias complejas, entre las que se podría encontrar la liberación de exudados rizosféricos que puedan servir como fuente de carbono a un tipo determinado de bacterias y no a otro, la liberación de compuestos que puedan inducir determinadas rutas catabólicas o de síntesis de antibióticos u hormonas (Hartmann *et al.*, 2009; Segura *et al.*, 2009) o liberación de ciertos compuestos tóxicos para determinadas bacterias (Palumbo *et al.*, 1998). El establecimiento de poblaciones bacterianas con capacidad de degradar contaminantes en la cercanía de la raíz

(Siciliano *et al.*, 2001; Chaudhry *et al.*, 2005), representaría una ventaja selectiva para las plantas que estuviesen creciendo en un ambiente contaminado, ya que las proveería de un ambiente rizosférico limpio.

Como una primera aproximación para analizar la capacidad de las plantas de modificar las poblaciones bacterianas a su alrededor, se realizó un estudio de las poblaciones bacterianas de la rizosfera y del suelo cercano a la raíz de plantas de distintas localizaciones seleccionadas en base a su proximidad a fuentes emisoras de PAHs. Para este estudio se realizaron por un lado análisis mediante DGGE de las muestras de suelo y por otro lado, con una vertiente más práctica, se aislaron e identificaron bacterias capaces de metabolizar fenantreno (un PAH de bajo peso molecular constituido por tres anillos bencénicos). Los análisis de DGGE permiten separar una mezcla de diferentes moléculas de ADN en base a su secuencia, ya que estas presentan diferente movilidad en una matriz de acrilamida de concentración desnaturante creciente. Analizando los patrones de bandas de las diferentes muestras en los gels de DGGE se pueden inferir diferencias en la composición de las comunidades microbianas (Muyzer *et al.*, 1993; Ferris *et al.*, 1996; Teske *et al.*, 1996; Kowalchuk *et al.*, 1997). Si en estos análisis se analiza también la secuencia de las bandas, se pueden identificar además los grupos bacterianos mayoritarios presentes en estas comunidades. Estos análisis no están exentos de problemas ya que la amplificación de los fragmentos puede estar sesgada por los oligonucleótidos y condiciones de amplificación utilizados, favoreciendo la amplificación de ciertos grupos bacterianos en detrimento de otros. Además, se han descrito situaciones en las que bandas con la misma movilidad pertenecían a secuencias diferentes, y al contrario, que dos bandas distintas se correspondan con la misma secuencia nucleotídica. Pese a estos inconvenientes, esta técnica permite visualizar los componentes dominantes de las poblaciones bacterianas de diversas muestras (Muyzer *et al.* 1993). Estudios llevados a cabo por Fulthorpe y colaboradores (2008) mostraron que los 10 géneros mayoritarios identificados en cuatro suelos diferentes representaban entre el 30 y el 37% de las secuencias, lo que indicaba que en los suelos, en general hay unas pocas especies dominantes y una alta proporción de especies que están presentes en números extremadamente bajos (Lauber *et al.*, 2009). Por tanto, los análisis mediante DGGE pueden dar una idea general aproximada sobre la estructura de la comunidad bacteriana dominante.

La biogeografía de los microorganismos ha recibido una atención extraordinaria en los últimos años, y el paradigma de que “todo está en todas partes, pero el ambiente selecciona” (Baas Becking, 1934) ha sido reforzado por gran cantidad de estudios que apoyan la idea de que la dispersión microbiana es global (Finlay y Clarke,



1999; Fenchel, 2003; Hubert *et al.*, 2009, Chu *et al.*, 2010) y que la composición de la comunidad microbiana está influenciada por las condiciones ambientales específicas (Crump *et al.*, 2004; Lozupone y Knight, 2007; Nemergut *et al.*, 2011). Por tanto, parece que la dispersión microbiana no es el factor limitante a la hora del establecimiento de una población bacteriana, sino más bien las condiciones ambientales de la zona (Chu *et al.*, 2010), en concreto las características ambientales del suelo, siendo el pH uno de los factores claves (Fierer y Jackson, 2006; Laubert *et al.*, 2009). Los análisis mediante DGGE realizados durante esta Tesis Doctoral, con todas las limitaciones indicadas anteriormente, muestran que las poblaciones dominantes en las muestras de suelos de una misma área geográfica son muy similares entre sí, pero distintas entre las diferentes localizaciones estudiadas, lo que está de acuerdo con las teorías expuestas anteriormente, y nos hace pensar que las características del suelo y otros factores ambientales, son importantes a la hora de determinar las poblaciones bacterianas mayoritarias. Varios autores han indicado que las comunidades bacterianas se estructuran de acuerdo a las variaciones locales en el pH del suelo, y que la variación en materia orgánica, tipo de vegetación y otros factores ambientales tendrían un menor impacto en la composición filogenética de las comunidades bacterianas (Fierer y Jackson, 2006; Fulthorpe *et al.*, 2008; Laubert *et al.*, 2009; Chu *et al.*, 2010). Otros factores del suelo, como pueden ser la salinidad o la capacidad de intercambio catiónico también pueden ser importantes en la determinación de la composición microbiana del suelo, aunque estos se han estudiado menos (Lozupone y Knight, 2007; Laubert *et al.*, 2009). En consonancia con el efecto que la vegetación podría tener en la selección de la comunidad bacteriana, nosotros hemos visto que aunque existen comunidades mayoritarias similares entre todas las muestras de Madrid y todas las de Huelva, en estos suelos las muestras rizosféricas y no rizosféricas se agrupan diferencialmente. Los índices de similitud resultantes en ambos casos no permiten clasificar las como muestras estrictamente diferentes (ni totalmente iguales) lo que sugiere que la rizosfera de las plantas de estas localidades, sí que ejerce cierta presión selectiva sobre las comunidades bacterianas, aunque esta probablemente no sea la principal fuerza de selección. El hecho de que las muestras rizosféricas se organicen en un mismo grupo, sugiere que pese a que las muestras proceden de la rizosfera de distintas plantas, el efecto rizosférico es bastante común para todas ellas. Pese a que la composición de los exudados bacterianos es diferente entre distintas plantas y entre los distintos estadios del desarrollo de la planta e incluso entre distintas zonas de la raíz (Walker *et al.*, 2003b; Hartmann *et al.*, 2009; Dennis *et al.*, 2010), existen pocos estudios enfocados en la determinación de la composición de los exudados rizosféricos (Dennis *et al.*, 2010) y en muchos casos se asumen las

diferencias en composición porque el metabolismo secundario de las plantas es capaz de generar miles de compuestos distintos que en principio podrían ser secretados por la raíz. Casi todos los exudados rizosféricos analizados contienen ácidos orgánicos, aminoácidos, azúcares, fenoles y ácidos grasos como compuestos mayoritarios comunes (Jones, 1998; Dakora y Phillips, 2002; Kamilova *et al.*, 2006; Henry *et al.*, 2008), siendo los compuestos procedentes del metabolismo secundario mucho menos estudiados, probablemente porque sean componentes más minoritarios y más específicos de un determinado tipo de planta (Dakora y Phillips, 2002). Por tanto, es probable que el efecto rizosférico que hemos observado en nuestros análisis se deba a la presencia de los componentes mayoritarios de los exudados, comunes a todas las plantas seleccionadas, y que la acción que puedan ejercer los compuestos específicos de cada una de las plantas, se ejerza sobre poblaciones bacterianas minoritarias que no se observan en este tipo de análisis. Existen distintos estudios que muestran una influencia clara de los exudados rizosféricos sobre las comunidades bacterianas (Felske *et al.*, 2000; Smalla *et al.*, 2001; Costa *et al.*, 2006; Berg y Smalla, 2009); en algunos de ellos utilizan soluciones artificiales que se asemejan a los exudados radiculares (en sus componentes principales) o se hacen en condiciones de laboratorio (Maloney *et al.*, 1997; Marilley y Aragno, 1999; Haichar *et al.*, 2008; entre otros). En estas condiciones controladas, los efectos rizosféricos, a veces mucho más claros, difieren entre distintos exudados rizosféricos (Oger *et al.*, 2004; Micallef *et al.*, 2009; Badri *et al.*, 2009) o distintas zonas de la raíz (Marschner *et al.*, 2002). Sin embargo, en otros casos los exudados radiculares no producen un cambio radical en la comunidad bacteriana, sino cambios sutiles (Duineveld *et al.*, 2001).

En las muestras de Cenes de la Vega (Granada) no se observaron diferencias significativas entre el patrón de bandas de muestras rizosféricas y no rizosféricas. Esto puede ser debido a que las muestras tomadas en esta zona fueron menos homogéneas que las tomadas en las otras dos zonas. Las muestras G6, G7, G10 y G11 procedían del suelo cercano a la acequia, que estaba prácticamente anegado, las muestras G1, G2 y G8 fueron tomadas de un camino cercano, y las demás fueron tomadas en la zona más cercana a la alameda. Las variaciones existentes entre las poblaciones bacterianas en este caso, estarán influenciadas no sólo por la rizosfera de la planta, sino también por las distintas condiciones ambientales de las diferentes muestras.

Las poblaciones bacterianas identificadas en base a la secuencia de las bandas extraídas de los geles de DGGE incluyen géneros bacterianos típicos de suelos como Acidobacterias, Methilobacterias y Rhizobios (Kuske *et al.*, 1997; Fulthroe *et al.*, 2008) así como géneros que siendo también típicos de suelos se han

asociado a la degradación de compuestos aromáticos con taminantes, como son por ejemplo los géneros *Pseudomonas*, *Sphingomonas* y *Burkholderia* (Dunn y Gunsalus, 1973; Menn *et al.*, 1993; Laurie y Lloyd-Jones, 1999; Tittabutr *et al.*, 2011; Gibson *et al.*, 1973; Fredrickson *et al.*, 1991 y 1995). En general, no se pueden hacer distinciones entre géneros bacterianos exclusivamente presentes en las muestras rizosféricas o en las no rizosféricas. Con los análisis realizados, tampoco se puede inferir que en la rizosfera de las plantas existan más bacterias con potencial biodegradador que en el suelo desnudo.

Los resultados obtenidos mediante DGGE son consistentes con los obtenidos en el aislamiento de cepas con capacidad de degradar fenantreno (y otros PAHs de bajo peso molecular) en el sentido de que pertenecen a los mismos géneros que aparecen como mayoritarios en los suelos analizados (*Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Arthrobacter* y *Sphingomonadaceae*). De igual manera, no se han aislado más bacterias capaces de degradar fenantreno de las muestras rizosféricas que de las de suelo y por tanto, no parece que la vegetación de estas zonas esté ejerciendo un papel selectivo respecto a bacterias degradadoras de PAHs. Este resultado concuerda con los trabajos de Siciliano y colaboradores (1998) que observaron que la presencia de genes degradadores de naftaleno (*ndo*) no era mayoritaria en la rizosfera de las plantas analizadas. Es interesante destacar que bacterias del género *Sphingomonas*, *Pseudomonas* y *Burkholderia* se han asociado frecuentemente a la rizosfera de las plantas (Haichar *et al.*, 2008), mientras que nosotros hemos aislado cepas pertenecientes a estos géneros tanto de rizosfera como de suelo.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que la vegetación de las zonas estudiadas ejerce cierta presión selectiva sobre las comunidades bacterianas presentes en la rizosfera. Además, las bacterias mayoritarias presentes en estos suelos pertenecen en general a los mismos géneros que las bacterias que posteriormente se aislaron de los mismos en base a su capacidad de metabolizar fenantreno. La selección de cepas con la capacidad de metabolizar compuestos tóxicos es uno de los primeros pasos para disponer en el laboratorio de una colección de cepas que nos pueda servir para diseñar estrategias de biorremediación optimizadas para los distintos tipos de suelos y de plantas en los que se vayan a utilizar.

## **CAPÍTULO 2**



## 1. ADHESIÓN Y COLONIZACIÓN DE SUPERFICIES BIÓTICAS

Con objeto de seleccionar el mejor par planta-bacteria para su futura aplicación en estrategias de rizorremediación, se analizaron las capacidades de adhesión a superficies vegetales de las bacterias degradadoras de PAHs aisladas.

Como plantas modelo se seleccionaron el trébol blanco (*Trifolium repens*) y la mostaza blanca (*Sinapis alba*). El trébol es una planta ampliamente distribuida en las regiones de clima templado mientras que la mostaza es típica de la región mediterránea. Ambas plantas son de interés en estrategias de rizorremediación, el trébol blanco por que al ser una leguminosa forma fácilmente asociaciones con las bacterias del suelo, y la mostaza porque es una planta hiperacumuladora de metales por lo que sería de especial interés a la hora de remediar zonas con diferentes tipos de contaminación.

Como ya se ha indicado en el Capítulo 1, de todas las cepas aisladas se seleccionaron representantes de cada uno de los géneros en función de la zona y del tipo de muestra (suelo o rizosfera) del que se aisló. En total se analizaron dieciséis cepas; nueve aisladas en muestras de suelo y siete de muestras de rizosfera. Además se utilizó la cepa *Pseudomonas putida* KT2440 como cepa de referencia dada su gran capacidad de colonizar la rizosfera de varias plantas (Molina *et al.*, 2000, Espinosa-Urgel, 2002). Con estas cepas se realizaron los ensayos de adhesión a semillas y raíces de trébol, y se seleccionaron aquellas que presentaron mayor adhesión para realizar los ensayos en semillas y raíces de mostaza.

### 1.1. Adhesión a semillas

En estrategias de rizorremediación, una forma sencilla y económica de inocular las bacterias de interés en el suelo a remediar es añadirlas adheridas a la superficie de las semillas (Colleran, 1997; Segura *et al.*, 2009). Por ello, se analizó la capacidad de adhesión de las bacterias aisladas a semillas de trébol y mostaza.

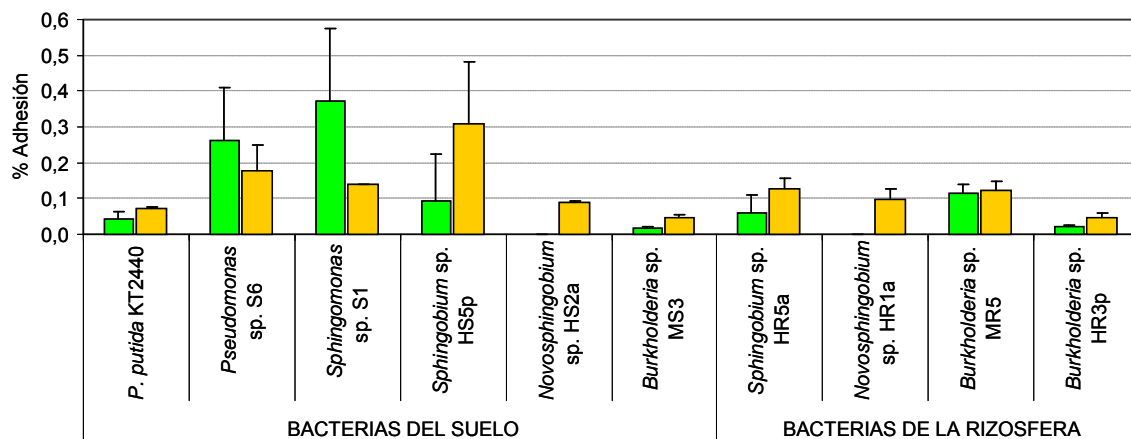
Como se observa en la Tabla 01, las bacterias con mayor capacidad de adhesión a las semillas de trébol fueron *Sphingomonas* sp. S1 y *Pseudomonas* sp. S6, con un porcentaje de bacterias adheridas del 0,37% y 0,26% respectivamente. Las cepas *Burkholderia* sp. MR5, *Sphingobium* sp. HS5p y *Sphingobium* sp. HR5a presentaron una adhesión algo menor (entre 0,112% y 0,06%) mientras que el resto de las cepas ensayadas presentaron una adhesión menor del 0,05 %. Entre estas últimas, destacan las dos cepas de *Novosphingobium* (HS2a y HR1a) que prácticamente no presentaron adhesión (0,001%).

**Tabla 01. Adhesión a semillas de trébol**

Bacterias del suelo		Bacterias de la Rizosfera	
<i>P. putida</i> KT2440	0,042±0,021	<i>Sphingomonas</i> sp. R3	0,037±0,033
<b><i>Pseudomonas</i> sp. S6</b>	<b>0,261±0,150</b>	<i>Sphingomonas</i> sp. R4a	0,038±0,024
<b><i>Sphingomonas</i> sp. S1</b>	<b>0,370±0,205</b>	<i>Sphingobium</i> sp. HR5a	0,060±0,049
<i>Sphingomonas</i> sp. S5	0,024±0,011	<i>Novosphingobium</i> sp. HR1a	0,001±0,001
<b><i>Sphingobium</i> sp. HS5p</b>	<b>0,093±0,132</b>	<b><i>Burkholderia</i> sp. MR5</b>	<b>0,112±0,026</b>
<i>Novosphingobium</i> sp. HS2a	0,001±0,001	<i>Burkholderia</i> sp. HR3p	0,022±0,003
<i>Burkholderia</i> sp. MS3	0,016±0,007	<i>Arthrobacter</i> sp. R7	0,021±0,003
<i>Arthrobacter</i> sp. S4	0,012±0,004		
<i>Arthrobacter</i> sp. HS3g	0,001±0,002		
<i>Mycobacterium</i> sp. S3	0,019±0,023		

Los valores están expresados como el porcentaje de bacterias unidas a las semillas tras 1h de incubación

Para analizar la adhesión de las cepas anteriores a otras semillas, se seleccionaron aquellas que presentaron una mayor capacidad de adhesión a las semillas de trébol y aquellas que no presentaron casi adhesión. Las bacterias Gram-positivas, que presentaban en general índices de adhesión bajos, fueron descartadas de este análisis. Así, se ensayaron con semillas de mostaza nueve cepas (cinco de suelo y cuatro rizosféricas). Los porcentajes de adhesión a ambas semillas se muestran en la Figura 01. Como se observa en la figura, todas las cepas ensayadas, excepto *Burkholderia* sp. MS3 y HR3p, presentaron buenos porcentajes de adhesión, siendo éstos superiores a los de la cepa control *P. putida* KT2440.



**Figura 01. Adhesión de las nueve cepas seleccionadas a semillas.** Los datos representan el porcentaje de bacterias unidas, tras una hora de incubación, a semillas de trébol (verde) y de mostaza (amarillo). Las barras de error indican la desviación estándar.

Observando la figura 01, se puede observar que las bacterias con mayor capacidad de adhesión a semillas coinciden para ambas plantas (*Pseudomonas* sp.

S6, *Sphingomonas* sp. S1, *Sphingobium* sp. HS5 y *Burkholderia* sp. MR5) y por tanto, parece que esta capacidad depende de las características propias de cada cepa. No obstante, para poder hacer una buena correlación, se están llevando a cabo estudios de adhesión a distintos tipos de semillas.

## 1.2. Colonización de raíces

La colonización de la rizosfera es un proceso clave en una buena estrategia de rizadorremediación. Esto supone, que una vez adheridas a las semillas, las bacterias tienen que migrar hacia la rizosfera y establecerse de forma estable en la superficie radicular. Para analizar la capacidad de nuestras cepas de establecerse en la rizosfera, hicimos dos tipos de experimentos. En uno de ellos medimos la capacidad de adhesión a raíces de trébol y mostaza sumergiendo las mismas en una solución que contenía de  $10^5$  a  $10^6$  unidades formadoras de colonias (UFC) y analizamos el porcentaje de bacterias que se adherían a la raíz tras una hora de incubación. Los resultados de estos ensayos (Tabla 02) mostraron que *Novosphingobium* sp. HR1a y *Sphingobium* sp. HR5a son las mejores colonizadoras de raíz de trébol, con una adhesión del 0,33 y 0,21%, respectivamente. Se obtuvieron también porcentajes relativamente altos de adhesión con *Pseudomonas* sp. S6 (0,10%), *Sphingomonas* sp. S1 (0,09%), y *Burkholderia* sp. MS3 (0,07%). Estos porcentajes eran similares a los que mostraba la cepa control, *Pseudomonas putida* KT2440.

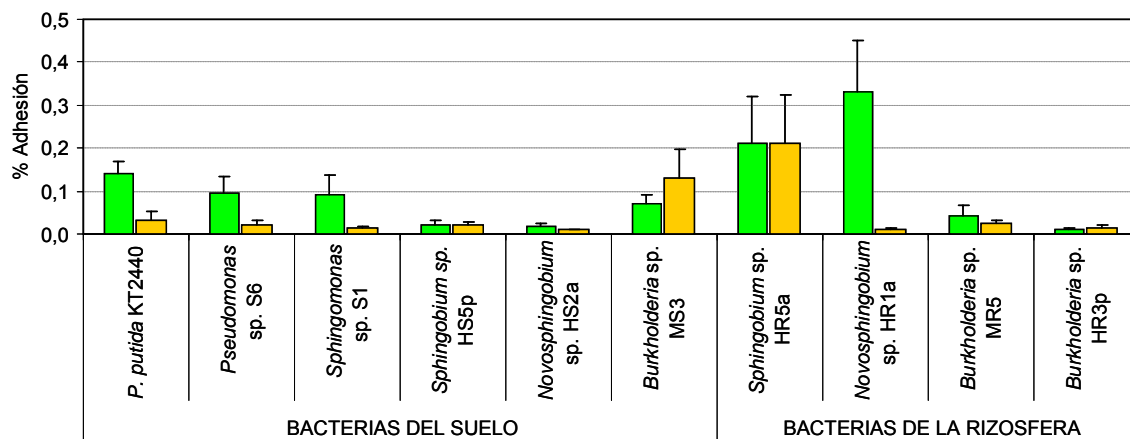
**Tabla 02. Adhesión a raíces de trébol**

Bacterias del suelo		Bacterias de la rizosfera	
<i>P. putida</i> KT2440	0,140±0,028	<i>Sphingomonas</i> sp. R3	0,018±0,012
<i>Pseudomonas</i> sp. S6	0,095±0,037	<i>Sphingomonas</i> sp. R4a	0,022±0,012
<i>Sphingomonas</i> sp. S1	0,092±0,045	<b><i>Sphingobium</i> sp. HR5a</b>	<b>0,212±0,110</b>
<i>Sphingomonas</i> sp. S5	0,005±0,002	<b><i>Novosphingobium</i> sp. HR1a</b>	<b>0,332±0,120</b>
<i>Sphingobium</i> sp. HS5p	0,022±0,009	<i>Burkholderia</i> sp. MR5	0,043±0,024
<i>Novosphingobium</i> sp. HS2a	0,016±0,007	<i>Burkholderia</i> sp. HR3p	0,012±0,003
<i>Burkholderia</i> sp. MS3	0,071±0,020	<i>Arthrobacter</i> sp. R7	0,001±0,00
<i>Arthrobacter</i> sp. S4	0,003±0,003		
<i>Arthrobacter</i> sp. HS3g	0,003±0,002		
<i>Mycobacterium</i> sp. S3	0,029±0,015		

Los valores están expresados como el porcentaje de bacterias unidas a las raíces tras 1h de incubación



En la Figura 02 se muestran gráficamente los resultados de adhesión a semillas de trébol y de mostaza de las nueve cepas seleccionadas. La mayoría de las cepas presentaron una adhesión a raíz de mostaza mucho menor que para la raíz de trébol, siendo *Novosphingobium* sp. HR5a y *Burkholderia* sp. MS3 las que presentaron mayores índices de adhesión a semillas de mostaza.



**Figura 02. Adhesión de las nueve cepas seleccionadas a raíces.** Los datos representan el porcentaje de bacterias unidas, tras una hora de incubación, a raíces de trébol (verde) y de mostaza (amarillo). Las barras de error indican la desviación estándar.

En este caso, al contrario de lo que ocurría con las semillas, la capacidad de adhesión de las cepas sí varía con el tipo de raíz. Así, *Novosphingobium* sp. HR1a, que presenta una buena adhesión a raíz de trébol presenta porcentajes de adhesión a raíz de mostaza menores del 0,02%.

En el segundo tipo de experimentos, se analizó la capacidad de las bacterias para mantenerse como poblaciones estables en las raíces de trébol. Para ello, se diseñaron sistemas gnotobióticos en los cuales se germinaron las semillas en presencia de las bacterias y se tomaron muestras a distintos tiempos para realizar el conteo de número de células viables. En estos sistemas, también se analizó la capacidad de las bacterias para colonizar las raíces a medida que la planta germinaba y crecía. Para ello se extrajeron las plantas de estos sistemas, se lavaron y se colocaron en tubos con 2 ml de agua y perlas de vidrio. Se agitó con vortex para separar las bacterias firmemente adheridas a la raíz y se sembraron diluciones seriadas para contar el número de células adheridas. Finalmente las raíces de las plantas se cortaron y pesaron (peso húmedo) para poder determinar el número de células adheridas por gramo de raíz (UFC/g raíz).

Ya a los cuatro días tras la inoculación, todas las bacterias analizadas presentaron una buena colonización de la raíz. Curiosamente *Novosphingobium* sp. HR1a (la que mejor adhesión a raíz presentó en los experimentos anteriores) fue la cepa que presentó una colonización inicial más baja (de  $2 \times 10^6$  UFC/g raíz) aunque a

los siete días aumentó el número de UFC/g de raíz dos órdenes de magnitud (hasta  $1 \times 10^8$  UFC/g raíz). De todas las cepas ensayadas, las bacterias pertenecientes al género *Burkholderia* fueron las que presentaron una mejor colonización de la raíz, concretamente la cepa MS3 que llegó a superar las  $1 \times 10^9$  UFC/g raíz a los cuatro y siete días.

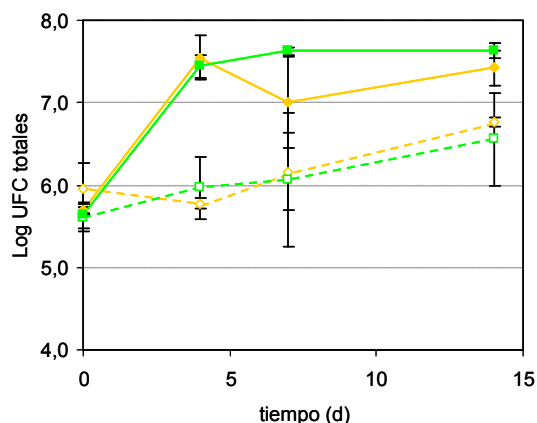
**Tabla 03. Colonización de la raíz de plantas de trébol**

Bacteria	Log <sub>10</sub> UFC totales 0 días	Log <sub>10</sub> UFC/g raíz 4 días	Log <sub>10</sub> UFC/g raíz 7 días	Log <sub>10</sub> UFC/g raíz 14 días
<i>P. putida</i> KT2440	6,88±0,25	7,67±0,11	7,65±0,28	7,47±0,18
<i>Pseudomonas</i> sp. S6	5,61±0,17	7,61±0,25	7,92±0,29	7,92±0,44
<i>Sphingomonas</i> sp. S1	5,95±0,31	7,85±0,47	7,55±0,33	7,26±0,49
<i>Sphingobium</i> sp. HS5p	6,51±0,20	7,75±0,27	8,87±0,26	8,73±0,14
<i>Sphingobium</i> sp. HR5a	6,13±0,15	8,43±0,56	8,97±0,47	8,60±0,41
<i>Novosphingobium</i> sp. HS2a	6,52±0,11	7,89±0,31	8,77±0,18	8,34±0,26
<i>Novosphingobium</i> sp. HR1a	6,71±0,21	6,31±0,55	8,16±0,38	8,58±0,32
<i>Burkholderia</i> sp. MS3	5,74±0,40	9,25±0,30	9,13±0,23	8,85±0,36
<i>Burkholderia</i> sp. MR5	6,76±0,31	8,53±0,46	8,81±0,16	8,28±0,46
<i>Burkholderia</i> sp. HR3p	6,54±0,10	8,69±0,23	8,60±0,47	8,43±0,63

### 1.3. Crecimiento bacteriano en los sistemas gnotobióticos

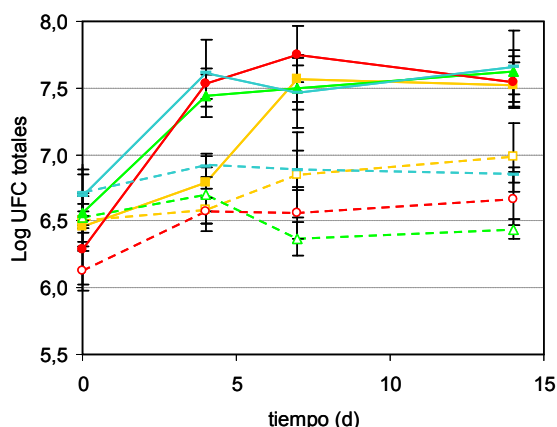
En los experimentos mostrados anteriormente, el ritmo de crecimiento de cada una de las cepas utilizando los compuestos producidos por las plantas durante su germinación y posterior crecimiento puede influir en su capacidad de colonización de la raíz, ya que en estos sistemas no se está añadiendo ningún nutriente adicional al medio. Por tanto, decidimos examinar el crecimiento de las bacterias a medida que se producía la maduración de la planta.

Como se observa en la Figura 03, las cepas *Pseudomonas* sp. S6 y *Sphingomonas* sp. S1, en ausencia de la planta, experimentan un ligero crecimiento, pasando de  $0,4 - 1 \times 10^6$  UFC totales hasta  $2,9 - 5,4 \times 10^6$  UFC totales. Sin embargo, en presencia de la planta experimentan un crecimiento mucho mayor, sobre todo durante los primeros cuatro días, en los que *Pseudomonas* sp. S6 aumenta su población de  $4,5 \times 10^5$  a  $4,3 \times 10^7$  UFC totales y *Sphingomonas* sp. S1 de  $4,9 \times 10^5$  a  $2,84 \times 10^7$  UFC totales. A partir de estos cuatro primeros días, las dos cepas ya no crecen más, pero las poblaciones son capaces de mantenerse hasta los catorce días.



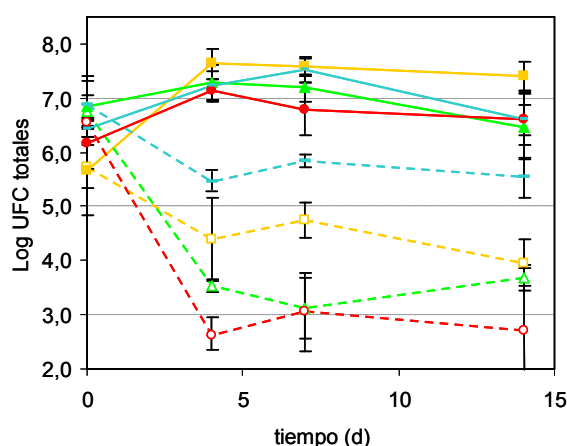
**Figura 03. Crecimiento de las cepas *Sphingomonas* sp. S1 y *Pseudomonas* sp. S6 en los sistemas gnotobióticos.** En la grafica se muestra el crecimiento en presencia (líneas continuas y símbolos cerrados) y ausencia de las plantas (líneas discontinuas y símbolos abiertos) de las cepas *Pseudomonas* sp. S6 (en verde) y *Sphingomonas* sp. S1 (en amarillo). Las barras de error indican la desviación estándar.

Las cepas pertenecientes a los géneros *Sphingobium* y *Novosphingobium* (Figura 04) son capaces de mantener la población inicial en ausencia de la planta, y en algunos casos como en el de las cepas *Sphingobium* sp. HS5p y HR5a experimentan un ligero crecimiento. Cuando en el medio hay plantas, que puedan aportar nutrientes, todas las cepas son capaces de crecer. Durante los cuatro primeros días, todas las bacterias aumentan su población desde  $2,2 - 3,8 \times 10^6$  hasta  $2,3 - 3,5 \times 10^7$  UFC totales, excepto en el caso de *Sphingobium* sp. HS5p que sólo alcanza las  $6,17 \times 10^6$  UFC totales. Sin embargo, a los siete días esta cepa alcanza la misma densidad poblacional que el resto (entre  $2,8 - 3,5 \times 10^7$  UFC totales). A partir de los 7 días, todas las cepas han detenido su crecimiento, y en este caso como en el de las cepas *Pseudomonas* sp. S6 y *Sphingobium* sp. S1 son capaces de mantener las poblaciones hasta los catorce días.



**Figura 04. Crecimiento de las cepas de *Sphingobium* y *Novosphingobium* en los sistemas gnotobióticos.** En la grafica se muestra el crecimiento en presencia (líneas continuas y símbolos cerrados) y ausencia de las plantas (líneas discontinuas y símbolos abiertos) de las cepas *Sphingobium* sp. HS5p (en amarillo) y HR5a (en rojo) y de *Novosphingobium* sp. HS2a (en verde) y HR1a (en azul). Las barras de error indican la desviación estándar.

En la Figura 05, se representa el crecimiento de las tres cepas de *Burkholderia* aisladas junto con la cepa control *P. putida* KT2440. Como se observa en el gráfico, en ausencia de las plantas, ninguna de las cepas de *Burkholderia* es capaz de mantener sus poblaciones, disminuyendo los valores de células viables por debajo de las  $1 \times 10^4$  UFC totales; *P. putida* KT2440 a pesar de que también disminuye su población no alcanza valores tan bajos. En presencia de las plantas, todas las cepas experimentan crecimiento durante los cuatro primeros días alcanzando entre  $1,4 - 4,4 \times 10^7$  UFC totales. A partir de los cuatro días ninguna de las cepas de *Burkholderia* crece, mientras que *P. putida* KT2440 aumenta un poco más su población. Después de los siete días todas las cepas detienen su crecimiento y las poblaciones se mantienen.



**Figura 05. Crecimiento de las cepas de *Burkholderia* y *P. putida* KT2440 en los sistemas gnotobióticos.** En la grafica se muestra el crecimiento en presencia (líneas continuas y símbolos cerrados) y ausencia de las plantas (líneas discontinuas y símbolos abiertos) de las cepas *Burkholderia* sp. MS3 (en amarillo) MR5 (en verde) y HR3p (en rojo) y *P. putida* KT2440 (en azul). Las barras de error indican la desviación estándar.

En conclusión, parece que todas las cepas analizadas son capaces de aprovechar los nutrientes liberados por las plantas ya que en presencia de estas crecen mejor que en su ausencia. En ausencia de las plantas, algunas de las cepas son capaces de mantenerse a una densidad celular igual a la inicial y en algún caso puede haber algo de crecimiento mientras que otras no son capaces de sobrevivir y su densidad celular disminuye dos o tres órdenes de magnitud. Sin embargo, en presencia de las plantas siempre hay crecimiento bacteriano y el número de células viables aumenta una media de dos órdenes de magnitud. Únicamente en el caso de *P. putida* KT2440 el número de UFC totales aumenta sólo de  $1 \times 10^7$  a  $3,53 \times 10^7$  UFC totales.

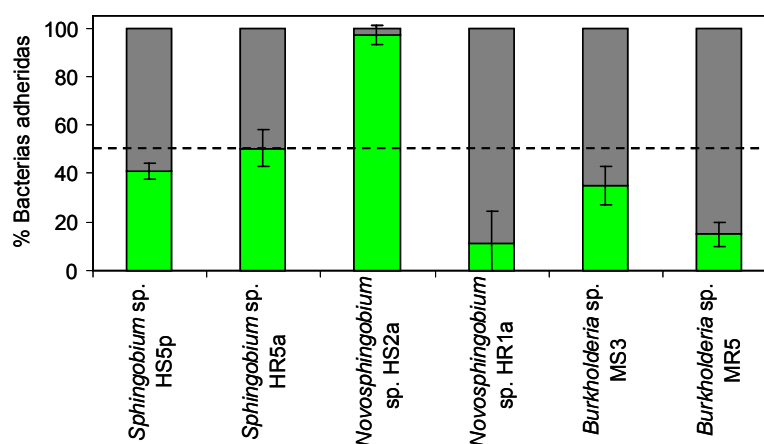
Durante los cuatro primeros días, que coinciden con la germinación de la semilla, es cuando las bacterias experimentan el mayor crecimiento. Exceptuando el caso de las cepas de *Burkholderia*, *Sphingomonas* sp. S1, y *Novosphingobium* sp.

HR1a, el resto de cepas continúan creciendo hasta los siete días de la inoculación. Finalmente, a partir del séptimo día el número de UFC totales se mantiene estable o comienza a descender un poco.

#### 1.4. Adhesión competitiva a raíz de trébol

La inoculación de bacterias en la planta conlleva, en la mayor parte de los casos estudiados, una disminución del número de células vivas o activas debido, entre otras causas, a la competencia con las bacterias indígenas. Con objeto de determinar la capacidad de las bacterias aisladas para establecerse en la rizosfera en competencia con otras bacterias, se llevaron a cabo ensayos de adhesión a raíz de trébol en competencia con la cepa control *Pseudomonas putida* KT2440. En estos ensayos se analizaron seis de las diez cepas analizadas en la adhesión a semillas y raíces de mostaza. No se pudieron analizar las cepas *Pseudomonas* sp. S6 y *Sphingomonas* sp. S1 por falta de un mecanismo de selección frente a KT2440, ni la cepa *Burkholderia* sp. HR3p porque resultó imposible ajustar la proporción de células inoculadas al inicio en una proporción del 50%.

En los ensayos de adhesión en competencia (Figura 06), *Sphingobium* sp. HR5a se adhiere a la raíz de trébol más o menos con la misma eficiencia que *P. putida* KT2440, mientras *Sphingobium* sp. HS5p presenta una adhesión competitiva ligeramente menor a la de la cepa control. En el caso de la cepa HR5a, esta era más eficiente que *P. putida* KT2440 cuando se inoculaban independientemente, mientras que HS5p era menos eficiente. Las dos cepas de *Burkholderia* estudiadas, que inoculadas en solitario tenían porcentajes de adhesión menores que los de *P. putida* KT2440, mantienen este patrón en ensayos de adhesión competitiva. Los resultados más llamativos se produjeron con *Novosphingobium* sp. HR1a y con *Novosphingobium* sp. HS2a. Aunque cuando se inoculaba aisladamente, la cepa *Novosphingobium* sp. HR1a presentaba una mayor capacidad de adhesión a raíz de trébol que la cepa *P. putida* KT2440, cuando se co-inoculan, KT2440 es capaz de desplazar a la cepa HR1a de manera que tras una hora, representa el 90% de las células adheridas a la raíz. Ocurre lo contrario con la cepa *Novosphingobium* HS2a cuya capacidad de adherirse a raíces es muy baja cuando se inocula individualmente, pero que sin embargo es capaz de desplazar a *P. putida* KT2440 cuando entran en competencia.



**Figura 06. Adhesión competitiva frente a *Pseudomonas putida* KT2440.** Las cepas a competir se inocularon en la misma proporción ( $50\% \pm 5\%$ ), y se determinó el porcentaje de bacterias adheridas de cada una de ellas tras una hora de incubación con las raíces. En gris se muestra la cepa *Pseudomonas putida* KT2440 y en verde la cepa analizada en cada caso. La línea de puntos indica el 50% y las barras de error la desviación estándar.

Uno de los mecanismos por los que las cepas bacterianas pueden ser competitivas, aunque sus mecanismos de adhesión en esterilidad no sean óptimos, puede ser la producción de compuestos antimicrobianos. Se realizaron ensayos de inhibición del crecimiento de *P. putida* KT2440 utilizando las cepas aisladas durante esta Tesis Doctoral. Estos resultados fueron negativos y por tanto, podemos descartar que el mecanismo por el cual la cepa *Novosphingobium* sp. HS2a es tan eficiente en la adhesión competitiva sea por la producción de compuestos antibacterianos. Además se estudió la capacidad de estas cepas para producir compuestos que resultaran tóxicos para hongos fitopatógenos. Para ello, utilizamos los hongos *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* CECT 2715 y *Ustilago maydis* SG200. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* es el agente causal del marchitamiento vascular del tomate. Este hongo coloniza los conductos xilemáticos de la planta bloqueando y tapando los vasos, lo que determina la aparición de síntomas de marchitamiento de hoja, amarilleo y eventualmente necrosis y muerte total de la planta. *Ustilago maydis* ataca las mazorcas y plantas de maíz e impide su desarrollo y maduración. Las plantas infectadas desarrollan malformaciones abultadas (tumores), que contienen en su interior las esporas reproductivas en un tejido esponjoso de color negro.

Las bacterias pertenecientes a los géneros *Massilia*, *Arthrobacter* y *Mycobacterium* no tuvieron efecto sobre el crecimiento de ninguno de los dos hongos, al menos en las condiciones ensayadas. Algunas de las cepas analizadas, pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Sphingobium* y *Novosphingobium* eran capaces de inhibir parcialmente el crecimiento de alguno de los hongos, destacando *Sphingomonas* sp. S5 y *Novosphingobium* S7 que inhiben totalmente el desarrollo de *Ustilago* y parcialmente el de *Fusarium*.

Llama la atención que todas las cepas de *Burkholderia* aisladas presentan una gran capacidad antifúngica frente a los dos hongos estudiados.

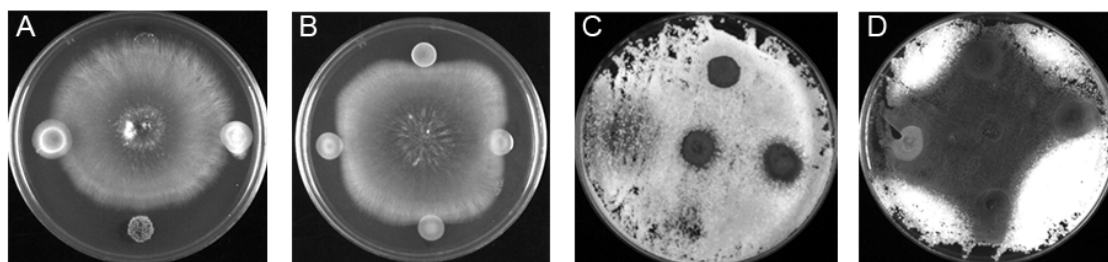
En la siguiente tabla se muestran los resultados de la inhibición del crecimiento de ambos hongos por parte de las bacterias.

**Tabla 04. Inhibición del crecimiento de hongos fitopatógenos**

Bacteria	<i>Fusarium</i>	<i>Ustilago</i>	Bacteria	<i>Fusarium</i>	<i>Ustilago</i>
<i>Pseudomonas</i> sp. S6	-	-	<i>Novosphingobium</i> sp. HR1a	-	-
<i>Pseudomonas</i> sp. R2	-	+/-	<i>Novosphingobium</i> sp. HR1b	-	-
<i>Sphingomonas</i> sp. S1	-	+	<i>Novosphingobium</i> sp. HR3g	-	-
<i>Sphingomonas</i> sp. S5	+/-	+	<i>Burkholderia</i> sp. MS3	+	+
<i>Sphingomonas</i> sp. R3	-	-	<i>Burkholderia</i> sp. MS4b	+	+
<i>Sphingomonas</i> sp. R4a	-	-	<i>Burkholderia</i> sp. MS4t	+	+
<i>Sphingomonas</i> sp. HS5g	-	-	<i>Burkholderia</i> sp. MR5	+	+
<i>Sphingomonas</i> sp. HR2t	-	-	<i>Burkholderia</i> sp. HR3p	+	+
<i>Sphingomonas</i> sp. HR2b	-	-	<i>Massilia</i> sp. HS1t	-	-
<i>Sphingomonas</i> sp. HR4a	-	-	<i>Massilia</i> sp. HS1b	-	-
<i>Sphingobium</i> sp. HS3p	+/-	-	<i>Arthrobacter</i> sp. S4	-	-
<i>Sphingobium</i> sp. HS5p	-	-	<i>Arthrobacter</i> sp. R7	-	-
<i>Sphingobium</i> sp. HR5a	-	+/-	<i>Arthrobacter</i> sp. HS3g	-	-
<i>Sphingobium</i> sp. HR5b	-	-	<i>Arthrobacter</i> sp. HS4-1	-	-
<i>Sphingobium</i> sp. HR5r	+/-	-	<i>Arthrobacter</i> sp. HS4-2	-	-
<i>Novosphingobium</i> sp. S7	+/-	+	<i>Mycobacterium</i> sp. S3	-	-
<i>Novosphingobium</i> sp. HS2a	+/-	-			

En la tabla se indica si el crecimiento del hongo se vio afectado parcialmente (+/-), totalmente (+), o no se vio afectado (-).

En la Figura 07 se muestra cómo en presencia de *Burkholderia* sp. MS3 se observa una morfología cuadrada en el micelio de *Fusarium* y una coloración oscura en el césped de *Ustilago* indicativo de una incorrecta maduración (Figura 07 B y D). Estos resultados, sugieren que estas cepas producen compuestos antifúngicos de amplio espectro ya que afectan a los dos hongos analizados.



**Figura 07. Inhibición del crecimiento de hongos fitopatógenos.** A. *Fusarium* inoculado junto con distintas cepas bacterianas (halos alrededor del hongo) que no afectan a su desarrollo. B. *Fusarium* con morfología anormal debido a la presencia de *Burkholderia* sp. MS3. C. Césped de *Ustilago* que no se ve afectado por la inoculación de las bacterias (zona de la placa izquierda e inferior) o se ve afectado parcialmente (halos de color oscuro). D. Maduración anormal de *Ustilago* debido a la presencia de *Burkholderia* sp. MS3.

## 2. ELIMINACIÓN DE FENANTRENO EN SISTEMAS GNOTOBIÓTICOS

Se decidió realizar ensayos de degradación en sistemas gnotobióticos para tener criterios objetivos en la elección de la mejor combinación planta-bacteria a la hora de diseñar un buen sistema de rizorremediación.

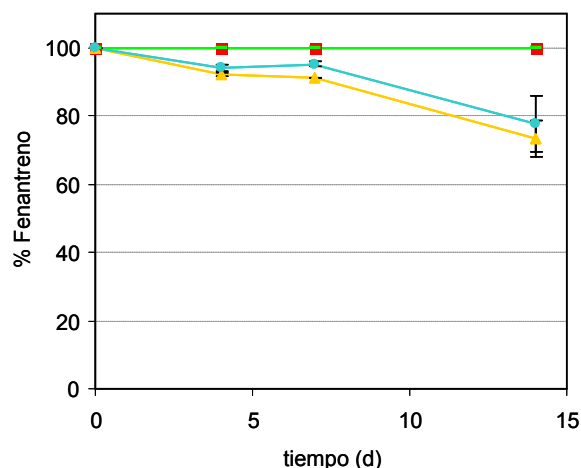
Para estos ensayos se comenzó utilizando la cepa *Burkholderia* sp. MS3 en base a su capacidad de adhesión a raíz y por su capacidad de producir compuestos antifúngicos y la cepa *Novosphingobium* sp. HS2a como una de las cepas que presentaba mejor adhesión competitiva a raíz de trébol. En estos experimentos se quería observar tanto la eliminación de fenantreno del medio, como el efecto que tenía la presencia de las bacterias en la toxicidad que pudiera ejercer el fenantreno sobre las plantas. Para esto, lo primero que se hizo fue un ensayo preliminar de toxicidad de fenantreno para las plantas de trébol utilizándose dos concentraciones de fenantreno (0,01 g/l y 0,1 g/l). A la concentración de fenantreno más baja no se notaron efectos significativos sobre el porcentaje de germinación, longitud de tallo y de raíz de las plantas de trébol, ni sobre el aspecto general de la planta. Sin embargo, a una concentración de 0,1g/l los efectos sobre los parámetros indicados ya fueron significativos. Por tanto, decidimos utilizar esta concentración en los ensayos posteriores. Hay que tener en cuenta, sin embargo, que la solubilidad del fenantreno en agua es de 1,13mg/l ( $\approx 6 \mu\text{M}$ ) a 25°C y por tanto este compuesto se suministró en cristales.

Para estos experimentos se utilizaron sistemas gnotobióticos como los descritos anteriormente, sólo que en este caso se añadió fenantreno a los tubos problema. Ya que las condiciones ambientales podrían afectar a la eficiencia de los procesos de biodegradación, se realizaron dos experimentos, uno en primavera (principios de abril) y otro en invierno (finales de noviembre) con la cepa *Burkholderia* sp. MS3 Las plantas se dejaron germinar y crecer en el laboratorio, donde la temperatura diurna



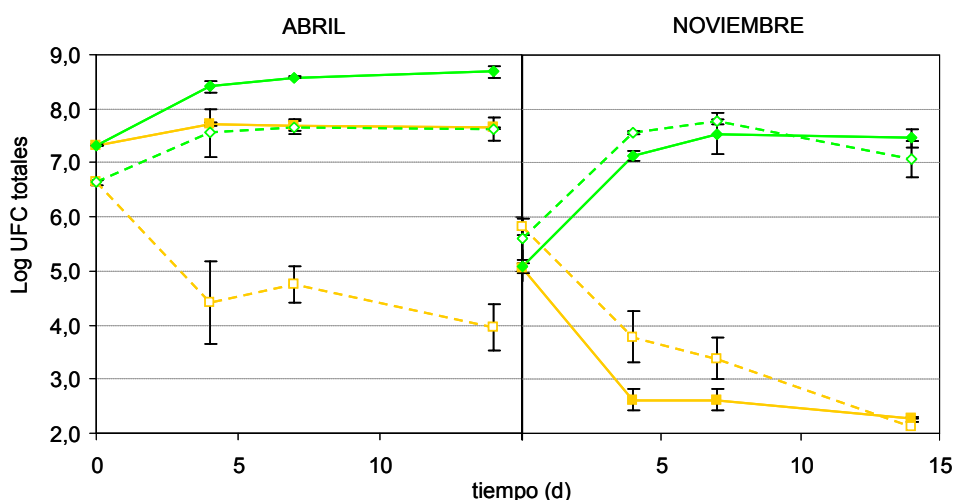
permanecía constante (entre 21-22°C) pero donde la temperatura nocturna fluctuaba según la estación del año (aproximadamente 17°C en primavera y 10°C en invierno), sin llegar a ser tan extremas como en el exterior.

En el caso de *Burkholderia* sp. MS3, se detectó eliminación de fenantreno sólo en el ensayo realizado durante el mes de abril (Figura 08). En este caso, *Burkholderia* sp. MS3 fue capaz de degradar fenantreno desde los primeros días del experimento, aunque ésta fue más evidente a partir del séptimo día. Cuando se detuvo el experimento, a los 14 días, la cantidad de fenantreno que quedaba en el medio era aproximadamente el 75% de la cantidad inicial. Es interesante observar que esta degradación es muy similar tanto en presencia como en ausencia del trébol. Esto nos está indicando que aunque la planta no está estimulando la degradación de fenantreno en nuestro sistema modelo, tampoco está reprimiendo la eliminación del compuesto pesa a tener otra fuente de carbono como son los exudados radiculares.



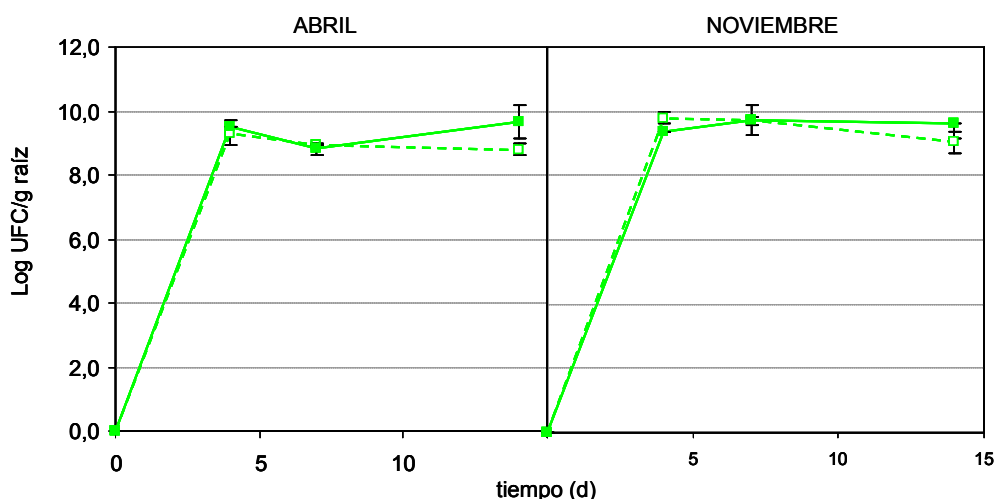
**Figura 08. Degradación de fenantreno en los sistemas gnotobióticos en el ensayo realizado en el mes de abril.** Como control se prepararon tubos únicamente con fenantreno (rojo) o con la planta (verde). La línea amarilla indica la bacteria creciendo sola y la azul creciendo en asociación con la planta. Las barras de error indican la desviación estándar.

Al igual que se había visto en los ensayos de colonización, en los dos ensayos realizados con la cepa *Burkholderia* sp. MS3, el número de UFC totales disminuye dos órdenes de magnitud cuando la bacteria no tiene ninguna fuente de carbono (sin fenantreno ni planta) y aumenta entre uno y dos órdenes de magnitud en presencia de la planta independientemente de si en el medio hay o no fenantreno (Figura 09). En ausencia de la planta y cuando en el medio hay fenantreno, si la bacteria lo está degradando (abril), el número de UFC totales aumenta un orden de magnitud, sin embargo cuando no hay degradación del contaminante el número de UFC totales descendió dos órdenes de magnitud (noviembre). El aumento en el número de UFC ocurre fundamentalmente durante los cuatro primeros días desde la inoculación coincidiendo con el periodo de germinación de la semilla (Figura 09).



**Figura 09. Crecimiento de *Burkholderia* sp. MS3 en los sistemas gnotobióticos en presencia y ausencia de fenantroeno en los meses de abril y noviembre.** En la gráfica se muestra el crecimiento de la bacteria sola (amarillo) y en asociación con plantas de trébol (verde) en presencia (líneas continuas, símbolos cerrados) y ausencia de fenantroeno (líneas discontinuas, símbolos abiertos). Las barras de error indican la desviación estándar.

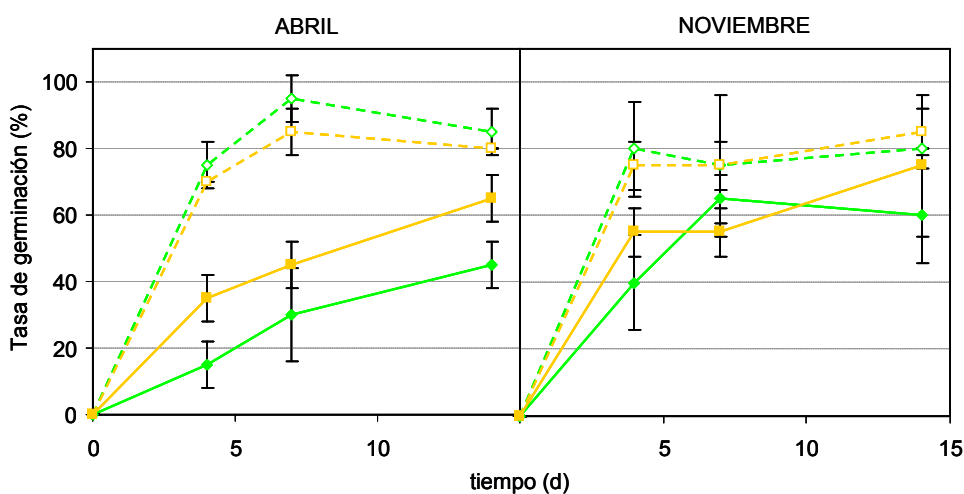
En estos ensayos también se analizó la capacidad de las bacterias para colonizar la raíz de trébol, observándose que la presencia del contaminante no altera la eficiencia de la colonización (Figura 10); a los cuatro días el número de bacterias en la raíz supera las  $1 \times 10^9$  UFC/g raíz manteniéndose constante a lo largo del tiempo a pesar de que la raíz sigue creciendo, alcanzando una longitud de unos 15 cm a los 14 días. En los dos experimentos realizados se obtuvo la misma eficiencia colonizadora de raíz independientemente de la estación del año.



**Figura 10. Colonización de la raíz de trébol por *Burkholderia* sp. MS3 en los sistemas gnotobióticos en presencia y ausencia de fenantroeno en los meses de abril y noviembre.** En la gráfica se muestra la colonización de la raíz en presencia del contaminante (líneas continuas, símbolos cerrados) y en su ausencia (líneas discontinuas, símbolos abiertos). Las barras de error indican la desviación estándar.

Los parámetros analizados para determinar la toxicidad del fenantroeno sobre la planta fueron la tasa de germinación y la longitud del tallo y la raíz. Al analizar la tasa

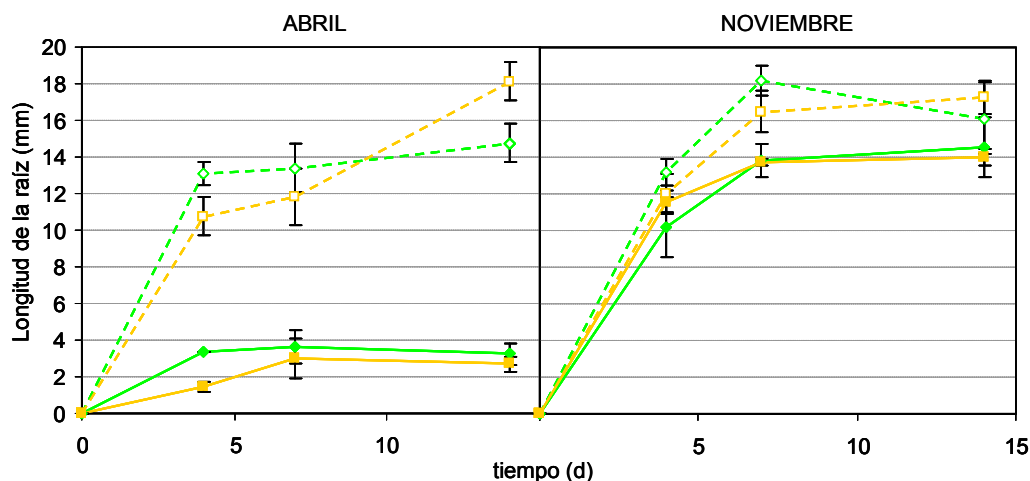
de germinación (Figura 11), observamos que en ausencia del hidrocarburo en los dos ensayos la mayoría de las semillas han germinado a los cuatro días (75-80%), llegándose al 80-90% de germinación a los 7 días. Sin embargo, en aquellos tubos en los que hay fenantreno se observa tanto un retardo como una menor germinación de las semillas. El efecto tóxico del fenantreno es mayor en el mes de abril, ya que se observa claramente un retardo en la germinación y el porcentaje de germinación que se alcanza es tan sólo del 40%, mientras que en el ensayo de noviembre se alcanza una tasa de germinación del 60%. Cuando la bacteria está presente y está degradando fenantreno (abril), el porcentaje de germinación a los cuatro días es casi el doble que en ausencia de bacteria. Este efecto no se observó en el ensayo realizado durante el mes de noviembre.



**Figura 11. Tasa de germinación del trébol en los sistemas gnotobióticos en los meses de abril y noviembre.** En la gráfica se muestra la germinación de las semillas sin inocular (verde) e inoculadas con *Burkholderia* sp. MS3 (amarillo) en presencia de fenantreno (líneas continuas, símbolos cerrados) y en su ausencia (líneas discontinuas, símbolos abiertos). Las barras de error indican la desviación estándar.

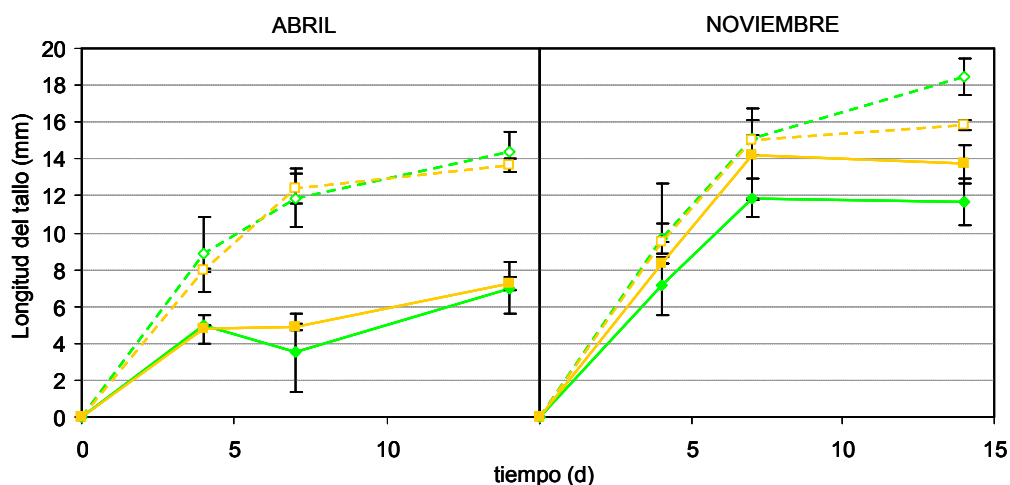
Además de la tasa de germinación, el crecimiento de la planta también se vio afectado en presencia del contaminante siendo la longitud de la raíz tallo y del tallo menor comparada con los controles. Al igual que en el caso anterior, el efecto tóxico del fenantreno sobre estos dos parámetros de las plantas fue mayor en el experimento realizado durante la primavera que en el realizado durante el invierno (Figuras 12 y 13).

En ausencia del contaminante, la longitud de la raíz fue de  $14,75 \pm 1,06$  mm y  $18,44 \pm 0,98$  mm en los ensayos de abril y noviembre respectivamente. La presencia del contaminante prácticamente impide el desarrollo de la raíz ( $3,25 \pm 0,59$  mm) en abril, mientras que en el mes de noviembre la raíz alcanza un tamaño sólo algo menor a las condiciones control ( $14,56 \pm 1,63$  mm) (Figura 12). En ninguno de los dos ensayos, se observó un efecto beneficioso de las bacterias en las plantas inoculadas.



**Figura 12. Longitud de la raíz de las plantas de trébol en los sistemas gnotobióticos en los meses de abril y noviembre.** En la gráfica se muestra la longitud de la raíz de las semillas sin inocular (verde) e inoculadas con *Burkholderia* sp. MS3 (amarillo) en presencia de fenantreno (líneas continuas, símbolos cerrados) y en su ausencia (líneas discontinuas, símbolos abiertos). Las barras indican la desviación estándar.

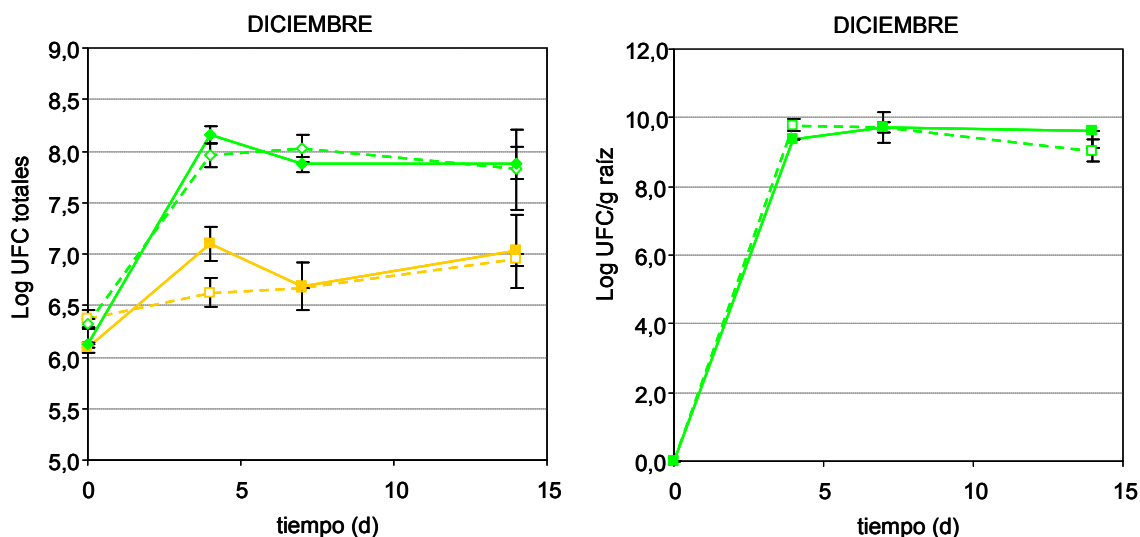
En el caso de la longitud del tallo, en ausencia de fenantreno ésta fue de  $14,39 \pm 1,07$  mm en el mes de abril y de  $18,44 \pm 0,98$  mm en el mes de noviembre. En presencia del contaminante, en el mes de abril la longitud del tallo de las plantas fue de  $7,0 \pm 1,41$  mm, mientras que en el mes de noviembre la reducción en el tamaño del tallo era menor (alcanzándose unos  $11,69 \pm 1,25$  mm). En este caso se observó un ligero aumento de la longitud del tallo en presencia de bacteria, aunque estos datos hay que tomarlos con prudencia y tan sólo las repeticiones del ensayo nos revelarán si esta tendencia es estadísticamente relevante.



**Figura 13. Longitud del tallo de las plantas de trébol en los sistemas gnotobióticos en los meses de abril y noviembre.** En la gráfica se muestra la longitud de tallo de las semillas sin inocular (verde) e inoculadas con *Burkholderia* sp. MS3 (amarillo) en presencia de fenantreno (líneas continuas, símbolos cerrados) y en su ausencia (líneas discontinuas, símbolos abiertos). Las barras de error indican la desviación estándar.

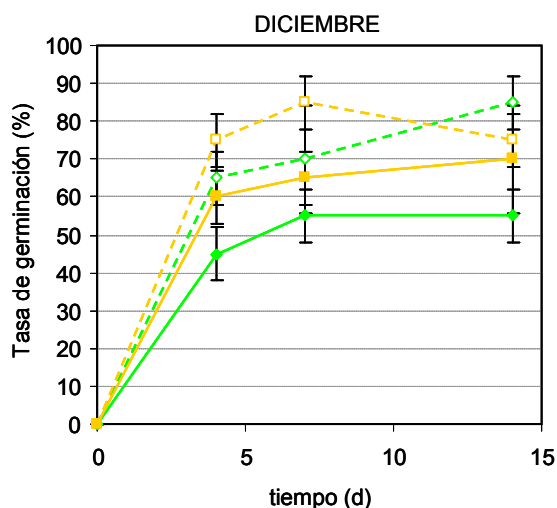
En el caso de la cepa *Novosphingobium* sp. HS2a, sólo se ha realizado un ensayo de degradación en los sistemas gnotobióticos a principios del mes de diciembre (invierno). Los parámetros analizados fueron los mismos que en el caso de la cepa *Burkholderia* sp. MS3. En este ensayo, al igual que en el realizado en invierno con *Burkholderia* sp. MS3 no se detectó degradación de fenantreno por parte de la bacteria.

Como se observa en la Figura 14, en presencia de las plantas las bacterias son capaces de crecer aumentando casi dos órdenes de magnitud respecto de las UFC totales iniciales. En cambio en ausencia de las plantas de trébol, independientemente de si en el medio hay fenantreno o no, las bacterias experimentan un ligero crecimiento pasando de  $1 - 3 \times 10^6$  a  $1 \times 10^7$ . Al igual que ocurría en el caso de la cepa *Burkholderia* sp. MS3, la presencia del contaminante en el medio no afecta a la tasa de colonización de la raíz por parte de *Novosphingobium* sp. HS2a (Figura 14).



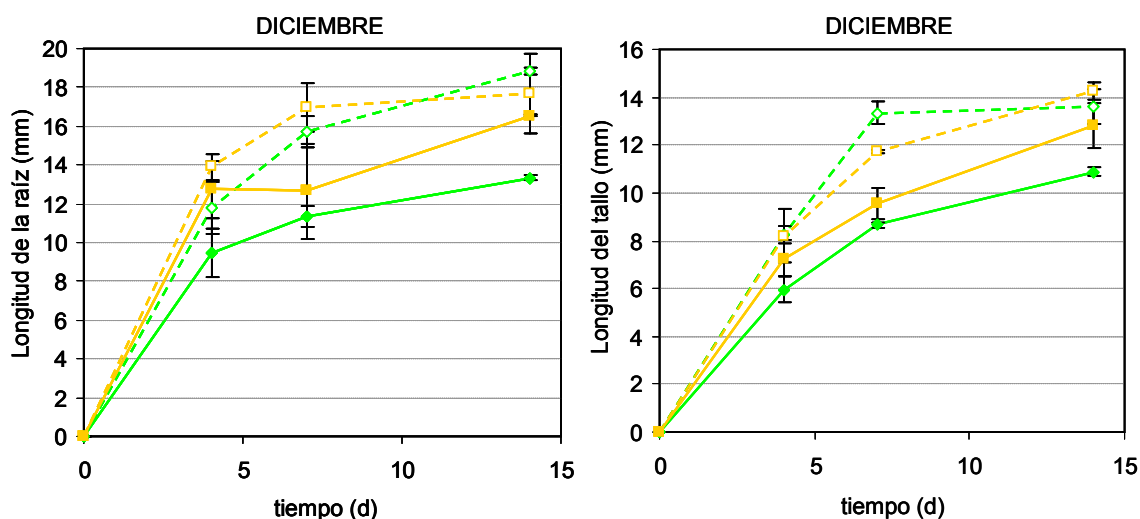
**Figura 14. Crecimiento y colonización de la raíz de trébol por *Novosphingobium* sp. HS2a en los sistemas gnotobióticos en el mes de diciembre.** En la gráfica de la izquierda se muestra el crecimiento de la bacteria sola (amarillo) y en asociación con plantas de trébol (verde) en presencia (líneas continuas, símbolos cerrados) y ausencia de fenantreno (líneas discontinuas, símbolos abiertos). En la gráfica de la derecha se muestra la colonización de la raíz en presencia del contaminante (líneas continuas, símbolos cerrados) y en su ausencia (líneas discontinuas, símbolos abiertos). Las barras de error indican la desviación estándar.

En cuanto a los parámetros de la planta analizados, se observa que el fenantreno afecta a todos ellos. Como se observa en la Figura 15, la presencia de fenantreno en el medio causa una disminución en la tasa de germinación, siendo ésta del 55 - 70% respecto el 80 - 85 % del control sin contaminante. Aquí también se observa una tendencia a la mejora del porcentaje de germinación de las semillas en presencia de fenantreno y la bacteria, aunque al igual que anteriormente, estos datos hay que tomarlos con mucha precaución.



**Figura 15. Tasa de germinación del trébol en los sistemas gnotobióticos en el mes de diciembre.** En la gráfica se muestra la germinación de las semillas sin inocular (verde) e inoculadas con *Novosphingobium* sp. HS2a (amarillo) en presencia de fenantreno (líneas continuas, símbolos cerrados) y en su ausencia (líneas discontinuas, símbolos abiertos). Las barras de error indican la desviación estándar.

En cuanto a la longitud de la raíz y el tallo, se observa un efecto similar al de la germinación. La presencia de fenantreno en el medio hace que las plantas presenten una longitud del tallo y de la raíz menor respecto las condiciones control (Figura 16). En este caso también la presencia de la bacteria en el medio parece reducir los efectos tóxicos del hidrocarburo sobre estos dos parámetros.



**Figura 16. Longitud de la raíz y el tallo de las plantas de trébol en los sistemas gnotobióticos en el mes de diciembre.** En la gráfica de la izquierda se muestra la longitud de la raíz de las semillas sin inocular (verde) e inoculadas con *Novosphingobium* sp. HS2a (amarillo) en presencia de fenantreno (líneas continuas, símbolos cerrados) y en su ausencia (líneas discontinuas, símbolos abiertos). En la gráfica de la derecha se muestra la longitud del tallo de las plantas sin inocular (verde) e inoculadas con *Novosphingobium* sp. HS2a (amarillo) en presencia de fenantreno (líneas continuas, símbolos cerrados) y en su ausencia (líneas discontinuas, símbolos abiertos). Las barras de error indican la desviación estándar.

## DISCUSIÓN

En la literatura se han descrito numerosas bacterias capaces de metabolizar PAHs, pero en pocos casos se ha analizado su capacidad de adhesión a semillas o de establecerse en la rizosfera de las plantas. Estas características les conferirían una ventaja selectiva a la hora de ser utilizadas en estrategias de biorremediación. En este capítulo se han analizado algunas de las propiedades importantes en la interacción con la planta de las cepas bacterianas que se aislaron en el capítulo anterior. Estas características son la adhesión a semillas y raíces tanto en cultivo puro como en competencia, la utilización de los exudados radiculares para el crecimiento, o la colonización de la raíz. Además, también se ha analizado la capacidad de estas cepas para inhibir el crecimiento de otras bacterias y hongos lo que sería beneficioso en la colonización competitiva en la rizosfera. En muchas formulaciones comerciales se utilizan bacterias adheridas a las semillas para la inoculación en suelo de bacterias beneficiosas para la planta (Colleran, 1997; Segura *et al.*, 2009). Es por tanto interesante explorar la posibilidad de inoculación de plantas con bacterias con propiedades de degradación de contaminantes adheridas a las semillas. Cuando analizamos la proporción de bacterias que eran capaces de adherirse a la superficie de las semillas, vimos que cinco de las cepas analizadas tenían una buena adhesión a semillas de trébol y también a semillas de mostaza (*Pseudomonas* sp. S6, *Sphingomonas* sp. S1, *Sphingobium* sp. HS5p, *Sphingobium* sp. HR5a y *Burkholderia* sp. MR5), lo que sugiere que los mecanismos implicados en esta adhesión dependen fundamentalmente de la bacteria y no del tipo de semilla. Los factores bacterianos que participan en la adhesión a semillas identificados hasta el momento son fundamentalmente proteínas extracelulares o de membrana (DeFlaun *et al.*, 1990; Dörr *et al.*, 1998; Espinosa-Urgel *et al.*, 2000; Darsonval *et al.*, 2009), como pili, fimbrias, adhesinas, flagelos, o lipopolisacáridos (Torres *et al.*, 2005; Yousef-Coronado *et al.*, 2008) y muchas de ellas están también implicadas en la formación de biofilms y en la adhesión a superficies bióticas (Espinosa-Urgel *et al.*, 2000; Torres *et al.*, 2005). Actualmente se cree que los procesos implicados en la adhesión a superficies bióticas y abióticas comparten algunos procesos comunes, aunque otros serían divergentes (Yousef-Coronado *et al.*, 2008). En este sentido, y aunque las semillas son superficies bióticas, en el tipo de ensayo que llevamos a cabo (superficies esterilizadas y tiempo de incubación corto) probablemente las bacterias las “sientan” fundamentalmente como simples superficies a las que adherirse sin que las características particulares de las mismas sean definitivas para influir en el proceso de adhesión.

Sin embargo, en el caso de la adhesión a raíz, los resultados que hemos obtenido sugieren que los mecanismos implicados son más específicos de la interacción planta-bacteria. Las cepas que mejor se adhirieron a las raíces de trébol fueron, por orden: *Novosphingobium* sp. HR1a, *Sphingobium* sp. HR5a, *P. putida* KT2440, *Pseudomonas* sp. S6 y *Sphingobium* sp. S1, mientras que para mostaza sólo dos de estas cepas presentaron una buena adhesión *Sphingobium* sp. HR5a y *Burkholderia* sp. MS3. En esta especificidad estarían interviniendo probablemente los compuestos radiculares específicos de cada planta. Mientras que la semilla tiene una cubierta exterior impermeable a la exudación de compuestos, en los experimentos de adhesión utilizamos los ápices de las raíces que suelen ser las estructuras más activas en la liberación de exudados. Por otro lado al separarse estos ápices del resto de la planta, estamos induciendo una lesión donde también se produce la liberación de productos radiculares. En los experimentos de adhesión, los tiempos que se utilizan (1h) no son suficientemente largos como para ver diferencias significativas en base a la utilización de sustratos por las bacterias, pero sí como para influir en el movimiento de las bacterias hacia la raíz por quimiotaxis, una de las funciones generalmente implicadas en colonización de raíz (Zheng y Sinclair, 1996; Yaryura *et al.*, 2008). Es interesante observar que aunque hay diferencias significativas en cuanto a la capacidad de adhesión de las distintas cepas a la raíz de trébol, estas diferencias se anulan cuando realizamos el experimento de colonización de raíz en los sistemas gnotobióticos. En este caso, casi todas las cepas estudiadas alcanzaban una densidad celular de aproximadamente  $10^8$  UFC/g de raíz, si bien la cinética de colonización no fue la misma para todas ellas. En estos experimentos de colonización, llevados a cabo durante 14 días entran en juego más factores y los exudados radiculares sí pueden jugar un papel importante, ya que como hemos demostrado, estas bacterias son capaces de crecer utilizándolos. En la colonización, no sólo interviene la capacidad de utilizar los exudados, sino también la capacidad de resistir compuestos tóxicos que puedan exudar las plantas (Palumbo *et al.*, 1998) o la identificación de señales vegetales específicas. La presencia de otros microorganismos, y los compuestos que éstos puedan producir, serían otros de los factores que podrían limitar la colonización, aunque en el tipo de experimentos que nosotros hemos llevado a cabo (en condiciones axénicas y con una sola cepa bacteriana) no serían relevantes.

Una de las observaciones realizadas durante esta Tesis Doctoral es el hecho de que no necesariamente las bacterias aisladas de la rizosfera presentaban mejor adhesión y colonización de las raíces que aquellas que se habían aislado de los suelos adyacentes. Estos resultados son opuestos a las observaciones de otros autores (Hozore y Alexander, 1991; Lugtenberg y Dekkers, 1999), esto puede deberse



a varias razones. Una de ellas podría ser que en la rizosfera de la planta no hubiera bacterias con capacidad de degradar fenantreno distintas de aquellas que estuviesen en el suelo circundante, sino solamente más activas y en mayores cantidades. Hay numerosos estudios que sugieren que en la rizosfera hay menos diversidad bacteriana pero mayor número de bacterias y más activas metabólicamente (Rentz *et al.*, 2004; Kuiper *et al.*, 2004a). Nuestros propios resultados (Capítulo 1) sugieren que en ambos ambientes (rizosfera y suelo) las poblaciones mayoritarias están regidas por la zona geográfica y no por la presencia/ausencia de la planta y que además bacterias pertenecientes a géneros que típicamente degradan PAHs están presentes en ambos tipos de suelos. Además al haber hecho un enriquecimiento, podemos también haber seleccionado en suelos no rizosféricos células de poblaciones mayoritariamente rizosféricas pero que se encontraran a bajos niveles en suelo desnudo. De hecho, aunque no hemos hecho un análisis filogenético en profundidad de todas las cepas, algunos de los aislados podrían ser en realidad la misma cepa. Por último, conviene no perder de vista el hecho de que estos ensayos de adhesión y colonización se han realizado en condiciones de esterilidad, donde no existe competencia con otras bacterias indígenas, y que puede que estos índices de colonización decaigan rápidamente en ambientes microbianos complejos. De hecho, los experimentos de adhesión realizados en competencia con *P. putida* KT2440, muestran que algunas de las bacterias aisladas, con altos índices de adhesión en cultivos puros, presentan una menor adhesión a raíz en competencia con *P. putida* KT2440 (*Novosphingobium* sp. HR1a), mientras que otras con menor capacidad de adhesión (*Novosphingobium* sp. HS2a) llegan a desplazar a la cepa control. Los mecanismos de competencia de las bacterias por ocupar un determinado nicho están relacionados en muchos casos con la competencia por los nutrientes, captación de hierro, síntesis de compuestos antimicrobianos y otros. Sin embargo para que estos entren en juego se necesitan periodos de incubación relativamente largos ya que son mecanismos que dependen del crecimiento y estado metabólico de las bacterias. Los experimentos de adhesión competitiva están realizados a tiempo corto (1 hora) y por tanto las diferencias en la tasa de crecimiento de las distintas cepas no influyen significativamente en el resultado. Desconocemos por tanto, los mecanismos por los cuales *Novosphingobium* sp. HS2a, que presenta un porcentaje de adhesión a raíz de trébol menor que *P. putida* KT2440 en cultivo puro, puede desplazar en tan sólo 1 hora a ésta última en los ensayos de competencia.

En los ensayos de crecimiento en los sistemas gnotobióticos, todas las bacterias estudiadas aumentan su número en presencia de la planta, mientras que su número disminuye o se mantiene en su ausencia ya que en el medio no hay ninguna

fuentes de carbono. Este resultado indica que todas las cepas son capaces de utilizar los exudados radiculares de las plantas, no obstante cada cepa mostró un comportamiento diferente lo que refleja diferencias en la utilización de los compuestos liberados por la planta. En el caso de las tres cepas de *Burkholderia* y de *Sphingomonas* sp. S1, las cepas crecen activamente durante los cuatro primeros días de incubación, sugiriendo que en este caso los exudados liberados durante la germinación de las semillas son los preferencialmente utilizados por estos géneros. Para las demás cepas, el crecimiento se suele mantener hasta los 7 días. La utilización diferencial de los exudados radiculares podría conferir a algunas de las bacterias ventajas competitivas frente a otras. Hay que tener en cuenta que en el sistema utilizado la planta sobrevive durante aproximadamente 21 días, aunque el periodo de mayor crecimiento se observa hasta los diez días tras la inoculación.

La producción de compuestos tóxicos para otros microorganismos rizosféricos también sería una ventaja selectiva. Aunque no hemos explorado de momento la colonización competitiva en raíz en condiciones reales, si hemos demostrado la producción de compuestos antifúngicos por las cepas de *Burkholderia*; en concreto estas cepas fueron capaces de inhibir el crecimiento de dos hongos fitopatógenos *in vitro*. Este hecho puede ser de gran utilidad no sólo en competencia entre microorganismos, sino también para la planta, que se beneficiaría de la capacidad degradativa de la bacteria y de la protección frente al ataque de hongos fitopatógenos. Además estos resultados son de relevancia en el contexto general de la protección de cultivos.

Para evaluar el potencial fitorremediador de estas cepas, realizamos ensayos de eliminación de fenantreno en sistemas gnotobióticos con dos de las cepas aisladas. De los tres ensayos que se llevaron a cabo, tan sólo el experimento realizado en primavera dio resultados positivos en cuanto a degradación del contaminante, lo que ya estaría indicando una posible limitación en la aplicación de estas estrategias de rizorremediación sugiriendo que las condiciones climáticas van a condicionar en gran medida los resultados. Esta limitación podría deberse a dos motivos fundamentales, por un lado, las bacterias a temperaturas más bajas son menos eficientes a la hora de degradar el contaminante, y además los efectos tóxicos del fenantreno son mayores a altas temperaturas. Este efecto de toxicidad probablemente esté relacionado con la solubilidad del fenantreno, que aumenta con la temperatura y por tanto está más biodisponible en los experimentos realizados en el mes de abril que aquellos realizados durante el invierno. Igualmente, al haber más cantidad soluble, y por tanto biodisponible, la eliminación por las bacterias también será más eficaz. Los resultados preliminares indican que aunque la presencia de las plantas no mejora la eficiencia en

la eliminación de fenantreno, ésta no se ve afectada negativamente por la presencia de la planta.

En el ensayo llevado a cabo en primavera, la tasa de germinación del trébol aumentaba en presencia de *Burkholderia* sp. MS3 cuando en el medio se había añadido fenantreno, lo que sugiere que la eliminación de este compuesto por parte de la bacteria tiene un efecto beneficioso sobre la planta.

En los experimentos realizados en invierno, tanto con *Burkholderia* sp. MS3 como en *Novosphingobium* sp. HS2a se observa una cierta tendencia a la mejora de algunos de los parámetros estudiados al estar presente la bacteria. Al ser los efectos tóxicos menores en estos casos, y al haber realizado tan sólo un experimento, estos datos hay que tomarlos con mucha reserva. Pese a ello, esto puede indicar que en estos sistemas sí que hay una pequeña disminución de la concentración de fenantreno, que pese a no ser detectada por HPLC sí son detectados por la planta, que mejora su crecimiento. La sensibilidad de las plantas a pequeñas variaciones en la biodisponibilidad de fenantreno queda de manifiesto por las diferencias que se observan en el efecto tóxico que este compuesto ejerce sobre las plantas en noviembre y abril, aunque en estas diferencias probablemente haya que tener en cuenta también la fisiología de las plantas en cada estación. *A priori*, los parámetros básicos de crecimiento analizados en estos experimentos no son muy diferentes entre las distintas estaciones por lo que no parece que la salud general de la planta está desfavorecida en invierno.

El conjunto de resultados recogidos en este capítulo nos permiten concluir que para llevar a cabo estrategias de biorremediación, no sólo hay que tener en cuenta las capacidades catabólicas de las bacterias, sino que también hay que tener en cuenta sus capacidades en la interacción con la planta que se quiera utilizar y las interacciones con los organismos indígenas que ya están presentes en el suelo. Analizar todas estas propiedades puede darnos una idea de qué bacterias serían las mejores en cada estrategia de biorremediación teniendo en cuenta el tipo de planta que queramos utilizar, el modo de inoculación y las características del sitio a remediar.

## **CAPÍTULO 3**



## 1. IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES DE DEGRADACIÓN DE NAFTALENO Y FENANTRENO EN LAS CEPAS AISLADAS

Al comienzo de esta Tesis Doctoral, las secuencias de genes que codifican proteínas relacionadas con la degradación de naftaleno y fenantreno estaban ya descritas para algunas cepas de los géneros *Pseudomonas* (Kurkela *et al.*, 1988; Simon *et al.*, 1993; Takizawa *et al.*, 1994), *Sphingomonas* (Pinyakong *et al.*, 2000; Schuler *et al.*, 2009; Story *et al.*, 2001 entre otros) y *Burkholderia* (Laurie y Lloyd-Jones, 1999). Para identificar los genes de degradación de PAHs en las bacterias aisladas de las muestras de suelo, se siguieron dos estrategias: la amplificación de dichos genes mediante reacción en cadena de la polimerasa utilizando oligonucleótidos diseñados en base a secuencias ya publicadas, y la hibridación por Southern blot en condiciones poco restrictivas.

En la estrategia de PCR, la región amplificada por dichos cebadores se corresponde con la subunidad grande (ISP $\alpha$ ) de la dioxigenasa inicial de la ruta de degradación de distintos PAHs (Tabla 01)

**Tabla 01. Oligonucleótidos diseñados para identificar los genes degradativos**

Gen	Cepa	Referencia	nº acceso de GenBank
<i>phnA1a</i>	<i>Sphingomonas</i> sp. CHY-1	Demanèche <i>et al.</i> , 2004	AJ633551
<i>bphA1f</i>	<i>Sphingomonas aromaticivorans</i> F199	Romine <i>et al.</i> , 1998	AF079317
<i>phnAc</i>	<i>Burkholderia</i> sp. RP007	Laurie y Lloyd-Jones, 1999	AF061751

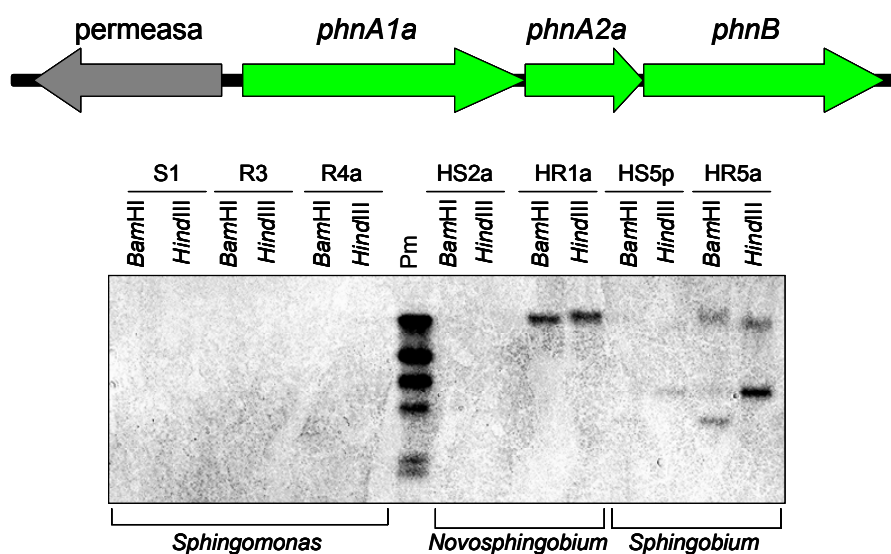
Cuando la estrategia anterior no funcionó, utilizamos los oligonucleótidos correspondientes para sintetizar sondas marcadas con digoxigenina y así identificar mediante hibridación de Southern blot genes que pudieran tener menor homología con los ya publicados. Las sondas que se sintetizaron para la identificación y el análisis de los genes de degradación en las cepas aisladas se muestran en la Tabla 07 de la sección de Materiales y Métodos.

### 1.1. Identificación de los genes de degradación en las cepas de la familia Sphingomonadaceae

Para la identificación de genes en las cepas de la familia Sphingomonadaceae seleccionadas, se diseñaron oligonucleótidos basados en la secuencia del gen que codifica la subunidad mayor (*phnA1a*) de la dioxigenasa inicial de *Sphingomonas* sp. CHY-1 que cataliza el primer paso en la degradación de varios PAHs (Demanèche *et*

al., 2004) (Figura 01). Utilizando estos oligonucleótidos se lograron bandas de amplificación en cuatro de las cepas utilizadas (*Novosphingobium* sp. HR1a, HR1b, HR3g y *Sphingobium* sp. HR5a). La secuencia de estas bandas presentaba una similitud del 99% con respecto a la secuencia nucleotídica de *Sphingomonas* CHY-1 (Anexo 2).

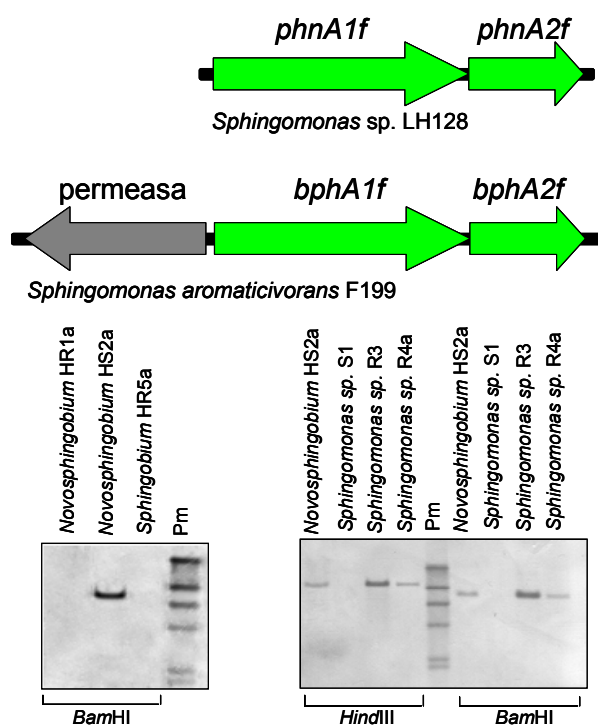
Cuando hibridamos el ADN cromosómico de varias de las cepas aisladas en esta Tesis Doctoral con la sonda *phnA1a*, obtuvimos hibridación sólo con las cepas *Novosphingobium* sp. HR1a y *Sphingobium* sp. HS5p y HR5a. No se obtuvo ninguna banda de hibridación en el caso de las cepas del género *Sphingomonas* ni para *Novosphingobium* sp. HS2a.



**Figura 01. Representación esquemática de los genes *phn* de *Sphingomonas* CHY-1 y análisis por Southern blot de diferentes cepas aisladas en esta Tesis Doctoral hibridadas con la sonda *phnA1a*.** La sonda se construyó por amplificación del ADN genómico de *Novosphingobium* sp. HR1a, y la hibridación se realizó a 60°C. Pm: marcador de peso molecular.

Para identificar los genes que portaban las demás cepas pertenecientes a la familia Sphingomonadaceae utilizamos oligonucleótidos basados en la secuencia del gen *bphA1f* de *Sphingomonas aromaticivorans* F199. El gen *bphA1f* codifica la subunidad grande de la dioxigenasa inicial que cataliza el primer paso de la ruta de degradación de bifenilo y naftaleno en la cepa F199. Se obtuvieron bandas de amplificación en las cepas de *Sphingomonas* sp. R3 y R4a y en *Novosphingobium* sp. HS2a. Las secuencias de estas cepas presentaron una similitud del 99% respecto a la del gen *bphA1f* y a la del gen *phnA1f* de *Sphingomonas* sp. cepa LH128 (Shuler *et al.*, 2009) (Anexo 3). Al utilizar la sonda *bph* para hibridar el ADN de las distintas sphingomonadaceas, comprobamos que no se obtenía señal para las cepas *Sphingobium* sp. HR5a y HR1a y que las bandas de hibridación en las tres

*Sphingomonas* eran del mismo tamaño que la de *Novosphingobium* HS2a, lo que unido a la similitud de secuencia nos hacía pensar que los genes que portaban ambos géneros eran prácticamente idénticos. No se obtuvo banda de hibridación cuando se usó el ADN de *Sphingomonas* sp. S1 y por tanto, los genes de esta cepa están todavía por identificar.



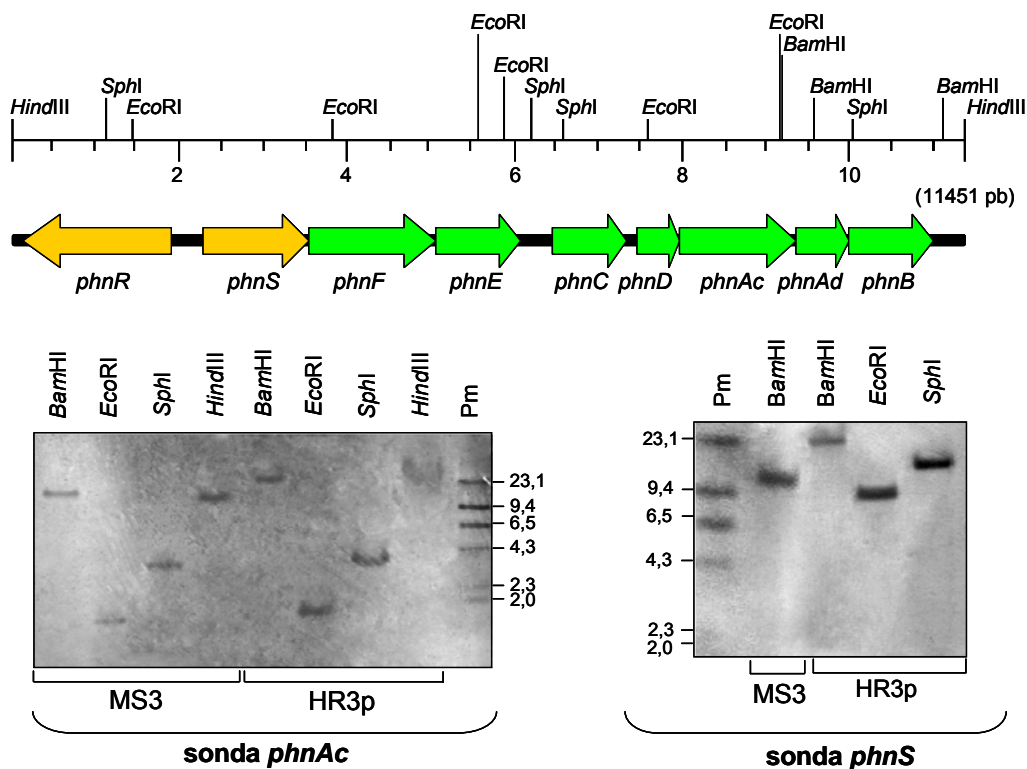
**Figura 02.** Representación esquemática de los genes *bph* de *Sphingomonas aromaticivorans* F199 y *phn* de *Sphingomonas* sp. LH128 y análisis por Southern blot de las diferentes cepas con la sonda *bph*. La sonda se construyó por amplificación del ADN genómico de *Novosphingobium* sp. HS2a y la temperatura de hibridación fue 60°C. Pm: marcador de peso molecular.

## 1.2. Identificación de los genes de degradación en las cepas del género *Burkholderia*

Como se ha indicado anteriormente, utilizando oligonucleótidos diseñados en base a la secuencia del gen *phnAc* (que codifica la subunidad grande de la dioxigenasa) de *Burkholderia* sp. cepa RP007 (Laurie y Lloyd-Jones, 1999) logramos amplificar un fragmento de 859 pb utilizando como molde el ADN de las cepas *Burkholderia* MS3, MS4b, MS4t, MR5 y *Burkholderia* HR3p. Para llevar a cabo un análisis más exhaustivo de los genes de degradación, se seleccionaron tres de las cepas de *Burkholderia* aisladas. En la zona de Madrid, se aislaron las cepas MS3 y MR5 de muestras de suelo cercano a una planta de espino (*Rhamnus lycioides*) y de la rizosfera de una encina (*Quercus ilex*) respectivamente. La cepa HR3p, se aisló de la rizosfera de una planta de manzanilla silvestre (*Anthemis tinctoria*) en el muestreo de Huelva.



La secuencia de las bandas amplificadas en las cepas MS3 y HR3p fue del 99% y 98% idénticas a nivel de nucleótido con la de la cepa *Burkholderia* sp. RP007 (Anexo 4), siendo la secuencia de MR5 100% idéntica a la de MS3. La hibridación del ADN total de las tres cepas con la sonda *phnAc* marcada con digoxigenina reveló que los fragmentos de hibridación resultantes, cuando se cortaba el ADN con las enzimas de restricción *EcoRI* y *SphI*, eran del mismo tamaño que los esperados para la cepa RP007 ya descrita (en la Figura 03 sólo se muestra la hibridación con la cepa MS3). Esto, junto con la alta homología que existía entre los fragmentos secuenciados de *phnAc* nos llevó a pensar que los genes *phnC*, *phnD*, *phnAc*, *phnAd* y *phnB* de las cepas aisladas MS3, MR5 y HR3p eran muy similares en secuencia a los de la cepa RP007. Estos genes codifican una extradiol dioxigenasa (*phnC*), una isomerasa (*phnD*), las subunidades grande (*phnAc*) y pequeña (*phnAd*) de la dioxigenasa inicial, y una dihidrodiol dehidrogenasa (*phnB*).

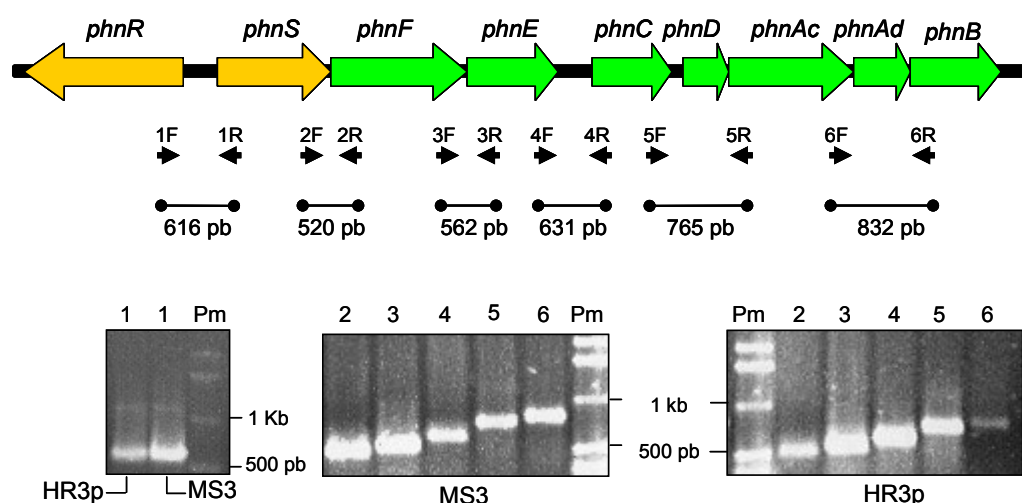


**Figura 03. Organización de los genes *phn* en *Burkholderia* sp. RP007 y análisis por Southern blot de los genes de las cepas *Burkholderia* sp. MS3 y HR3p. Los fragmentos teóricos resultantes de la digestión del ADN de *Burkholderia* sp. RP007 con las enzimas de restricción utilizadas se han situado sobre el mapa genético. Pm: marcador de peso molecular.**

Cuando el ADN genómico se cortó con *HindIII*, la banda de hibridación de la cepa MS3 (tomada desde ahora como cepa tipo para MR5 y RP007) tenía un tamaño similar al de la publicada (aproximadamente 11,5 kb), pero este fragmento era mayor en la cepa HR3p. Al hibridar el ADN de la cepa HR3p, previamente cortado con

*Bam*HI, con una sonda preparada mediante amplificación del gen *phnS* (sonda *phnS*) de MS3, confirmamos que en la cepa HR3p el fragmento de restricción que incluía los genes reguladores (*phnS* y *phnR*) era mayor que el fragmento de hibridación en la cepa MS3 (y que en la cepa MR5). Además, los fragmentos de hibridación *Eco*RI y *Sph*I predichos en base al análisis de la secuencia de la cepa RP007 (de aproximadamente 2 y 5 kb respectivamente) eran también mayores (unas 7 kb más) en la cepa HR3p (Figura 03). Esto sugería que aunque los genes estructurales eran bastante parecidos, existían diferencias significativas en la región reguladora entre las cepas MS3 (MR5) y HR3p.

Para confirmar si el orden de los genes *phn* en las cepas MS3 y HR3p era el mismo que en RP007, y poder estudiar las diferencias en la región reguladora, se diseñaron oligonucleótidos en los extremos 3' y 5' de algunos de los genes y se utilizaron para amplificar el ADN genómico de las cepas MS3 y HR3p. En las dos cepas todas las parejas de oligonucleótidos amplificaron bandas del tamaño esperado, indicando que el orden génico en estas dos cepas era similar al descrito para RP007 (Figura 04).

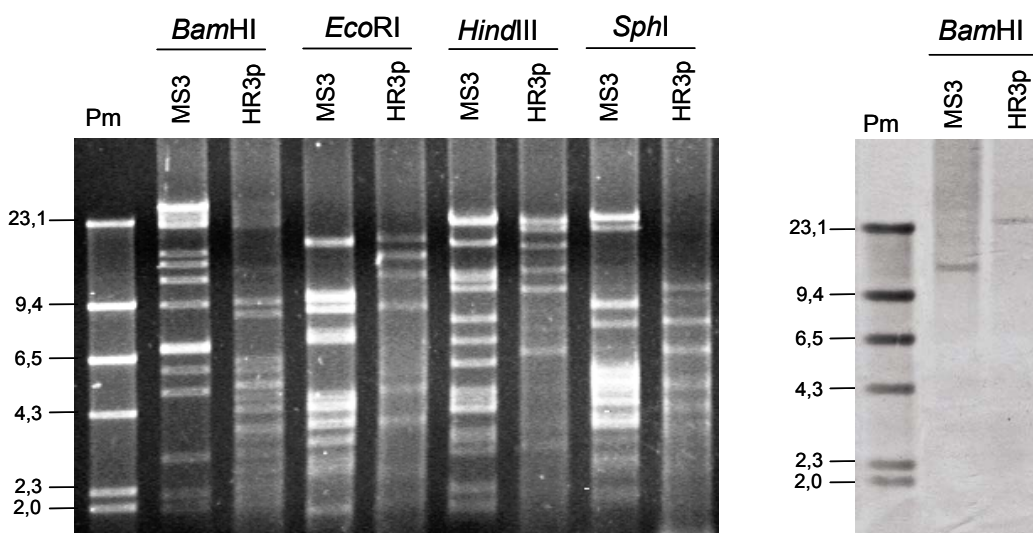


**Figura 04. Esquema de la localización de los oligonucleótidos utilizados para el análisis por PCR de la organización génica de los genes *phn* en las cepas *Burkholderia* sp. MS3 y HR3p y resultados de las amplificaciones.** Las bandas de amplificación se visualizaron en un gel de agarosa al 1%. Pm: marcador de peso molecular.

Sin embargo, aunque los oligonucleótidos 1F y 1R eran capaces de amplificar la región intergénica entre *phnR* y *phnS* sugiriendo que estos genes se encontraban contiguos en la cepa HR3p, oligonucleótidos utilizados para amplificar parte del gen regulador *phnS* junto con la región intergénica *phnR-phnS* y oligonucleótidos usados para amplificar la región *phnR-phnF* en la cepa HR3p no rindieron la banda de amplificación del tamaño esperado. Esto volvía a sugerir que había diferencias

significativas en la región reguladora de estos genes entre la cepa MS3 y la cepa HR3p.

Laurie y Lloyd-Jones (1999) demostraron que los genes *phn* en la cepa *Burkholderia* sp. RP007 se encontraban en un plásmido de gran tamaño (>100 Kb). Para comprobar si en nuestro caso los genes degradativos de las cepas *Burkholderia* sp. MS3 y HR3p tenían una localización similar a la de la cepa RP007, se realizaron extracciones de plásmidos de gran tamaño y se analizaron mediante hibridación de Southern con la sonda *phnAc*. Las dos cepas de *Burkholderia* analizadas poseen un plásmido de gran tamaño, sin embargo al analizar su patrón de restricción se observa que los plásmidos de las dos cepas difieren (Figura 05). En el caso de la cepa MS3, la sonda *phnAc* hibrida a la altura de unas de las bandas del megaplásmido, lo que apoyaría la hipótesis de que los genes se localizan en dicho plásmido. En cambio, en el caso de la cepa HR3p, la sonda hibrida a una altura mayor y no parece coincidir con ninguna de las bandas del plásmido por lo que en este caso no está tan claro que los genes *phn* tengan localización plasmídica.



**Figura 05. Patrón de restricción de los plásmidos extraídos de las cepas *Burkholderia* sp. MS3 y HR3p y análisis por Southern de la localización de los genes *phn* en ambas cepas.** Las digestiones se visualizaron en un gel de agarosa al 0,5%, y la hibridación se realizó a 65°C. Pm: marcador de peso molecular.

## 2. CARACTERIZACIÓN DE LAS REGIONES PROMOTORAS DE LOS GENES DE DEGRADACIÓN IDENTIFICADOS

La identificación de los genes implicados en la degradación de naftaleno y fenantreno nos sirvió como base para amplificar las posibles regiones promotoras de estos genes y estudiar su regulación. Dado que teníamos dos tipos de organización genómica, una con los genes organizados en un cluster (en las cepas de *Burkholderia*), y otra con los genes de la dioxigenasa localizados de forma aislada

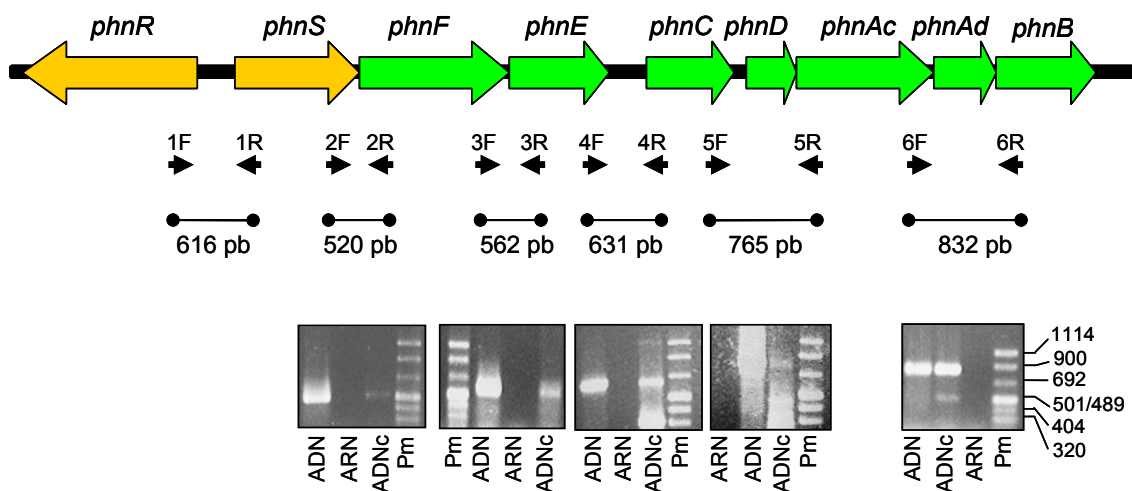
respecto a las otras enzimas de la ruta (cepas de la familia Sphingomonadaceae), decidimos utilizar dos de las especies bacterianas como sistemas modelo para estudiar su regulación. Por un lado analizamos la expresión de los genes de la ruta de degradación de fenantreno en las dos cepas de *Burkholderia* sp. (MS3 y HR3p) y por otro lado la expresión de los genes *phnA1f-phnA2f* de *Novosphingobium* HS2a.

En todos los casos, los promotores se amplificaron utilizando cebadores que poseían una secuencia diana de restricción *Eco*RI en 5' respecto a la secuencia a amplificar y una diana *Pst*I en 3', para así facilitar el clonaje en la orientación correcta en el vector pMP220 que porta el gen de la enzima  $\beta$ -galactosidasa desprovisto de promotor (Spaink *et al.*, 1987).

## 2.1. Estudio de la expresión de los genes de degradación de naftaleno y fenantreno en las cepas del género *Burkholderia*

### 2.1.1. Estudio de la expresión de los promotores de las cepas MS3, MR5 y HR3p

Laurie y colaboradores (1999) demostraron mediante RT-PCR que los genes *phnSFECDAcAdB* se transcribían como un solo operón. Mediante RT-PCR nosotros comprobamos que efectivamente, en la cepa MS3, los genes *phnSFECDAcAdB* se transcribían en un solo operón (Figura 06).



**Figura 06. RT-PCR de los genes *phn* en la cepa *Burkholderia* sp. MS3.** El ARN se extrajo de cultivos crecidos en medio mínimo con glucosa y naftaleno. Pm: marcador de peso molecular.

Para poder estudiar la expresión del operón *phnSFECDAcAdB* y del gen *phnR*, esta región intergénica (529 pb en MS3, y 530 pb en HR3p) se clonó en las dos orientaciones posibles (Figura 07). Los plásmidos correspondientes se denominaron pPSM y pPRM cuando la región clonada pertenecía a la cepa *Burkholderia* sp. MS3 y pPSH y pPRH cuando la región clonada pertenecía a la cepa HR3p. Aunque los genes

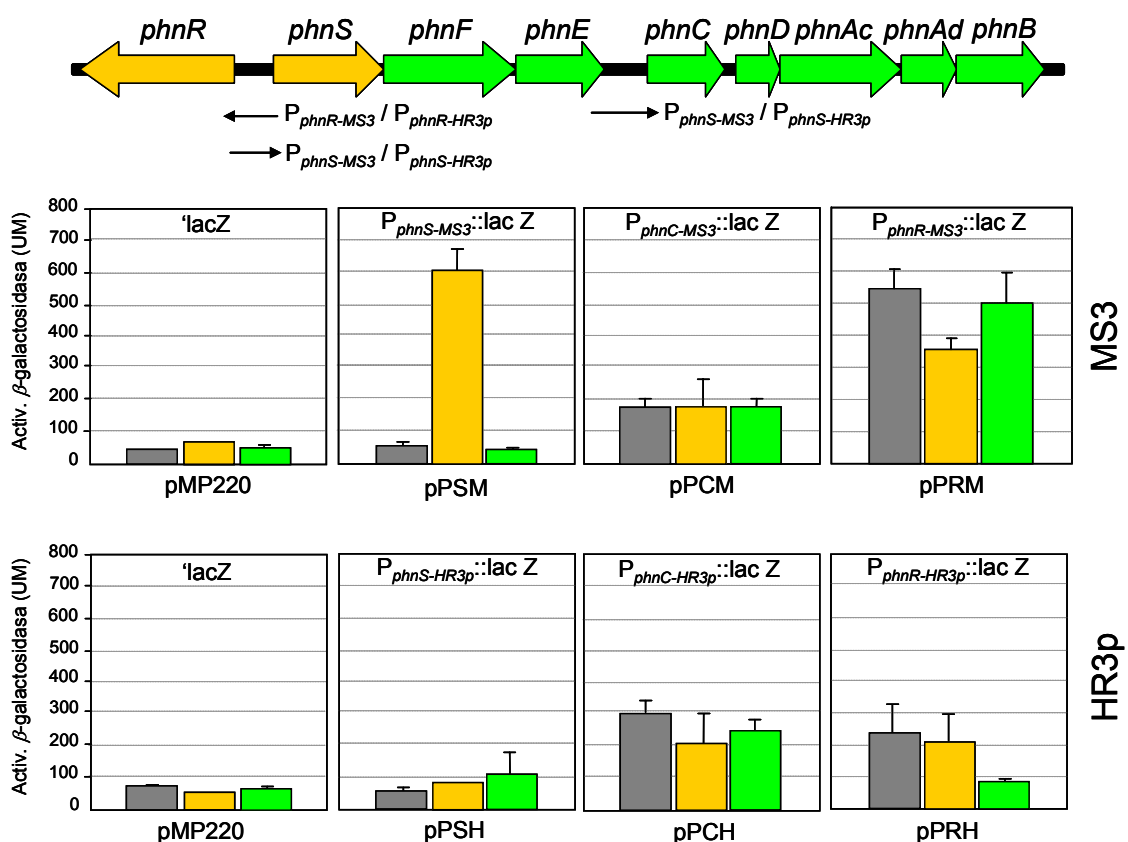
*phnE* y *phnC* se co-transcriben, entre el codón de finalización de *phnE* y el inicio de *phnC* hay 414 pb, lo que nos hizo pensar que en esa región podría existir un promotor interno. Para comprobar la existencia de este promotor y analizar su expresión clonamos también esta región en el plásmido pMP220. A los plásmidos correspondientes les denominamos pPCM y pPCH en la cepa MS3 y HR3p, respectivamente. Estas construcciones se realizaron en *E. coli* y posteriormente se electroporaron en las respectivas cepas de *Burkholderia*. Los clones positivos (resistentes a tetraciclina) se analizaron por PCR utilizando oligonucleótidos del plásmido pMP220 que amplifican la región del sitio de multiclonaje (donde se inserta el fragmento de ADN) y además los plásmidos se visualizaron en geles de agarosa.

Laurie y colaboradores (1999) habían sugerido, mediante experimentos de RT-PCR, que el operón *phn* se inducía por naftaleno y fenantreno, de manera que nosotros comenzamos por estudiar la expresión de los posibles promotores cuando la cepa se crecía en medio mínimo M9 con glucosa como única fuente de carbono, en medio mínimo M9 con glucosa y naftaleno y en medio mínimo M9 con glucosa y fenantreno. Lo primero que observamos es que los niveles de expresión de cada uno de los tres promotores ensayados no mostraron diferencias significativas a lo largo de la curva de crecimiento. El promotor  $P_{phnS-MS3}$  comenzaba a inducirse por naftaleno a las dos horas de comenzar el crecimiento, siendo esta inducción máxima las 7,5 horas. Por eso, los datos que se muestran en este capítulo se refieren siempre a las 7,5 horas.

Los experimentos de medida de la actividad  $\beta$ -galactosidasa desde los promotores de la cepa *Burkholderia* sp. MS3 (Figura 07) mostraron que la expresión a partir del promotor  $P_{phnS-MS3}$  se inducía en presencia de naftaleno (aproximadamente 8 veces respecto del control sin inducir), pero cuando se crecía en glucosa o en glucosa-fenantreno la actividad  $\beta$ -galactosidasa era igual que la que daba el plásmido desprovisto de secuencia promotora. Los niveles basales de expresión a partir del posible promotor aguas arriba de *phnC* ( $P_{phnC-MS3}$ ) eran 3 veces superiores a la actividad del plásmido sin promotor y a los del promotor  $P_{phnS-MS3}$  sin inducir. Estos resultados apoyarían la hipótesis de la existencia de un promotor interno y con una actividad basal constitutiva en esta zona. La expresión desde el promotor de  $P_{phnR-MS3}$  era de unas 500 unidades Miller (U.M.), siendo ligeramente inferior en presencia de naftaleno (Figura 07).

La expresión desde los promotores de la cepa *Burkholderia* sp. HR3p era bastante diferente. El promotor  $P_{phnS-HR3p}$  no se inducía por naftaleno, los niveles de expresión a partir del posible promotor  $P_{phnC-HR3p}$  eran ligeramente más altos que en la

cepa MS3 y los niveles de expresión a partir del promotor  $P_{phnR-HR3p}$  eran de unas 200 U.M.



**Figura 07. Actividad β-galactosidasa de los plásmidos pMP220, pPSM, pPCM y pPRM en *Burkholderia* sp. MS3 (parte superior) y de los plásmidos pPSH, pPCH y pPRH en *Burkholderia* sp. HR3p (parte inferior).** En gris se muestra la actividad en ausencia de inductor y en amarillo y verde cuando se añaden naftaleno y fenantreno como inductor, respectivamente. Las barras de error indican la desviación estándar.

Al analizar la expresión de estos promotores cuando en el medio se añadían algunos compuestos descritos como inductores en algunas de las rutas de degradación de PAHs (protocatecuato, *o*-phtalato, 1-hidroxi-2-naftóico o salicilato) se observó que ninguno de ellos aumentaba significativamente los niveles de expresión desde ninguno de los promotores ensayados (Tablas 02 y 03). Para evaluar el efecto de los exudados radiculares, se recogieron exudados tras 4 y 8 días tal y como se indica en la sección de Materiales y Métodos, y se utilizaron como posibles inductores. En este caso, tampoco los exudados promovieron la actividad promotora, pero es interesante destacar que las actividades basales tampoco fueron reprimidas.

**Tabla 02. Actividad β-galactosidasa en la cepa *Burkholderia* sp. MS3**

Inductor	pMP220	pPSM	pPCM	pPRM
Ninguno	45,3±3,4	58,0±7,1	231,4±50,6	545,3±61,1

Inductor	pMP220	pPSM	pPCM	pPRM
Fenantreno	46,4±7,3	40,5±8,0	177,5±21,6	355,8±36,7
Naftaleno	37,3±2,4	597,4±61,5	232,8±15,0	502,3±91,8
1-hidroxi-2-naftóico	47,0±4,3	49,2±16,8	221,8±10,5	627,7±50,2
Salicilato	30,9±2,3	61,7±5,1	307,9±17,5	679,3±53,4
o-phtalato	38,3±0,3	43,5±9,9	200,5±8,4	524,0±42,8
Protocatecuato	46,1±3,2	54,4±7,9	234,1±27,5	494,3±62,1
Exudados 4 días	35,6±2,3	51,0±1,0	265,1±21,9	598,2±81,7
Exudados 8 días	38,6±3,3	46,7±1,0	266,7±37,1	585,8±35,2

Los valores están expresados en Unidades Miller

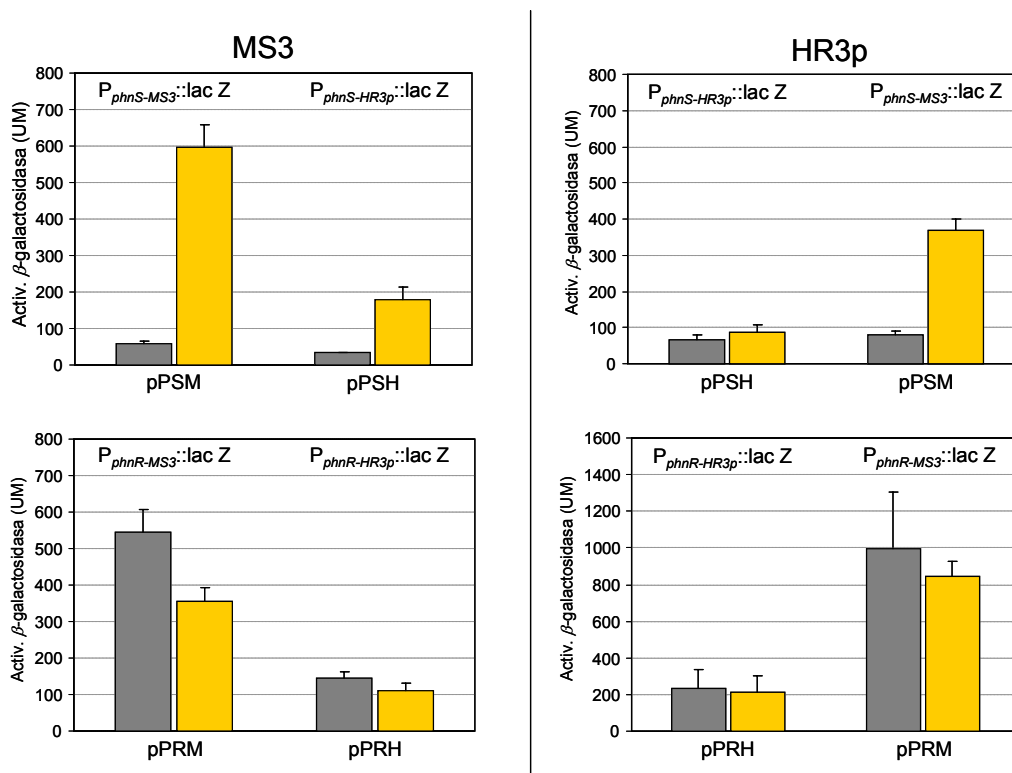
**Tabla 03. Actividad  $\beta$ -galactosidasa en la cepa *Burkholderia* sp. HR3p**

Inductor	pMP220	pPSH	pPCH	pPRH
Ninguno	77,2±4,0	65,2±15,4	303,6±83,9	282,8±67,2
Fenantreno	72,6±4,5	82,3±4,4	247,1±31,1	151,4±9,4
Naftaleno	64,3±2,0	88,0±18,6	209,8±83,9	211,1±90,4
1-hidroxi-2-naftóico	70,4±7,7	45,7±11,6	248,3±4,5	242,7±25,6
Salicilato	72,8±23,6	64,5±4,0	163,5±52,3	233,4±58,2
o-phtalato	65,3±2,4	42,5±2,1	302,6±5,6	303,5±16,8
Protocatecuato	74,3±10,99	69,7±17,9	387,1±16,0	344,9±23,0
Exudados 4 días	78,5±6,0	79,6±18,3	347,7±65,4	258,0±6,5
Exudados 8 días	51,9±0,9	59,1±5,7	382,3±21,4	341,4±34,7

Los valores están expresados en Unidades Miller

### 2.1.2. Estudio de la expresión de los promotores de la cepa MS3 en la cepa HR3p y de los promotores de la cepa HR3p en MS3

Para intentar definir si las diferencias observadas entre los niveles de expresión de los promotores en las dos cepas de *Burkholderia* dependían de la secuencia de la región promotora o de algún determinante de la propia cepa, introdujimos los plásmidos pPSM y pPRM en la cepa HR3p y los plásmidos pPSH y pPRH en la cepa MS3. Los plásmidos pPCM y pPCH no se intercambiaron ya que las diferencias de expresión que se encontraron entre las dos cepas fueron relativamente bajas. Los resultados del ensayo de  $\beta$ -galactosidasa se muestran en la Figura 08.



**Figura 08. Actividad  $\beta$ -galactosidasa de los promotores de *Burkholderia sp.* MS3 en la cepa HR3p y de los promotores de *Burkholderia sp.* HR3p en la cepa MS3. En gris se muestra la actividad en ausencia de inductor y en amarillo cuando se añadió naftaleno como inductor. Las barras de error indican la desviación estándar.**

Al introducir el promotor  $P_{phnS-HR3p}$  en la cepa MS3, la actividad  $\beta$ -galactosidasa de este promotor, que no era inducible por naftaleno en su propia cepa, aumentaba en presencia de este compuesto, pero los niveles de expresión no fueron tan altos como los del promotor  $P_{phnS-MS3}$ . Curiosamente, el promotor  $P_{phnS-MS3}$  seguía respondiendo a naftaleno en la cepa HR3p aunque su propio promotor  $P_{phnS-HR3p}$  no respondía a la presencia de este compuesto. Esto sugería que la cepa HR3p sí poseía un regulador capaz de inducir, en presencia de naftaleno, el promotor  $P_{phnS-MS3}$  pero no su propio promotor. Al introducir el promotor  $P_{phnR-HR3p}$  en la cepa MS3, este promotor tenía una expresión mucho más baja que cuando la cepa posee su propio promotor  $P_{phnR-MS3}$ . Al introducir el promotor  $P_{phnR-MS3}$  en HR3p este pasaba a tener una actividad mucho más alta que en su cepa correspondiente.

## 2.2. Estudio de la expresión de los genes de degradación de naftaleno y fenantreno en la cepa *Novosphingobium sp.* HS2a.

La región intergénica (519 pb) entre la posible permeasa y el gen *bphA1f* ( $P_{bphA1f}$ ) se clonó en el vector pMP220 y se ensayó la actividad promotora en presencia de los posibles sustratos y de los inductores de la ruta. Al igual que en el caso anterior,



primero se determinó la expresión del promotor a lo largo de la curva de crecimiento. En este caso no se observaron diferencias en cuanto al nivel de expresión a ninguno de los tiempos analizados y por tanto los resultados que se muestran corresponden con los datos obtenidos a las 7,5 horas al igual que en el caso de las cepas de *Burkholderia*. En la cepa *Novosphingobium* sp. HS2a, la actividad  $\beta$ -galactosidasa no se indujo por ninguno de los compuestos probados, siendo la actividad del promotor unas 3 veces más alta que la del plásmido sin promotor.

**Tabla 04. Actividad  $\beta$ -galactosidasa en la cepa *Novosphingobium* sp. HS2a**

Inductor	pMP220	pPBH
Ninguno	47,4±15,1	149,9±29,8
Fenantreno	49,2±17,9	135,4±29,3
Naftaleno	39,4±19,1	88,9±28,2
1-hidroxi-2-naftóico	45,3±12,4	60,6±10,6
Salicilato	42,7±4,9	121,0±31,7
o-phtalato	47,0±5,5	198,3±30,3
Protocatecuato	41,9±3,8	105,7±13,5
Exudados 4 días	52,5±5,5	205,6±16,2
Exudados 8 días	48,0±3,8	180,5±16,8

Los valores están expresados en Unidades Miller

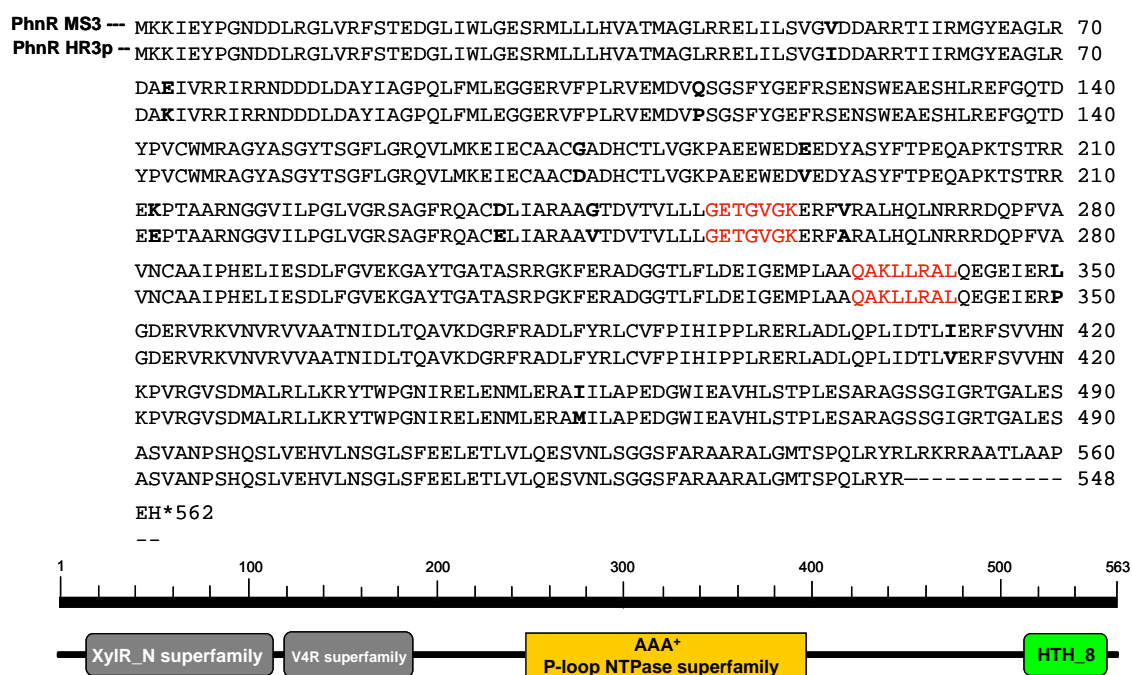
### 3. ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DE LA RUTA DE DEGRADACIÓN DE NAFTALENO Y FENANTRENO EN *BURKHOLDERIA* SP. MS3 Y HR3p

Al encontrar diferencias tan significativas en la expresión del operón *phnSFECDAcAdB* y del gen *phnR* entre las dos cepas de *Burkholderia* aisladas en Madrid (MS3) y Huelva (HR3p), decidimos estudiar más en detalle la regulación de estos genes.

#### 3.1. Análisis *in silico* de los reguladores transcripcionales PhnR y PhnS

El cluster *phn*, contenía dos fases de lectura abierta cuya traducción se correspondía con dos posibles reguladores transcripcionales. El análisis de las secuencias de los posibles reguladores PhnR de *Burkholderia* MS3 y HR3p permitió clasificarlos como reguladores de la familia NtrC. Esta familia de reguladores se caracterizan por depender del factor sigma alternativo  $\sigma^{54}$ . En la secuencia de PhnR se distinguían claramente los tres dominios funcionales descritos para esta familia (Figura 09). En el extremo N-terminal (desde el aminoácido 11 al 113) se encuentra el dominio de reconocimiento de la señal (dominio A), en la región central se encuentra el dominio

de activación (dominio C) que es el más conservado dentro de esta familia de reguladores. En esta región aparecen dos motivos muy conservados: Walker A y B implicados en la unión e hidrólisis de ATP necesaria para la unión al complejo promotor-holoenzima de la ARN polimerasa, por ello estos reguladores se encuentran incluidos en la superfamilia AAA+ (ATPasas asociadas a varias actividades celulares). Finalmente en el extremo C terminal estos reguladores presentan un motivo helice-giro-hélice (HTH) (aminoácidos 511-552) de unión a ADN (Díaz y Prieto, 2000). En el caso de PhnR en el dominio de unión a efector aparece una secuencia aminoacídica conservada (motivo vinyl-4-reductasa) que se cree implicada en la unión de hidrocarburos (desde el aminoácido 122-184) (Anantharaman *et al.*, 2001).



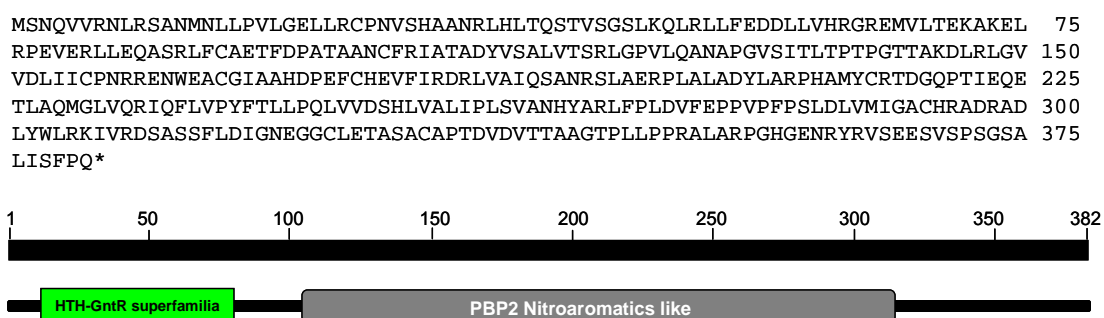
**Figura 09. Secuencia y representación esquemática de los dominios de las proteínas PhnR en las cepas *Burkholderia* sp. MS3 y HR3p.** La línea negra representa la longitud de las proteínas y las cajas los dominios funcionales descritos para la familia. Las dos secuencias de los motivos Walker A y B están señalados en rojo en la secuencia de aminoácidos. Los aminoácidos en negrita indican las diferencias en la secuencia de las dos proteínas. El final de la proteína PhnR en HR3p no se pudo secuenciar al no amplificar los oligonucleótidos utilizados para MS3.

Así mismo, las secuencias consenso de promotores dependientes de  $\sigma^{54}$  también están muy bien descritos en la literatura (Barrios *et al.*, 1999; Tropel y van der Meer, 2004; Zhao *et al.*, 2009) en las secuencias de las dos cepas de *Burkholderia* se pueden distinguir algunos de estos motivos consenso (Figura 10).



**Figura 10. Análisis *in silico* de la secuencia intergénica *phnR-phnS*.** La posible secuencia consenso para el reconocimiento de  $\sigma^{54}$  está marcada en cajas rosas y las dos secuencias repetidas invertidas (upstream activating sequences, UAS) típicas de los promotores dependientes de  $\sigma^{54}$  están indicadas por las flechas en verde. Las secuencias en azul representan las posibles cajas de unión al ribosoma.

La proteína reguladora PhnS pertenece a la familia de reguladores transcripcionales LysR. En este caso, el dominio de unión a ADN que presenta el motivo hélice-giro-hélice (HTH) está situado en el extremo N-terminal de la proteína (amino ácidos 14 al 73). El dominio C-terminal en esta familia de reguladores se corresponde con el dominio de reconocimiento de la señal y en este caso tiene homología con dominios de proteínas reguladoras como NahR de *Pseudomonas putida* (Yeng y Gunsalus, 1985, Schell y Wender, 1986), DntR de *Burkholderia* sp. (Lönneborg *et al.*, 2007) o LinR (Miyachi *et al.*, 2002), implicadas en las rutas de degradación de naftaleno, 2,4-dinitrotolueno y lindano respectivamente.

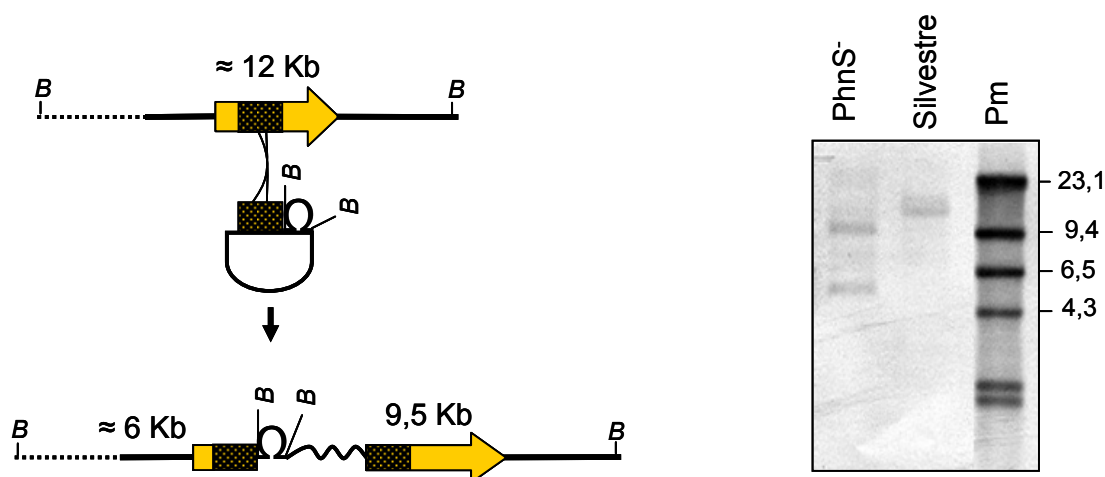


**Figura 11. Secuencia y representación esquemática de los dominios de la proteína PhnS de *Burkholderia* sp. MS3.** La barra negra representa la longitud de la proteína y las cajas de colores los dominios funcionales descritos para la familia.

Como se ha dicho anteriormente, en la cepa HR3p la sonda *phnS* hibridaba con el ADN genómico, sin embargo con ninguno de los oligonucleótidos diseñados en base a la secuencia del gen en MS3 logramos amplificar esta región, por lo que, de momento, desconocemos si esta proteína está íntegra, y por tanto funcional, en la cepa HR3p.

### 3.1.1. Estudio de la expresión de los promotores $P_{phnS-MS3}$ , $P_{phnR-MS3}$ y $P_{phnC-MS3}$ en un mutante *phnS* de la cepa *Burkholderia* sp. MS3

Para clarificar el papel de los correspondientes reguladores en la cepa MS3, construimos un mutante en el gen regulador *phnS* ( $PhnS^-$ ) mediante la incorporación de un interposón  $\Omega$ -Km<sup>R</sup> en la mitad del gen tal y como se explica en la sección de Materiales y Métodos. La correcta inserción del interposón se comprobó mediante Southern blot (Figura 12).



**Figura 12. Esquema de la construcción del mutante  $PhnS^-$  en *Burkholderia* sp. MS3 y Southern blot comprobando la mutación.** El ADN cromosómico se digirió con *Bam*HI y la membrana se hibridó con la sonda *phnS* a 65°C. Pm: marcador de peso molecular.

Los plásmidos pPSM, y pPCM y el plásmido pMP220 se introdujeron en este mutante mediante electroporación y se ensayó la actividad  $\beta$ -galactosidasa en presencia y ausencia de naftaleno. No conseguimos introducir el plásmido pPRM en la cepa mutante. La expresión desde estos promotores era similar a la que mostraban en la cepa silvestre. El promotor *phnS* se inducía unas 7 veces en presencia de naftaleno, y la actividad  $\beta$ -galactosidasa del promotor  $P_{phnC-MS3}$  mostraba unos valores unas 3 veces más altos que los del plásmido desprovisto de secuencia promotora (Tabla 05).

**Tabla 05. Actividad  $\beta$ -galactosidasa en el mutante PhnS<sup>-</sup> de *Burkholderia* sp. MS3**

Plásmido	Sin inductor	Naftaleno
pMP220	46,3±8,1	60,8±9,3
pPSM	57,3±8,7	387,4±47,6
pPCM	195,7±54,1	181,0±22,2

Los valores están expresados en Unidades Miller.

## DISCUSION

Genes implicados en la degradación de PAHs han sido ya descritos en numerosas especies bacterianas y sin embargo su regulación, exceptuando los genes de degradación de naftaleno en *Pseudomonas putida*, ha recibido hasta el momento poca atención. En esta Tesis Doctoral se han comenzado a estudiar las bases moleculares de la degradación de PAHs para el entendimiento y estudio de la expresión de este tipo de genes, abriendo así la puerta a su posible manipulación para la mejora de las técnicas de biorremediación.

Para poder estudiar la regulación de las rutas de degradación de PAHs en las bacterias aisladas durante esta Tesis Doctoral, primero determinamos si sus rutas catabólicas eran similares a las ya descritas en la literatura. Para esto utilizamos oligonucleótidos y sondas basadas en la secuencia de las dioxigenasas implicadas en las primeras reacciones de degradación de PAHs. Estas dioxigenasas iniciales que hidroxilan el anillo aromático suelen tener un amplio rango de sustrato y por tanto, son capaces de participar en la oxidación de diferentes PAHs. En las cepas aisladas durante esta Tesis Doctoral hemos encontrado dos tipos, diferentes en cuanto a organización genética, de genes de degradación de naftaleno y fenantreno. Los genes que hemos identificado en las cepas *Burkholderia* sp. MS3 y HR3p son prácticamente idénticos a los descritos por Laurie y Lloyd-Jones (1999) en *Burkholderia* sp. RP007. Estos autores demostraron que cepas de *E. coli* con las proteínas recombinantes PhnAcAdB de *Burkholderia* sp. RP007 eran capaces de oxidar naftaleno y fenantreno. Además, la transferencia de los genes *phn* a *E. coli* confería a esta cepa la capacidad de crecer en presencia de naftaleno y fenantreno, pudiendo ser detectados algunos intermediarios predichos en la ruta como por ejemplo el ácido salicílico. La organización genética del operón *phn* es diferente a los de la ruta clásica de degradación de naftaleno en *Pseudomonas putida* (*nah*-like) ya que en el cluster de genes *phn* no aparecen los genes que codifican los componentes ferredoxina y reductasa terminal de la dioxigenasa inicial. En la posible regulación de esta ruta también aparecen elementos que no están presentes en la ruta *nah*, como es un posible regulador de la familia NtrC (PhnR).

Al contrario de lo que ocurre en *Pseudomonas* y *Burkholderia*, los genes de degradación de naftaleno y fenantreno descritos en la literatura en distintas cepas de la familia Sphingomonadaceae no aparecen en un solo cluster, sino que tienen una localización más fragmentada. Los dos tipos de genes que nosotros hemos identificado en las distintas cepas aisladas se corresponden con los identificados en

*Sphingomonas aromaticivorans* cepa F199 y *Sphingomonas* sp. LH128 (Schuler *et al.*, 2009) y con los identificados en *Sphingomonas* CHY-1 (Demanèche *et al.*, 2004).

La secuencia parcial de la dioxigenasa en las cepas *Novosphingobium* sp. HS2a y *Sphingomonas* HR3 y HR4a era prácticamente idéntica a la de los genes *bphA1f* de *S. aromaticivorans* F199 y *phnA1f* de *Sphingomonas* sp. LH128. *S. aromaticivorans* F199 es capaz de crecer en distintos compuestos aromáticos, como tolueno, bifenilo y naftaleno gracias al plásmido pNL1 que porta todos los genes necesarios para la degradación de estos compuestos (Romine *et al.*, 1999). De hecho este plásmido codifica siete genes homólogos de subunidades grande y pequeña de dioxigenasas que hidroxilan el anillo. Nosotros decidimos identificar mediante amplificación tan sólo el gen *bphA1f* que era el que presentaba mayor homología con distintas naftaleno dioxigenasas de *Pseudomonas* ya que las otras presentaban mayor homología con dioxigenasas relacionadas con la degradación de carbazol, salicilato, tolueno y otros compuestos monoaromáticos (Romine *et al.*, 1999). Posteriormente, se comprobó que las secuencias identificadas también tenían una alta identidad con el gen *phnA1f* de la cepa de *Sphingomonas* LH128 (Schuler *et al.*, 2009). Esta cepa (LH128) fue aislada de suelos contaminados con PAHs en base a su capacidad de degradar fenantreno y cuando los genes *phnA1fA2f*, que codifican las subunidades grande y pequeña de la dioxigenasa responsable del ataque inicial sobre el PAH, se sobreexpresaron en *E. coli*, ésta adquirió la capacidad de oxidar varios PAHs, tanto de alto como de bajo peso molecular. Por tanto, es una enzima con un amplio rango de sustrato, teniendo preferencia por el naftaleno (100% de actividad relativa), seguido de fenantreno (43,3%), bifenilo (31,8%) y antraceno (28,7%).

En las cepas *Novosphingobium* sp. HR1a, HR1b, HR3g y *Sphingobium* sp. HS5p y HR5a las secuencias obtenidas eran casi idénticas a las de *Sphingomonas* sp. CHY-1, cepa que se aisló inicialmente por su capacidad de degradar criseno (PAH de cuatro anillos) pero que también degrada naftaleno, fenantreno y antraceno (Demanèche *et al.*, 2004). Los genes *phnA1a* y *phnA2a* se han sobreexpresado en *E. coli* y se ha demostrado que son capaces de oxidar fenantreno a *cis*-3,4-dihidroxi-3,4-dihidrofenantreno.

Tanto en *Burkholderia* sp. R007 como en las distintas cepas de la familia Sphingomonadaceae de las que hemos hablado anteriormente, los genes de degradación de PAHs están codificados en plásmidos. Experimentos preliminares llevados a cabo en nuestro laboratorio sugieren que efectivamente en la cepa *Burkholderia* sp. MS3 los genes *phn* están asociados a un plásmido de gran tamaño, mientras que en la cepa HR3p, que también porta un plásmido grande, esta asociación todavía no está clara. No hemos explorado todavía la presencia de plásmidos en las

distintas cepas de la familia Sphingomonadaceae pero probablemente porten plásmidos similares a los ya descritos.

Siguiendo las mismas estrategias que las usadas para la identificación de los genes de degradación en las cepas de los géneros *Burkholderia* y de la familia Sphingomonadaceae, se trataron de identificar los genes de las cepas de *Pseudomonas* aisladas. Sin embargo, ni la amplificación usando oligonucleótidos basados en la secuencia de *Pseudomonas putida* NCIB9816, ni la hibridación en condiciones poco restrictivas con una sonda sintetizada con los oligonucleótidos anteriores usando ADN genómico de la cepa *P. putida* G7 nos permitieron identificar estos genes. Por tanto, pensamos que estas cepas podrían portar genes bastante diferentes a los clásicos descritos en otras cepas del género *Pseudomonas*. Hay que destacar que ninguna de las cepas de *Pseudomonas* aisladas es capaz de crecer con naftaleno. Tampoco hemos explorado todavía los genes de degradación que se puedan encontrar en las cepas de los géneros *Mycobacterium* y *Arthrobacter*, ya que nos hemos centrado en las bacterias Gram-negativas. Estos genes de degradación, junto con los de las cepas de *Pseudomonas*, se tratarán de identificar posteriormente mediante construcción de librerías genómicas.

Una de las principales ventajas que ofrece la agrupación de los genes implicados en el catabolismo de un compuesto, es la de poder coordinar su expresión y así minimizar los costes energéticos derivados de tener algunas enzimas expresándose sin que su sustrato esté disponible en la célula (Díaz y Prieto, 2000). Por esto los cluster génicos suelen estar finamente regulados. Un claro ejemplo de esto lo vemos en la regulación de los genes de degradación de PAHs en las cepas *Novosphingobium* HS2a y *Burkholderia* MS3. En distintas cepas del género *Sphingomonas* los genes que participan en la mineralización del compuesto están dispersos en el cromosoma (Kim y Zylstra, 1999; Romine *et al.*, 1999; Pinyakong *et al.*, 2003). La alta similitud de secuencia encontrada entre las dioxigenasas y las correspondientes secuencias aguas arriba de *Novosphingobium* HS2a y las del plásmido pNL1 nos hace pensar que la organización genética de nuestra cepa probablemente sea similar a la de este plásmido, y por tanto, que sólo los genes de las subunidades grande y pequeña de la dioxigenasa se encuentren formado un operón independiente de los otros genes implicados en la degradación de los PAHs. Nosotros hemos mostrado en esta Tesis Doctoral que la expresión del operón *phnAf* es constitutiva en glucosa, no estando inducida ni por fenantreno ni por naftaleno, los mejores sustratos de esta dioxigenasa en la cepa LH128 (Schuler *et al.*, 2009), ni por ninguno de los posibles intermediarios de la ruta ensayados. Sin embargo, los genes de degradación de fenantreno en *Burkholderia* sp. cepa MS3 están finamente



regulados probablemente por un sistema con dos reguladores, uno de tipo LysR y otro de tipo NtrC. La expresión basal resultante desde el promotor *phnS* es prácticamente inexistente cuanto la cepa está creciendo en glucosa, induciéndose significativamente tras la adición al medio de naftaleno. Curiosamente, la expresión basal en glucosa de los genes *phnCDAcAdB* es más alta que la expresión de *phnSFE* a pesar de formar un único operón. Esta expresión parece ser consecuencia de la existencia de un promotor interno situado entre *phnE* y *phnC* que mantiene su nivel de actividad en presencia de los distintos sustratos o posibles intermediarios ensayados. De esta forma, parece que el fenantreno podría estar transformándose de forma constitutiva a ácido *trans*-4-(1-hidroxi-2-il)-2-oxobut-3-enoico (en el caso del naftaleno, a ácido *trans*-*o*-hidroxi-2H-cromeno-2-carboxílico) mediante las actividades dioxigenasa de PhnAcAd, deshidrogenasa de PhnB, extradiol dioxigenasa de PhnC e isomerasa de PhnD (Figura 13). Los siguientes pasos en la ruta, la conversión del *trans*-4-(1-hidroxi-2-il)-2-oxobut-3-enoico (ácido *trans*-*o*-hidroxi-2H-cromeno-2-carboxílico en el caso del naftaleno) a 1-hidroxi-2-naftalaldehído (salicil-aldehído) y posteriormente a ácido 1-hidroxi-2-naftóico (salicilato) sería llevado a cabo por las enzimas PhnE y PhnF respectivamente y cuyos genes tienen que ser inducidos por la presencia de naftaleno en el medio de cultivo.

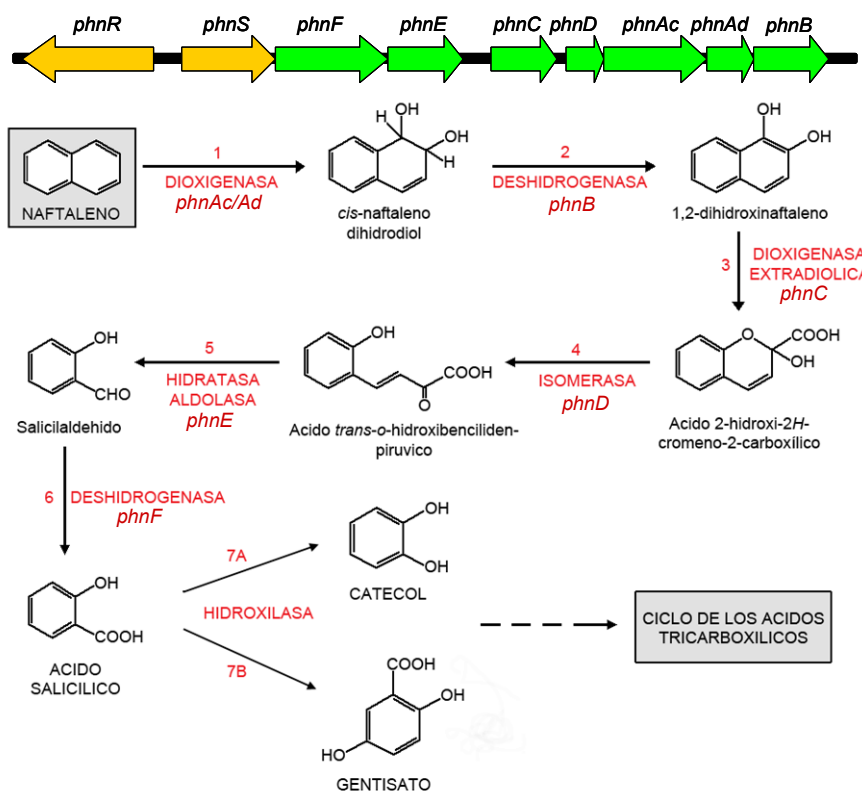


Figura 13. Esquema de la organización de los genes *phn* y ruta de degradación de naftaleno en *Burkholderia* sp. RP007.

Este esquema es diferente en la cepa HR3p, en donde los genes *phnSFE* no se inducen por naftaleno. Aquí hay que reseñar que aunque hemos demostrado que el final del gen *phnS* está contiguo al principio de *phnF*, no hemos logrado confirmar la localización de la secuencia promotora con respecto a los genes *phnFE*.

Aunque todavía nos faltan muchos elementos para poder descifrar la regulación de los genes *phn* en estas dos cepas de *Burkholderia*, el esquema regulatorio general podría ser algo similar al de los genes de degradación de tolueno (genes *xyl*) en el plásmido pWW0. En la degradación de tolueno participan genes que están codificados en dos operones; el operón “*upper*” (*xylUWCMABN*) codifica las enzimas que transforman el tolueno en benzoato, y en operón “*meta*” (*xylXYZLEGFJQKIH*) que codifica las enzimas que transforman el benzoato en intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (acetaldehído y piruvato). Estos operones están regulados por dos proteínas en un circuito bastante complejo. La proteína XylR, que pertenece a la familia de reguladores transcripcionales de NtrC, está siempre unida al ADN y en presencia de efector, esta proteína que está inactiva pasa a ser activa estimulando la transcripción desde el promotor de la ruta “*upper*” (Pu). Paralelamente, la forma activa de XylR estimula la transcripción del gen *xylS*. El gen *xylS* se expresa en esta situación desde sus dos promotores, uno constitutivo e independiente de XylR (Ps2) y otro dependiente de XylR y de  $\sigma^{54}$  (Ps1). Cuando *xylS* se sobreexpresa, la proteína XylR (perteneciente a la familia de reguladores transcripcionales AraC/XylS) se activa promoviendo la transcripción de la ruta “*meta*”. La proteína XylR se transcribe también desde dos promotores en tándem dependientes de  $\sigma^{70}$ . Por analogía, y en la cepa MS3, la proteína PhnR que se expresa de forma constitutiva se activaría en presencia de naftaleno induciendo la transcripción del operón *phnSFECDAcAdB*. Desafortunadamente los intentos de construir un mutante de PhnR no han dado resultados positivos; este mutante nos indicaría si efectivamente éste es el inductor de la ruta. El mutante defectivo en PhnS no tenía efecto sobre la inducción de los operones estudiados y una posible hipótesis es que PhnS esté induciendo la ruta del salicilato, por la cual el salicilato es metabolizado a intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos. La identificación de esta ruta y el análisis de su expresión en este fondo mutante nos permitirán validar esta hipótesis. La otra cuestión que queda por confirmar es la existencia de un promotor interno entre los genes *phnE* y *phnC*; es posible que estos genes se expresen de forma constitutiva, tal y como vemos en los ensayos de  $\beta$ -galactosidasa, transformando el naftaleno en ácido *trans-o*-hidroxi-2H-cromeno-2-carboxílico y que alguno de los intermediarios producidos durante esta transformación sea el inductor real del operón *phnS*.

El esquema de regulación en la cepa HR3p plantea todavía más preguntas. En este caso PhnR no induciría la transcripción del operón *phnSFECDAcAdB*. Dado que PhnR es muy similar en ambas cepas, y que cuando se introduce el promotor  $P_{phnS-MS3}$  en la cepa HR3p este sí se induce por naftaleno (aunque la inducción es menor que cuando está en su propia cepa), podemos pensar que este regulador es funcional aunque pudiera ser que menos eficiente que PhnR de MS3. La región promotora es también bastante similar entre ambas cepas aunque la posición -12 en la posible secuencia consenso para la unión de  $\sigma^{54}$  también es distinta entre ambas cepas, conteniendo una C en MS3 y T en HR3p. Esta posición está altamente conservada en todos los promotores dependientes de  $\sigma^{54}$  y es crítica para dirigir la unión de la polimerasa al sitio preciso para formar la burbuja de transcripción y generar el complejo promotor abierto (Wang *et al.*, 1999). Cambios en esta posición conllevan una disminución de la transcripción (Wang *et al.*, 1999). Esto es compatible con el hecho de que en HR3p no haya inducción del operón *phnS* en presencia de naftaleno. No obstante, este promotor sí parece ser reconocido en MS3, aunque los niveles de inducción son mucho más bajos que con su propio promotor. En cualquier caso, la caracterización de la región reguladora de la cepa HR3p es imprescindible para poder hacer un análisis de los diferentes mecanismos de expresión de estos operones en las dos cepas de *Burkholderia*.

Tanto en el caso de *Burkholderia* como en el de *Novosphingobium* HS2a, se necesitarán más estudios sobre la expresión de los genes de degradación en el medio ambiente, centrándonos en la rizosfera. Existen estudios donde se demuestra que los exudados radiculares, ricos en hidratos de carbono, aminoácidos y ácidos orgánicos inhiben la degradación de compuestos aromáticos (Rentz *et al.*, 2004), mientras que otros trabajos sugieren que compuestos presentes en estos exudados pueden favorecer la eliminación de los compuestos (Gilbert y Crowley, 1997; Singer *et al.*, 2003). Nosotros hemos visto que tanto en *Burkholderia* como *Novosphingobium* sp. HS2a los genes de degradación de PAHs, aunque no son inducidos por los exudados radiculares de trébol, tampoco son reprimidos, lo que abre una puerta interesante en su estudio en rizorremediación.

**DISCUSIÓN GENERAL**



## DISCUSIÓN GENERAL

En los distintos capítulos de esta Tesis Doctoral hemos ido estudiando algunas de las propiedades clave para poder diseñar un buen sistema de rizorremediación. La idea conductora de esta Tesis es que para cualquier proceso de rizorremediación se tendrán que analizar las características particulares de la zona a remediar y se tendrán que utilizar distintas asociaciones de plantas y microorganismos. Los resultados obtenidos durante este estudio van precisamente encaminados a poder generar una serie de conocimientos sobre un conjunto de bacterias y plantas que puedan facilitar la elección de la mejor combinación. Obviamente, los parámetros a estudiar son muy variados y las interacciones entre los tres elementos fundamentales, el suelo, la planta y las bacterias son enormemente complejas lo que dificulta el asegurar el éxito de la rizorremediación incluso utilizando la mejor combinación disponible en el laboratorio. Sin embargo, el tener un catálogo de recursos disponibles y un conjunto de conocimientos ya establecidos sobre las interacciones, en este caso entre la planta y las bacterias que llevarán a cabo la remediación, facilitará la toma de decisiones respecto al diseño de la estrategia.

En la última década, y como consecuencia de los avances de las técnicas -ómicas, el estudio de la distribución de los microorganismos en el medio ambiente, los procesos particulares de la interacción de éstos con el suelo, y su contribución a la atenuación natural han cobrado gran relevancia. Desde el primer trabajo de Radwan y colaboradores (1995), en el que se demostró la importancia de la degradación de hidrocarburos en la raíz de plantas por los microorganismos autóctonos, numerosos estudios han tratado sobre el papel que las bacterias indígenas cumplen en la eliminación de contaminantes. Aunque el papel de éstas en biorremediación es indiscutible, la observación de la existencia de sitios contaminados pone de manifiesto que no siempre esta eliminación natural de contaminantes es efectiva, y en muchos casos hay que utilizar técnicas de bioaumento para conseguir la reducción de los niveles de contaminantes a cantidades tolerables para el ecosistema. Para la mayoría de contaminantes, la teoría de que en zonas contaminadas habitan bacterias capaces de degradar estos compuestos está ya muy aceptada, y por tanto el aislamiento de treinta y tres cepas con capacidad de transformar PAHs en el suelo y la rizosfera de las zonas muestreadas durante este trabajo (Granada, Madrid y Hue lva) y que eran susceptibles de estar contaminadas por estos compuestos no representa un hecho sorprendente. Aunque en general, en la mayoría de los suelos estudiados hasta el momento predominan las acidobacterias, actinobacterias, bacteroidetes y

proteobacterias (Lauber *et al.*, 2009; Chu *et al.*, 2010) en los suelos que nosotros hemos analizado, las poblaciones dominantes pertenecen fundamentalmente al grupo de las proteobacterias, al igual que las cepas aisladas posteriormente en base a su capacidad de transformar fenantreno (*Pseudomonas*, *Sphingobium*, *Novosphingobium*, *Sphingomonas* y *Burkholderia*). Esto indica que en su entorno naturalizados estos géneros probablemente tienen en estos ambientes un nicho adecuado para prosperar y sugiere por tanto que las estrategias encaminadas a su bioaumento (en este caso mediante incorporación a la rizosfera) podrían dar buen resultado. Además, si tenemos en cuenta la similitud de secuencia que hemos encontrado entre todos los genes degradativos de las cepas de la familia Sphingomonadaceae (en cuyo análisis sólo hemos encontrado dos tipos de dióxigenasas relacionadas con la degradación de PAHs), la similitud de secuencias entre los genes de las cepas de *Burkholderia*, así como la similitud de todas estas secuencias con las de cepas ya publicadas y aisladas en otros lugares del mundo, la idea de la posibilidad de transferencia horizontal de genes se hace patente. El hecho de que en localizaciones distintas se encuentren genes con una similitud de secuencias de un 98% entre bacterias de la misma familia sugiere que estos genes se transfieren en la naturaleza con relativa facilidad de unas cepas a otras. Así, se puede pensar que la introducción de alguna de estas cepas en ambientes contaminados podría dar lugar a la transferencia de genes a las cepas ya existentes y bien establecidas en ese suelo, contribuyendo a mejorar la capacidad degradativa de la microbiota del suelo en general. Esta transferencia de genes desde las cepas degradativas a las poblaciones nativas ha sido estudiada en detalle por Taghavi y colaboradores (2005). Al introducir la cepa *Burkholderia cepacia* L.S.2.4., portadora del plásmido pTOM que confiere la capacidad de degradar tolueno, en la rizosfera de álamos se observó que algunos miembros de la comunidad endófitas habían adquirido este plásmido y ahora eran capaces de eliminar el contaminante y persistir en el ambiente de la planta.

Las propiedades de adhesión a semilla y raíz, de colonización de raíz, de crecimiento con los exudados radiculares y de expresión de genes en la rizosfera son muy importantes a la hora de plantear la estrategia de biorremediación. Las interacciones que establecen las bacterias con las plantas han sido ampliamente estudiadas en patógenos vegetales y, en los últimos años, han recibido gran atención las establecidas entre bacterias beneficiosas, denominadas en general PGPRs (del inglés "Plant Growth Promoting Rhizobacteria"), y la planta. Sin embargo, no se han llevado a cabo muchos estudios en el ámbito de la biorremediación. Aunque los mecanismos de adhesión y colonización probablemente tengan puntos comunes con

los de las PGPR, los mecanismos específicos de esta interacción, los que harían que la planta potenciase la colonización por este tipo de bacterias, podrían ser distintos ya que la función que realizan estas bacterias no está relacionada con la síntesis de hormonas, con la movilización de nutrientes o con algunas de las funciones que son beneficiosas para la planta *per se*. En este caso el beneficio de la interacción sería más indirecto y consistiría en eliminar los contaminantes del suelo que rodea a la raíz de la planta. El estudio molecular de estos mecanismos ha quedado fuera del ámbito de esta Tesis Doctoral, pero es una línea de investigación que probablemente merezca la pena explorarse para aquellas bacterias que han demostrado tener mejores capacidades de colonización. De hecho, contamos con sistemas modelo *a priori* óptimos para su estudio, ya que tenemos cepas pertenecientes al mismo género que poseen distintas capacidades de adhesión, como es el caso de las cepas *Burkholderia* sp. MS3 y MR5 o *Novosphingobium* sp. HS2a y HR5a.

Es sorprendente el hecho de que no hayamos encontrado correlación entre las bacterias aisladas de la rizosfera y la capacidad de las cepas para adherirse o colonizar la raíz de la planta, ya que algunos autores han demostrado esta relación (Hozore y Alexander, 1991; Lugtenberg y Dekkers, 1999). Aunque no todas las cepas tuvieron una adhesión inicial similar, todas ellas fueron capaces de colonizar y mantener las poblaciones en la rizosfera, independientemente de si fueron aisladas de una muestra rizosférica o no. La cinética de esta colonización no obstante fue diferente entre distintas cepas y esto puede ser relevante en el contexto de la colonización competitiva. Esto muestra de nuevo que hay que estudiar estas propiedades antes de intentar llevar a cabo la biorremediación ya que no se puede dar por sentado que una cepa por haber sido aislada de rizosfera es mejor colonizadora que una aislada de suelo. El próximo paso para avanzar en el estudio de la colonización será marcar las cepas más relevantes con la proteína de fluorescencia verde y realizar el análisis de la colonización en condiciones más reales y en presencia de microorganismos indígenas. El marcaje de las cepas con la proteína de fluorescencia verde, introducida en el cromosoma, o fusionada a los promotores de los genes de degradación de PAHs, especialmente ahora que conocemos algunos de los principios básicos de la expresión de los mismos en presencia de exudados radiculares, nos servirá para completar el seguimiento no sólo de cómo las cepas aisladas en esta Tesis Doctoral colonizan la rizosfera, sino también para analizar el patrón de expresión de los genes de interés a lo largo de este proceso de colonización. El estudio de la regulación de estos genes, especialmente *in vivo* dará mucha información sobre el resultado previsible de la degradación.



Es también interesante, desde el punto de vista de la ciencia básica, las diferencias en la regulación entre las dos cepas de *Burkholderia*, MS3 y HR3p, que teniendo genes estructurales prácticamente idénticos poseen una regulación diferente. Desde el punto de vista de evolución de rutas catabólicas, el hecho de que en una cepa se siga un esquema más o menos clásico de regulación (MS3) y que en la otra se hayan sufrido una serie de modificaciones en la región reguladora que le hace probablemente perder estos elementos regulatorios es enormemente interesante.

Por último, hay que destacar que aunque algunas cepas de *Burkholderia* son patógenas, tanto para animales como para plantas, las que hemos aislado en esta Tesis Doctoral están filogenéticamente cercanas a las especies *Burkholderia graminis* para las cuales se han demostrado propiedades beneficiosas para las plantas y de *Burkholderia xenovorans*, que posee capacidades biodegradativas de compuestos xenobióticos. Las bacterias de este género, al igual que las *Pseudomonas* ocupan distintos nichos ecológicos, siendo algunas de vida libre mientras que otras son epifíticas, endofíticas o incluso en simbiosis obligados. A medida que se conoce más sobre este género se van describiendo nuevas funciones benéficas en la interacción con las plantas, como pueden ser la contribución a un mejor balance hídrico, la capacidad de fijar nitrógeno, de inducir el crecimiento vegetal o de producir compuestos antifúngicos y de facilitar la adaptación del huésped a estrés ambientales, (Capítulo 2; Schmidt *et al.*, 2009, por citar algunos). Por tanto, aunque cualquier posible uso en procesos biotecnológicos necesita incluir exámenes exhaustivos de riesgos potenciales (Coenye y Vandamme, 2003), la gran cantidad de posibles usos beneficiosos está potenciando la investigación para establecer los factores que definen qué cepas de *Burkholderia* pueden suponer un riesgo medioambiental y cuáles no. De hecho algunos marcadores de patogenicidad ya descritos no se han encontrado en especies de *Burkholderia* diazótrofes asociadas a plantas. Si estos resultados se confirman a gran escala, se podría utilizar estas cepas para diversas aplicaciones medioambientales, como la biorremediación.

Aunque no han sido objeto de estudio en esta Tesis Doctoral, no podemos olvidarnos de que se han aislado representantes del grupo de las actinobacterias (*Mycobacterium* y *Arthrobacter*) entre las bacterias capaces de metabolizar fenantreno, y éstas también están ampliamente distribuidas en el medio ambiente, por lo que su utilización en biorremediación podría también ser de interés.

En conclusión, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral son relevantes desde el punto de vista biotecnológico ya que han permitido disponer de un amplio repertorio de bacterias con capacidad de degradar PAHs de bajo peso molecular, y entre ellas, algunas presentaron buenas capacidades en la interacción con las plantas lo que las hace ser buenas candidatas para llevar a cabo estrategias de rizorremediación. Aunque se ha avanzado en el conocimiento de la expresión de genes de biodegradación de PAHs, todavía quedan bastantes parámetros que analizar para poder controlar mejor las condiciones de expresión en la rizosfera.



**CONCLUSIONES**



- 1.- La principal fuerza de selección de las poblaciones mayoritarias en la rizosfera no parece ser la composición de los exudados radiculares, no obstante, la presencia de las plantas sí tiene un efecto sobre estas poblaciones.
- 2.- En zonas cercanas a fuentes de emisión de PAHs se pueden aislar bacterias capaces de metabolizar fenantreno. Estas bacterias pertenecen a los mismos géneros que algunas de las poblaciones mayoritarias de estos suelos.
- 3.- Las bacterias que poseen una buena capacidad de adhesión a semilla, la tienen a los dos tipos de semillas analizadas, mientras que la capacidad de adhesión a raíz depende del tipo de planta.
- 4.- La capacidad de colonización de raíz en condiciones axénicas no depende del lugar (suelo o rizosfera) de donde se aislaron originalmente las cepas bacterianas.
- 5.- La capacidad de colonización en competencia con *P. putida* KT2440 de las bacterias aisladas en esta Tesis no puede ser inferida en base a los datos de colonización individual.
- 6.- Los genes de degradación de fenantreno identificados en las cepas aisladas durante esta Tesis Doctoral son prácticamente idénticos a los descritos en la literatura de cepas aisladas en localizaciones muy diferentes.
- 7.- La regulación de los genes *phn* de las dos cepas de *Burkholderia* identificadas durante esta Tesis Doctoral es muy diferente entre ellas. En la cepa MS3 estos genes se inducen por naftaleno, mientras que en la cepa HR3p no. En ninguna de las dos cepas estos genes se inducen por los exudados radiculares de trébol, pero tampoco son reprimidos.
- 8.- Los genes *phnA1f* de *Novosphingobium* sp. HS2a no se inducen ni por fenantreno, naftaleno, ni por los posibles intermediarios de la ruta. Al igual que en el caso de las cepas de *Burkholderia*, tampoco lo hacen en presencia de los exudados de raíz de trébol, ni tampoco son reprimidos.



**ANEXOS**





## Anexo 1: Secuencias obtenidas a partir de las bandas de los geles de DGGE

### DGGE de las muestras de Granada

#### Banda 1: Uncultured $\delta$ -proteobacterium (FJ568409)

GTCATCGTGCTGGATGTTAGCCAACACTTATTCTTTCCCTCCCCACAGAGCTTTACAACCCGAAGGCCTTC  
ATCGCTCACGCGGCGTGCCTGCGTCAGGCTTTGCCCCATTGCGCAAGATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTA  
G

#### Banda 2: *Halomonas* sp. (DQ358684)

AAGCTCGAGGATATTAGCCCCAAGCCCTTCTTTCCCACTGAAAGTGCTTTACAACCCCTAGGGCCTTCATC  
ACTCACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTGCGCCATTGTCCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGG

#### Banda 3: Uncultured Rhizobiales bacterium (HM799096)

CCATACCCCTCTTCTACGGTTCCCGTCATTATCTTACCCTTAAAAGAGCTTTACAACCCCTAAGGCCTTC  
ATCACTCACGCGGCATGCTGGATCAGGCTTTGCCCCATTGTCCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTA  
GG

#### Banda 4: *Sphingopyxis* sp. (AB524074)

TCATTATCATCTCTGGTGAAGAGCTTTACAACCCCTAAGGCCTTCATCACTCACGCGGCATGGCTGGATCAG  
GCTTTGCCCCATTGTCCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTA

### DGGE de las muestras de Madrid

#### Banda 1: *Pseudomonas moraviensis* (AY970952)

TTAGTATTAATCTACAACCCCTTCTCCCAACTTAAAGTGCTTTACAATCCGAAGACCTTCTTCACACACG  
CGGCATGGCTGGATCAGGCTTTGCCCCATTGTCCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCG

#### Banda 2: *Acidobacteria bacterium* (HM0622413)

AATTAACCCCTTACTTATTCTTCCCGTCTTGCGAAGTTACATCCCGAAGGATTTTCATCCTTCACGCGGCGT  
TGCTGGGTCAGGCTTTGCCCCATTGCCAAAATTCCCGACTGCTGCCGGAGAAGCCAGTTGGTT

#### Banda 3: *Pseudomonas cedrina* subsp. *fulgida* (HQ432807)

TCCGTACGTCAAATTCAGAGTATTAATCTACAACCCCTTCTCCCAACTTAAAGTGCTTTACAATCCGAA  
GACCTTCTTCACACACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTTGCCCCATTGTCCAATATTCCCCACTGCTGCC  
TCCCGTAGG

#### Banda 4: *Burkholderia mimosarum* (AY752953)

TCTGTCAATTATCATCTAGGCTGTAAAGTTAGATCTAGGGCTCATCCCTACGCGGCGTTGCTGGTCAGGC  
TTGCGCCATTGTCCAAAATTCCCACTGTTGCCCTCCCGAGCCCCCGTGTCCGT

#### Banda 5: *Acidobacteria bacterium* (EU185178)

GCGTCGCTAGCATTTGTTAACGCAAGCGTATTACTTCCCGATCTTGCGAAGCTTACATCCCGAAGGGTGAT  
CCTTCTTGCGGCGATTGGGAACAGGCTTTGCGCATTTGCCAAAATTCCCGACTGCTGCCTCCC

#### Banda 6: Uncultured *Sphingomonas* sp. (DQ923856)

ATCCCGTAAAGAGTTTACAACCCCTAAGGCCTTCATCACTCACGCGGCATTGCTGGATCAGGCTTTGCCC  
CATTGTCCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGCT

## DGGE de las muestras de Huelva

**Banda 1: *Burkholderia* sp. (HM461178)**

GTCCGGATCGTCATCACCCGACTGTATTAGAGCCAAGGATTTCTTTCCGGACAAAAGTGCTTTACAACCC  
GAAGCCTTCTTACACACACGCGCATTTGTGGATCAGGCTTTTCGCCATTGTCCAAAATCCCCACTGCTGC  
CTCCCGTAG

**Banda 2: Uncultured soil bacterium (GU598931)**

CATAGGTTGAAGAGCTTTACAACCCTAAGGCTTCATCACTCACGCGGCGTGGCTGCATCAGGCTTGCGCC  
CATTGTCCAATATTCTATACTGCTGCGTTCGCGTAGGCTCGCGTGCCGTGCGTCCGCCAG

**Banda 3: *Burkholderia multivorans* (EF427758)**

TTTTCGGTACCGTCATCCCCGACTGTATTAGAGCCAAGGATTTCTTTCCGGACAAAAGTGCTTTACAAC  
CCGAAGCCTTCTTACACACACGCGCATTTGTGGATCAGGCTTTTCGCCATTGTCCAAAATCCCCACTGC  
TGCTCCCGTA

**Banda 4: Uncultured *Sphingomonas* (DQ923856)**

CTCAGTACTGTCATTATCATCCGGTAAAGAGCTTTACAACCCTAAGGCTTCATCACTCACGCGGCATTG  
CTGGATCAGGCTTTTCGCCATTGTCCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGTTCCCGT

**Banda 5: *Methilobacterium rhodesianum* (GU430671)**

CGGGCTATCTCCGGTTCGTCATTATCGTCCGGATAAAGAGCTTTACAACCCTAAGGCTTCATCACTCACG  
CGGCATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCATTGTCCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGCCCCCGT

**Banda 6: *Arthrobacter* sp. (FJ006834)**

TTTTCTCCGGTCTGTCATTATCATCCCGGTAAGAGCTTTACAACCCTAAGGCTTCATCACTCACGCG  
GCATTGCTGGATCAGGCTTTTCGCCATTGTCCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGG

**Banda 7: Micrococcaceae bacterium (AY177727)**

GAGGTCGTCACCTTTTCGCTTCTTCTACTGAAGAGGTTACAACCCGAAGCGGTCTTCCCTCACGCGGCGTC  
GCTGCATCAGGCTTTCGCGCATTTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGCCCCCGGTG

**Banda 8: *Burkholderia* sp. (HQ441255)**

CGTCATCCCCGACTGTATTAGAGCCAAGGATTTCTTTCCGGACAAAAGTGCTTTACAACCCGAAGGCTT  
TCTTACACACGCGGCATTGCTGGATCAGGCTTTTCGCCATTGTCCAAAATCCCCACTGCTGCCTCCCG  
TAGG

## Anexo 2: Alineamiento de las secuencias del gen *phnAc* de *Burkholderia* sp.

### RP007, MS3 y HR3p

```

RP007      ACGCATGAATGCGCTATTCCCAATTACGGTGATTTCTGTGACCACGCGCATGGGAACGGAT
MS3        ACGCATGAATGCGCTATTCCCAATTACGGTGATTTCTGTGACCACGCGCATGGGAACGGAT
HR3p       ACGCATGAATGCGCTATTCCCAATTACGGTGATTTCTGTGACCACGCGCATGGGAACGGAT
*****

RP007      GAGGTGATTGTGATGCGGCAGAAGGATAAAGCTCGATTAAAGCCTTTCTCAACGTTTGCAGG
MS3        GAGGTGATTGTGATGCGGCAGAAGGATAAAGCTCGATTAAAGCCTTTCTCAACGTTTGCAGG
HR3p       GAGGTGATTGTGATGCGGCAGAAGGATAAAGCTCGATTAAAGCAATTTCTCAACGTTTGCAGG
*****

RP007      CATCGCGGTGCGCGCTATGCGCAGTCGAAGCGGGTAACGCGCGGGCTTCGCCTGCAAT
MS3        CATCGCGGTGCGCGCTATGCGCAGTCGAAGCGGGTAACGCGCGGGCTTCGCCTGCAAT
HR3p       CATCGCGGTGCGCGCTATGCGCAGTCGAAGCGGGTAACGCGCGGGCTTCGCCTGCAAT
*****

RP007      TATCATGGCTGGGCGTATGGGGCAGATGGATCGCTTCTAAGTGTTCATTTGAGAATGAA
MS3        TATCATGGCTGGGCGTATGGGGCAGATGGATCGCTTCTAAGTGTTCATTTGAGAATGAA
HR3p       TATCATGGCTGGGCGTATGGGGCAGATGGATCGCTTCTAAGCGTTCATTTGGAATGAA
*****

RP007      ATTTATCAAAGCGTCTGGATAAATGCAAAAACGGTCTGCATGAAATGGCAAGGTGGAG
MS3        ATTTATCAAAGCGTCTGGATAAATGCAAAAACGGTCTGCATGAAATGGCAAGGTGGAG
HR3p       ATTTATCAAAGCGTCTGGATAAATGCAAAAACGGTCTGCATGAAATGGCAAGGTGGAG
*****

RP007      TCCTATCATGGATTGCTTTACGGCTGCTTCGATACAGATGCGCCCAATCTAAAGGAATAC
MS3        TCCTATCATGGATTGCTTTACGGCTGCTTCGATACAGATGCGCCCAATCTAAAGGAATAC
HR3p       TCCTATCATGGATTGCTTTACGGCTGCTTCGATACAGATGCGCCCAATCTAAAGGAATAC
*****

RP007      CTGGGCGATTTTGCATGGTATCTCGATCTTTGGATGGAAGCCGGCGGGCATCGAACTC
MS3        CTGGGCGATTTTGCATGGTATCTCGATCTTTGGATGGAAGCCGGCGGGCATCGAACTC
HR3p       CTGGGCGATTTTGCATGGTATCTCGATCTTTGGATGGAAGCCGGCGGGCATCGAACTC
*****

RP007      GTCGGGCCGCTGCCCCTGCTTCAATCGAAGCCAATTGGAAAGCGCCGTAGAGAAATTTT
MS3        GTCGGGCCGCTGCCCCTGCTTCAATCGAAGCCAATTGGAAAGCGCCGTAGAGAAATTTT
HR3p       GTCGGGCCGCTGCCCCTGCTTCAATCGAAGCCAATTGGAAAGCGCCGTAGAGAAATTTT
*****

RP007      GTCGGTGACGCCTATCATGTGCGCTGGACACATGCATCCGCGCTTAGATCCGGTCACTCC
MS3        GTCGGTGACGCCTATCATGTGCGCTGGACACATGCATCCGCGCTTAGATCCGGTCACTCC
HR3p       GTCGGTGACGCCTATCATGTGCGCTGGACACATGCATCCGCGCTTAGATCCGGTCACTCC
*****

RP007      GGGTTCGCCGGCATGGCAGGGAATAACGTGCTTCCGCCAGCAGGCGCCGGTCTGCAGGTT
MS3        GGGTTCGCCGGCATGGCAGGGAATAACGTGCTTCCGCCAGCAGGCGCCGGTCTGCAGGTT
HR3p       GGGTTCGCCGGCATGGCAGGGAATAACGTGCTTCCGCCAGCAGGCGCCGGTCTGCAGGTT
*****

RP007      ACCACGCGGCACGGTCACGGGATCGGTGCGCTATATGACGTCTATGCGGGCGTCCACGAC
MS3        ACCACGCGGCACGGTCACGGGATCGGTGCGCTATATGACGTCTATGCGGGCGTCCACGAC
HR3p       ACCACGCGGCACGGTCACGGGATCGGTGCGCTATATGACGTCTATGCGGGCGTCCACGAC
*****

RP007      AACGAGTTATCCGAAGAGTTGATGGCATGGGGCCTGGCCAAAGAGCAGGTTCTTAAAGAA
MS3        AACGAGTTATCCGAAGAGTTGATGGCATGGGGCCTGGCCAAAGAGCAGGTTCTTAAAGAA
HR3p       AACGAGTTATCCGAAGAGTTGATGGCATGGGGCCTGGCCAAAGAGCAGGTTCTTAAAGAA
*****

```

Anexo 2

RP007 AAAATTGGC**CC**GATACGTGCCCGGCTTTATCGGTCACATTTGAATGGAACCATCTTCCCC  
MS3 AAAATTGGC**CC**GATACGTGCCCGGCTTTATCGGTCACATTTGAATGGAACCATCTTCCCC  
HR3p AAAATTGGC**T**CGATACGTGCCCGGCTTTATCGGTCACATTTGAATGGAACCATCTTCCCC  
\*\*\*\*\*

RP007 AATACCAGTTTCCTCACAGGATCGGG**T**GTATT**T**AAGGTCTGGCAGCCACA**T**GGGCCCAA  
MS3 AATACCAGTTTCCTCACAGGATCGGG**T**GTATT**C**AAGGTCTGGCAGCCACA**T**GGGCCCAA  
HR3p AATACCAGTTTCCTCACAGGATCGGG**C**GTATT**C**AAGGTCTGGCAGCCACA**C**GGGCCCAA  
\*\*\*\*\*

RP007 AAGACCGAGGTATTGACGT  
MS3 AAGACCGAGGTATTGACGT  
HR3p AAGACCGAGGTATTGACGT  
\*\*\*\*\*

**Anexo 3: Alineamiento de las secuencias del gen *phnA1a* de *Sphingomonas* sp. CHY-1, *Novosphingobium* sp. HR1a, HR1b, HR3g y *Sphingobium* sp. HR5a**

```

HR1b      ACCACA-TCGTAGACACTGTCAATGCTAGCCAGTCCCGTCAGGTGTTCTGGGACAGAGAC
HR5a      ACCACACTCGTAGACACTGTCAATGCTAGCCAGTCCCGTCAGGTGTTCTGGGACAGAGAC
HR1a      ACCACACTCGTAGACACTGTCAATGCTAGCCAGTCCCGTCAGGTGTTCTGGGACAGAGAC
CHY-1     ACCACACTCGTAGACACTGTCAATGCTAGCCAGTCCCGTCAGGTGTTCTGGGACAGAGAC
HR3g      ACCACACTCGTAGACACTGTCAATGCTAGCCAGTCCCGTCAGGTGTTCTGGGACAGAGAC
          *****

HR1b      GTTTATGATCTTGAATAGAGCGGATTTTTTCCGGGCATGGTTGATGCTCGGCCACAAA
HR5a      GTTTATGATCTTGAATAGAGCGGATTTTTTCCGGGCATGGTTGATGCTCGGCCACAAA
HR1a      GTTTATGATCTTGAATAGAGCGGATTTTTTCCGGGCATGGTTGATGCTCGGCCACAAA
CHY-1     GTTTATGATCTTGAATAGAGCGGATTTTTTCCGGGCATGGTTGATGCTCGGCCACAAA
HR3g      GTTTATGATCTTGAATAGAGCGGATTTTTTCCGGGCATGGTTGATGCTCGGCCACAAA
          *****

HR1b      TCGCTTCTCCCGAAGCCGGGCGACTTCATCACGACTTATATGGCCGAGGACAAGATCATC
HR5a      TCGCTTCTCCCGAAGCCGGGCGACTTCATCACGACTTATATGGCCGAGGACAAGATCATC
HR1a      TCGCTTCTCCCGAAGCCGGGCGACTTCATCACGACTTATATGGCCGAGGACAAGATCATC
CHY-1     TCGCTTCTCCCGAAGCCGGGCGACTTCATCACGACTTATATGGCCGAGGACAAGATCATC
HR3g      TCGCTTCTCCCGAAGCCGGGCGACTTCATCACGACTTATATGGCCGAGGACAAGATCATC
          *****

HR1b      CTTTCGCACCAGAGCGACGGGACCTTCCGCGCCTTATCAATTCTGTGCACGCACCGCGGC
HR5a      CTTTCGCACCAGAGCGACGGGACCTTCCGCGCCTTATCAATTCTGTGCACGCACCGCGGC
HR1a      CTTTCGCACCAGAGCGACGGGACCTTCCGCGCCTTATCAATTCTGTGCACGCACCGCGGC
CHY-1     CTTTCGCACCAGAGCGACGGGACCTTCCGCGCCTTATCAATTCTGTGCACGCACCGCGGC
HR3g      CTTTCGCACCAGAGCGACGGGACCTTCCGCGCCTTATCAATTCTGTGCACGCACCGCGGC
          *****

HR1b      AACCAGATTTGCCACGCCGACAGCGGTAACGCCAAGGCGTTTCGTCTGCAATTATCACGGC
HR5a      AACCAGATTTGCCACGCCGACAGCGGTAACGCCAAGGCGTTTCGTCTGCAATTATCACGGC
HR1a      AACCAGATTTGCCACGCCGACAGCGGTAACGCCAAGGCGTTTCGTCTGCAATTATCACGGC
CHY-1     AACCAGATTTGCCACGCCGACAGCGGTAACGCCAAGGCGTTTCGTCTGCAATTATCACGGC
HR3g      AACCAGATTTGCCACGCCGACAGCGGTAACGCCAAGGCGTTTCGTCTGCAATTATCACGGC
          *****

HR1b      TGGGTGTACGGGCAGGATGGATCGTTGGTTCGATGTCCCACTCGAGTCGCGCTGTTACCAC
HR5a      TGGGTGTACGGGCAGGATGGATCGTTGGTTCGATGTCCCACTCGAGTCGCGCTGTTACCAC
HR1a      TGGGTGTACGGGCAGGATGGATCGTTGGTTCGATGTCCCACTCGAGTCGCGCTGTTACCAC
CHY-1     TGGGTGTACGGGCAGGATGGATCGTTGGTTCGATGTCCCACTCGAGTCGCGCTGTTACCAC
HR3g      TGGGTGTACGGGCAGGATGGATCGTTGGTTCGATGTCCCACTCGAGTCGCGCTGTTACCAC
          *****

HR1b      AACAAACTCGATAAGCAAGAGCTGGCGGCGAAGTCTGTTTCGGGTCGAAACCTACAAGGGT
HR5a      AACAAACTCGATAAGCAAGAGCTGGCGGCGAAGTCTGTTTCGGGTCGAAACCTACAAGGGT
HR1a      AACAAACTCGATAAGCAAGAGCTGGCGGCGAAGTCTGTTTCGGGTCGAAACCTACAAGGGT
CHY-1     AACAAACTCGATAAGCAAGAGCTGGCGGCGAAGTCTGTTTCGGGTCGAAACCTACAAGGGT
HR3g      AACAAACTCGATAAGCAAGAGCTGGCGGCGAAGTCTGTTTCGGGTCGAAACCTACAAGGGT
          *****

HR1b      TTCATTTTCGGTTGCCATGATCCCGAAGCGCCAAGCCTTGAAGACTACCTGGGCGAATTC
HR5a      TTCATTTTCGGTTGCCATGATCCCGAAGCGCCAAGCCTTGAAGACTACCTGGGCGAATTC
HR1a      TTCATTTTCGGTTGCCATGATCCCGAAGCGCCAAGCCTTGAAGACTACCTAGGCGAATTC
CHY-1     TTCATTTTCGGTTGCCATGATCCCGAAGCGCCAAGCCTTGAAGACTACCTGGGCGAATTC
HR3g      TTCATTTTCGGTTGCCATGATCCCGAAGCGCCAAGCCTTGAAGACTACCTGGGCGAATTC
          *****

HR1b      CGTTTTTATCTCGACACCATCTGGGAAGGAGGGGGCGCTGGGCTGGAAGTCTCGGTCCG
HR5a      CGTTTTTATCTCGACACCATCTGGGAAGGAGGGGGCGCTGGGCTGGAAGTCTCGGTCCG
HR1a      CGTTTTTATCTCGACACCATCTGGGAAGGAGGGGGCGCTGGGCTGGAAGTCTCGGTCCG
CHY-1     CGTTTTTATCTCGACACCATCTGGGAAGGAGGGGGCGCTGGGCTGGAAGTCTCGGTCCG
HR3g      CGTTTTTATCTCGACACCATCTGGGAAGGAGGGGGCGCTGGGCTGGAAGTCTCGGTCCG
          *****

```

Anexo 3

HR1b CCGATGAAGAGCCTGCTTCACTGCAACTGGAAAGTGCCGGTCGAAAATTTTGTCCGGCGAC  
HR5a CCGATGAAGAGCCTGCTTCACTGCAACTGGAAAGTGCCGGTCGAAAATTTTGTCCGGCGAC  
HR1a CCGATGAAGAGCCTGCTTCACTGCAACTGGAAAGTGCCGGTCGAAAATTTTGTCCGGCGAC  
CHY-1 CCGATGAAGAGCCTGCTTCACTGCAACTGGAAAGTGCCGGTCGAAAATTTTGTCCGGCGAC  
HR3g CCGATGAAGAGCCTGCTTCACTGCAACTGGAAAGTGCCGGTCGAAAATTTTGTCCGGCGAC  
\*\*\*\*\*

HR1b GGATATC**A**TGTCGGATGGACCCATGCGGCGGCGCTTGGTCAGATCGGTGGTCCGTTGGCG  
HR5a GGATATC**G**TGTCGGATGGACCCATGCGGCGGCGCTTGGTCAGATCGGTGGTCCGTTGGCG  
HR1a GGATATC**A**TGTCGGATGGACCCATGCGGCGGCGCTTGGTCAGATCGGTGGTCCGTTGGCG  
CHY-1 GGATATC**A**TGTCGGATGGACCCATGCGGCGGCGCTTGGTCAGATCGGTGGTCCGTTGGCG  
HR3g GGATATC**A**TGTCGGATGGACCCATGCGGCGGCGCTTGGTCAGATCGGTGGTCCGTTGGCG  
\*\*\*\*\*

HR1b GGACTGGCCGGCAACCGCGGGACATTCCCTTCGACGATCTTGGATTGCAGTTCACGACC  
HR5a GGACTGGCCGGCAACCGCGGGACATTCCCTTCGACGATCTTGGATTGCAGTTCACGACC  
HR1a GGACTGGCCGGCAACCGCGGGACATTCCCTTCGACGATCTTGGATTGCAGTTCACGACC  
CHY-1 GGACTGGCCGGCAACCGCGGGACATTCCCTTCGACGATCTTGGATTGCAGTTCACGACC  
HR3g GGACTGGCCGGCAACCGCGGGACATTCCCTTCGACGATCTTGGATTGCAGTTCACGACC  
\*\*\*\*\*

HR1b CGGCATGGTCATGGCTTTGGGGTGATCGACAACGCGGCGGCTGCGATCCACCGAAAGGGC  
HR5a CGGCATGGTCATGGCTTTGGGGTGATCGACAACGCGGCGGCTGCGATCCACCGAAAGGGC  
HR1a CGGCATGGTCATGGCTTTGGGGTGATCGACAACGCGGCGGCTGCGATCCACCGAAAGGGC  
CHY-1 CGGCATGGTCATGGCTTTGGGGTGATCGACAACGCGGCGGCTGCGATCCACCGAAAGGGC  
HR3g CGGCATGGTCATGGCTTTGGGGTGATCGACAACGCGGCGGCTGCGATCCACCGAAAGGGC  
\*\*\*\*\*

HR1b GACGGCTGGAACAAATATCTTGAGGACACCCGCGGCGAGGTGCGCCGCAAGTTTGGCGCG  
HR5a GACGGCTGGAACAAATATCTTGAGGACACCCGCGGCGAGGTGCGCCGCAAGTTTGGCGCG  
HR1a GACGGCTGGAACAAATATCTTGAGGACACCCGCGGCGAGGTGCGCCGCAAGTTTGGCGCG  
CHY-1 GACGGCTGGAACAAATATCTTGAGGACACCCGCGGCGAGGTGCGCCGCAAGTTTGGCGCG  
HR3g GACGGCTGGAACAAATATCTTGAGGACACCCGCGGCGAGGTGCGCCGCAAGTTTGGCGCG  
\*\*\*\*\*

HR1b GATCGCGAACGGCTTTATGTCCGGGCACTGGAACGGCGCGATCTTCCCAATTGCTCGTTC  
HR5a GATCGCGAACGGCTTTATGTCCGGGCACTGGAACGGCGCGATCTTCCCAATTGCTCGTTC  
HR1a GATCGCGAACGGCTTTATGTCCGGGCACTGGAACGGCGCGATCTTCCCAATTGCTCGTTC  
CHY-1 GATCGCGAACGGCTTTATGTCCGGGCACTGGAACGGCGCGATCTTCCCAATTGCTCGTTC  
HR3g GATCGCGAACGGCTTTATGTCCGGGCACTGGAACGGCGCGATCTTCCCAATTGCTCGTTC  
\*\*\*\*\*

HR1b CTGTATGGCACCACACCTTCAAATCTGGCATCCACGCGGGCCGCACGAGATTGAAGTA  
HR5a CTGTATGGCACCACACCTTCAAATCTGGCATCCACGCGGGCCGCACGAGATTGAAGTA  
HR1a CTGTATGGCACCACACCTTCAAATCTGGCATCCACGCGGGCCGCACGAGATTGAAGTA  
CHY-1 CTGTATGGCACCACACCTTCAAATCTGGCATCCACGCGGGCCGCACGAGATTGAAGTA  
HR3g CTGTATGGCACCACACCTTCAAATCTGGCATCCACGCGGGCCGCACGAGATTGAAGTA  
\*\*\*\*\*

HR1b TGGACCTATAACCATGGTGCCGAGCGATGCCGATCCCCTACCAAGAGTGCGATACAGCGC  
HR5a TGGACCTATAACCATGGTGCCGAGCGATGCCGATCCCCTACCAAGAGTGCGATACAGCGC  
HR1a TGGACCTATAACCATGGTGCCGAGCGATGCCGATCCCCTACCAAGAGTGCGATACAGCGC  
CHY-1 TGGACCTATAACCATGGTGCCGAGCGATGCCGATCCCCTACCAAGAGTGCGATACAGCGC  
HR3g TGGACCTATAACCATGGTGCCGAGCGATGCCGATCCCCTACCAAGAGTGCGATACAGCGC  
\*\*\*\*\*

HR1b GAAGCGACGAGAACATTTCGGAACCGCCGGGACGCTGGAAAGCGACGACGGCGAAAACATG  
HR5a GAAGCGACGAGAACATTTCGGAACCGCCGGGACGCTGGAAAGCGACGACGGCGAAAACATG  
HR1a GAAGCGACGAGAACATTTCGGAACCGCCGGGACGCTGGAAAGCGACGACGGCGAAAACATG  
CHY-1 GAAGCGACGAGAACATTTCGGAACCGCCGGGACGCTGGAAAGCGACGACGGCGAAAACATG  
HR3g GAAGCGACGAGAACATTTCGGAACCGCCGGGACGCTGGAAAGCGACGACGGCGAAAACATG  
\*\*\*\*\*

HR1b TCTTCGGCAACCTACGTGAACCGTGGCGTGATCACGCGTGACGGCATGATGAATTCGACC  
 HR5a TCTTCGGCAACCTACGTGAACCGTGGCGTGATCACGCGTGACGGCATGATGAATTCGACC  
 HR1a TCTTCGGCAACCTACGTGAACCGTGGCGTGATCACGCGTGACGGCATGATGAATTCGACC  
 CHY-1 TCTTCGGCAACCTACGTGAACCGTGGCGTGATCACGCGTGACGGCATGATGAATTCGACC  
 HR3g TCTTCGGCAACCTACGTGAACCGTGGCGTGATCACGCGTGACGGCATGATGAATTCGACC  
 \*\*\*\*\*

HR1b ATGGGCGTCGGCTACGAAGGACCGCATCCGGTTTATCCCGGAATCGTCGGCATCAGCTTC  
 HR5a ATGGGCGTCGGCTACGAAGGACCGCATCCGGTTTATCCCGGAATCGTCGGCATCAGCTTC  
 HR1a ATGGGCGTCGGCTACGAAGGACCGCATCCGGTTTATCCCGGAATCGTCGGCATCAGCTTC  
 CHY-1 ATGGGCGTCGGCTACGAAGGACCGCATCCGGTTTATCCCGGAATCGTCGGCATCAGCTTC  
 HR3g ATGGGCGTCGGCTACGAAGGACCGCATCCGGTTTATCCCGGAATCGTCGGCATCAGCTTC  
 \*\*\*\*\*

HR1b ATTGGCGAGACATCCTACCGGGGCTTCTACCGGTTCTGGAAGGAAATGATCGATGCCCCC  
 HR5a ATTGGCGAGACATCCTACCGGGGCTTCTACCGGTTCTGGAAGGAAATGATCGATGCCCCC  
 HR1a ATTGGCGAGACATCCTACCGGGGCTTCTACCGGTTCTGGAAGGAAATGATCGATGCCCCC  
 CHY-1 ATTGGCGAGACATCCTACCGGGGCTTCTACCGGTTCTGGAAGGAAATGATCGATGCCCCC  
 HR3g ATTGGCGAGACATCCTACCGGGGCTTCTACCGGTTCTGGAAGGAAATGATCGATGCCCCC  
 \*\*\*\*\*

HR1b GATTGGGCGAGCGTGAAGGCAAACGACGACAATTGGGATTCGGTCTTCACGAATCGCAAT  
 HR5a GATTGGGCGAGCGTGAAGGCAAACGACGACAATTGGGATTCGGTCTTCACGAATCGCAAT  
 HR1a GATTGGGCGAGCGTGAAGGCAAACGACGACAATTGGGATTCGGTCTTCACGAATCGCAAT  
 CHY-1 GATTGGGCGAGCGTGAAGGCAAACGACGACAATTGGGATTCGGTCTTCACGAATCGCAAT  
 HR3g GATTGGGCGAGCGTGAAGGCAAACGACGACAATTGGGATTCGGTCTTCACGAATCGCAAT  
 \*\*\*\*\*

HR1b TTCTGGAACGAAAAGCTCAACGCGGCCGAATGA  
 HR5a TTCTGGAACGAAAAGCTCAACGCGGCCGAATGA  
 HR1a TTCTGGAACGAAAAGCTCAACGCGGCCGAATGA  
 CHY-1 TTCTGGAACGAAAAGCTCAACGCGGCCGAATGA  
 HR3g TTCTGGAACGAAAAGCTCAACGCGGCCGAATGA  
 \*\*\*\*\*





**Anexo 4: Alineamiento de las secuencias del gen *bphA1f* de *Sphingomonas aromaticivorans* F199 y *phnA1f* de *Sphingomonas* sp. LH128, R3 y R4a y *Novosphingobium* sp. HS2a**

```

LH128      ATCGTCGCTTTTCGAGCGTTCCCGCCGTACCAAATGAACGGATCGC--TTCGCGCTGGATCG
R3         -----CCCTCGGGAAACGGATCGCCTTCGCGCTGGATCG
R4         -----ACCCTTTGCACGGATCGC--TTCGCGCTGGATCG
HS2       --TGTCGCTTTTCGAGCGTTCCCGCCGTACCAAATGAACGGATCGC--TTCGCGCTGGATCG
F199      -----CCCGCCGTACCAAATGAACGGATCGC--TTCGCGCTGGATCG
                **      * *****
LH128      ACCGCTTAGTTTTCGGTGTTCGGCATTCTTCGGCACCATGGTATAGGTCCAGACCTCGATTT
R3         ACCGCTTAGTTTTCGGTGTTCGGCATTCTTCGGCACCATGGTATAGGTCCAGACCTCGATTT
R4         ACCGCTTAGTTTTCGGTGTTCGGCATTCTTCGGCACCATGGTATAGGTCCAGACCTCGATTT
HS2       ACCGCTTAGTTTTCGGTGTTCGGCATTCTTCGGCACCATGGTATAGGTCCAGACCTCGATTT
F199      ACCGCTTAGTTTTCGGTGTTCGGCATTCTTCGGTACCATGGTATAGGTCCAGACCTCGATTT
                *****
LH128      CATGCGGCCCGCGCGGATGCCAGATCTTGAAGGTGTTGGTTCCGTAGAGGAACGAACAGT
R3         CATGCGGCCCGCGCGGATGCCAGATCTTGAAGGTGTTGGTTCCGTAGAGGAACGAACAGT
R4         CATGCGGCCCGCGCGGATGCCAGATCTTGAAGGTGTTGGTTCCGTAGAGGAACGAACAGT
HS2       CATGCGGCCCGCGCGGATGCCAGATCTTGAAGGTGTTGGTTCCGTAGAGGAACGAACAGT
F199      CATGCGGCCCGCGCGGATGCCAGATCTTGAAGGTGTTGGTTCCGTAGAGGAACGAACAGT
                *****
LH128      TGGGGAAGATCGACGTATTCCAGTGACCGACATAGAGCCGTTTCGCGCTCCGGCCCCGAATT
R3         TGGGGAAGATCGACGTATTCCAGTGACCGACATAGAGCCGTTTCGCGCTCCGGCCCCGAATT
R4         TGGGGAAGATCGACGTATTCCAGTGACCGACATAGAGCCGTTTCGCGCTCCGGCCCCGAATT
HS2       TGGGGAAGATCGACGTATTCCAGTGACCGACATAGAGCCGTTTCGCGCTCCGGCCCCGAATT
F199      TGGGGAGGATCGACGTATTCCAGTGACCGACATAGAGCCGTTTCGCGCTCCGGCCCCGAATT
                * *** *****
LH128      TTTTCGCGAATTCGGCCCCGCGTCTGCTCGAGATATTTGACGTACCCGTCGCGCTTGACGT
R3         TTTTCGCGAATTCGGCCCCGCGTCTGCTCGAGATATTTGACGTACCCGTCGCGCTTGACGT
R4         TTTTCGCGAATTCGGCCCCGCGTCTGCTCGAGATATTTGACGTACCCGTCGCGCTTGACGT
HS2       TTTTCGCGAATTCGGCCCCGCGTCTGCTCGAGATATTTGACGTACCCGTCGCGCTTGACGT
F199      TTTTCGCGAATTCGGCCCCGCGTCTCCTCGAGATATTTGACGTACCCGTCGCGCTTGACGT
                *****
LH128      GGATCGCAGTCGCCGCATTATCGATCAGGCCAAACCCGTGGCCATGCCGCATGGTGAATT
R3         GGATCGCAGTCGCCGCATTATCGATCAGGCCAAACCCGTGGCCATGCCGCATGGTGAATT
R4         GGATCGCAGTCGCCGCATTATCGATCAGGCCAAACCCGTGGCCATGCCGCATGGTGAATT
HS2       GGATCGCAGTCGCCGCATTATCGATCAGGCCAAACCCGTGGCCATGCCGCATGGTGAATT
F199      GGATCGCAGTCGCCGCGTTATCGATCAGGCCAAACCCGTGGCCATGCCGCATGGTGAATT
                *****
LH128      GCAGACCAAGGTCGTCAAACGGCATGTTCGGCGCGATTGCCCGACAGGCCAGCCAGCTCGC
R3         GCAGACCAAGGTCGTCAAACGGCATGTTCGGCGCGATTGCCCGACAGGCCAGCCACCTCGC
R4         GCAGACCAAGGTCATCAAACGGCATGTTCGGCGCGATTGCCCGACAGGCCAGCCCGCTCGC
HS2       GCAGACCAAGGTCGTCAAACGGCATGTTCGGCGCGATTGCCCGACAGGCCAGCCAGCTCGC
F199      GCAGACCAAGGTCGTCAAACGGCATGTTCGGCGCGATTGCCCGACAGGCCAGCCAGCTCGC
                *****
LH128      CCCCGATCATCTGGAGAGCGGCGGCATGCGTCCAGCCCACGTGATACCCATCGCCGACGA
R3         CCCCGATCATCTGGAGAGCGGCGGCATGCGTCCAGCCCACGTGATACCCATCGCCGACGA
R4         CCCCGATCATCTGGAGAGCGGCGGCATGCGTCCAGCCCACGTGATACCCATCGCCGACGA
HS2       CCCCGATCATCTGGAGAGCGGCGGCATGCGTCCAGCCCACGTGATACCCATCGCCGACGA
F199      CCCCGATCATCTGGAGAGCGGCGGCATGCGTCCAGCCCACGTGATACCCATCGCCGACGA
                *****

```

LH128 AGT**T**CTCGGTCGGGACTTTCCAATTGCAGGCGAGGGTGCTTTTCAACGGCGGCCCGACCA  
R3 AGT**T**CTCGGTC-----  
R4 AGT**T**CTCGGTCGGGACTTTCCAATTGCAGGCGAGGGTGCTTTTCAACGG-----  
HS2 AGT**C**CTCGGTCGGGACTTTCCAATTGCAGGCGAGGGTGCTTTTCAACGGCGGCCCGACCA  
F199 AGT**T**CTCGGTCGGGACTTTCCAATTGCAGGCGAGGGTGCTCTTCAAVGGCGGCCCGAGCA  
\*\*\* \*\*\*\*\*

**Anexo 5: Alineamiento de las secuencias del gen *phnR* de *Burkholderia* sp.**

**RP007, MS3 y HR3p**

```

RP007      ATGAAGAAAATCGAATACCCGGGGAATGACGACTTACGCGGACTGGTCCG
HR3p      ATGAAGAAAATCGAATACCCGGGGAACGACGACTTACGCGGACTGGTCCG
MS3       ATGAAGAAAATCGAATACCCGGGGAATGACGACTTACGCGGACTGGTCCG
          *****
RP007      CTTCTCGACAGAGGACGGTCTGATCTGGCTGGGGGAGAGCCGGATGCTGC
HR3p      CTTCTCGACAGAAGACGGTCTGATCTGGCTGGGGGAGAGCCGGATGCTGC
MS3       CTTCTCAACAGAGGACGGTCTGATCTGGCTGGGGGAGAGCCGGATGCTGC
          *****
RP007      TGCTTCACGTCGCCACGATGGCAGGACTGCGCCGCGAGCTGATCTTGTCG
HR3p      TGCTTCACGTCGCCACGATGGCAGGACTGCGCCGCGAGCTGATCTTGTCG
MS3       TGCTTCACGTCGCCACGATGGCGGGACTGCGCCGCGAGCTGATCTTGTCA
          *****
RP007      GTAGGTATTGACGATGCGCGCCGGACCATCATCCGCATGGGGTATGAAGC
HR3p      GTAGGTATTGACGATGCGCGCCGGACCATCATCCGCATGGGGTATGAAGC
MS3       GTAGGTGTTGACGATGCGCGCCGGACCATCATCCGCATGGGGTATGAAGC
          *****
RP007      CGGTTTGCGCGACGCCGAGATCGTCCGAAGGATACGCAGGAACGACGACG
HR3p      CGGTTTGCGCGACGCCAAGATCGTGCGAAGGATACGCAGGAACGACGACG
MS3       CGGTTTGCGCGACGCCGAGATCGTGCGAAGGATACGCAGGAACGACGACG
          *****
RP007      ATCTCGACGCTTACATCGCCGGACCCCAACTTTTCATGCTCGAAGGGGGC
HR3p      ATCTCGACGCTTACATCGCCGGCCCCCAACTTTTCATGCTCGAAGGGGGC
MS3       ATCTCGACGCTTACATCGCCGGGCCCCAACTTTTCATGCTCGAAGGGGGC
          *****
RP007      GAACGTGTGTTTCCGCTGCGGGTCGAGATGGACGTGCCGAGCGGCAGCTT
HR3p      GAACGTGTGTTTCCGCTGCGGGTCGAGATGGACGTGCCGAGCGGCAGCTT
MS3       GAACGTGTGTTTCCGCTGCGGGTCGAGATGGACGTGCAGAGCGGCAGCTT
          *****
RP007      TTATGGCGAGTTTTCGCTCCGAGAATTCGTGGGAGGCGGAGTCTCATCTGC
HR3p      TTATGGCGAGTTTTCGCTCCGAGAATTCGTGGGAGGCGGAGTCTCATCTGC
MS3       TTACGGCGAGTTTTCGCTCCGAGAATTCGTGGGAGGCGGAGTCTCATCTGC
          ***
RP007      GCGAGTTCGGCCAGACCGACTACCCGGTGTGCTGGATGCGGGCAGGCTAC
HR3p      GCGAGTTCGGCCAGACCGACTACCCGGTGTGCTGGATGCGGGCAGGCTAC
MS3       GCGAGTTCGGCCAGACCGACTACCCGGTGTGCTGGATGCGGGCAGGCTAC
          *****
RP007      GCCTCAGGCTATACGTCTGGCTTTCTTGGTCGACAGGTGTTGATGAAGGA
HR3p      GCCTCAGGCTATACGTCTGGCTTTCTTGGTCGACAGGTGTTGATGAAGGA
MS3       GCCTCAGGCTATACGTCTGGCTTTCTTGGTCGACAGGTGTTGATGAAGGA
          *****
RP007      AATCGAATGCGCCGCCTGCGGTGCAGACCATTGCACGCTAGTGGGCAAAC
HR3p      AATCGAATGCGCCGCCTGCGGTGCAGACCATTGCACGCTAGTGGGTAAAC
MS3       AATCGAATGCGCCGCCTGCGGTGCAGACCATTGCACGCTAGTGGGCAAAC
          *****
RP007      CTGCCGAGGAATGGGAGGACGTGGAGGACTATGCGAGCTACTTCACGCCG
HR3p      CTGCCGAGGAATGGGAGGACGTGGAGGACTATGCGAGCTACTTCACGCCG
MS3       CTGCCGAGGAATGGGAGGACGAGGAGGACTATGCGAGCTACTTCACGCCG
          *****

```

**RP007** GAACAGGCTCCGAAAACCTCGACCCGCCGCGAG**GA**ACCCACAGCCGCACG  
**HR3p** GAACAGGCTCCGAAAACCTCGACCCGCCGCGAG**GA**ACCCACAGCCGCACG  
**MS3** GAACAGGCTCCGAAAACCTCGACCCGCCGCGAG**AG**CCACAGCCGCACG  
 \*\*\*\*\* \* \*\*\*\*\*

**RP007** CAATGGCGGCGTCATCCTCCCGGGCCTGGTTGGCCGCTCGGCGGG**T**TTTC  
**HR3p** CAATGGCGGCGTCATCCTCCCGGGCCTGGTTGGCCGCTCGGCGGG**T**TTTC  
**MS3** CAATGGCGGCGTCATCCTCCCGGGCCTGGTTGGCCGCTCGGCGGG**C**TTTC  
 \*\*\*\*\* \*\*\*\*

**RP007** GTCAAGCATGCGA**G**CTCATTGCCCGCGCGGG**G**TACCGACGTACCGGTG  
**HR3p** GTCAAGCATGCGA**G**CTCATTGCCCGCGCGGG**T**TACCGACGTACCGGTG  
**MS3** GTCAAGCATGCGA**C**CTCATTGCCCGCGCGGG**G**TACCGACGTACCGGTG  
 \*\*\*\*\*

**RP007** CTGCTGCTCGGCGAGACGGGAGT**T**GGCAAGGAACGCTTT**G**CCCGC  
**HR3p** CTGCTGCTCGGCGAGACGGGAGT**T**GGCAAGGAACGCTTT**G**CCCGC  
**MS3** CTGCTGCTCGGCGAGACGGGAGT**C**GGCAAGGAACGCTTT**T**CCCGC  
 \*\*\*\*\*

**RP007** GCACCAACTCAATCGGCGGCGCGATCAACCCTTCGTTGCGGTCAACTGCG  
**HR3p** GCACCAACTCAATCGGCGGCGCGATCAACCCTTCGTTGCGGTCAACTGCG  
**MS3** GCACCAACTCAATCGGCGGCGCGATCAACCCTTCGTTGCGGTCAACTGCG  
 \*\*\*\*\*

**RP007** CAGCGATCCCCATGAGCTGATTGAATCCGA**C**CTGTTCCGGTGTGCGAGAAG  
**HR3p** CAGCGATCCCCATGAGCTGATTGAATCCGA**T**CTGTTCCGGTGTGCGAGAAG  
**MS3** CAGCGATCCCCATGAGCTGATTGAATCCGA**C**CTGTTCCGGTGTGCGAGAAG  
 \*\*\*\*\*

**RP007** GGAGCCTATACCGGGG**C**TACGGCGTCACGCC**C**AGGCAA**G**TTTCGAGCGCGC  
**HR3p** GGAGCCTATACCGGGG**A**ACGGCGTCACGCC**C**AGGCAA**A**TTTCGAGCGCGC  
**MS3** GGAGCCTATACCGGGG**C**TACGGCGTCACGCC**G**AGGCAA**G**TTTCGAGCGCGC  
 \*\*\*\*\*

**RP007** CGACGGTGGCACCCTGTTTCTTGACGAGATCGGCGAGATGCC**G**CTCGCCG  
**HR3p** CGACGGTGGCACCCTGTTTCTTGACGAGATCGGCGAGATGCC**G**CTCGCCG  
**MS3** CGACGGTGGCACCCTGTTTCTTGACGAGATCGGCGAGATGCC**C**CTCGCCG  
 \*\*\*\*\*

**RP007** CCCAGGCCAA**G**CTATTGCGAGC**A**CTTCAGGAAGGCGAAATCGAGCG**G**CTT  
**HR3p** CCCAGGCCAA**A**CTATTGCGAGC**A**CTTCAGGAAGGCGAAATCGAGCG**A**CTT  
**MS3** CCCAGGCCAA**G**CTATTGCGAGC**G**CTTCAGGAAGGCGAAATCGAGCG**G**CTT  
 \*\*\*\*\*

**RP007** GGCGA**C**GAGCGCGTGCGCAAGGTGAACGTGCGGGTGGTCGCCGCCAC**C**AA  
**HR3p** GGCGA**T**GAGCGCGTGCGCAAGGTGAACGTGCGGGTGGTCGCCGCCAC**T**AA  
**MS3** GGCGA**C**GAGCGCGTGCGCAAGGTGAACGTGCGGGTGGTCGCCGCCAC**A**AA  
 \*\*\*\*\*

**RP007** CATCGATCTCAC**CC**AGGCAGTCAAGGATGGCCGCTTCCGTGCGGACCTGT  
**HR3p** CATCGATCTCAC**GT**AGGCAGTCAAGGATGGCCGCTTCCGTGCGGACCTGT  
**MS3** CATCGATCTCAC**CC**AGGCAGTCAAGGATGGCCGCTTCCGTGCGGACCTGT  
 \*\*\*\*\*

**RP007** TCTATCGCCTGTGCGTGT**T**CCGATCCACATCCCGCCACTGCGCGAGCGC  
**HR3p** TCTATCGCCTGTGCGTGT**T**CCGATCCACATCCCGCCACTGCGCGAGCGC  
**MS3** TCTATCGCCTGTGCGTGT**T**CCGATCCACATCCCGCCACTGCGCGAGCGC  
 \*\*\*\*\*

**RP007** CTCGCCGATCTGCAGCCGCTGATCGACACGCTA**G**TCGAGCGCTTCTCCGT  
**HR3p** CTCGCCGATCTGCAGCCGCTGATCGACACGCTA**G**TCGAGCGCTTCTCCGT  
**MS3** CTCGCCGATCTGCAGCCGCTGATCGACACGCTA**A**TCGAGCGCTTCTCCGT  
 \*\*\*\*\*

**RP007** GGTCCACAACAAACCGGTGCTTGGCGTTTCCGATATGGCTTTACGCCTGC  
**HR3p** GGTCCACAACAAACCGGTGCGTGGCGTTTCCGATATGGCTTTACGCCTGC  
**MS3** GGTCCACAACAAAGCCGGTGCCTGGCGTTTCCGATATGGCTTTACGCCTGC  
 \*\*\*\*\*

**RP007** TCAAGCGTTATACCTGGCCTGGCAACATCCGGGAGCTGGAAAACATGCTG  
**HR3p** TCAAGCGTTACACCTGGCCTGGCAACATCCGGGAGCTGGAAAACATGCTG  
**MS3** TCAAGCGTTACACCTGGCCTGGCAACATCCGGGAGCTGGAAAACATGCTG  
 \*\*\*\*\*

**RP007** GAGCGCGCAATGATCCTCGCACCCGAGGATGGCTGGATCGAAGCCGTCCA  
**HR3p** GAGCGCGCAATGATCCTCGCACCCGAGGATGGTGGATCGAAGCCGTCCA  
**MS3** GAGCGCGCAATAATCCTCGCACCCGAGGATGGCTGGATCGAAGCCGTCCA  
 \*\*\*\*\*

**RP007** CCTCTCCACCCCGCTGGAATCCGCACGGGCCGGCAGCAGTGGTATCGGCC  
**HR3p** CCTCTCCACCCCGCTGGAATCCGCACGGGCCGGCAGCAGTGGTATCGGCC  
**MS3** CCTCTCCACCCCGCTGGAATCCGCACGGGCCGGCAGCAGTGGTATCGGCC  
 \*\*\*\*\*

**RP007** GGACAGGAGCGCTCGAATCGGCAAGTGTGCGCAATCCGTCTCATCAGTCA  
**HR3p** GGACAGGAGCGCTCGAATCGGCAAGTGTGCGCAATCCGTCTCATCAGTCA  
**MS3** GGACAGGAGCGCTCGAATCGGCAAGTGTGCGCAATCCGTCTCATCAGTCA  
 \*\*\*\*\*

**RP007** CTGGTGGAGCACGTCCTGAACTCGGGGCTCTCGTTTCGAGGAACTTGAAC  
**HR3p** CTGGTGGAGCATGTCCTGAACTCGGGGCTCTCGTTTCGAGGAACTTGAAC  
**MS3** CTGGTGGAAACGTCCTAACTCGGGGCTCTCGTTTCGAGGAACTTGAAC  
 \*\*\*\*\* \*\* \* \* \*

**RP007** GCTGGTGTTCAGGAGTCGGTCAACCTTTCCGGTGGCAGCTTCGCCCGCG  
**HR3p** GCTGGTGTTCAGGAGTCGGTCAACCTTTCCGGCGGCAGCTTCGCCCGCG  
**MS3** GCTGGTGTTCAGGAGTCGGTCAACCTTTCCGGTGGCAGCTTCGCCCGCG  
 \*\*\*\*\*

**RP007** CCGCGCGTGCCTTGGGCATGACCAGCCACAGTTACGCTATCGACTTCGA  
**HR3p** CCGCGCGTGCCTTGGGCATGACCAGCCACAGTTACGCTATCGA-----  
**MS3** CCGCGCGTGCCTTGGGCATGACCAGCCACAGTTACGCTATCGACTTCGA  
 \*\*\*\*\*

**RP007** AAGCGCCAGGCAGCCACTCTCGGGCGCCGGAGCGCTGA  
**HR3p** -----  
**MS3** AAACGCCGGGCAGCCACTCTCGGGCGCCGGAGCGACTGA



## **BIBLIOGRAFÍA**





- Abril, M. A., Michan, C., Timmis, K. N., and Ramos, J. L.** 1989. Regulator and enzyme specificities of the TOL plasmid-encoded upper pathway for degradation of aromatic hydrocarbons and expansion of the substrate range of the pathway. *J. Bacteriol.* 171:6782-6790.
- Achouak, W., Conrod, S., Cohen, V., and Heulin, T.** 2004. Phenotypic variation of *Pseudomonas brassicacearum* as a plant root-colonization strategy. *Mol. Plant Microbe Interact.* 17:872-879.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W. Myers, E. W., and Lipman, D. J.** 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
- Anantharaman, V., Koonin, E. V., and Aravind, L.** 2001. Regulatory potential, phyletic distribution and evolution of ancient, intracellular small-molecule-binding domains. *J. Mol. Biol.* 307:1271-1292.
- Anderson, T. A., Guthrie, E. A., and Walton, B. T.** 1993. Bioremediation in the rhizosphere. *Environ. Sci. Technol.* 27:2630-2636.
- Andreote, F. D., Carneiro, R. T., Salles, J. F., Marcon, J., Labate, C. M., Azevedo, J. L., and Araújo, W. L.** 2009. Culture-independent assessment of rhizobiales-related alphaproteobacteria and the diversity of *Methilobacterium* in the rhizosphere and rhizoplane of transgenic *Eucalyptus*. *Microbial Ecol.* 57:82-93.
- Annweiler, E., Richnow, H. H., Antranikian, G., Hebenbrock, S., Garms, C., Franke, S., Franke, W., and Michaelis, W.** 2000. Naphthalene degradation and incorporation of naphthalene-derived carbon into biomass by the thermophile *Bacillus thermoleovorans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:518-523.
- Aprill, W., and Sims, R. C.** 1990. Evaluation of the use of prairie grasses for stimulating polycyclic aromatic hydrocarbon treatment in soil. *Chemosphere.* 20:253:265.
- Attila, C., Ueda, A., Cirillo, S. L. G., Chen, W., and Wood, T. K.** 2008. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 virulence factors and poplar tree response in the rhizosphere. *Microbial Biotechnol.* 1:17-29.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. F. Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K.** 1991. Current protocols in molecular biology. Greene Publishing Associated. New York, USA.
- Baas Becking, L. G. M.** 1934. Geobiologie of Inleiding tot de Milieukunde. The Hague, the Netherlands: Van Stockum & Zoon.
- Badalucco, L., and Nannipieri, P.** 2007. Nutrient transformation in the rhizosphere. In *The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the plant-soil interface*. Pinton, R., Varanini, Z., and Nannipieri, P. (eds.). CRC Press, New York, 111-133.
- Badri, D. V., Quintana, N., El Kassis, E. G., Kim, H. K., Choi, Y. H., Sugiyama, A., Verpoorte, R., Martinoia, E., Manter, D. K. and Vivanco, J. M.** 2009. An ABC transporter mutation alters root exudation of phytochemicals that provoke an overhaul of natural soil microbiota. *Plant Physiol.* 151:2006-2017.
- Baker, G. C., Smith, J. J., and Cowan, D. A.** 2003. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J. Microbiol. Methods.* 55:541-555).
- Barac, T., Taghavi, S., Borremans, B., Provoost, A., Oeyen, L., Colpaert, J. V., Vangronsveld, J., and van der Lelie, D.** 2004. Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile, organic pollutants. *Nature Biotech.* 22:583-588.
- Barr, M., East, A. K., Leonard, M., Mauchline, T. H., and Poole, P. S.** 2008. In vivo expression technology (IVET) selection of genes of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* A34 expressed in the rhizosphere. *FEMS Microbiol. Lett.* 282:219-227.
- Barrios, H., Valderrama, B., and Morett, E.** 1999. Compilation and analysis of sigma(54)-dependent promoter sequences. *Nucleic Acids Res.* 27:4305-4313.

- Bastiaens, L., Springael, D., Wattiau, P., Harms, H., deWachter, R., Verachtert H., and Diels, L.** 2000. Isolation of adherent polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading bacteria using PAH-sorbing carriers. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:1834-1843.
- Bender, C., Rangaswamy, V., and Loper, J.** 1999. Polyketide production by plant-associated pseudomonads. *Annu. Rev. Phytopathol.* 37:175-196.
- Bender, R. A.** 1991. The role of the NAC protein in the nitrogen regulation of *Klebsiella aerogenes*. *Mol. Microbiol.* 5:2575-2580.
- Berg, G., and Smalla, K.** 2009. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* 68:1-13.
- Bethesda Research Laboratories.** 1986. BRL pUC host: *E. coli* DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup> competent cells. *Bethesda Res. Lab. Focus.* 8:9-12.
- Böltner, D., Godoy, P., Muñoz-Rojas, J., Duque, E., Moreno-Morillas, S., Sánchez, L., and Ramos, J. L.** 2008. Rhizoremediation of lindane by root-colonizing *Sphingomonas*. *Microbial Biotech.* 1:87-93.
- Bonnier, G., and Layens, G.** 1988. Claves para la determinación de plantas vasculares. OMEGA. Barcelona, España.
- Boonchan, S., Britz, M. L., and Stanley, G. A.** 1998. Surfactant-enhanced biodegradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia*. *Biothechnol. Bioeng.* 59:482-494.
- Boonchan, S., Britz, M. L., and Stanley, G. A.** 2000. Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal bacterial cocultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:1007-1019.
- Bosch, R., García-Valdés, E., and Moore, E. R. B.** 1999. Genetic characterization and evolutionary implications of a chromosomally encoded naphthalene-degradation upper pathway from *Pseudomonas stutzeri* AN10. *Gene.* 236:149-157.
- Brazil, G. M., Kenefick, L., Callanan, M., Haro, A., de Lorenzo, V., Dowling, D. N., and O'Gara, F.** 1995. Construction of a rhizosphere *Pseudomonas* with potential to degrade polychlorinated biphenyls and detection of *bph* gene expression in the rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1946-1952.
- Broek, A. V., Lambrecht, M., and Vanderleyden, J.** 1998. Bacterial chemotactic motility is important for the initiation of wheat root colonization by *Azospirillum brasilense*. *Microbiol.* 144:2599-2606.
- Buck, M., Cannon, W., and Woodcock, J.** 1987. Transcriptional activation of the *Klebsiella pneumoniae* nitrogenase promoter may involve DNA loop formation. *Mol. Microbiol.* 1:243-249.
- Buck, M., and Cannon, W.** 1992a. Activator-independent formation of a closed complex between  $\sigma^{54}$ -holoenzyme and *nifH* and *nifU* promoters of *Klebsiella pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 6:1625-1630.
- Buck, M., and Cannon, W.** 1992b. Specific binding of the transcription factor  $\sigma^{54}$  to promoter DNA. *Nature.* 358:422-424.
- Buyer, J. S., Roberts, D. P., and Russek-Cohen, E.** 2002. Soil and plant effects on microbial community structure. *Can. J. Microbiol.* 48:955-964.
- Calvo-Revuelta, C., de la Fuente-Santiago, E., and Rodríguez-Vázquez, J. A.** 1999. Characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon in emissions from coal-fired power plants: the influence of operation parameters. *Environ. Technol.* 20:61-68.
- Campbell, R., and Greaves, M. P.** 1990. Anatomy and community structure of the rhizosphere. In *The Rhizosphere*. Lynch, J. M. (ed.) Chichester, UK: John Wiley & Sons. 11-34.
- Cane, P. A., and Williams, P. A.** 1986. A restriction map of naphthalene catabolic plasmid pWW60-1 and location of some of its catabolic genes. *J. Gen. Microbiol.* 132:2919-2929.

- Capdevila, S., Martínez-Granero, F. M., Sánchez-Contreras, M., Rivilla, R., and Martín, M.** 2004. Analysis of *Pseudomonas fluorescens* F113 genes implicated in flagellar filament synthesis and their role in competitive root colonization. *Microbiol.* 150:3889-3897.
- Cases, I., and de Lorenzo V.** 1998. Expression systems and physiological control of promoter activity in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 1:303-310.
- Cavaglieri, L., Orlando, J., and Etcheverry, M.** 2009. Rhizosphere microbial community structure at different maize plant growth stages and root locations. *Microbiol. Res.* 164:391-399.
- Cerniglia, C. E.** 1993. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Curr. Opin. Biotechnol.* 4:6224-6232.
- Chaudhry, Q., Blom-Zandstra, M., Gupta, S., and Joner, E. J.** 2005. Utilising the synergy between plants and rhizosphere microorganisms to enhance breakdown of organic pollutants in the environment. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 12:34-48.
- Chen, M. M., Zhu, Y. G., Su, Y. H., Chen, B. D., Fu, B. J., and Marschner, P.** 2006. Effects of soil mixture and plant interactions on the soil microbial community structure. *Eur. J. Soil Biol.* 43:31-38.
- Chen, S.-H., and Aitken, M. D.** 1999. Salicylate stimulates the degradation of high-molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas saccharophila* P15. *Environ. Sci. Technol.* 33:435-439.
- Chin-A-Woeng, T. F. C., Bloemberg, G. V., Mulders, I. H. M., Dekkers, L. C., and Lugtenberg, B. J. J.** 2000. Root colonization is essential for biocontrol of tomato foot and root rot by the phenazine-1-carboxamide-producing bacterium *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13:1340-45.
- Choi, K. H., Kumar, A., and Schweizer, H. P.** 2006. A 10 min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmids transformation. *J. Microbiol. Methods.* 64:391-397.
- Chu, H., Fierer, N., Lauber, C., Caporaso, J. G., Knight, R., and Grogan, P.** 2010. Soil bacterial diversity in the Arctic is not fundamentally different from that found in other biomes. *Environ. Microbiol.* 12:2998-3006.
- Clark, L.** 1995. Hydrocarbon pollution control and remediation of groundwater: a brief review. *Q. J. Eng. Geol. Hydrogeol.* 28:S93-S100.
- Coco, W. M., Rothmel, R. K., Henikoff, S., and Chakrabarty, A. M.** 1993. Nucleotide sequence and initial functional characterization of the *clcR* gene encoding a LysR family activator of the *clcABD* chlorocatechol operon in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 175:417-427.
- Coenye, T., and Vandamme, P.** 2003. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environ. Microbiol.* 5:719-729.
- Cohen, M. F., Williams, J., and Yamasaki, H.** 2002. Biodegradation of diesel fuel by an *Azolla*-derived bacterial consortium. *J. Environ. Sci. Health Part A Toxic-Hazard Subst. Environ. Eng.* 37:1593-1606.
- Cohen, S., Chang, A. C. Y., and Hsu, L.** 1972. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-Factor DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 69:2110-2114.
- Colleran, E.** 1997. Uses of bacteria in bioremediation. In *Methods in Biotechnology, Vol 2. Bioremediation Protocols*. Sheehan, D. (ed.) Totowa, NJ, USA: Human Press.
- Costa, R. Gotz, M., Mrotzek, N., Lottmann, J. Berg, G. and Smalla, K.** 2006. Effects of site and plant species on rhizosphere community structure as revealed by molecular analysis of microbial guilds. *FEMS Microbiol. Ecol.* 56:236-249.
- Crump, B. C., Hopkinson, C. S., Sogin, M. L., and Hobbie, J. E.** 2004. Microbial biogeography along a near estuarine salinity gradient: combined influences of bacterial growth and residence time. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:1494-1505.

- Cui, C. Z., Zeng, C., Wan, X., Chen, D., Zhang, J. Y., and Shen, P.** 2008. Effect of rhamnolipids on the degradation of anthracene by two newly isolated strains, *Sphingomonas* sp. 12A and *Pseudomonas* sp. 12B. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18:63-66.
- Cunningham, S. D., and Ow, D. W.** 1996. Promises and prospects of phytoremediation. *Plant Physiol.* 110:715-719.
- Daane, L. L., Harjono, I., Zylstra, G. J., and Häggblom, M.M.** 2001. Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria associated with the rhizosphere of salt marsh plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:2683-2691.
- Dakora F. D., and Phillips, D. A.** 2002. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant Soil.* 245:35-47.
- Dandie, C. E., Thomas, S. M., Bentham, R. H., and McClure, N. C.** 2004. Physiological characterization of *Mycobacterium* sp. strain 1B isolated from a bacterial culture able to degrade high-molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Appl. Microbiol.* 97:246-255.
- Dandurand, L. M., Schotzko, D. J., and Knudsen, G. R.** 1997. Spatial patterns of rhizoplane populations of *Pseudomonas fluorescens*. *App. Env. Microbiol.* 63:3211-3217.
- Danhorn, T., and Fuqua, C.** 2007. Biofilm formation by plant associated bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 61:401-422.
- Darrah, P. R., and Roose, T.** 2007. Modeling the rhizosphere. In *The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the plant-soil interface*. Pinton, R., Varani ni, Z., and Nannipieri, P. (eds.). CRC Press, New York. 331-370.
- Darsonval, A., Darrasse, A., Durand, K., Bureau, C., Cesbron, S., and Jacques, M. A.** 2009. Adhesion and fitness in the bean phyllosphere and transmission to seed of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 22:747-757.
- de Ridder-Duine, A. S., Kowalchuk, G. A., Klein-Gunnewiek, P. J. A., Smant, W., Van Veen, J. A., and De Boer, W.** 2005. Rhizosphere bacterial community composition in natural stands of *Carex arenaria* (sand sedge) is determined by bulk soil community composition. *Soil Biol. Biochem.* 37:349-357.
- De Weert, S., Vermeiren, H., Mulders, I. H. M., Kuiper, I., Hendrickx, N., Bloemberg, G. V., Vanderleyden, J., De Mot, R., and Lugtenberg, B. J. J.** 2002. Flagella-driven chemotaxis towards exudate components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 15:1173-1180.
- de Weger, L. A., van der Vlugt, C. I., Wijffjes, A. H., Bakker, P. A., Schippers, B., and Lugtenberg, B. J. J.** 1987. Flagella of a plant growth stimulating *Pseudomonas fluorescens* strain are required for colonization of potato roots. *J. Bacteriol.* 169:2769-2773.
- DeFlaun, M. F., Tanzer, A. S., McAteer, A. L., Marshall, B., and Levy, S. D.** 1990. Development of an adhesion assay and characterization of an adhesion-deficient mutant of *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:112-119.
- DeFlaun, M. F., Marshall, B. M., Kulle, E. P. and Levy, S. B.** 1994. Tn5 insertion mutants of *Pseudomonas fluorescens* defective in adhesion to soil and seeds. *Appl. Env. Microbiol.* 60:2637-2642.
- Dekkers, L. C., Phoelich, C. C., van der Fits, L., and Lugtenberg, B. J. J.** 1998a. A site-specific recombinase is required for competitive root colonization by *Pseudomonas fluorescens* WCS365. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:7051-7056.
- Dekkers, L. C., Van Der Bij, A. J., Mulders, I. H. M., Phoelich, C. C., Wentwoord, R. A. R., Glandorf, D. C. M., Wijffelman, C. A., and Lugtenberg, B. J. J.** 1998b. Role of the O-antigen of lipopolysaccharide, and possible roles of growth rate of NADH:ubiquinone oxidoreductase (nuo) in competitive tomato root-tip colonization by *Pseudomonas fluorescens* WCS365. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 11:763-71.
- Demanèche, S., Meyer, C., Micoud, J., Louwagie, M., Willison, J. C., and Jouanneau.** 2004. Identification and functional analysis of two aromatic-ring-hydroxylating dioxygenases

- from *Sphingomonas* strain that degrades various polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:6714-6725.
- Dennis, P. F., Miller, A. J. and Hirsch, P. R.** 2010. Are root exudates more important than other sources of rhizodeposits in structuring rhizosphere bacterial communities?. *FEMS Microbiol. Ecol.* 72: 313-327.
- Denome, S. A., Stanley, D. C., Olson, E. S., and Young, K. D.** 1993. Metabolism of dibenzothiophene and naphthalene in *Pseudomonas* strains: complete DNA sequences of an upper naphthalene catabolic pathway. *J. Bacteriol.* 175:6890-6901.
- Desai, A. M., Autenrieth, R. L., Dimitriou-Christidis, P., and McDonald, T. J.** 2008. Biodegradation kinetics of select polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) mixtures by *Sphingomonas paucimobilis* EPA505. *Biodegradation.* 19:223-233.
- Desnoues, N., Lin, M., Guo, X., Ma, L., Carreno-Lopez, R., and Elmerich, C.** 2003. Nitrogen fixation genetics and regulation in a *Pseudomonas stutzeri* strain associated with rice. *Microbiol.* 149:2251-2262.
- Devos, O., Combet, E., Tassel, P., and Paturel L.** 2006. Exhaust emissions of PAHs of passenger cars. *Polycycl. Aromat. Compd.* 26:69-78.
- Di Gennaro, P., Rescalli, E., Galli, E., Sello, G., and Bestetti, G.** 2001. Characterization of *Rhodococcus opacus* R7, a strain able to degrade naphthalene and *o*-xylene isolated from a polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil. *Res. Microbiol.* 152:641-651.
- Díaz, E., and Prieto, M. A.** 2000. Bacterial promoters triggering biodegradation of aromatic pollutants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11:467-475.
- Dixon, R.** 1986. The *xyIABC* promoter from the *Pseudomonas putida* TOL plasmid is activated by nitrogen regulatory genes in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 203:129-136.
- Donnelly, P.K., Hegde, R. S., and Fletcher, J. S.** 1994. Growth of PCB-degrading bacteria on compounds from photosynthetic plants. *Chemosphere.* 28:981-988.
- Dörr, J., Hurek, R., and Reinhold-Hured, B.** 1998. Type IV pili are involved in plant-microbe and fungus-microbe interactions. *Mol. Microbiol.* 30:7-17.
- Doty, S. L., Shang, T. Q., Wilson, A. M., Tangen, J., Westergreen, A. D., Newman, L. A., Strand, S. E., and Gordon, M. P.** 2000. Enhanced metabolism of halogenated hydrocarbons in transgenic plants containing mammalian cytochrome P450 2E1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:6287-6291.
- Doty, S. L.** 2008. Enhancing phytoremediation through the use of transgenic and endophytes. *New Phytol.* 179:318-333.
- Duineveld, B. M., Kowalchuk, G. A., Keijzer, A., van Elsas, J. D., and van Veen, J. A.** 2001. Analysis of bacterial communities in the rhizosphere of chrysanthemum via denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rRNA as well as DNA fragments coding of 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:172-178.
- Dunn, N. W., and Gunsalus, I. C.** 1973. Transmissible plasmids encoding early enzymes of naphthalene oxidation in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 114:974-979.
- Efroymsen, R., and Alexander, M.** 1991. Biodegradation by an *Arthrobacter* species of hydrocarbons partitioned into an organic solvent. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1441-1447.
- Espinosa-Urgel, M., Salido, M., and Ramos, J. L.** 2000. Genetic analysis of functions involved in adhesion of *Pseudomonas putida* to seeds. *J. Bacteriol.* 182:2363-2369.
- Espinosa-Urgel, M., Kolter, R., and Ramos, J. L.** 2002. Root colonization by *Pseudomonas putida*: love at first sight. *Microbiol.* 148: 341-343.
- Fellay, R., Frey, J., and Krisch, H.** 1987. Interposon mutagenesis of soil and water bacteria: a family of DNA fragments designed for in vitro insertional mutagenesis of gram-negative bacteria. *Gene.* 52:147-154.

- Felske, A., Wolterink, A., van Lis, R., de Vos, W. M., and Akkermans, A. D.** 2000. Response of a soil bacterial community to grassland succession as monitored by 16S rRNA levels of the predominant ribotypes. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3998-4003.
- Fenchel, T.** 2003. Biogeography for bacteria. *Science.* 301: 925-926.
- Fernández, P., Vilanova, R. M., Martínez, C., Appleby, and Grimalt, J. O.** 2000. The historical record of atmospheric pyrolytic pollution over Europe registered in the sedimentary PAH from remote mountain lakes. *Env. Sci. Technol.* 34:1906-1913.
- Ferris, M. J., Muyzer, G., and Ward, D. M.** 1996. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:340-346.
- Fierer, N., and Jackson, R. B.** 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103:626-631.
- Filion, M., Hamelin, R. C., Bernier, L., and St-Arnaud, M.** 2004. Molecular profiling of rhizosphere microbial communities associated with healthy and diseased black spruce (*Picea mariana*) seedling grown in a nursery. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:3541-3551.
- Finlay, B. J., and Clarke, K. J.** 1999. Ubiquitous dispersal of microbial species. *Nature.* 400:828-828.
- Fisher, S. G., and Lerman, L. S.** 1979. Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis. *Cell.* 16:191-200.
- Foster, R. C.** 1988. Microenvironments of soil microorganism. *Biol. Fertil. Soils.* 6:189-203.
- Franklin, F. C. H., Bagdasarian, M., Bagdasarian, M. M., and Timmis, K. N.** 1981. Molecular and functional analysis of the TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida* and cloning of genes for the entire regulated aromatic ring meta-cleavage pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:7458-7462.
- Franzetti, A., Caredda, P., Ruggeri, C., Colla, P. L., Tamburini, E., Papacchini, M., and Bestetti, G.** 2009. Potential applications of surface active compounds by *Gordonia* sp. strain BS29 in soil remediation technologies. *Chemosphere.* 75:801-807.
- Fredrickson, J. K., Brockman, F. J., Workman, D. J., Li, S. W., and Stevens, T. O.** 1991. Isolation and characterization of a subsurface bacterium capable of growth on toluene, naphthalene, and other aromatic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:796-803.
- Fredrickson, J. K., Balkwill, D. L., Drake, G. R., Romine, M. F., Ringelberg, D. B., and White, D. C.** 1995. Aromatic-degrading *Sphingomonas* isolates from the deep subsurface. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1917-1922.
- Freeman, D. J., and Cattell, F. C. R.** 1990. Woodburning as a source of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ. Sci. Technol.* 24:1581-1585.
- French, C. E., Rosser, S. J., Davies, G. J., Nicklin, S., and Bruce N. C.** 1999. Biodegradation of explosives by transgenic plants expressing pentaerythritol tetranitrate reductase. *Nat. Biotechnol.* 17:491-494.
- Fulthorpe, R. R., Roesch, L. F. W., Riva, A., and Triplett, E. W.** 2008. Distantly sampled soils carry few species in common. *The ISME J.* 2:901-910.
- Gamalero, E., Lingua, G., Tombolini, R., Avidano, L., Pivato, B., and Berta, G.** 2005. Colonization of tomato root seedling by *Pseudomonas fluorescens* 92rkG5: spatio-temporal dynamics, localization, organization, viability, and culturability. *Microbiol. Ecol.* 50:289-297.
- García-Junco, M., De Olmedo, E., Ortega-Calvo, J. J.** 2001. Bioavailability of solid and non-aqueous phase liquid (NAPL)-dissolved phenanthrene to the biosurfactant-producing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* 19SJ. *Environ. Microbiol.* 3:561-569.
- García-Junco, M., Gomez-Lahoz, C., Niqui-Arroyo, J. L., and Ortega-Calvo, J. J.** 2003. Biosurfactant- and biodegradation-enhanced partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons from nonaqueous-phase liquids. *Environ. Sci. Technol.* 37:2988-2996.

- Geiselbrecht, A. D., Hedlund, B. P., Tichi, M. A., and Staley, J. T.** 1998. Isolation of marine polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading *Cycloclasticus* strains from the Gulf of Mexico and comparison of their PAH degradation ability with that of Puget sound *Cycloclasticus* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4703-4710.
- Gibson, D. T., Roberts, R. L., Wells, M. C., and Koval, V. M.** 1973. Oxidation of biphenyl by a *Beijerinckia* species. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 50:211-219.
- Gilbert, E. S., and Crowley, D. E.** 1997. Plant compounds that induce polychlorinated biphenyl biodegradation by *Arthrobacter* sp. strain B1B. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1933-1038.
- Goldstein, R. M., Mallory, L. M., and Alexander, M.** 1985. Reasons for possible failure of inoculation to enhance biodegradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 50:977-983.
- Gopishetty, S. R., Heinemann, J., Deshpande, M., Rosazza, J. P. N.** 2007. Aromatic oxidations by *Streptomyces griseus*: biotransformations of naphthalene to 4-hydroxy-1-tetralone. *Enzyme Microb. Tech.* 40:1622-1626.
- Gralla, J. D.** 1996. Activation and repression of *E. coli* promoters. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 6:526-530.
- Gransee, A., and Wittenmayer, L.** 2000. Qualitative and quantitative analysis of water-soluble root exudates in relation to plant species and development, *J. Plant. Nut. Soil Sci.* 163:381-385.
- Grayston, S. J., and Campbell, C. D.** 1996. Functional biodiversity of microbial communities in the rhizosphere of hybrid larch (*Larix eurolepis*) and sitka spruce (*Picea sitchensis*). *Tree Physiol.* 16:1031-1038.
- Grosser, R. J., Warshawsky, D., Vestal, J. R.** 1991. Indigenous and enhanced mineralization of pyrene, benzo[a]pyrene and carbazole in soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:3462-3469.
- Haas, D., and Défago, G.** 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat. Rev. Microbiol.* 3:307-319.
- Habe, H., and Omori, T.** 2003. Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67:225-243
- Haichar, F. Z., Marol, C., Berge, O., Rangel-Castro, J. I., Prosser, J. I., Balesdent, J., Heulin, T. and Achouak, W.** 2008. Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *The ISME J.* 2:1221-1230.
- Hammer, O., Harper, D. A. T., and Ryan, P. D.** 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol. Electron.* 4:1-9.
- Hanahan, D.** 1983. Studies on the transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166:557-580.
- Hanahan, D.** 1985. Techniques for transformation of *E. coli*. In *DNA cloning: a practical approach*, vol. 1. Glover, D. M. (ed.). IRL Press, Oxford.
- Handelsman, J., and Stabb, E. V.** 1996. Biocontrol of soil-borne plant pathogens. *Plant Cell.* 8:1855-1869.
- Hartmann, A., Schmid, M., van Tuinen, D and Berg, G.** 2009. Plant-driven selection of microbes. *Plant Soil.* 321:235-257.
- Hawkes, C. V., De Angelis, K. M., and Firestone, M. K.** 2007. Root interactions with soil microbial communities and processes. In *The rhizosphere: an ecological perspective*. Cardon, Z. and Whitbeck, J. (eds.). Elsevier Academic Press, New York. 1-31.
- Head, M.** 1998. Bioremediation: towards a credible technology. *Microbiology.* 144:599-608.
- Hedlund, B. P., Geiselbrecht, A. D., Bair, T. J., and Staley, J. T.** 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by a new marine bacterium, *Neptunomonas naphthovorans*. gen. nov. sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:251-259.
- Henry, S., Texier, S., Hallet, S., Bru, D., Dambreville, C., Chèneby, D., Bizouard, F., Germon, J. C., and Philippot L.** 2008. Disentangling the rhizosphere effect on nitrate



- reducers and denitrifiers: insight into the role of root exudates. *Environ. Microbiol.* 10:3082–3092.
- Hiltner, L. 1904. Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiete der Bodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und Brache. *Arb. DLG.* 98:59-78.
- Hinsinger, P., Plassard, C., Tang, C., and Jaillard, B. 2003. Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: a review. *Plant Soil.* 248:43-59.
- Hoagland, R. E., Zablutowicz, R. M., and Locke, M. A. 1994. Propionil metabolism by rhizosphere microflora. In *Bioremediation through rhizosphere technology*. Anderson, T. A., and Coats, J. R. (eds.). American Chemical Society, Washington, D. C. 160-183.
- Højberg, O., and Sorensen, J. 1993. Microgradients of microbial oxygen consumption in a barley rhizosphere model system. *App. Env. Microbiol.* 59:431-437.
- Højberg, O., Schnider, U., Winteler, H. V., Sorensen, J., and Haas, D. 1999. Oxygen-sensing reporter strain of *Pseudomonas fluorescens* for monitoring the distribution of low-oxygen habitats in soil. *App. Env. Microbiol.* 65:4085-4093.
- Holguin, G., and Bashan, Y. 1996. Nitrogen-fixation by *Azospirillum brasilense* CD is promoted when co-cultured with a mangrove rhizosphere bacterium (*Staphylococcus* sp.). *Soil Biol. Biochem.* 28:1651-1660.
- Hooper, D. U., Chapin, F. S., Ewel, J. J., Hector, A., Incausti, P., Lavorel, S., Lawton, J. H., Lodge, D. M., Loreau, M., Naeem, S., Schmid, B., Setälä, H., Symstad, A. J., Vandermeer, J., and Wardle, D. A. 2005. Effects of biodiversity on ecosystem functioning: a consensus of current knowledge. *Ecol. Monog.* 75:3.35.
- Houlden, A., Timms-Wilson, T. M., Day, M. J., and Bailey, M. J. 2008. Influence of plant development stage on microbial community structure and activity in the rhizosphere of three field crops. *FEMS Microbiol. Ecol.* 65:193-201.
- Hozore, E., and Alexander, M. 1991. Bacterial characteristic important to rhizosphere competence. *Soil Biol. Biochem.* 23:717-723.
- Hubert C., Loy, A., Nickel, M., Arnosti, C., Baranyi, C., Bruchert, V., Ferdelman, T., Finster, K., Flemming M. C., de Rezende J. R., Vandieken, V., and Bo, B. J. 2009. A constant flux of diverse thermophilic bacteria into the cold arctic seabed. *Science.* 325:1541-1544.
- Hughes, J. B., Shanks, J., Vanderford, M., Lauritzen, J., and Bhadra, R. 1997. Transformation of TNT by aquatic plants and plant tissue cultures. *Environ. Sci. Technol.* 31:266-271.
- Ieva, R., Alaimo, C., Delany, I., Spohn, G., Rappuoli, R., and Scarlato, V. 2005. CrgA is an inducible LysR-type regulator of *Neisseria meningitidis*, acting both as a repressor and as an activator of gene transcription. *J. Bacteriol.* 187:3421-3430.
- Inouye, S., Nakazawa, A., and Nakazawa, T. 1987. Expression of the regulatory gene *xyIS* on the TOL plasmid is positively controlled by the *xyIR* gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:5182-5186.
- Ishikawa, C. M., and Bledsoe, C. S. 2000. Seasonal and diurnal patterns of soil water potential in the rhizosphere of blue oaks: Evidence for hydraulic lift. *Oecol.* 125:459-465.
- Jacobsen, C. S. 1997. Plant protection and rhizosphere colonization of barley by seed inoculated herbicide degrading *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia* DBO1 (pRO101) in 2,4-D contaminated soil. *Plant Soil.* 189:139-144.
- Jones, D. L. 1998. Organic acids in the rhizosphere – a critical review. *Plant Soil.* 205:25-44.
- Jones, R. M., Pagmantidis, V., Williams, P. A. 2000. *sal* genes determining the catabolism of salicylate esters are part of a supraoperonic cluster of catabolic genes in *Acinetobacter* sp. strain ADP1. *J. Bacteriol.* 182:2018-2025.

- Jukes, T. H., and Cantor, C. R.** 1969. Evolution of protein molecules. In *Mammalian protein metabolism*. Munro, H. N. (ed.). Academic Press, New York. 21-132.
- Jussila, M. M., Jurgens, G., Linström, K., and Suominen, L.** 2006. Genetic diversity of culturable bacteria in oil-contaminated rhizosphere of *Galega orientalis*. *Environ. Pollut.* 139:244-257.
- Kallimanis, A., Frillingos, S., Drinas, C., and Koukkou, A. I.** 2007. Taxonomic identification, phenanthrene uptake activity, and membrane lipid alterations of the PAH-degrading *Arthrobacter* sp. strain Sphe3. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76:709-717.
- Kamath, R., Schnoor, J. L., and Alvarez, P. J. J.** 2004. Effect of root-derived substrates on the expression of *nah-lux* genes in *Pseudomonas fluorescens* HK44: Implications for PAH biodegradation in the rhizosphere. *Environ. Sci. Technol.* 38:1740-1745.
- Kamilova, F., Kravchenko, L. V., Shaposhnikov, A. I., Makarova, N., and Lugtenberg, B. J. J.** 2006. Effects of the tomato pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* and of the biocontrol bacterium *Pseudomonas fluorescens* WCS365 on the composition of organic acids and sugars in tomato root exudate. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 19:1121-6.
- Kämper, J., Kahmann, R., Bölker, M., Ma, L.-J., Brefort, T., Saville, B. J. et al.** 2006. Insight from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature.* 444:97-101.
- Karavangeli, M., Labrou, N. E., Clonis, Y. D., and Tsaftaris, A.** 2005. Development of transgenic tobacco plants overexpressing maize glutathione S-transferase I for chloroacetanilide herbicides phytoremediation. *Biomol. Eng.* 22:121-128.
- Karlsson, A., Parales, J. V., Parales, R. E., Gibson, D. T., Eklund, H., and Ramaswamy, S.** 2003. Crystal structure of naphthalene dioxygenase: side-on binding of dioxygen to iron. *Science.* 299:1039-1042.
- Kästner, M., Breuer-Jammali, M., and Mahro, B.** 1994. Enumeration and characterization of the soil microflora from hydrocarbon-contaminated soil sites able to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41:267-273.
- Kästner, M.** 2000. Degradation of aromatic and polycyclic aromatic compounds. In *Environmental processes II: soil decontamination, biotechnology*. Rehm, H. J., Reed, G., Pühler, A., and Stadler, P., (eds.). Wiley, New York.
- Keck, J., Sims, R. C., and Coover, M.** 1989. Evidence for cooxidation of polynuclear aromatic hydrocarbons in soil. *Water. Res.* 23:1467-1476.
- Keith, L. H., and Telliard, W. A.** 1979. Priority pollutants I – a perspective view. *Environ. Sci. Technol.* 13:416-423.
- Kelley, I., Freeman, J. P., Evans, F. E., and Cerniglia, C. E.** 1993. Identification of metabolites from the degradation of fluoranthene by *Mycobacterium* sp. strain PYR-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:800-806.
- Kelley, S. L., Aitchison, E. W., Deshpande, M., Schnoor, J. L., and Alvarez, P. J.** 2001. Biodegradation of 1,4-dioxane in planted and unplanted soil: effect of bioaugmentation with *Amycolata* sp. CB1190. *Water Res.* 35:3791-3800.
- Kent, A. D., and Triplett, E. W.** 2002. Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. *Annu. Rev. Microbiol.* 56:211-236.
- Keuth, S., and Rehm, H.-J.** 1991. Biodegradation of phenanthrene by *Arthrobacter polychromogenes* isolated from a contaminated soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34:804-808.
- Khalili, N. R., Scheff, P. A., and Holsen, T. M.** 1995. PAH source fingerprint for coke ovens, diesel and gasoline engines, highway tunnels and wood combustion emissions. *Atmos. Environ.* 29:533-545.
- Kiely, P. D., Haynes, J. M., Higgins, C. H., Franks, A., Mark, G. L., Morrissey, J. P., and O’Gara, F.** 2006. Exploiting new systems-based strategies to elucidate plant-bacterial interactions in the rhizosphere. *Microbiol. Ecol.* 51:257-266.

- Kierek-Pearson, K., and Karatan, E.** 2005. Biofilm development in bacteria. *Adv. Appl. Microbiol.* 57:79-111.
- Kim, E., and Zylstra, G. J.** 1999. Functional analysis of genes involved in biphenyl, naphthalene, phenanthrene and *m*-xylene degradation by *Sphingomonas yanoikuyae* B1. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 23:294-302.
- Kim, E. J., Oh, J. E., and Chang, Y. S.** 2004. Effects of forest fire on the level and distribution of PCFF/Fs and PAHs in soil. *Sci. Total. Environ.* 311:177-189.
- Kim, S., Chun, J., Bae, K. S., and Kim, Y.** 2000. Polyphasic assignment of an aromatic-degrading *Pseudomonas* sp., strain DJ77, in the genus *Sphingomonas* as *Sphingomonas chungbukensis* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50:1641-1647.
- Kim, S. J., Kweon, O., Jones, R. C., Edmondson, R. D., and Cerniglia, C. E.** 2008. Genomic analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons degradation in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Biodegradation.* 19:859-881.
- Kim, T. J., Lee E.Y., Kim, Y. J., Cho, K. S., and Ryu, H. W.** 2003. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Burkholderia cepacia* 2A-12. *World J. Microb. Biot.* 19:411-417.
- Kingsley, M. T., Frederickson, J. K., Metting, F. B., and Seidler, R. J.** 1994. Environmental restoration using plant-microbe bioaugmentation. In *Bioremediation of chlorinated and polyaromatic hydrocarbons compounds*. Hinchee, R. E., Leeson, A., Semprini, R., and Ong, S. K. (eds.). Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA. 287-292.
- Kiyohara, H., Nagao, K., and Yana, K.** 1982. Rapid screen for bacteria degrading water-insoluble, solid hydrocarbons on agar plates. *Appl. Environ. Microbiol.* 43 (2): 454-457.
- Kohler, T., Harayama, S., Ramos, J. L., and Timmis, K. N.** 1989. Involvement of *Pseudomonas putida* RpoN sigma factor in regulation of various metabolic functions. *J. Bacteriol.* 171:4326-4333.
- Kowalchuk, G. A., Stephen, J. R., De Boer, W., Prosser, J. I., Embley, T. M., and Woldendorp, J. W.** 1997. Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class Proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:1489-97.
- Kowalchuk, G. A., Buma, D. S., De Boer, W., Klinkhamer, P. G. L., and van Veen, J. A.** 2002. Effects of above-ground plant species composition and diversity on the diversity of soil-borne microorganisms. *Anton. Leeuw.* 81:509-520.
- Krisch, H. M., and Selzer, G.** 1981. Construction and properties of a recombinant plasmid containing gene 32 of bacteriophage T4D. *J. Mol. Biol.* 148: 199-218.
- Kuiper, I., Bloemberg, G. V., and Lugtenberg, B. J. J.** 2001. Selection of a plant-bacterium pair as a novel tool for rhizostimulation of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 14:1197-1205.
- Kuiper, I., Lagendijk, E. L., Bloemberg, G. V., and Lugtenberg, B. J. J.** 2004a. Rhizoremediation: a beneficial plant-microbe interaction. *Mol. Plant Microbe. Interact.* 17:6-15.
- Kuiper, I., Lagendijk, E. L., Pickford, R., Derrick, J. P., Lamers, G. E. M., Thomas-Oates, J. E., Lugtenberg B. J. J., and Bloemberg G. V.** 2004b. Characterization of two *Pseudomonas putida* lipopeptide biosurfactants, putisolvin I and II, which inhibit biofilm formation and break down existing biofilms. *Mol. Microbiol.* 51:97-113.
- Kulakov, L. A., Allen, C. C. R., Lipscomb, D. A., and Larkin, M. J.** 2000. Cloning and characterization of a novel *cis*-naphthalene dihydrodiol dehydrogenase gene (*narB*) from *Rhodococcus* sp. NCIMB12038. *FEMS Microbiol. Lett.* 182:327-331.
- Kurkela, S., Lehtväslaiho, H., Palva, E. T., and Teeri, T. H.** 1988. Cloning, nucleotide sequence and characterization of genes encoding naphthalene dioxygenase of *Pseudomonas putida* strain NCIB9816. *Gene.* 73:355-362.

- Kuske, C. R., Barns, S. M., and Busch, J. D. 1997. Diverse uncultivated bacterial groups from soils of the arid south western United States that are present in many geographic regions. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:3614-3621.
- Lam, J. S., Matewish, M., and Poon, K. K. H. 2004. Lipopolysaccharides of *Pseudomonas aeruginosa*. In *Pseudomonas: biosynthesis of macromolecules and molecular metabolism*. Ramos, J. L. (ed.) Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, Vol III. 3-51.
- Laubert, C. L., Hamady, M., Knight, R. and Fierer, N. 2009. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:5111-5120.
- Laurie, A. D., and Lloyd-Jones, G. 1999. The *phn* genes of *Burkholderia* sp. strain RP007 constitute a divergent gene cluster for polycyclic aromatic hydrocarbon catabolism. *J. Bacteriol.* 181:531-540.
- Law, R. J., and Hellou, J. 1999. Contamination of fish and shellfish following oil spill incidents. *Environ. Geosci.* 6:90-98.
- Leveau, J. H., and van der Meer, J. R. 1996. The *tfdR* gene product can successfully take over the role of the insertion element-inactivated TfdT protein as a transcriptional activator of the *tfdCDEF* gene cluster, which encodes cholorocatechol degradation in *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4). *J. Bacteriol.* 178:6824-6832.
- Liste, H. H., and Alexander, M. 2000. Plant-promoted pyrene degradation in soil. *Chemosphere.* 40:7-10.
- Liu, Q., and Bender, R. A. Complex regulation of urease formation from the two promoters of the *ure* operon of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 189:7593-7599.
- Llamas, M. A., Rodríguez-Herva, J. J., Hancock, R. E. W., Bitter, W., Tommassen, J., and Ramos, J. L. 2003. Role of *Pseudomonas putida* *tol-oprL* gene products in uptake of solutes through the cytoplasmic membrane. *J. Bacteriol.* 185:4707-4716.
- Lohmann, R., Northcott, G. L., and Jones, J. C. 2000. Assessing the contribution of diffuse domestic burning as a source of PCDD/Fs and PAHs to the UK atmosphere. *Environ. Sci. Technol.* 34:2892-2899.
- Lönneborg, R., Smirnova, I., Dian, C., Leonard, G. A., and Brzezinski, P. 2007. In vivo and in vitro investigation of transcriptional regulation by DntR. *J. Mol. Biol.* 372:571-82.
- Loreau, M., Nacem, S., Inchausit, P., Bengtsson, J., Grime, J. P., Hector, A., Hooper, D. U., Huston, M. A., Raffaelli, D., Schmid, B., Tilma, D. and Wardle, D. A. 2001. Biodiversity and ecosystem functioning: current knowledge and future challenges. *Science.* 294:804-808.
- Lozupone, C. A., and Knight, R. 2007. Global patterns in bacterial diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104:11436-11440.
- Ludwig, W., Strunk O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar, Buchner, A., Lai, T., Steppi, S., Jobb, G., Forster, W., Brettske, I., Gerber, S., Ginhart, A. W., Gross, O., Grumann, S., Hermann, S., Jost, R., König, A., Liss, T., Lussmann, R., May, M., Nonhoff, B., Reichel, B., Strehlow, R., Stamatakis, A., Stuckmann, N., Vilbig, A., Lenke, M., Ludwig, T., Bode, A., and Schleifer, K. H. 2004. ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res.* 32:1363-1371.
- Lugtenberg, B. J. J., and Dekkers, L. C. 1999. What makes *Pseudomonas* bacteria rhizosphere competent?. *Environ. Microbiol.* 1:9.13.
- Lugtenberg, B. J. J., Kravchenko, L. V., and Simons, M. 1999. Tomato seed and root exudate sugars: composition, utilization by *Pseudomonas* biocontrol strains and role in rhizosphere colonization, *Env. Microbiol.* 1:439-446.
- Lugtenberg, B. J. J., Dekkers, L., and Bloemberg, G. V. 2001. Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 39:461-490.
- Lugtenberg, B. J. J., Chin-A-Woeng, T. F. C., and Bloemberg, G. V. 2002. Microbe-plant interactions: principles and mechanisms. *Anton. Leeuw.* 81:373-383.

- Lugtenberg, B. J. J. and Bloemberg, G. V.** 2004. Life in the rhizosphere. In *Pseudomonas: genomics, life style and molecular architecture*. Ramos, J. L. (ed.). Kluwer Academic / Plenum Publishers. New York. Vol I. 403-430.
- Lynch, J. M., and Whipps, J. M.** 1990. Substrate flow in the rhizosphere. *Plant Soil*. 129:1-10.
- Maddocks, S. E., and Oyston, P. C.** 2008. Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology*. 154:3609-3623.
- Mahaffey, W. R., Gibson, D. T., and Cerniglia, C. E.** 1988. Bacterial oxidation of chemicals carcinogens: formation of polycyclic aromatic acids from benz[a]anthracene. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:2415-2423.
- Maloney, P. E., van Bruggen, A. H. C., and Hu, S.** 1997. Bacterial community structure in relation to the carbon environments in lettuce and tomato rhizospheres and in bulk soil. *Microbial Ecol.* 34:109-117.
- Marilley, L., and Aragno, M.** 1999. Phylogenetic diversity of bacterial communities differing in degree and proximity of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* roots. *Appl. Soil. Ecol.* 13:127-136.
- Mark, G. L., Dow, J. M., Kiely, P. D., Higgins, H., Haynes, J., Baysse, C., Abbas, A., Foley, T., Franks, A., Morrissey, J., and O’Gara, F.** 2005. Transcriptome profiling of bacterial responses to root exudates identifies genes involved in microbe-plant interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 102:17454-17459.
- Marr, L. C., Kirschtetter, T. W., and Harley, R. A.** 1999. Characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons in motor vehicle fuels and exhaust emissions. *Environ. Sci. Technol.* 33:3091-3099.
- Marsch, J. L., Erfle, M., and Wykes, E. J.** 1984. The pIC plasmid and phage vectors with versatile cloning sites for recombinant selection by insertional inactivation. *Gene*. 32:481-485.
- Marschner, P., Yang, C.-H., Lieberei, R., and Crowley, D. E.** 2001. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* 33:1437-1445.
- Marschner, P., Neumann, G., Kania, A., Weiskopf, L. and Lieberei, R.** 2002. Spatial and temporal dynamics of the microbial community structure in the rhizosphere of cluster roots of white lupin (*Lupinus albus* L.). *Plant Soil*. 246:167-174.
- Martínez-Granero, F., Rivilla, R., and Martín, M.** 2006. Rhizosphere selection of highly motile phenotypic variants of *Pseudomonas fluorescens* with enhanced competitive colonization ability. *App. Env. Microbiol.* 72:3429-3434.
- Matilla, M. A., Espinosa-Urgel, M., Rodríguez-Herva, J. J., Ramos, J.L., and Ramos-González, M. I.** 2007. Genomic analysis reveals the major driving forces of bacterial life in the rhizosphere. *Genome Biol.* 8:R179.
- Medeiros, P. M., and Simonet, B. R. T.** 2008. Source profiles of organic compounds emitted upon combustion of green vegetation from temperate climate forest. *Environ. Sci. Technol.* 42:8310-8316.
- Menn, F. –M., Applegate, B. M., and Saylor, G. S.** 1993. NAH plasmid-mediated catabolism of anthracene and phenanthrene to naphthoic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1938-1942.
- Merckx, R., van Ginkel, J. H., Sinnaeve, J., and Cremers, A.** 1986. Plant-induced changes in the rhizosphere of maize and wheat I. Production and turnover of root-derived material in the rhizosphere of maize and wheat. *Plant Soil*. 96:85-93.
- Meyer, S., Moser, R., Neef, A., Stahl, U., and Kämpfer, P.** 1999. Differential detection of key enzymes of polyaromatic-hydrocarbon-degrading bacteria using PCR and gene probes. *Microbiology*. 145:1731-1741.
- Micallef, S. A., Shiaris, M. P., and Colon-Carmona, A.** 2009. Influence of *Arabidopsis thaliana* accessions on rhizobacterial communities and natural variation in root exudates. *J. Exp. Bot.* 60:1729-1742.

- Miethke, M., and Marahiel, M. A.** 2007. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71:413-451.
- Miguel, A. H., Kirchstetter, T. W., and Harley, R. A.** 1998. On-road emissions of particulate polycyclic aromatic hydrocarbons and black carbon from gasoline and diesel vehicles. *Environ. Sci. Technol.* 32:450-455.
- Miller, J.** 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor. New York, USA.
- Misra, S., and Gedamu, L.** 1989. Heavy-metal tolerant transgenic *Brassica napus* L. and *Nicotiana tabacum* L. plants. *Theor. Appl. Genet.* 78:161-168.
- Miya, R. K., and Firestone, M. K.** 2001. Enhanced phenanthrene biodegradation in soil by slender oat root exudates and root debris. *J. Environ. Qual.* 30:1911-1918.
- Miyauchi, K., Lee, H. S., Fukuda, M., Takagi, M., and Nagata, Y.** 2002. Cloning and characterization of LinR, involved in regulation of the downstream pathway for gamma-hexachlorocyclohexane degradation in *Sphingomonas paucimobilis* UT 26. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1803-7.
- Molina, L., Ramos, C., Ronchel, M-C., Molin, S., and Ramos, J. L.** 1998. Construction of an efficient biologically contained *Pseudomonas putida* strain and its survival in outdoor assays. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2072-2078.
- Molina, L., Ramos, C., Duque, E., Ronchel, M. C., García, J. M., Wyke, L., and Ramos, J. L.** 2000. Survival of *Pseudomonas putida* KT2440 in soil and in the rhizosphere of plants under greenhouse and environmental conditions. *Soil Biol. Biochem.* 32:315-321.
- Morales, G., Linares, J. F., Beloso, A., Albar, J. P. Martínez, J. L., and Rojo, F.** 2004. The *Pseudomonas putida* Crc global regulator controls the expression of genes from several chromosomal catabolic pathways for aromatic compounds. *J. Bacteriol.* 186:1337-1344.
- Moreno, R., and Rojo, F.** 2008. The target for the *Pseudomonas putida* Crc global regulator in the benzoate degradation pathway is the BenR transcriptional regulator. *J. Bacteriol.* 190:1539-1545.
- Morett, E., and Segovia, S.** 1993. The  $\sigma^{54}$  bacterial enhancer-binding protein family: mechanism of action and phylogenetic relationship of their functional domain. *J. Bacteriol.* 175:6067-6074.
- Morgan, J. A. W., Bending, G. D., and White, P. J.** 2005. Biological costs and benefits to plant-microbe interactions in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 56:1729-1739.
- Mueller, J. G., Chapman, P. J., Blattmann, B. O., and Pritchard, P. H.** 1990. Isolation and characterization of a fluoranthene-utilizing strain of *Pseudomonas paucimobilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1079-1086.
- Mulligan, C. N.** 2005. Environmental applications for biosurfactants. *Environ. Pollut.* 133:183-198.
- Muyzer, G., de Waal, E. C., and Uitterlinden, A. G.** 1993. Profiling of complex microbial population by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:695-700.
- Naes, K., and Oug, E.** 1997. Multivariate approach to distribution patterns and fate of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments from smelter-affected Norwegian fjords and coastal waters. *Environ. Sci. Technol.* 31:1283-1288.
- Naes, K., Oug, E., and Knutzen, J.** 1998. Source and species-dependent accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in littoral indicator organism from Norwegian smelter-affected marine waters. *Mar. Environ. Res.* 45:193-207.
- Nemergut, D. R., Costello, E. K., Hamady, M., Lozupone, C., Jiang, L., Schmidt, S. K., Fierer, N., Townsend, A. R., Cleveland, C. C., Stanish, L. and Knight, R.** 2011. Global patterns in the biogeography of bacterial taxa. *Environ. Microbiol.* 13:135-144.
- Neumann, G., and Römheld, V.** 2007. The release of root exudates as affected by the plant physiological status. In *The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the*

- plant-soil interface*. Pinton, R., Varanini, Z., and Nan nipieri, P. (eds.). CRC Press, New York, 23-72.
- Nichols, T. D., Wolf, D. C., Rogers, H. B., Beyrouy, C. A., and Reynolds, C. M.** 1997. Rhizosphere microbial populations in contaminated soils. *Water Air Soil Pollut.* 95:165-178.
- Niqui-Arroyo, J. L., Bueno-Montes, M., Posada-Baquero, R., Ortega-Calvo, J. J.** 20 06. Electrokinetic enhaceme nt of phenanth rene bi odegradation in creosote-p olluted clay soil. *Environ. Pollut.* 142:326-332.
- Nishimura, A., Morita, M., Nishimura, Y., and Sugino, Y.** 1990. A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucleic Acids Res.* 18:6169.
- Nishino, S. F., and Spain, J. C.** 1993. Deg radation of nitro b enzene by a *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:2520-2525.
- Oger, P. M., Mansouri, H., Nesme, X., and Dessaux, Y.** 2004. Engineering root exudation of *Lotus* toward the produ ction of two novel carbon compounds leads to th e selection of distinct microbial populations in the rhizosphere. *Microbial Ecol.* 47:96-103.
- Olivella, M. A., Ribalta, T. G., de Febrer, A. R., Mollet, J. M., and de las Heras, F. X. C.** 2006. Distribution of p olycyclic aro matic hydro carbons in riverine wat ers after Mediterranean forest fires. *Sci. Total. Environ.* 355:156-166.
- Ortega-Calvo, J. J., Marchenko, A. I., Vorobyov, A. V., and Borovick, R. V.** 2 003. Chemotaxis in poly cyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from coal-tar- and oil-polluted rhizosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* 44:373-381.
- Ospar Comission.** 200 2. Emissi ons and di scharges of polycyclic aro matic hydrocarbons (PAHs) from primary aluminium electrolysis, Soederberg Technology. Ospar Comission, Londres.
- Palumbo, J. D., Kado, C. I., and Phillips, D. A.** 1998. An isoflavonoid-inducible efflux pump in *Agrobacterium tumefaciens* is involved in competitive colonization of roots. *J. Bacteriol.* 180:3107-3113.
- Parales, R. E., Lee, K., Resnick, S. M., Jiang, H., Lessner D. J., and Gibson, D. T.** 2000. Substrate specificity of na phthalene dioxygenase: effect of specific amino acids at the active site of the enzyme. *J. Bacteriol.* 182:1641-1649.
- Parales, R. E., and Haddock, J. D.** 2004. Bi ocatalytic degradation of pollutants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15:374-379.
- Park, K. S., Sims, R. C., Dupont, R. R., Doucette, W. J., and Matthews, J. E.** 1990. Fate of PAH compounds in two soil types: Influence of volatilization, abiotic loss, and biological activity. *Environ. Toxicol. Chem.* 9:187-195.
- Parke, D., D'Argenio, D. A., and Ornstorn, L. N.** 2000. Bacteria are not what they eat: that is why they are so diverse. *J. Bacteriol.* 182:257-263.
- Parker, J. S., Cavell, A. C., Dolan, L., Roberts, K. and Grierson, C. S.** 2000. Genetic interactions during root hair morphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 12:1961-1974.
- Pereira, W. E., Hostettler, F. D., Luoma, S. N. van Geen, A., Fuller, C. C., and Anima, R. J.** 1999. Sedi mentary record of a nthropogenic a nd bio genic polycycli c aromatic hydrocarbons in San Francisco Bay, California. *Mar. Chem.* 64:99-113.
- Pérez-Martín, J., Timmis, K. N., and de Lorenzo, V.** 1994. Co-re gulation by bent DNA. Functional substitutions of the integration host factor site at  $\sigma^{54}$ -dependent promoter Pu of the upper-TOL operon by intrinsically curved sequences. *J. Biol. Chem.* 269:22657-22662.
- Petterson, R. F. Lundstrom, K., Chattopadhyaya, J. B., Josephson, S., Philipson, L., Kaarinainen, L., and Palva, I.** 1983. Chemical synthesis and molecular cloning of a STOP oligonucleotide encoding a UGA translation terminal signal in the three reading frames. *Gene.* 24:15-27.

- Pillai, B. V. S., and Swarup, S.** 2002. Elucidation of the flavonoid catabolism pathway in *Pseudomonas putida* P ML2 by comparative metabolite profiling. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:143-151.
- Pinyakong, O., Habe, H., Supaka, N., Pinpanichkarn, P., Juntongjin, K., Yoshida, T., Furihata, K., Nojiri, H., Yamane, H., and Omori, T.** 2000. Identification of novel metabolites in the degradation of phenanthrene by *Sphingomonas* sp. strain P2. *FEMS Microbiol. Lett.* 191:115-121.
- Pinyakong, O., Habe, H., Yoshida, T., Nojiri, H., and Omori, T.** 2003. Identification of three novel salicylate 1-hydroxylases involved in the phenanthrene degradation of *Sphingobium* sp. strain P2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301:350-357.
- Platt, A., Shingler, V. Taylor, S. C., and Williams, P. A.** 1995. The 4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase and acetaldehyde dehydrogenase (acylating) encoded by the *nahM* and *nahO* genes of the naphthalene catabolic plasmid p WW60-22 provide further evidence of conversion of *meta*-cleavage pathway gene sequences. *Microbiology.* 141:2223-2233.
- Pohjola, S. K., Savela, K., Kuusimäki, L., Kanno, T., Kawanishi, M., and Weyand, E.** 2004. Polycyclic aromatic hydrocarbons of diesel and gasoline exhaust and DNA adduct detection in calf thymus DNA and lymphocyte DNA of workers exposed to diesel exhaust. *Polycycl. Aromat. Compnd.* 24:451-465.
- Popham, D. L., Szeto, D., Keener, J., and Kustu, S.** 1989. Function of a bacterial activator protein that binds to transcriptional enhancers. *Science.* 243:629-635.
- Porteous, L. A., Seidler, R. J., and Watrud, L. S.** 1997. An improved method for purifying DNA from soil for polymerase chain reaction amplification and molecular ecology applications. *Mol. Ecol.* 6:787-791.
- Prakash, O., and Lal, R.** 2006. Description of *Sphingobium fuliginis* sp. nov., a phenanthrene-degrading bacterium from a fly ash dumping site, and reclassification of *Sphingomonas cloacae* as *Sphingobium cloacae* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56:2147-2152.
- Pratt, L. A., and Kolter, R.** 1998. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol. Microbiol.* 30:285-293.
- Prentky, P., and Krisch, H. M.** 1984. In vivo insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene.* 29:303-313.
- Preston, G. M.** 2004. Plant perceptions of plant growth-promoting *Pseudomonas*. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B-Biol. Sci.* 359:907-918.
- Prieto, M. A., Galán, B., Torres, B., Ferrández, A., Fernández, C., Minambres, B., García, J. L., and Díaz, E.** 2004. Aromatic metabolism versus carbon availability: the regulatory network that controls catabolism of less-preferred carbon sources in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* 28:503-518.
- Prikryl, Z., and Vancura, V.** 1980. Root exudates of plants – VI. Wheat root exudates as dependent on growth, concentration gradient of exudates and the presence of bacteria. *Plant Soil.* 57:69-83.
- Providenti, M. A., Flemming, C. A., Lee, H., and Trevors, J. T.** 1995. Effect of addition of rhamnolipid biosurfactant of rhamnolipid-producing *Pseudomonas aeruginosa* on phenanthrene mineralization in soil slurries. *FEMS Microbiol. Ecol.* 17:15-26.
- Pumphrey, G. M., and Madsen, E. L.** 2007. Naphthalene metabolism and growth inhibition by naphthalene in *Polaromonas naphthalenivorans* strain C J2. *Microbiology.* 153:3730-3738.
- Purves, W. K., Orians, G. H., and Heller, H. C.** 1994. In *Life: the science of biology* 4<sup>th</sup> Edition. Freeman and Company (eds.). Sinauer Associates Inc. Sunderland, MA. USA.
- Qiu, X., Shah, S. I., Kendall, E. W., Sorensen, D. L., Sims, R. C., and Engelke, M. C.** 1994. Grass-enhanced bioremediation for clay soils contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons. In *Bioremediation through rhizosphere technology*. Anderson, T. A., and Coats, J. R. (eds.). American Chemical Society, Washington, D. C. 142-157.



- Radwan, S., Sorkhoh, N., and El-Nemr, I. 1995. Oil biodegradation of round roots. *Nature*. 376:302.
- Rainey, P. B. 1999. Adaptation of *Pseudomonas fluorescens* to the plant rhizosphere. *Environ. Microbiol.* 1:243-257.
- Ramos, C., Mølbak, L., and Molin, S. 2000a. Bacterial activity in the rhizosphere analyzed at the single-cell level by monitoring ribosome contents and synthesis rates. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:801-809.
- Ramos, C., Molina, L., Mølbak, L., Ramos, J. L., and Molin, S. 2000b. A bioluminescent derivative of *Pseudomonas putida* KT2440 for deliberate release into the environment. *FEMS Microbiol. Ecol.* 34:91-102.
- Ramos, J. L., Mermoud, N., and Timmis, K. N. 1987. Regulatory circuits controlling transcription of TOL plasmid operon encoding meta-cleavage pathway for degradation of alkylbenzoates by *Pseudomonas*. *Mol. Microbiol.* 1:293-300.
- Ramos, J. L., Díaz, E., Dowling, D., de Lorenzo, V., Molin, S., O'Gara, F., Ramos, C., and Timmis, K. N. 1994. The behaviour of bacteria designed for biodegradation. *Nat. Biotechnol.* 12:1349-1356.
- Ramos-González, M. I., Campos, M. J., and Ramos, J. L. 2005. Analysis of *Pseudomonas putida* KT2440 gene expression in the maize rhizosphere: in vivo expression technology capture and identification of root-activated promoters. *J. Bacteriol.* 187:4033-4041.
- Raup, D. M., and Crick, R. E. 1979. Measurement of faunal similarity in paleontology. *J. Paleontol.* 53:1213-1227.
- Reddy, B. R., and Sethunathan, N. 1983. Mineralization of parathion in the rice rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 45:826-829.
- Reitzer, L. J., and Magasanik, B. 1986. Transcription of *glnA* in *E. coli* is stimulated by activator bound to sites far from the promoter. *Cell.* 45:785-792.
- Rentz, J. A., Alvarez, P. J. J., and Schnoor, J. L. 2004. Repression of *Pseudomonas putida* phenanthrene-degrading activity by plant root extracts and exudates. *Environ. Microbiol.* 6:574-583.
- Ribes, A., Grimalt, J. O., Torres, C. J., and Cuevas, E. 2003. Polycyclic aromatic hydrocarbons in mountain soils of the subtropical Atlantic. *J. Environ. Quality.* 32:977-987.
- Roberts, D. P., Dery, P. D., Yucel, I., Buyer, J., Holtman, M. A., Kobayashi, D. Y. 1999. Role of *pfkA* and general carbohydrate catabolism in seed colonization by *Enterobacter cloacae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2513-2519.
- Rodríguez, H., and Fraga, R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotech. Adv.* 17:319-339.
- Rodríguez-Herva, J. J., Duque, E., Molina-Henares, M. A., Navarro-Avilés, G., van Dillewijn, P., de la Torre, J., Molina-Henares, A. J., Sánchez-de la Campa, A., Ran, F. A., Segura, A., Shingler, V., and Ramos, J. L. 2010. Physiological and transcriptomic characterization of a *fliA* mutant of *Pseudomonas putida* K T2440. *Environ. Microbiol. Reports.* 2:373-380.
- Rodríguez-Navarro, D. N., Dardanelli, M. S., and Ruíz-Saínz, J. E. 2007. Attachment of bacteria to the roots of higher plants. *FEMS Microbiol. Lett.* 272:127-136.
- Romero-Arroyo, C. E., Schell, M. A., Gaines, G. L., and Neidle, E. L. 1995. *catM* encodes a LysR-type transcriptional activator regulating catechol degradation in *Acinetobacter calcoaceticus*. *J. Bacteriol.* 177:5891-5898.
- Romine, M. F., Stillwell, L. C., Wong, K. -K., Thurston, S. J., Sisk, E. C., Sensen, C., Gaasterland, T., Fredrickson, J. F., and Saffer, J. D. 1999a. Complete sequence of a 184-kilobase catabolic plasmid from *Sphingomonas aromaticivorans* F199. *J. Bacteriol.* 181:1585-1602.

- Romine, M. F., Fredrickson, J. K., and Li, S. -M. 1999b. Induction of aromatic catabolic activity in *Sphingomonas aromaticivorans* strain F199. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 23:303-313.
- Ronchel, M. C., and Ramos, J. L. 2001. Dual system to reinforce biological containment of recombinant bacteria designed for rhizoremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:2649-2656.
- Rosario, C. J., and Bender, R. A. 2005. Importance of tetramer formation by the nitrogen assimilation control protein for strong repression of glutamate dehydrogenase formation in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 187:8291-8299.
- Rosas, S. B., Andres, J. A., Rovera, M., and Correa, N. S. 2006. Phosphate-solubilizing *Pseudomonas putida* can influence the rhizobia-legume symbiosis. *Soil Biol. Biochem.* 38:3502-3505.
- Rothmel, R. K., Aldrich, T. L., Houhton, J. E., Coco, W. M., Ornston, L. N., and Chakrabarty, A. M. 1990. Nucleotide sequencing and characterization of *Pseudomonas putida catR*: a positive regulator of the *catBC* operon is a member of the LysR family. *J. Bacteriol.* 172:922-931.
- Rovira, A. D. 1965. Interactions between plant roots and soil microorganism. *Annu. Rev. Microbiol.* 19:241-246.
- Rudrappa, T., Biedrzycki, M. L., and Bais, H. P. 2008. Causes and consequences of plant-associated biofilms. *FEMS Microbiol. Ecol.* 64:153-166.
- Saito, A., Iwabuchi, T., and Harayama, S. 1999. Characterization of genes for enzymes involved in the phenanthrene degradation in *Nocardioide* sp. KP7. *Chemosphere.* 38:1331-1337.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, USA.
- Santos, E. C., Jacques, R. J. S., Bento, F. M., Peralba, M. D. R., Selbach, P. A., Sa, E. L. S., and Camargo, F. A. O. 2008. Anthracene biodegradation and surface activity by an iron-stimulated *Pseudomonas* sp. *Bioresour. Technol.* 99:2644-2649.
- Sasse-Dwight, S., and Gralla, J. D. 1988. Probing the *Escherichia coli glnALG* upstream activation mechanism in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:8934-8938.
- Schaller, G. 1987. pH changes in the rhizosphere in relation to the pH-buffering of soils. *Plant Soil.* 97:439-444.
- Schell, M. A., and Wender, P. E. 1986. Identification of the *nahR* gene product and nucleotide sequences required for its activation of the *sal* operon. *J. Bacteriol.* 166:9-14.
- Schmidhauser, T. J., and Helinski, D. R. 1985. Regions of broad-host-range plasmid RK2 involved in replication and stable maintenance in nine species of gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 164:446-455.
- Schnoor, J. L., Aitchison, E. W., Kelley, S. L., and Alvarez, P. J. 1995. Biocoating of seeds with plant growth-promoting rhizobacteria to improve plant establishment. *Outlook Agric.* 25:179-185.
- Schuler, L., Jouanneau, Y., Ní Chadhain, S. M., Meyer, C., Pouli, M., Zylstra, G. J., Hols, P., and Agathos, S.N. 2009. Characterization of a ring-hydroxylating dioxygenase from phenanthrene-degrading *Sphingomonas* sp. strain L H128 able to oxidize benzo[a]anthracene. *Appl. Biotechnol.* 83:465-475.
- Schwab, A. P., and Banks, M. K. 1994. Biologically mediated dissipation of polyaromatic hydrocarbons in the root zone. In *Bioremediation through rhizosphere technology*. Anderson, T. A., and Coats, J. R. (eds.). American Chemical Society, Washington, D. C. 132-141.
- Schwab, A. P., Banks, M. K., and Arunachalam, M. 1995. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere soil. In *Bioremediation of recalcitrant organics*. Hinchee, R. E., Anderson, D. B., and Hoepfel R. E. (eds.). Battelle Memorial Institute, Columbus, OH, USA.

- Segura, A., Rodríguez-Conde, S., Ramos, C., and Ramos, J. L.** 2009. Bacterial responses and interactions with plants during rhizoremediation. *Microbial Biotech.* 2:452-464.
- Sepic, E., Bricelj, M., and Leskovsek, H.** 1998. Degradation of fluoranthene by *Pasteurella* sp. IFA and *Mycobacterium* sp. PYR-1: Isolation and identification of metabolites. *J. Appl. Microbiol.* 85:746-754.
- Serdar, C. M., and Gibson, D. T.** 1989a. Isolation and characterization of altered plasmids in mutant strains of *Pseudomonas putida* NCIB9816. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164:764-771.
- Serdar, C. M., and Gibson, D. T.** 1989b. Studies of nucleotide sequence homology between naphthalene-utilizing strains of bacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164, 772-779.
- Shamsuzzaman, K. M., and Barnsley, E. A.** 1974. The regulation of naphthalene oxygenase in pseudomonads. *J. Gen. Microbiol.* 83:165-170.
- Shann, J. R., and Boyle, J. J.** 1994. Influence of plant species on in situ rhizosphere degradation. In *Bioremediation through rhizosphere technology*. Anderson, T. A., Coats, J. R. (Eds.). American Chemical Society, Washington, D. C. 70-81.
- Shaw, L. J., Morris, P., and Hooker, J. E.** 2006. Perception and modification of plant flavonoid signals by rhizosphere microorganisms. *Environ. Microbiol.* 8:1867-1880.
- Shingler, V., Bartilson, M., and Moore, T.** 1993. Cloning and nucleotide sequence of the gene encoding the positive regulator (DmpR) of the phenol catabolic pathway encoded by pVI150 and identification of DmpR as a member of the NtrC family of transcriptional activators. *J. Bacteriol.* 175:1596-1604.
- Shingler, V.** 1996. Signal sensing by sigma 54-dependent regulators: derepression as a control mechanism. *Mol. Microbiol.* 19:409-416.
- Shingler, V.** 2003. Integrated regulation in response to aromatic compounds: from signal sensing to attractive behaviour. *Environ. Microbiol.* 5:1050-1057.
- Shreve, G. S., Inguva, S., and Gunnam, S.** 1995. Rhamnolipids biosurfactant enhancement of hexadecane biodegradation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Marine Biol. Biotechnol.* 4:331-337.
- Siciliano, S. D., Fortin, N., Mihoc, A., Wisse, G., Labelle, S., Beaumier, D., Ouellette, D., Roy, R., Whyte, L. G., Banks, M. K., Schwab, P., Lee, K., and Greer, C. W.** 2001. Selection of specific endophytic bacterial genotypes by plants in response to soil contamination. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:2469-2475.
- Simon, M. J., Osslund, T. D., Saunders, R., Ensley, B. D., Suggs, S., Harcourt, A., Suen, W., Cruden, D. L., Gibson, A. T., and Zylstra, G. J.** 1993. Sequences of gene encoding naphthalene dioxygenase in *Pseudomonas putida* strain G7 and NCIB 9816-4. *Gene.* 127:31-37.
- Simonich S. L., and Hites, R. A.** 1994. Importance of vegetation in removing polycyclic aromatic hydrocarbons from the atmosphere. *Nature.* 370:49-51.
- Simons, M., van der Bij, A. J., Brand, J., de Weger, L. A., Wijffelman, C. A., and Lugtenberg, B. J. J.** 1996. Gnotobiotic system for studying rhizosphere colonization by plant growth-promoting *Pseudomonas* bacteria. *Mol. Plant Microbe Interact.* 9:600-607.
- Simons, M., Permentier, H. P., de Weger, L. A., Wijffelman, C. A., and Lugtenberg, B. J. J.** 1997. Amino acids synthesis is necessary for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens* strain WCS365. *Mol. Plant Microbe Interact.* 10:102-106.
- Singer, A. C., Crowley, D. E., and Thompson, I. P.** 2003. Secondary plant metabolites in phytoremediation and biotransformation. *Trends Biotech.* 21:123-130.
- Smalla, K., Wieland, G., Buchner, A., Zock, A., Parzy, K., Kaiser, S., Roskot, H. H., and Berg, G.** 2001. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studies by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:4742-4651.

- Snyder, W. C., and Hansen, H. N.** 1954. Variation and speciation in the genus *Fusarium*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 60:16-23.
- Somers, E., Vanderleyden, J., and Srinivasan, M.** 2004. Rhizosphere bacterial signalling: A love parade beneath our feet. *Crit. Rev. Microbiol.* 30:205-240.
- Sørensen, J., Jensen, L. E., and Nybroe, O.** 2001. Soil and rhizosphere as habitats for *Pseudomonas* inoculants: new knowledge on distribution, activity and physiological state derived from micro-scale and single-cell studies. *Plant Soil.* 232:97-108.
- Spaink, H. P., Okker, R. J., Wijffelman, C. A., Pees, E., and Lugtenberg, B. J. J.** 1987. Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1J1. *Plant. Mol. Biol.* 9:27-39.
- Sriprang, R., Hayashi, M., Yamashita, M., Ono, H., Saeki, K., and Murooka, Y.** 2002. A novel bioremediation system for heavy metals using the symbiosis between leguminous plant and genetically engineered rhizobia. *J. Biotechnol.* 99:279-293.
- Sticher, L., Mauch-Mani, B., and Métraux, J. P.** 1997. Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35:235-270.
- Story, S. Parker, S., Hayasaka, S., Riley, M., and Kline, E.** 2001. Convergent and divergent points in catabolic pathways involved in utilization of fluoranthene, naphthalene, anthracene, and phenanthrene by *Sphingomonas paucimobilis* var. EPA505. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 26:369-382.
- Stülke, J., and Hillen, W.** 1999. Carbon catabolite repression in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 2:195-201.
- Sutton-Grier, A. E., Wright, J. P., McGill, B. M., and Richardson, C.** 2011. Environmental conditions influence the plant functional diversity effect on potential denitrification. *PLoS ONE* 6 e16584.
- Taghavi, S., Barac, T., Greenberg, B., Borremans, B., Van-gronsveld, J., and van der Lelie, D.** 2005. Horizontal gene transfer to endogenous endophytic bacteria from poplar improves phytoremediation of toluene. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:8500-8505.
- Takizawa, N., Kaida, N., Torigoe, S., Moritani, T., Sawada, T., Satoh, S., and Kiyohara, H.** 1994. Identification and characterization of genes encoding polycyclic aromatic hydrocarbon dioxygenase and polycyclic aromatic hydrocarbon dihydrodiol dehydrogenase in *Pseudomonas putida* OUS82. *J. Bacteriol.* 176:2444-2449.
- Takizawa, N., Iida, T., Sawada, T., Yamauchi, K., Wang, Y. -W., Fukuda, M., and Kiyohara, H.** 1999. Nucleotide sequences and characterization of genes encoding naphthalene upper pathway of *Pseudomonas aeruginosa* PaK1 and *Pseudomonas putida* OUS82. *J. Biosci. Bioeng.* 87:723-731.
- Teske, A., Wawer, C., Muyzer, G., and Ramsing, N. B.** 1996. Distribution of sulfate-reducing bacteria in a stratified fjord (Mariager Fjord, Denmark) as evaluated by most-probable-number counts and denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified ribosomal DNA fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1405-15.
- Tian, B., Yang, J., and Zhang, K. -Q.** 2007. Bacteria used in the biological control of plant-parasitic nematodes: populations, mechanisms of action, and future perspectives. *FEMS Microbiol. Ecol.* 61:197-213.
- Tittabutr, P., Cho, I. K., and Li, Q. X.** 2011. Phenanthrene-like dioxygenases metabolize polycyclic aromatic hydrocarbons in *Burkholderia* sp. C3. *Biodegradat.* DOI 10.1007/s10532-011-9468-y.
- Torres, A. G., Jeter, C., Langley, W., and Matthyse, A. G.** 2005. Differential binding of *Escherichia coli* O157:H7 to alfalfa, human epithelial cells, and plastic is mediated by a variety of surface structures. *Appl. Env. Microbiol.* 71:8008-8015.
- Tran Van, V., Berger, O., Ngo Ke, S., Balandreau, J., and Heulin, T.** 2000. Repeated beneficial effects of rice inoculation with a strain of *Burkholderia vietnamiensis* on early and late yield components in low fertility sulphate acid soils. *Plant Soil.* 218:273-284.

- Trenck, v.d. T., and Sandermann, H. Jr.** 1980. Oxygenation of benzo[a]pyrene by plant microsomal fractions. *FEBS Lett.* 119:227-231.
- Tropel, D., and van der Meer, J. R.** 2004. Bacterial transcriptional regulators for the degradation pathways of aromatic compounds. *Microbial. Mol. Biol. Rev.* 68:474-500.
- Turnbull, G. A., Morgan, J. A., Whipps, J. P., and Saunders, J. R.** 2001. The role of motility in the in vitro attachment of *Pseudomonas putida* PaW8 to wheat roots. *FEMS Microbiol. Ecol.* 35:57-65.
- Urbance, J. W., Cole, J., Saxman, P., and Tiedje, J. M.** 2003. BSD: the biodegradative strain database. *Nucleic Acids Res.* 31:152-155.
- Uren, N. C.** 2007. Types, amounts, and possible functions of compounds released into rhizosphere by soil-grown plants. In *The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the plant-soil interface*. Pinton, R. Varanini, Z., and Nannipieri, P. (eds.). CRC Press, New York, 1-21.
- van Aken, B.** 2008. Transgenic plants for phytoremediation: helping nature to clean up environmental pollution. *Trends Biotechnol.* 26:225-227.
- van Diepeningen, A. D., De Vos, O. J., Zelenev, V. V., Semenov, A. M., and van Bruggen, A. H. C.** 2005. DGGE fragments oscillate with or counter to fluctuations in cultivable bacteria along wheat roots. *Microbiol. Ecol.* 50:506-517.
- van Dillewijn, P.** 2008. What gets turned on in the rhizosphere?. *Microbial Biotech.* 1:341-342.
- van Loon, L. C., and Bakker, P.A.H. M.** 2005. Induced systemic resistance as a mechanism of disease suppression by rhizobacteria. In *PGPR: biocontrol and biofertilization*. Siddiqui, Z. A. (ed.). Springer, Dordrecht. 39-66.
- van Veen, J. A., van Overbeek, L. S., and van Elsas, J. D.** 1997. Fate and activity of microorganisms introduced into soil. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61:121-135.
- Vancura, V.** 1980. Fluorescent pseudomonads in the rhizosphere of plants and their relation to root exudates. *Folia Microbiol.* 25:168-173.
- Vessey, J. K.** 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil.* 255:571-586.
- Vila-Escalé, M., Vegas-Vilarrúbia, T., and Prat, N.** 2007. Release of polycyclic aromatic compounds into a Mediterranean creek (Catalonia, NE Spain) after a forest fire. *Water Res.* 41:2171-2179.
- Viñas-Diéguez, L., Franco-Hernandez, M. A., and González-Fernandez, J. J.** 2002. Distribution of PAHs in surficial sediments of the Vigo estuary, Spain. Central axis and adjacent shelf. *Polycycl. Aromat. Compd.* 22:161-173.
- Walker, T. S., Pal Bais, H. P., Grotewold, E., and Vivanco, J. M.** 2003a. Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiol.* 132:44-51.
- Walker, T. S., Pal Bais, H. P., Halligan, K. M., Stermitz, F. R., and Vivanco, J. M.** 2003b. Metabolic profiling of root exudates of *Arabidopsis thaliana*. *J. Agric. Food Chem.* 51:2548-2554.
- Walter, U., Beyer, M., Klein, J., and Rehm, H-J.** 1991. Degradation of pyrene by *Rhodococcus* sp. UW1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34:671-676.
- Walton, B. T., and Anderson, T. A.** 1990. Microbial degradation of trichloroethylene in the rhizosphere: potential application to biological remediation of waste sites. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1012-1216.
- Wang, L., Guo, Y., and Gralla, J. D.** 1999. Regulation of sigma 54-dependent transcription by core promoter sequences: roles of -12 region nucleotides. *J. Bacteriol.* 181:7558-7565.
- Weiss, D. S., Batut, J., Klose, K. E., Keener, J., and Kustu, S.** 1991. The phosphorylated form of the enhancer-binding protein NTRC has an ATPase activity that is essential for activation of transcription. *Cell.* 67:155-167.

- Weissenfels, W. D., Beyer, M., and Klein, J. 1990. Degradation of phenanthrene, fluorene, and fluoranthene by pure bacteria cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32:479-484.
- Westerberg, K., Elväng, A. M., Stackebrandt, E., and Jansson, J. K. 2000. *Arthrobacter chlorophenolicus* sp. nov., a new species capable of degrading high concentration of 4-chlorophenol. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50:2083-2092.
- WHO, IARC. 1997. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Vol 69. Polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans. IARC, Lyon, France.
- Wick, L. Y., Colangelo, T., and Harms, H. 2001. Kinetics of mass-transfer limited bacterial growth on solid PAHs. *Environ. Sci. Technol.* 35:354-361.
- Wick, L. Y., Ruiz de Munain, A., Springael, D., and Harms, H. 2002. Responses of *Mycobacterium* sp. 501T to the low bioavailability of solid anthracene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58:378-385.
- Wornat, M. J., Ledesma, E. B., Sandrowitz, A. K., Roth, M. J., Dawsey, S. M., Qiao, Y. L., and Chen, W. 2001. Polycyclic aromatic hydrocarbons identified in soot extract from domestic coal-burning stoves of Henan Province, China. *Environ. Sci. Technol.* 35:1943-1952.
- Xiao-Ying, L., Zhang, T., and Fang, H. 2011. Bacteria-mediated PAH degradation in soil and sediment. *Appl. Environ. Biotechnol.* 89:1357-1371.
- Yang, C. H., and Crowley, D. E. 2000. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:345-351.
- Yang, C. H., Crowley, D. E., and Menge, J. A. 2001. 16S rDNA fingerprinting of rhizosphere bacterial communities associated with healthy and *Phytophthora* infected avocado roots. *FEMS Microbiol. Ecol.* 35:129-136.
- Yang, Y., Chen, R. F., and Shiaris, M. P. 1994. Metabolism of naphthalene, fluorene, and phenanthrene: preliminary characterization of a cloned gene cluster from *Pseudomonas putida* NCIB 9816. *J. Bacteriol.* 176:2158-2164.
- Yaryura, P. M., León, M., Correa, O. S., Kerber, N. L., Pucheu, N. L., and García, A. F. 2008. Assessment of the role of chemotaxis and biofilm formation as requirements for colonization of roots and seeds of soybean plants by *Bacillus amyloliquefaciens* BNM339. *Curr. Microbiol.* 56:625-632.
- Yee, D. C., Maynard, J. A., and Wood, T. K. 1998. Rhizoremediation of trichloroethylene by a recombinant, root colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain expressing toluene ortho-monooxygenase constitutively. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:112-118.
- Yen, K. M., and Gunsalus, I. C. 1985. Regulation of naphthalene catabolic genes of plasmid NAH7. *J. Bacteriol.* 162:1008-13.
- Yen, K. M., and Serdar, C. M. 1988. Genetics of naphthalene catabolism in *Pseudomonas*. *Crit. Rev. Microbiol.* 15:247-268.
- Yi, H., and Crowley, D. E. 2007. Biostimulation of PAH degradation with plants containing high concentration of linoleic acid. *Environ. Sci. Technol.* 41:4382-4388.
- Yousef-Coronado, F., Travieso, M. L., and Espinosa-Urgel, M. 2008. Different, overlapping mechanisms for colonization of abiotic and plant surfaces by *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiol. Lett.* 288:118-124.
- Yunker, M. B., Macdonald, R. W., Vingarzan, R., Mitchell, R. H., Goyette, D., and Sylvestre, S. 2002. PAHs in the Fraser river basin: a critical appraisal of PAHs ratios indicators of PAH source and composition. *Org. Geochem.* 33:489-515.
- Zablutowicz, R. M., Hoagland, R. E., and Locke, M. A. 1994. Glutathione S-transferase activity in rhizosphere bacteria and the potential for herbicide detoxification. In *Bioremediation through rhizosphere technology*. Anderson, T. A., and Coats, J. R. (eds.). American Chemical Society, Washington, D. C. 184-198.

- Zeinali, M., Vossoughi, M., and Ardestani, S. K.** 2008. Naphthalene metabolism in *Nocardia otitidiscaviarum* strain TSH 1, a moderately thermophilic microorganism. *Chemosphere*. 72:905-909.
- Zhang, G. Y., Ling, J. Y., Sun, H. B., Luo, J., Fan, Y. Y., and Cui, Z. J.** 2009. Isolation and characterization of newly isolated polycyclic aromatic hydrocarbons-degrading *Janibacter anophelis* strain JY11. *J. Hazard Mater.* 172:580-586.
- Zhang, H., Kallimanis, A., Koukkou A. I., and Drinas, C.** 2004. Isolation and characterization of novel bacteria degrading polycyclic aromatic hydrocarbons from polluted Greek soils. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65:124-131.
- Zhang, Y., and Miller, R. M.** 1994. Effect of a *Pseudomonas* rhamnolipid biosurfactant on cell hydrophobicity and biodegradation of octadecane. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:2101-2106.
- Zhao, K., Mingzhu, L., and Burgess, R. R.** 2009. Promoter and regulon analysis of nitrogen assimilation factor  $\sigma^{54}$ , reveal alternative strategy for *E. coli* MG1655 flagellar biosynthesis. *Nucleic Acids Res.* 38:1273-1283.
- Zheng, X. Y., and Sinclair, J. B.** 1996. Chemotactic response of *Bacillus megaterium* strain B153-2-2 to soybean root and seed exudates. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 48:21-35.
- Zhou, C., Yang, Y., and Jong, A. Y.** 1990. Mini-prep in ten minutes. *Biotechniques*. 8: 172-173.
- Zhou, J., Bruns, M. A., and Tiedje, J. M.** 1996. DNA Recovery from soils of diverse composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (2): 316-322.
- Zhou, N. -Y., Al-Dulayymi, J., Baird, M. S., and Williams, P. A.** 2002. S-allylthiolate 5-hydroxylase from *Ralstonia* sp. strain U2: a monooxygenase with close relationship to and shared electron transport proteins with naphthalene dioxygenase. *J. Bacteriol.* 184:1547-1555.
- Zielinska, B., Sagebiel, J. Arnott, W. P. Rogers, C. F., Kelly, K. E., Wagner, D. A. Lighty, J. S., Sarofin, A. F., and Palmer, G.** 2004. Phase and size distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in diesel and gasoline vehicle emissions. *Environ. Sci. Technol.* 38:2557-2567.
- Zylstra, G. J., and Gibson, D. T.** 1991. Aromatic hydrocarbon degradation: a molecular approach. In *Genetic engineering. Principles and methods*. Setlow, J. K. (ed.). New York. Plenum Press. 13:183-203.
- Zylstra, G. J., and Kim, E.** 1997. Aromatic hydrocarbon degradation by *Sphingomonas yanoikuyae* B1. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 19:408-414.