

Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Estación Experimental del Zaidín



Universidad de Granada



**Desarrollo de biosensores para la detección de
hidrocarburos aromáticos en aguas marinas**

Programa de Doctorado en Biología Fundamental y de Sistemas

Tesis Doctoral

Verónica Hernández Sánchez

2016

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Verónica Hernández Sánchez
ISBN: 978-84-9125-090-6
URI: <http://hdl.handle.net/10481/44832>

Desarrollo de biosensores para la detección de hidrocarburos aromáticos en aguas marinas

Memoria que presenta la Licenciada en Ingeniería Química
Verónica Hernández Sánchez para optar al Título de Doctora

Fdo.: Verónica Hernández Sánchez

Vº Bº de La Directora

Vº Bº del Co-director

Fdo.:

Fdo.:

Ana Segura Carnicero

Lázaro Molina Delgado

Doctora en Biología

Doctor en Biología

Investigadora Científica del CSIC

Contratado Post-doctoral del
CSIC

EEZ-CSIC/Universidad de Granada

2016

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el grupo de Microbiología Ambiental y Biodegradación del Departamento de Protección Ambiental de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Granada

Con la financiación de la Unión Europea (FP7-KBBE-2012-6-312139) y del MICINN (JAEPre036).



Francisco de Goya.

Agradecimientos

A mis directores de tesis. A Ana Segura, porque, a pesar de la distancia, siempre me he sentido apoyada. Muchas gracias por los consejos y por el esfuerzo que me has dedicado. A Lázaro Molina, gracias por escucharme siempre y por ayudarme en todo lo que has podido. Gracias por corregirme todo tan rápido.

A Juan Luis Ramos, por haberme permitido formar parte de su grupo de investigación. Muchas gracias por apoyarme y guiarme cuando lo necesité.

A mis compañeras del lab: Alicia y Mati. Por los consejos y por haberme ayudado siempre que os he necesitado. Por vuestra amistad y por los buenos momentos en el lab y fuera de él.

A los chic@s de Manolo y Maribel: a Saray, por las conversaciones en la biblioteca. A Óscar, por tu energía y por las risas. A María y a Patri Godoy, por ser siempre tan encantadoras. Gracias también a Nené y a Laura.

A los chic@s de Pieter: a Jesús y Silvia B. Por ser tan expeditivos siempre y por ayudar a organizar todos los eventos. Gracias por los buenos consejos.

A los chic@s de Tino: a Miriam y a Bertrand, por los consejos cuando lo he necesitado. Gracias también a Andrés, Jose, Álvaro, Diana, Miguel y David.

A los chic@s de Marian: a Josemi, por ser siempre tan agradable y tan bueno con todos. Gracias también a Cristina y Joaquín.

A los chic@s de Silvia: a Sophie, Patri B. y Dani porque me lo he pasado muy bien con vosotros en las comidas. Gracias por darme siempre las enzimas y reactivos que necesitara, fuese la hora que fuese.

A tod@s los que forman parte del grupo “JLR” por vuestro compañerismo todos estos años.

A mis amigas Mari y Teresa, que, aunque últimamente nos vemos poco por la distancia que nos separa, siempre me he sentido apoyada por vosotras. Os quiero. Gracias también a Leticia, Claudia y Olga.

A mi familia política, porque me acogió desde el primer momento. Especialmente gracias a Conchi, sé que te hacía mucha ilusión verme leer la tesis. Te echaré en falta ese día.

A mis abuelos, primos y tíos, gracias por estar ahí siempre a pesar de vernos poco. A mis padres y mi hermano, por todo el apoyo que he recibido a lo largo de estos años y por respetar mi escasez de tiempo. Gracias porque sé que, pase lo que pase, vais a estar ahí. A Yuna, por todo el cariño que me das cada vez que voy a visitaros. Os quiero mucho a todos.

A Janis y a Jim. Nunca vais a saber que os menciono aquí, pero os merecéis estar aquí. Por darme tanto amor siempre, por alegrarme con vuestros saltos y lametones cada vez que llegaba a casa cansada del laboratorio y por consolarme cuando estaba triste o desanimada. Gracias por obligarme a salir a dar un paseo todos los días y por hacerme tantísima compañía cuando estaba sola en casa escribiendo esta Tesis.

A David. Por ser el apoyo más importante que he tenido durante esta “tragicomedia” llamada Tesis. Por alegrarte por mí cuando daba saltos de alegría por algún resultado positivo y por escucharme cuando estaba triste/enfadada/confundida por algún resultado negativo. Por intentar ayudarme siempre y darme buenos consejos. Por creer en mí y por tu paciencia y cariño. Gracias por compartir tu vida conmigo.

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

INTRODUCCIÓN	1
1. Contexto de la presente Tesis Doctoral	1
2. Derrames de petróleo	1
3. El petróleo	4
3.1 Componentes principales	4
3.2 Toxicidad del petróleo en seres humanos	7
3.3 Toxicidad del petróleo en el medio ambiente	8
3.4 Destino de la contaminación petrolífera en el ecosistema	9
4. Remediación de derrames de petróleo	12
4.1 Barreras de contención y recogida manual	12
4.2 Vacío y centrifugado	13
4.3 Solidificación	13
4.4 Dispersantes	14
4.5 Atenuación natural	15
4.5.1 Proceso biológico.....	16
4.5.2 Especies degradadoras.....	16
5. Biorremediación de derrames	18
5.1 Bioaumentación	18
5.2 Bioestimulación	19
6. Degradación bacteriana de hidrocarburos aromáticos	20
6.1 Degradación aerobia de hidrocarburos aromáticos	22
6.1.1 Degradación de tolueno.....	22
6.1.2 Degradación de PAHs.....	23
6.2 Degradación de hidrocarburos aromáticos de alto peso molecular	24
7. Regulación de rutas de degradación de compuestos aromáticos	25
8. Biosensores	26
8.1 Biosensores basados en enzimas	27
8.2 Biosensores basados en anticuerpos	28
8.3 Biosensores basados en DNA	30
8.4 Biosensores bacterianos	31
8.4.1 Bases moleculares.....	32
8.4.2 Genes reporteros.....	33
8.4.3 Aplicaciones de los biosensores bacterianos.....	35

OBJETIVOS	38
MATERIALES Y MÉTODOS	42
1. Cepas bacterianas	44
2. Medios y condiciones de cultivo	45
2.1 Medios ricos	45
2.1.1 Bacterias no marinas.....	45
2.1.2 Bacterias marinas.....	45
2.2 Medios mínimos	46
2.2.1 Bacterias no marinas.....	46
2.1.2 Bacterias marinas.....	46
2.3 Antibióticos	47
2.4 Condiciones de cultivo	47
2.5 Preparación de las distintas soluciones con los inductores	48
3. Plásmidos	49
4. Aislamiento de DNA	50
4.1 Aislamiento de DNA plasmídico	50
4.2 Aislamiento de DNA cromosómico	50
5. Técnicas de manipulación de DNA	51
5.1 Determinación de la concentración de DNA	51
5.2 Electroforesis de DNA	51
5.3 Recuperación de fragmentos de DNA de los geles de agarosa	52
5.4 Digestión de DNA con enzimas de restricción	52
5.5 Ligación de DNA	52
5.6 Reacción en cadena con DNA polimerasa (PCR)	53
5.7 Preparación de RNA, RT-PCR y RACE	55
6. Transferencia de plásmidos	55
6.1 Transferencia por choque térmico	55
6.1.1 Preparación de células competentes.....	56
6.1.2 Transformación.....	56
6.2 Electrotransformación	57
6.2.1 Preparación de células electrocompetentes.....	57
6.2.2 Electroporación.....	57
6.3 Transferencia por conjugación	57

7. Crecimiento de PAHs y degradación de PAHs	58
8. Cinética de muerte con tolueno	58
9. Construcción de las cepas mutantes en <i>pahA</i> y <i>pahR</i>	59
10. Construcción de los sistemas bioreporteros	60
10.1 Bioreportero de hidrocarburos aromáticos monocíclicos (pKST-1)	60
10.2 Bioreportero de naftaleno y derivados (pKSN-1)	61
10.3 Bioreportero sistemas heterólogos de naftaleno y derivados (pKSN-3)	62
10.4 Bioreportero de naftaleno y derivados con GFP inestable (pKSN-2)	63
10.5 Bioreportero de hidrocarburos aromáticos policíclicos (pKSPA-1)	64
10.6 Bioreportero de hidrocarburos aromáticos policíclicos para expresión heteróloga (pKSPA-3)	64
10.6 Bioreportero de hidrocarburos aromáticos policíclicos con expresión regulada por XylS-Pm, (pKSPA-4)	65
10.8 Bioreportero de hidrocarburos aromáticos policíclicos con GFP inestable (pKSPA-2)	65
11. Medida de la actividad β -galactosidasa	66
12. Medida de la fluorescencia	67
13. Cromatografía de gases-espectrometría de masas	68
14. Experimentos de tierra	69
RESULTADOS	71
Capítulo 1	73
1. Introducción	75
2. Tasa de crecimiento de bacterias en medio marino	76
3. Antibiogramas	79
4. Capacidad de las cepas para ser transformadas	81
5. Tolerancia a compuestos tóxicos	82
Discusión	84
Capítulo 2	87
1. Introducción	89
2. Funcionamiento del sistema bioreportero	94
3. Construcción de las cepas biosensoras de BTEX	95
3.1 Tolerancia de las cepas a disolventes orgánicos	96
3.2 Estabilidad del plásmido pKST-1	97

4. Optimización del biosensor	98
4.1 Concentración necesaria de benzoato	99
4.2 Determinación del tiempo óptimo de exposición al inductor	100
4.3 Determinación de límites de detección del biosensor	102
4.4 Determinación de la especificidad del sistema bioreportero	107
5. Validación del biosensor con muestras complejas (crudo, gasoil, gasolina, muestras ambientales)	110
5.1 Análisis del contenido de las muestras ambientales mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS)	110
5.2 Validación del biosensor con gasolina	111
5.3 Validación del biosensor con gasoil	114
5.4 Validación del biosensor con aguas y sedimentos marinos	116
5.5 Validación del biosensor con muestras contaminadas con crudo o derrames de crudo	117
6. Desaparición de gasolina en suelo. Respuesta del biosensor	117
Discusión	120
Capítulo 3	128
1. Introducción	130
2. Determinación del perfil de inductores del promotor P_{phnS}	133
3. Construcción de un sistema bioreportero para su expresión heteróloga	136
4. Mejora del sistema bioreportero para su expresión heteróloga	137
5. Caracterización del sistema pKSN-1	139
5.1 Determinación del tiempo óptimo de exposición al inductor	139
5.2 Determinación de los límites de detección de este biosensor	140
5.3 Determinación de la especificidad del sistema bioreportero	141
5.4 Estudio del funcionamiento de <i>Burkholderia</i> sp. MS3 (pKSN-1) en medio marino ONR7a	143
6. Validación del biosensor con muestras complejas	143
6.1 Validación del biosensor con gasoil	144
6.2 Validación del biosensor con gasolina	145
6.3 Validación del biosensor con muestras contaminadas con crudo o con derrames de crudo	146
Discusión	147

Capítulo 4	152
1. Introducción	154
2. Identificación y caracterización de la dioxigenasa responsable de la transformación de PAHs	157
3. Caracterización de la región del promotor de <i>pahA</i>	160
4. Caracterización del regulador de P_{pahA}	164
5. Sistema bioreportero para su expresión heteróloga	168
6. Funcionamiento del plásmido pKSPA-1	170
7. Caracterización del sistema bioreportero pKSPA-1	170
7.1 Determinación del tiempo óptimo de exposición al inductor	171
7.2 Determinación de los límites de detección del biosensor	171
7.3 Determinación de la especificidad del sistema bioreportero	172
7.4 Cambio de la GFP estable del bioreportero por una GFP inestable	174
8. Validación del biosensor pKSPA-1 con mezclas complejas	175
8.1 Validación del biosensor con gasoil	175
8.2 Validación del biosensor con gasolina	177
8.3 Validación del biosensor con aguas y sedimentos marinos	178
8.4 Validación del biosensor con muestras contaminadas con crudo o derrames de crudo	179
Discusión	181
DISCUSIÓN GENERAL	188
CONCLUSIONES	196
ANEXOS	201
Anexo 1	203
Anexo 2	204
Anexo 3	205
Anexo 4	206
Anexo 5	207
BIBLIOGRAFÍA	209

ÍNDICE DE TABLAS

Introducción

Tabla 1. Composición de algunos petróleos crudos.

Tabla 2. Biodegradación de hidrocarburos aromáticos por bacterias marinas.

Materiales y métodos

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas.

Tabla 2. Condiciones de cultivo de cada una de las cepas.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Resultados

Capítulo 1

Tabla 1. Tiempo de generación de las bacterias marinas.

Tabla 2. Concentraciones de antibiótico en las que no se observó crecimiento de las cepas.

Tabla 3. Tolerancia de las cepas elegidas a distintos compuestos tóxicos.

Capítulo 2

Tabla 1. Límites de detección (LD) y de saturación (LS) de los biosensores con diferentes BTEX.

Tabla 2. Comparación de los límites de detección y límites en el rango lineal de los tres biosensores con gasolina.

Tabla 3. Comparación de los límites de detección y límites en el rango lineal de los tres biosensores con gasoil.

Tabla 4. Resultado del análisis de BTEX por GC-MS de las muestras de suelo contaminado con gasolina.

Capítulo 3

Tabla 1. Concentración de PAHs, naftaleno y BTEX en las distintas cantidades de gasolina utilizadas.

Tabla 2. Concentración de PAHs, naftaleno y BTEX en las distintas cantidades de crudo y petróleo de Prestige utilizadas.

Capítulo 4

Tabla 1. Límites de detección y límites de saturación de *Novosphingobium* sp. HR1a (pKSPA-1) con gasoil.

Tabla 2. Concentración de PAHs, naftaleno y BTEX en las distintas cantidades de gasolina utilizadas.

Tabla 3. Concentración de PAHs y naftaleno en las distintas muestras utilizadas.

Tabla 4. Concentración de PAHs y naftaleno en las distintas muestras utilizadas.

ÍNDICE DE FIGURAS

Introducción

Figura 1. Mapa que muestra a tiempo real el tráfico de barcos en el mar Mediterráneo.

Figura 2. Derrames producidos en el mar Mediterráneo entre 1980 y 2015.

Figura 3. Diferentes tipos de hidrocarburos saturados, insaturados y aromáticos presentes en el crudo de petróleo.

Figura 4. Estructura molecular del asfalteno propuesta para el petróleo Maya (Méjico).

Figura 5. Procesos que tienen lugar en el medio ambiente tras un derrame de petróleo en medios acuosos.

Figura 6. Factores que afectan a la biodegradación.

Figura 7. Requisitos de la bioestimulación y ejemplos de estimuladores usados.

Figura 8. Degradación de tolueno en bacterias aerobias.

Figura 9. Degradación de PAHs de bajo peso molecular en bacterias aerobias.

Figura 10. Mecanismos de interacción con el DNA de los reguladores transcripcionales, activadores y represores.

Figura 11. Representación esquemática de biosensores.

Figura 12. Biosensor basado en anticuerpos.

Figura 13. Biosensor basado en DNA.

Figura 14. Principio de una bacteria biosensora.

Materiales y Métodos

Figura 1. Estrategia para la construcción del sistema bioreportero de hidrocarburos aromáticos monocíclicos pKST-1.

Figura 2. Esquema del sistema bioreportero pKSN-1 de naftaleno y derivados.

Figura 3. Esquema del sistema bioreportero pKSN-3 de naftaleno y derivados para sistemas heterólogos.

Figura 4. Esquema del sistema bioreportero pKSN-2 de naftaleno y derivados con GFP inestable.

Figura 5. Esquema del sistema bioreportero pKSPA-1 de PAHs.

Figura 6. Esquema del sistema bioreportero pKSPA-3 para la detección de PAHs en sistemas heterólogos.

Figura 7. Esquema del sistema bioreportero pKSPA-4 para la detección de PAHs en sistemas heterólogos.

Figura 8. Esquema del sistema bioreportero pKSPA-2 de PAHs con GFP inestable.

Resultados

Capítulo 1

Figura 1. Curvas de crecimiento de distintas bacterias marinas.

Figura 2. Curvas de crecimiento de *Burkholderia* sp. MS3, *Novosphingobium* sp. HR1a, *Pseudomonas putida* KT2440 y *Pseudomonas putida* DOT-T1E en medio marino ONR7a.

Capítulo 2

Figura 1. Organización de los genes *tod* en el genoma de *Pseudomonas putida* DOT-T1E.

Figura 2. Reacciones para la degradación de tolueno a piruvato y acetyl-coA en *Pseudomonas putida* DOT-T1E.

Figura 3. Representación esquemática de la organización y el modo de acción de los sistemas de dos componentes.

Figura 4. Inducción del P_{todX} por TodS-TodT en respuesta a un amplio rango de aromáticos.

Figura 5. Funcionamiento del plásmido pKST-1.

Figura 6. Supervivencia de *Alcanivorax borkumensis* SK2, *Pseudomonas putida* KT2440 y *Pseudomonas putida* DOT-T1E después de un choque de tolueno de 0,2 % (v/v).

Figura 7. Estabilidad del plásmido pKST-1 en *Pseudomonas putida* KT2440, *Pseudomonas putida* DOT-T1E y *Alcanivorax borkumensis* SK2 en medio marino ONR7a.

Figura 8. Estudio de la influencia de la concentración de benzoato en la eficiencia del biosensor.

Figura 9. Experimentos de inducción de *Alcanivorax borkumensis* SK2 (pKST-1) y *Pseudomonas putida* KT2440 (pKST-1) a diferentes concentraciones de tolueno y tiempos de inducción.

Figura 10. Experimentos de inducción del plásmido pKST-1 en *Alcanivorax borkumensis* SK2, *Pseudomonas putida* KT2440 y *Pseudomonas putida* DOT-T1E a diferentes concentraciones de tolueno.

Figura 11. Experimentos de inducción del sistema bioreportero pKST-1 con tolueno en *Alcanivorax borkumensis* SK2, *Pseudomonas putida* KT2440 y *Pseudomonas putida* DOT-T1E en medio marino. Comparación de la inducción obtenida por *Pseudomonas putida* DOT-T1E (pKST-1) en medio marino ONR7a y medio mínimo M9.

Figura 12. Efecto del *o*-xileno en la respuesta a tolueno de *Pseudomonas putida* KT2440 (pKST-1).

Figura 13. Respuesta del biosensor *Pseudomonas putida* KT2440 (pKST-1) con hidrocarburos aromáticos policíclicos.

Figura 14. Experimentos de inducción del plásmido pKST-1 en *Alcanivorax borkumensis* SK2, *Pseudomonas putida* KT2440 y *Pseudomonas putida* DOT-T1E a diferentes concentraciones de gasolina.

Figura 15. Experimentos de inducción del plásmido pKST-1 en *Alcanivorax borkumensis* SK2, *Pseudomonas putida* KT2440 y *Pseudomonas putida* DOT-T1E a diferentes concentraciones de gasoil.

Figura 16. Detección de gasolina en suelo por *Pseudomonas putida* KT2440 (pKST-1).

Capítulo 3

Figura 1. Esquema de la organización de los genes *phn* y ruta de degradación de *Burkholderia* sp. RP007.

Figura 2. Actividad β -galactosidasa del plásmido pPSM en *Burkholderia* sp. MS3 en presencia de naftaleno, 1-bromonaftaleno, 1-cloronaftaleno, 2,7-dinitronaftaleno, 1-metilnaftaleno y 2-metilnaftaleno.

Figura 3. Actividad β -galactosidasa del plásmido pPSM en *Burkholderia* sp. MS3 en presencia de naftaleno, benzoato, etilbenceno, tolueno y decano.

Figura 4. Curvas de crecimiento de *Burkholderia* sp. MS3 en medio mínimo M9 con diferentes compuestos como única fuente de carbono.

Figura 5. Esquema del sistema bioreportero pKSN-1 de naftaleno y derivados y su funcionamiento.

Figura 6. Esquema y funcionamiento del sistema bioreportero pKSN-3.

Figura 7. Experimentos de inducción del plásmido pKSN-1 en *Burkholderia* sp. MS3 a 7,5 horas con naftaleno.

Figura 8. Experimentos de inducción del plásmido pKSN-1 en *Burkholderia* sp. MS3 a 7,5 horas con distintas concentraciones de naftaleno.

Figura 9. Experimentos de inducción a 7,5 horas del plásmido pKSN-1 en *Burkholderia* sp. MS3 con 2-metilnaftaleno, 1-metilnaftaleno, fenantreno, tolueno, etilbenceno y *o*-xileno.

Figura 10. Experimentos de inducción del plásmido pKSN-1 en *Burkholderia* sp. MS3 a 7,5 horas con distintas concentraciones de gasoil.

Capítulo 4

Figura 1. Diferencias en la solubilidad, resistencia a la degradación y capacidad mutagénica de diferentes hidrocarburos aromáticos policíclicos.

Figura 2. Esquema de la ruta de degradación de fenantreno en bacterias aerobias.

Figura 3. Comparación filogenética de la secuencia de aminoácidos de la subunidad alfa de las distintas dioxigenasas encontradas en HR1a con aquellas encontradas en la literatura y con una función clara asignada.

Figura 4. Curvas de crecimiento de *Novosphingobium* sp. HR1a con diferentes PAHs como fuente de carbono.

Figura 5. Curva de crecimiento del mutante de *Novosphingobium* sp. HR1a en el gen de la dioxigenasa *pahA* con diferentes PAHs como fuente de carbono.

Figura 6. Región reguladora de *pahA* y su alineamiento con regiones homólogas.

Figura 7. Expresión de *P_{pahA}* en *Novosphingobium* sp. HR1a.

Figura 8. Expresión de P_{pahA} en el mutante en el regulador $pahR$ en *Novosphingobium* sp. HR1a.

Figura 9. Expresión de P_{pahR} en *Novosphingobium* sp. HR1a.

Figura 10. Esquema de la construcción de pKSPA-3.

Figura 11. Experimentos de inducción del plásmido pKSPA-3 en *Novosphingobium* sp. HR1a a 5 y 24 horas con naftaleno y fenantreno.

Figura 12. Funcionamiento del sistema bioreportero pKSPA-4.

Figura 13. Funcionamiento del plásmido pKSPA-1.

Figura 14. Experimentos de inducción del plásmido pKSPA-1 en *Novosphingobium* sp. HR1a a con naftaleno a distintas horas.

Figura 15. Experimentos de inducción del plásmido pKSPA-1 en *Novosphingobium* sp. HR1a a distintas concentraciones de salicilato, naftaleno y fenantreno.

Figura 16. Experimentos de inducción del plásmido pKSPA-1 en *Novosphingobium* sp. HR1a con naftaleno, fenantreno, 2-metilnaftaleno, antraceno, pireno, tolueno, etilbenceno y *o*-xileno.

Figura 17. Experimentos de inducción del plásmido pKSPA-1 en *Novosphingobium* sp. HR1a a distintas concentraciones de gasoil.

Figura 18. Experimentos de inducción del plásmido pKSPA-1 en *Novosphingobium* sp. HR1a con aguas y sedimentos de Gela.

Figura 18. Experimentos de inducción del plásmido pKSPA-1 en *Novosphingobium* sp. HR1a con agua saturada de crudo.

ABREVIATURAS

1-BrNaf	1-Bromonaftaleno
1-CINaf	1-Cloronaftaleno
1-Mnaf	1-Metilnaftaleno
2,7-dNnaf	2,7-Dinitronaftaleno
2-Mnaf	2-Metilnaftaleno
Ant	Antraceno
API	Instituto Americano del Petróleo
ATP	Adenosín trifosfato
BTX	Hydrocarburos aromáticos monocíclicos excepto etilbenceno (Benceno, tolueno, xilenos)
BTEX	Hydrocarburos aromáticos monocíclicos (Benceno, tolueno, etilbenceno, xilenos)
C:N:P	Carbono:Nitrógeno:Fosfato
cLB	Medio tipo Luria-Bertani para conjugación de bacterias marinas
Cri	Criseno
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidad óptica
EB	Etilbenceno
EDTA	Tetra-acetato de etilendiamina
EEUU	Estados Unidos
Fe	Fenantreno
GC-MS	Cromatografía de gases-espectrometría de masas
GFP [LVA]	Proteína verde fluorescente inestable
GFP	Proteína verde fluorescente

GO_x	Glucosa oxidasa
HOHD	2-hidroxi-6-oxohepta-2,4-dienoato
HTC	Motivo hélice-giro-hélice
IARC	Agencia Internacional de Investigación Contra el Cáncer
ITOPF	The international tanker owner pollution federation
kb	Kilobase (s)
LB	Luria-Bertani
LUC	Luciferasa de luciérnaga
LUX	Luciferasa
M276	Medio rico para bacterias marinas
M9	Medio mínimo para bacterias no marinas
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
Naf	Naftaleno
NtrC	Proteína C reguladora de nitrógeno
<i>o</i>-Fta	<i>o</i> -Ftalato
ONPG	<i>o</i> -nitrofenil-β-galactopiranosido
ONR7a	Medio mínimo para bacterias marinas
<i>o</i>-Xil	<i>o</i> -Xileno
p/v	Peso/volumen
PAH(s)	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
PCR	Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa termorresistente
Pir	Pireno
Prot	Protocatecuato
RNA	Ácido ribonucleico

Sali	Ácido salicílico
SOC	Medio super óptimo
TCA	Ácidos tricarboxílicos
Tol	Tolueno
UMT	Uroporfirinogen-III-C-metiltransferasa
v/v	Volumen/volumen
WHO	Organización Mundial de la Salud

INTRODUCCIÓN

1. CONTEXTO DE LA PRESENTE TESIS DOCTORAL

La presente Tesis Doctoral se engloba dentro del proyecto europeo “Soluciones biotecnológicas integradas para combatir derrames de petróleo marinos” (Kill•Spill), en el cual se desarrollan biotecnologías innovadoras para su uso en acciones encaminadas a la limpieza de derrames de petróleo en ambientes marinos. En el marco de este proyecto se desarrollan herramientas adecuadas para la primera respuesta, el seguimiento y las acciones a largo plazo.

Dentro de este proyecto se desarrollan distintas herramientas para monitorizar la biorremediación de las zonas contaminadas. Estas herramientas abarcan métodos químicos para detectar productos de degradación, análisis metagenómicos para detectar cepas y proteómicos para el seguimiento de actividades degradativas, así como la construcción de biosensores para la rápida detección de hidrocarburos aromáticos. El trabajo de Tesis propuesto se centra precisamente en la construcción de distintos biosensores para detectar hidrocarburos aromáticos.

2. DERRAMES DE PETRÓLEO

Desde hace décadas se vienen produciendo accidentes marítimos que provocan derrames de petróleo con efectos muy graves en el medio ambiente. Estos derrames pueden ser tanto de crudo (petróleo sin modificar), como de sus derivados refinados (como gasolina y diesel) y sus productos secundarios, combustibles más pesados. Aunque la mayor parte de los derrames se deben a accidentes marítimos, también se pueden producir por fugas, accidentes en petroleros o en plataformas petrolíferas, inclemencias meteorológicas o, incluso, a conflictos bélicos, como, por ejemplo la Guerra del Golfo de 1991, donde se produjo uno de los mayores derrames de petróleo producidos en la historia (Baumann, 2001).

Algunos de los derrames de crudo y de compuestos refinados más conocidos han dañado ecosistemas en lugares como Alaska (Exxon Valdez), Francia y España (Prestige) y recientemente el Golfo de México (BP). La cantidad de petróleo liberado durante estos derrames varía desde cientos hasta miles de toneladas; por ejemplo, en el desastre del Amoco Cádiz se derramaron 223.000 toneladas, en el Prestige fueron 63.000 toneladas y en el Deepwater Horizon 524.000 toneladas (Gundlach *et al.*, 1983; Albaigés, 2006; Jernelöv, 2010).

Pese a que las grandes catástrofes reciben mucha atención mediática, conviene recordar que el ambiente marino está constantemente expuesto a emisiones más pequeñas de petróleo (EEA, 2006).



Figura 1. Mapa que muestra a tiempo real el tráfico de barcos en el mar Mediterráneo. Imagen tomada el 13 de febrero de 2016 (www.marinetraffic.com).

En el caso concreto del mar Mediterráneo y, a pesar de que representa menos del 1% de la superficie marina global, acoge el 20% del tráfico marítimo de buques de almacenamiento (Figura 1). Este tráfico implica, inevitablemente, numerosos casos de contaminación por hidrocarburos en el mar que a veces son graves, siendo en muchas

ocasiones imperceptibles (EEA, 2006). Este tipo de derrames representa la mayor fracción de la cantidad total de hidrocarburos de petróleo que alcanza el entorno marino (The National Academies Press, 2003).

En la Figura 2 se pueden observar todos los accidentes en los que se han producido derrames de petróleo en el mar Mediterráneo desde 1980 hasta 2015. Estos accidentes varían en la cantidad de petróleo que se derramó (MEDGIS-MAR, 2016).

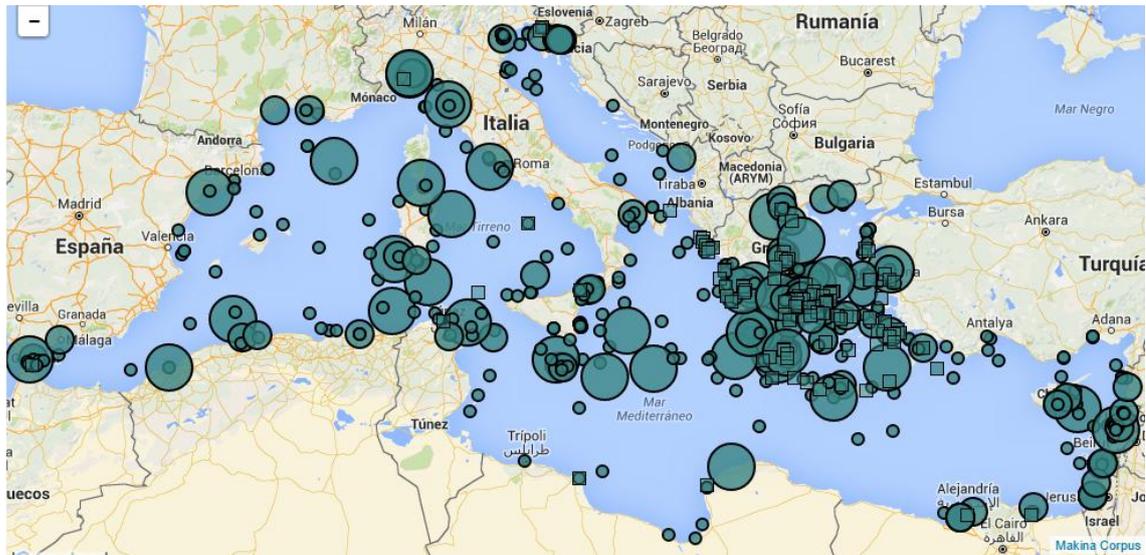


Figura 2. Derrames producidos en el mar Mediterráneo entre 1980 y 2015. El diámetro del círculo se corresponde con el volumen del derrame (menos de 7 toneladas, entre 7 y 700 toneladas y más de 700 toneladas.) En los cuadrados no se conoce exactamente el tamaño de la contaminación (MEDGIS-MAR, 2016).

Cada derrame es diferente; no sólo por su composición, sino también porque los diversos factores medio ambientales y geográficos determinan su dispersión, impacto ecológico y los consecuentes modos de actuación (remediación). Cuando existe tanta diversidad de factores, la gravedad final del derrame, es decir, los efectos en los ecosistemas o la permanencia del petróleo en el medio ambiente, es difícil de predecir, aunque la experiencia de estudios sobre vertidos anteriores ayuda a determinar las estrategias más apropiadas para su contención o eliminación (Kooyman, 2010).

3. EL PETRÓLEO

Petróleo es un término general que describe un amplio rango de sustancias naturales de consistencia normalmente líquida, de origen animal, vegetal o mineral. El petróleo crudo se origina de forma natural mediante procesos geológicos y geoquímicos (The National Academies Press, 2003).

3.1 Componentes principales

Los componentes principales del petróleo son hidrocarburos. Además, el petróleo crudo a veces contiene sales minerales, así como trazas de azufre o de metales como níquel, vanadio y cromo (NRC, 1985). En general, los compuestos hidrocarbonados del petróleo se clasifican según su estructura. Estos pueden ser hidrocarburos saturados, olefinas, aromáticos y compuestos polares (Speight, 1991).

Los compuestos saturados consisten básicamente en alcanos (o parafinas) y cicloalcanos (o naftenos) (Figura 3). En el petróleo se encuentran alcanos desde uno hasta 40 átomos de carbono.

Las olefinas son compuestos que contienen insaturaciones; poseen al menos un enlace doble carbono-carbono (Figura 3). Cantidades altas de olefinas se encuentran sólo en productos ya refinados (NRC, 1985; Speight, 1991).

Los compuestos aromáticos incluyen como mínimo un anillo de benceno (Figura 3). Son muy estables y persistentes en el medioambiente y muchos de ellos tienen efectos tóxicos en los organismos. Los monocíclicos son compuestos volátiles y los que se encuentran mayoritariamente en el crudo pertenecen al grupo BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xileno). Normalmente el tolueno es el compuesto BTEX más abundante (NRC, 1985; Speight, 1991, Hernández-Sánchez *et al.*, 2016).

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) contienen al menos, dos anillos de benceno (Figura 3). Los PAHs incluyen aquellos compuestos que tienen los efectos más graves sobre el medioambiente de todos los componentes del petróleo crudo, como por ejemplo, antraceno, fenantreno y pireno. Esto es debido a su recalcitrancia natural a la biodegradación, su bioacumulación en el medio ambiente y a los efectos nocivos sobre la salud asociados a su exposición (Kumar *et al.*, 2014). La abundancia de estos compuestos aromáticos en el petróleo habitualmente disminuye al aumentar su peso molecular (Neff, 1990).

Por último, los compuestos polares son aquellos que poseen enlaces con elementos como el azufre, oxígeno o nitrógeno. En la industria petrolífera, los compuestos polares más pequeños se conocen como resinas. Los compuestos más grandes se llaman asfaltenos (Figura 4) (The National Academies Press, 2003).

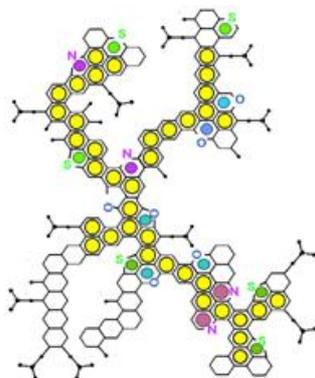


Figura 4. Estructura molecular del asfalteno propuesta para el petróleo Maya (Méjico) por Altamirano *et al.*, 1986.

En la siguiente tabla se muestra la composición de diferentes tipos de petróleos con los porcentajes de cada uno de los compuestos.

Tabla 1. Composición de algunos petróleos crudos. *Modificado de American Petroleum Institute, 2011.*

Fuente del crudo	Parafinas	Naftenos	Aromáticos	Azufre
	% vol	% vol	% vol	% peso
Ligero de Arabia Saudí	63	18	19	2.0
Sur de Louisiana	79	45	19	0.0
Beryl	47	34	19	0.4
Brent del Mar del Norte	50	34	16	0.4
Ligero de Venezuela	52	34	14	1.5
Kuwait	63	20	24	2.4
Amargo del Este de Texas (EEUU)	46	32	22	1.9
Bahía Prudhoe	27	36	28	0.9
Pesado de Arabia Saudí	60	20	15	2.1
Pesado de Venezuela	35	53	12	2.3

3.2 Toxicidad del petróleo en seres humanos

Muchos de los compuestos orgánicos que forman el petróleo son altamente tóxicos y cancerígenos. Por ejemplo, el naftaleno puede producir daño o destrucción de los glóbulos rojos cuando existe exposición a altas cantidades de este compuesto. También puede causar confusión, náuseas, vómitos, diarreas y aparición de sangre en la orina. La Agencia Internacional de Investigación contra el Cáncer (IARC) describe el naftaleno como un posible cancerígeno para humanos y animales (IARC, 2002).

El fenantreno, aunque no está clasificado como cancerígeno para los seres humanos, puede producir irritación de la piel y del tracto respiratorio, tos, dolor de garganta, dermatitis y dolor (OSHA, 2007).

Por otra parte, el benceno ataca el hígado, los riñones, los pulmones, el corazón y el cerebro y puede causar daños en el DNA (Huff, 2007). Se han llevado a cabo un gran número de estudios epidemiológicos, clínicos y de laboratorio que conectan el benceno con la anemia aplásica, leucemia aguda y anomalías de la médula ósea (Kasper *et al.* 2004). El Instituto Americano del Petróleo (API) declaró, ya en 1948, que “se considera que la única cantidad de benceno absolutamente segura es cero” (API, 1948).

El tolueno inhalado en cantidades moderadas puede causar cansancio, confusión, debilidad, pérdida de memoria, náuseas, pérdida de apetito y pérdida de audición y de visión. Estos síntomas suelen desaparecer cuando cesa la exposición. La inhalación de tolueno en gran cantidad puede producir náuseas, adormecimiento, inconsciencia e incluso la muerte (Canadian Centre for Occupational Health and Safety, 2013).

3.3 Toxicidad en el medio ambiente

Los derrames de petróleo suelen tener como resultado daños ambientales inmediatos y a largo plazo, pudiendo durar décadas.

Cuando el petróleo alcanza las playas, éste las cubre y se pega a las rocas; las marismas costeras, bosques de manglares y otros humedales, las plantas fibrosas y hierbas absorben el petróleo, lo cual puede dañar las plantas y hacer toda el área inadecuada para la vida (West, 2014).

Las aves marinas necesitan nadar y bucear para cazar su alimento y al quedar cubiertas con petróleo se destruye su aislamiento impermeable natural, dejándolas vulnerables a la hipotermia o sobrecalentamiento, además de imposibilitarles el vuelo. También pueden dañar zonas donde se encuentran los nidos, lo que tiene efectos muy

dañinos a largo plazo en especies enteras, y obstaculizar los patrones migratorios al contaminar las áreas donde las aves migratorias suelen parar.

También puede producir efectos letales en peces, crustáceos y otro tipo de vida marina, como los mamíferos (West, 2014).

Cuando una parte del petróleo deja de flotar y empieza a hundirse en el ambiente marino, este puede tener los mismos efectos dañinos, matando o contaminando muchos peces y organismos pequeños que son enlaces esenciales en la cadena alimentaria.

3.4 Destino de la contaminación petrolífera en el ecosistema

En cuanto el petróleo se derrama se dispersa debido a las corrientes de agua, la acción de las olas y la dirección del viento. La velocidad a la que esto ocurre depende en gran medida de la viscosidad del petróleo y de las condiciones meteorológicas y físico químicas del agua marina, de forma que existen grandes variaciones en el espesor de la capa de petróleo que se forma tras un derrame (ITOPF, 2013). Los compuestos refinados que son más volátiles, como el queroseno (compuesto fundamentalmente de hidrocarburos de longitud de cadena entre 6 y 16 átomos de carbono) y los productos diesel (compuesto fundamentalmente de hidrocarburos de longitud de cadena entre 8 y 21 átomos de carbono) se evaporarán en un corto periodo de tiempo (Kingston, 2002).

Las olas en la superficie marina pueden provocar que una parte o toda la marea negra se rompa en gotas de distinto tamaño. Estas se mezclan en los niveles superficiales de la columna de agua; las gotas más pequeñas permanecerán resuspendidas en el agua marina, mientras que las más grandes tenderán a volver a la superficie, donde pueden fusionarse con otras gotas para formar de nuevo una marea negra o esparcirse para formar una película muy pequeña. El petróleo que permanece resuspendido en el agua tiene un área superficial mayor que antes de dispersarse; lo que fomenta que se sucedan

otros procesos naturales como la disolución, biodegradación y la sedimentación (ITOPF, 2013) (Figura 5).

Después de un corto periodo de tiempo el petróleo empezará a formar una emulsión, la cual puede contener hasta un 80% de agua (Kingston, 2002). La formación de emulsiones produce que el volumen de contaminante aumente entre tres y cuatro veces. Esto retrasa y ralentiza otros procesos que permitirían que el petróleo se disipara (ITOPF, 2013) (Figura 5).

Los compuestos solubles (compuestos alifáticos y algunos aromáticos de bajo peso molecular) en agua del petróleo pueden disolverse en las aguas circundantes. Esto depende de la composición y del estado del petróleo, y ocurre más rápidamente cuando el petróleo está disperso en la columna de agua. Los componentes que son más solubles en agua son algunos de los hidrocarburos aromáticos ligeros, como el benceno y el tolueno (ITOPF, 2013) (Figura 5).

El petróleo se puede adherir a partículas de sedimentos o materia orgánica pudiéndose así hundir hacia el fondo marino, contaminándolo. Igualmente, cuando el derrame llega a entornos continentales puede pegarse y penetrar en el sustrato que constituya la costa (ITOPF, 2013; Boyd *et al.*, 2001). Este proceso hace que los efectos de meteorización debidos a la acción de las olas y otros procesos físicos sean menos eficientes (Kingston, 1997).

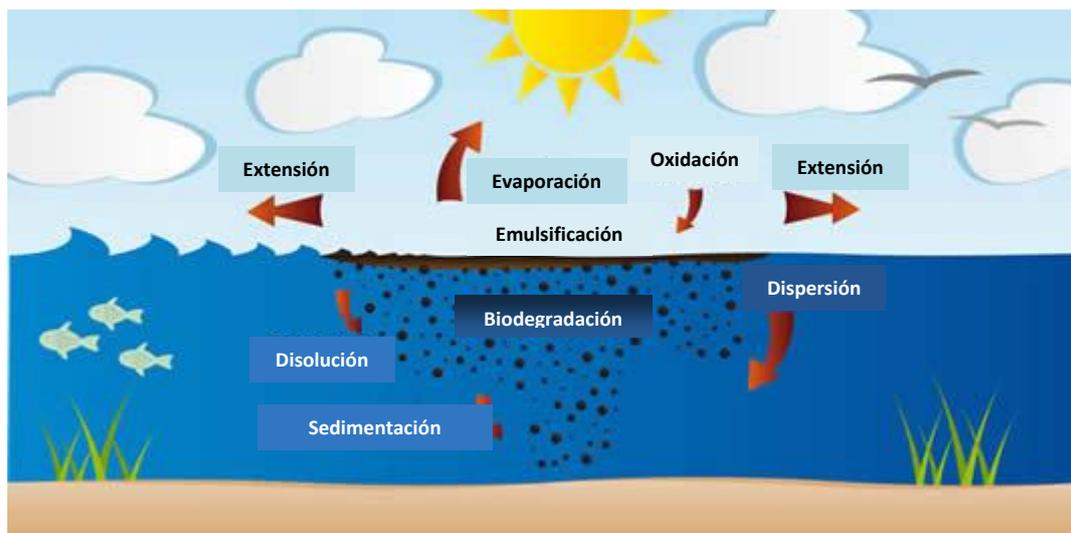


Figura 5. Procesos que tienen lugar en el medio ambiente tras un derrame de petróleo en medios acuáticos.

Modificado de ITOPF, 2013.

Los petróleos reaccionan con el oxígeno químicamente rompiéndose en productos solubles o formando compuestos persistentes llamados alquitranes. Este proceso es promovido por la luz solar y el grado de extensión que pueda tener depende del tipo de petróleo y de la forma a la que esté expuesto a la luz solar. Mediante la oxidación se forma una cubierta protectora de compuestos pesados que aumenta la persistencia del petróleo como un todo (ITOPF, 2013).

Por último, tenemos el proceso de biodegradación. El agua marina contiene una serie de microorganismos que pueden transformar el petróleo en compuestos solubles en agua y, eventualmente, conllevar a su total degradación dando como productos finales dióxido de carbono y agua. Los factores principales que afectan a la eficiencia de la biodegradación son los niveles de nutrientes en el agua, la temperatura y el nivel de oxígeno presente. Además, la formación de las gotas de petróleo, ya sea de forma natural o por dispersión química, aumenta el área superficial del petróleo y el área biodisponible para que la biodegradación tenga lugar (ITOPF, 2013).

Para comprender y predecir el destino de los contaminantes en un ambiente dado, es necesaria, entre otras cosas, una descripción adecuada de biodisponibilidad de estos compuestos (Tecon *et al.*, 2009). La biodisponibilidad es la fracción de un compuesto químico (en un sistema) que puede ser detectado o transformado por organismos vivos. Esta fracción biodisponible puede variar dependiendo de parámetros de transferencia de materia, que incluyen procesos fisicoquímicos como la disolución, desorción y difusión, procesos hidrológicos como el mezclado y, finalmente, procesos biológicos como el consumo y el metabolismo (Tecon *et al.*, 2006). Compuestos poco solubles en agua tienen en general poca biodisponibilidad y como consecuencia una fuerte limitación del acceso del compuesto al microorganismo, lo que afecta a la cinética de su biodegradación (Bosma *et al.*, 1997; Wick *et al.*, 2001). Esto ocurre con los PAHs de mayor peso molecular, que pese a que algunos son intrínsecamente biodegradables, no lo son efectivamente porque los microorganismos no los pueden adquirir de forma eficaz (Tecon *et al.*, 2006).

4. REMEDIACIÓN DE DERRAMES DE PETRÓLEO

La limpieza y la recuperación de un ecosistema afectado por un derrame de petróleo son difíciles y dependen de varios factores, incluyendo el tipo de petróleo derramado, la temperatura del agua (afectando a evaporación y biorremediación) y los tipos de costa y de playa involucrados.

4.1 Barreras de contención y recogida manual

De forma general, se ha considerado que la mejor manera de conseguir una recuperación rápida del ecosistema es la recogida manual del fuel. Para facilitar este proceso se puede utilizar agua a una presión y temperatura compatibles con la conservación de la vida adherida al sustrato (Figueras, 2008).

Además, se suelen utilizar barreras de contención, que permiten cercar los derrames sobre la superficie del agua evitando así su dispersión. Se presentan en tres versiones que difieren del diseño de sus flotadores y que se usan en distintos ambientes; planos (para zonas de aguas protegidas, como puertos, lagos y ríos), cilíndricos (para soportar las condiciones adversas que puede haber en costas y en puertos) o cilíndricos hinchables (para usar en costas opuestas y en mar abierto) (Instituto Aragonés de Fomento, 2014).

El dragado de los sedimentos se utiliza cuando se derraman petróleos que son más densos que el agua, los cuales se hunden, de forma que la limpieza se efectúa debajo de la superficie del agua contaminada (Office of Response and Restoration, 2007).

4.2 Vacío y centrifugado

Mediante la aplicación de vacío el petróleo se absorbe junto con el agua para después centrifugar esta mezcla y separar los componentes. Normalmente, el agua tratada se devuelve al mar, pero esta agua va contaminada con pequeñas cantidades de petróleo que regresan al mar lo que ha obstaculizado el uso regular de esta técnica debido a una regulación de los EEUU que limita la cantidad de petróleo devuelto al mar (Fountain, 2010).

4.3 Solidificación

Los productos solidificantes están compuestos por polímeros secos de alto peso molecular que en contacto con el petróleo forma un enlace físico con este, aumentando su viscosidad hasta el punto en el que el petróleo solidifica en un material parecido a la goma. Los solidificadores son insolubles en agua, de manera que la eliminación del petróleo solidificado es más fácil. Se ha demostrado que los solidificadores no son tóxicos para la vida acuática y silvestre y se ha comprobado como eliminan vapores

tóxicos comúnmente asociados con hidrocarburos como benceno, xilenos y acetona. El tiempo de reacción para la solidificación del petróleo está controlado por el área superficial o el tamaño del polímero así como por la viscosidad del petróleo. Algunos fabricantes de solidificadores indican que el petróleo solidificado se puede depositar en vertederos, reciclar y usar como un aditivo en asfaltos o gomas o ser quemado como un combustible bajo en cenizas (C.I.Agent Solutions, 2010).

4.4 Dispersantes

Los dispersantes se utilizan para fragmentar el petróleo y acelerar su biodegradación natural. Actúan reduciendo la tensión superficial que evita que el petróleo y el agua se mezclen, favoreciendo la formación de pequeñas gotas de petróleo, lo que facilita una rápida dilución del petróleo debido a los movimientos de agua. Al aumentar el área superficial del petróleo se aumenta la exposición a la evaporación natural y a la acción bacteriana. Los dispersantes son más efectivos cuando se utilizan dentro de las primeras dos horas después de que el derrame se haya producido. Sin embargo, no son apropiados para todos los petróleos ni para todos los lugares (Appea, 2004); la decisión de usar o no dispersantes para combatir un derrame de petróleo se debe tomar en cada caso individual, teniendo en cuenta el tiempo que ha acontecido desde el derrame, las condiciones atmosféricas, el ambiente particular involucrado y el tipo de petróleo derramado (Appea, 2004).

Los biosurfactantes juegan un papel importante en estos procesos de remediación debido a su eficacia en dispersión así como sus características amables con el medioambiente, así como una baja toxicidad y una alta biodegradabilidad (Silva *et al.*, 2014). Actualmente, el mayor mercado de biosurfactantes se encuentra en la industria petrolífera, en la cual estos compuestos se pueden usar en la limpieza de derrames de petróleos, la eliminación de los residuos de petróleo de tanques de almacenamiento, la

recuperación de petróleo aumentada por microorganismos y la biorremediación de agua y suelo (Sobrinho *et al.*, 2013).

4.5 Atenuación natural

Debido a la naturaleza invasiva de los métodos más utilizados para la eliminación de derrames, en algunos casos es mejor dejar que el petróleo derramado se disperse de forma natural, particularmente en áreas ecológicamente sensibles como los humedales (Pezeshki *et al.*, 2000). Los petróleos más ligeros se dispersarán más rápidamente que los pesados (Appea, 2004). Aparte además de estos procesos, al producirse un derrame, las bacterias presentes en el medio y que son capaces de degradar hidrocarburos proliferarán rápidamente (American Society for Microbiology, 2011).

La atenuación natural es uno de los factores que actúan en la meteorización del petróleo y es un proceso natural en el cual bacterias u otros microorganismos alteran y rompen moléculas orgánicas en otras sustancias, eventualmente produciendo ácidos grasos y dióxido de carbono (Hoff, 1993).

Aparte de los factores microbianos intrínsecos de cada cepa degradadora que condiciona la eliminación del contaminante hay otros factores implicados en los procesos de atenuación natural como los que se muestran en la Figura 6.

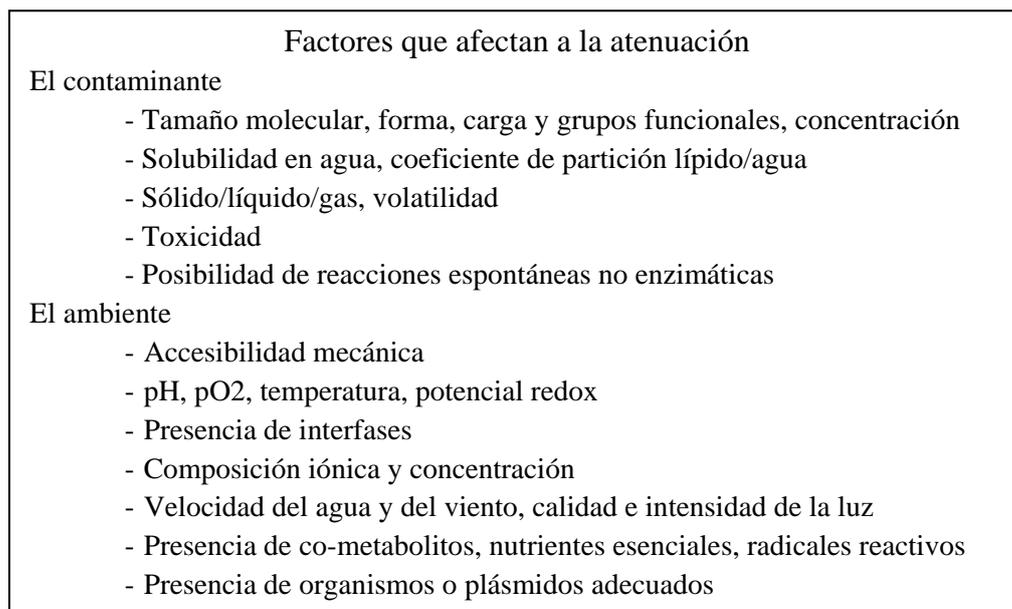


Figura 6. Factores que afectan a la biodegradación (Hazen, 2010).

4.5.1 Proceso biológico

La biodegradación es el proceso por el cual los compuestos químicos son degradados por seres vivos; en esta Tesis Doctoral nos centraremos fundamentalmente en la degradación por bacterias.

Existen microorganismos capaces de degradar enzimáticamente los hidrocarburos de petróleo (ver apartado 6 de esta introducción). Los alcanos en el rango C₁₀ a C₂₆ y los aromáticos de bajo peso molecular como benceno, tolueno y xileno son los que se degradan biológicamente de forma más fácil. Sin embargo, las estructuras más complejas, como los hidrocarburos policíclicos de alto peso molecular, compuestos con azufre, etc. son más resistentes a la biodegradación (Kumar *et al.*, 2014).

4.5.2 Especies degradadoras

Se considera que las bacterias son los agentes predominantes de degradación de hidrocarburos en el ambiente marino (Yakimov *et al.*, 2007). Hasta ahora se han descrito más de 20 géneros bacterianos marinos degradadores de hidrocarburos distribuidos en los grupos Gram negativas (α -, β - y γ -proteobacterias), Gram positivas y *Flexibacter-*

Cytophaga-Bacteroides. Debido a que una especie es capaz de degradar sólo un número limitado de los compuestos encontrados en el petróleo crudo, normalmente para la mineralización de sus componentes se necesita de la participación de un consorcio compuesto por muchas especies bacterianas distintas (Röling *et al.*, 2002).

Muchas de las rutas metabólicas de degradación de hidrocarburos en ambientes aerobios han sido bien estudiadas en las últimas décadas. Los pasos iniciales en la biodegradación de hidrocarburos por bacterias y hongos implican generalmente la oxidación del sustrato por oxigenasas, que necesitan oxígeno molecular. Los alcanos se convierten en ácidos carboxílicos que después se biodegradan mediante la ruta de la β -oxidación de ácidos grasos formando acetato que entra en el ciclo del ácido tricarboxílico. Los anillos de hidrocarburos aromáticos generalmente se hidroxilan para formar dioles; que posteriormente son atacados por mono-, dioxigenasas que rompen el anillo y que posteriormente es degradado a intermediarios del ciclo del ácido tricarboxílico. La biodegradación completa (mineralización) de hidrocarburos produce como compuestos finales dióxido de carbono y agua, que no son tóxicos, así como biomasa celular que puede ser fácilmente asimilada en la cadena alimentaria (Atlas, 1995; Sierra-García *et al.*, 2014).

Para evaluar los efectos potenciales de un derrame de petróleo en la estructura y la función de una comunidad bacteriana, especialmente las bacterias degradadoras de hidrocarburos se están usando técnicas novedosas como la metagenómica y la secuenciación masiva, evitando las técnicas tradicionales de aislamiento y cultivo de bacterias. Estos resultados son esenciales para desarrollar un amplio conocimiento de las comunidades microbianas que están presentes en lugares con altas probabilidades de sufrir un derrame de petróleo (Greer *et al.*, 2014).

5. BIORREMEDIACIÓN DE DERRAMES

La biorremediación es la técnica que permite acelerar la velocidad de la biodegradación natural mediante la superación de los factores limitantes de la velocidad (Atlas, 1995; Hoff, 1993; Swannell *et al.*, 1996). Existen diversas técnicas de biorremediación y a continuación se describen brevemente varias de ellas, especialmente las utilizadas para la biorremediación de entornos contaminados con vertidos petrolíferos.

5.1 Bioaumentación

La bioaumentación, o aumentación bacteriana, es un proceso que intenta mejorar el tratamiento de las aguas contaminadas incrementando la diversidad y/o actividad microbiana a través de la introducción directa en las aguas contaminadas de microorganismos seleccionados y amplificados previamente en el laboratorio aislados de esas aguas o de otros entornos (Stephenson y Stephenson, 1992).

Tras el aislamiento de microorganismos degradadores de un contaminante específico de muestras ambientales, la exposición a cantidades crecientes de sustrato puede aumentar la tolerancia de la cepa a estos compuestos a través de la selección y adaptación natural. La exposición a agentes mutagénicos como la luz ultravioleta, el óxido nitroso aumenta la variación genética, pudiendo mejorar las habilidades degradadoras de la población aislada. Esta mejora debe ser analizada a nivel de laboratorio y en campo para atestiguar la seguridad, eficacia y reproducibilidad del proceso (Dash *et al.*, 2013).

La actividad metabólica, adaptabilidad y la competencia ecológica de los inoculantes son las mayores limitaciones en los procesos de biorremediación. Estos productos necesitan un alto nivel de robustez para poder ser expuestos a diversos ambientes

(Mohammed *et al.*, 2006). Tsutsumi *et al.*, (2000) llevaron a cabo un experimento de campo para confirmar la efectividad de un producto comercial compuesto por bacterias exógenas degradadoras de petróleo llamado TerraZyme (Oppenheimer Biotechnology). Este experimento se llevó a cabo en la costa de Nakhodka (Japón), donde se había producido un derrame de petróleo. Los resultados que obtuvieron demostraron que este producto era capaz de mejorar significativamente la biodegradación de petróleo en la costa (Tsutsumi *et al.*, 2000).

5.2 Bioestimulación

La bioestimulación consiste en la adición de nutrientes al medio contaminado para estimular el crecimiento de las poblaciones indígenas de ese medio, de manera que las poblaciones degradadoras del contaminante sean más efectivas.

Existen algunos estudios en los que se demuestra el aumento de poblaciones degradadoras en respuesta a la presencia de contaminantes, por ejemplo, Hazen *et al.*, (2010) encontraron que el petróleo derramado en el accidente del Deepwater Horizon en el Golfo de Méjico estimuló las poblaciones de γ -proteobacteria indígenas, las cuales están relacionadas con degradadoras conocidas del petróleo. Acosta-González *et al.*, (2012) encontraron evidencias de un aumento de la comunidad microbiana con el potencial para responder a la contaminación por hidrocarburos en sedimentos contaminados por petróleo del Prestige, mostrando predominancia en esta comunidad las γ - y δ -proteobacterias.

Nuestra habilidad para mejorar la biorremediación de cualquier ambiente es directamente proporcional al conocimiento de la biogeoquímica del lugar. El parámetro que generalmente limita el crecimiento de los microorganismos es el balance C:N:P (carbono:nitrógeno:fósforo), establecido por el estado fisiológico de la población celular (Herbert, 1976). Goldman *et al.*, (1987) encontraron que, para bacterias marinas, la

composición química elemental se mantiene relativamente invariable sobre 45:9:1. En derrames de petróleo esta proporción se ve alterada por la gran cantidad de C que contiene los hidrocarburos, de forma que una práctica habitual en estos casos es añadir N y P para favorecer el crecimiento microbiano.

Los principales requisitos para el éxito de las técnicas de bioestimulación se exponen en la Figura 7.

Requisitos de la bioestimulación
1. Microbios correctos presentes
2. Habilidad para estimular los microbios necesarios para la degradación
3. Buenas técnicas para la adición de nutrientes
4. C:N:P recomendado 45:9:1 (Gallego <i>et al.</i> , 2007)
5. Compuestos añadidos:
- Gases: Aire, oxígeno, óxido nitroso, propano, metano, trietil fosfato, etc.
- Líquidos: Ácido láctico, aceite vegetal, acetato, compuestos liberadores de hidrógeno, etc
- Sólidos: Agentes de carga (aserrín, productos secundarios agrícolas), compuestos liberadores de oxígeno, etc.

Figura 7. Requisitos de la bioestimulación y ejemplos de estimuladores usados (Hazen, 2010)

6. DEGRADACIÓN BACTERIANA DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS

La degradación bacteriana de hidrocarburos ha sido bastante estudiada en los últimos años. El aislamiento de bacterias degradadoras de alcanos o hidrocarburos aromáticos monocíclicos es relativamente sencillo si se usan los medios de cultivo adecuados y se enriquecen con estos compuestos (Harayama *et al.*, 2004). Muchas de estas bacterias usan fuentes de carbono limitadas, presentando una clara preferencia por los hidrocarburos, como por ejemplo los géneros *Alcanivorax*, *Marinobacter*, *Thalassolituus*, *Cycloclasticus* y *Oleispira* (Yakimov *et al.*, 2007).

Algunas bacterias degradadoras de hidrocarburos aisladas de ambientes marinos se engloban en géneros que incluyen también especies degradadoras aisladas de suelo: por ejemplo, las degradadoras de naftaleno *Staphylococcus* y *Micrococcus* (Zhuang *et al.*,

2003), degradadoras de 2-metilfenantreno como *Sphingomonas* (Gilewicz *et al.*, 1997) y degradadoras de alcanos como *Geobacillus* (Maugeri *et al.*, 2002).

Aunque la lista de cepas marinas degradadoras de hidrocarburos es cada día más completa, en la Tabla 2 presentamos las cepas que se proponía utilizar en este trabajo de Tesis Doctoral, junto con sus principales características.

Tabla 2. Biodegradación de hidrocarburos aromáticos por bacterias marinas.

Cepa	Origen	Sustrato	Referencia
Agua			
<i>Alcanivorax borkumensis</i> , SK2	marina/sedimento de la isla de Borkum.	n-alcanos	Yakimov <i>et al.</i> , 1998
Sedimentos			
<i>Cycloclasticus zancles</i>	superficiales del estrecho de Puget, EEUU	Hidrocarburos aromáticos	Dyksterhouse <i>et al.</i> , 1995
Agua del Mediterráneo			
<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> , VT8	cercana a una refinería de petróleo	Alcanos C ₁₆ -C ₂₀	Gauthier <i>et al.</i> , 1992
Agua			
<i>Oleiphilus messinensis</i> , ME102	marina/sedimento del puerto de Messina, Italia	Alcanos, alcanosatos y alcanoles	Golyshin <i>et al.</i> , 2002
Agua superficial de			
<i>Oleispira antarctica</i> , RB-8	la bahía de Rod, (Antártica)	Alcanos C ₁₀ -C ₁₈	Yakimov <i>et al.</i> , 2003

	Agua		
<i>Thalassolituus</i>	marina/sedimento	Alcanos C ₇ -C ₂₀	Yakimov <i>et al.</i> ,
<i>oleivorans</i> , Mil-1	del puerto de		2004
	Milazzo, Italia		

6.1 Degradación aerobia de hidrocarburos aromáticos

El metabolismo bacteriano implicado en la degradación aerobia de hidrocarburos aromáticos ha sido ampliamente estudiado en los últimos 35 años. 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).

6.1.1 Degradación de tolueno

La biodegradación del tolueno ha sido ampliamente estudiada a nivel molecular y, por tanto, sirve como modelo para entender los mecanismos del metabolismo bacteriano de los anillos de benceno.

En la Figura 8 se muestra un esquema de los pasos iniciales en la activación del anillo de tolueno en diferentes bacterias. La hidroxilación del anillo se puede hacer mediante la oxidación de la cadena lateral hasta formar ácido benzoico, como en *Pseudomonas putida* mt-2 (plásmido pWWO) o por dihidroxilación directa del anillo, como es el caso de la *P. putida* DOT-T1E. En otros casos se puede producir una monohidroxilación del anillo para formar *m*-, *p*- u *o*-cresol.

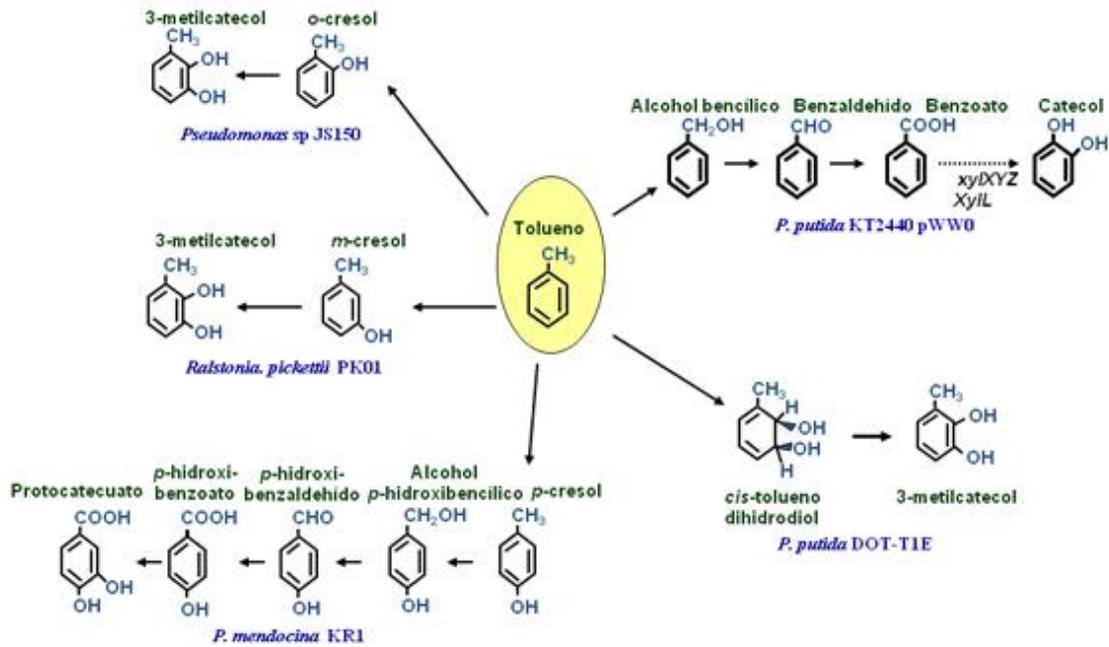


Figura 8. Degradación de tolueno en distintas bacterias aerobias.

6.1.2 Degradación de PAHs

La degradación de PAHs de dos y tres anillos por bacterias aerobias ha sido bastante bien estudiada, de forma que el mecanismo enzimático implicado, así como la localización de las rutas degradativas (en plásmidos o cromosoma) en diferentes bacterias están relativamente bien caracterizados (Zylstra *et al.*, 1988). 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 dihidrodiool (en el caso de degradación de naftaleno), etapa catalizada por una dioxigenasa. El siguiente paso consiste en la deshidrogenación de la forma dihidrodiool sobre el que actúa una segunda dioxigenasa que rompe el anillo. Las dioxigenasas actúan sucesivamente sobre los anillos restantes, produciéndose así la activación, apertura y eliminación de cada uno de los anillos (Figura 9).

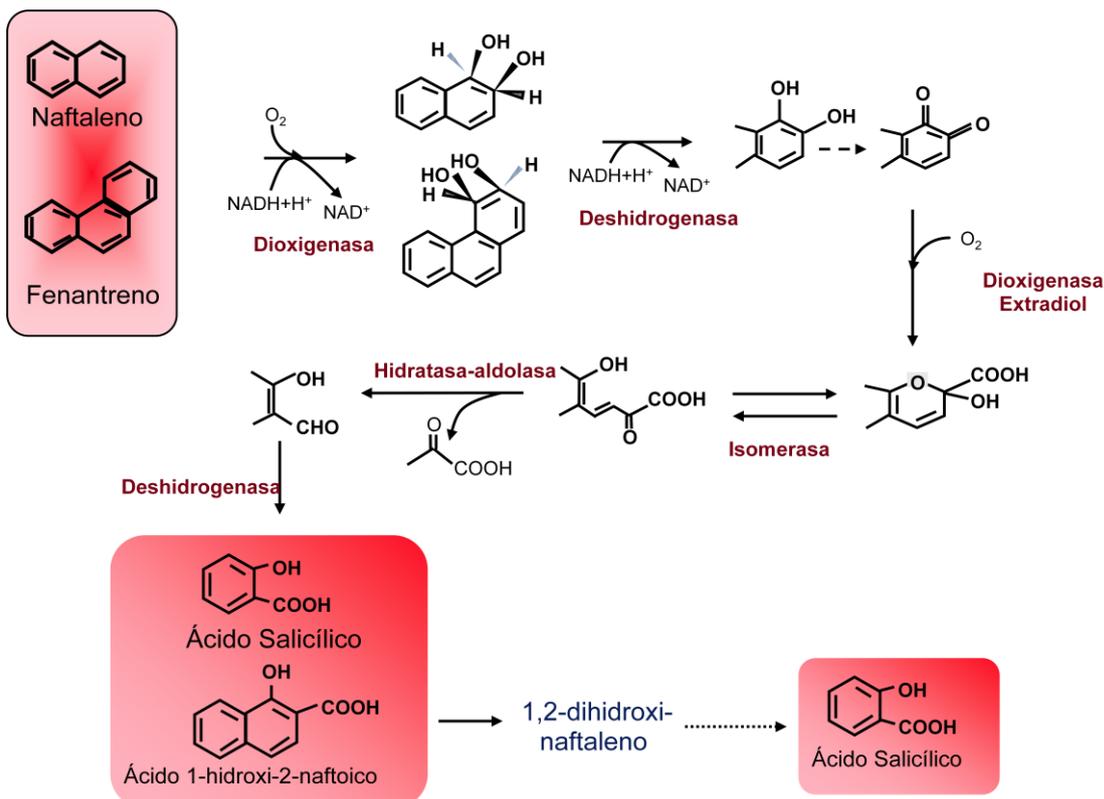


Figura 9. Degradación de PAHs de bajo peso molecular en bacterias aerobias.

6.2 Degradación de hidrocarburos aromáticos de alto peso molecular

La degradación de hidrocarburos aromáticos de alto peso molecular es más compleja. Si bien se conocen cepas bacterianas capaces de degradar hidrocarburos aromáticos de cuatro anillos, como pueden ser *Pseudomonas* (Mueller *et al.*, 1990), *Alcaligenes* (Weissenfels *et al.*, 1990), *Rhodococcus* (Walter *et al.*, 1991), o *Mycobacterium* (Boldrin *et al.*, 1993), se conoce relativamente poco sobre la mineralización de los mismos. La degradación de hidrocarburos aromáticos de cuatro o más anillos es más compleja y en muchos casos sólo ocurre mediante co-metabolismo, es decir, en presencia de una fuente de carbono adicional.

Así por ejemplo se ha descrito la co-metabolización de benzo[a]pireno por bacterias creciendo en pireno (Keck *et al.*, 1989; Boonchan *et al.*, 2000). Se han caracterizado distintos intermediarios en la degradación de estos compuestos, algunos de ellos

parecen acumularse sin ser posteriormente degradados (especialmente si no están en presencia de microbios que puedan biodegradarlos), constituyendo lo que se conoce como “dead-end products” (Freeman *et al.*, 1995).

7. REGULACIÓN DE RUTAS DE DEGRADACIÓN DE COMPUESTOS AROMÁTICOS

En general los genes que componen las rutas catabólicas de compuestos aromáticos en procariotas están organizados en agrupaciones de genes que se regulan coordinadamente (operones). Una de las principales ventajas que ofrece esta agrupación de los genes 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 *et al.*, 2000). Por esto, los clúster génicos suelen estar finamente regulados. Esta fina regulación se ejerce mediante una amplia variedad de proteínas pertenecientes a diferentes familias de reguladores transcripcionales (Díaz *et al.*, 2000).

Los reguladores transcripcionales de rutas catabólicas pueden ser activadores o represores, ambos interaccionando con el DNA diana a través de dominios de unión tipo hélice-giro-hélice (HTH) y que inducen la transcripción cuando interaccionan con el sustrato aromático o un intermediario de la ruta, que funciona como molécula inductora, aunque por mecanismos diferentes (Figura 10).

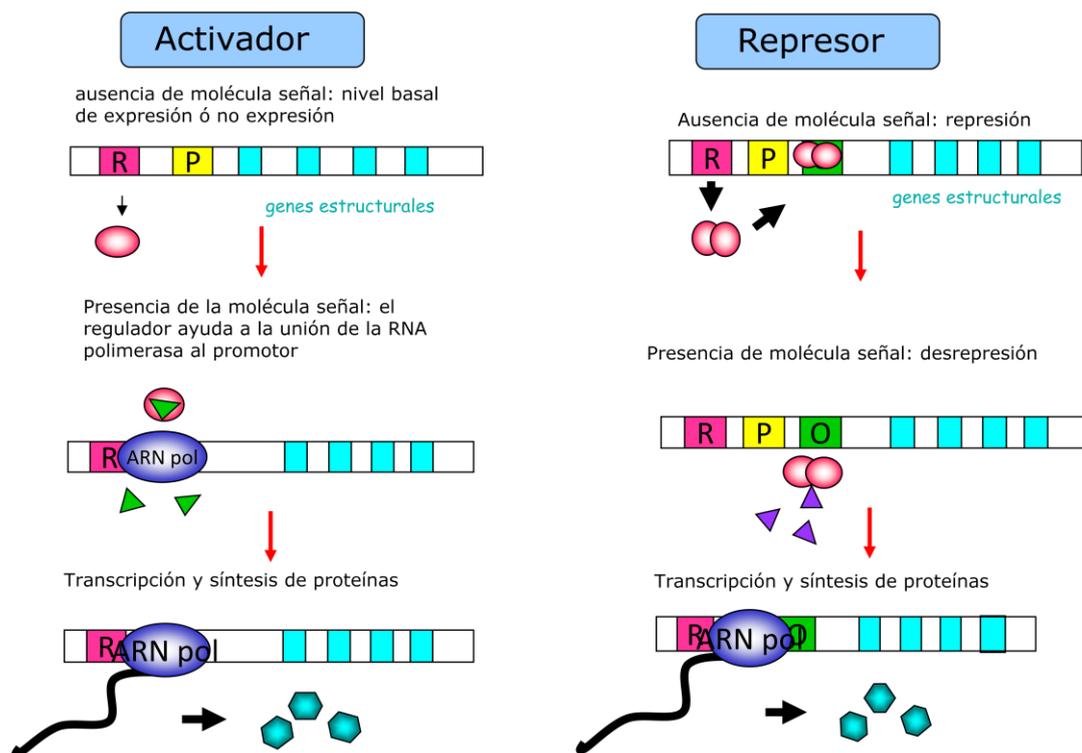


Figura 10. Mecanismos de interacción con el DNA de los reguladores transcripcionales activadores y represores.

Durante este trabajo de Tesis Doctoral se han utilizado promotores y reguladores de diferentes rutas metabólicas de degradación de compuestos aromáticos que se irán describiendo en la introducción del capítulo correspondiente de la memoria de Tesis Doctoral.

8. BIOSENSORES

Monitorizar la presencia de compuestos contaminantes en el agua, el aire y el suelo es fundamental para entender y manejar riesgos para la salud humana y el medio ambiente. Debido a las mayores exigencias reguladoras en temas medioambientales y al tiempo y los costes invertidos en los análisis químicos de las muestras ambientales existe una necesidad real de métodos simples, rápidos, baratos y que se puedan trasladar

al terreno. En este sentido los biosensores ofrecen una alternativa atractiva para un gran número de aplicaciones de seguimiento medioambientales.

La definición de biosensor generalmente aceptada en la bibliografía es la de un dispositivo autónomo integrado consistente en un elemento biológico de reconocimiento (enzima, anticuerpo, receptor o microorganismo), el cual se combina con un sensor químico transductor de señal de forma que ambos responden conjuntamente a determinados compuestos químicos de manera dependiente de concentración (Rodríguez-Mozaz *et al.*, 2005).

Existen diferentes tipos de biosensores, clasificados por el tipo de elemento biológico de reconocimiento. En la siguiente figura se muestra un esquema de los diferentes tipos de biosensores y, a continuación, se hace una breve descripción de cada uno de ellos.

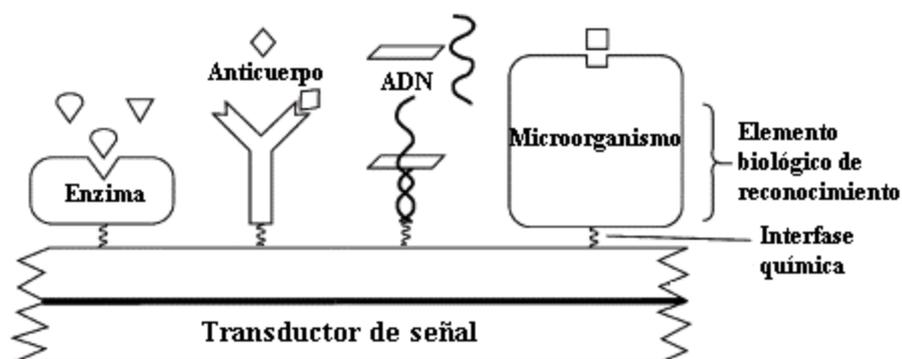


Figura 11. Representación esquemática de biosensores. *Modificado de Rogers, 2006.*

8.1 Biosensores basados en enzimas

Las enzimas fueron históricamente los primeros elementos moleculares de reconocimiento incluidos en los biosensores y continúan utilizándose como tal para aplicaciones medioambientales, como en el caso de la detección de pesticidas (Trojanowicz, 2002) y compuestos fenólicos (Dzyadevych *et al.*, 2002).

Estos biosensores utilizan la afinidad y selectividad catalítica de las enzimas hacia una molécula diana. Estos biosensores llevan un registro de los electrones que pasan a

través de la enzima hasta el electrodo o transductor (dispositivo que transforma un evento molecular de reconocimiento en una señal eléctrica medible) sobre el cual se encuentra depositada (Konry *et al.*, 2003).

Entre las ventajas de este tipo de biosensores se incluyen la capacidad de modificar las propiedades catalíticas o la especificidad de sustrato utilizando ingeniería genética y la amplificación catalítica de la respuesta del biosensor mediante la modulación de la actividad de la enzima con respecto al analito diana. Entre sus desventajas, se incluyen su alto coste debido a la necesidad de aislar la enzima, que estas son muchas veces inestables cuando se aíslan y a que bastantes enzimas necesitan cofactores para la detección de sustancias (Rogers, 2006; Mu *et al.*, 2011).

Como ejemplo, Kushwah *et al.*, 2011 desarrollaron un biosensor que detectaba fenol mediante una lacasa procedente del hongo *Pleurotus ostreatus*, la cual se inmovilizó sobre una película de polianilina.

8.2 Biosensores basados en anticuerpos

En este caso, los biosensores basados en anticuerpos pueden ser no competitivos (Figura 12A) o competitivos (Figura 12B).

El primer paso de estos ensayos, en ambos casos, consiste en tratar la superficie del transductor modificado (con el anticuerpo específico contra el analito que se desea investigar) con reactivos bloqueantes (tales como la sueroalbúmina bovina) para minimizar la adsorción inespecífica.

En el caso del formato no competitivo (Figura 12A), se incuba el biosensor previamente tratado con la muestra problema durante un tiempo prefijado y se lava el material adsorbido inespecíficamente en la superficie del transductor modificado (Figura 12A, paso b). Después (Figura 12A, paso c) se añade un anticuerpo marcado enzimáticamente con especificidad hacia el analito y que se une a éste por otro epítipo

distinto al que se ha unido con el anticuerpo inmovilizado. Tras lavar la superficie para remover el conjugado enzimático que no se ha adsorbido específicamente, se adiciona en exceso el sustrato de la enzima que va unida al anticuerpo secundario (Figura 13A, paso d) y se mide la intensidad de corriente, que corresponde a la velocidad máxima de la reacción enzimática (saturación por el sustrato) y que es, por tanto, proporcional a la actividad enzimática en la superficie del transductor y a la concentración del analito en la muestra.

En el caso del formato competitivo (Figura 12B) después de tratar la superficie, se incuba el biosensor en presencia del analito y de un conjugado enzimático que consiste en el propio analito modificado con una enzima (Figura 12B, paso b). Durante un tiempo prefijado, el analito y el conjugado enzimático compiten por los sitios de unión del anticuerpo inmovilizado sobre el transductor. Tras lavar la superficie del biosensor para eliminar las especies adsorbidas inespecíficamente (Figura 12B, paso c) se añade en exceso el sustrato de la enzima conjugada al analito (Figura 12B, paso d) y se mide la intensidad de corriente, que es inversamente proporcional a la concentración del analito en la muestra.

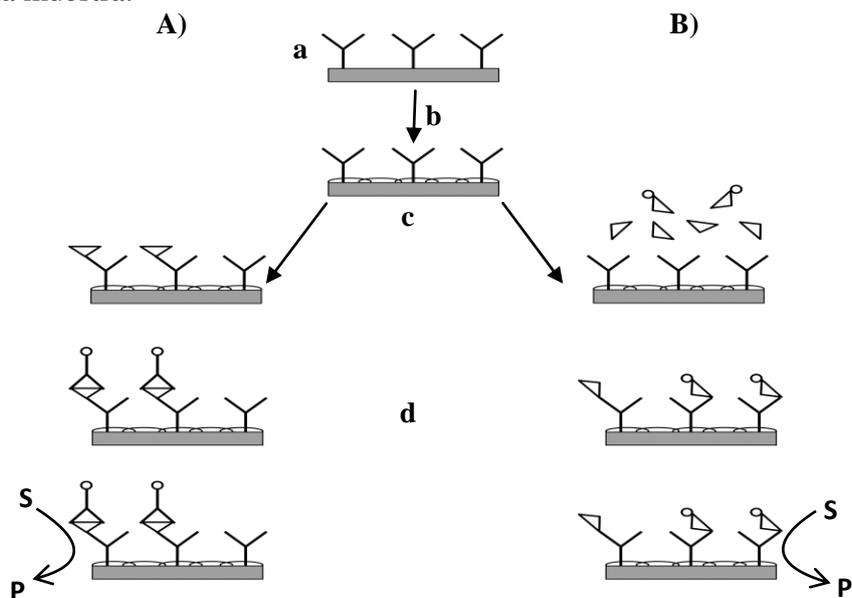


Figura 12. Biosensor basado en anticuerpos. *Modificado de Alegret et al., 2004.*

Este tipo de biosensores en formato competitivo se ha usado, por ejemplo, para determinar la calidad de aguas continentales, mediante la detección de microcistinas (compuestos que resultan tóxicos para distintos organismos, incluidos los seres humanos) (Herranz *et al.*, 2012).

8.3 Biosensores basados en DNA

En estos biosensores, el proceso de reconocimiento de DNA se basa en el principio de los pares de bases complementarios, adenina:timina y citosina:guanina. Si el ácido nucleico diana es conocido, la secuencia complementaria se puede sintetizar, etiquetar y después inmovilizar en el biosensor, de tal manera que las sondas de hibridación se pueden unir a las secuencias diana, generando una señal óptica (la más utilizada para este tipo de biosensores) (Marazuela *et al.*, 2002).

Debido a su amplio rango de actividad física, química y biológica, los biosensores basados en ácidos nucleicos pueden utilizarse para muchos ensayos bioanalíticos (Rogers, 2006). Las moléculas de DNA catalíticamente activas se conocen como deoxiribozimas o DNAzimas y han sido utilizadas para el diseño de sensores de iones ya que las DNAzimas con actividades dependientes de metal se pueden obtener a través de la evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial (SELEX) o selección *in-vitro* (Liu *et al.*, 2004). En el ámbito de la contaminación este principio se ha utilizado para el diseño de un biosensor de Pb^{2+} . La DNAzima específica de Pb^{2+} se conoce como “8-17” DNAzima, cuya estructura secundaria se muestra en la Figura 13; se compone de una hebra DNA sustrato (17DS) y una hebra de DNA con actividad enzimática (17E). La hebra de sustrato contiene una unión simple a RNA (ribonucleósido adenosina, (rA)) que sirve como sitio de corte y una extensión de 12 bases en ambos lados complementarios a un oligonucleótido (12-mer) que va unido a nanopartículas de oro. La hebra de sustrato extendida (Sub_{AU}) que contiene las

nanopartículas (5'DNA_{Au}) y la DNAzima (17E) se ensamblan para formar agregados azules. Si los agregados se calientan por encima de su temperatura de fusión ($T_m=46^\circ\text{C}$ para agregados en cloruro sódico 300 mM), las nanopartículas se separan, dando como resultado color rojo. Si se permite que el sistema se enfríe despacio hasta temperatura ambiente y en ausencia de Pb^{2+} las nanopartículas se ensamblan de nuevo y forman agregados azules. Cuando hay Pb^{2+} en el medio el DNA catalítico rompe la hebra de sustrato (Figura 13B) inhibiendo la formación de los agregados de nanopartículas y dando como resultado color rojo (Figura 13C). Detectando y cuantificando el color, se puede inferir la cantidad de Pb^{2+} presente (Liu *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004).

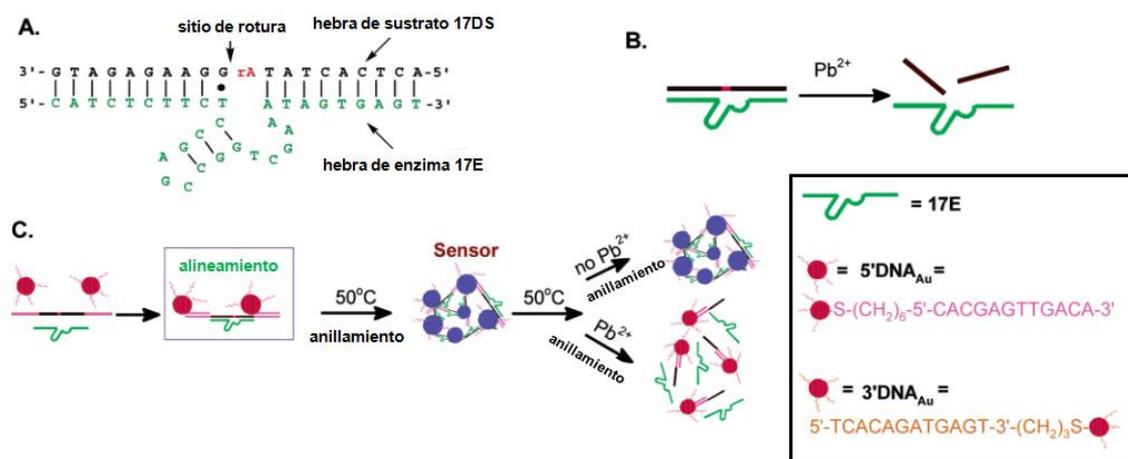


Figura 13. Biosensor basado en DNA. a) Estructura secundaria de la DNAzima “8-17”. b) Rotura de 17DS por 17E en la presencia de Pb^{2+} . c) Esquema del diseño del biosensor colorimétrico de Pb^{2+} .

Modificada de Liu et al., 2004.

8.4 Biosensores bacterianos

Los biosensores bacterianos son aquellos que usan a células microbianas vivas e intactas que han sido genéticamente modificadas para producir una señal apreciable en respuesta a un compuesto químico específico o un agente físico en su ambiente. Estos biosensores responden únicamente a la fracción biológicamente relevante que influye en la célula y que, en general, es capaz de pasar a través de las membranas celulares. Los

estudios de biodisponibilidad predicen la exposición real de los organismos en el medioambiente y son valiosos para la evaluación de riesgos y para la selección de opciones adecuadas de remediación (Liao *et al.*, 2006).

Dado que en la realización de esta Tesis Doctoral se van a construir biosensores de este tipo, profundizaremos más en su descripción.

8.4.1 Bases moleculares

El sistema de detección de los microorganismos biosensores está compuesto, en la mayoría de los casos, por un circuito genético simple, que posee dos elementos: un sistema regulador o sensor (por ejemplo un gen regulador y su promotor) y uno o más genes reporteros (Kuppardt, 2010) (Figura 14). El componente sensor regula la transcripción del gen reportero desde el promotor diana cuando la molécula efectora está presente en la célula. El nivel de la expresión del gen reportero se refleja en la actividad de la proteína reportera, la cual puede ser medida de forma continua o después de un periodo de calibración previamente determinado. A partir de la actividad de las proteínas reporteras, interpoladas en la curva de calibración, se pueden determinar las concentraciones de los compuestos diana o los flujos en muestras no conocidas (Sticher *et al.*, 1997).

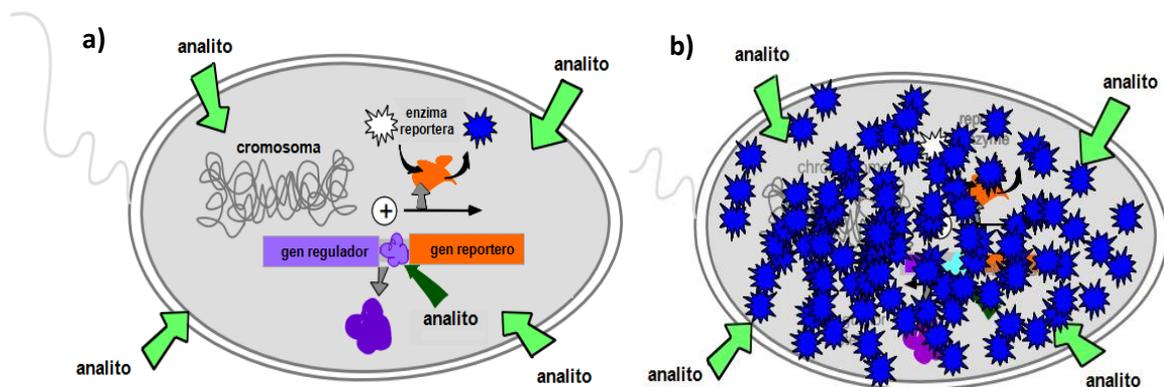


Figura 14. Principio de una bacteria biosensora. a) El analito lleva a un cambio conformacional de la proteína reguladora, el gen reportero adyacente se transcribe y, consecuentemente, la enzima reportera se

expresa. b) La bacteria reportera después del contacto con el analito. La célula contiene la proteína reportera, la cual se puede detectar directamente (por ejemplo, proteína verde fluorescente o GFP) o por el producto de una reacción (por ejemplo, β -galactosidasa). *Modificada de Harms et al., 2006.*

8.4.2 Genes reporteros

Hay gran variedad de genes reporteros disponibles; las señales que generan pueden clasificarse como colorimétricas, fluorescentes, luminiscentes, quimioluminiscentes o electroquímicas. A pesar de que cada uno funciona de manera distinta su producto final siempre debe ser el mismo; una señal medible, idealmente proporcional a la concentración del compuesto químico o agente físico al cual ha sido expuesto. En algunos casos, la señal solamente ocurre cuando se añade un sustrato secundario al ensayo (como por ejemplo cuando se usan los genes *luxAB*, o *luc* donde el sustrato es generalmente un aldehído de cadena larga). Para otros bioreporteros, la señal debe ser activada por una fuente de luz externa (GFP, mCherry y UMT) y para otros pocos la señal es completamente autoinducida, sin requerir ningún estímulo adicional externo debido a que se genera internamente el sustrato involucrado en la reacción de luminiscencia (*luxCDABE*) (Meighen, 1994).

La elección de los genes reporteros depende de factores como la expresión, eficiencia, estabilidad, actividad basal, método de detección y metodología de análisis (Daunert *et al.*, 2000) y puede variar en función de las condiciones experimentales y métodos de detección que se vayan a emplear.

Las proteínas reporteras más utilizadas son:

a) β -galactosidasa: Aunque muy utilizada para análisis de biología molecular en los laboratorios de investigación, para muestras ambientales no es un sistema demasiado adecuado, ya que la técnica requiere diversos reactivos y pasos secuenciales para poder cuantificar la señal (Miller, 1972).

b) Luciferasa (*Lux*): Luciferasa es un nombre genérico para una enzima que cataliza una reacción de emisión de luz. Los genes de la luciferasa se hallan de forma natural en bacterias, algas, hongos, medusas, insectos y calamares, y la luz resultante que producen estos organismos es llamada bioluminiscencia (Widder, 2010). En bacterias, se han aislado los genes responsables de la reacción de emisión de luz (los genes *lux*) y estos se han usado en la construcción de biosensores que emiten luz con una intensidad máxima a 490 nm (Tinikul *et al.*, 2012). El sistema genético completo *lux* consiste en cinco genes, *luxA*, *luxB*, *luxC*, *luxD* y *luxE* pero en la mayoría de biosensores se han incorporado sólo los genes *luxAB* (Tabla 2), con el inconveniente de que para producir bioluminiscencia necesitan de la adición de un aldehído de cadena larga (generalmente decanal o dodecanal) en algún momento del bioensayo, aunque se piensa que el tetradecanal es el sustrato natural para la reacción de luminiscencia (Meighen, 1994). La luciferasa de la luciérnaga es una variedad de luciferasa que cataliza una reacción que produce luz visible en el rango de 550-575 nm. Esta necesita la adición de un sustrato exógeno (luciferina) para que ocurra la reacción luminosa. Se han construido numerosos biosensores basados en los genes *luc* (de la luciferasa) para la detección de un amplio rango de compuestos orgánicos e inorgánicos de interés ambiental (Nivens *et al.*, 2003).

c) Proteína verde fluorescente (GFP): la proteína verde fluorescente (GFP) es una proteína aislada y clonada de la medusa *Aequorea Victoria* (Misteli *et al.*, 1997). La GFP produce una señal verde fluorescente (pico de emisión a 509 nm y pico de excitación a 480 nm) sin necesidad de añadir un sustrato exógeno. Todo lo que necesita es una fuente de luz ultravioleta que active las propiedades fluorescentes de la proteína. Esta habilidad para autofluorescer hace que la GFP sea muy utilizada en la construcción de biosensores ya que se puede usar en tiempo real para monitorizar células vivas e

intactas. Además, es una proteína muy estable, por lo que se usa de forma extensiva en sistemas biosensores en bacterias, levaduras y plantas (Tsien, 1998). Esta proteína se ha alterado de forma que existen versiones que emiten en otras longitudes de onda (cian, rojo y amarillo) lo que ha permitido utilizarla como detector multidiana.

d) mCherry: esta proteína y la mayoría de las fluorescentes rojas derivan de los genes encontrados en *Disocoma sp.* Esta proteína produce una señal color rojo fluorescente sin necesidad de añadir un sustrato exógeno. Al igual que la GFP, todo lo que necesita es una fuente de luz ultravioleta que active sus propiedades fluorescentes (pico de emisión a 610 nm y pico de excitación a 587 nm) (Shaner *et al.*, 2004). Dentro de las proteínas de color rojo es de las más usadas habiendo sido citada en más de 200 artículos hasta la fecha (Clontech, 2014).

8.4.3 Aplicaciones de los biosensores bacterianos

Algunas de las ventajas de los biosensores bacterianos residen en el bajo coste de los equipos necesarios, el fácil protocolo de medida y la rapidez de respuesta (Harms *et al.*, 2006). Además, los avances de la ingeniería genética han facilitado la construcción de biosensores de forma eficaz (Kuppardt, 2010). La tecnología de biosensores puede ser usada como una alternativa en laboratorios con presupuestos bajos o para análisis multidianas. Además, debido a que se pueden miniaturizar, se pueden usar para la detección de compuestos diana incluso en ambientes espacialmente restringidos donde es muy difícil efectuar análisis químicos (Kuppardt, 2010).

Teniendo en cuenta su rango de detección y especificidad, los biosensores bacterianos se pueden usar como un sistema analítico para medir cuantitativamente ciertos compuestos en las muestras de interés. Al contrario que los métodos químicos, y debido a que están compuestos por células vivas, los biosensores bacterianos no miden la cantidad total de compuesto en el ambiente, sino que miden la fracción

biológicamente relevante que influye en la célula y que es capaz de pasar a través de las membranas celulares. Debido a esto se puede obtener información sobre el transporte hacia la célula, su dinámica de degradación a lo largo del tiempo, su distribución espacial a nivel microambiental y su posible toxicidad, de una forma no disruptiva, objetivo que no se puede lograr con la utilización de los métodos químicos. A pesar de ello, todavía no influyen en las decisiones sobre la gestión de los lugares contaminados, ya que todavía están en fase experimental y no se están aplicando en gran medida en ambientes reales (Harms *et al.*, 2006; Harms, 2007).

En esta Tesis Doctoral se aborda el diseño y construcción de biosensores bacterianos para la detección de hidrocarburos aromáticos que puedan ser utilizados en distintos nichos ecológicos, fundamentalmente en la detección de estos contaminantes en medios marinos.

OBJETIVOS

El objetivo general de esta Tesis Doctoral se encamina al desarrollo y caracterización de una batería de biosensores para detectar distintos hidrocarburos aromáticos monocíclicos y policíclicos en ambientes marinos y terrestres, con especial énfasis en la detección de estos contaminantes en medios marinos. Para alcanzar este objetivo general se propusieron los siguientes objetivos específicos:

1. Selección y caracterización de las distintas cepas hospedadoras de los biosensores construidos.
2. Desarrollo y caracterización de biosensores para la detección de hidrocarburos aromáticos monocíclicos basados en el sistema TodS-TodT y el promotor P_{todX} de *Pseudomonas putida* DOT-T1E.
3. Desarrollo y caracterización de un biosensor específico de naftaleno y compuestos derivados basado en la proteína reguladora PhnR y el promotor P_{phnS} de *Burkholderia* sp. MS3.
4. Desarrollo y caracterización de un biosensor de hidrocarburos aromáticos policíclicos basado en el promotor P_{phaA} de la dioxigenasa PhaA (primera enzima que participa en la degradación de PAHs) de *Novosphingobium* sp. HR1a.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. CEPAS BACTERIANAS

Los microorganismos utilizados en este trabajo se recogen en la Tabla 1.

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas.

Cepa	Fuente de carbono habitual en el laboratorio	Contaminante que degrada	Referencia
<i>Burkholderia</i> sp. MS3	Glucosa	Naftaleno, fenantreno	Rodríguez-Conde, 2011
<i>Novosphingobium</i> sp. HR1a	Glucosa	Naftaleno, fenantreno	Rodríguez-Conde, 2011
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	LB	-	Hanahan, 1983 y 1985
<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> , VT8	M276	Hexadecano, fenantreno	Nyugen <i>et al.</i> , 1999
<i>Alcalinovorax borkumensis</i> , SK2	Piruvato sódico	Alcanos	Yakimov <i>et al.</i> , 1998
<i>Thalassolituus oleivorans</i> , Mil-1	TWEEN 40	Alcanos	Yakimov <i>et al.</i> , 2004
<i>Oleispira antartica</i> , RB8	TWEEN 40	Alcanos, Tweens	Yakimov <i>et al.</i> , 2003
<i>Oleiphilus messinensis</i> , ME102	n-Hexadecano	Alcanos, alcanoatos	Golyshin, 2002
<i>Cycloclasticus zancles</i> , ME07	Naftaleno	Naftaleno, fenantreno	Dyksterhouse <i>et al.</i> , 1995
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	Citrato sódico	-	Ramos-Díaz <i>et al.</i> , 1998
<i>Pseudomonas putida</i> DOT-T1E	Citrato sódico	Tolueno	Ramos <i>et al.</i> , 1998

2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

Todos los medios de cultivo y soluciones fueron esterilizados bajo calor húmedo, en autoclave, a 120°C y a 1 atmósfera de presión. Los antibióticos se esterilizaron por filtración utilizando filtros estériles de nitrocelulosa de 0,22 µm de diámetro de poro.

2.1 Medios ricos

2.1.1 Bacterias no marinas

Como medio rico se utilizó el medio Luria-Bertani (LB) (Sambrook *et al.*, 1989), cuya composición es la siguiente: bacto-triptona, 10 g; extracto de levadura, 5 g; NaCl, 10 g; agua hasta 1 litro. Para la preparación de medio sólido LB, se añadió bacto-agar (Difco, ref 0140-01), hasta una concentración final del 2% (p/v).

La composición del medio SOC utilizado en las electroporaciones es la siguiente: bacto-triptona, 20 g; extracto de levadura, 5 g; NaCl, 0,5 g; KCl, 0,186 g; MgCl₂, 0,952 g; agua hasta 1 litro.

2.1.2 Bacterias marinas

Como medio rico se utilizó el medio M276, cuya composición es la siguiente: NaCl 80 g; casaminoácidos (con vitaminas), 7,5 g; citrato trisódico, 3 g; MgSO₄·7H₂O, 20 g; K₂HPO₄, 0,5 g; Fe(NH₄)₂(SO)₄·6H₂O, 0,05 g; peptona, 5 g; extracto de levadura, 1 g; H₂O hasta 1 litro. Para la preparación de medio sólido, se añadió bacto-agar (Difco, ref 0140-01), hasta una concentración final del 2% (p/v).

La composición del medio cLB utilizado en las transformaciones por conjugación es la siguiente: medio LB suplementado con 2% (p/v) de piruvato sódico; 0,0445% (p/v) Na₂HPO₄·2H₂O; 0,25% (p/v) NaNO₃; 1,15% (p/v) NaCl; 0,375% (p/v) KCl; 0,0735% (p/v) CaCl₂·2H₂O.

2.2 Medios mínimos

2.2.1 Bacterias no marinas

Para el cultivo en medio mínimo en bacterias no marinas se empleó una modificación del medio M9 (Sambrook *et al.*, 1989), cuya composición es la siguiente: solución 10x M9 100mL; solución A9 (goodies), 2,5 mL; MgSO₄ 1M; citrato férrico amónico 6% (p/v), 1 mL; H₂O hasta 1 litro. Para la preparación de medio sólido, se añadió bacto-agar (Difco, ref 0140-01), hasta una concentración final del 2% (p/v).

-Solución 10x M9: Na₂HPO₄.7H₂O, 70 g; KH₂ PO₄, 30 g; NH₂Cl, 10 g; NaCl, 5 g; H₂O hasta 1 litro.

-Solución A9: HBO₃, 300 mg; ZnCl₂, 50 mg; CuCl₂.H₂O, 10 mg; MnCl₂.4H₂O, 30 mg; CoCl₂, 200 mg; NiCl₂.6H₂O, 20 mg; NaMO₄.2H₂O, 30 mg; H₂O hasta 1 litro.

Como fuentes de carbono se utilizaron glucosa (10 mM), naftaleno, fenantreno, criseno y antraceno en cristales. Este compuesto es muy volátil por lo que pasa rápidamente a fase vapor de forma que está disponible para las bacterias.

2.2.2 Bacterias marinas

Para el cultivo en medio mínimo de bacterias marinas se utilizó el medio ONR7a. Se prepararon tres soluciones distintas que se autoclavaron separadamente. Se mezclaron después de autoclavar cuando se enfriaron, como mínimo, hasta 50°C. La solución 1 contenía: NaCl, 22,79 g; Na₂SO₄, 3,98 g; KCl, 0,72 g; NaBr, 83 mg; NaHCO₃, 31 mg; H₃BO₃, 27 mg; NaF, 2,6 mg; NH₄Cl, 0,27 g; Na₂HPO₄.7H₂O, 89 mg; TAPSO, 1,3 g. Esta solución se debe ajustar hasta pH 7,6. La solución 2 contenía: MgCl₂.6H₂O, 11,18 g; CaCl₂.2H₂O, 1,46 g; SrCl₂.6H₂O, 24 mg. La solución 3 contenía: FeCl₂.4H₂O, 20 mg. Estos valores están referidos a un volumen total de 1 litro.

2.3 Antibióticos

Las soluciones de antibióticos se prepararon a una concentración 1000 veces superior a la concentración final de los ensayos, disolviéndolos en agua destilada, excepto el cloranfenicol que se preparó en etanol absoluto y tanto la tetraciclina como la rifampicina que se disolvieron en metanol. Las soluciones preparadas en agua 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 a las concentraciones finales siguientes: Ampicilina (Ap), 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Cloranfenicol (Cm), 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Kanamicina (Km), 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Gentamicina (Gm), 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Estreptomicina (Sm), 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Tetraciclina (Tc), 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Rifampicina (Rf) 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

2.4 Condiciones de cultivo

Las condiciones de cultivo de cada una de las cepas se recogen en la Tabla 2. La velocidad de agitación de los matraces fue de 200 rpm en todos los casos.

Tabla 2. Condiciones de cultivo de cada una de las cepas.

Cepa	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)
<i>Burkholderia</i> sp. MS3	30
<i>Novosphingobium</i> sp. HR1a	30
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	37
<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> , VT8	30
<i>Alcalinovorax borkumensis</i> , SK2	30
<i>Thalassolitus oleivorans</i> , Mil-1	30
<i>Oleispira antartica</i> , RB8	4
<i>Oleiphilus messinensis</i> , ME102	30
<i>Cycloclasticus zancles</i> , ME07	30

2.5 Preparación de las distintas soluciones con los inductores

Las disoluciones de hidrocarburos aromáticos policíclicos (naftaleno/fenantreno/antraceno/pireno) se prepararon de igual manera. En primer lugar se añadieron varios cristales del PAH a 10 mL de medio M9/ONR7a en un matraz de 125 mL cerrado y recubierto con parafilm. Se dejó una noche agitando para conseguir una solución saturada de estos compuestos. Al día siguiente se efectuaron diluciones para obtener distintas concentraciones de estos compuestos y se añadieron al cultivo a inducir.

Las disoluciones de baja concentración de hidrocarburos aromáticos monocíclicos, gasolina (Star Gasolina CEPSA) y gasoil (Star Diesel Gasóleo A+ CEPSA) se realizaron de igual manera. En primer lugar se añadió la cantidad correspondiente a un matraz con 10 mL de medio M9/ONR7a y se agitó vigorosamente (con el matraz cerrado). Posteriormente se añadió la cantidad adecuada al cultivo a inducir. Para las concentraciones más altas de hidrocarburos aromáticos monocíclicos, gasolina y gasoil se añadió directamente el compuesto puro al matraz que contenía el cultivo.

En el caso de otros compuestos volátiles como, los naftalenos sustituidos (1-metilnaftaleno, 2-metilnaftaleno, 1-bromonaftaleno, 1-cloronaftaleno y 1,2-dinitronaftaleno) se utilizaron varillas de vidrio que contenían 30 μ L del compuesto.

Para las muestras de sedimentos de Gela (mesocosmos con petróleo de un derrame producido en las costas de Gela, Italia) y del puerto de Mesina (Italia) se añadieron 5 g de sedimento a 5 mL de agua en matraces cerrados y recubiertos con parafilm, se agitaron vigorosamente y se dejaron reposando toda la noche. Al día siguiente se centrifugó esta solución y se cogió la cantidad de líquido correspondiente para cada experimento.

Para obtener una solución saturada de petróleo del Prestige (accidente de noviembre de 2002) se añadieron 4 g de petróleo a 100 mL de medio en un frasco cerrado y cubierto con parafilm y se dejó toda la noche agitando. Al día siguiente se utilizó la cantidad de líquido correspondiente para cada experimento de inducción.

Por último, para obtener una solución saturada de Dansk crudo (provisto por Fernando Rojo, Centro Nacional de Biotecnología) se añadió 2 g de crudo a 50 mL de medio en un frasco cerrado y cubierto con parafilm. Al día siguiente se utilizó la cantidad de líquido correspondiente.

3. PLÁSMIDOS

Los plásmidos utilizados en este estudio se detallan a continuación.

pMBL-T[®]: este vector de 2,9 kb de tamaño y da resistencia a ampicilina, está diseñado para el clonaje de productos de PCR. Los vectores pMBL son digeridos con EcoRV y se les añade una timina a cada extremo 3'. Ello permite la ligación de productos de PCR generados con polimerasas que añaden una adenina en cada extremo del producto de PCR, tales como la MBL Taq DNA polimerasa, la MBLong DNA polimerasa, la MBL HOT Start DNA polimerasa y la MBLong HOT Start DNA polimerasa. El vector tiene el origen de replicación ColE1 y un número de copias/célula de entre 500-700 moléculas. La presencia del α -péptido permite tanto la complementación como la inactivación de la actividad β -galactosidasa por inserción de bandas de PCR (Molbiolab, 2004)

pMP220: es un plásmido de aproximadamente 10,5 kb, que da resistencia a tetraciclina, derivado del vector pTJS75 (Schmidhauser *et al.*, 1985) perteneciente al grupo de incompatibilidad IncP. Posee el sitio de clonación múltiple (MCS) de pIC20H (Marsch *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 β -galactosidasa (Spaink *et al.*, 1987).

pGreenTIR: este plásmido de aproximadamente 3,5 kb y que confiere resistencia a ampicilina, contiene los genes *GFP* unidos a una región optimizada de inicio de la traducción (TIR) que aumenta el nivel de fluorescencia (Miller *et al.*, 1997).

pSEVA637: es un plásmido de aproximadamente 3,7 kb que contiene el gen reportero sin promotor, *GFP* y confiere resistencia a gentamicina. La clonación de promotores delante del gen reportero permite medir la expresión de los mismos como fluorescencia (Silva-Rocha *et al.*, 2013).

pSEVA438: (Silva-Rocha *et al.*, 2013) que contiene el sistema *XylS-P_m* de regulación sensible a benzoato y *m*-toluato procedente del plásmido TOL de *Pseudomonas putida* mt-2 y confiere resistencia a estreptomicina.

4. AISLAMIENTO DE DNA

Para el aislamiento se utilizaron distintos métodos según el tipo de DNA, la pureza requerida y la cantidad que se quisiera obtener.

4.1 Aislamiento de DNA plasmídico

Para la preparación rápida de DNA plasmídico libre de RNA se utilizó el sistema “*Quantum Prep plasmid miniprep kit*” (Bio-rad), partiendo de un volumen de cultivo de 1,5 mL y siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.2 Aislamiento de DNA cromosómico

La extracción de DNA cromosómico se realizó con el “*Wizard Genomic DNA Purification Kit*” (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante y partiendo de un volumen de cultivo de 1 mL.

5. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE DNA

5.1 Determinación de la concentración de DNA

La concentración de DNA de una solución se determinó espectrofotométricamente utilizando un Nanodrop (ND-1000 *Spectrophotometer*). Se determinó la absorbancia de DNA a 260 nm frente a un blanco de agua. La concentración de DNA de la muestra se calculó respecto al valor estándar de $A_{260}=1$ para soluciones con 50 $\mu\text{g/mL}$ de DNA de cadena doble.

5.2 Electroforesis de DNA

La electroforesis de DNA se llevó a cabo según Sambrook *et al.*, 1989, utilizando geles de agarosa preparados en tampón Tris/Acetato/EDTA (TAE) (Tris-base 4,84 g; ácido acético glacial 1,14 mL; EDTA- Na_2 0,5M pH 8, 2 mL y agua hasta 1 litro. Este tampón se preparó a partir de una solución 50 veces concentrada y esterilizada en autoclave). La concentración de agarosa usada variaba entre 0,8-2% (p/v) en función del tamaño de los fragmentos que se deseaba separar. Para cada muestra a analizar se añadió 3 μL de tampón de carga (0,25% de Bromophenol Blue; 0,25% de Xylen Cuanol FF, 33% de glicerol, 66,6% de agua autoclavada). Como patrones de peso molecular se usó el marcador comercial *Wide-Range DNA Ladder 50-10000 bp* (Takara). La separación se realizó por electroforesis horizontal sumergida a un voltaje de 5-10 V/cm.

Las moléculas de DNA separadas en el gel se tiñeron por inmersión en una solución con bromuro de etidio o GelRed (Biotium, Inc.). Tras lavar con agua para eliminar el exceso de colorante, el DNA se visualizó mediante la exposición del gel a luz ultravioleta (245 nm). Las imágenes se recogieron con una videocámara acoplada a una impresora térmica, utilizando el equipo Gel-Doc de BioRad.

5.3 Recuperación de fragmentos de DNA de los geles de agarosa

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

5.4 Digestión de DNA con enzimas de restricción

Las digestiones de DNA 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 DNA, 0,1 volúmenes del tampón de restricción correspondiente suministrado por la casa comercial (10 veces concentrado) y 0,5-1 unidades del 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.

5.5 Ligación de DNA

Para la ligación de moléculas de DNA se partió de plásmidos lineales (pMBL-T[®]) 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 DNA lineal se le añadió 1 unidad de fosfatasa alcalina (Roche Applied Science, ref. 04898133001) por cada 5-10 pmoles de extremos 5'. A la mezcla se le añadió 0,1 volúmenes de 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 DNA 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 DNA 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 10.

5.6 Reacción en cadena con DNA polimerasa (PCR)

Este método se utilizó para el análisis de las colonias obtenidas tras la transformación de ligaciones y para la amplificación de fragmentos a los que se les añadió sitios de restricción adecuados flanqueando los fragmentos de DNA de interés. La reacción estándar de amplificación contenía: DNA molde (0,2 ng de DNA cromosómico o 10 μg de DNA plasmídico), oligonucleótidos (25-50 moles), 0,1 volúmenes del tampón de la Taq DNA-polimerasa (KCl 50mM, MgCl₂ 1,5mM, Tris-HCl 10mM, pH 9), dNTPs 25-50 μg de cada uno, Taq DNA-polimerasa 0,1 U/25 μL y agua hasta un volumen final de 25 μL .

Las condiciones estándar de la reacción de amplificación fueron las siguientes: tras una desnaturalización inicial a 94°C durante 2 min, se realizaron 30 ciclos en las siguientes condiciones: 30 s a 94°C, 1 min a la temperatura de hibridación y 1 min por cada kb del fragmento que queremos amplificar a 72°C, tras los cuales se hizo una extensión final a 72°C durante 7 min. La temperatura de hibridación varió en función de la temperatura de fusión de los oligonucleótidos utilizados.

Los productos de amplificación se purificaron utilizando el sistema comercial “*QIAquick Gel Extraction Kit*” (QIAGEN, ref. 28704) para eliminar los oligonucleótidos y dNTPs incorporados.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Nombre	Secuencia (5'→3')	Enzima de restricción	Construcción
phnA+1	CTGTCGGCGTGGAATC		+1
phnA int+1-F	GTCAATGCTAGCCAGTCC		+1
phnA int+1-R	GAGTGGTGTCCGCGCT		+1
phnA1-K	<u>GGGGTACCGCC</u> ACGATGTGCTGCCAGGC	<i>KpnI</i>	Mutante de <i>pahA</i>
phnA1-B	<u>CGGGATCC</u> CTGTCCGGCGTGCAAATCTG	<i>BamHI</i>	Mutante de <i>pahA</i>
phnA2-B	<u>CGGGATCC</u> GACGATCTTGGATTGCAGTT	<i>BamHI</i>	Mutante de <i>pahA</i>
phnA2-S	<u>GCCTGCAGAT</u> GTTCTCTCCGATGTTG	<i>PstI</i>	Mutante de <i>pahA</i>
1956-F	CGTGCGATTTTGCTGGTG		Mutante de <i>pahR</i>
1956-R	GCGATGCAGGTTGCCGGC		Mutante de <i>pahR</i>
TodST for	<u>CCCCGCGGG</u> GATGATACGAGGGCGTATG	<i>SacII</i>	pKST-1
TodST rev	<u>AAGGATCC</u> ACTATTCCAGGCTATCCTTG	<i>BamHI</i>	pKST-1
GFP for	GGAAGGATTGTAATTATGAGTAAAGGAGAA		pKST-1
GFP rev	<u>AAGGATCC</u> CTATTTGTATAGTTCATCCA	<i>BamHI</i>	pKST-1
Ptodox for	<u>AAACTAGT</u> GGTCTGAGGTTTTTCATCGAC	<i>SpeI</i>	pKST-1
Ptodox rev	TTCTCCTTTACTCATAATTACAATCCTTCC		pKST-1
PhnR	<u>AAGGATCC</u> TCAGCGCTCCGGCG	<i>BamHI</i>	pKSN-1
PphnS	<u>TTAAGCTT</u> CACCGATCGATTGAC	<i>HindIII</i>	pKSN-1
phnAc-F	<u>CCGCGGA</u> ATAGGAGACAGACGATGGATACTA	<i>SacII</i>	pKSN-3
phnAd-R	<u>CCCCGATAT</u> CTCACAGAAAATCAGCATAT	<i>EcoRV</i>	pKSN-3
[LVA]N for	<u>TTAAGCTT</u> ATGCGTAAAG GAGAAGA	<i>HindIII</i>	pKSN-2
CHY for	<u>GGAATTC</u> TTCAATCCCAGTTGCATAGC	<i>EcoRI</i>	pKSPA-1
CHY rev	<u>AACTGCAG</u> GGCTCTCTCCGGTTTCACG	<i>PstI</i>	pKSPA-1
Pr1956-F	<u>GGAATTC</u> GATCGACTTCGGTCTGG	<i>EcoRI</i>	pKSPA3- <i>P_{pahR}::lacZ</i>

Nombre	Secuencia (5'→3')	Enzima de restricción	Plásmido
Pr1956-R	<u>CCGCGGCCGC</u> TACCGCCCGATCTTTTC	<i>NotI</i>	pKSPA-3
Rbs-1956-F	<u>CCCCGCGGACACATAATTTGAGTATG</u>	<i>SacII</i>	pKSPA-4
1956-R	<u>CCCCGATATC</u> TACCGCCCGATCTTTTC	<i>EcoRV</i>	pKSPA-4
[LVA]P for	<u>AACTGCAGATGCGTAAAG</u> GAGAAGAA	<i>PstI</i>	pKSPA-2
[LVA] rev	<u>AAACTAGTTAAGCTACTAAAGCGTAGT</u>	<i>SpeI</i>	pKSPA-2
Pr1956-2-R	<u>AACTGCAGCTCAAATTATGTGTAGAG</u>	<i>PstI</i>	<i>P_{pahR}::lacZ</i>

5.7 Preparación de RNA, RT-PCR y RACE

Novosphingobium sp. HR1a se creció durante una noche en medio mínimo M9 con glucosa. Entonces, las células se diluyeron 100 veces en medio fresco hasta que los cultivos alcanzaron una turbidez de aproximadamente 1 a 660 nm.

Las células se recogieron mediante centrifugación (5000 x g durante 10 minutos) y se procesaron para el aislamiento de su RNA de acuerdo con el método de Marques *et al.*, (1993).

5'RACE se hizo utilizando el 5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0 (Invitrogen™), utilizando 5 µg de RNA y los oligonucleótidos phnA+1, phnA int+1-F y phnA int+1-R.

6. TRANSFERENCIA DE PLÁSMIDOS

6.1 Transformación por choque térmico

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

6.1.1 Preparación de células competentes

Para preparar células competentes partimos de un método derivado del escrito por Cohen *et al.*, 1972.

Partimos de un cultivo que haya estado creciendo durante 12 h a 37°C con agitación, en LB. De este se inocularon 0,5 mL 100 mL de LB. Cuando el cultivo alcanza una densidad óptica de 0,4-0,5 se recogieron las células mediante centrifugación a 4°C y se resuspendieron en 50 mL de una solución de CaCl₂ 0,1 M. Las células se incubaron durante una hora en hielo en cámara fría y con agitación orbital. Transcurrido ese tiempo se volvieron a recoger las células por centrifugación y se resuspendieron en 10 mL de CaCl₂ dejándose una hora 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.

6.1.2 Transformación

Se siguió el método descrito por Nishimura *et al.*, (1990). Una alícuota de la suspensión celular preparada anteriormente, mantenida a -80 °C, y a la que se le añadió el DNA plasmídico que queríamos transformar, se dejó en hielo durante 20 min. Pasado este tiempo, se aplicó un choque térmico a la mezcla sometiéndola a 37 °C durante 30-40 segundos y luego en frío durante 2 min. Posteriormente se añadió 1 mL de medio LB y se incubó a 37°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 12 h a 37°C.

6.2 Electrotransformación

6.2.1 Preparación de células electrocompetentes

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

Se recogió 1 mL de cultivo crecido en LB durante 12 h a 30°C. Seguidamente se hicieron tres lavados para eliminar las sales del medio, para ello las células se centrifugaron a 12000 rpm 1 min y se resuspendieron en agua estéril. Después de los lavados, las células se resuspendieron en 40 µL de agua estéril y se mantuvieron en hielo hasta el pulso eléctrico.

6.2.2 Electroporación

Se añadieron 10-50 ng de DNA plasmídico a las células electrocompetentes. Se dejaron 1 minuto en hielo y posteriormente se transfirieron a una cubeta de electroporación de 1 mm 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 1 mL de medio SOC y se incubaron a 30 °C y 200 rpm durante dos horas. Las células transformantes se seleccionaron recreciéndolas en placas de LB con el antibiótico adecuado durante 12 h a 30°C.

6.3 Transferencia por conjugación

Para la conjugación bacteriana de la cepa *Alcanivorax borkumensis* SK2 se utilizó el método descrito por Sabirova *et al.*, 2006.

Se incubó la cepa *A. borkumensis* a 30°C en medio ONR7a hasta que se alcanzó la fase estacionaria y las células se centrifugaron a 3200 rpm a 4°C. El cultivo donador de *E. coli* (DH5α) y el “ayudante” HB101 (pRK600) se cultivaron durante toda la noche a 37°C en medio LB con sus antibióticos correspondientes. Estos se centrifugaron a 3200

rpm a 4°C y se lavaron con cLB. Seguidamente se resuspendieron en 1 mL de cLB en las siguientes proporciones: Donador 1: Receptor 4: Ayudante 2.

Posteriormente se mezclaron y se depositaron en un filtro milipore desmontable estéril de 0,22 µm de diámetro de poro en una placa de cLB sólido y se incubaron de 7 a 8 horas a 30 °C.

Después se pasó el filtro a un tubo con 1 mL de ONR7a y se agitó hasta que las bacterias se separaron del filtro. Posteriormente, se hicieron diluciones y se sembraron 100 µl de cada dilución y de la solución original en medio selectivo (ONR7a+agar+antibiótico selectivo). Por último se dejó incubar a 25°C.

7. CRECIMIENTO EN PAHs Y DEGRADACIÓN DE PAHs

La bacteria *Novosphingobium* sp. HR1a se cultivó durante la noche en medio mínimo M9 junto con glucosa como fuente de carbono. El día anterior a la inoculación se prepararon matraces conteniendo 25 mL de medio mínimo M9 y 2,5 mg de PAHs para obtener la máxima disolución de PAHs (la solubilidad de estos en agua es baja) y trabajar en condiciones de saturación.

Los hidrocarburos aromáticos monocíclicos se añadieron a una concentración de 0,5 mM, con la excepción de salicilato que mostró ser tóxico a esta concentración. En este caso, el salicilato se añadió a 0,1 mM durante los primeros 3 días.

Los matraces se inocularon para alcanzar $D.O_{660nm}$ de 0,1 y se cultivaron a 30 °C en agitador orbital (200 rpm). Se tomaron muestras a diferentes tiempos para medir la turbidez del cultivo y densidad celular.

8. CINÉTICA DE MUERTE CON TOLUENO

Para el estudio de la tolerancia a disolventes de *Alcanivorax borkumensis* SK2, *Pseudomonas putida* KT2440 y *Pseudomonas putida* DOT-T1E se crecieron las cepas

durante una noche y al día siguiente se diluyeron a una D.O de 0,1 en medio marino ONR7a con piruvato sódico (1 %) en el caso de *A. borkumensis* SK2 y en LB en el caso de las *Pseudomonas*. Se crecieron hasta una fase aproximadamente a mitad de la exponencial (D.O \approx 0,6) y se dividieron en tres matraces: se añadió 0,1 % y 0,2 % (v/v) de tolueno a dos matraces y el tercero se mantuvo como control. Se tomaron muestras a 0, 15 y 30 minutos después de la adición de tolueno y se sembraron diluciones para obtener el número de células viables.

9. CONSTRUCCIÓN DE LAS CEPAS MUTANTES EN *pahA* y *pahR*

Para la construcción del mutante de *pahA* en *Novosphingobium* sp. HR1a se amplificaron dos fragmentos del gen: un fragmento de 620 pb utilizando los oligonucleóticos phnA1-K , phnA1-B que contenían las dianas de restricción *KpnI* y *BamHI* respectivamente y un fragmento de 710 pb con los oligonucleótidos phnA2-B y phnA2-S que contienen los sitios de restricción *BamHI* y *PstI* respectivamente. Estos dos fragmentos se cortaron con las enzimas de restricción que llevaban incorporadas y se clonaron en pGEM-Zf previamente cortado en las *KpnI* y *PstI*. El plásmido resultante se transformó en *E. coli*. DH5a. Tras la comprobación del plásmido, éste se cortó con *BamHI* y se ligó con el fragmento Ω -Kam del plásmido pHP45 Ω Km (Prentki y Krisch, 1989) que había sido cortado previamente con la misma enzima y extraído de gel. La construcción resultante, que contenía dos fragmentos del gen *pahA* interrumpidos con el gen de resistencia a kanamicina se electroporaron en *Novosphingobium* sp. HR1a. Se seleccionaron las cepas resistentes a kanamicina y tras comprobación por Southern blot se eligió una cepa transconjugante en la que se había incorporado el marcador de resistencia por doble recombinación.

En el caso del mutante de *pahR* en *Novosphingogium* sp. HR1a se amplificó un fragmento de 301 pb a partir de DNA genómico de *Novosphingobium* sp. HR1 usando los oligonucleótidos 1956-F y 1956-R.

Este fragmento fue clonado en el plásmido pMBL-T e introducido en *E. coli* por transformación. Este plásmido fue digerido con *Bam*HI y el casete Ω -Km del plásmido pHP45 Ω Km (Prentki y Krisch, 1989) que, previamente había sido digerido con *Bam*HI, fue ligado en estos plásmidos. El plásmido resultante se electroporó en *Novosphingobium* sp. HR1a. Los transformantes que llevaban el plásmido integrado en el cromosoma mediante recombinación homóloga se seleccionaron en placas de LB con kanamicina y se comprobaron por hibridación Southern Blot.

10. CONSTRUCCIÓN DE LOS SISTEMAS BIOREPORTEROS

10.1 Bioreportero de hidrocarburos aromáticos monocíclicos (pKST-1)

En primer lugar, se amplificaron por separado los genes *todST* (utilizando los oligos TodST for y TodST rev), el promotor P_{todX} de *P. putida* DOT-T1E (con los oligos P_{todx} for y P_{todx} rev) y el gen de la proteína verde fluorescente (con oligos GFP for y GFP rev), *gfp*, del plásmido pGreen-TIR (Miller *et al.*, 1997). Posteriormente, mediante PCR solapante se amplificó el fragmento $P_{todX}::gfp$ usando como molde los productos de PCR obtenidos anteriormente (P_{todX} y *gfp*) y con los oligos P_{todx} for y GFP rev. Por último, los amplicones correspondientes a los genes *todST* y a la fusión $P_{todX}::gfp$ se cortaron con las enzimas *Sac*II, *Bam*HI y *Spe*I, *Bam*HI respectivamente y se se introdujeron en el plásmido pSEVA438 cortado previamente con *Sac*II y *Spe*I, resultando el plásmido pKST-1 (Figura 1).

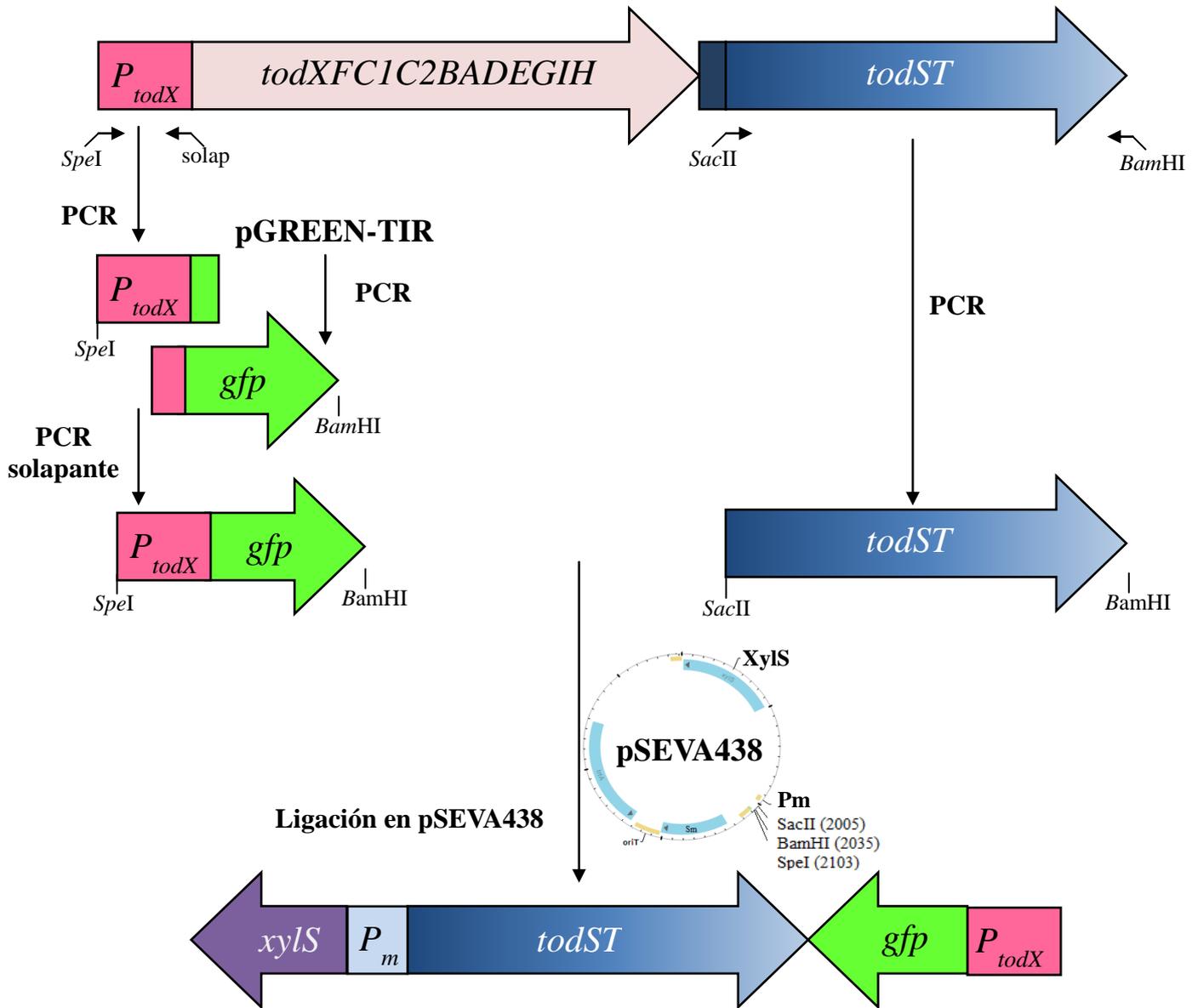


Figura 1. Estrategia para la construcción del sistema bioreportero de hidrocarburos aromáticos monocíclicos pKST-1.

10.2 Bioreportero de naftaleno y derivados (pKSN-1)

Para la construcción del biosensor y con la idea de introducirlo en diferentes cepas hospedadoras, se amplificó la proteína reguladora PhnR junto con el promotor P_{phnS} procedente de *Burkholderia* sp. MS3 por PCR con oligonucleótidos diseñados con sitios diana para las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III (P_{phnS} for y PhnR rev). Posteriormente este fragmento se cortó con éstas enzimas de restricción y se clonó en el plásmido pSEVA637 que había sido previamente cortado con las mismas enzimas

(Silva-Rocha *et al.*, 2013), quedando fusionado este promotor con la proteína verde fluorescente que ya se encontraba previamente en pSEVA637 obteniéndose el plásmido pKSN-1 (Figura 2).



Figura 2. Esquema del sistema bioreportero pKSN-1 de naftaleno y derivados

10.3 Bioreportero sistemas heterólogos de naftaleno y derivados (pKSN-3)

En primer lugar se amplificó la dioxigenasa *phnAcAd* procedente de *Burkholderia* sp. MS3 mediante PCR con oligonucleótidos diseñados con sitios diana para las enzimas de restricción *SacII* y *EcoRV* (con los oligos *phnAc-F* y *phnAd-R* mostrados en Tabla 3). Este fragmento se cortó con las enzimas indicadas y se clonó en el plásmido pSEVA438 que había sido previamente cortado *SacII* y *SmaI* (extremo romo). El plásmidos resultante se cortó con *PacI* y *BamHI* para obtener el fragmento *XylS-P_m-PhnAcAd* y que se introdujo en el plásmido pKSN-1 previamente cortado con las mismas enzimas, dando como resultado pKSN-3.

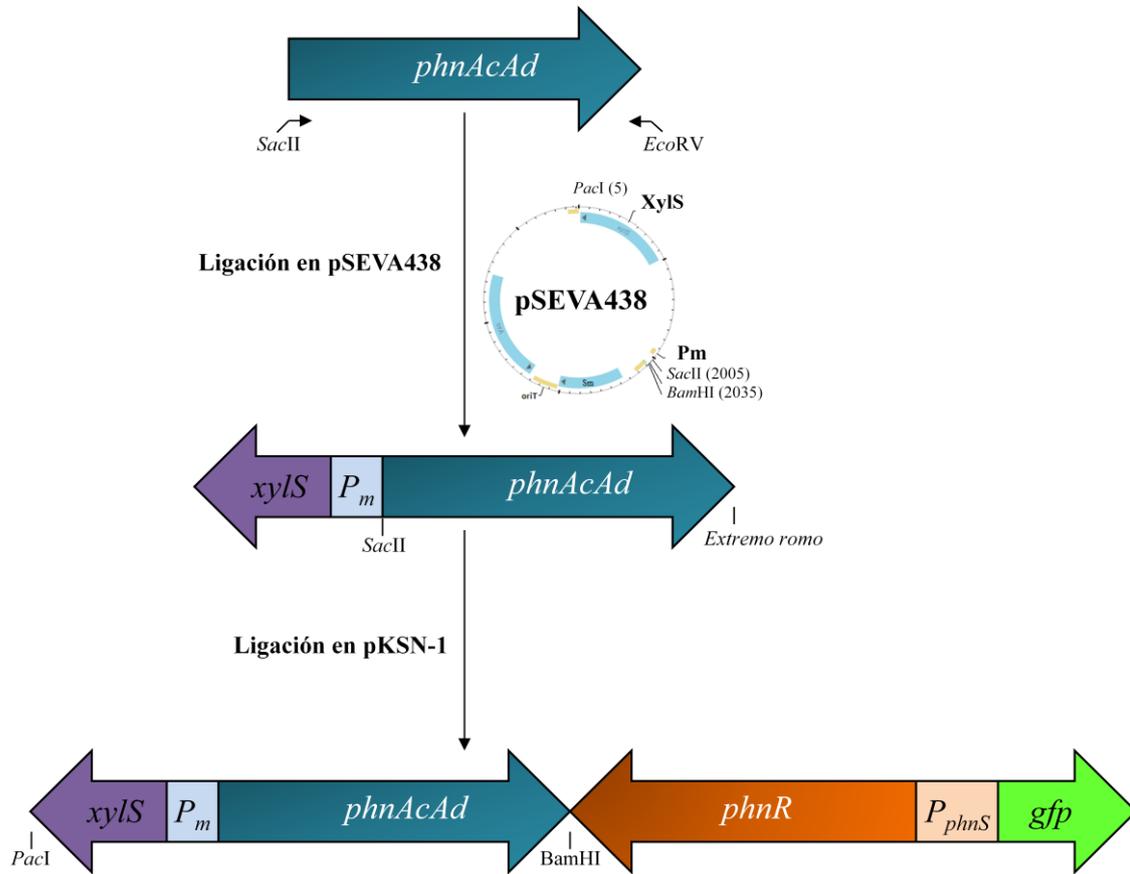


Figura 3. Esquema del sistema bioreportero pKSN-3 de naftaleno y derivados para sistemas heterólogos.

10.4 Bioreportero de naftaleno y derivados con GFP inestable (pKSN-2)

En primer lugar se amplificó la GFP inestable, del plásmido pGfLR1 proporcionado por el grupo de Víctor de Lorenzo, mediante PCR con los oligonucleótidos [LVA]N for y [LVA] rev diseñados con sitios diana para las enzimas de restricción *HindIII* y *SpeI* y se clonó en el plásmido pGEM-T. El plásmido resultante se cortó con estas enzimas de restricción y el fragmento con la GFP fue extraído de gel y clonado posteriormente en el plásmido pKSN-1 al que previamente, mediante digestión con *HindIII* y *SpeI*, se le había extraído la GFP estable, dando como resultado el plásmido pKSN-2 (Figura 4).



Figura 4. Esquema del sistema bioreportero pKSN-2 de naftaleno y derivados con GFP inestable.

10.5 Bioreportero de hidrocarburos aromáticos policíclicos (pKSPA-1)

Se procedió a la amplificación mediante PCR el promotor P_{pahA} con los oligonucleótidos CHY for y CHY rev (Tabla 3) diseñados con sitios diana para las enzimas de restricción $EcoRI$ y $PstI$. Este amplicón se cortó con las enzimas de restricción mencionadas y se fusionó posteriormente con gen que codifica la proteína verde fluorescente (GFP) que se encontraba en el plásmido pSEVA637 que había sido previamente cortado con las mismas enzimas de restricción (Silva-Rocha *et al.*, 2013) (Figura 5).

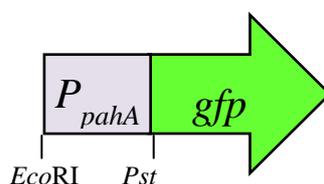


Figura 5. Esquema del sistema bioreportero pKSPA-1 de PAHs.

10.6 Bioreportero de hidrocarburos aromáticos policíclicos para expresión heteróloga (pKSPA-3)

Se amplificó mediante PCR el gen regulador $phaR$ con su promotor nativo P_{phaR} con los oligonucleótidos Pr1956-F y Pr1956-R diseñados con sitios diana para las enzimas de restricción $NotI$ y $EcoRI$ (Tabla 1) y tras la correspondiente digestión, se clonó esta construcción en pKSPA-1 que había sido previamente cortado con las mismas enzimas de restricción obteniendo el plásmido pKSPA-3 (Figura 6).

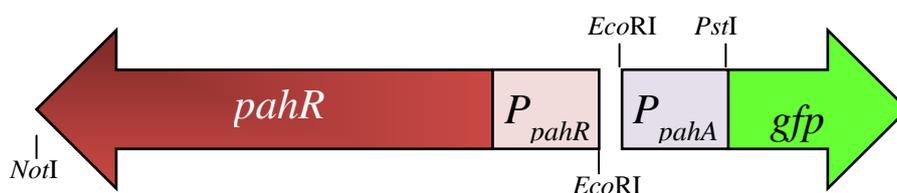


Figura 6. Esquema del sistema bioreportero pKSPA-3 para la detección de PAHs en sistemas heterólogos.

10.7 Bioreportero de hidrocarburos aromáticos policíclicos con expresión regulada por XylS-Pm (pKSPA-4).

En primer lugar se amplificó el regulador *phaR* con los oligos Rbs-1956-F y 1956-R diseñados con sitios diana para las enzimas de restricción *SacII* y *EcoRV* y el amplicón resultante se fusionó al promotor P_m , cuya expresión está regulada por *XylS* y la presencia de benzoato. Este sistema regulador (*XylS*-Pm) está presente en el plásmido pSEVA438 (ver Capítulo 2), en el que se introdujo también la fusión $P_{phaA}::gfp$ cortado con las enzimas de restricción *EcoRI* y *EcoRV* obteniéndose el plásmido pKSPA-4 (Figura 7).



Figura 7. Esquema del sistema bioreportero pKSPA-4 para la detección de PAHs en sistemas heterólogos.

10.8 Bioreportero de hidrocarburos aromáticos policíclicos con GFP inestable (pKSPA-2)

En primer lugar se amplificó la GFP inestable usando el plásmido pGfLR1 como molde y los oligonucleótidos [LVA]P for y [LVA] rev diseñados con sitios diana para las enzimas de restricción *PstI* y *SpeI*. Este amplicón se digirió con las mismas enzimas de restricción y se clonó en el plásmido pKSPA-1 al que previamente, mediante digestión con *PstI* y *SpeI*, se le había extraído la GFP estable, dando como resultado el plásmido pKSN-2 (Figura 7).

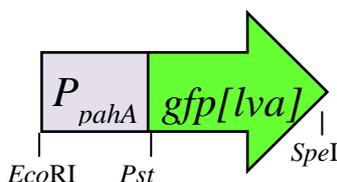


Figura 8. Esquema del sistema bioreportero pKSPA-2 de PAHs con GFP inestable.

11. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD β - GALACTOSIDASA

Para estudiar cómo el promotor P_{pahA} respondía a la presencia de diversos PAHs, se clonó esta región promotora (P_{pahA}), en el plásmido pMP220 que codifica un gen *lacZ* sin promotor, dando como resultado el plásmido pHR1a ($P_{pahA}::lacZ$) (Rodríguez-Conde *et al.*, 2011).

El promotor P_{pahR} se amplificó mediante PCR con los oligonucleótidos Pr1956-F y Pr1956-2-R diseñados con sitios diana para las enzimas de restricción *EcoRI* y *PstI* y este amplicón resultante se dirigió con las mismas enzimas de restricción y se clonó en el plásmido pMP220.

La medida de la actividad β -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 *o*-nitrofenil- β -galactopiranosido (ONPG), sustrato incoloro de la β -galactosidasa, es hidrolizado por el enzima produciendo galactosa y *o*-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 200rpm. Se recogieron muestras de 0,1 mL de volumen. Estas muestras se tomaron a las 5 h (el tiempo en el que se alcanza máxima actividad β -galactosidasa en el caso de *Novosphingobium* sp. HR1a) y a las 7,5 h en el caso de *Burkholderia* sp. MS3. Para la permeabilización de células se usó cloroformo y SDS al 0,1% (p/v), y, posteriormente se añadieron 800 μ l de tampón Z y se dejaron incubar durante 1 min a en un baño a 30 °C, luego se añadieron 200 μ l de ONPG. La mezcla de reacción se incubó a 30 °C durante 5 min, momento en el cual se paró la reacción

añadiendo 2 mL de una solución Na_2CO_3 0,5 M. La concentración de *o*-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 (Rodríguez-Conde, 2011).

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

$$\text{Actividad } \beta - \text{galactosidasa} = \frac{A_{420} - 1,7 * A_{550}}{t * V * \text{DO}_{660}} * 1000$$

Donde t representa el tiempo de reacción en minutos y V el volumen de cultivo recogido en mililitros, en este caso 5 minutos y 0,1 mL respectivamente.

Tampón Z (pH 7): 60mM Na_2HPO_4 , 40mM NaH_2PO_4 , 10mM KCl, 1mM MgSO_4 y 50mM de β -mercaptoetanol.

ONPG: 4 mg/mL de *o*-nitrofenil- β -galactopiranosido en tampón fosfato 0,1 M pH 7. Esta solución se mantuvo estable a 4 °C y en oscuridad.

12. MEDIDA DE LA FLUORESCENCIA

La medida de la fluorescencia producida por los biosensores se realizó mediante un fluorímetro PTI. El software utilizado fue el programa Felix32 instalado por defecto.

A partir de pre-inóculos celulares incubados a 30°C durante 24 ó 48 horas, dependiendo de la cepa empleada, se inocularon nuevos cultivos a una DO_{660} inicial de 0,1 (lavados previamente con agua o ONR7a tres veces) en el medio correspondiente con glucosa, citrato sódico ó piruvato sódico como fuente de carbono (dependiendo del microorganismo). Inmediatamente se añadió el inductor, y los cultivos se incubaron a 30°C y agitación de 200 rpm. Las muestras se tomaron a distintos tiempos tras la adición del inductor y se midió su densidad óptica a 660 nm y su fluorescencia

(unidades obtenidas en conteos por segundo). Para medir esta última se utilizaron cubetas de cuarzo y se ajustaron los cultivos a una densidad óptica de 0,1. Las frecuencias de emisión y excitación para medir la GFP fueron 510 nm y 485 nm respectivamente.

Los resultados obtenidos se expresan como fluorescencia relativa, es decir, la fluorescencia de la muestra con inductor dividida por la fluorescencia del control (cepa sin inductor).

13. CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Para analizar los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) y los hidrocarburos aromáticos monocíclicos (BTEX) se utilizó la cromatografía de gases-espectrometría de masas.

Para los PHAs el método de inyección fue DI-SPME con fibra 65µm PDMS/DVB y 18mL de muestra en viales de 20 mL. Tras la optimización, las condiciones SPME de extracción fueron: extracción a 60°C durante 60 minutos y agitando a 500rpm. Desorción a 300°C 10 minutos (tiempo de splitless 4 minutos). Las condiciones GC-MS fueron: 50°C (1min) >> 11°C/min hasta 325°C (8min). Flujo 1mL/min de He. Columna 30m x 0.25mm x 0.25µm. Se utilizaron dos métodos para el análisis de masas. Análisis en TIC y SIM, Full Scan con rango 100- 300m/z; y análisis en Ms/Ms para las muestras de menor concentración.

Para los BTEX fue igual que los anteriores con las siguientes diferencias: HS-SPME y 10mL de muestra en viales de 20mL. Extracción a 30°C durante 4 minutos. Desorción a 150°C durante 3 minutos (tiempo de splitless 3 minutos). Condiciones GC-MS: 45°C (3,5min) >>38°C/min hasta 80°C (4min) >> 75°C/min hasta 150°C (6min). Análisis en TIC y SIM, Full Scan con rango 45-300m/z.

14. EXPERIMENTOS DE TIERRA

La tierra se preparó mezclando un 59% de arena y un 41% de turba. Dicha mezcla se homogeneizó y se repartió en vasos de 100 g. Posteriormente, se añadió a cada uno de ellos la cantidad correspondiente de gasolina y se procedió a su homogenización. Los vasos se dejaron destapados en la campana de extracción para que la gasolina se fuera evaporando a lo largo del tiempo. Para los ensayos de inducción se incubó *P. putida* KT2440 en medio mínimo M9 con citrato sódico como fuente de carbono durante un periodo de tiempo de 24 horas. Al día siguiente este cultivo se diluyó a una densidad óptica de 0,1; en 10 mL de medio mínimo M9 con citrato sódico como fuente de carbono al que se añadió 1 g de tierra. Esta mezcla se incubó 5 horas a 28°C y 200 rpm de agitación. Posteriormente, se tomaron 2 mL de esta mezcla y se centrifugaron a 2000 rpm durante 1 minuto, de manera que las partículas de tierra quedaran en el pellet y las bacterias en el sobrenadante. Se extrajo el sobrenadante y se midió su densidad óptica a 660 nm. Para las muestras que iban a ser medidas en el fluorímetro este sobrenadante se diluyó a una densidad óptica de 0,1.

Para la preparación de las muestras a analizar con GC-MS se recogieron 2 g de tierra y se añadieron 6,5 mL de agua. Esta mezcla se agitó durante 30 segundos en vórtex y se centrifugó a 9500 rpm y temperatura ambiente durante 10 minutos. Se recogió el sobrenadante y que se analizó por GC-MS utilizando la metodología mencionada anteriormente.

RESULTADOS

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

Como se ha expuesto anteriormente, la presente Tesis Doctoral se engloba dentro del proyecto europeo “Soluciones biotecnológicas integradas para combatir derrames de petróleo marinos” (Kill•Spill). Dentro de este proyecto, y entre otras actividades, se desarrollan herramientas para la biorremediación de zonas marinas contaminadas y el seguimiento de la misma. Por tanto, y debido a que se iban a desarrollar distintas tecnologías, se decidió tratar de usar las mismas cepas marinas que se estaban utilizando en el consorcio como hospedadores de los biosensores que se debían construir. Además, nos propusimos también introducir los bioreporteros en cepas hospedadoras ya disponibles en el laboratorio.

Para la evaluación de las cepas candidatas a ser utilizadas como cepas biosensoras había que tener en cuenta los siguientes requerimientos:

- Capacidad de crecimiento en medio marino, ya que uno de los objetivos últimos de la Tesis Doctoral era el desarrollo de biosensores para ambientes marinos.
- Sensibilidad de las cepas a antibióticos ya que para la construcción de los bioreporteros se disponía en el laboratorio de una batería de plásmidos con genes que codifican diferentes resistencias a antibióticos y para poder diseñar el bioreportero necesitábamos saber si su selección era compatible con el hospedador.
- Capacidad para ser manipuladas genéticamente, al menos, para poder adquirir los plásmidos que se iban a construir.
- Y, por último, tolerancia a los compuestos tóxicos que deben detectar.

Por tanto, en este primer capítulo se describe la evaluación de estas capacidades en las cepas marinas del consorcio Europeo y en otras disponibles en el Grupo de Protección Ambiental de la EEZ (apartado 1 de Materiales y Métodos de la presente

Tesis Doctoral) para así seleccionar las mejores candidatas para albergar los sistemas bioreporteros que se construirán.

2. TASA DE CRECIMIENTO DE BACTERIAS EN MEDIO MARINO

Se estudió la tasa de crecimiento de las distintas cepas disponibles en el proyecto Kill•Spill en medio marino utilizando las fuentes de carbono recomendadas en la literatura (Tabla 1, Materiales y Métodos). Estos experimentos se llevaron a cabo, en primer lugar, en microplacas incubadas a 30 °C con una agitación de 200 rpm en un Bioscreen que tomaba datos de densidad óptica cada hora, hasta las 48 h. Para el caso de *Oleispira antarctica* RB8 se ajustó la temperatura del Bioscreen a 4 °C. Para estudiar el crecimiento de *Cycloclasticus zancles* ME07 se utilizaron placas de ELISA que se incubaron en un agitador orbital a 30 °C y 200 rpm. Las densidades ópticas del cultivo se midieron en un espectrofotómetro de placas ya que la fuente de carbono que se recomienda es el naftaleno, compuesto muy volátil que puede dañar el aparato Bioscreen. Posteriormente se comprobaron todos los datos obtenidos en el Bioscreen creciendo las distintas cepas en matraces (Figura 1).

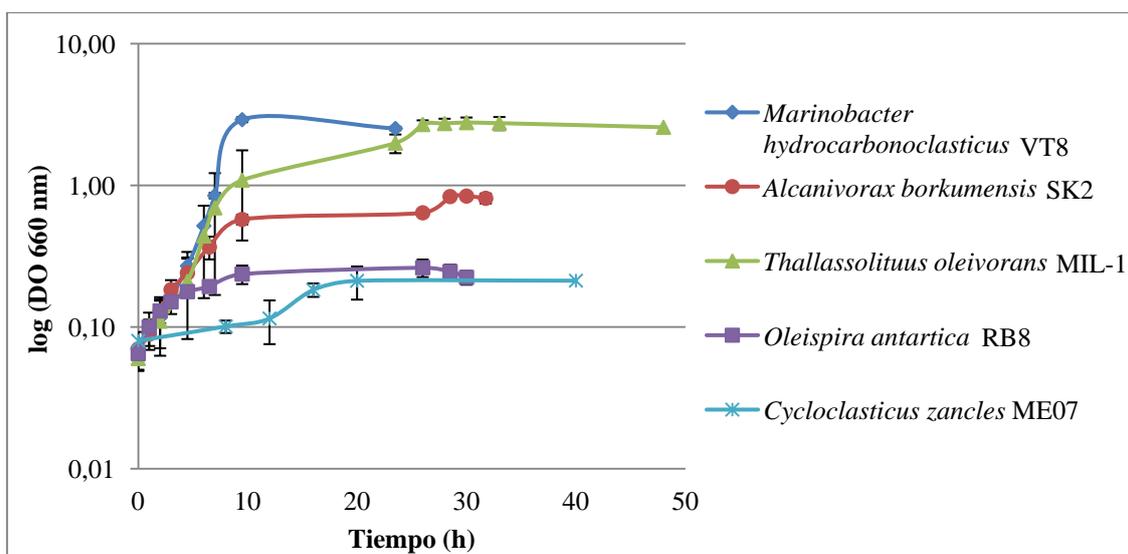


Figura 1. Curvas de crecimiento de distintas bacterias marinas en matraces.

Como se aprecia en la Figura 1 *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* VT8 presentó la mejor tasa de crecimiento, alcanzando densidades celulares máximas superiores a 1 a DO₆₆₀ a las 8 horas. *Thalassolituus oleivorans* MIL-1 y *Alcanivorax borkumensis* SK2 también presentaron buenas tasas de crecimiento en sus sustratos respectivos, aunque las densidades ópticas fueron algo inferiores a las de *M. hydrocarbonoclasticus* (Figura 1). *Oleispira antartica* RB8, y *Cycloclasticus zancles* ME07 alcanzaron densidades ópticas máximas muy bajas (0,26 en 26 horas y 0,25 en 70 horas respectivamente).

Oleiphilus messinensis ME102 utiliza como fuente carbono *n*-hexadecano que no es soluble en agua y forma agregados, por lo que las medidas de densidad óptica dieron una gran variabilidad (datos no mostrados).

A partir de las curvas de crecimiento se calcularon los tiempos de generación para cada una de las cepas marinas (Tabla 1).

Tabla 1. Tiempo de generación de las bacterias marinas.

Cepa	Fuente de carbono	Tiempo de generación (h)
<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> , VT8	M276	1,4
<i>Alcanivorax borkumensis</i> , SK2	Piruvato sódico	3,5
<i>Thalassolituus oleivorans</i> , Mil-1	TWEEN 40	1,3
<i>Oleispira antartica</i> , RB8	TWEEN 40	7,5
<i>Cycloclasticus zancles</i> , ME07	Naftaleno	12
<i>Oleiphilus messinensis</i> , ME102	<i>n</i> -Hexadecano	No determinado

Como se puede observar en la Tabla 1, las cepas con menores tiempos de generación fueron *M. hydrocarbonoclasticus* VT8 y *A. borkumensis* SK2, 1,4 h y 3,5 h respectivamente.

Tras estos estudios descartamos dos cepas que no presentaban las características requeridas para ser hospedadoras. En primer lugar, la cepa *C. zancles* ME07, que

presentaba un tiempo de generación excesivamente alto (12 h) para ser un buen biosensor; idealmente se necesita que el cultivo alcance una densidad óptica relativamente alta en corto espacio de tiempo para tener un número de células apropiado para detectar el compuesto. En segundo lugar, la cepa *O. messinensis* ME102 que mostró la formación de grumos que colapsaron y formaron un depósito en el fondo de la placa durante su crecimiento, fenómeno que podría alterar el patrón de emisión de fluorescencia. Además este fenotipo hace que esta cepa pueda presentar problemas en la electroporación, transformación o cualquier otro sistema de manipulación genética. También se descartó la cepa *M. hydrocarbonoclasticus* VT8, porque el medio que requiere para su crecimiento producía *per se* una gran cantidad de fluorescencia (comunicación personal del Dr. Fernando Rojo).

Dado que el número de cepas marinas que podrían ser de utilidad era reducido, analizamos la capacidad de otras cepas aisladas de ambientes no marinos, disponibles en el laboratorio (Tabla 1 de Materiales y Métodos), para cultivar en medio marino artificial (Figura 2). En el caso de *Burkholderia* sp. MS3 y *Novosphingobium* sp. HR1a se utilizó glucosa como fuente de carbono, mientras que en el caso de *Pseudomonas putida* KT2440 y *Pseudomonas putida* DOT-T1E se utilizó citrato sódico como fuente de carbono, compuestos que se utilizarían posteriormente como fuentes de carbono en los ensayos de inducción para evaluar el comportamiento de los biosensores.

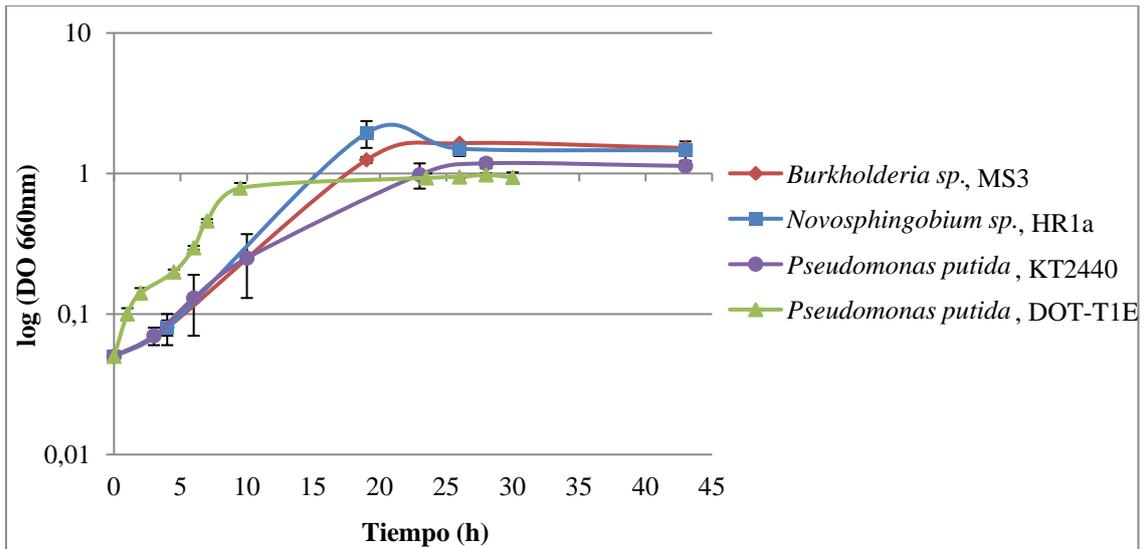


Figura 2. Curvas de crecimiento de *Burkholderia sp.* MS3, *Novosphingobium sp.* HR1a, *Pseudomonas putida* KT2440 y *Pseudomonas putida* DOT-T1E en medio marino ONR7a.

Las cuatro cepas tuvieron tasas de crecimiento adecuadas en medio marino con tiempos de generación de 2 h para *P. putida* DOT-T1E, 4 h para *Novosphingobium sp.* HR1a y *P. putida* KT2440 y 6 h para *Burkholderia sp.* MS3.

Estas cuatro cepas fueron consideradas como buenas candidatas a ser consideradas cepas hospedadoras de biosensores ya que muestran buenos tiempos de generación. Además, las cepas de *P. putida* han sido ampliamente estudiadas y son fácilmente manipulables genéticamente (Molina *et al.*, 2000; Duque *et al.*, 2007). Los protocolos de manipulación genética para las cepas de *Burkholderia sp.* MS3 y *Novosphingobium sp.* HR1a se habían adaptado satisfactoriamente ya en el laboratorio. (Molina *et al.*, comunicado personal).

3. ANTIBIOGRAMAS

Para el diseño de los bioreporteros se decidió utilizar los plásmidos de la serie pSEVA descritos en el grupo de Víctor de Lorenzo (Silva-Rocha *et al.*, 2013). Estos plásmidos presentan una gran versatilidad modular lo que les hace muy adecuados para llevar a cabo las manipulaciones genéticas necesarias para la construcción de los

sistemas bioreporteros. Además, presentan un origen de replicación que les permite ser introducidos en un amplio número de huéspedes. Como en las distintas versiones de estos plásmidos pSEVA hay genes de resistencia a diversos antibióticos, se realizaron pruebas de sensibilidad a estos antibióticos con el fin de determinar el mejor vector para cada posible cepa hospedadora.

Para determinar el patrón de resistencias a antibióticos de las cepas marinas seleccionadas primero se realizaron experimentos de medición del halo de inhibición formado en cultivos en placa en presencia de discos impregnados con distintos antibióticos (bioMérieux). Una vez determinado el espectro de resistencias y susceptibilidad de las cepas estudiadas, se determinó el efecto de la aplicación de diferentes concentraciones de antibiótico a su crecimiento en cultivo líquido. Para ello se utilizaron tanto el Bioscreen como medios de cultivo en matraces. Estos experimentos demostraron que *O. antartica* RB8 poseía una alta resistencia a todos los antibióticos estudiados, por lo que se descartó como candidata (Tabla 3). Además, estos experimentos determinaron que *T. oleivorans* MIL-1 era bastante resistente a cloramfenicol y *A. borkumensis*, SK2 a kanamicina. Por tanto, los antibióticos gentamicina, estreptomycin y tetraciclina eran los más adecuados para ser utilizados con estas cepas, aunque las concentraciones inhibitorias de tetraciclina eran más altas (3 veces) que las utilizadas en el laboratorio para otras cepas (Tabla 2).

Tabla 2. Concentraciones de antibiótico en las que no se observó crecimiento de las cepas (en µg/mL). R indica resistencia a todas las concentraciones de antibióticos probadas.

Bacteria	Ap	Cm	Gm	Km	Sm	Tc
<i>Oleispira antartica</i> RB8	R	R	R	R	R	R
<i>Alcanivorax borkumensis</i> SK2	300	30	>30	>75	50	>30
<i>Thalassolituus oleivorans</i> MIL-1	100	60	10	25	50	30

Como resultado de estos estudios se determinó que tanto las cepas marinas *A. borkumensis* SK2 y *T. oleivorans* MIL-1 seguían siendo idóneas para el desarrollo de los biosensores, mientras que no lo era la cepa *O. antartica* RB8.

También se completaron algunos estudios previos de sensibilidad a antibióticos de las cepas terrestres, encontrándose que *Burkholderia* sp. MS3 y *Novosphingobium* sp. HR1a eran sensibles a concentraciones de gentamicina mayores de 30 µg/mL, mientras que la cepa aislada de aguas residuales *P. putida* DOT-T1E y la terrestre *P. putida* KT2440 eran sensibles a Sm (150 µg/mL).

Por tanto, para definir el diseño para la construcción de los bioreporteros requeridos, los plásmidos idóneos fueron el pSEVA638 y pSEVA438 que conferían resistencia a los antibióticos estreptomicina y gentamicina respectivamente a la cepa hospedadora (Silva-Rocha *et al.*, 2013).

4. CAPACIDAD DE LAS CEPAS PARA SER TRANSFORMADAS

Por último, se necesitaba saber si las cepas aisladas de ambientes marinos eran susceptibles de permitir la introducción de los plásmidos mencionados en este estudio. Los procesos de transferencia de material genético pueden resultar muy dificultosos en este tipo de cepas. Debido a que existía información sobre las técnicas de transferencia de plásmidos en *A. borkumensis* SK2 (Kalscheuer *et al.*, 2007), se decidió continuar los estudios con esta cepa, descartando la utilización de *T. oleivorans* MIL-1, donde no existían protocolos de manipulación genética descritos en la bibliografía. Se llevaron a cabo experimentos de conjugación y electroporación de *A. borkumensis* SK2, de *P. putida* KT2440 y DOT-T1E, *Novosphingobium* sp. HR1a y *Burkholderia* sp. MS3, siguiendo los protocolos mencionados en el apartado de Materiales y Métodos de la presente tesis doctoral.

El método más eficaz para la introducción de ADN exógeno en *A. borkumensis* SK2 fue la conjugación, con una frecuencia de transconjugantes de 10^{-7} transconjugantes/donador. En el caso de las cepas no marinas el método más eficaz para la introducción de ADN exógeno fue la electroporación, obteniendo frecuencias máximas de 10^{-4} transformantes/ μ g de ADN. Como se puede observar, la frecuencia de la conjugación en *A. borkumensis* SK2 fue bastante baja, sin embargo, fue suficiente para introducir los plásmidos necesarios en ella.

5. TOLERANCIA A COMPUESTOS TÓXICOS

Por último, era importante comprobar que las cepas que se usaran como hospedadoras eran tolerantes, como mínimo, a las concentraciones de solubilidad en agua de los contaminantes a detectar. Por eso se estudió el crecimiento de estas cepas con sus fuentes de carbono habituales en presencia de estos compuestos partiendo de una densidad óptica inicial de 0,1 (Tabla 3).

Tabla 3. Tolerancia de las cepas elegidas a distintos compuestos tóxicos.

Compuesto/ Cepa	SK2	MS3	HR1a	KT2440	DOT-T1E
Naftaleno (31,6mg/L)	+	+	+	+	+
2-Metilnaftaleno (24,6 mg/L)	-	+	+	+	+
Fenantreno (1,6 mg/L)	+	+	+	+	+
Tolueno (92,14 mg/L)	+	+	+	+	+
Benceno (184 mg/L)	-	-	-	+	+

<i>o</i> -Xileno (178 mg/L)	-	-	+	+	+
Etilbenceno (150 mg/L)	-	-	+	+	+

Como se puede observar en esta Tabla 3, tanto la bacteria marina elegida *A. borkumensis*, SK2, como las bacterias del suelo *Burkholderia* sp. MS3, *Novosphingobium* sp. HR1a, *P. putida* KT2440 y la cepa aislada de aguas residuales *P. putida* DOT-T1E toleraban concentraciones saturantes de los compuestos aromáticos policíclicos naftaleno y fenantreno y, mientras que *A. borkumensis* SK2 no toleraba 2-metilnaftaleno, sí lo hacían las otras cuatro cepas estudiadas.

En el caso de los compuestos aromáticos monocíclicos, salvo tolueno que era tolerado por todas las cepas a concentraciones saturantes, todos los demás ejercieron algún efecto tóxico sobre algunas de ellas. Las cepas *P. putida* KT2440 y DOT-T1E fueron las únicas tolerantes a todos los compuestos. Estos compuestos son componentes básicos y mayoritarios del petróleo y serán los componentes objetivos a detectar por los biosensores.

Los resultados obtenidos en este capítulo nos muestran que, de la batería de bacterias de partida, la cepa marina *A. borkumensis* SK2, las cepas terrestres *Burkholderia* sp. MS3, *Novosphingobium* sp. HR1a y *P. putida* KT2440 y la cepa de aguas residuales *P. putida* DOT-T1E son los candidatos idóneos para su utilización como hospedadoras de los bioreporteros de compuestos aromáticos a diseñar. La versatilidad de algunas de estas bacterias (crecimiento tanto en medios marinos como terrestres y tolerancia a contaminantes) también nos hace presuponer la posible utilización de estos biosensores en una amplia gama de entornos para la detección de derrames de petróleo.

DISCUSIÓN

En este capítulo se muestra la caracterización inicial de las cepas bacterianas candidatas a ser hospedadoras de los diferentes sistemas bioreporteros que se debían construir para los diferentes objetivos propuestos.

Los requisitos que decidimos identificar fueron, que la cepa creciera en un ambiente similar a donde se fuera a usar el biosensor, en este caso medio marino con concentraciones saturantes de contaminantes, y que fueran sensibles a algún antibiótico para los que hubiera genes de resistencia en la serie de plásmidos pSEVA (Silva-Rocha *et al.*, 2013).

Aunque inicialmente se había propuesto en el consorcio del proyecto Kill•Spill que todos los socios utilizaran las mismas cepas marinas en el proyecto, el análisis del crecimiento de las mismas en medio marino hizo recomendable el análisis de otras cepas disponibles en el laboratorio. Curiosamente, aunque el género *Burkholderia* se ha considerado tradicionalmente como terrestre (Coenye *et al.*, 2003) o de agua dulce (Leff *et al.*, 1995), la cepa utilizada en este ensayo *Burkholderia* sp. MS3, aislada de suelo, fue capaz de crecer en el medio marino. Especies pertenecientes a los géneros *Novosphingobium* (Jun *et al.*, 2008) y *Pseudomonas* (Fujinami *et al.*, 2014) sí que habían sido previamente aisladas de entornos marinos y, aunque las utilizadas en este trabajo proceden de ambientes diferentes, *Novosphingobium* sp. HR1a y *P. putida* KT2440 fueron aisladas de suelo y *P. putida* DOT-T1E de aguas residuales (Molina *et al.*, 2000; Duque *et al.*, 2007; Rodríguez-Conde *et al.*, 2011), también fueron capaces de crecer a altas concentraciones de sal, aunque con peores rendimientos que en medios sin sal, especialmente en el caso de *Burkholderia* sp. MS3.

El análisis de la tolerancia a antibióticos demostró que las cepas marinas eran bastante tolerantes a altas concentraciones de muchos antibióticos, posiblemente debido

a que hayan estado en contacto con microorganismos resistentes a antibióticos que les pueden haber transferido los genes de resistencia (Baquero *et al.*, 2008) y que tan sólo la estreptomicina y la gentamicina producían inhibición del crecimiento celular a concentraciones similares a las usadas en el laboratorio con otras cepas bacterianas.

El siguiente parámetro que necesitábamos conocer era la tolerancia a compuestos derivados de petróleo de estas cepas, ya que si la cepa hospedadora no es capaz de crecer o incluso de sobrevivir en presencia de determinadas concentraciones del contaminante, el biosensor nos daría un falso negativo y, por tanto, no sería útil para la detección del contaminante de elección.

En conjunto, los datos obtenidos en este capítulo nos permitieron identificar qué cepas eran más prometedoras para la construcción de los biosensores, qué resistencias a antibióticos debíamos usar en los plásmidos en los que se introdujesen los distintos elementos del sistema bioreportero y qué cepas podíamos utilizar para la detección específica de cada contaminante en base a los resultados de toxicidad.

Estos datos constituyeron un punto de partida para la construcción de los biosensores, aunque como se verá en los sucesivos capítulos, en la selección final de cepas se tuvieron en cuenta también otros factores más específicos.

CAPÍTULO 2

1. INTRODUCCIÓN

Como se ha mencionado en la Introducción General de esta tesis, los componentes del petróleo crudo y sus derivados más solubles en agua son benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos (BTEX) (Speight, 1991) y son precisamente éstos los que constituyen una de las amenazas más serias y comunes para la salud humana y animal (ATSDR, 2004). Debido a esta toxicidad, existe una necesidad de detectar su presencia en la naturaleza (Alberici *et al.*, 2002) y de controlar su biodegradación mientras está ocurriendo (Heitzer *et al.*, 1993). El uso de biosensores es una aproximación para este control eficiente, fácil de usar y de bajo coste (Belking, 2003).

En este capítulo se describe tanto la construcción, como la caracterización de biosensores para la detección de hidrocarburos aromáticos monocíclicos tipo BTEX basados en el sistema de regulación del operón de degradación de tolueno (*tod*) de *Pseudomonas putida* DOT-T1E.

P. putida DOT-T1E posee una ruta de degradación de tolueno que se organiza en dos operones, el primero comprende los genes *todXFC1C2BADEGIH* que codifican las enzimas necesarias para la conversión de tolueno a intermediarios del ciclo de Krebs, mientras que el segundo operón incluye dos genes de regulación, *todST* (Figura 1).

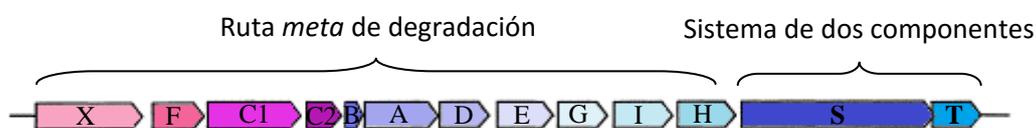


Figura 1. Organización de los genes *tod* en el genoma de *Pseudomonas putida* DOT-T1E (Modificado de Mosqueda *et al.*, 1999)

El primer paso de la degradación de tolueno se lleva a cabo por la enzima tolueno dioxigenasa, enzima codificada por *todC1C2BA*. Esta enzima consta de tres elementos funcionales que son: una flavoproteína con actividad reductasa, codificada por el gen

todA, una ferredoxina codificada por el gen *todB* y un tercer componente constituido por una proteína con centros de hierro y azufre que posee una subunidad grande (*todC1*) y otra pequeña (*todC2*) (Gibson *et al.*, 1990), y cuyo papel es desestabilizar el anillo de tolueno mediante la introducción de dos grupos hidroxilo. Tras la formación del *cis*-tolueno dihidrodiol, la enzima *cis*-dihidrodiol deshidrogenasa (codificada por el gen *todD*) reduce NAD^+ a NADH y oxida el *cis*-tolueno dihidrodiol a 3-metilcatecol. La enzima 3-metilcatecol 2,3-dioxigenasa, codificada por el gen *todE*, transforma el 3-metilcatecol en 2-hidroxi-6-oxohepta-2,4-dienoato (HOHD). Los genes *todFGIH* codifican las enzimas necesarias del paso de HOHD hasta piruvato y acetil-CoA (Zylstra *et al.*, 1988; Lacal, 2008) (Figura 2).

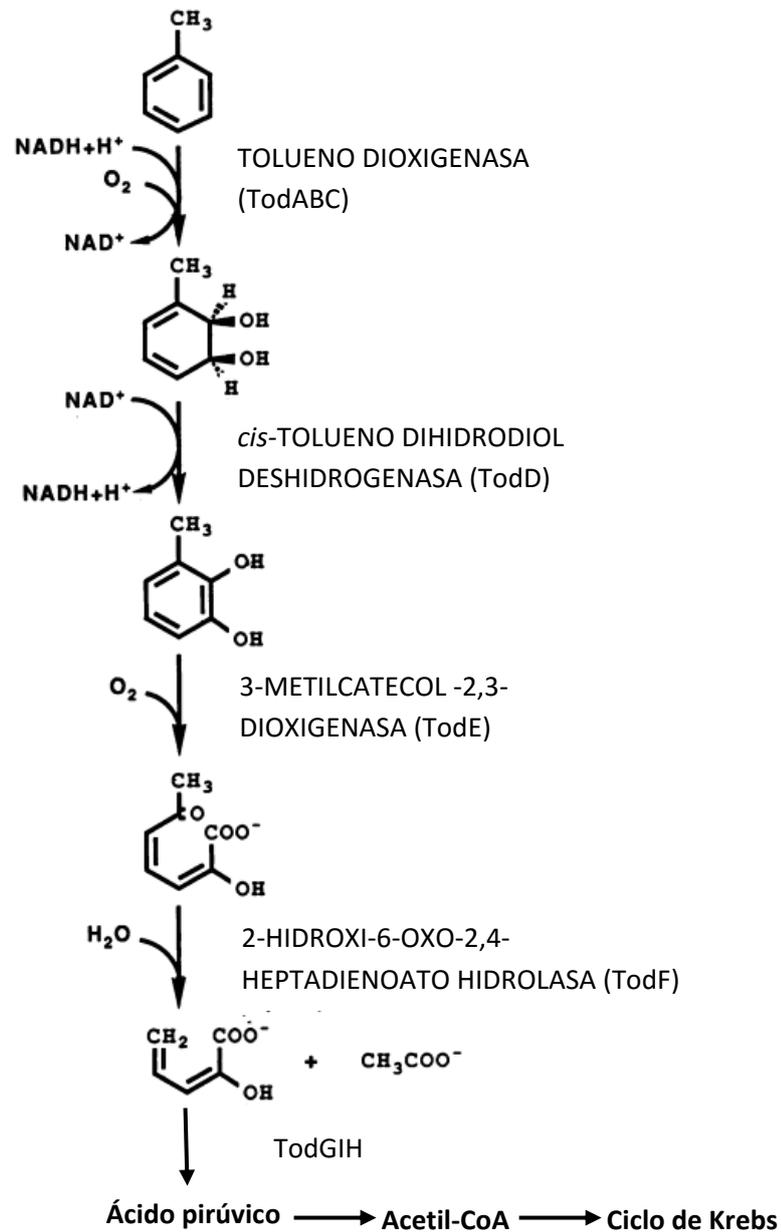


Figura 2. Reacciones para la degradación de tolueno a piruvato y acetil-coA en *P. putida* DOT-T1E.

Modificado de Zylstra *et al.*, 1988.

El sistema TodS-TodT es un sistema de regulación de dos componentes codificado por un operón que se encuentra aguas abajo de los genes estructurales descritos anteriormente, formando un operón independiente que se expresa de forma constitutiva (Mosqueda *et al.*, 1999). El gen *todS* codifica una proteína sensor histidin kinasa, mientras que *todT* codifica un regulador de respuesta. La señal (por ejemplo, el tolueno) es percibida por el sensor histidina quinasa TodS, produciendo su autofosforilación en

un residuo conservado de histidina situado normalmente en el extremo C terminal de la proteína. El fosfato se transfiere entonces desde la histidina hasta un residuo conservado de aspartato, normalmente encontrado en el extremo N terminal de su regulador de respuesta afín, TodT. El regulador de respuesta fosforilado, TodT, posteriormente se une a sus sitios diana de DNA en el promotor P_{todX} , mediando el control a nivel transcripcional de los genes estructurales de la ruta degradativa de la tolueno dioxigenasa, *tod* (Figura 3) (Lau *et al.*, 1997).

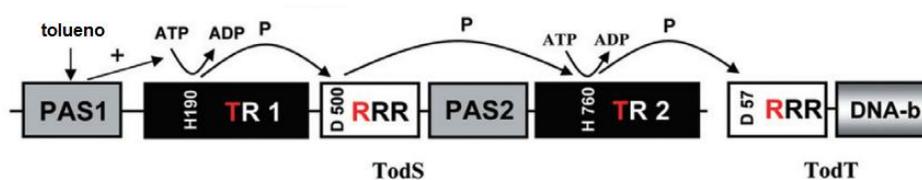


Figura 3. Representación esquemática de la organización y el modo de acción de los sistemas de dos componentes. El sistema TodS/TodT pertenece al tipo TRTR de las cascadas de fosforilación. Se indica la secuencia de la transferencia del grupo fosforilo. tm, región de transmembrana; PAS, dominio sensor de tipo Per-Arnt-Sim; TR, módulo transmisor que consta de un dominio de dimerización/histidina transferidora de fosforilo y un dominio catalítico; RRR, dominio receptor regulador de respuesta; HPT, histidina que contiene un dominio de transferencia de fosforilo; DNA-b, dominio de unión a AND. (Silva-Jiménez *et al.*, 2012).

Lacal *et al.*, 2006 identificaron el perfil de efectores del sistema TodS-TodT mediante el estudio de la inducción del promotor de *todX*, P_{todX} , fusionado al gen *lacZ* (Figura 4). Los datos indicaron que compuestos aromáticos monocíclicos sustituidos con cadenas alquílicas cortas, como es el tolueno ($-\text{CH}_3$), aumentan significativamente la activación de P_{todX} , mientras que las compuestos aromáticos monocíclicos sustituidos con cadenas alquílicas más largas (etilbenceno, *n*-propilbenceno) eran incapaces de inducir la expresión de P_{todX} . Los derivados sustituidos con grupos cloro-, bromo- y flúor fueron capaces de inducir el sistema, aunque con menos eficiencia que el tolueno.

Busch *et al.*, 2007 demostraron que el *o*-xileno era un antagonista del sistema, ya que se unía a TodS pero no inducía el sistema, por lo que disminuía la expresión del operón *tod* en presencia de tolueno.

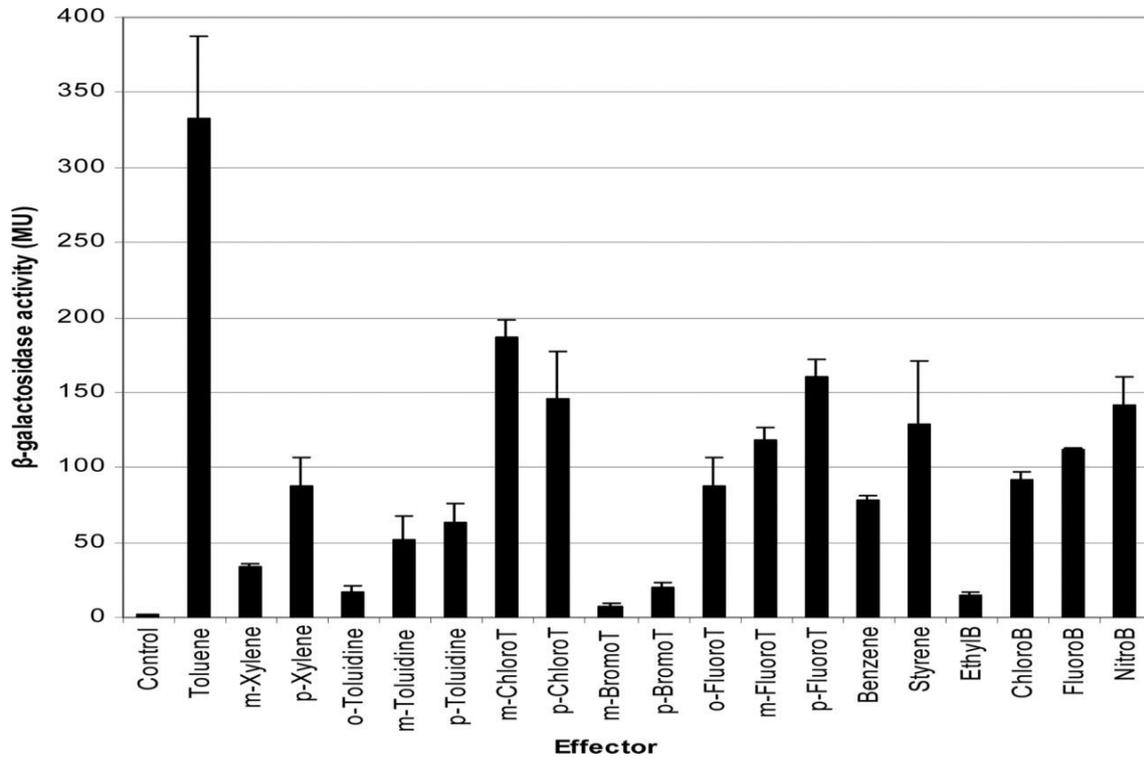


Figura 4. Inducción del P_{todX} por TodS-TodT en respuesta a un amplio rango de aromáticos. *P. putida* DOT-T1E con el plásmido $P_{todX}::lacZ$ se cultivó en medio M9 con 1 mM del efector indicado. Cuando la turbidez de los cultivos fue de 0,8 se midió la actividad β -galactosidasa. Los compuestos probados que no indujeron el sistema fueron: *o*-xileno; *m*- y *p*-etiltolueno; *o*-, *m*- y *p*-nitrotolueno; *o*-cloro-, *o*-, *m*- y *p*-iodotolueno; propil-, butil- e isobutilbenceno; 1,2,3-, 1,3,5-, 1,2,4-trimetilbenceno y benzamida. T, tolueno; B, benceno. (Lacal *et al.*, 2006). Las barras de error significan la desviación estándar de tres repeticiones de experimentos.

El objetivo de este capítulo fue la construcción de un biosensor que detectase compuestos de BTEX en medios ambientales, idealmente en muestras marinas y terrestres. Debido a la necesidad de introducir el sistema bioreportero en sistemas heterólogos, que no poseen los genes *todST* en su genoma, se decidió construir el bioreportero expresando las proteínas reguladoras TodST mencionadas anteriormente y

el promotor P_{todX} fusionado a la proteína fluorescente verde. Esta proteína fluorescente no necesita de ningún reactivo exógeno para producir fluorescencia (Tsien, 1998), lo que supone una gran ventaja a la hora de emplear sistemas biosensores eficientes para la determinación de contaminantes en muestras ambientales.

2. FUNCIONAMIENTO DEL SISTEMA BIOREPORTERO

En su forma más simple un sistema bioreportero consta de una/s proteína/s reguladora/s y un promotor regulado que controla la expresión de un gen reportero. Se decidió expresar los genes *todST* a partir del promotor constitutivo, P_m , e incluir en la construcción la proteína reguladora XylS del plásmido pWW0 (Spooner *et al.*, 1986). Este sistema de regulación está incluido en el plásmido pSEVA438.

El funcionamiento del sistema bioreportero pKST-1 se esquematiza en la Figura 5. A pesar de que la expresión de *todST* se encuentra bajo el control del promotor P_m (inducible por benzoato o 3-metilbenzoato), el nivel de transcripción basal de este promotor es suficiente para permitir la inducción del sistema y, por tanto, no fue necesario el uso de benzoato, ni 3-metilbenzoato en los experimentos de inducción (ver punto 4.1 Concentración necesaria de benzoato). En presencia del efector (por ejemplo, tolueno) las proteínas TodST se activan, siendo TodT capaz de unirse al promotor P_{todX} induciendo la expresión de la proteína de GFP (Figura 5).

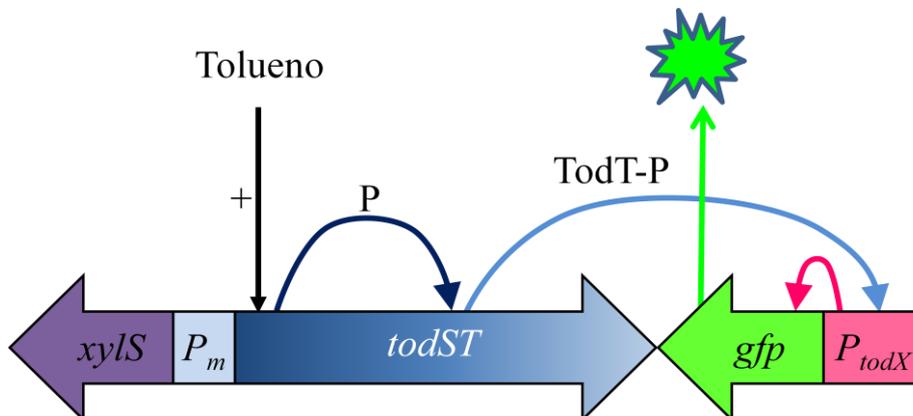


Figura 5. Esquema del funcionamiento del plásmido pKST-1.

Este plásmido se introdujo en *P. putida* KT2440 y se ensayó su funcionamiento en respuesta a una concentración baja, no tóxica, de tolueno (18 mg/L). En ausencia del inductor, los niveles de fluorescencia de cultivo fueron de 41.885 conteos por segundo, mientras que en presencia de tolueno los niveles aumentaban hasta valores de 610.001 conteos por segundo. Estos resultados confirmaron el buen funcionamiento del biosensor y, por tanto, esta construcción fue utilizada en sucesivos experimentos.

3. CONSTRUCCIÓN DE LAS CEPAS BIOSENSORAS DE BTEX

Como se ha mencionado anteriormente, el objetivo último de este trabajo era la detección de compuestos de BTEX presentes en contaminaciones de distintos entornos (terrestres y marinos), por ello es necesario utilizar cepas bacterianas capaces de crecer en estos hábitats. Por otro lado, este tipo de compuestos muestra una gran toxicidad para toda forma de vida. En concreto, el hidrocarburo aromático monocíclico más abundante en petróleos, gasolinas y gasoil es el tolueno (NRC, 1985; Speight, 1991), compuesto extremadamente tóxico para los microorganismos. El tolueno, y en general muchos disolventes orgánicos tóxicos, se intercala en las membranas biológicas desestabilizándolas, causando la fuga de proteínas, lípidos e iones y la interrupción del potencial de la membrana celular. Como consecuencia de todo esto, se produce el colapso de la síntesis de ATP que, junto con otras lesiones, lleva a la muerte celular (Smet *et al.*, 1978). Las cepas biosensoras para este tipo de compuestos deben mostrar, por tanto, una cierta tolerancia a disolventes orgánicos.

De la batería de bacterias descritas en el capítulo anterior, se seleccionaron tres cepas en las que se introdujo el plásmido pKST-1. Como buena colonizadora de suelo se seleccionó *Pseudomonas putida* KT2440 (Molina *et al.*, 2000), que a su vez es tolerante de forma moderada a BTEX (Segura *et al.*, 2003, Rodríguez-Hervas *et al.*, 2007). Como cepa colonizadora de aguas dulces *Pseudomonas putida* DOT-T1E, que es una cepa

procedente de aguas residuales y altamente tolerante a BTEX (Duque *et al.*, 2007). Como cepa marina se seleccionó *Alcanivorax borkumensis* SK2, de la que se conocía su capacidad de degradar alcanos (Yakimov *et al.*, 1998) y que era algo tolerante a alcoholes y fenoles (Naether *et al.*, 2013), pero que en el capítulo anterior se demostró que también tenía tolerancia a concentraciones saturantes de tolueno.

3.1 Tolerancia de las cepas a disolventes orgánicos

Debido a la importancia del carácter de tolerancia a disolventes orgánicos en la construcción de biosensores para este tipo de moléculas, el paso siguiente de este trabajo fue estudiar de manera más detallada la supervivencia de las cepas seleccionadas en presencia de distintas concentraciones de BTEX. Se eligió el tolueno como compuesto modelo y se expusieron las tres cepas seleccionadas a un choque con distintas concentraciones de este compuesto (0,1% y 0,2 % v/v). La adición repentina de este tolueno a una concentración de 0,1% no tuvo efecto en la supervivencia de ninguna de las tres cepas (datos no mostrados). Sin embargo, 15 minutos después de la adición del disolvente (0,2% v/v) el número de células vivas de *A. borkumensis* SK2 cayó por debajo de nuestro límite de detección ($<10^2$ células por mL) (Figura 6A). En el caso de *P. putida* KT2440, y aunque a 15 minutos después de la adición de 0,2% (v/v) tolueno había 10^{-6} células viables por mL, a los 30 minutos de la adición de tolueno el número de células viables disminuyó por debajo de nuestro límite de detección (Figura 6B). El 100% de las células de *P. putida* DOT-T1E resistieron el choque del 0,2% (v/v) de tolueno (Figura 6C). Por tanto, se pudo concluir que *A. borkumensis* SK2 y *P. putida* KT2440 sólo eran capaces de tolerar concentraciones moderadas de tolueno; esto es un factor importante ya que la detección de compuestos tóxicos por los biosensores necesita tener en cuenta el rango de concentración en el cual las células son viables.

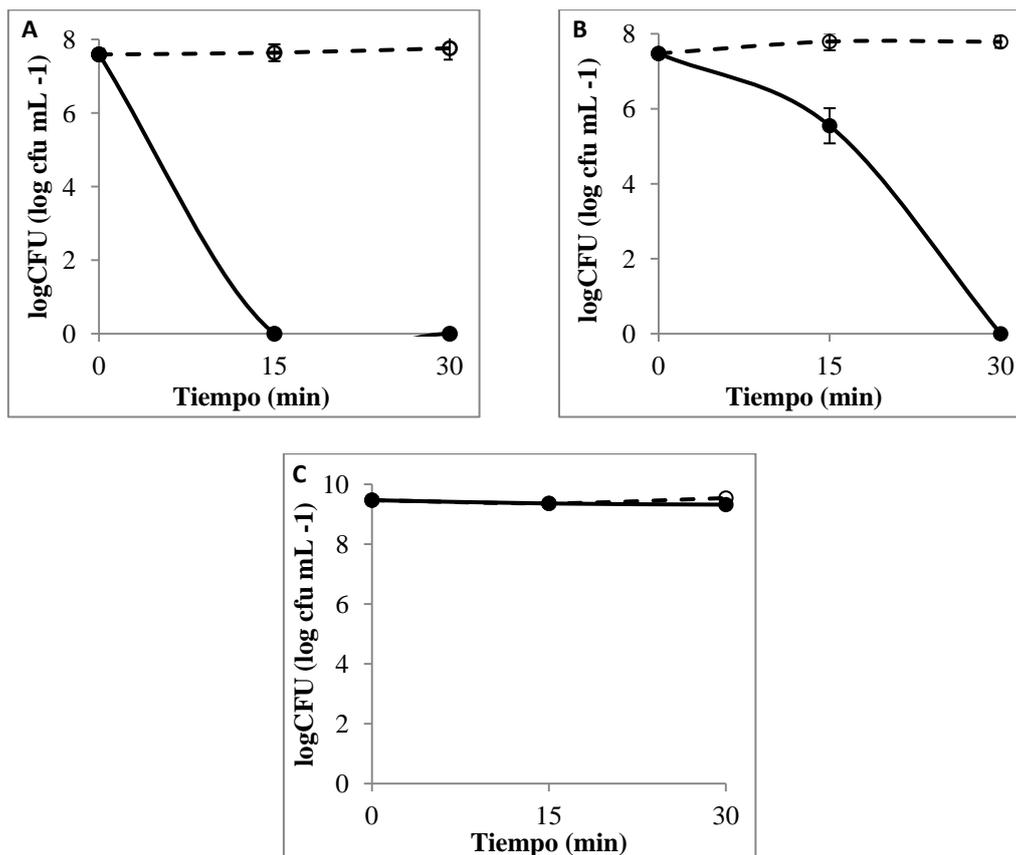


Figura 6. Supervivencia de *Alcanivorax borkumensis* SK2 (A), *P. putida* KT2440 (B) y *P. putida* DOT-T1E (C) después de un choque de tolueno de 0,2% (v/v). Los símbolos cerrados y línea continua corresponden a la muestra con tolueno y los símbolos abiertos y línea discontinua corresponden a la muestra control, sin tolueno. Las barras de error significan la desviación estándar de tres repeticiones de experimentos.

3.2 Estabilidad del plásmido pKST-1

El que el sistema bioreportero se encuentre en un plásmido y no en el cromosoma tiene algunas desventajas, como pudiera ser la necesidad de la existencia de una presión selectiva constante para asegurar la conservación del plásmido (Rice *et al.*, 1995). Debido a esto se llevaron a cabo ensayos de estabilidad del plásmido pKST-1 en *P. putida* KT2440, *P. putida* DOT-T1E y *A. borkumensis* SK2 (Figura 7).

El plásmido pKST-1 mostró ser muy estable en *P. putida* KT2440; después de 100 generaciones sin presión selectiva (ausencia del antibiótico Sm) este plásmido se

encontraba presente en el 99% de la población. El plásmido pKST-1 es también muy estable en *P. putida* DOT-T1E; después de 100 generaciones sin presión selectiva el 95% de las células mantenían este plásmido. En el caso de *A. borkumensis* SK2, se observó una disminución proporcional de las células que contenían plásmido al aumentar el número de generaciones. Sin embargo, en el número de generaciones necesario para llevar a cabo los experimentos de fluorescencia (menos de 10) el plásmido fue estable (al menos el 95% de las células fueron portadoras de pKST-1); por tanto se puede concluir que los tres biosensores pueden usarse en condiciones de campo en ausencia de antibiótico.

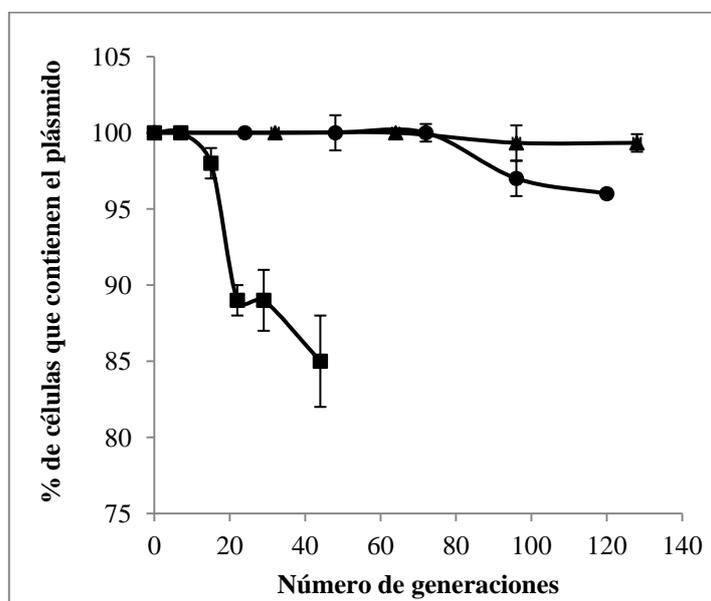


Figura 7. Estabilidad del plásmido pKST-1 en *P. putida* KT2440 (triángulos), *P. putida* DOT-T1E (círculos) en medio LB y *A. borkumensis* SK2 (cuadrados) en medio marino ONR7. Las barras de error significan la desviación estándar de tres repeticiones de experimentos.

4.- OPTIMIZACIÓN DEL BIOSENSOR

Los parámetros más importantes que deben medirse y optimizarse en un biosensor son el tiempo de exposición al inductor, es decir, el tiempo que necesita el biosensor para detectar dicho compuesto, los límites de detección y saturación y la especificidad a los compuestos que se quieren detectar (Hynninen *et al.*, 2010).

El tolueno es el BTEX más abundante en muestras ambientales contaminadas con petróleo, gasoil y gasolina (NRC, 1985; Speight, 1991). Debido a esto, este compuesto ha sido utilizado como modelo para optimizar el funcionamiento del biosensor.

4.1 Concentración necesaria de benzoato

El benzoato es un inductor del promotor P_m (Kessler *et al.*, 1993) incluido en el vector pSEVA438 y que, por lo tanto, para inducir la expresión de las proteínas reguladoras TodS-TodT del bioreportero pKST-1 sería necesario su adición al medio de cultivo (Silva-Rocha *et al.*, 2012). Para determinar la concentración de este compuesto más adecuada para la óptima expresión del sistema, se cultivó *P. putida* KT2440 (pKST-1) en medio mínimo M9 con citrato sódico como fuente de carbono, con tolueno (83 mg/L) y diferentes concentraciones de benzoato (Figura 8). Como se puede observar en la Figura 8, el aumento de la concentración de benzoato no afectó a la inducción de la producción de fluorescencia por tolueno; no se observaron diferencias significativas de expresión relativa de la GFP en presencia de benzoato 144 mg/L y 432 mg/L. Curiosamente, en ausencia de este compuesto y en presencia de tolueno, la inducción del sistema fue mayor que en presencia de benzoato, indicando una posible interferencia de este compuesto con el funcionamiento del biosensor, aunque no debe ser una interferencia directa ya que se ha descrito que el benzoato no se une a TodS (Busch *et al.*, 2007). Sin embargo, *P. putida* KT2440 degrada benzoato (Molina *et al.*, 2000) y algún producto de esta degradación podría unirse a TodS impidiendo la unión del tolueno (competencia por el sitio de unión) evitando la inducción de P_{tox} . Debido al buen funcionamiento del sistema en ausencia de benzoato, no se utilizó este compuesto en experimentos posteriores.

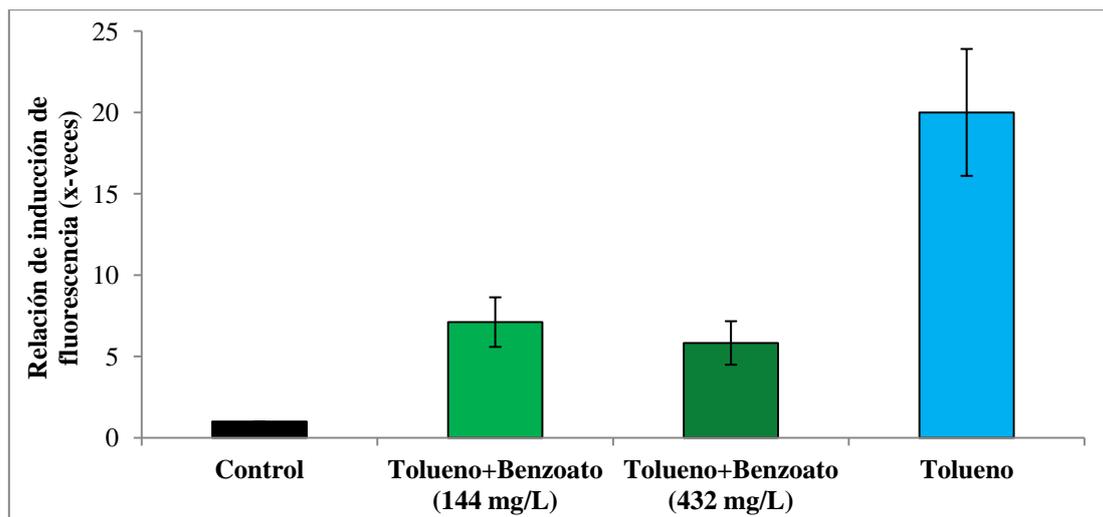


Figura 8. Estudio de la influencia de la concentración de benzoato en la eficiencia del biosensor *P. putida* KT2440 (pKST-1). Las barras de error significan la desviación estándar de tres repeticiones de experimentos.

4.2 Determinación de tiempo óptimo de exposición al inductor

La utilidad última de este tipo de biosensores es detectar claramente diferencias en la concentración de su inductor existentes en un/distintos entorno/s a lo largo del tiempo (Zhang *et al.*, 2013). La determinación del tiempo óptimo de exposición a un inductor es un parámetro importante a la hora de determinar el funcionamiento de un biosensor (Siegfried *et al.*, 2012). Este tiempo óptimo es aquel que permita una mejor diferenciación de la expresión de un biosensor a distintas concentraciones (Hynninen *et al.*, 2010). Por ello, *A. borkumensis* SK2 (pKST-1) (Figura 9A) y *P. putida* KT2240 (pKST-1) (Figura 9B) se expusieron a diferentes concentraciones de tolueno y a diferentes tiempos de inducción.

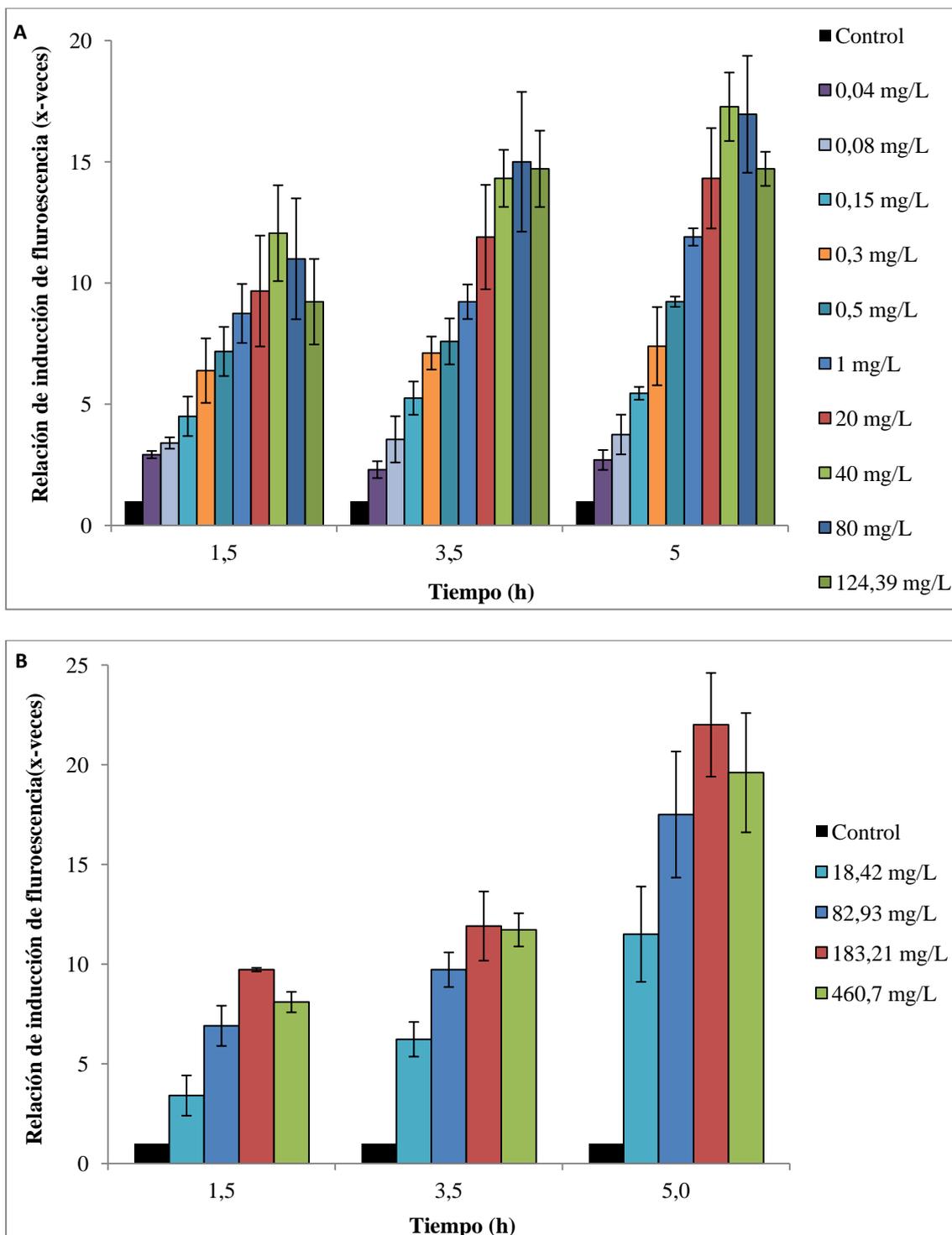


Figura 19. Experimentos de inducción de *A. borkumensis* SK2 (pKST-1) (A) y *P. putida* KT2440 (pKST-1) (B) a diferentes concentraciones de tolueno y tiempos de inducción. Las barras de error significan la desviación estándar de tres repeticiones de experimentos.

Como se puede observar en la Figura 9A, para el caso de la cepa *A. borkumensis* SK2 (pKST-1), la fluorescencia relativa producida por el sistema biosensor

(fluorescencia producida en condiciones de inducción/fluorescencia emitida en control sin inducir) aumenta con el tiempo. El tiempo de inducción óptimo se estimó en 5 h ya que las inducciones obtenidas fueron mayores. Los resultados fueron similares para el caso de la cepa *P. putida* KT2440 (pKST-1) (Figura 9B), encontrándose que 5 h fue el tiempo óptimo de exposición al inductor. Hay que destacar que en los análisis llevados a cabo por Lacal *et al.*, (2006) con $P_{todX}::lacZ$ en *P. putida* DOT-T1E el tiempo óptimo de inducción fue también de 5 h. Por tanto se eligió este tiempo como tiempo óptimo de inducción para todas las cepas en experimentos posteriores.

4.3 Determinación de límites de detección del biosensor

Otro de los parámetros importantes de un biosensor es su sensibilidad en la detección de un determinado compuesto (Hynninen *et al.*, 2010). El límite de detección mínimo se considera aquella concentración de inductor a la que la cepa biosensora emite el doble de fluorescencia que el control sin inductor. Como límite de saturación del sistema se considera aquella concentración del inductor a la que el biosensor encuentra su máxima emisión de fluorescencia (Sevilla *et al.*, 2015).

Para determinar tanto el límite de detección mínimo como el límite de saturación, las cepas biosensoras se expusieron a un amplio rango de concentraciones de tolueno. *A. borkumensis* SK2 (pKST-1) (Figura 10A), *P. putida* KT2240 (pKST-1) (Figura 10B) y *P. putida* DOT-T1E (pKST-1) (Figura 10C) respondieron con emisión de fluorescencia cuando el tolueno se utilizó como inductor.

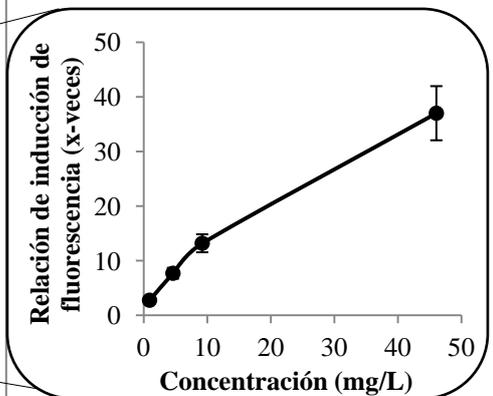
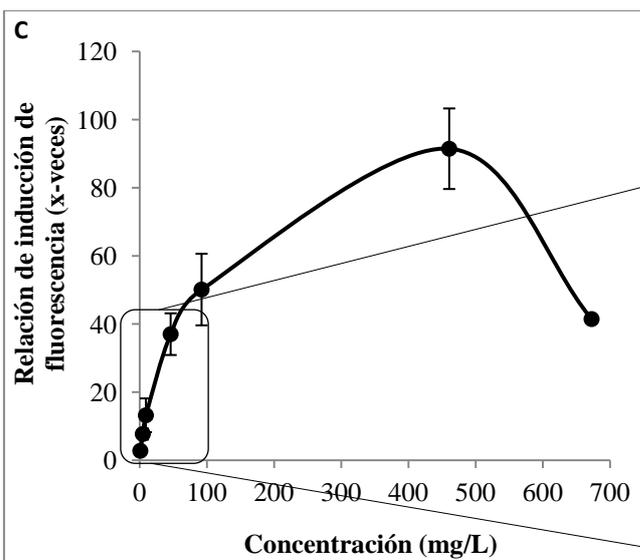
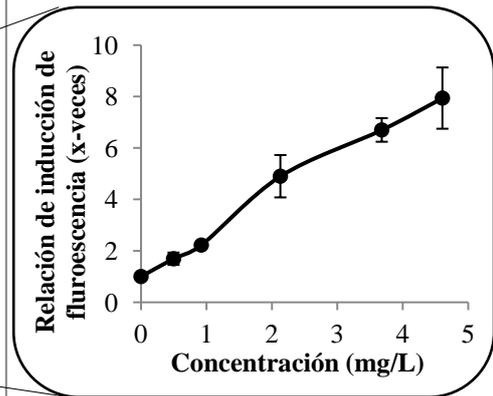
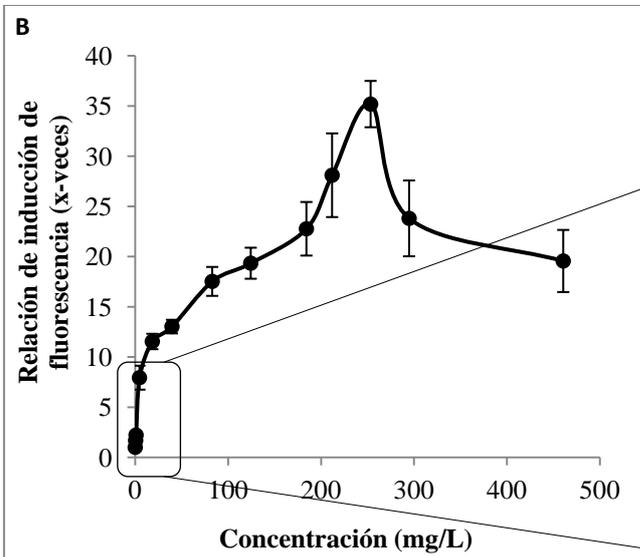
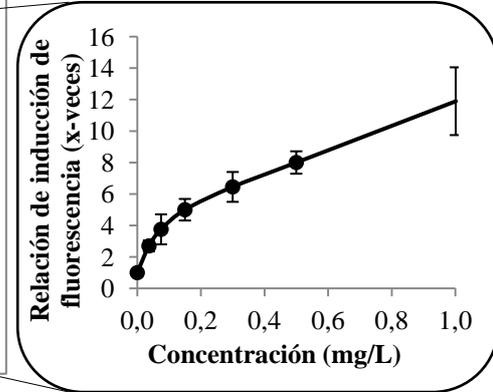
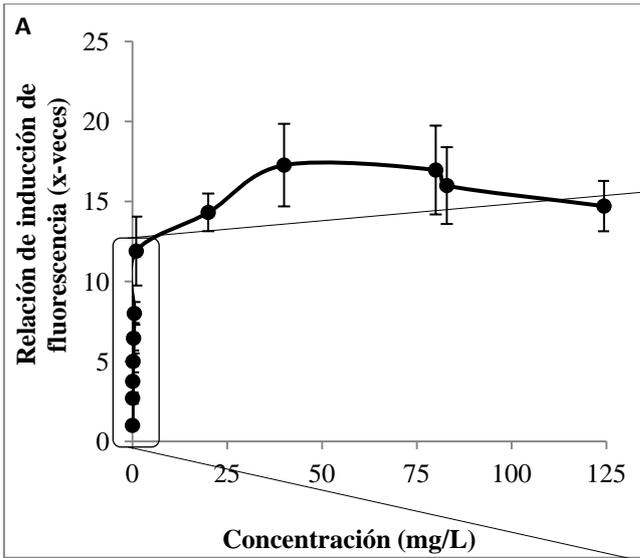


Figura 10. Determinación de los límites de detección y saturación en las cepas biosensoras *A. borkumensis* SK2 (pKST-1) (A), *P. putida* KT2440 (pKST-1) (B) y *P. putida* DOT-T1E (pKST-1) (C). Las barras de error significan la desviación estándar de tres repeticiones independientes.

El límite de detección de *A. borkumensis* SK2 (pKST-1) (Figura 10A) se determinó a una concentración de 0,04 mg/L de tolueno, mientras que el límite de saturación se corresponde con una concentración de 40 mg/L, donde la emisión de fluorescencia relativa fue de 17 veces. A concentraciones mayores, la emisión de fluorescencia comenzó a decaer, probablemente porque el tolueno podría estar causando ciertos efectos tóxicos en *A. borkumensis* SK2 (pKST-1). Sin embargo, se siguió observando fluorescencia hasta una concentración de tolueno de 120 mg/L (14,5 veces de inducción), concentración (0,014% v/v) que todavía no resultaba letal para las células (Figura 6). A concentraciones comprendidas entre 0,04 mg/L y 1 mg/L, la emisión de fluorescencia aumentó linealmente con respecto a la concentración de tolueno. Este rango de concentraciones es, en principio, el que podría utilizarse para cuantificación de tolueno con esta cepa biosensora. Si se representa la concentración de tolueno (mg/L) frente a la relación de inducción de fluorescencia (x-veces), se obtiene la recta de ajuste de estos datos. La ecuación de regresión tendría la siguiente fórmula: $y=0,095x-0,2316$ donde “y” sería la concentración de tolueno (mg/L) y “x” sería la relación de inducción de fluorescencia (x-veces) y cuya $R^2=0,94$.

El límite de detección de tolueno de *P. putida* KT2440 (pKST-1) (Figura 10B) se determinó a una concentración de 0,9 mg/L, bastante más alta que la determinada para *A. borkumensis* SK2 (pKST-1) (0,04 mg/L), mientras que el límite de saturación se observó a una concentración de 250 mg/L, donde la emisión de fluorescencia relativa fue de 35 veces comparada con el caso de la cepa biosensora en ausencia de tolueno. A concentraciones mayores de tolueno, probablemente debido a la toxicidad del mismo, la

emisión de fluorescencia empezó a disminuir. Sin embargo, a estas altas concentraciones de tolueno (hasta 460 mg/L), se seguía observando una emisión de fluorescencia relativa de 20 veces, ya que esta concentración (0,054% v/v) todavía no era letal para los cultivos (Figura 6). A concentraciones comprendidas entre 1 mg/L y 5 mg/L, la emisión de fluorescencia aumentó linealmente con respecto a la concentración de tolueno. En este caso la ecuación de la recta de ajuste de estos datos es: $y=0,6584x-0,609$ y cuya $R^2=0,99$.

El límite de detección de tolueno por parte de *P. putida* DOT-T1E (pKST-1) (Figura 10C) fue similar al caso de *P. putida* KT2440 (pKST-1) (0,9 mg/L), mientras que el límite de saturación fue mucho más alto (460 mg/L), donde la fluorescencia relativa emitida por esta cepa biosensora fue de 90 veces. Concentraciones superiores de tolueno, 460 mg/L, se supuso que afectaron a al metabolismo de *P. putida* DOT-T1E (pKST-1), por lo que la emisión de fluorescencia comenzó a disminuir. Al igual que en los casos anteriores, a concentraciones sobresaturadas de tolueno (700 mg/L o 0,082% v/v) este biosensor continuaba mostrando una gran inducción (40 veces), debido a que esta concentración todavía no resultaba letal para las células (Figura 6). A concentraciones comprendidas entre 5 mg/L y 100 mg/L, la emisión de fluorescencia aumentó linealmente con respecto a la concentración de tolueno, con recta de ajuste $y=0,998x-2,3357$ y cuya $R^2=0,97$.

Todos estos experimentos se realizaron usando medio mínimo M9 para las dos cepas biosensoras de *P. putida*, y medio marino para el biosensor *A. borkumensis* SK2 (pKST-1). Para demostrar la importancia de la cepa hospedadora para la detección de compuestos tóxicos en un determinado entorno, se analizó el funcionamiento de los biosensores de *P. putida* en medio marino. No se pudo comprobar el funcionamiento del biosensor de *A. borkumensis* SK2 (pKST-1) en medio mínimo M9, ya que esta cepa no

crecía en dicho medio. Como ya se mostró en el Capítulo 1 de la presente Tesis Doctoral (Figura 3), *P. putida* KT2440 y *P. putida* DOT-T1E fueron capaces de crecer en medio marino, aunque *P. putida* KT2440 crecía más lentamente que *P. putida* DOT-T1E.

El funcionamiento del biosensor *P. putida* KT2440 (pKST1) en medio marino con tolueno fue bastante pobre comparado con el obtenido en M9 (Figuras 11A y 11B, Anexo 1) probablemente porque la cepa esté estresada a altas concentraciones de sal. *P. putida* DOT-T1E (pKST-1) se comportó eficientemente en medio marino, aunque su funcionamiento fue mejor en medio mínimo M9 comparado con el obtenido en medio marino (Figura 11B), los límites de detección fueron mayores en medio marino (2,5 mg/L) que en M9 (0,9 mg/L) (Anexo 1).

P. putida DOT-T1E (pKST-1) (Figura 11A) mostró límites de detección más altos que *A. borkumensis* SK2 (pKST-1) (2,5 mg/L vs 0,04 mg/L).

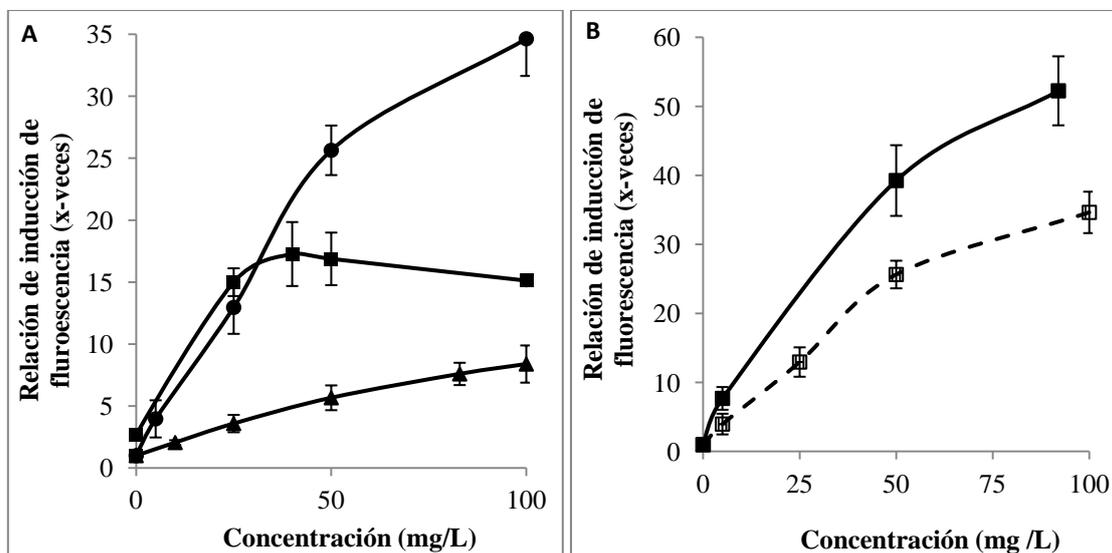


Figura 11. Experimentos de inducción del sistema bioreportero pKST-1 con tolueno en A) *A. borkumensis* SK2 (cuadrados), *P. putida* KT2440 (triángulos) y *P. putida* DOT-T1E (círculos) en medio marino ONR7a. B) *P. putida* DOT-T1E (pKST-1) en medio marino (símbolos abiertos y línea de puntos) y en medio mínimo M9 (símbolos cerrados y línea continua). Las barras de error significan la desviación estándar de tres repeticiones de experimentos independientes.

Por tanto, para los experimentos posteriores se decidió usar medio mínimo M9 para los biosensores de *P. putida* y medio marino para los experimentos con *A. borkumensis* SK2 (pKST-1).

Todos estos resultados muestran que las cepas biosensoras construidas son capaces de detectar distintas concentraciones de tolueno con diferentes rangos de detección cuantitativa. Las diferencias en los límites de detección de las tres cepas pueden ser debidas a los distintos mecanismos fisiológicos característicos de cada una de ellas, como como por ejemplo, la presencia o ausencia de bombas de expulsión de disolventes orgánicos.

4.4 Determinación de la especificidad del sistema bioreportero

La especificidad de los biosensores está determinada por el espectro de efectores de la proteína reguladora que controla la expresión del gen reportero (van der Meer *et al.*, 2004). Idealmente, se requiere que los biosensores desarrollados sean específicos para el tipo de compuestos a detectar y que no sean inducidos por otras moléculas presentes en el medio (Ripp, 2005).

En nuestro caso, los biosensores se construyeron para la detección de compuestos volátiles de tipo BTEX, que se encuentran abundantemente en vertidos de petróleo. Para determinar la especificidad de los biosensores construidos se llevaron a cabo experimentos de exposición de las cepas construidas a los restantes hidrocarburos aromáticos monocíclicos del grupo BTEX (benceno, *m*-xileno, *p*-xileno, *o*-xileno y etilbenceno) y también a hidrocarburos aromáticos policíclicos (naftaleno, fenantreno, etc) (Figura 13) presentes en mezclas de petróleo, gasoil, gasolina (Neff, 1990). Los resultados se muestran en la Tabla 1 y en la Figura 12.

Tabla 1. Límites de detección (LD) y saturación (LS) de los biosensores con diferentes BTEX.

<i>A. borkumensis</i> SK2 (pKST-1)	LD	LS	Relación de inducción
Tolueno	0,04	40	17,01
Benceno	0,15	0,5	8,91
<i>p</i> -Xileno	1,5	80	16,87
<i>m</i> -Xileno	70	125	14,15
<i>P. putida</i> KT2440 (pKST-1)	LD	LS	Relación de inducción
Tolueno	0,9	250	35,20
Benceno	0,4	100	23,45
<i>p</i> -Xileno	25	110	11,50
<i>m</i> -Xileno	45	125	9,74
<i>P. putida</i> DOT-T1E (pKST-1)	LD	LS	Relación de inducción
Tolueno	0,9	460	91,44
Benceno	0,2	150	53,55
<i>p</i> -Xileno	5	125	39,47
<i>m</i> -Xileno	40	125	17,31

Los tres biosensores fueron inducidos por *p*- y *m*-xileno y benceno, además de por tolueno. No se encontró inducción a ninguna concentración de etilbenceno. Para el *m*-xileno, el límite de saturación fue idéntico para las tres cepas (125 mg/L). Este resultado, junto con los altos límites de detección, 40, 45 y 70 mg/L para *P. putida* DOT-T1E (pKST-1), *P. putida* KT2440 (pKST-1) y *A. borkumensis* SK2 (pKST-1) respectivamente (Tabla 1), sugerían que este compuesto no es un buen inductor del sistema. Busch *et al.*, (2007) habían determinado previamente que el *o*-xileno es un antagonista del sistema y, efectivamente, cuando se añadieron diferentes

concentraciones de *o*-xileno a un cultivo inducido con 5 mg/L o 1 mg/L de tolueno se observó una disminución progresiva de la fluorescencia (Figura 12).

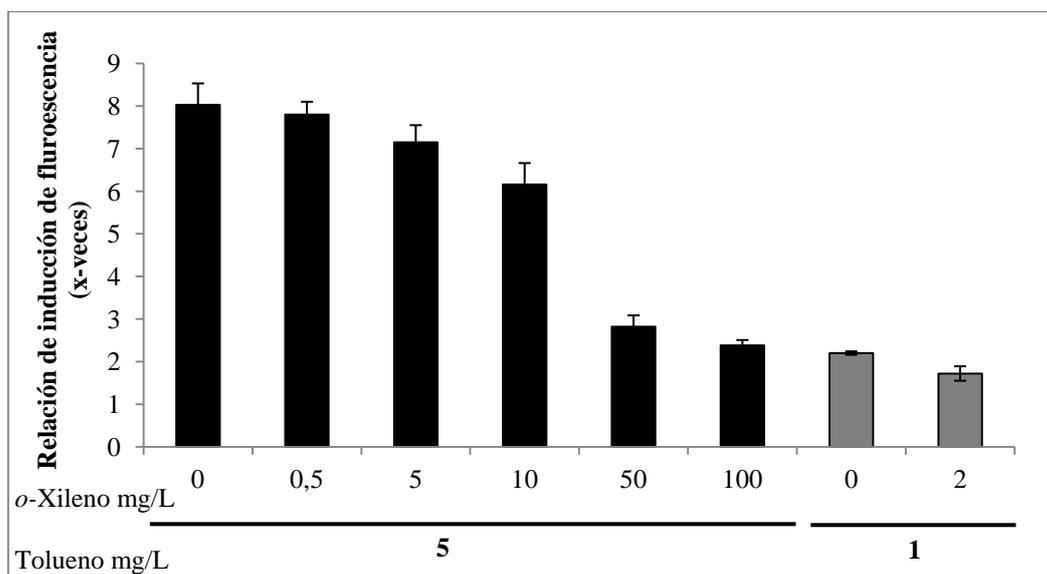


Figura 12. Efecto del *o*-xileno en la respuesta a tolueno de *P. putida* KT2440 (pKST-1). Las barras de error significan la desviación estándar de tres repeticiones de experimentos.

No se observó inducción de *P. putida* KT2440 (pKST-1) cuando se añadieron diversos PAHs a sus concentraciones de saturación en medios acuosos como fenantreno (1,6 mg/L), naftaleno (31,6 mg/L) y 2-metilnaftaleno (24,6 mg/L) (Figura 13).

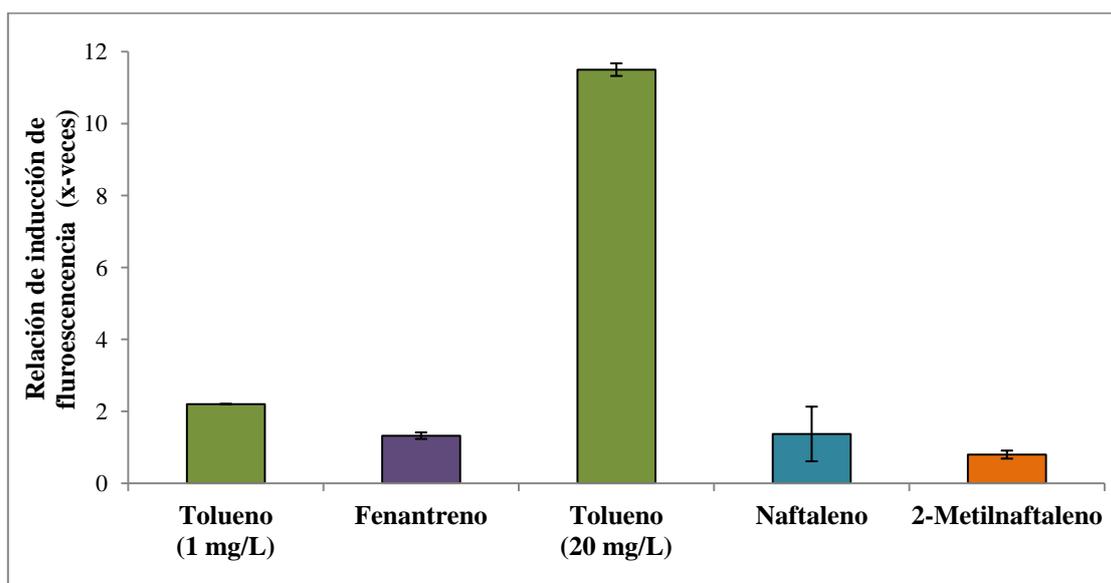


Figura 13. Respuesta del biosensor *P. putida* KT2440 (pKST-1) con hidrocarburos aromáticos policíclicos. Las barras de error significan la desviación estándar de tres repeticiones de experimentos.

Estos resultados indican una especificidad de estos biosensores limitada a algunos de los compuestos del BTEX, concretamente tolueno, benceno, *m*- y *p*-xileno.

5. VALIDACIÓN DEL BIOSENSOR CON MUESTRAS COMPLEJAS (CRUDO, GASOIL, GASOLINA, MUESTRAS AMBIENTALES)

La mayoría de las muestras ambientales son mezclas de contaminantes complejos que podrían tener efectos agonistas, antagónicos o sinérgicos causados por interacciones físicas o químicas complejas en el funcionamiento del biosensor (Zhang *et al.*, 2012). Debido a esto consideramos conveniente validar los biosensores construidos con muestras complejas.

La mayor parte de contaminación por BTEX se debe a vertidos de combustibles en el medio ambiente (Baumann, 2001). Por ello, se probó la eficacia de los biosensores de BTX (benceno, tolueno, *m*- y *p*-xileno) diseñados en esta tesis a la hora de detectar la presencia de estos compuestos en muestras de laboratorio contaminadas artificialmente con diferentes concentraciones de gasolina y gasoil (Figuras 14 y 15) y en muestras ambientales obtenidas de entornos potencialmente contaminados de forma accidental por vertidos de petróleo y derivados (descritos en M&M).

5.1 Análisis del contenido de las muestras ambientales mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS)

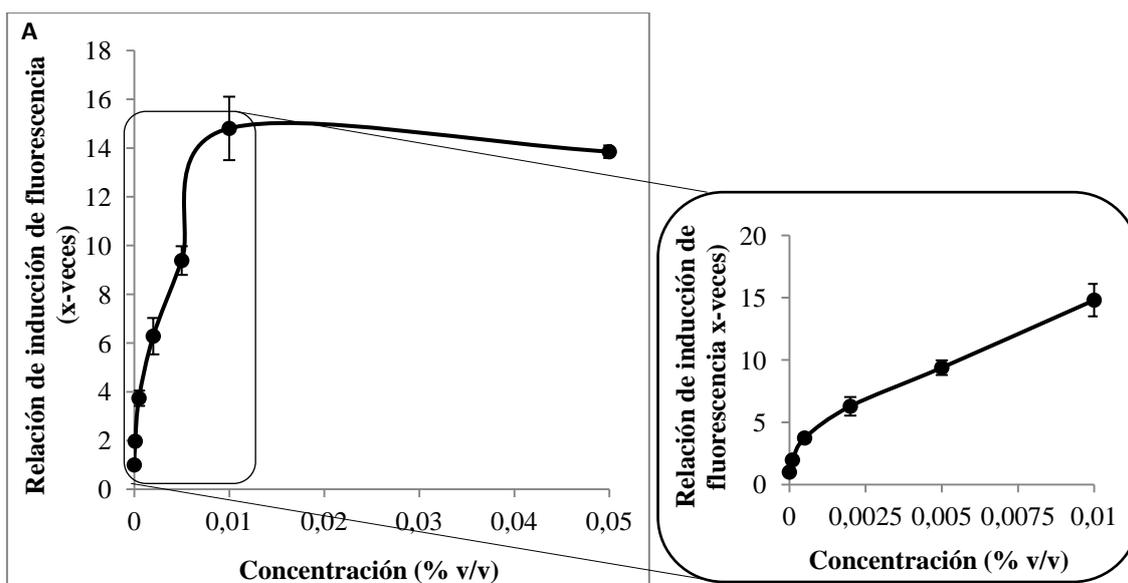
Para hacer una determinación cualitativa y cuantitativa de los hidrocarburos aromáticos monocíclicos y policíclicos en las muestras ambientales que se utilizarían posteriormente para los ensayos de inducción, se llevó a cabo la cuantificación tanto de BTEX como de PAHs mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS). La concentración de BTEX y PAHs determinadas en estas muestras se muestra en el Anexo 2.

En general, las gasolinas contienen un 50% de hidrocarburos aromáticos, mientras que el gasoil contiene sólo un 25% de éstos hidrocarburos, siendo el otro 75% hidrocarburos saturados (ATSDR, 1995). Consecuentemente, las muestras contaminadas con gasolina tenían mayor contenido en BTEX y PAHs que aquellas contaminadas con gasoil (Anexo 2).

En las muestras ambientales de Messina, Gela, Motril y Salobreña se puede apreciar un bajo nivel de contaminación en todas ellas, siendo los BTEX inapreciables tanto en aguas como en sedimentos. Probablemente debido a su alta volatilidad, la cantidad de BTEX en estas muestras es inferior a la de PAHs, siendo éstos más abundantes en los sedimentos de Messina que en los de Gela o en las muestras de agua.

5.2 Validación del biosensor con gasolina

Cuando los distintos biosensores fueron expuestos a concentraciones crecientes de gasolina se observó inducción de la emisión de la fluorescencia relativa en todos ellos; *A. borkumensis* SK2 (pKST-1) (Figura 14A), *P. putida* KT2440 (pKST-1) (Figura 14B) y *P. putida* DOT-T1E (pKST-1) (Figura 14C).



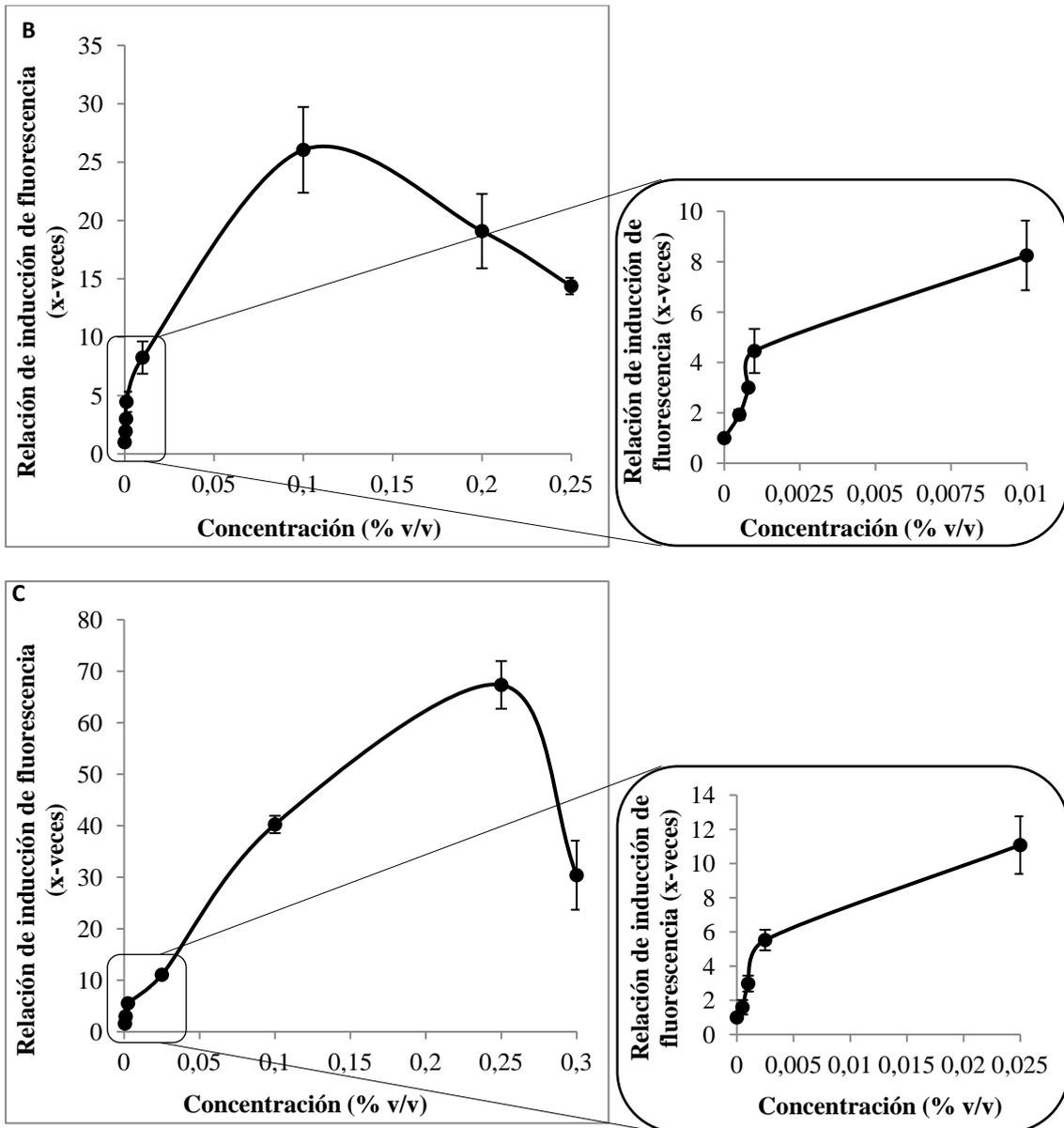


Figura 14. Experimentos de inducción de fluorescencia en *A. borkumensis* SK2 (pKST-1) (A), *P. putida* KT2440 (pKST-1) (B) y *P. putida* DOT-T1E (pKST-1) (C) a diferentes concentraciones de gasolina.

Las barras de error significan la desviación estándar de tres repeticiones de experimentos.

El límite de detección de compuestos BTX en muestras contaminadas con gasolina del biosensor *A. borkumensis* SK2 (pKST-1) (Figura 14A) fue más bajo que en las cepas de *P. putida*, efecto ya observado para el caso del tolueno, confirmando la mayor sensibilidad de este biosensor. La concentración mínima de BTX detectada en muestras contaminadas con gasolina a fue cuando la gasolina estaba diluida al 0,0001% (v/v) y el

límite de saturación se produjo a una concentración de gasolina de 0,01% (v/v) donde la emisión de fluorescencia relativa fue de 15 veces. A concentraciones mayores, se supuso que el crecimiento de *A. borkumensis* SK2 (pKST-1) se veía comprometido debido al estrés producido por la presencia de compuestos tóxicos, por ello la intensidad de fluorescencia comenzó a decaer. Sin embargo, se siguió observando fluorescencia (14 veces de inducción) hasta una concentración de gasolina de 0,05% (v/v).

El límite de detección de compuestos BTX en muestras contaminadas con gasolina por parte de *P. putida* KT2440 (pKST-1) (Figura 14B) se determinó a una concentración de gasolina del 0,0005% (v/v), mientras que el límite de saturación se observó a una concentración del 0,1% (v/v), donde la emisión de fluorescencia relativa fue de 26 veces. Concentraciones mayores de gasolina, se supuso que afectaban al crecimiento de esta cepa, de manera que la inducción comenzaba a disminuir. Sin embargo, a altas concentraciones de gasolina se seguía observando inducción, induciéndose 15 veces a una concentración de gasolina 0,25% (v/v).

En el caso de *P. putida* DOT-T1E (pKST-1) (Figura 14C) el límite de detección de BTEX en muestras contaminadas con gasolina se determinó a una concentración del 0,00075% (v/v), mientras que el límite de saturación se determinó a una concentración de gasolina del 0,25% (v/v), donde la emisión de fluorescencia relativa fue de 68 veces. Al igual que en el caso de *P. putida* KT2440 (pKST-1), se supuso, que concentraciones mayores de gasolina comenzaban a afectar al crecimiento de esta cepa, por lo que la inducción comenzaba a disminuir. Sin embargo, en este caso a concentraciones altas de gasolina del 0,3% (v/v) se seguía observando una alta inducción (30 veces).

En la Tabla 2 se pueden observar los límites de detección y de saturación de gasolina de las tres cepas y los límites del rango en el que la inducción varía de forma lineal con la concentración de gasolina (Tabla 2).

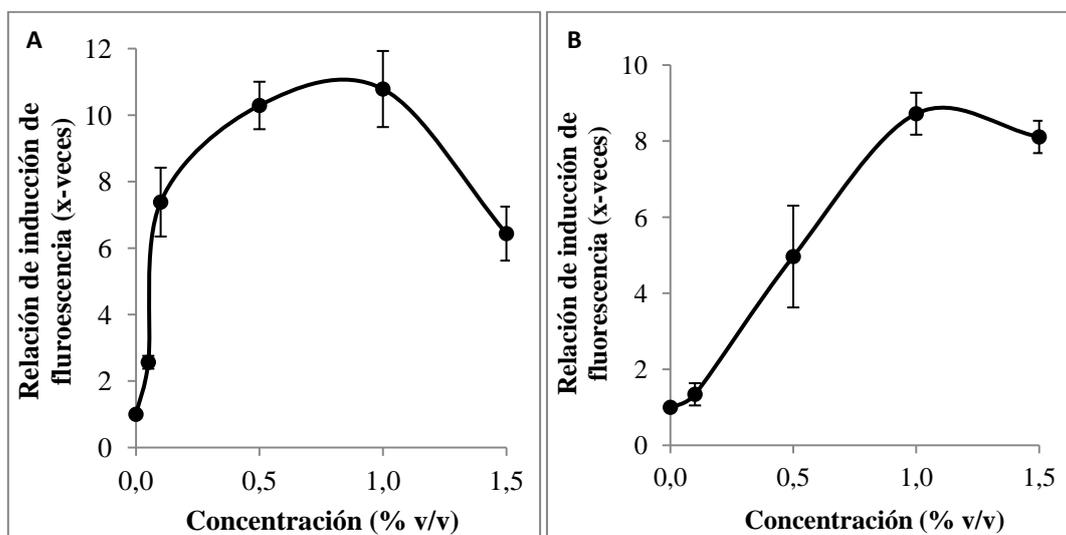
Tabla 2. Comparación de los límites de detección y límites en el rango lineal de los tres biosensores con gasolina.

Límites/Biosensor	SK2 (pKST-1)		KT2440 (pKST-1)		DOT-T1E (pKST-1)	
Detección	Límite detección	Límite saturación	Límite detección	Límite saturación	Límite detección	Límite saturación
Gasolina (%)	0,0001	0,01	0,0005	0,1	0,00075	0,25
Gasolina (mg/L de BTX)*	0,05	5	0,27	54	0,41	125
En rango lineal	Límite inferior	Límite superior	Límite inferior	Límite superior	Límite inferior	Límite superior
Gasolina (%)	0,0001	0,01	0,0005	0,01	0,00075	0,1
Gasolina (mg/L de BTX)*	0,05	5	0,27	5,40	0,41	54

* Cantidad de BTX detectados que están presentes en el porcentaje de gasolina indicado en la Tabla 2.

5.3 Validación del biosensor con gasoil

Diferentes concentraciones de gasoil también fueron capaces de inducir la emisión de fluorescencia por *A. borkumensis* SK2 (pKST-1) (Figura 15A), *P. putida* KT2440 (pKST-1) (Figura 15B), *P. putida* DOT-T1E (pKST-1) (Figura 15C).



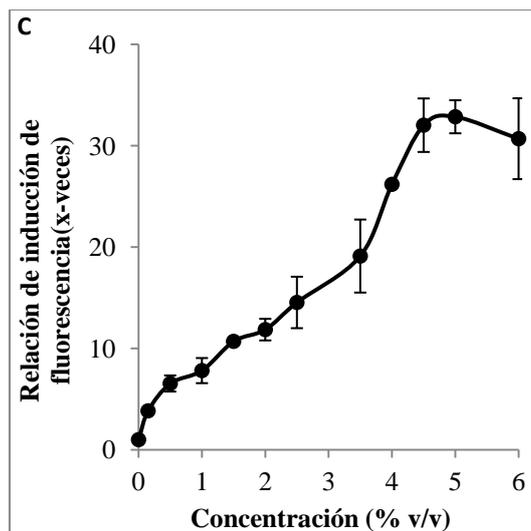


Figura 15. Experimentos de inducción de fluorescencia por gasoil en *A. borkumensis* SK2 (pKST-1) (A), *P. putida* KT2440 (pKST-1) (B) y *P. putida* DOT-T1E (pKST-1) (C) a diferentes concentraciones de gasoil. Las barras de error significan la desviación estándar de tres repeticiones de experimentos.

En el caso de *A. borkumensis* SK2 (pKST-1) (Figura 15A) el límite de detección de BTX en muestras de gasoil fue a una concentración de 0,05% (v/v), mientras que el límite de saturación se observó a una concentración de 0,8% (v/v) (Tabla 3), donde la emisión de fluorescencia relativa fue de 11 veces. A concentraciones mayores se siguió observando fluorescencia hasta una concentración de gasolina de 1,5% (v/v) (6,2 veces de inducción).

El límite de detección de BTX en muestras contaminadas con gasoil en *P. putida* KT2440 (pKST-1) (Figura 15B) fue 0,15% (v/v), mientras que el límite de saturación se observó a una concentración de 1% (v/v) (Tabla 3), donde la emisión de fluorescencia relativa fue de 9 veces. Sin embargo, a altas concentraciones de gasoil se seguía observando inducción, 8 veces a una concentración de gasoil 1,5% (v/v).

En el caso de *P. putida* DOT-T1E (pKST-1) (Figura 15C) el límite de detección de compuestos BTX en muestras con gasoil fue a una concentración de 0,08% (v/v) de gasoil, mientras que el límite de saturación se observó a una concentración de 4,5%

(v/v) (Tabla 3), donde la emisión de fluorescencia relativa fue de 33 veces. Al igual que en el caso de *A. borkumensis* SK2 (pKST-1) y *P. putida* KT2440 (pKST-1) concentraciones mayores de gasoil afectaban al crecimiento de esta cepa, por lo que la intensidad de la inducción comenzaba a disminuir. Sin embargo, en este caso a concentraciones altas de gasoil se seguía observando una alta inducción (30 veces) a una alta concentración de gasoil de 6% (v/v).

En la Tabla 3 se pueden observar los límites de detección y de saturación de gasoil de estas cepas y los límites del rango en el que la inducción varía de forma lineal con la concentración de gasoil, rango en el que podría utilizarse esta cepa biosensora como medio de cuantificación de BTX en gasoil.

Tabla 3. Comparación de los límites de detección y límites en el rango lineal de los tres biosensores con gasoil.

Límites/Biosensor	SK2 (pKST-1)		KT2440 (pKST-1)		DOT-T1E (pKST-1)	
Detección	Límite detección	Límite saturación	Límite detección	Límite saturación	Límite detección	Límite saturación
Gasoil (%)	0,05	0,8	0,15	1	0,08	4,5
Gasoil (mg/L de BTX)*	1,57	25	4,72	31	2,52	141
En rango lineal	Límite inferior	Límite superior	Límite inferior	Límite superior	Límite inferior	Límite superior
Gasoil (%)	0,05	0,25	0,15	1	0,08	3,5
Gasoil (mg/L de BTX)*	1,57	7,87	4,72	31	4	110

* Cantidad de BTX detectados que están presentes en el porcentaje de gasolina indicado en la Tabla 4.

5.4 Validación del biosensor con aguas y sedimentos marinos

Se realizaron experimentos de inducción con las aguas de los puertos de Motril (Granada) y Mesina (Italia) (transitadas por barcos y donde se pueden producir escapes de combustibles), de las playas de Salobreña, cercana al puerto de Motril (Granada) y de Gela (Sicilia), situada cerca de una refinería donde se había producido un derrame de combustible. También se analizaron los sedimentos del puerto de Mesina y sedimentos cercanos a Gela.

En todos los casos, los test de inducción de la emisión de fluorescencia por los biosensores con 5 % y 10 % (v/v) de estas aguas y sedimentos resultaron negativos. Esto está de acuerdo con los resultados del análisis por GC-MS de estas muestras, en las que no se detectaron concentraciones significativas de BTX (Anexo 2). Por tanto, ninguno de los biosensores da falsos positivos.

5.5 Validación del biosensor con muestras contaminadas con crudo o derrames de crudo

En los experimentos realizados a distintas concentraciones de aguas saturadas de crudo y petróleo (chapapote) del Prestige tampoco se observó inducción del biosensor. Las muestras contenían 0,004 mg/L (crudo) y 0,011 mg/L (petróleo del Prestige) de tolueno (Anexo 2), una concentración muy cercana al límite de detección del biosensor de *A. borkumensis* SK2 (pKST-1) y por debajo de los límites de detección de los otros dos biosensores.

Los resultados experimentales obtenidos en este apartado 5 con muestras contaminadas artificialmente y muestras ambientales nos permiten afirmar que estos biosensores son específicos en la determinación de compuestos monocíclicos que forman parte de las mezclas BTEX y que permiten discriminar entre muestras contaminadas y no contaminadas.

6. DESAPARICIÓN DE GASOLINA EN SUELO. RESPUESTA DEL BIOSENSOR

Los BTX son compuestos altamente volátiles que desaparecen de forma natural de los ambientes donde se vierten por evaporación, dispersión atmosférica y biodegradación natural. Se decidió determinar la eficacia de los biosensores diseñados

para la detección de la desaparición de estos compuestos de suelos contaminados artificialmente con gasolina. Estos suelos fueron monitorizados con la cepa biosensora KT2440 (pKST-1) (Figura 16) debido a su buena persistencia en suelos (Molina *et al.*, 2000), a la vez que se cuantificaba el contenido en BTEX mediante GC-MS (Tabla 4)

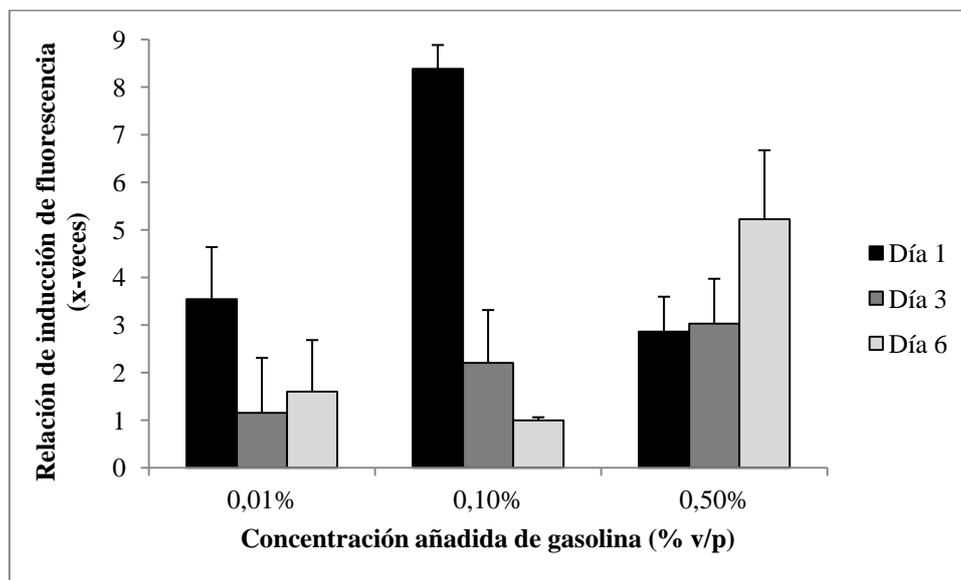


Figura 16. Detección de BTX en suelos contaminados por gasolina usando *P. putida* KT2440 (pKST-1).

Las barras de error significan la desviación estándar de tres repeticiones de experimentos.

Cuando el suelo se contaminó con 0,01 % (v/p) de gasolina, se obtuvo inducción del biosensor 1 día después de contaminar el suelo; en los días siguientes, la cantidad de tolueno determinada por GC-MS (Tabla 4) estaba por debajo del límite de detección de este biosensor (concentración de tolueno 0,15 mg/L; Tabla 2) y, por tanto, no se observó respuesta positiva (Figura 16).

Cuando se añadió gasolina al suelo a una concentración de 0,1 % (v/p) (Figura 16) se observó una disminución de los niveles de inducción a lo largo del tiempo, al igual que en la concentración de tolueno en las muestras (Tabla 4). En el día 6 después de añadir la gasolina, la concentración de BTEX estaba por debajo del límite de detección (L.D: 0,32 mg/L; Tabla 2).

Los suelos contaminados con 0,5 % (v/p) de gasolina mostraron inducciones más bajas de las esperadas en los días 1 y 3 (Figura 16). Como el número de células del biosensor en el cultivo aumentaba de 10^8 a 10^9 células por mL después de las 5 horas de incubación, se descartaron problemas de toxicidad. Sin embargo, se determinó que la concentración de *o*-xileno en las muestras después de 1 día y 3 días fue relativamente alta (2,13 y 1,11 mg/L) comparada con la cantidad de BTX inductores del biosensor. A estas concentraciones el *o*-xileno produce inhibición en el funcionamiento del biosensor (Figura 13). Este problema no se observó en el día 6, cuando se determinó una buena inducción del biosensor probablemente porque la concentración de *o*-xileno había disminuido a una concentración próxima a la que no interfería con la inducción (Figura 12).

Tabla 4. Resultado del análisis de BTEX por GC-MS de las muestras de suelo contaminadas con gasolina.

	Benceno	Tolueno	Etilbenceno	<i>m-,p</i> -xileno	<i>o</i> -xileno	BTEX totales
0,01%						
Día 1	0,018	0,106	0,016	0,019	0,031	0,19
Día 3	0,015	0,078	0,015	0,021	0,028	0,155
Día 6	0,009	0,033	0,012	0,018	0,026	0,098
0,1 %						
Día 1	0,026	0,384	0,095	0,111	0,292	0,908
Día 3	0,018	0,166	0,034	0,052	0,132	0,401
Día 6	0,019	0,138	0,028	0,025	0,113	0,322
0,50%						
Día 1	0,057	1,263	0,592	1,289	2,129	5,329
Día 3	0,026	0,493	0,238	0,477	1,114	2,348
Día 6	0,027	0,377	0,155	0,362	0,668	1,588

* Resultados en mg/L.

Estos resultados mostraron que este biosensor es capaz de detectar BTX de una forma sencilla y que puede ser útil para mapear rápidamente la contaminación de entornos donde se sospecha que se ha producido un derrame de petróleo o de derivados del mismo.

DISCUSIÓN

El propósito del presente capítulo fue la construcción y validación del funcionamiento de biosensores para la detección específica de hidrocarburos aromáticos monocíclicos en diferentes ambientes (marino, agua dulce y terrestre). Para ello, decidimos construir un sistema bioreportero en base a los reguladores TodS y TodT y su correspondiente promotor P_{todX} , ya que este sistema regulador de dos componentes había sido estudiado en la cepa *P. putida* DOT-T1E en nuestro laboratorio por Lacal *et al.*, (2006) y Busch *et al.*, (2007) y se había determinado que el perfil de efectores comprendía distintos compuestos aromáticos monocíclicos. Para poder usar este sistema bioreportero en distintos ambientes, se decidió implementarlo en varias cepas bacterianas, concretamente en *A. borkumensis* SK2 que es una cepa marina (Yakimov *et al.*, 1998), en una cepa altamente tolerante a disolventes orgánicos (*P. putida* DOT-T1E; Ramos *et al.*, 1995) y en una buena colonizadora de suelos (*P. putida* KT2440; Molina *et al.*, 2000), obteniendo así una alta versatilidad para el bioreportero.

Aunque al comienzo de esta Tesis Doctoral ya existían biosensores para la detección de tolueno, la construcción de nuevos biosensores respondía a una serie de necesidades que no estaban cubiertas por los desarrollados con anterioridad. Los biosensores de BTEX contruidos por Willardson *et al.*, (1998) y Tecon *et al.*, (2010), estaban basados en el activador transcripcional *XylR* de *P. putida* mt-2 en *Escherichia coli* DH5 α y los genes *lucFF* como reporteros fusionados al promotor P_u de *P. putida* mt-2 (Willardson *et al.*, 1998) y la proteína sensora TbuT de *Ralstonia pickettii* en *E. coli* DH5 α y LuxAB como proteína reportera fusionada al promotor P_{tbuA1} (Tecon *et al.*, 2010). Ambos utilizaban luminiscencia para cuantificar la expresión génica, por lo que necesitaban la adición de un sustrato secundario exógeno (O_2 y aldehído) para su activación (Van der Meer *et al.*, 2010) lo que complica el protocolo de detección del contaminante,

especialmente si se quiere llevar a cabo la detección en el mismo sitio donde se encuentra la contaminación. Además, ambos bioreporteros están introducidos en *E. coli*, lo que limita bastante el rango de utilización.

Esta última limitación no afecta al biosensor desarrollado por Applegate *et al.*, (1998) que está basado en células de *P. putida* F1, cepa que degrada tolueno mediante la ruta de la tolueno dioxigenasa análoga a la de *P. putida* DOT-T1E. Este sistema contiene los genes *lux* como proteína reportera, y un sistema regulador que tiene una base molecular similar al del bioreportero desarrollado durante esta Tesis Doctoral. Las bacterias del género *Pseudomonas* son bastante resistentes a la presencia de productos tóxicos, agentes estresantes y cambios ambientales (Heipieper *et al.*, 1994), lo que las hace, en general, más útiles que otras cepas de laboratorio para la detección de este tipo de compuestos, especialmente en mezclas complejas como son las muestras ambientales. Pese a la similitud en la base molecular entre nuestro bioreportero y el desarrollado por Applegate, había diferencias significativas entre los distintos biosensores; las cepas biosensoras *P. putida* KT2440 (pKST-1) y *P. putida* DOT-T1E (pKST-1) mostraron límites de saturación mucho más altos (250 mg/L y 460 mg/L respectivamente) lo que representa una gran ventaja en la detección de estos compuestos en muestras con mayor contenido de BTX. Igualmente, el sistema de detección con GFP presenta ventajas significativas a la hora de simplificar el ensayo (ver introducción).

Los límites de detección de los biosensores construidos en esta Tesis Doctoral estaban por debajo de los determinados para las cepas biosensoras de Willardson *et al.*, (1998) y Stiner *et al.*, (2002) y eran similares a los que presentaban los biosensores de Applegate *et al.*, (1998) y Tecon *et al.*, (2010) (Anexo 1). *A. borkumensis* (pKST-1), mostró un rango de detección similar al del biosensor de Applegate (de 0,03 mg/L a 50 mg/L de tolueno puro en soluciones acuosas), con la ventaja de funcionar óptimamente

en medio marino sin necesidad de dilución (Anexo 1). Curiosamente, y pese a ser cepas aisladas de suelo y aguas residuales, los biosensores basados *P. putida* KT2440 y *P. putida* DOT-T1E mostraron un funcionamiento adecuado en este medio marino sin necesidad de dilución. No obstante, su funcionamiento, especialmente el de *P. putida* KT2440 (pKST-1) fue bastante peor que en medio mínimo M9, probablemente por el mayor estado de estrés de estas cepas. Los biosensores desarrollados en otros laboratorios con anterioridad a esta Tesis Doctoral no fueron estudiados en medio marino excepto en el de Tecon *et al.*, (2010) donde las muestras marinas se tuvieron que diluir cuatro veces para el correcto funcionamiento del biosensor. Por tanto, los biosensores desarrollados en esta Tesis Doctoral representan una mejora importante con respecto a los ya existentes.

Una de las mayores ventajas del uso de biosensores, es el corto tiempo óptimo necesario para medir (5 horas de incubación+10 s por medición de fluorescencia por muestra), un tiempo que es más corto que la puesta en marcha y el análisis de muestras por métodos químicos (Van der Meer *et al.*, 2010) y un método mucho más barato. Este tiempo de ensayo de nuestros biosensores es similar o inferior que para los biosensores de Stiner *et al.*, (2002) y Willardson *et al.*, (1998), donde los tiempos de crecimiento y exposición al inductor fueron de 5,5 h y 6,5 h respectivamente. En el caso de los biosensores de Applegate *et al.*, (1998) y Tecon *et al.*, (2010) el tiempo de exposición que decidieron utilizar fue de 2 horas, ligeramente inferior al elegido por nosotros. Por otra parte, la detección de BTEX por GC-MS requiere equipos más sofisticados e implica el traslado de las muestras al laboratorio donde estuviera disponible el GC-MS lo que resta agilidad al proceso y encarece los costes.

Con la introducción del bioreportero en diferentes cepas bacterianas conseguimos obtener biosensores que poseen límites de detección y de saturación diferentes. Estas

diferencias probablemente podrían deberse a la presencia de distintos mecanismos de resistencia a disolventes orgánicos en cada cepa. Aunque ya se sabía que *P. putida* DOT-T1E era una cepa muy resistente a disolventes orgánicos (Ramos *et al.*, 1998), no se tenía mucha información disponible sobre la tolerancia de *P. putida* KT2440 y *A. burkumensis* a estos compuestos; en este trabajo se determinó que estas dos últimas cepas son moderadamente tolerantes a disolventes orgánicos.

La resistencia a disolventes orgánicos en *P. putida* se debe a la existencia de bombas de eflujo de salida de disolventes; la bomba TtgABC está codificada cromosómicamente en *P. putida* KT2440 y *P. putida* DOT-T1E, mientras que las bombas TtgDEF (codificada en el cromosoma) y TtgGHI (en el plásmido pGRT1) (Rojas *et al.*, 2001; Rodríguez-Herva *et al.*, 2007; Molina *et al.*, 2011) están presentes sólo en *P. putida* DOT-T1E. La presencia de estas bombas de extrusión de disolventes orgánicos hace que el tolueno que penetra en la célula sea expulsado rápidamente. No se tiene información sobre bombas de eflujo en *A. borkumensis* SK2, cepa caracterizada por ser degradadora de alcanos (Yakimov *et al.*, 1998). Como hemos puesto de manifiesto, esta cepa era más sensible a altas concentraciones de tolueno; probablemente, por la ausencia de bombas de flujo eficientes. Por tanto, la concentración efectiva de BTEX en el interior celular podría ser mayor, lo que conllevaría la activación del biosensor a concentraciones más bajas que en el caso de las cepas de *P. putida*. Las diferencias entre los límites de saturación en la detección de BTEX entre las dos cepas de *Pseudomonas* (250 mg/L de tolueno puro en el caso de KT2440 (pKST-1) y 460 mg/L de tolueno puro en el caso de DOT-T1E (pKST-1)), podrían deberse a que *P. putida*, DOT-T1E posee numerosos mecanismos para una mejor supervivencia a altas concentraciones de tolueno (Segura *et al.*, 2012); entre ellos destacar que esta cepa acumula menor cantidad de tolueno en su interior debido a la

mayor presencia y efectividad de los sistemas de extrusión mencionados anteriormente y a la capacidad de esta cepa para la degradación de disolventes orgánicos (Mosqueda *et al.*, 1999).

El propósito final de un biosensor es comprobar la presencia o ausencia de un compuesto en el ambiente. La mayoría de las muestras ambientales son mezclas complejas de sustancias que pueden interferir (con efectos agonistas, antagonistas o sinérgicos) en el funcionamiento de un biosensor. Para validar un biosensor es necesario que otras moléculas no deseadas no sean capaces de activar estos sistemas (Zhang *et al.*, 2009). Por esta razón también se ha demostrado que las cepas biosensoras desarrolladas en este estudio son capaces de detectar de forma específica otros BTX como tolueno, benceno, *m*- y *p*-xileno, mientras que no detecta otros compuestos del petróleo como etilbenceno, o PAHs, encontrándose que el *o*-xileno influye de forma negativa en el sistema.

Aunque la cepa biosensora construida en *P. putida* F1 funcionaba con compuestos puros de forma similar a *Alcanivorax borkumensis* (pKST-1), se disponía de muy pocos datos sobre su comportamiento en muestras ambientales; sólo se han publicado ensayos de inducción con combustible de aviación (JP-4), en los que no se indicaba el límite de detección mínimo de BTEX en dicho combustible, ni la cantidad total de estos compuestos en estas muestras. Nosotros hemos determinado los límites de detección de BTX en derrames artificiales de gasoil y gasolina y se ha cuantificado por GC-MS la cantidad de BTEX presentes en estas muestras. Los ensayos realizados con gasolina nos han permitido determinar que la cantidad mínima de tolueno detectada en gasolina (cantidad de tolueno determinada por GC-MS presente en la cantidad de gasolina a la que el biosensor se inducía 2 veces) en *P. putida* KT2440 (pKST-1) y *P. putida* DOT-T1E (pKST-1) fue mucho menor que en el caso de tolueno puro, lo que se podría

explicar por una posible actividad aditiva de la mezcla de BTX encontrada en este combustible. En el caso del gasoil, los límites de detección de tolueno eran mayores que los encontrados con gasolina y tolueno. Esto podría ser debido a una mayor presencia de compuestos antagonistas que inhiben el funcionamiento del sistema. Por ejemplo, el *o*-xileno, antagonista en la inducción del promotor P_{todX} , se encuentra en mayor cantidad en el caso del gasoil (Anexo 2).

Los BTEX son compuestos altamente volátiles (Lim *et al.*, 2014) y, por esta razón, las muestras ambientales expuestas durante largo tiempo a condiciones atmosféricas, como en el caso de los sedimentos y aguas de Gela/Messina o las aguas de Salobreña/Motril, o incluso el petróleo del Prestige o el petróleo crudo, no contenían BTEX (aguas marinas y sedimentos) o la concentración de estos compuestos era muy baja (en el caso de los petróleos). Consecuentemente, los biosensores no detectaron BTX en estas muestras, validando el buen funcionamiento de los mismos, no dando lugar a falsos positivos.

La validez de los biosensores se demostró también en los experimentos en suelo contaminado artificialmente con diversas cantidades de gasolina. El biosensor fue capaz de emitir fluorescencia cuando los niveles de tolueno (o BTX) de la muestra estaban por encima de los límites de detección del biosensor. En algunos casos, la fluorescencia emitida por *P. putida* KT2440 (pKST-1) fue menor de la esperada, probablemente debido a la mayor presencia de *o*-xileno en estas muestras.

Por tanto, se puede concluir que la utilización de biosensores en muestras complejas para la cuantificación de productos específicos es difícil ya que puede haber distintos factores que modifiquen los niveles de inducción. Entre estos factores, hemos identificado que la presencia de compuestos antagonistas es uno de los que influyen en la cuantificación, pero además la dinámica de volatilización de compuestos y la

biodisponibilidad de los mismos pueden afectar considerablemente al funcionamiento del biosensor.

En resumen, el conjunto de biosensores construidos en esta Tesis Doctoral son capaces de detectar de forma muy sensible la presencia de un amplio rango de concentraciones de BTX y, dada la naturaleza de las cepas bacterianas utilizadas, son capaces de detectarlos en gran variedad de muestras complejas (tanto en aguas marinas, como en aguas dulces y suelos). Hay que destacar que estos biosensores detectan la fracción biodisponible de BTX, es decir aquella que está disponible para el microorganismo.

CAPÍTULO 3

1. INTRODUCCIÓN

El naftaleno y sus derivados son los compuestos más abundantes dentro de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) presentes en el petróleo y sus derivados, como gasoil y gasolina (Anexo 2). La Agencia Internacional de Investigación contra el Cáncer (IARC) describe el naftaleno (IARC, 2002) y sus derivados 1- y 2-metilnaftaleno (ATSDR, 2005) como posibles agentes carcinógenos para humanos y animales. Además, estos compuestos afectan a la formación de células sanguíneas, al hígado, al sistema nervioso, a los ojos y al sistema respiratorio (ASTDR, 2005). Aparte de estos efectos cancerígenos, el naftaleno puede causar confusión, náuseas, vómitos, diarreas y aparición de sangre en la orina. Algunos derivados clorados, como el 1-cloronaftaleno, causan daños severos en la piel y pueden tener efectos mortales en el hígado (WHO, 2001).

Precisamente debido a esta toxicidad, existe la necesidad de detectar su presencia en la naturaleza para así poder eliminarlos del medio ambiente (Alberici *et al.*, 2002). El uso de biosensores, como ya se ha manifestado en capítulos anteriores, es una buena aproximación para esta detección eficiente, fácil de usar y de bajo coste (Belkin, 2003).

Para conseguir el tercer objetivo de esta Tesis Doctoral, la construcción y la caracterización de un biosensor para la detección específica de naftalenos, decidimos analizar si el sistema de regulación del operón de la degradación de PAHs (*phn*) de *Burkholderia* sp. MS3 era conveniente para la construcción de este biosensor.

Los genes implicados en la degradación de PAHs en *Burkholderia* sp. MS3, fueron identificados en el laboratorio en el que se realizó esta Tesis Doctoral por la Dra Rodríguez-Conde (comunicación personal) y son prácticamente idénticos a los descritos por Laurie *et al.* (1999) en *Burkholderia* sp. RP007. Experimentos llevados a cabo por la Dra. Rodríguez-Conde sugieren que, al igual que en *Burkholderia* sp. RP007,

también en la cepa *Burkholderia* sp. MS3 los genes *phn* están asociados a un plásmido de gran tamaño.

El primer paso de la ruta de degradación de naftaleno, PAH de bajo peso molecular, consiste en la adición de una molécula de oxígeno en la posición 1,2 del anillo aromático para dar *cis*-naftaleno dihidrodiol. Este paso está catalizado por la naftaleno dioxigenasa codificada por los genes *phnAc* y *phnAd*. El siguiente paso consiste en la deshidrogenación de la forma dihidrodiol generándose 1,2-dihidroxi-naftaleno sobre el que actúa la 1,2-dihidroxi-naftaleno dioxigenasa produciendo ácido 2-hidroxi-2H-cromeno-2-carboxílico. Posteriormente actúan una isomerasa y una hidratasa-aldolasa formándose salicilaldehído que es transformado en salicilato por la enzima salicilaldehído deshidrogenasa (Figura 1). Finalmente, el salicilato puede ser metabolizado a través de la ruta del catecol o del gentisato hasta intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Laurie y Lloyd-Jones, 1999).

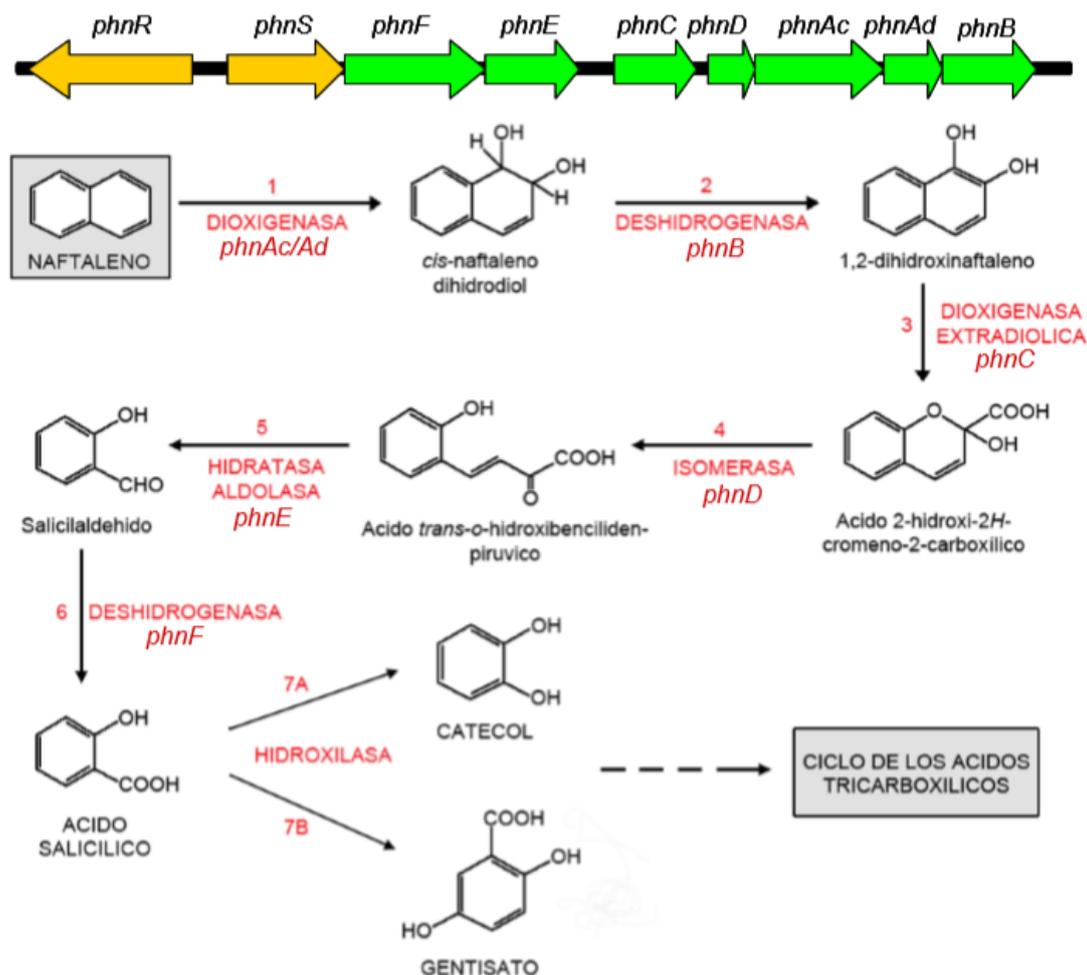


Figura 1. Esquema de la organización de los genes *phn* y ruta de degradación en *Burkholderia* sp. RP007

Modificado de (Rodríguez-Conde, 2011).

Los genes *phnSFECDAcAdB* forman un operón (Figura 1), teniendo PhnS homología con reguladores de la familia LysR. El gen regulador *phnR* se transcribe de forma divergente al operón *phnSFECDAcAdB* y codifica una proteína que muestra una alta similitud con reguladores tipo NtrC (Laurie y Lloyd-Jones, 1999). Rodríguez-Conde *et al.*, (en preparación) demostraron que PhnR era el principal responsable de la inducción del operón *phnSFECDAcAdB* en presencia de naftaleno y, que al contrario de lo descrito para *Burkholderia* sp. RP007, este operón no se inducía por fenantreno, salicilato ni otros intermediarios de la ruta metabólica.

Dada la especificidad de este sistema por naftaleno, se decidió seguir adelante con una caracterización más exhaustiva de los inductores del sistema y con la construcción del biosensor.

2. DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE INDUCTORES DEL PROMOTOR P_{phnS}

Debido a que el naftaleno y sus derivados metilados constituyen los compuestos aromáticos mayoritarios dentro de los hidrocarburos aromáticos policíclicos en derrames de petróleo y combustibles (Speight, 1991) y a la alta toxicidad de los naftalenos halogenados (WHO, 2011), se decidió profundizar en el estudio de la expresión de este promotor (P_{phnS}) utilizando como moléculas inductoras el naftaleno y algunos derivados como 1- y 2-metilnaftaleno, 1-cloronaftaleno, 1-bromonaftaleno y 2,7-dinitronaftaleno. Este estudio se hizo con una construcción ya disponible en el laboratorio que tenía el gen de la β -galactosidasa bajo el control del promotor P_{phnS} (plásmido pPSM) y que estaba introducida en la cepa *Burkholderia* sp. MS3. La expresión de P_{phnS} se indujo 8,5 veces en presencia concentraciones saturantes de naftaleno (31,6 mg/L), 3,7 veces en presencia de 1-bromonaftaleno (13,8 mg/L), 5,6 veces en presencia de 1-cloronaftaleno (200 mg/L), 6,3 veces en presencia de 1-metilnaftaleno (31,7 mg/L) y 11,1 veces en presencia de 2-metilnaftaleno (24,6 mg/L) con respecto al control sin inducir (Figura 2). Estos resultados indicaron que los mejores inductores fueron el naftaleno y el 2-metilnaftaleno, aunque los derivados halogenados del naftaleno y el 1-metilnaftaleno también fueron bastante buenos inductores. No se observó inducción en presencia de 2,7-dinitronaftaleno. .

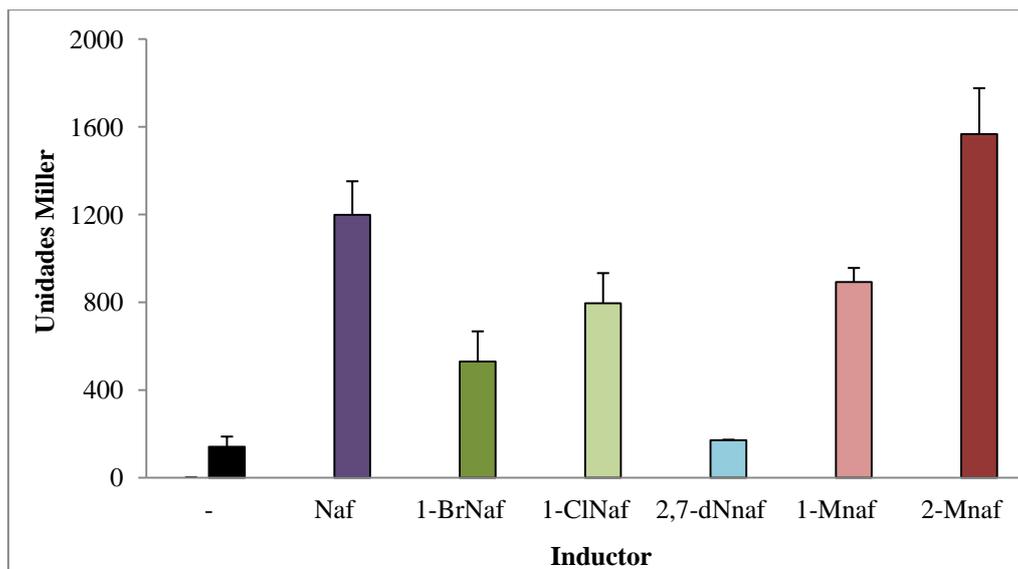


Figura 2. Actividad β -galactosidasa del plásmido pPSM en *Burkholderia* sp. MS3 en presencia de naftaleno (Naf), 1-bromonaftaleno (1-BrNaf), 1-cloronaftaleno (1-ClNaf), 2,7-dinitronaftaleno (2,7-dNnaf), 1-metilnaftaleno (1-Mnaf) y 2-metilnaftaleno (2-Mnaf). Las barras de error significan la desviación estándar de tres repeticiones de experimentos.

No se observó inducción de la expresión desde el promotor P_{phnS} en presencia de compuestos aromáticos monocíclicos (benzoato, etilbenceno, tolueno) ni de otros hidrocarburos lineales (decanato) que también se encuentran entre los compuestos más abundantes de los diferentes crudos (Speight, 1991). Esto nos indicó la alta especificidad de este sistema por naftalenos y derivados monosustituídos y por tanto su idoneidad para el propósito de este objetivo (Figura 3).

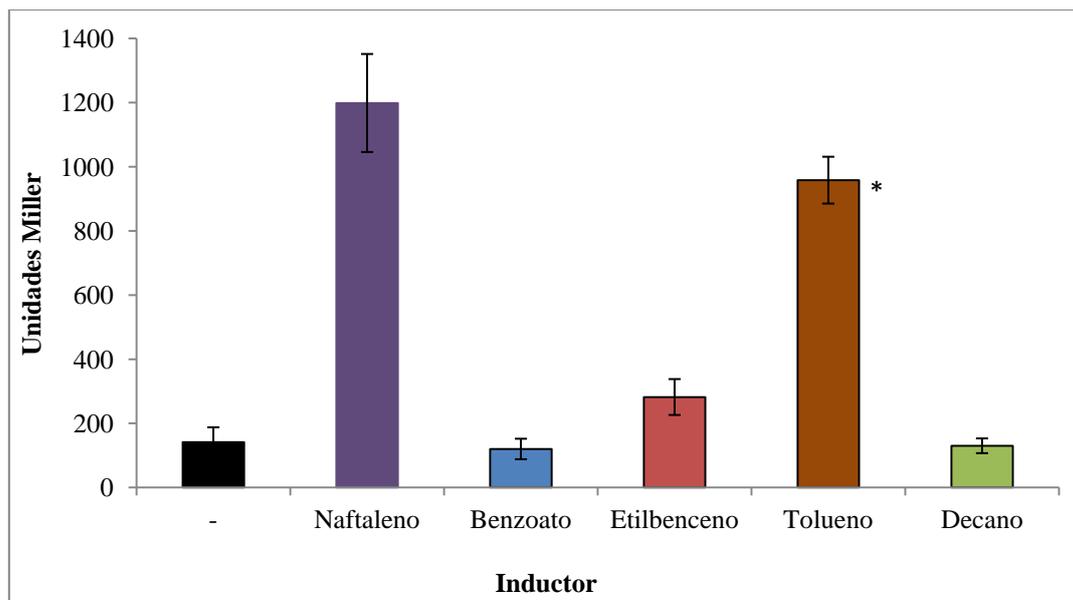


Figura 3. Actividad β -galactosidasa del plásmido pPSM en *Burkholderia* sp. MS3 en presencia de naftaleno, benzoato, etilbenceno, tolueno y decano. * Este resultado es un artificio, las células no crecían bien en presencia de tolueno a esta concentración. Las barras de error significan la desviación estándar de tres repeticiones de experimentos.

En un biosensor es importante conocer si, además de reconocer la presencia de un compuesto, es capaz de degradarlo. Si lo elimina podemos hablar de detección de flujos del compuesto en la célula, si no de concentración del compuesto inicial biodisponible (Van der Meer *et al.*, 2010). Para analizar el crecimiento de la cepa utilizando los inductores del sistema como única fuente de carbono, se realizaron curvas de crecimiento con los derivados de naftaleno utilizados anteriormente, encontrándose que esta cepa era capaz de crecer en medio mínimo M9 con 1- y 2-metilnaftaleno como única fuente de carbono a una concentración de 31,6 mg/L y 24,6 mg/L respectivamente. Sin embargo, no era capaz de crecer con 1-cloro (200 mg/L) y 1-bromonaftaleno (13,8 mg/L) como fuente de carbono (Figura 4).

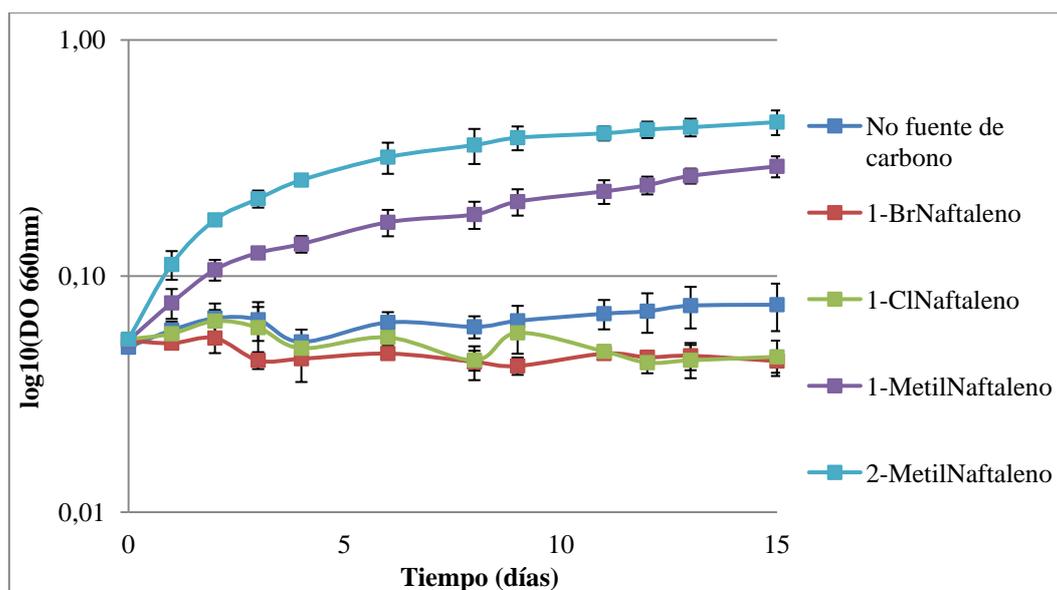


Figura 4. Curvas de crecimiento de *Burkholderia* sp. MS3 en medio mínimo M9 con diferentes compuestos como única fuente de carbono. Las barras de error significan la desviación estándar de tres repeticiones de experimentos.

A raíz de estos experimentos podemos concluir que *Burkholderia* sp. MS3 es una cepa capaz de degradar naftalenos y algunos de sus derivados.

3. CONSTRUCCIÓN DE UN SISTEMA BIOREPORTERO PARA EXPRESIÓN HETERÓLOGA

La construcción $P_{phnS}::lacZ$ (utilizada para determinar el perfil de inducción del operón de la ruta degradativa de naftalenos) incluida en la cepa *Burkholderia* sp. MS3, podría ser utilizada como sistema bioreportero para la detección específica de naftalenos y derivados, pero la reacción de la β -galactosidasa resulta compleja a la hora de ser utilizada *in situ* como sistema biosensor. Además, en este plásmido no se había clonado la proteína reguladora, necesaria para la expresión en sistemas heterólogos. Por esto se decidió construir un biosensor con la proteína reportera GFP (pKSN-1) tal y como se indica en Materiales y Métodos

En presencia del inductor, el gen regulador *phnR* de *Burkholderia* sp. MS3 se transcribe y la proteína PhnR induce la expresión de *gfp* a partir del promotor P_{phnS} en función de la concentración de inductor presente.

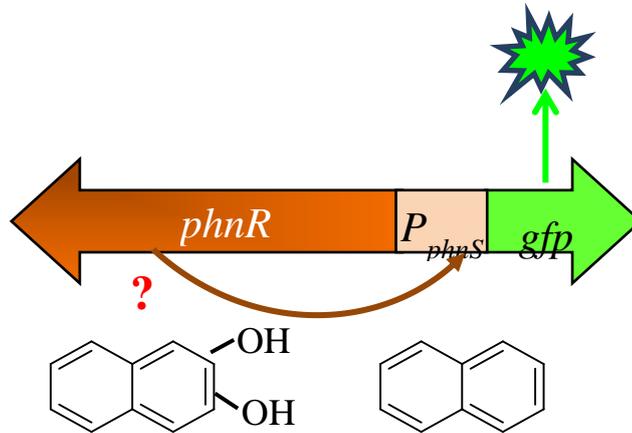


Figura 5. Funcionamiento del sistema bioreportero pKSN-1 de naftaleno y derivados.

Cuando esta construcción se electroporó en *Burkholderia* sp. MS3, se comprobó que el funcionamiento era el esperado, mostrando inducción por naftaleno. Sin embargo, cuando se introdujo *E. coli* DH5 α y en *P. putida* KT2440 el sistema no mostró inducción, lo que podría ser debido a que el naftaleno no fuera inductor directo del sistema, sino un producto de su degradación (Rodríguez-Conde, comunicación personal), o que hubiera problemas de transporte en estas cepas.

4. MEJORA DEL SISTEMA BIOREPORTERO PARA SU EXPRESIÓN HETERÓLOGA

Debido a que en el sistema anterior no había expresión de GFP en presencia de naftaleno, se procedió a realizar una nueva construcción que pudiera expresarse de manera heteróloga en cepas incapaces de degradar naftaleno y distintas a *Burkholderia* sp. MS3, como *E. coli*, *P. putida* KT2440 o *A. borkumensis* SK2.

Nuestro mejor candidato para ser inductor del sistema fue el *cis*-naftaleno dihidrodiol (Figura 1) resultado de la acción de la dioxigenasa codificada por los genes *phnAcAd* sobre el naftaleno, ya que se había demostrado anteriormente que 1,2-dihidroxi-naftaleno, salicilaldehído y salicilato (compuestos comerciales) no inducían el sistema (Rodríguez-Conde, 2011). Se procedió, pues, a la construcción de un sistema bioreportero (pKSN-3) que contenía la dioxigenasa del operón *phn* de *Burkholderia* sp. MS3 (*phnAcAd*), la proteína reguladora de este operón PhnR y el promotor P_{phnS} (Figura 6). Este sistema bioreportero funcionaría de la siguiente manera: en primer lugar, la presencia de benzoato produce la activación de la proteína XylS que se une al promotor P_m induciendo la transcripción de los genes *phnAcAd*. La actividad enzimática de estas proteínas activaría la conversión de naftaleno a *cis*-naftaleno dihidrodiol que, de ser el inductor de la ruta, que sería reconocido por la proteína reguladora PhnR, induciendo la transcripción de *gfp* desde el promotor P_{phnS} (Figura 6).

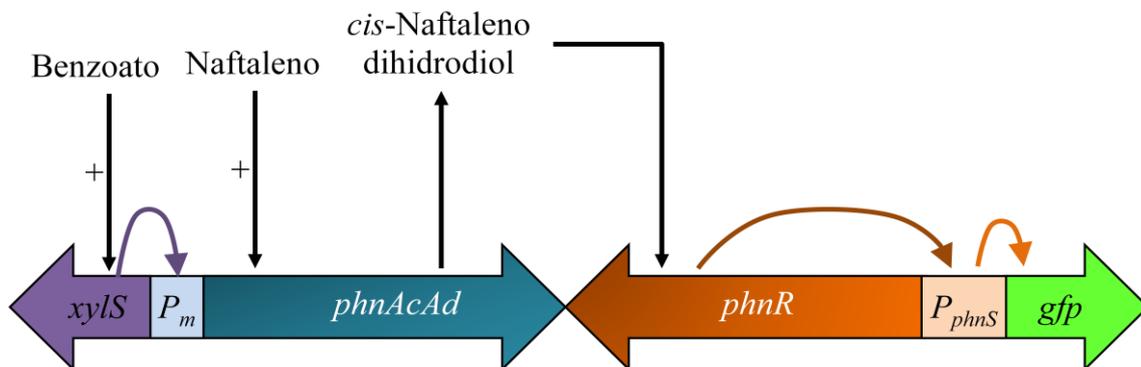


Figura 6. Funcionamiento del sistema bioreportero pKSN-3.

Se introdujo el plásmido pKSN-3 en *E. coli* DH5a mediante transformación, obteniéndose la cepa *E. coli* (pKSN-3). Esta cepa se expuso a benzoato y naftaleno, no se observándose emisión de fluorescencia a ninguna de las concentraciones utilizadas (datos no mostrados). Este resultado podría ser debido a que, para el funcionamiento de la dioxigenasa *phnAcAd*, se podría requerir, como en el caso de otras dioxigenasas, la

participación de un sistema de ferredoxinas, enzimas que actúan como intermediarias transportadoras de electrones (Bruschi *et al.*, 2006). Estas ferredoxinas no se han identificado en el operón *phn* de *Burkholderia* sp. MS3 ni se han descrito en su genoma y, aunque en algunas dioxigenasas el componente ferredoxina puede ser intercambiado entre dioxigenasas de diferentes cepas bacterianas (Valentine, 1964), en este caso podría no ser así. También es posible que en esta construcción nos falte algún elemento regulador no caracterizado hasta el momento y necesario para la inducción.

5. CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA pKSN-1

Dado que el bioreportero pKSN-3 no funcionaba en cepas heterólogas y dado el escaso conocimiento que se tenía hasta el momento del sistema de regulación del operón *phn*, decidimos utilizar la cepa *Burkholderia* sp. MS3 como hospedador del sistema bioreportero. Hay que recordar que previamente habíamos determinado que esta cepa crecía también en medio marino pese a haber sido aislada de suelo.

Como se ha mencionado en el capítulo anterior, los parámetros a determinar para la caracterización de un biosensor son el tiempo óptimo de exposición al inductor, los límites de detección y la especificidad a los compuestos que se quieren detectar (Hynninen *et al.*, 2012).

5.1 Determinación del tiempo óptimo de exposición al inductor

Para la determinación de este parámetro, *Burkholderia* sp. MS3 (pKSN-1) se expuso a naftaleno (31,6 mg/L) a diferentes tiempos, encontrándose que las mayores inducciones se obtenían a 7,5 h, al igual que en los ensayos de β -galactosidasa (Figura 7).

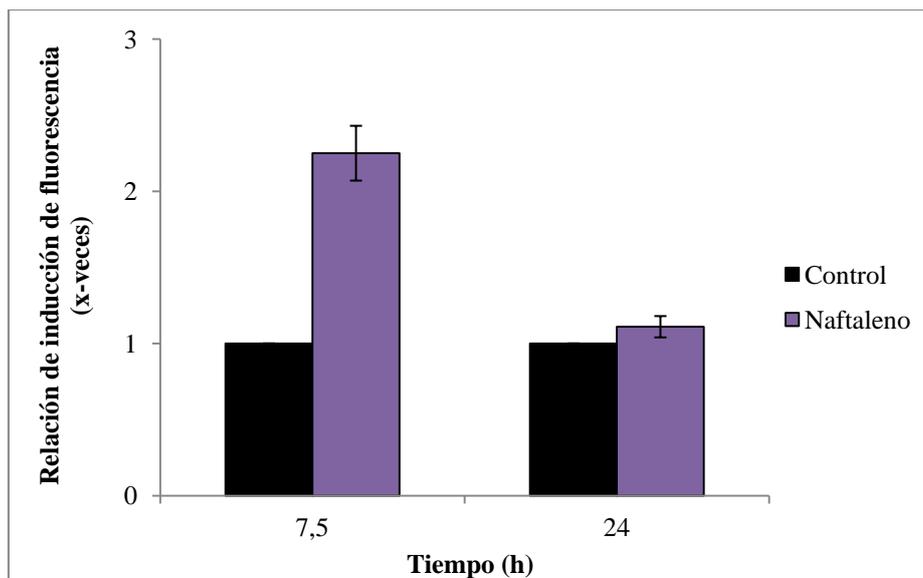


Figura 7. Experimentos de inducción del plásmido pKSN-1 en *Burkholderia* sp. MS3 a 7,5 horas con naftaleno. Las barras de error significan la desviación estándar de tres repeticiones de experimentos.

En los experimentos de inducción realizados a tiempos menores a 7,5 h (5 h) (datos no mostrados) y a tiempos mayores (24 h) (Figura 7) no se observó inducción de la expresión de fluorescencia. Posiblemente, a estos tiempos altos de inducción la cepa haya degradado la mayor parte del naftaleno.

5.2 Determinación de los límites de detección de este biosensor

Como se puede observar en la Figura 8, el límite de detección de este compuesto para naftaleno es de 31,6 mg/L (concentración de saturación) donde la inducción de la expresión de fluorescencia es de 2,53 veces. Cantidades mayores de naftaleno en el medio no mostraron un aumento de la inducción de la emisión por fluorescencia, posiblemente porque el biosensor no detecte más que la fracción soluble en el medio o por efectos de toxicidad de naftaleno (con una cantidad de naftaleno en el medio de 60 mg/L se observa un menor crecimiento de las células).

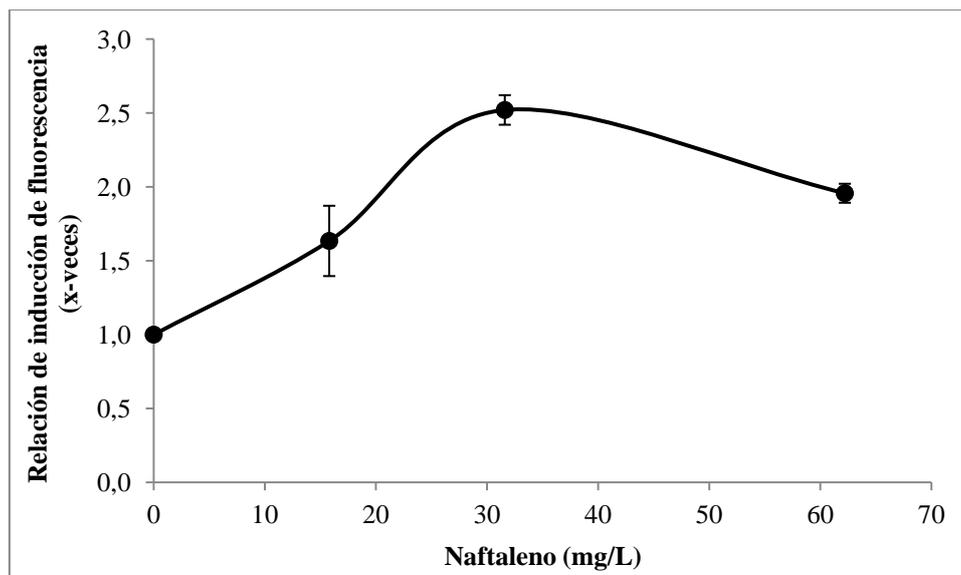


Figura 8. Experimentos de inducción del plásmido pKSN-1 en *Burkholderia* sp. MS3 a 7,5 horas con distintas concentraciones de naftaleno. Las barras de error significan la desviación estándar de tres repeticiones de experimentos.

5.3 Determinación de la especificidad del sistema bioreportero

Como también se mencionó en el capítulo anterior, la determinación de la especificidad del sistema bioreportero es un parámetro importante, ya que se requiere que los bioreporteros sean específicos para un tipo de compuestos y que no sean inducidos por otras moléculas presentes en el medio (Ripp, 2005).

Para comprobar la especificidad del bioreportero se llevaron a cabo experimentos de inducción a 7,5 h usando otros PAHs, como 2-metilnaftaleno (24,6 mg/L), 1-metilnaftaleno (31,7 mg/L) y fenantreno (1,6 mg/L) e hidrocarburos aromáticos monocíclicos como tolueno (92,14 mg/L), etilbenceno (150 mg/L) y *o*-xileno (178 mg/L) (Figura 9).

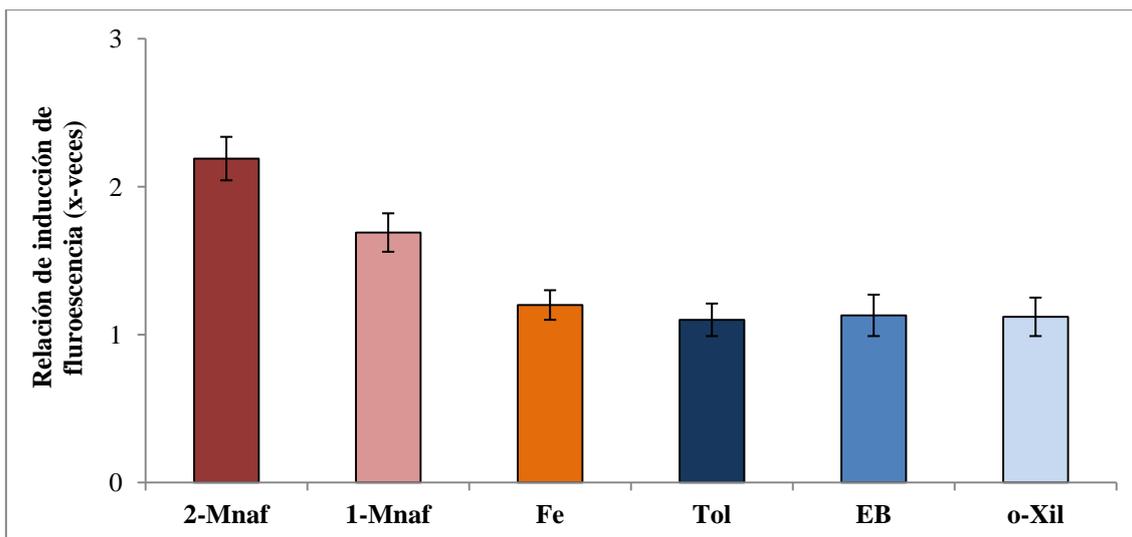


Figura 9. Experimentos de inducción a 7,5 h del plásmido pKSN-1 en *Burkholderia* sp. MS3 con 2-metilnaftaleno (2-Mnaf), 1-metilnaftaleno (1-Mnaf), fenantreno (Fe), tolueno (Tol), etilbenceno (EB) y *o*-xileno (*o*-Xil). Las barras de error significan la desviación estándar de tres repeticiones de experimentos.

Al igual que en los experimentos de β -galactosidasa, no se observó inducción de la expresión desde el promotor P_{phnS} en presencia de los compuestos aromáticos monocíclicos utilizados, corroborando la especificidad de este sistema por naftaleno y derivados. En el caso del 1-metilnaftaleno se observó una inducción de 1,7 veces, insuficiente por consenso para decir que es un inductor del sistema. No obstante, el resultado está en concordancia con lo visto anteriormente con ensayos de β -galactosidasa, donde el 1-metilnaftaleno también era peor inductor que el 2-metilnaftaleno o el naftaleno.

Para intentar mejorar la sensibilidad del biosensor decidimos reemplazar la proteína GFP con la proteína GFP inestable. Para ello se fusionó el gen que codifica la proteína reguladora PhnR con su promotor P_{phnS} y este a la proteína reportera GFP [LVA], una GFP inestable (Miller *et al.*, 2002) resultando el plásmido pKSN-2. Esta proteína tiene una vida media de 40 min (Andersen *et al.*, 1998), de manera que, en el caso de

existieran una alta actividad basal del promotor P_{phmS} , la GFP que se hubiese acumulado durante el crecimiento anterior a la inducción no produjese una señal fluorescente alta. Cuando esta construcción se introdujo en *Burkholderia* sp. MS3, obteniéndose la cepa *Burkholderia* sp. MS3 (pKSN-2), y se expuso a naftaleno a distintos tiempos no se observó inducción del sistema (datos no mostrados). Este fenómeno indeseado podría ser debido a que la GFP producida se degradase demasiado rápido para el tipo de determinaciones llevadas a cabo.

5.4 Estudio del funcionamiento de *Burkholderia* sp. MS3 (pKSN-1) en medio marino ONR7a

Se realizaron experimentos para estudiar también el funcionamiento del biosensor *Burkholderia* sp. MS3 (pKSN-1) en medio marino ONR7a. El crecimiento de este biosensor en medio marino con y sin gentamicina fue algo peor que en M9 (datos mostrados), pero aun así se observó una inducción relativa de la fluorescencia de 1,78 veces en presencia de gentamicina y de 2,08 en ausencia de antibiótico en presencia de concentraciones saturantes de naftaleno en el medio (31,6 mg/L). Estos datos indicaban que el biosensor en medio marino funcionaba de forma muy similar (mostrando una inducción de unas dos veces) a como lo hacía en medio M9.

6. VALIDACIÓN DEL BIOSENSOR CON MUESTRAS COMPLEJAS

El paso siguiente fue la validación de esta cepa biosensora *Burkholderia* sp. MS3 en muestras ambientales. Como se mencionó en capítulos anteriores, estas muestras son complejas y en ellas pueden existir compuestos que pueden alterar el funcionamiento de un biosensor (Zhang *et al.*, 2012).

A la hora de determinar la toxicidad de un vertido en el medio ambiente es importante saber qué tipo y en que rango de concentraciones está presentes los PAHs (Wang *et al.*, 2003), por eso, y para validar nuestro biosensor, probamos la eficacia del biosensor de naftaleno tanto en muestras de laboratorio contaminadas artificialmente con diferentes concentraciones de gasoil y gasolina, así como en muestras ambientales obtenidas de entornos que habían sido contaminados por vertidos de petróleo y derivados de manera accidental (descritos en M&M).

6.1 Validación del biosensor con gasoil

Se observó inducción de la emisión de fluorescencia en *Burkholderia* sp. MS3 (pKSN-1) en presencia de gasoil en medio mínimo M9. El límite de detección para esta cepa biosensora, aquella concentración donde la inducción en presencia de gasoil fue el doble de la de la cepa en ausencia de este combustible, fue a una concentración del 0,5% (v/v) (Figura 10). En esta muestra la cantidad de PAHs totales (determinado por GC-MS) fue de 0,36 mg/L, siendo la específica de naftaleno de 0,29 mg/L. Este límite estuvo 2 órdenes de magnitud por debajo del encontrado por naftaleno puro (31,6 mg/L). Cantidades mayores de gasoil (1% v/v; concentración específica de naftaleno 0,58 mg/L) mostraron un ligero aumento de la inducción (2,5 veces).

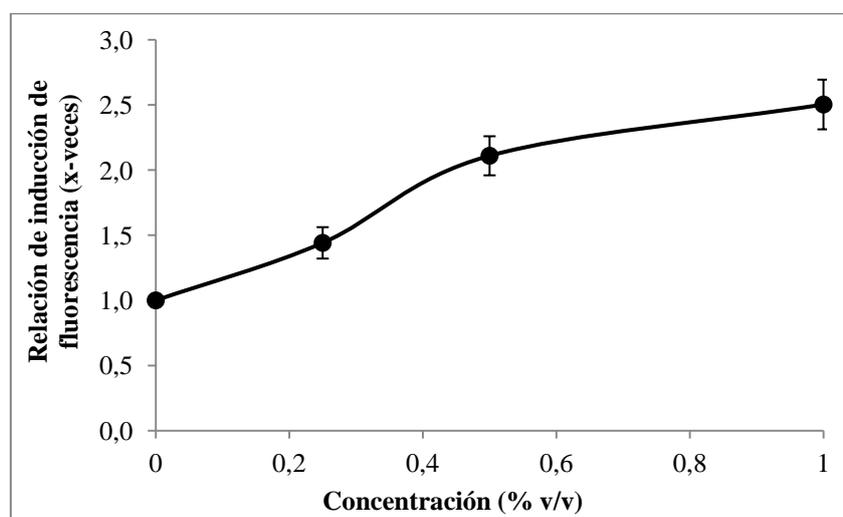


Figura 10. Experimentos de inducción del plásmido pKSN-1 en *Burkholderia* sp. MS3 a 7,5 horas con distintas concentraciones de gasoil. Las barras de error significan la desviación estándar de tres repeticiones de experimentos.

6.2 Validación del biosensor con gasolina

Se realizaron experimentos de inducción a distintas concentraciones de gasolina (Tabla 1). *Burkholderia* sp. MS3 (pKSN-1) fue capaz de tolerar concentraciones de gasolina hasta 0,06% (v/v), concentración que ya afectaba a la supervivencia de la cepa. La concentración de 0,15 % (v/v) provocaba la muerte de las células, probablemente debido a la alta concentración de BTEX (Tabla 1). El sistema se indujo 4 veces en presencia de gasolina al 0,01% (v/v), sin embargo a una concentración de 0,005 % (v/v) el sistema sólo se inducía 1,3 veces que, por acuerdo en su definición, se consideró como no inducción. La cantidad de PAHs totales (incluyendo naftaleno) y de naftaleno en la muestra de 0,01 % (v/v) fue muy similar siendo aproximadamente 15 µg/L (Tabla 1) de cada una de ellas. El límite de detección de naftaleno y derivados en gasolina fue de un orden de magnitud menor que el encontrado en gasoil y tres órdenes de magnitud menor con respecto al encontrado cuando se utilizó naftaleno puro.

No se produjo inducción a la concentración de 0,06% (v/v) ya que, como hemos indicado anteriormente, a esta concentración de gasolina la supervivencia de la cepa de estudio se vio muy afectada.

Tabla 1. Concentración de PAHs, naftaleno y BTEX en las distintas cantidades de gasolina utilizadas.

Gasolina (%)	PAHs (mg/L)	Naftaleno (mg/L)	BTEX (mg/L)
0,005	0,00768	0,00747	3,71803
0,01	0,01536	0,01493	7,43606
0,06	0,09213	0,08959	44,61637
0,15	0,23032	0,22397	111,54090

6.3 Validación del biosensor con muestras contaminadas con crudo o con derrames de crudo

En los experimentos realizados a distintas concentraciones (1%, 5% y 10% (v/v)) de aguas saturadas de crudo y petróleo (chacapote) de Prestige no se observó inducción de la expresión de *Burkholderia* sp. MS3 (pKSN-1) (datos no mostrados). El contenido de PAHs (determinado por GC-MS) y, concretamente, de naftaleno estaba por debajo del límite de detección del biosensor con las muestras complejas de gasoil (Tabla 2).

Tabla 2. Concentración de PAHs, naftaleno y BTEX en las distintas cantidades de crudo y petróleo de Prestige utilizadas.

Muestra	PAHs (mg/L)	Naftaleno (mg/L)	BTEX (mg/L)
Crudo (1 %)	0,01298	0,01297	0,00275
Crudo (5 %)	0,06491	0,06486	0,01373
Crudo (10 %)	0,12982	0,12972	0,02745
Prestige (1 %)	0,00194	0,00184	0,00484
Prestige (5 %)	0,00969	0,00919	0,02422
Prestige (10 %)	0,01938	0,01837	0,04844

DISCUSIÓN

El propósito del presente capítulo fue la construcción y validación del funcionamiento de un sistema biosensor para la detección específica de naftaleno y sus derivados. Este biosensor se construyó con los elementos reguladores de la ruta degradativa de naftaleno de la cepa *Burkholderia* sp. MS3: el gen que codifica el regulador de esta ruta *phnR* y el promotor de la ruta degradativa P_{phnS} . Esta cepa degrada naftaleno y fenantreno y es capaz de colonizar la rizosfera de las plantas, eliminando satisfactoriamente fenantreno de suelos artificialmente adicionados con este compuesto, restaurando la calidad de suelos contaminados para su posterior uso agrícola (Rodríguez-Conde *et al.*, enviado).

Aunque uno de los objetivos iniciales de este estudio fue la expresión heteróloga del sistema biosensor en cepas marinas, no conseguimos expresarlo en ninguna de las cepas inicialmente seleccionadas como hospedadoras; no obstante demostramos que pese a ser una cepa aislada de suelo, *Burkholderia* sp. MS3 es capaz de crecer en medio marino (Capítulo 1 de esta Tesis Doctoral) y hemos demostrado el buen funcionamiento del biosensor *Burkholderia* sp. MS3 (pKSN-1) en este medio.

Una de las razones por las que el sistema no se expresa en bacterias de otro género, podría deberse a que el naftaleno no fuese el inductor directo de este sistema. Nuestra primera hipótesis fue que que el *cis*-naftaleno dihidrohiol, primer producto de la ruta degradativa del naftaleno, resultante de la acción de la dioxigenasa PhnAcAd podría ser el inductor de esta ruta. La introducción de la primera dioxigenasa del operón *phn* de *Burkholderia* sp. MS3 en el sistema bioreportero no conllevó la inducción de la emisión de fluorescencia del plásmido pKSN-3 en cepas hospedadoras heterólogas en presencia de naftaleno, lo que indicaría que para el funcionamiento de este biosensor de manera heteróloga podría necesitar algún otro elemento, como un sistema de ferredoxinas que

actuarían como transportadores de electrones, necesarios para el funcionamiento del sistema de la dioxigenasa (Bruschi *et al.*, 2006), o alguna otra proteína reguladora accesoria. La mejora de este biosensor y el mejor entendimiento de la regulación de la ruta catabólica constituye una línea abierta por esta tesis en el grupo de trabajo.

Aunque en la bibliografía hay descritos distintos biosensores basados en sistemas similares, sólo Trögl *et al.*, 2007 han descrito un sistema de detección de derivados monosustituidos de naftaleno. Este sistema, introducido en *Pseudomonas fluorescens* HK44, contiene los genes *nah* que codifican la degradación de naftaleno unidos a los genes *luxCDABE* (Trögl *et al.*, 2007). Las inducciones detectadas por el biosensor para compuestos puros fueron menores que las obtenidas con las construcciones de *Burkholderia* sp. MS3 (pPSM) y aproximadamente iguales a las obtenidas con *Burkholderia* sp. MS3 (pKSN-1). Se describían inducciones de 2,61, 2,01, 2,13 y 2,12 veces para 1-bromonaftaleno, 1-cloronaftaleno, 1-metilnaftaleno y 2-metilnaftaleno respectivamente, a las mismas concentraciones (13,8 mg/L, 200 mg/L, 31,7 mg/L y 24,6 mg/L respectivamente) que las usadas con nuestro biosensor.

También hay descritos otros dos biosensores para la detección de naftaleno pero en ambos se ha utilizado, al igual que en el caso anterior (Trögl *et al.*, 2007), como reportero bioluminescente los genes *lux* (Werlen *et al.*, 2004; Tecon *et al.*, 2010). Como en el caso de la actividad β -galactosidasa, estos biosensores bioluminiscentes necesitan la adición de sustratos secundarios exógenos (en el caso de los biosensores bioluminiscentes un aldehído; Van der Meer *et al.*, 2010). Este no es el caso de los biosensores basados en GFP; estos no necesitan la adición de ningún tipo de compuesto para su activación, lo cual los hace, conjuntamente con el desarrollo de fluorímetros cada vez más sencillos y eficientes (Turner Designs, 2008), idóneos para su utilización

para una detección de la presencia de contaminantes ricos en naftalenos y sus derivados metilados en el entorno.

Otra de las ventajas de nuestro biosensor *Burkholderia* sp. MS3 (pKSN-1), además de tener GFP como proteína reportera, reside en que es muy específico para naftaleno y sus derivados monosustituídos y que no reconoce el fenantreno, compuesto que sí es reconocido en otros sistemas basados en elementos genéticos de otras cepas de *Burkholderia*. Tecon *et al.*, (2006) desarrollaron un biosensor similar utilizando el promotor P_{phnS} de *Burkholderia* sp. RP007 fusionado a GFP, cuyo límite de detección para naftaleno puro fue igual al encontrado en el biosensor desarrollado en el presente capítulo *Burkholderia* sp. MS3 (pKSN-1), 31,6 mg/L. Sin embargo este biosensor también detectaba fenantreno.

El mismo grupo de investigación modificó más tarde (Tecon *et al.*, 2010) este biosensor de PAHs cambiando sus genes GFP por los genes *lux*. Con este biosensor mejoraron los límites de detección, ya que la cantidad mínima de PAHs detectada por esta cepa en experimentos de simulación de un derrame de petróleo fue de 64 $\mu\text{g/L}$ y para naftaleno puro el límite de detección fue de 22 $\mu\text{g/L}$. Estos límites son inferiores a los detectados por nuestro biosensor de naftaleno puro, posiblemente por un mejor funcionamiento de los genes *lux* o por la adición de dimetilsulfóxido que aumenta la solubilidad del naftaleno, pero tienen el inconveniente de tener que añadir un compuesto exógeno para su detección y de que este biosensor no es específico de naftaleno como el desarrollado en el presente capítulo, sino que además detecta fenantreno. Sin embargo, en el caso de gasolina, el límite de detección de naftaleno en *Burkholderia* sp. MS3 (pKSN-1) se encontraba en 15 $\mu\text{g/L}$, inferior al encontrado por Tecon *et al.*, (2010).

Uno de los problemas de este biosensor a la hora de detectar compuestos puros es que su rango de detección es muy corto, el límite de detección el de saturación son

similares (31,6 mg/L de naftaleno). Aunque intentamos mejorar el biosensor mediante una GFP inestable, probablemente los tiempos de medición del biosensor eran demasiado altos para detectar la fluorescencia. El límite de saturación del biosensor está probablemente delimitado por la toxicidad del naftaleno así como por su biodisponibilidad.

Los límites de detección del biosensor son mucho más bajos en mezclas complejas que en compuestos puros. Este resultado no es tan sorprendente y, probablemente, sea debido a la presencia en estas mezclas complejas de metilnaftalenos, que no pudieron ser cuantificados porque nuestras muestras estaban saturadas de estos compuestos. Además, la presencia de disolventes orgánicos en la muestra puede aumentar la solubilidad del naftaleno y, por tanto, su biodisponibilidad.

En resumen este biosensor *Burkholderia* sp. MS3 (pKSN-1) es específico de naftaleno y metilnaftalenos, siendo capaz de detectar estos compuestos puros cuando están en disolución de medio mínimo M9 o medio marino en concentraciones saturantes. Este biosensor puede ser utilizado para detectar concentraciones muy bajas en muestras complejas. Debido a la toxicidad del naftaleno y derivados, sería conveniente llevar a cabo las mediciones de estas muestras ambientales usando distintas diluciones de la muestra.

CAPÍTULO 4

1. INTRODUCCIÓN

Dentro de la composición del petróleo, los hidrocarburos de bajo peso molecular, descritos en capítulos anteriores, son relativamente solubles en agua, haciéndolos biodisponibles para su degradación (Blum *et al.*, 2009). Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (en inglés abreviado PAHs) tienen menor solubilidad en agua cuanto mayor es el número de anillos aromáticos que contienen y esto hace que disminuya su potencial para biodegradación (Figura 1). Por tanto, los PAHs de medio y alto peso molecular (de 3 anillos o más) son más persistentes en el medio ambiente. Los PAHs pueden ser adsorbidos a partículas existentes en el entorno, acumulándose en estos materiales y convirtiéndose en una reserva de contaminantes (Simpson *et al.*, 1996; Morales-Caselles *et al.*, 2006), produciendo los llamados “efectos tóxicos crónicos” en el medioambiente (Aske *et al.*, 2002; Ghazali *et al.*, 2004). Algunos PAHs pueden dañar el DNA de los organismos que habitan el entorno contaminado e inducir mutaciones que conllevan efectos cancerígenos. Además pueden interferir con la tasa de crecimiento y el éxito reproductivo de las especies, aumentar la sensibilidad a patógenos y causar daño en el sistema inmune de animales (Paolo *et al.*, 1997; Wilcke *et al.*, 2000; Laffon *et al.*, 2006; Thang *et al.*, 2014).

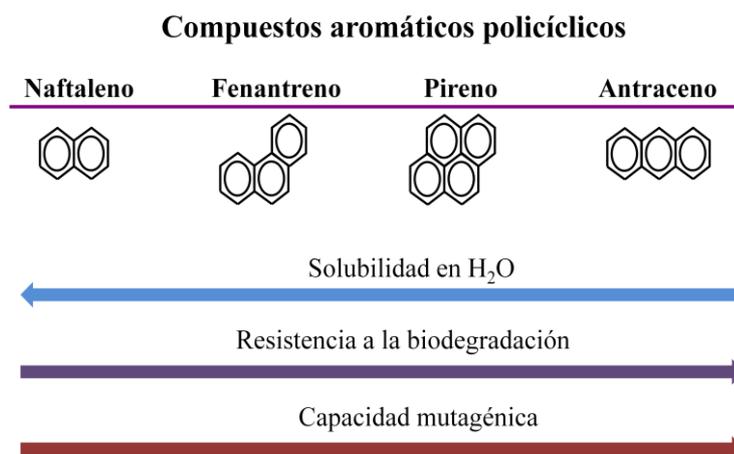


Figura 1. Diferencias en la solubilidad, resistencia a la biodegradación y capacidad mutagénica de diferentes hidrocarburos aromáticos policíclicos.

La capacidad de biodegradar PAHs se ha descrito en numerosos microorganismos, (incluyendo bacterias, hongos y algas) aislados de diversos ambientes: edáficos, acuáticos, aeróbicos y anaeróbicos (Haritash *et al.*, 2009). El fenantreno, compuesto de tres anillos aromáticos, ha sido utilizado en numerosos estudios como PAH modelo y las bases bioquímicas de su degradación aerobia están relativamente bien descritas (Figura 2); no sucede lo mismo para otros PAHs de alto peso molecular.

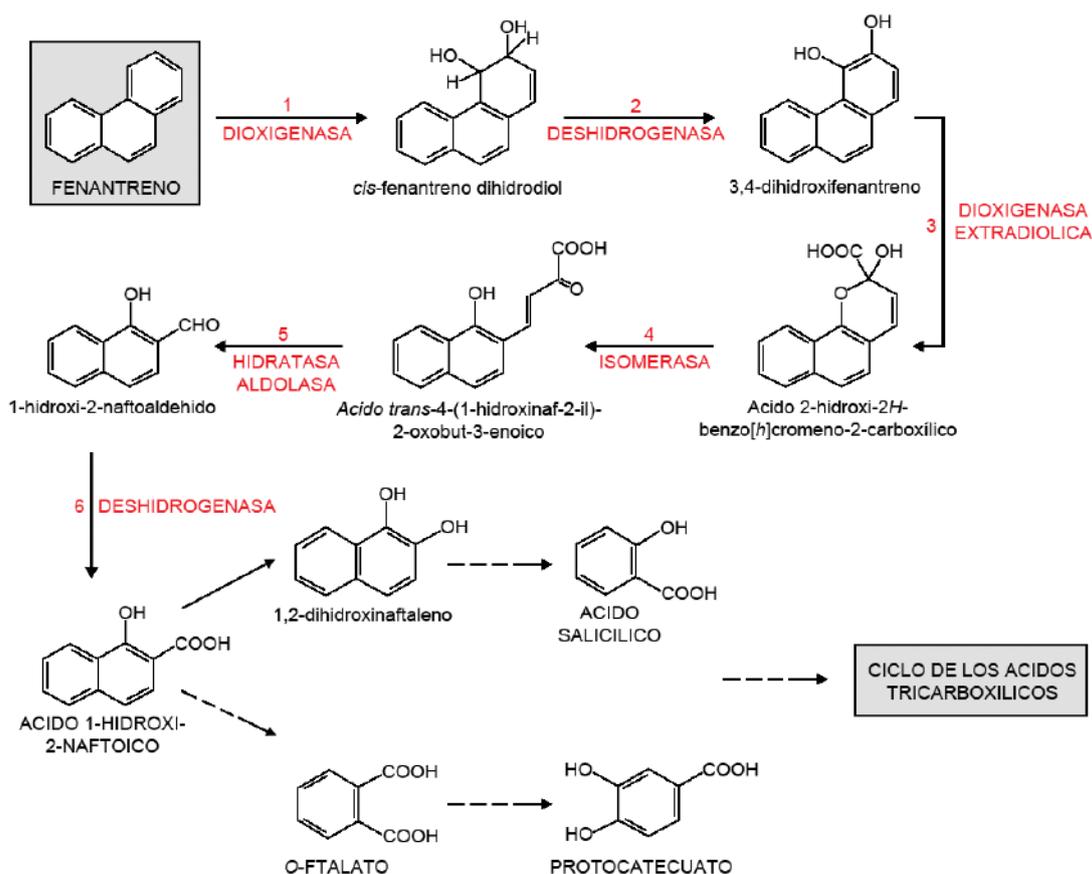


Figura 2. Esquema de la ruta de degradación de fenantreno en bacterias aerobias.

En general, en condiciones aeróbicas, el primer paso en la degradación de PAHs incluye la acción de una enzima oxigenasa multicomponente que hidroxila el anillo. Esta enzima consiste en tres componentes: una ferredoxina y una ferredoxina reductasa. La dioxigenasa terminal, a su vez, está formada por dos unidades: una subunidad α y una subunidad β (Kasai *et al.*, 2003). La subunidad α de las

oxigenasas terminales conocida está compuesta por un dominio catalítico con un centro de hierro mono nuclear que sirve como lugar de unión al sustrato y un dominio Rieske que conserva un grupo [2Fe-2S] que actúa como una entidad de transferencia de electrones para el centro mononuclear de hierro (Harayama *et al.*, 1992). Estas dioxigenasas son imprescindibles para la degradación de PAHs (Demaneche *et al.*, 2004).

Los procesos de degradación de PAHs de alto peso molecular, que también comienzan con el ataque de una dioxigenasa a uno o varios anillos aromáticos, son muy complejos. En muchas ocasiones, estos compuestos se degradan conjuntamente con otros más sencillos en procesos denominados co-metabolismo. En otros casos dan lugar a compuestos “dead-end” que no son posteriormente degradados (Keck *et al.*, 1989)

Los PAHs de alto peso molecular son contaminantes ubicuos en el medio ambiente y dada su toxicidad y efectos cancerígenos son sustancias de eliminación prioritaria. El último objetivo de la presente Tesis Doctoral, consistía en la construcción de biosensores para la detección de PAHs. Para esto, y dado que en la bibliografía disponible no había descrito ningún sistema regulador que respondiese a PAHs de alto peso molecular, se propuso estudiar la regulación de la expresión de la ruta degradativa de PAHs de un organismo aislado en el laboratorio, *Novosphingobium* sp. HR1a. La cepa *Novosphingobium* sp. HR1a fue aislada de la rizosfera de *Plantago lanceolata* en una zona situada cerca de la refinería situada en Palos de la Frontera (Huelva, España) por Rodríguez-Conde *et al.*, (2011). Esta cepa se aisló en base a su crecimiento en naftaleno y fenantreno como única fuente de carbono. Debido a sus buenas propiedades como inoculante para biorremediación (Molina *et al.*, en preparación), el DNA genómico se había secuenciado en el laboratorio y, por tanto, al inicio de esta Tesis se

tenían disponibles los datos de esta secuenciación, aunque no había todavía un análisis bioinformático de los mismos.

Por tanto, para poder utilizar el sistema regulador de esta cepa en la construcción de un biosensor debíamos identificar la/s dioxigenasa/s responsables de la biodegradación de PAHs de medio y alto peso molecular, los elementos genéticos responsables de la regulación de los genes degradativos, los inductores de la ruta, y, finalmente, construir el sistema biosensor.

2. IDENTIFICACIÓN DE LA DIOXIGENASA RESPONSABLE DE LA TRANSFORMACIÓN DE PAHs

Para identificar los genes responsables de la degradación de fenantreno, y dado que se tenía la secuencia genómica de *Novosphingobium* sp. HR1a, se llevó a cabo un análisis bioinformático para buscar dioxigenasas, identificándose nueve genes que codificaban dioxigenasas que hidroxilan anillos aromáticos. Las secuencias aminoacídicas de las subunidades α de estas dioxigenasas se compararon con las descritas en otros microorganismos, en este caso teniendo en cuenta sólo aquellas dioxigenasas que se habían caracterizado funcionalmente, ya que muchas veces la anotación genética de las mismas es muy confusa. Estos estudios revelaron que sólo una, codificada por el marco abierto de lectura denominado *ORF_1926* (del inglés Open Reading Frame) de *Novosphingobium* sp. HR1a, presentaba homología con un grupo de dioxigenasas clasificadas como dioxigenasas inespecíficas de PAHs en el grupo *Sphingomonas* (Figura 3). El resto de las dioxigenasas encontradas en *Novosphingobium* sp. HR1a parecen estar implicadas en la degradación de compuestos monocíclicos.

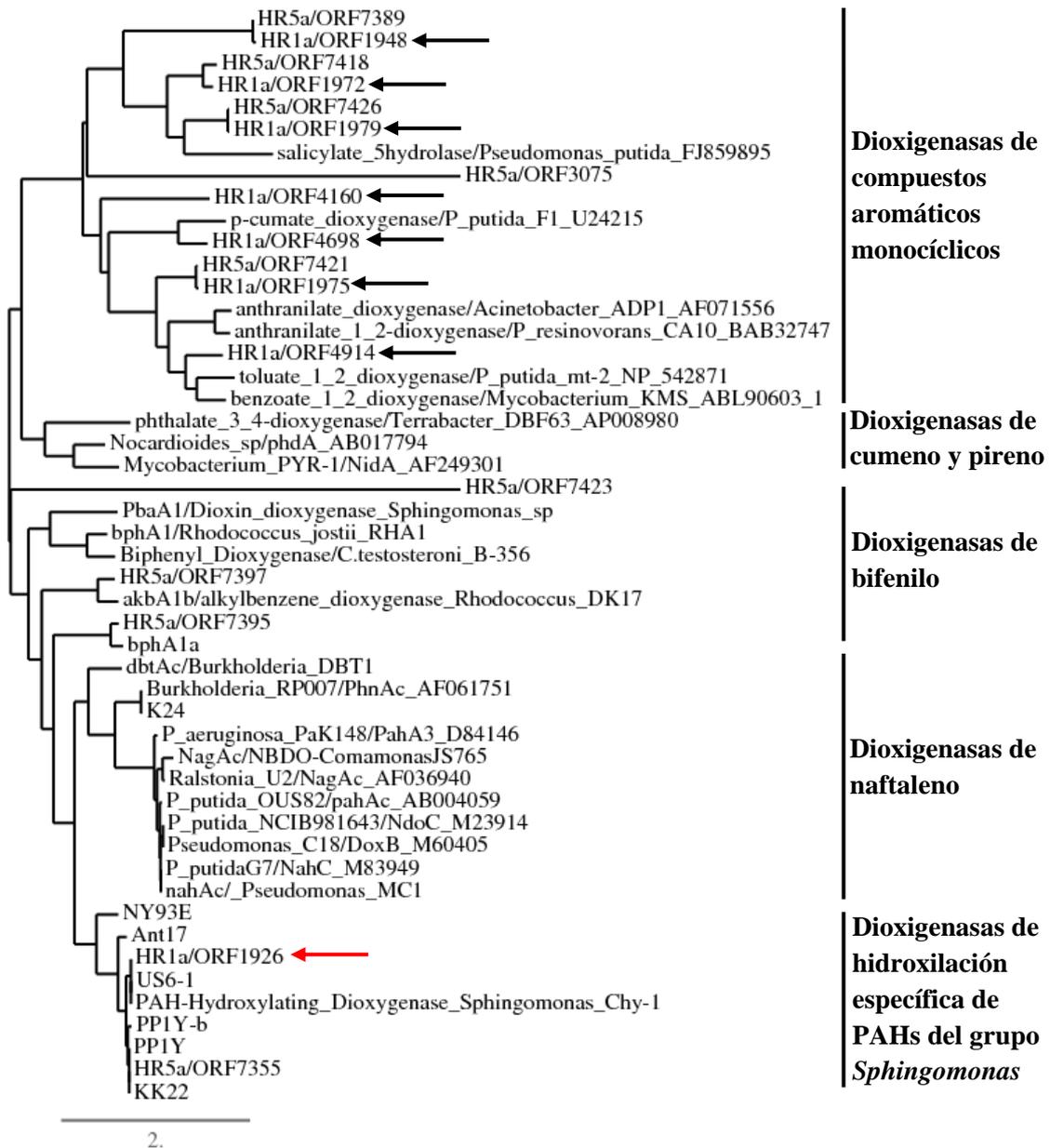


Figura 3. Comparación filogenética de la secuencia de aminoácidos de la subunidad alfa de las distintas dioxygenasas encontradas en HR1a con aquellas encontradas en la literatura y con una función clara asignada. Las flechas negras indican los diversos ORFs para las distintas dioxygenasas de *Novosphingobium* sp. HR1a. La flecha roja indica el ORF para la dioxygenasa que hidroxila PAHs encontrada en *Novosphingobium* sp. HR1a.

Para determinar el papel del *ORF_1926* (subunidad grande de la dioxygenasa de hidroxilación de PAHs) en la degradación de PAHs por parte de *Novosphingobium* sp. HR1a, se decidió construir un mutante en dicho gen y analizar el crecimiento del mismo

en PAHs. Como paso previo se caracterizó el espectro de PAHs en los que podía crecer la cepa.

Cuando *Novosphingobium* sp. HR1a se cultivó en presencia de naftaleno (compuesto de dos anillos aromáticos), fenantreno, antraceno (compuestos de 3 anillos), criseno y pireno (compuestos de 4 anillos) se observó un aumento en el número de células (datos no mostrados) y en la turbidez del cultivo (Figura 4), indicando que esta cepa era capaz de usar todos estos compuestos como única fuente de carbono, aunque crecía más rápidamente en el caso del naftaleno, posiblemente debido a que es el compuesto más soluble de los mencionados y sea el más biodisponible.

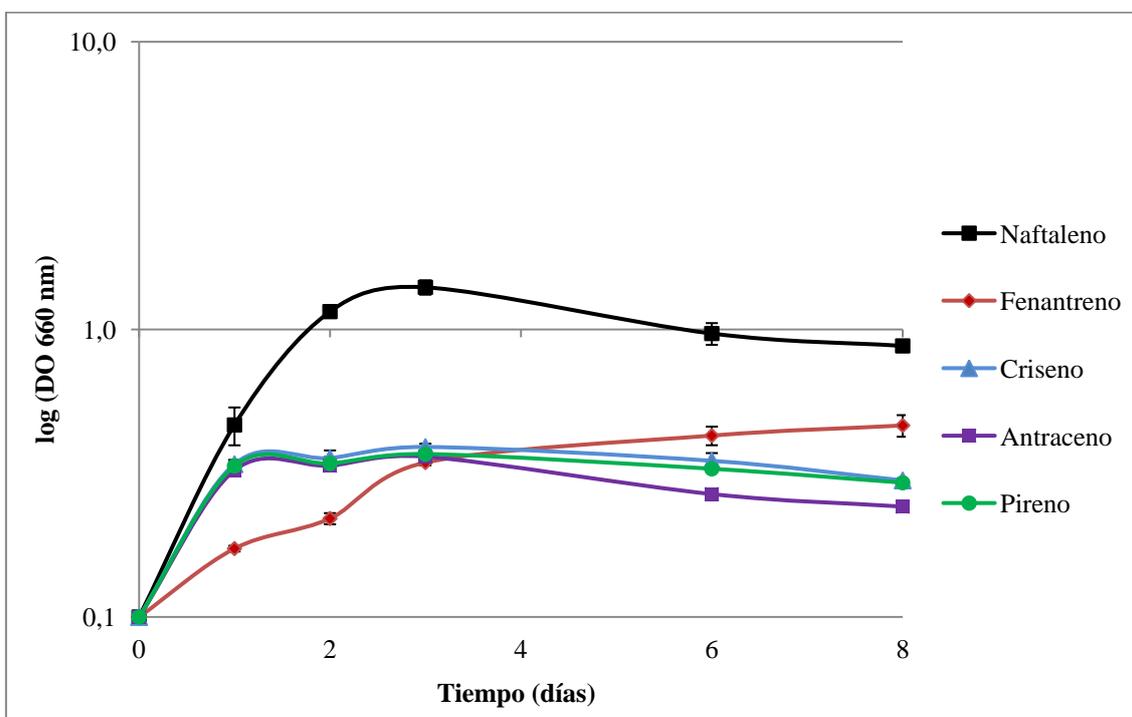


Figura 4. Curva de crecimiento de *Novosphingobium* sp. HR1a con diferentes PAHs como fuente de carbono. Las barras de error significan la desviación estándar de tres repeticiones.

Además, se observó que el cultivo adquiría un tono rojizo en presencia de antraceno y un tono amarillo claro en presencia de naftaleno y pireno, indicación de que el compuesto estaba siendo modificado por el microorganismo. El conjunto de estos

resultados indicó que la cepa *Novosphingobium* sp. HR1a era, al menos, capaz de biotransformar productivamente de estos compuestos aromáticos.

El mutante en la ORF_156 fue incapaz de crecer en medio con naftaleno, fenantreno, antraceno, criseno y pireno (Figura 5). Este resultado sugería que este gen estaba directamente implicado en la degradación/transformación de estos PAHs y que los otros genes de dioxigenasas identificados en el genoma de *Novosphingobium* sp. HR1a no eran capaces de suplir la función de esta dioxigenasa. Por su implicación en la degradación de compuestos PAHs se decidió denominar a este gen *pahA*.

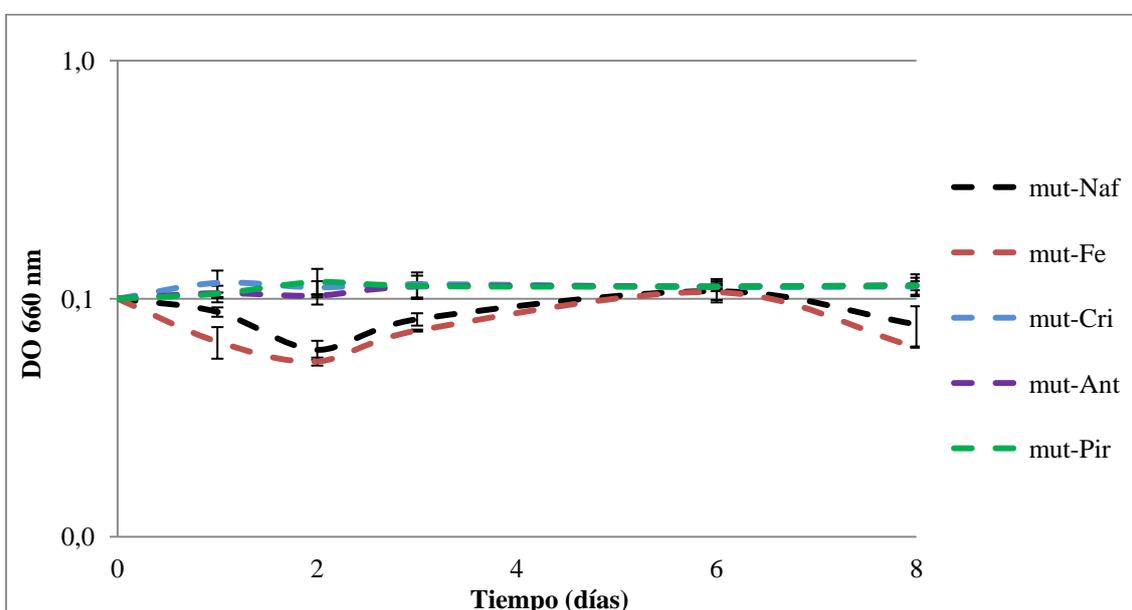


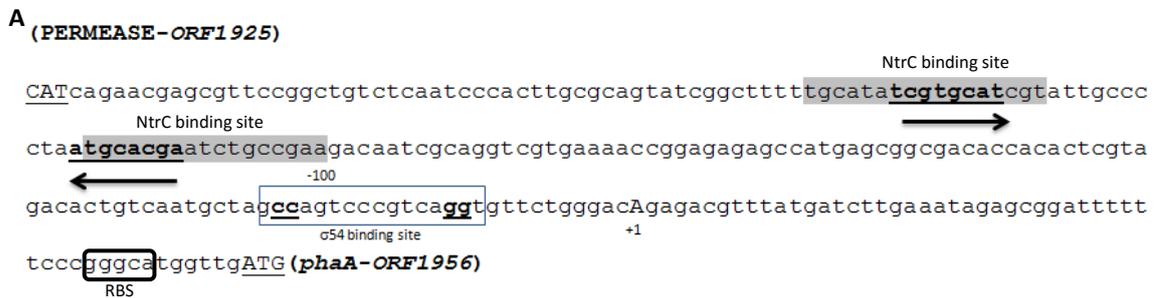
Figura 5. Curva de crecimiento del mutante de *Novosphingobium* sp. HR1a en el gen de la dioxigenasa *pahA* con diferentes PAHs como fuente de carbono. Naf, Naftaleno; Fe, Fenantreno; Cri, Criseno; Ant, Antraceno; Pir, Pireno. Las barras de erros significan la desviación estándar de tres repeticiones de experimentos.

3. CARACTERIZACIÓN DE LA REGIÓN DEL PROMOTOR DE *pahA*

La región intergénica de 239 pb situada entre la ORF_1925 que codifica una permeasa y el gen *pahA* (Anexo 3) se analizó para encontrar las secuencias consenso del promotor putativo. Usando la técnica RACE 5', se identificó el punto de inicio de la

transcripción localizado en la adenina de posición 51 aguas arriba del codón de iniciación de *phaA* (Figura 6). Aguas arriba de este inicio de la transcripción de *phaA* se encontró una forma no usual (CC-N10-GG) de la región -24 -12 para los promotores regulados por σ^{54} .

Aguas arriba de esta secuencia, posición -100, se localizaron dos repeticiones invertidas perfectas que podrían constituir las secuencias de activación (en inglés su abreviatura es UAS), típico de unión a promotores dependientes de σ^{54} , donde un posible regulador de la familia NtrC podría unirse al DNA (Tropel *et al.*, 2005). Todas las regiones de DNA mencionadas (punto de inicio de la transcripción, posibles promotores -12 -24 regulados por σ^{54} , UAS y dominios de unión al ribosoma (en inglés abreviado RBS)) presentaban una secuencia conservada con respecto otros miembros de la familia *Sphingomonadaceae* (Figura 6).



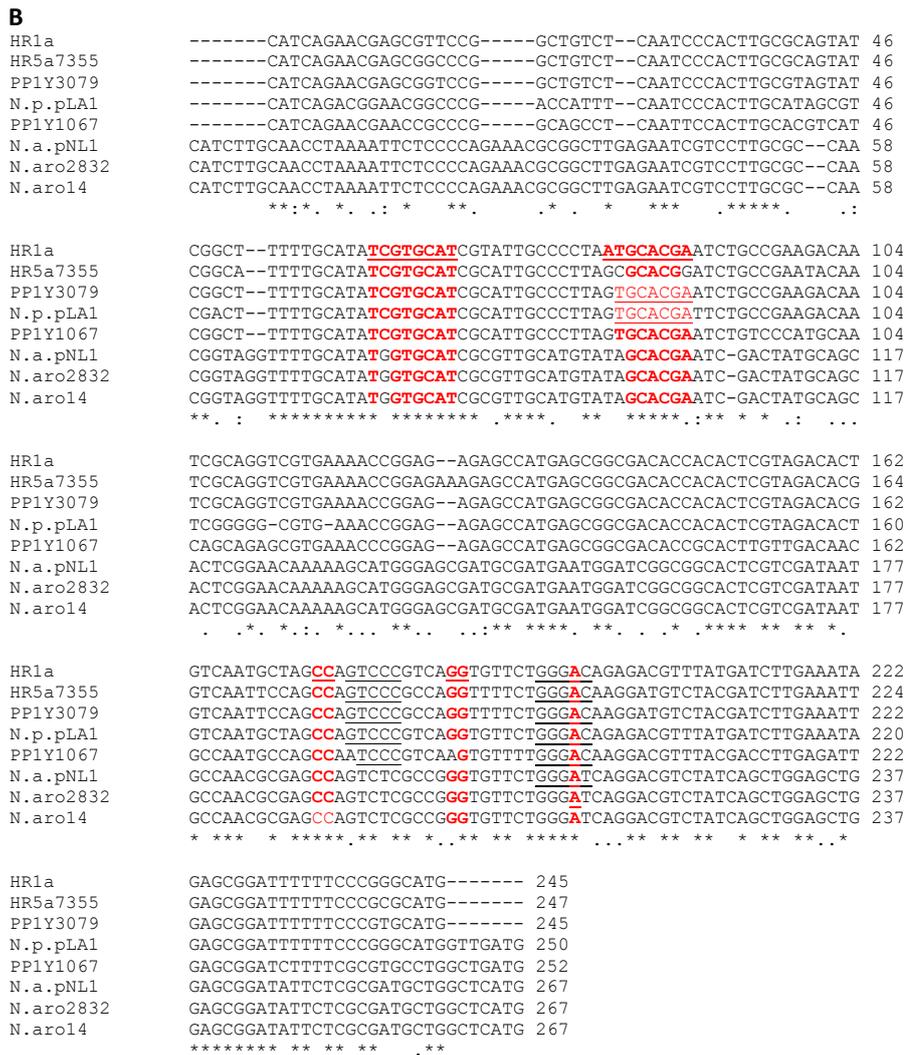


Figura 6. (A) Región reguladora de *pahA*. El sombreado gris (-100) es la secuencia de activación donde un posible regulador de la familia NtrC podría unirse al DNA y las flechas determinan las regiones palindrómicas. Caja azul, región -24 -12 para los promotores regulados por σ^{54} . RBS, dominio de unión al ribosoma. (B) Alineamiento de *pahA* con regiones homólogas de otros miembros de la familia *Sphingomonadaceae*. En rojo, las regiones de la región reguladora de *pahA* mencionadas en el apartado A de esta figura (menos el RBS). En subrayado las secuencias que se quería saber cómo se conservaban en los otros organismos. HR1a, *Novosphingobium* sp. HR1a (RAST server ID. 6666666.92368); HR5a, *Sphingobium* sp. HR5a (RAST server ID. 6666666.92369); PPIY. *Novosphingobium* sp. PPIY (GenBank I.D. NC_015580); N.p. pLA1, *Novosphingobium pentaromativorans* US6-1 plásmido pLA1 (GenBank I.D. NZ_AGFM01000122); N.a. pNL1, *Novosphingobium aromaticivorans* DSM 12444 plásmido pNL1 (GenBank I.D. CP000676.1); N. aro, *N. aromaticivorans* DSM 12444 cromosoma (GenBank I.D.

NC_007794.1)

Para estudiar cómo este promotor respondía a la presencia de diversos PAHs, se clonó la región promotora (P_{pahA}), en el plásmido pMP220 que codifica un gen *lacZ* sin promotor, dando como resultado el plásmido pHR1a ($P_{pahA}::lacZ$), el cual se introdujo en la cepa silvestre y en el mutante de la dioxigenasa.

Los ensayos de β -galactosidasa, llevados a cabo en *Novosphingobium* sp. HR1a (pHR1a) en medio mínimo M9 con glucosa como fuente de carbono, demostraron que el promotor P_{pahA} se inducía en presencia de PAHs de dos anillos aromáticos como naftaleno (incremento de inducción relativa con respecto a control sin inducir de 6 veces a su concentración de saturación, 31,6 mg/L) (Figura 7). También se observó inducción en presencia de PAHs de tres anillos aromáticos, como fenantreno y antraceno (inducción relativa de 2,5 veces a concentraciones de saturación de 1,6 mg/L y 0,044 mg/L respectivamente) (Figura 7) y con PAHs de 4 anillos aromáticos, como pireno y criseno (inducción relativa de 2 y 1,5 veces a concentraciones de saturación, 0,135 mg/L y 0,2 μ g/L respectivamente). Sin embargo, el mejor inductor fue el ácido salicílico, un compuesto aromático monocíclico, que es el intermediario clave en la ruta de degradación de naftaleno (Di Gennaro *et al.*, 2001) (7 veces de inducción a una concentración 805 mg/L). Otros compuestos aromáticos monocíclicos, como algunos intermediarios en la ruta de degradación de naftaleno (*o*-ftalato y protocatecuato a concentraciones 825 mg/L y 770 mg/L respectivamente) y diferentes BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno, *o*-xileno a 90 mg/L, y concentraciones de saturación de 92,14 mg/L, 150 mg/L y 178 mg/L respectivamente) fueron incapaces de inducir la expresión de P_{pahA} (Figura 7 y datos no mostrados). Todos estos experimentos fueron realizados a las 5 h de exposición a los inductores.

En el caso de la cepa mutante, se ensayó la actividad de P_{pahA} en presencia de fenantreno, naftaleno y salicilato; en este caso su expresión no se vio afectada

significativamente (datos no mostrados), lo que sugería que los mismos PAHs y no algunos de los derivados producidos por el metabolismo de los mismos eran los inductores de este promotor.

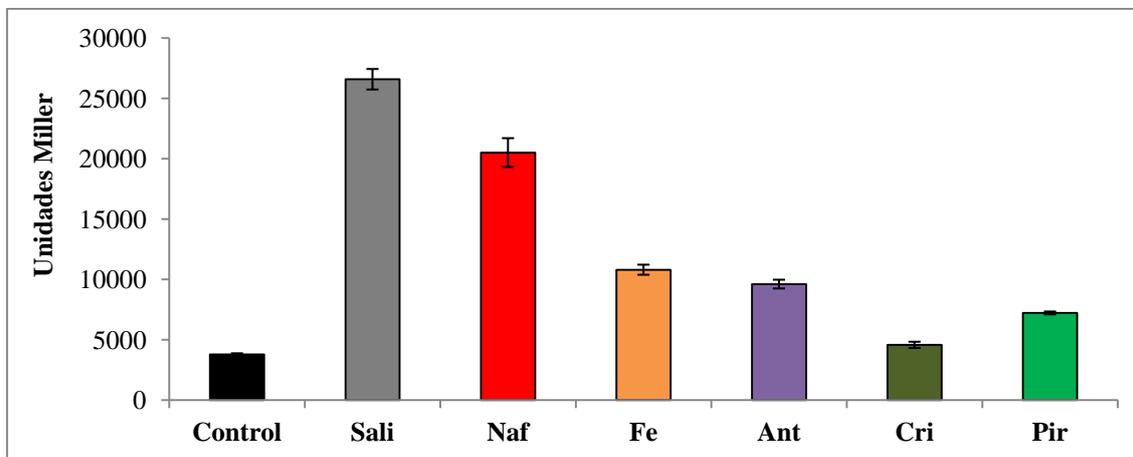


Figura 7. Expresión de P_{pahA} en *Novosphingobium* sp. HR1a. Sali, salicilato; Naf, naftaleno; Fen, fenantreno; Ant, antraceno; Cri, criseno; Pir, pireno. Las barras de error significan la desviación estándar de tres repeticiones de experimentos.

4. CARACTERIZACIÓN DEL REGULADOR DE P_{pahA}

Uno de los objetivos del Proyecto Europeo donde se enmarca esta Tesis Doctoral era la obtención de biosensores para ser utilizados en medios marinos. Para la expresión de estos biosensores de manera heteróloga en bacterias marinas, se precisaba la identificación del sistema de regulación de la ruta degradativa de PAHs de la cepa *Novosphingobium* sp. HR1a. Hasta el momento de la realización de esta Tesis Doctoral este regulador no había sido identificado.

La organización genética de las rutas de degradación de compuestos aromáticos en la familia *Sphingomonadaceae* difiere a la encontrada en otras bacterias; es raro que estos genes se organicen en unidades de transcripción coordinada y que, por tanto, los genes se encuentren localizados contiguamente en el genoma (Romine *et al.*, 1999). Este hecho dificultaba la identificación preliminar del regulador implicado en la degradación de PAHs, ya que no existía ninguna ORF que codificase un posible regulador

inmediatamente aguas arriba/abajo de los genes de la dioxigenasa. No obstante, en la secuencia genómica de *Novosphingobium* sp. HR1a, se localizaron cuatro marcos de lectura abierta (ORFs) que codificaban proteínas con homología con proteínas reguladoras de otros miembros de la familia *Sphingomonadaceae* y que estaban localizados en las inmediaciones del gen *pahA*, en dos transposones que contenían también los genes de varias dioxigenasas (Anexo 3).

- El *ORF_1937*, codifica una proteína de la familia MarR, descrita como involucrada en el control de una gran variedad de funciones biológicas, incluyendo la resistencia a diversos antibióticos, a desinfectantes del hogar, a disolventes orgánicos, a agentes de estrés oxidativo y la regulación de la síntesis del factor de virulencia en patógenos de humanos y plantas (Grove, 2013). Muchos de los reguladores de esta familia responden a compuestos aromáticos (Fiorentino *et al.*, 2007).

- El *ORF_1941*, con homología también con reguladores de la familia MarR, y que está codificado de forma divergente a los genes que codifican un sistema de transporte tripartito RND (Resistencia-nodulación-división) (*ORF_1942/4*) en *Novosphingobium* sp. HR1a.

- El *ORF_1956*, con homología a un gen que codifica un regulador de tipo NtrC. Estos reguladores en general presentan dos dominios, un dominio de interacción sigma 54 de polimerasa de RNA con actividad ATPasa y un dominio HTH (hélice-giro-hélice) de unión a DNA, en este caso, de tipo Fis. Este regulador se transcribe en la misma dirección que algunos genes involucrados en la degradación de compuestos monocíclicos, posiblemente benzoatos y derivados (*ORF_1975/1951*).

- El *ORF_1998*, un regulador de la familia IclR que se transcribía en la misma dirección que una proteína transportadora de la familia MFS (Major facilitator superfamily) y que participa en el flujo de antibióticos.

Como cualquiera de estos cuatro ORF podría controlar la expresión de *pahA*, se decidió construir mutantes en cada uno de ellos para así poder identificar cuál estaba directamente involucrado en la regulación de los genes de degradación de PAHs. Se construyeron mutantes en los genes *ORF_1937*, *ORF_1941* y *ORF_1956* de *Novosphingobium* sp. HR1a. Aunque se intentó obtener el mutante en la *ORF_1998* (regulador de la familia IclR), no fue posible conseguirlo.

Los mutantes en los *ORF_1937* y *ORF_1941* (reguladores tipo MarR) poseían un fenotipo similar a la cepa salvaje; fueron capaces de crecer en naftaleno, fenantreno, antraceno, criseno y pireno como única fuente de carbono (datos no mostrados). Cuando se introdujo el plásmido pHR1a en las cepas mutantes no se observaron cambios en la expresión del promotor *P_{pahA}* en presencia de fenantreno. Esto indicaba que estos reguladores no estaban implicados directamente en la expresión del gen *pahA*.

El mutante en la *ORF_1956* (regulador de la familia NtrC) poseía un fenotipo similar al mutante de *pahA*; fue incapaz de crecer con naftaleno, fenantreno, antraceno, criseno y pireno como única fuente de carbono (datos no mostrados). Este dato, junto con los obtenidos del análisis de la secuencia del promotor *P_{pahA}* que señalaban a la regulación por reguladores tipo NtrC sugerían que este regulador, llamado desde ahora *pahR*, estaba involucrado en la regulación de la ruta de degradación de PAHs en *Novosphingobium* sp. HR1a. Para confirmar este resultado el plásmido pHR1a se introdujo en el mutante *pahR* de la cepa *Novosphingobium* sp. HR1a, no observándose inducción de la actividad de *P_{pahA}* en presencia de naftaleno, fenantreno, antraceno, criseno, ni pireno (Figura 8).

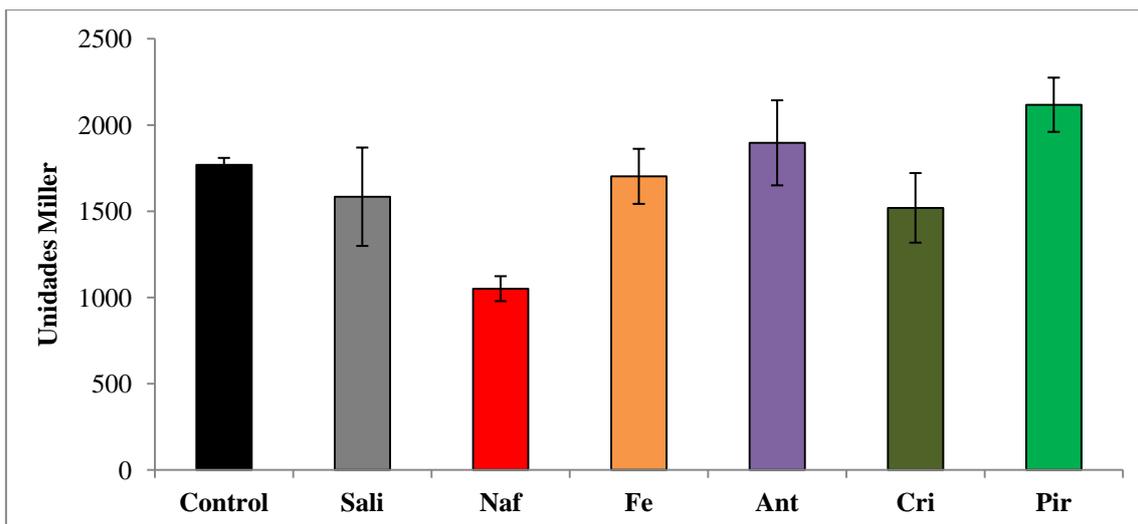


Figura 8. Expresión de P_{pahA} en el mutante en el regulador $pahR$ en *Novosphingobium* sp. HR1a. Sali, salicilato; Naf, naftaleno; Fen, fenantreno; Ant, antraceno; Cri, criseno; Pir, pireno. Las barras de error significan la desviación estándar de tres repeticiones de experimentos.

Además, se llevaron a cabo experimentos de expresión del promotor P_{pahR} mediante ensayos β -galactosidasa y se encontró que, cuando se clonó este promotor en el vector de expresión pMP220 y se introdujo en *Novosphingobium* sp. HR1a, éste se inducía en presencia de salicilato, naftaleno, fenantreno y pireno (Figura 9), los mismos compuestos que inducían la expresión de P_{pahA} .

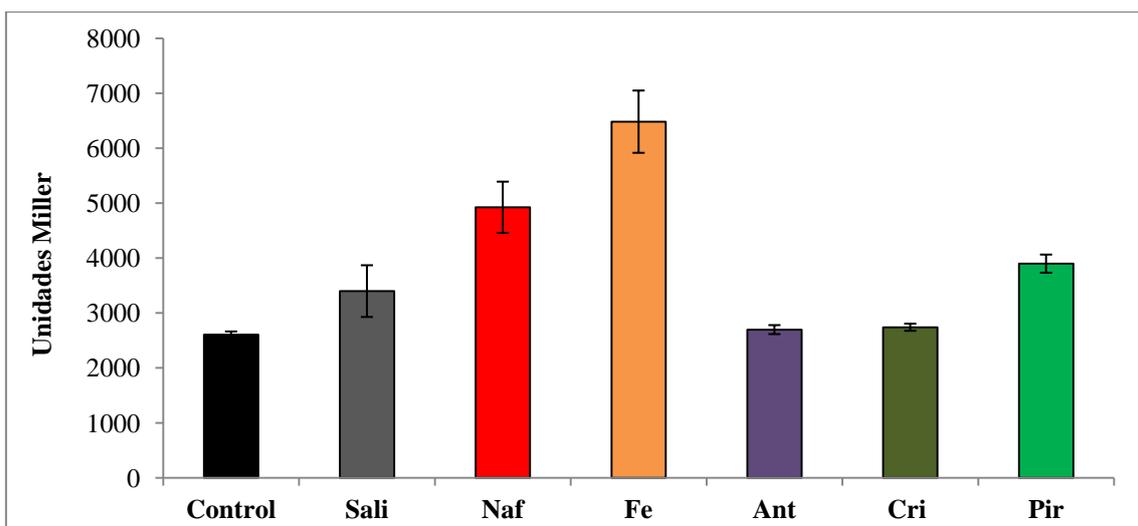


Figura 9. Expresión de P_{pahR} en *Novosphingobium* sp. HR1a. Sali, salicilato; Naf, naftaleno; Fen, fenantreno; Ant, antraceno; Cri, criseno; Pir, pireno. Las barras de error significan la desviación estándar de tres repeticiones de experimentos.

5. SISTEMA BIOREPORTERO PARA SU EXPRESIÓN HETERÓLOGA

Para conseguir un bioreportero para la detección de PAHs que se pudiera expresar en distintas cepas bacterianas, incluyendo cepas marinas, se procedió a la construcción de un sistema bioreportero con el gen regulador *pahR* con su promotor nativo P_{pahR} y el promotor P_{pahA} fusionado a GFP (Figura 10).

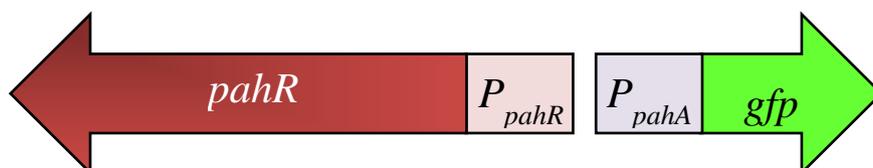


Figura 10. Esquema de la construcción de pKSPA-3.

Esta construcción se electroporó en la cepa original, *Novosphingobium* sp. HR1a, en *E. coli* DH5 α y en *P. putida* KT2440. En *Novosphingobium* sp. HR1a (pKSPA-3), se observó inducción de la expresión de fluorescencia en presencia tanto de concentraciones saturantes de naftaleno (31,6 mg/L), como de fenantreno (1,6 mg/L) (Figura 11); sin embargo, en *E. coli* DH5 α (pKSPA-3) y *P. putida* KT2440 (pKSPA-3) se observó una altísima expresión basal; la fluorescencia emitida sin inductor estaba por encima del rango de detección del fluorímetro utilizado y por tanto, un aumento de la expresión producido por el inductor no era detectable por el equipo.

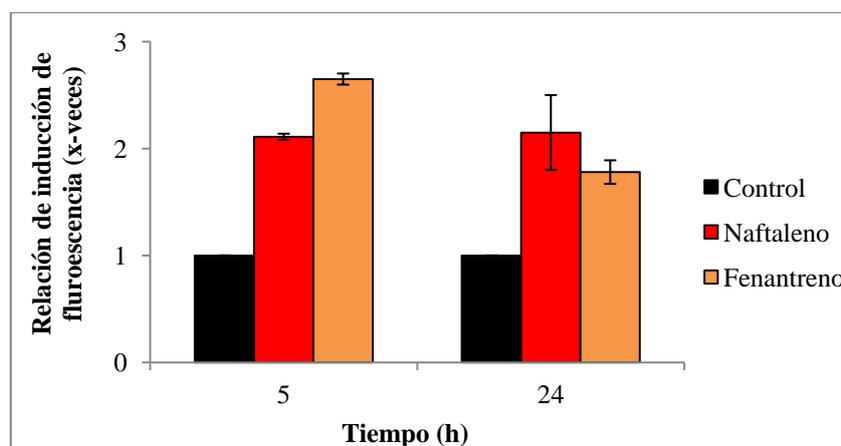


Figura 11. Experimentos de inducción del plásmido pKSPA-3 en *Novosphingobium* HR1a a 5 y 24 horas con naftaleno y fenantreno. Las barras de error significan la desviación estándar de tres repeticiones de experimentos.

Para intentar controlar la expresión del regulador dentro del bioreportero, se decidió construir el plásmido pKSPA-4, en el que se sustituyó el promotor nativo P_{pahR} por el promotor P_m (Figura 12). El funcionamiento de este biosensor sería el siguiente: en presencia de benzoato, se produciría la activación de la proteína XylS, esta se uniría a P_m e induciría la expresión de la proteína PahR. Esta a su vez, y en presencia de PAHs, induciría la expresión de GFP mediante la activación de la expresión desde el promotor P_{pahA} (Figura 12).

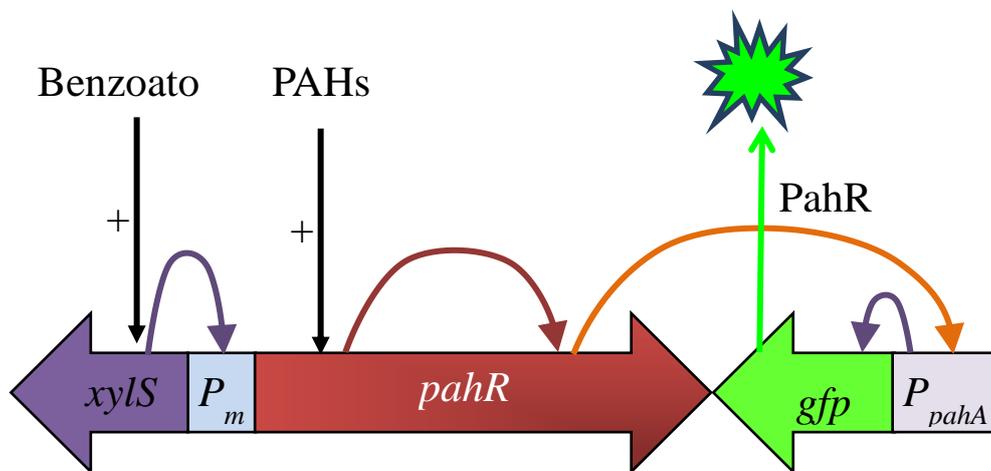


Figura 12. Funcionamiento del sistema bioreportero pKSPA-4.

Este sistema se electroporó en *E. coli* DH5 α y se probó con gasoil como inductor. Se usó gasoil en vez de fenantreno puro porque previamente se había determinado que el biosensor de naftaleno *Burkholderia* sp. MS3 (pKSN-3) era más sensible a la presencia de esta mezcla compleja que a los compuestos puros, probablemente porque la presencia de disolventes orgánicos favorecía la biodisponibilidad de los PAHs. No obstante, no se observó inducción del sistema a ninguno de los tiempos ensayados (datos no mostrados).

Todos estos resultados nos indicaron que en la regulación de P_{pahA} en *Novosphingobium* sp. HR1a existía otro elemento regulador que modulaba la expresión del promotor. Este componente no se encontraba en las cepas heterólogas probadas y

por tanto, para construir biosensores en cepas diferentes de la original, necesitábamos algún regulador adicional, que era desconocido.

6. FUNCIONAMIENTO DEL PLÁSMIDO pKSPA-1

Debido al buen crecimiento de *Novosphingobium* sp. HR1a en medio marino (ver Capítulo 1) y dado que no fue posible expresar el sistema bioreportero en cepas heterólogas, se decidió usar esta cepa como hospedadora. Esto nos permitió simplificar el bioreportero, debido a que todos los elementos reguladores estaban codificados en el cromosoma. El bioreportero a utilizar, contenido en el plásmido pKSPA-1, contenía la fusión $P_{pahA}::gfp$.

El funcionamiento de este biosensor se esquematiza en la Figura 13; en presencia de PAHs, el regulador *pahR*, ahora codificado exclusivamente en el cromosoma, se activa y se une al promotor P_{pahA} induciendo la transcripción de *gfp* en función de la concentración de inductor presente.

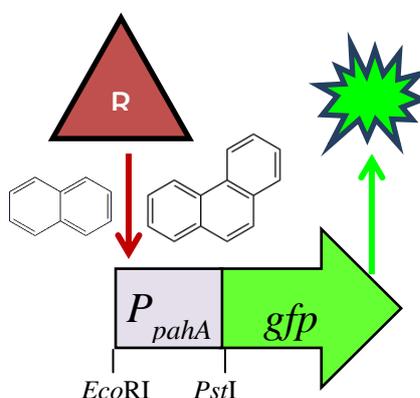


Figura 13. Funcionamiento del plásmido pKSPA-1.

7. CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA BIOREPORTERO pKSPA-1

Una vez construido el biosensor *Novosphingobium* sp. HR1a (pKSPA-1), se caracterizaron los parámetros básicos del biosensor: el tiempo de exposición al inductor, los límites de detección y la especificidad a los compuestos que se quieren detectar (Hynninen *et al.*, 2010).

7.1 Determinación del tiempo óptimo de exposición al inductor

Para la determinación de este parámetro que, como se indicó en capítulos anteriores es el tiempo que permite una mejor diferenciación de la expresión de un biosensor a distintas concentraciones (Hynninen *et al.*, 2010), se expuso *Novosphingobium* sp. HR1a (pKSPA-1) a una concentración de naftaleno de 31,6 mg/L a distintos tiempos en medio marino ONR7a (Figura 14). El tiempo donde se observó mayor inducción fue a las 24 h después de la adición del inductor.

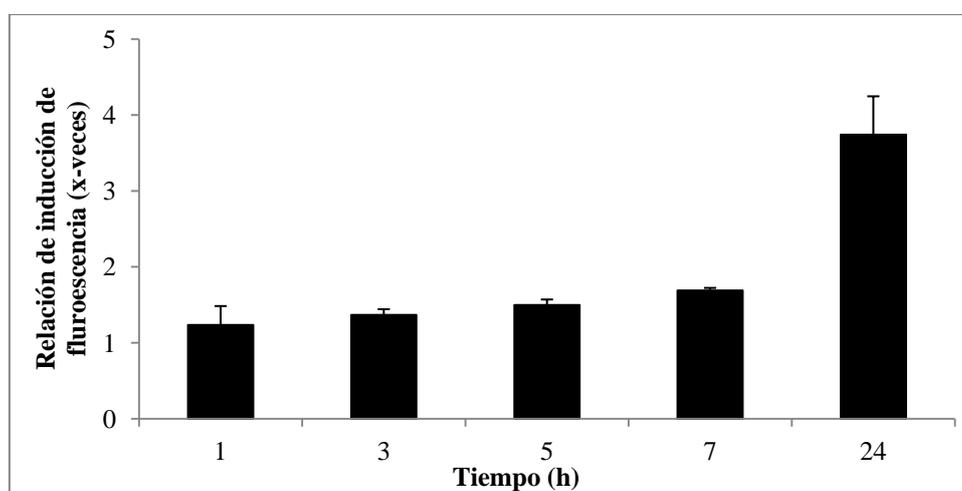


Figura 14. Experimentos de inducción del plásmido pKSPA-1 en *Novosphingobium* HR1a con naftaleno a distintas horas. Las barras de error significan la desviación estándar de tres repeticiones de experimentos.

7.2 Determinación de los límites de detección del biosensor

Para la determinación de estos parámetros se expuso *Novosphingobium* sp. HR1a (pKSPA-1) a diferentes cantidades de salicilato (Figura 15A) y PAHs de dos y tres anillos como naftaleno (Figura 15B) y fenantreno (Figura 15C) con tiempos de exposición de 24 h en medio marino ONR7a.

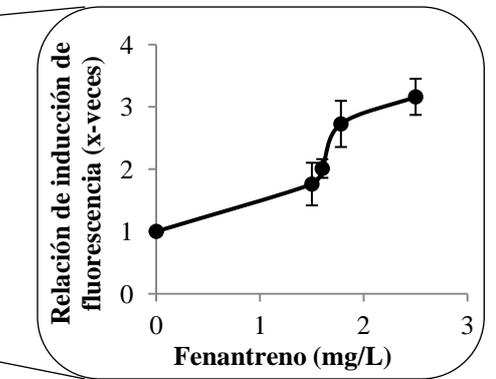
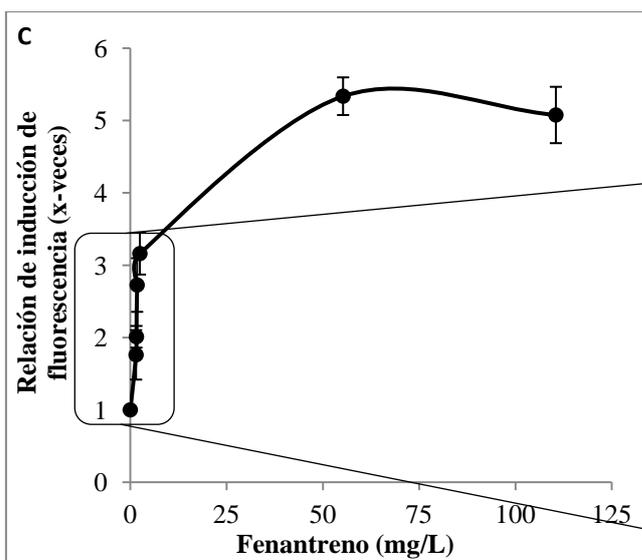
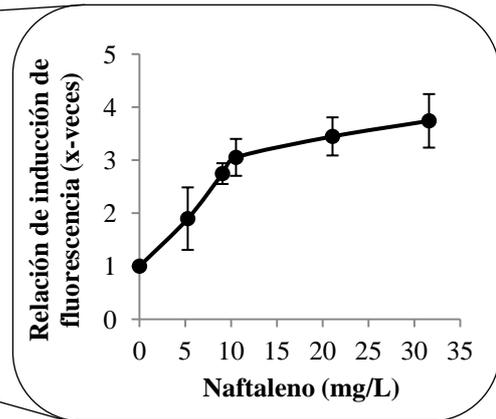
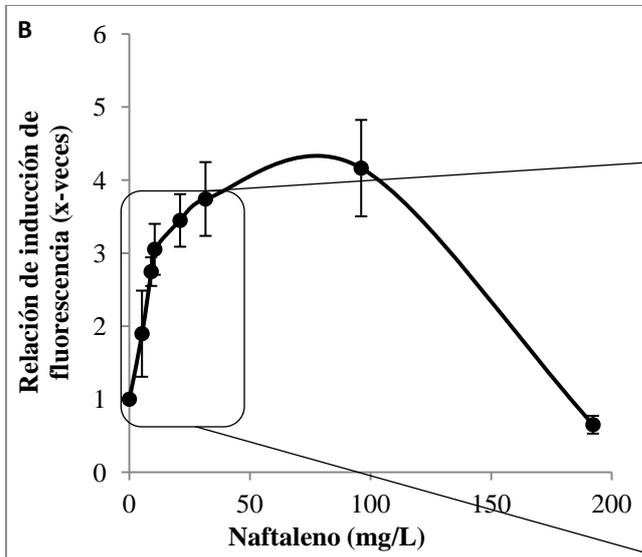
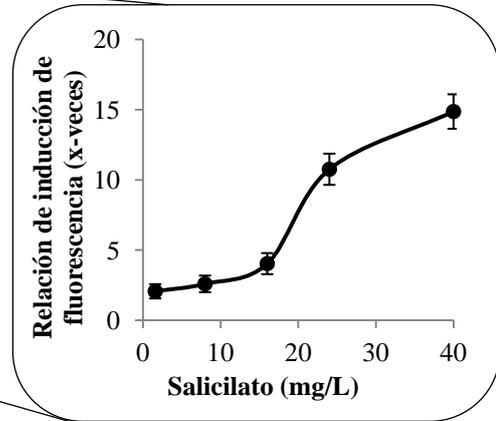
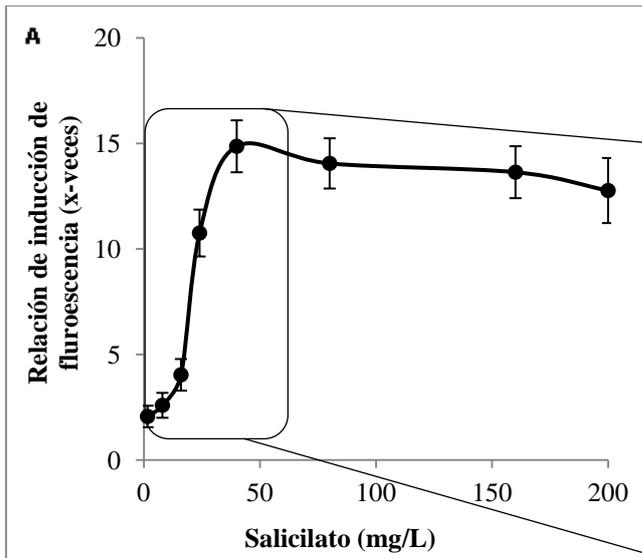


Figura 15. Experimentos de inducción del plásmido pKSPA-1 en *Novosphingobium* HR1a a distintas concentraciones de salicilato (A), naftaleno (B) y fenantreno (C). Las barras de error significan la desviación estándar de tres repeticiones de experimentos.

El límite mínimo de detección de salicilato mostrado por la cepa biosensora *Novosphingobium* sp. HR1a (pKSPA-1) fue 1,6 mg/L (Figura 15A); para el caso del naftaleno este límite mínimo de detección fue de una concentración de 5,2 mg/L (Figura 15B); mientras que para fenantreno este límite se situó a una concentración de 1,6 mg/L (Figura 15C), concentración próxima a la concentración de saturación de este compuesto en agua.

Los límites de saturación de esta cepa biosensora se situaron a una concentración de 40 mg/L de salicilato donde la fluorescencia relativa fue de 15 veces (Figura 15A). En el caso del naftaleno, el límite de saturación fue a una cantidad añadida de este compuesto de 70 mg/L con una emisión relativa de fluorescencia de 4,3 veces (Figura 15B). Para el fenantreno, el límite de saturación se determinó cuando se añadieron 60 mg/L de este compuesto, con una emisión relativa de fluorescencia de 5,5 veces (Figura 15C).

7.3 Determinación de la especificidad del sistema bioreportero

Aunque el perfil de PAHs que inducían el sistema se había determinado anteriormente en base a experimentos de β -gal era necesario determinar el rango de inductores del sistema bioreportero con GFP.

Para ello, se llevaron a cabo experimentos de exposición del biosensor a otros PAHs de dos anillos, como 2-metilnaftaleno (15 mg/L), de tres anillos como antraceno (0,044 mg/L) y de cuatro anillos como pireno (0,135 mg/L) a 24 h (Figura 16). También se expuso este biosensor a hidrocarburos aromáticos monocíclicos como tolueno (92,14 mg/L), etilbenceno (150 mg/L) y *o*-xileno (178 mg/L) (Figura 16). *Novosphingobium*

sp. HR1a fue capaz de crecer en presencia de todos estos compuestos, pero sólo se observó inducción del sistema en presencia de 2-metilnaftaleno (Figura 16). Los PAHs antraceno y pireno, así como los compuestos aromáticos monocíclicos tipo BTEX no indujeron el sistema biosensor estudiado (Figura 16).

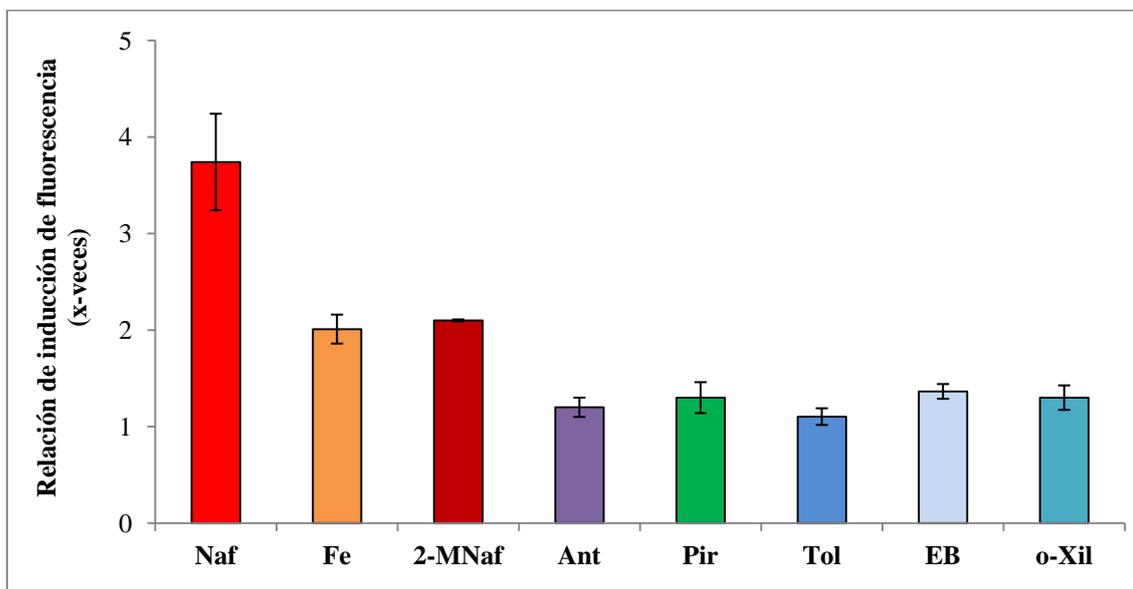


Figura 16. Experimentos de inducción a 24 h del plásmido pKSPA-1 en *Novosphingobium* HR1a con naftaleno (Naf), fenantreno (Fe), 2-metilnaftaleno (2-MNaf), antraceno (Ant), pireno (Pir), tolueno (Tol), etilbenceno (EB) y *o*-xileno (*o*-Xil). Las barras de error significan la desviación estándar de tres repeticiones de experimentos.

7.4 Cambio de la GFP estable del bioreportero por una GFP inestable

Dado que la sensibilidad de este biosensor a diferentes compuestos fue más baja que la mostrada cuando se usó como gen reportero el gen *lacZ* (Figura 8), decidimos averiguar si este fenómeno podría deberse a la alta fluorescencia basal (87038 ± 12800 conteos por segundo) observada en el biosensor en las condiciones control (sin la presencia de inductor) y, por tanto, a una posible acumulación de la proteína GFP en la célula a lo largo del tiempo de exposición. Por ello, se sustituyó el gen que codifica la síntesis de la proteína GFP estable del plásmido pKSPA-1 por una GFP inestable, que

se degrada rápidamente, denominada GFP [LVA] (Miller *et al.*, 2000), resultando el plásmido pKSPA-2. Esta construcción, se introdujo en *Novosphingobium* sp. HR1a.

Novosphingobium sp. HR1a (pKSPA-2) se expuso a inductores del sistema a distintos tiempos, resultando que el sistema biosensor no mejoraba significativamente. Por tanto, podemos concluir que el biosensor *Novosphingobium* sp. HR1a (pKSPA-1) es un sistema que detecta específicamente naftalenos, fenantreno y el producto de degradación de diversos PAHs, salicilato.

8. VALIDACIÓN DEL SISTEMA BIOREPORTERO pKSPA-1 CON MEZCLAS COMPLEJAS

El paso siguiente fue la validación de este biosensor con muestras complejas. Como se mencionó en capítulos anteriores, en ellas pueden existir compuestos que pueden alterar el funcionamiento de un biosensor (Zhang *et al.*, 2012). Es por ello que se probó la eficacia de este biosensor a la hora de detectar PAHs presentes tanto en muestras de laboratorio contaminadas artificialmente con diferentes concentraciones de gasoil y gasolina, así como en muestras ambientales obtenidas de entornos contaminados de manera accidental por vertidos de petróleo y derivados (descritos en MM).

8.1 Validación del biosensor con gasoil

Se observó inducción de la emisión de fluorescencia relativa cuando *Novosphingobium* sp. HR1a (pKSPA-1) se expuso a diferentes concentraciones de gasoil en medio marino ONR7a (Figura 17).

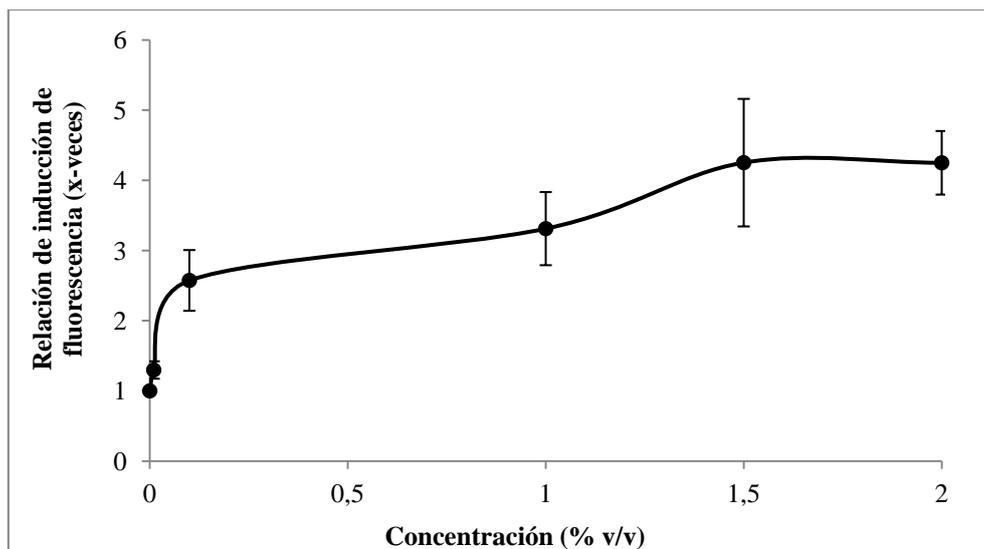


Figura 17. Experimentos de inducción del plásmido pKSPA-1 en *Novosphingobium* HR1a a distintas concentraciones de gasoil. Las barras de error significan la desviación estándar de tres repeticiones de experimentos.

Novosphingobium sp. HR1a (pKSPA-1) (Figura 17) tuvo como límite de detección de gasoil una concentración de 0,06 % (v/v), mientras que el límite de saturación se observó a una concentración de 1,5 % (v/v), donde la emisión relativa de fluorescencia fue de 4,3 veces. Se seguía observando inducción a una concentración de 2 % (v/v) donde fue de 4,1 veces con respecto al control sin inducir (Figura 17). En la Tabla 1 se pueden observar los límites de detección y de saturación por gasoil de esta cepa comparados con los obtenidos con naftaleno y fenantreno, encontrándose que el límite de detección de este biosensor era aproximadamente dos órdenes de magnitud inferior en el caso del uso de gasoil como inductor del sistema (teniendo en cuenta la cantidad de PAHs totales en la muestra cuantificados por GC-MS), que cuando se utilizó naftaleno o fenantreno en forma pura (Tabla 1).

Tabla 1. Límites de detección y límites de saturación de *Novosphingobium* sp. HR1a (pKSPA-1) con gasoil.

Muestra	Límite de detección	Límite de saturación
Naftaleno (mg/L)	5,2	70
Fenantreno (mg/L)	1,6	60
Gasoil (%)	0,06	1,5
Gasoil (mg/L de PAHs) ¹	0,04	1,05
Gasoil (mg/L de naftaleno) ²	0,03	0,86

¹ Cantidad de PAHs totales presentes en el porcentaje de gasoil indicado en la Tabla 1.

² Cantidad de naftaleno presente en el porcentaje de gasoil indicado en la Tabla 1.

8.2 Validación del biosensor con gasolina

También se realizaron experimentos de inducción a distintas concentraciones de gasolina. *Novosphingobium* sp. HR1a (pKSPA-1) fue capaz de tolerar concentraciones de gasolina de hasta 0,05% (v/v), concentración que empezaba a afectar la supervivencia de la cepa biosensora. Una concentración de 0,2% (v/v) provocaba la muerte de las células, probablemente debido a la alta concentración de BTEX (148 mg/L) encontradas en estas muestras (Tabla 2). El sistema no mostró inducción en ninguna de las concentraciones utilizadas que fueron 0,0001% (v/v), 0,005% (v/v), 0,01% (v/v), 0,05% y 0,05% (v/v), siendo la cantidad total de PAHs, de naftaleno y de BTEX determinadas por GC-MS las mostradas en la Tabla 2. La cantidad de PAHs encontrada en la mayor concentración de gasolina utilizada, en la que la supervivencia no estuvo afectada 0,01% (v/v), estuvo por debajo del límite de detección del sistema determinado en gasoil.

Tabla 2. Concentración de PAHs, naftaleno y BTEX en las distintas cantidades de gasolina utilizadas.

Gasolina (%)	PAHs (mg/L)	Naftaleno (mg/L)	BTEX (mg/L)
0,0001	0,000154	0,000149	0,074361
0,0005	0,000768	0,000747	0,371803
0,01	0,015355	0,014931	7,436060
0,05	0,076775	0,074655	37,18030
0,2	0,307098	0,298620	148,72120

8.3 Validación del biosensor con aguas y sedimentos marinos

Además, *Novosphingobium* sp. HR1a (pKSPA-1) se expuso a las muestras ambientales utilizadas en capítulos anteriores: aguas de los puertos de Motril/Granada y Mesina/Italia transitados por embarcaciones, de la playa de Salobreña/Granada menos frecuentada por barcos, de las aguas contaminadas por un derrame de combustible de Gela/Italia. También se analizaron los sedimentos del puerto de Mesina y sedimentos cercanos a Gela.

Novosphingobium sp. HR1a (pKSPA-1) mostró inducción cuando se expuso a las aguas (10 % v/v) y sedimentos de Gela (7,5 % v/v) (Figura 18), no encontrándose inducción cuando se expuso a las aguas de Motril/Salobreña/Messina (datos no mostrados).

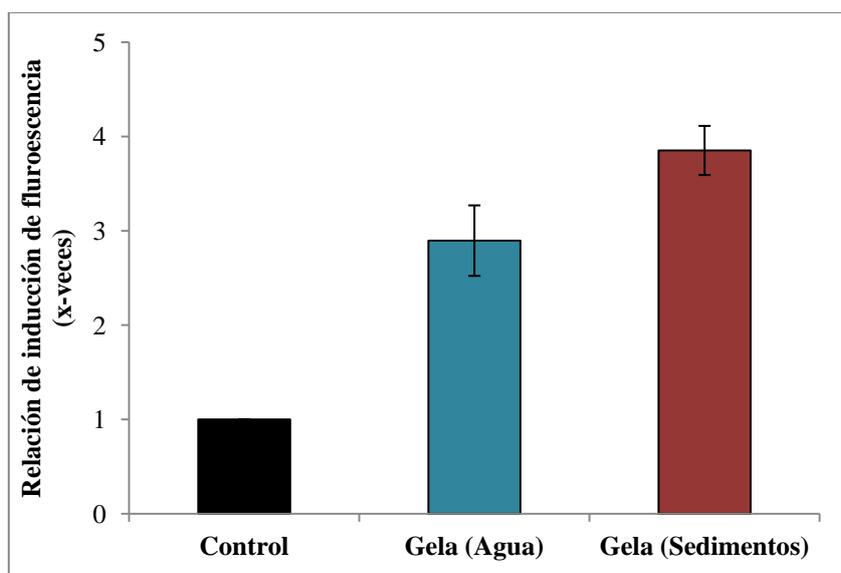


Figura 18. Experimentos de inducción del plásmido pKSPA-1 en *Novosphingobium* HR1a con aguas (10 % v/v) y sedimentos (7,5 % v/v) de Gela. Las barras de error significan la desviación estándar de tres repeticiones de experimentos.

El contenido de PAHs y naftaleno se muestra en la Tabla 3, encontrándose que en las aguas y en los sedimentos de Gela el límite de detección del sistema se encontraba muy

por debajo de los límites de detección obtenidos con PAHs puros (4 órdenes de magnitud inferior) y gasoil (un orden de magnitud inferior) (Tabla 1).

Tabla 3. Concentración de PAHs y naftaleno en las distintas muestras utilizadas.

Muestra	PAHs (mg/L)	Naftaleno (mg/L)
Aguas de Motril (10%)	0,00057	0
Aguas de Salobreña (10%)	0,00045	0,00006
Aguas de Messina (10%)	0,00105	0,00084
Sedimentos de Messina (10%)	0,00041	0,00008
Aguas de Gela (10%)	0,00117	0,00088
Sedimentos de Gela (7,5%)	0,00378	0,00351

8.4 Validación del biosensor con muestras contaminadas con crudo o derrames de crudo

En los experimentos realizados a distintas concentraciones de aguas saturadas de crudo y petróleo (chapatote) del Prestige se observó únicamente inducción con una solución saturada de crudo al 10 % (Figura 19).

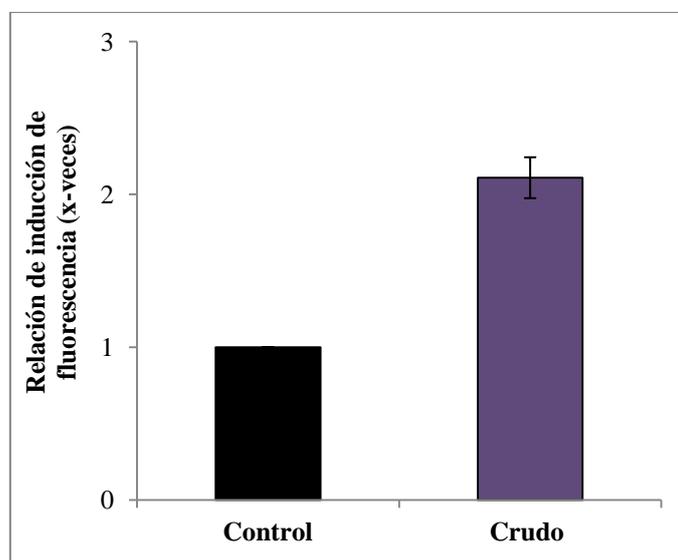


Figura 19. Experimentos de inducción del plásmido pKSPA-1 en *Novosphingobium* HR1a con agua saturada (10% v/v) de crudo. Las barras de error significan la desviación estándar de tres repeticiones de experimentos.

El contenido de PAHs, naftaleno y BTEX se muestra en la Tabla 4, encontrándose que la concentración de PAHs de la muestra de crudo al 10% estaba en el rango de detección del biosensor cuando se usó con gasoil como inductor del sistema. Dicha concentración estaba por debajo de este rango de detección en el caso de la muestra procedente del derrame del Prestige.

Tabla 4. Concentración de PAHs, naftaleno y BTEX en las distintas muestras utilizadas.

Muestra	PAHs (mg/L)	Naftaleno (mg/L)	BTEX (mg/L)
Crudo (10 %)	0,1298	0,1297	0,0275
Prestige (10 %)	0,0194	0,0184	0,0484

DISCUSIÓN

Para la construcción de un biosensor que fuese capaz de detectar PAHs de diferentes pesos moleculares, se comenzó el estudio a partir de una cepa aislada en el laboratorio de la que disponíamos de datos sobre su capacidad de degradar naftaleno y fenantreno y de su secuencia genómica. En esta tesis se demostró que esta cepa, *Novosphingobium* sp. HR1a, poseía la capacidad de degradar un amplio rango de PAHs. Además de usar naftaleno, fenantreno como única fuente de carbono, también era capaz de degradar antraceno, criseno y pireno; PAHs de alto peso molecular. En otras *Sphingomonadaceae*, esta capacidad es debida a la existencia de una dioxigenasa no específica que hidroxila PAHs (Demaneche *et al.*, 2004; Jouanneau *et al.*, 2006; Schuler *et al.*, 2009; Lyu *et al.*, 2014) y, por análisis de secuencia y construcción de un mutante en la dioxigenasa adecuada, demostramos que *pahA* era la dioxigenasa fundamental para la degradación de PAHs de diferentes pesos moleculares en *Novosphingobium* sp. HR1a. Que el mutante no creciera en ninguno de los PAHs probados sugería que ninguna otra de las dioxigenasas codificadas en el genoma era capaz de utilizar productivamente estos compuestos.

La expresión de los genes de estas dioxigenasas se inducen a menudo por la presencia de PAHs en los medios de cultivo (Kim *et al.*, 2006; Pagnout *et al.*, 2007) y, efectivamente, al utilizar la fusión $P_{pahA}::lacZ$ se demostró que el gen *pahA* de *Novosphingobium* sp. HR1a se inducía en presencia de concentraciones de saturación en agua de antraceno y pireno, siendo esta inducción mucho más clara en presencia de naftaleno, salicilato y fenantreno. Este sistema mostró gran especificidad por PAHs, ya que no se observó inducción de *pahA* en presencia de otros compuestos presentes en el petróleo como son los compuestos aromáticos monocíclicos (tolueno, etilbenceno y *o*-xileno). Por tanto, este sistema de regulación tenía buenas perspectivas para poder ser

utilizado en la construcción de un bioreportero para la detección de PAHs, incluyendo PAHs de alto peso molecular, para cuya detección no se había diseñado ningún biosensor hasta el momento.

Como esta Tesis Doctoral se enmarca dentro de un proyecto europeo, en el que interesaba usar las cepas utilizadas por el resto de socios en el consorcio, nuestra primera aproximación para el diseño del bioreportero fue generar un sistema que se pudiera utilizar en diversas cepas bacterianas. Para ello era imprescindible identificar la/s proteína/s que controlaban la expresión desde el promotor P_{pahA} . Cabe destacar que en este capítulo se ha descrito por primera vez el regulador de la ruta degradativa de PAHs para un miembro de la familia *Sphingomonadaceae*; PahR, perteneciente a la familia de los reguladores transcripcionales dependientes de σ^{54} . Esta proteína es esencial para la degradación de PAHs; en ausencia de este factor de transcripción, la expresión de la dioxigenasa que participa en la degradación de PAHs se reducía drásticamente y no se observaba inducción de la actividad β -galactosidasa desde el promotor P_{pahA} en presencia de ninguno de los posibles inductores. Esto se traducía en la incapacidad de la cepa mutante en *pahR* para utilizar estos compuestos para su crecimiento.

Los resultados obtenidos con el bioreportero pKSPA-3 (que incluía el regulador PahR) en diferentes cepas bacterianas, sugerían que existía un regulador adicional de la ruta que modulaba la expresión de la ruta. Uno de los posibles candidatos, que podría participar conjuntamente con *pahR* en la regulación de la degradación de PAHs, es la proteína codificada por el *ORF_1998*, un regulador de la familia IclR del que no se pudieron obtener mutantes en el transcurso de esta Tesis Doctoral.

La versión más sencilla del bioreportero pKSPA-1, en la que se ha eliminado el gen regulador *pahR*, introducida en la cepa *Novopshingobium* sp. HR1a era capaz de

detectar de forma específica algunos PAHs como naftaleno, fenantreno y 2-metilnaftaleno, mientras que no detectaba aromáticos monocíclicos. Este biosensor requería un tiempo de inducción (24 horas) sensiblemente superior al biosensor *Novosphingobium* sp. HR1a (pKSPA-3), que requería tan sólo 5 h de incubación en presencia del inductor. Hay que reseñar que estos tiempos de inducción están determinados en medios diferentes, el biosensor con pKSPA-1 se ensayó en medio marino ONR7a y el pKSPA-3 en medio M9. La cepa *Novosphingobium* sp. HR1a tiene un tiempo de generación menor en medio M9 (1,7 horas) que en el medio ONR7a (4 horas) (Capítulo 1) y esto puede condicionar el funcionamiento del biosensor. Por otro lado, la dosis de regulador presente en la célula, probablemente mayor con el sistema bioreportero pKSPA-3 que con pKSPA-1, también contribuya a estas diferencias. Por último, Lockwood, (1976) y Verschueren (2001) demostraron que la concentración de saturación del naftaleno y del fenantreno era menor en medio marino (23,1 mg/L y 0,6 mg/L, respectivamente) que en agua destilada (31,6 mg/L y 1,6 mg/L, respectivamente) y esto podría también a disminuir la biodisponibilidad del compuesto y hacer necesario más tiempo de exposición al inductor en el caso de los experimentos en medio marino. Al no poderse utilizar el bioreportero pKSPA-3 en sistemas heterólogos, se decidió continuar con el bioreportero pKSPA-1, mucho más sencillo.

Lamentablemente, este biosensor no respondía adecuadamente a los PAHs de alto peso molecular como criseno y pireno. Esta falta de respuesta no se debe a la falta de reconocimiento de estos compuestos por la proteína reguladora, ya que cuando se fusionaba el promotor P_{pahA} al gen de la β -galactosidasa sí que se producía una inducción significativa (de dos veces en presencia de pireno y 1,5 en antraceno), sino probablemente a un menor rango de discriminación en el gen reportero seleccionado

con respecto a la β -galactosidasa. La optimización de este biosensor para la detección de PAHs de alto peso molecular es otro de los campos abiertos por esta Tesis Doctoral.

Aunque existen otros biosensores capaces de detectar naftaleno y fenantreno, los descritos hasta el momento utilizan reporteros bioluminescentes (genes *lux*) (Tecon *et al.*, 2010) que, como en el caso de la actividad β -galactosidasa, necesitan la adición de sustratos secundarios exógenos (en el caso de los biosensores bioluminiscentes un aldehído) (Van der Meer *et al.*, 2010), disminuyendo su utilidad para aplicaciones de campo. Como se ha dicho anteriormente, éste no es el caso de los biosensores basados en GFP; que no necesitan la adición de ningún tipo de compuesto para su activación. Si comparamos nuestro biosensor *Burkholderia* sp, MS3 (pKSN-1) (Capítulo 3) con el construido en este capítulo, ambos presentan diferencias significativas. El primero es específico de naftaleno y derivados, mientras que *Novosphingobium* sp. HR1a (pKSPA-1), además de estos compuestos de dos anillos aromáticos, detecta fenantreno (tres anillos) y salicilato, compuesto clave en la degradación de PAHs (Di Gennaro *et al.*, 2001). Los límites de detección de naftaleno y 2-metilnaftaleno en el caso del biosensor *Novosphingobium* sp. HR1a (pKSPA-1) fueron menores que en el caso de *Burkholderia* sp. MS3 (pKSN-1), concretamente, 6 veces más bajo en el caso de naftaleno y 2 veces en el caso de 2-metilnaftaleno. Además, los límites de saturación del bioreportero *Novosphingobium* sp. HR1a (pKSPA-1) eran superiores que en el caso de *Burkholderia* sp. MS3 (pKSN-1). Esto puede ser debido a dos causas, por un lado a que el biosensor *Novosphingobium* sp. HR1a (pKSPA-1) en presencia de naftaleno produce salicilato, compuesto que es un buen inductor del sistema, aumentando la inducción y, por otro lado, puede deberse también a factores intrínsecos de la cepa hospedadora de cada bioreportero (tales como la resistencia al compuesto, los sistemas de transporte de los mismos y otros) que no han sido estudiados en detalle.

Los límites de detección de *Novosphingobium* sp. HR1a (pKSPA-1) son más bajos comparados con el biosensor construido por Tecon *et al.*, (2010), en el que usaron la proteína sensora PhnR de *Burkholderia sartisoli* RP007 y LuxAB como proteína reportera. En nuestro biosensor, estos límites de detección se situaron a concentraciones de 40 µg/L de PAHs en muestras contaminadas con gasoil, mientras que el límite de detección observado por estos autores fue de 64 µg/L de PAHs en experimentos de laboratorio donde simulaban un derrame de petróleo. Otras ventajas que presenta nuestro biosensor con respecto al descrito anteriormente son su capacidad de sobrevivir y crecer en medios marinos y su tolerancia a altas cantidades de PAHs. Tecon *et al.*, (2010) tuvieron que recurrir a la dilución de las muestras, para que no se afectara a la viabilidad de la cepa huésped utilizada, *Burkholderia sartisoli* RP007; esta cepa mostró más sensibilidad a las aguas marinas que *Novosphingobium* sp. HR1a (pKSPA-1). Además, los límites de saturación de *Novosphingobium* sp. HR1a (pKSPA-1) (70 mg/L de naftaleno y 60 mg/L de fenantreno) están muy por encima de los del biosensor de Tecon *et al.*, (2010), que no funcionaba correctamente por encima de una concentración de naftaleno de 384 µg/L. Este mejor funcionamiento del biosensor *Novosphingobium* sp. HR1a (pKSPA-1) lo hace más adecuado para su uso en aplicaciones medioambientales.

Al igual que se ha visto en los casos anteriores, los límites de detección de contaminantes en mezclas complejas se ven alterados por los compuestos presentes en las mismas o por la biodisponibilidad de los contaminantes. Los límites de detección de PAHs puros de la cepa *Novosphingobium* sp. HR1a (pKSPA-1) mostraron ser discordantes con los encontrados en mezclas complejas, probablemente porque estas muestras llevan siempre mezclas de PAHs que pueden tener efectos sinérgicos y en algunos casos (gasoil) elevadas concentraciones de disolventes orgánicos que pueden

contribuir a aumentar la solubilidad de los compuestos y, por tanto, aumentar su biodisponibilidad. Las muestras ambientales también mostraron límites de detección diferentes entre ellas (Anexo 4). Por ejemplo, el límite de detección del biosensor *Novosphingobium* sp. HR1a (pKSPA-1) en las muestras de aguas y sedimentos de Gela es un orden de magnitud menor que el encontrado para gasoil, pese a que en estas mezclas no hay BTEX. Es posible que en estas muestras haya otros inductores desconocidos hasta el momento, o que habiendo sido identificados no hayan sido cuantificados por GC-MS (por ejemplo metilnaftalenos). Estos resultados muestran la complejidad que tiene la evaluación de muestras ambientales. No obstante, hay que recordar que la toxicidad de estos compuestos está relacionada con la biodisponibilidad y que, por definición, los biosensores de células enteras miden la fracción biodisponible del contaminante, dando una idea más real de la peligrosidad del contaminante en un momento determinado.

Podemos concluir que *Novosphingobium* sp. HR1a (pKSPA-1) es un buen biosensor de PAHs tanto en entornos marinos como terrestres, ya que muestra gran sensibilidad a estos compuestos. Además, esta cepa posee otras características interesantes para su uso: es capaz de degradar PAHs y es tolerante a los mismos. Conviene remarcar que, en este caso concreto, donde el biosensor es capaz de degradar PAHs, este podría ser utilizado como agente biorremediador de entornos marinos contaminados, a la vez que serviría como agente biosensor para monitorizar el proceso de biodegradativo y detectar la ausencia/presencia de contaminante.

DISCUSIÓN GENERAL

DISCUSIÓN GENERAL

Esta Tesis Doctoral queda encuadrada en el proyecto europeo Kill•Spill (www.killspill.es) que tiene como objetivo principal desarrollar tecnologías innovadoras para su utilización en la limpieza integral de entornos marinos que han sufrido las consecuencias de derrames de petróleo (crudo) y derivados (gasolinas, gasoil, etc.). Entre estas tecnologías se encuentran el uso de nuevos materiales para dispersar/emulsionar estos vertidos, el diseño de nuevos materiales y barreras físicas de contención, procedimientos para la biorremediación de este petróleo y sistemas para detectar estos derrames accidentales.

El objetivo principal de la presente Tesis Doctoral queda englobado precisamente en la detección de vertidos de crudo (petróleo sin refinar) y sus derivados (gasolina y gasoil), así como en la determinación de su persistencia a lo largo del tiempo en el medio ambiente.

El abordaje para la consecución de este objetivo fue diseñar y caracterizar una batería de biosensores bacterianos para la detección de alguno de los componentes mayoritarios de estos vertidos: hidrocarburos aromáticos monocíclicos de tipo BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos) y policíclicos (PAHs) principalmente del tipo naftaleno y fenantreno (Speight, 1991). Estos biosensores deberían permitir la detección y el seguimiento *in-situ* de estos derrames de petróleo antes, durante y después de los tratamientos de descontaminación.

Aunque al principio del proyecto se planteó el uso común por todos los miembros del consorcio de una serie de cepas marinas degradadoras de diferentes tipos de hidrocarburos presentes en el petróleo, durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral descartamos varias cepas que no eran compatibles con el desarrollo de nuestros biosensores. De este modo, las cepas bacterianas finalmente utilizadas como

hospedadores de los distintos bioreporteros fueron microorganismos procedentes de medios marinos (*Alcanivorax borkumensis* SK2), terrestres (*Burkholderia* sp. MS3, *Novosphingobium* sp. HR1a y *Pseudomonas putida* KT2440) y de aguas dulces (*P. putida* DOT-T1E). Estas cepas mostraron tasas de crecimiento adecuadas, tanto en medios de laboratorio como en medio marino, un patrón de resistencia compatible con los vectores genéticos disponibles para la construcción de biosensores y la suficiente versatilidad genética para su posible manipulación en el laboratorio. Además, fueron capaces de tolerar un amplio rango de concentraciones de los compuestos a detectar: *Burkholderia* sp. MS3 y *Novosphingobium* sp. HR1a, utilizadas como hospedadoras de los bioreporteros de naftaleno y PAHs respectivamente, fueron capaces de tolerar cantidades superiores a la concentración de saturación de estos compuestos. Las cepas utilizadas para los biosensores de BTX (*A. burkomensis* SK2, *P. putida* KT2440 y *P. putida* DOT-T1E) mostraron tolerancia a estos compuestos, siendo la bacteria marina la menos resistente y *P. putida* DOT-T1E la más tolerante.

Los sistemas reporteros diseñados fueron capaces de detectar específicamente BTX (pKST-1), naftaleno y derivados (pKSN-1) y naftalenos, fenantreno y salicilato (pKSPA-1). Como se puede observar en el Anexo 5, estos biosensores demostraron ser muy sensibles a concentraciones relativamente bajas de BTX y PAHs puros. Los límites de detección para el caso de los biosensores de BTX se correlacionaban con los niveles de tolerancia de cada una de las cepas hospedadoras donde se introdujo la construcción reportera, mientras que para los PAHs el factor fundamental que influenciaba los límites de detección fue la solubilidad del compuesto en agua, que limitaba la biodisponibilidad del mismo.

Aunque, en condiciones de laboratorio y utilizando diferentes concentraciones de compuestos puros o mezclas complejas (como gasolina o gasoil), existe un rango de

concentraciones de BTX o PAHs donde la fluorescencia de todos los biosensores aumenta de forma lineal con respecto a la concentración de estos compuestos aromáticos, la cuantificación de estos contaminantes en muestras ambientales es compleja, ya que no siempre hay una correlación entre la fluorescencia emitida y los niveles en los que se encuentran los contaminantes a detectar. Este fenómeno se explica por la complejidad de las muestras ambientales: la diferente presencia y persistencia de compuestos agonistas y antagonistas, la diferente biodisponibilidad del compuesto y la toxicidad de compuestos de la mezcla. Todos estos factores contribuyen a la variabilidad de los resultados. Por ejemplo, los límites de detección en el caso de las muestras complejas, como la gasolina y el gasoil, son menores que los límites de detección obtenidos cuando se añaden los compuestos puros. Podemos concluir, por tanto, que estos biosensores son eficaces para determinar la presencia/ausencia de contaminantes biodisponibles en una zona, pero que no son herramientas adecuadas para la cuantificación absoluta de los compuestos diana. No obstante, no hay que olvidar que los biosensores desarrollados miden la concentración biodisponible del contaminante, parámetro determinante a la hora de evaluar los efectos medioambientales de un vertido. Dependiendo de la naturaleza química del contaminante, del tiempo pasado desde el vertido y de los procesos de eliminación de contaminantes en la zona (físicos, químicos y biológicos) la persistencia de los contaminantes será diferente. La alta volatilidad de los BTX hace que la cantidad de estos compuestos sea normalmente muy bajo o nulo en derrames de petróleo o sus derivados expuestos durante mucho tiempo a la intemperie y esa es la razón por la que el biosensor de aromáticos monocíclicos no dio resultados positivos en sedimentos y aguas de Gela, mientras que el biosensor de PAHs sí. Los PAHs son menos volátiles y más recalcitrantes en general.

La finalidad última de los biosensores desarrollados durante esta Tesis doctoral es la adecuación de estos sistemas biosensores para la medida *in situ*, de manera directa y continua de contaminantes en un vertido real de petróleo o derivados, sometido a distintas estrategias de descontaminación integradas en el proyecto Kill•Spill. Por eso, y pese a que *Burkholderia* sp. MS3 (pPSM) y *Novosphingobium* sp. HR1a (pHR1a), que llevan como reportero el gen *lacZ*, detectaban mayor número de derivados de naftaleno (1-bromonaftaleno, 1-cloronaftaleno y 1-metilnaftaleno) y PAHs (criseno, antraceno y pireno) respectivamente, que los biosensores equivalentes con la GFP, éstas opciones fueron descartadas para su uso *in situ* debido a la laboriosidad de los ensayos a realizar para la detección. De hecho, para completar el proyecto, se pretende inmovilizar las cepas biosensoras en matrices sintéticas. Una vez determinada la supervivencia de las cepas biosensoras y su eficiencia en dichas matrices, éstas se acoplarán a un instrumento óptico (fluorímetro) de pequeño tamaño, cuyo diseño corresponde a la empresa Creative Research Solutions BVBA, en Bélgica. Este dispositivo se sumergirá directamente en medios entornos marinos contaminados, donde hará un seguimiento a lo largo del tiempo de la emisión de fluorescencia producida por la presencia de contaminantes en condiciones medioambientales. Los datos de fluorescencia obtenidos por este fluorímetro podrán seguirse a distancia y en tiempo real ya que serán transferidos a una estación de trabajo dotada con un software (LabView) diseñado específicamente para esta tarea.

Como se ha ido discutiendo en cada capítulo, los biosensores pueden ser utilizados según sus características, en aguas dulces, marinas y suelos (o sedimentos). Esta versatilidad los hace extremadamente útiles como herramienta biotecnológica. Esta versatilidad los hace eficaces, por ejemplo, en la detección de tolueno en agua potable, ya que el límite de detección de los biosensores en BTX está por debajo del máximo

permitido por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA, 2005) de 1 mg/L. La identificación de salicilato, como uno de los mejores inductores del biosensor *Novosphingobium* sp. HR1a (pSKPA-1), permite también imaginar el diseño de un kit diagnóstico de estrés en plantas, ya que está bien estudiado que el salicilato media en diferentes respuestas a estreses bióticos y abióticos. El límite de detección de este compuesto, 2 mg/L, es probablemente muy alto para utilizarlo con este propósito por lo que sería necesario optimizar el biosensor.

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 biosensores bacterianos con capacidad de detectar BTX y PAHs a diferentes concentraciones y en distintos medios. Estos biosensores son lo suficientemente versátiles para que, mediante distintas optimizaciones, se pueda aumentar su sensibilidad y su respuesta en muestras ambientales y se puedan adaptar a la detección de compuesto en distintas aplicaciones.

CONCLUSIONES

- 1.- *Alcanivorax borkumensis* SK2, *Novosphingobium* sp. HR1a, *Burkholderia* sp. MS3, *Pseudomonas putida* KT2440 y *Pseudomonas putida* DOT-T1E demostraron ser buenas cepas hospedadoras para albergar construcciones cuya función era detectar hidrocarburos aromáticos monocíclicos (BTEX) o policíclicos (PAHs) en medios marinos, terrestres y en aguas dulces.
- 2.- Los biosensores construidos fueron muy eficaces para la detección de la presencia, a nivel de mg/L, de los contaminantes para los que fueron construidos.
- 3.- Estos biosensores mostraron ser específicos para la detección del tipo de moléculas para los que fueron diseñados. Los biosensores de hidrocarburos aromáticos monocíclicos (pKST-1) sólo detectaron benceno, tolueno, *m*- y *p*-xileno (BTX) y no se activaron por la presencia de PAHs. El biosensor *Burkholderia* sp. MS3 (pKSN-1), sólo detectó naftaleno y 2-metilnaftaleno y no se activó en presencia de fenantreno ni de BTEX. El biosensor *Novosphingobium* sp. HR1a (pKSPA-1) sólo detectó naftaleno, fenantreno, 2-metilnaftaleno y salicilato, y no se activó en presencia de BTEX.
- 4.- Los límites de detección en los biosensores de BTX variaron en función de la tolerancia de la cepa hospedadora a estos compuestos, siendo menores estos límites en la cepa más sensible a BTEX, *A. borkumensis* SK2 y mayores en la más tolerante, *P. putida* DOT-T1E.
- 5.- Los límites de detección de PAHs de *Novosphingobium* sp. HR1a (pKSPA-1) eran menores que la concentración de saturación en el caso de naftaleno y 2-metilnaftaleno, siendo igual a la de saturación para el fenantreno.
- 6.- En el caso de utilización de compuestos aromáticos puros y de mezclas complejas como gasoil y gasolina, existe un rango de concentración donde la fluorescencia de todos los biosensores aumenta de forma lineal con respecto a la concentración de los compuestos utilizados.
- 7.- Los límites de detección en el caso de las muestras complejas, como gasoil y gasolina, son menores que los límites de detección obtenidos cuando se miden compuestos puros.
- 8.- La no correlación directa entre la concentración de BTX y PAHs en muestras ambientales (aguas marinas contaminadas, aguas de puertos, sedimentos y tierra) y la fluorescencia emitida indica que estos biosensores, aunque mostraron más activación cuanto mayor era la presencia de contaminantes, no son eficaces para la cuantificación exacta de hidrocarburos aromáticos en este tipo de muestras.
- 9.- Los biosensores pueden ser utilizados para detectar la presencia a nivel de concentraciones traza (0,04 mg/L, 0,8 µg/L) de los respectivos contaminantes (tolueno puro y naftaleno en aguas contaminadas).
- 10.- Los biosensores de BTX y PAHs pueden utilizarse directamente en muestras de agua marina.

11.- La aplicación fundamental de estos biosensores en la naturaleza es la detección de sitios contaminados y evaluar la desaparición de dicha contaminación a lo largo del tiempo. Concretamente, los biosensores de BTX (basados en el bioreportero pKST-1) y el biosensor *Burkholderia* sp. MS3 (pKSN-1) podrían utilizarse para la detección de vertidos recientemente acontecidos, ya que debido a la alta y media volatilidad de los compuestos que detectan, los BTX y naftalenos respectivamente, son más escasos en muestras antiguas, mientras que el biosensor *Novosphingobium* sp. HR1a (pKSPA-1), que detecta PAHs de mayor peso molecular (más persistentes), podría emplearse para medir la persistencia y la expansión del vertido.

12.- Se ha identificado el regulador de la dioxigenasa de PAHs de *Novosphingobium* sp. HR1a y, aunque se ha incorporado al bioreportero pKSPA-2, su expresión no permite el control de la expresión del promotor P_{pahA} en cepas heterólogas, sugiriendo la existencia de algún otro elemento que module la expresión del operón en la cepa original. Por tanto, para poder expresar eficazmente este bioreportero en diferentes cepas bacterianas se requiere la mejor caracterización de la regulación de la expresión de este promotor en *Novosphingobium* sp. HR1a.

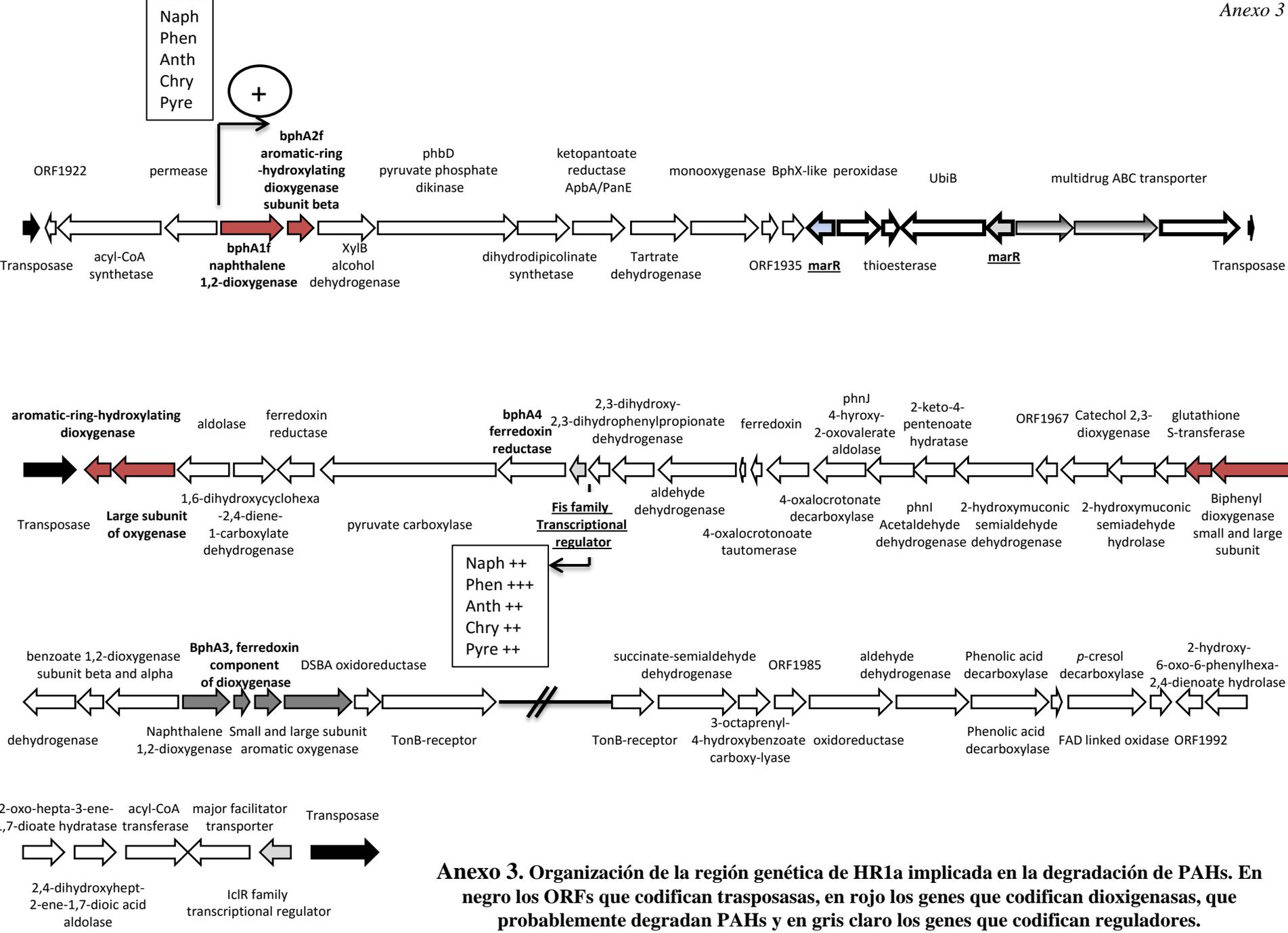
ANEXOS

Anexo 1. Características y límite de detección de distintos biosensores de BTEX. Valores en mg/L. LD: Límite de detección. ND: No determinado. NE: No hay experimentos.

Regulador	Promotor	Proteína reportera	Cepa hospedadora	LD tolueno puro	LD muestras complejas	Medio marino	Referencia
TodST	<i>P_{todX}</i>	<i>luxCDABE</i>	<i>P. putida</i> F1	0,03	ND (combustible de aviación JP-4)	NE	Applegate <i>et al.</i> , 1998
XylR	<i>P_u</i>	<i>lucFF</i>	<i>E. coli</i> DH5 α	4,6	7,3 (tolueno en agua contaminada con BTEX)	NE	Willardson <i>et al.</i> , 1998
TbuT	<i>P_{ibuA1}</i>	<i>gfp</i>	<i>P. fluorescens</i> A506	0,9	0,23 (tolueno en gasolina)	NE	Stiner <i>et al.</i> , 2002
TbuT	<i>P_{ibuA1}</i>	<i>luxAB</i>	<i>E. coli</i> DH5 α	0,02	ND (petróleo crudo NSO-1)	1/4 diluido (NSO-1)	Tecon <i>et al.</i> , 2010
TodST	<i>P_{todX}</i>	<i>gfp</i>	<i>A. borkumensis</i> SK2	0,04	0,032 (tolueno en gasolina)	0,04 (tolueno)	Este estudio
TodST	<i>P_{todX}</i>	<i>gfp</i>	<i>P. putida</i> KT2440	0,9	0,16 (tolueno en gasolina)	10 (tolueno)	Este estudio
TodST	<i>P_{todX}</i>	<i>gfp</i>	<i>P. putida</i> DOT-T1E	0,9	0,25 (tolueno en gasolina)	2,5 (tolueno)	Este estudio

Anexo 2. Resultado del análisis de BTEX y PAHs por GC-MS de las muestras ambientales. Valores en mg/L.

	Benceno	Tolueno	Etilbenceno	<i>m-, p</i>-Xileno	<i>o</i>-Xileno	Total BTEX	2 anillos	3 anillos	> 3 anillos	Naftaleno	Total PAHs
Petróleo y derivados											
Crudo	0,00	0,046	0,059	0,091	0,077	0,275	1,288	0,008	0,002	1,297	1,298
Prestige	0,041	0,108	0,087	0,129	0,118	0,484	0,1876	0,0045	0,0017	0,1837	0,1938
Gasoil	177	604	1082	2363	1823	6051	64,314	3,7548	2,0052	57,5424	70,0740
Gasolina	5248	32807	8647	16481	11175	74360	151	1,296	0,378	149	153
Aguas marinas											
Salobreña	0	0	0	0	0	0	0,0006	0,0001	0,0038	0,0006	0,0045
Motril	0	0	0	0	0	0	0,0018	0,0002	0,0037	-	0,0057
Messina	0	0	0	0	0	0	0,0091	0,0005	0,0009	0,0084	0,0105
Gela	0	0	0	0	0	0	0,0095	0,0006	0,0017	0,0088	0,0117
Sedimentos											
Messina	0	0	0	0	0	0	0,0009	0,0019	0,0014	0,0008	0,0041
Gela	0	0	0	0	0	0	0,0485	0,0031	0,0003	0,0468	0,0504



Anexo 3. Organización de la región genética de HR1a implicada en la degradación de PAHs. En negro los ORFs que codifican trasposasas, en rojo los genes que codifican dioxygenasas, que probablemente degradan PAHs y en gris claro los genes que codifican reguladores.

Anexo 4. Límites de detección de los biosensores de PAHs. Resultados expresados en mg/L. N.I significa no inducción (por debajo de 2 veces) y N.D. significa no determinado.

Límites/Biosensor	MS3 (pKSN-1)		HR1a (pKSPA-1)	
	Límite detección	Límite saturación	Límite detección	Límite saturación
Naftaleno (mg/L)	31,6	31,6	5,2	70
2-Metilnaftaleno (mg/L)	24,6	N.D	15	N.D
Fenantreno (mg/L)	N.I	N.I	1,6	60
Salicilato de sodio (mg/L)	N.D	N.D	1,6	40
Gasoil (mg/L de PAHs)	0,36	0,72	0,04	1,05
Gasoil (mg/L de naftaleno)	0,29	0,58	0,03	0,86
Gasoil (mg/L de BTEX)	30,26	60,52	3,63	90,77
Gasolina (mg/L de PAHs)	0,0154	N.D	N.I	N.I
Gasolina (mg/L de naftaleno)	0,0149	N.D	N.I	N.I
Gasolina (mg/L de BTEX)	7,43	N.D	N.I	N.I
Crudo (mg/L de PAHs)	N.I	N.I	0,1298	N.D
Crudo (mg/L de naftaleno)	N.I	N.I	0,1297	N.D
Crudo (mg/L de BTEX)	N.I	N.I	0,0275	N.D
Prestige (mg/L de PAHs)	N.I	N.I	N.I	N.I
Prestige (mg/L de naftaleno)	N.I	N.I	N.I	N.I
Prestige (mg/L de BTEX)	N.I	N.I	N.I	N.I
Aguas de Motril (mg/L de PAHs)	N.D	N.D	N.I	N.I
Aguas de Motril (mg/L de naftaleno)	N.D	N.D	N.I	N.I
Aguas de Motril (mg/L de BTEX)	N.D	N.D	N.I	N.I
Aguas de Salobreña (mg/L de PAHs)	N.D	N.D	N.I	N.I
Aguas de Salobreña (mg/L de naftaleno)	N.D	N.D	N.I	N.I
Aguas de Salobreña (mg/L de BTEX)	N.D	N.D	N.I	N.I
Aguas de Messina (mg/L de PAHs)	N.D	N.D	N.I	N.I
Aguas de Messina (mg/L de naftaleno)	N.D	N.D	N.I	N.I
Aguas de Messina (mg/L de BTEX)	N.D	N.D	N.I	N.I
Sedimentos de Messina (mg/L de PAHs)	N.D	N.D	N.I	N.I
Sedimentos de Messina (mg/L de naftaleno)	N.D	N.D	N.I	N.I
Sedimentos de Messina (mg/L de BTEX)	N.D	N.D	N.I	N.I
Aguas de Gela (mg/L de PAHs)	N.D	N.D	0,00117	N.D
Aguas de Gela (mg/L de naftaleno)	N.D	N.D	0,00088	N.D
Aguas de Gela (mg/L de BTEX)	N.D	N.D	0	N.D
Sedimentos de Gela (mg/L de PAHs)	N.D	N.D	0,00378	N.D
Sedimentos de Gela (mg/L de naftaleno)	N.D	N.D	0,00351	N.D
Sedimentos de Gela (mg/L de BTEX)	N.D	N.D	0	N.D

Anexo 5. Límites de detección de todos los biosensores con compuestos puros. Resultados expresados en mg/L. N.I significa no inducción (por debajo de 2 veces) y N.D. significa no determinado.

Compuesto puro/Biosensor	<i>A. borkumensis</i> SK2 (pKST-1)	<i>P. putida</i> KT2440 (pKST-1)	<i>P. putida</i> DOT-T1E (pKST-1)	<i>Burkholderia</i> sp. MS3 (pKSN-1)	<i>Novosphingobium</i> sp. HR1a (pKSPA-1)
Benceno	0,15	0,4	0,2	N.D.	N.D.
Tolueno	0,04	0,9	0,9	N.I.	N.I.
Etilbenceno	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.
<i>m</i> -Xileno	70	45	40	N.D.	N.D.
<i>p</i> -Xileno	1,5	25	5	N.D.	N.D.
<i>o</i> -Xileno	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.
Naftaleno	N.I.	N.I.	N.I.	31,6	5,2
2-Metilnaftaleno	N.D.	N.I.	N.D.	24,6	15
Salicilato	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2
Fenantreno	N.D.	N.I.	N.D.	N.I.	1,6

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta-González, A., Rosselló-Móra, R., Marqués, S.** (2013) Characterization of the anaerobic microbial community in oil-polluted subtidal sediments: aromatic biodegradation potential after the Prestige oil spill. *Environmental Microbiology* **15**(1): 77-92.
- Albaigés, J., Morales-Nin, B., Vilas, F.** (2006) The Prestige oil spill: A scientific response. *Marine Pollution Bulletin* **53** (5-7): 205-207.
- Alberici, R.M., Zampronio, C.G., Poppi, R.J., Eberlin, M.N.** (2002) Water solubilisation of ethanol and BTEX from gasoline: on-line monitoring by membrane introduction mass spectrometry. *Analyst* **127**: 230-234.
- Alegret, S., del Valle, M., Merkoçi, A.** (2004) Sensores electroquímicos: introducción a los quimiosensores y bisensores. Univ. Autónoma de Barcelona.
- Alonso-Alvarez, C., Pérez, C., Velando, A.** (2007) Effects of acute exposure to heavy fuel oil from the Prestige spill on a seabird. *Aquatic Toxicology* **84** (1): 103-110.
- Altamirano, et al.** (1986) IMP Bulletin, México.
- American Petroleum Institute** (1984) API Toxicological Review: Benzene. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Department of Health and Human Services.
- American Petroleum Institute** (2011) Crude Oil Category. Category assessment document. Petroleum HPV Testing Group.
- Andersen, J. B., Sternberg, C., Poulsen, L. K., Bjørn, Givskov, M., Molin, S.** (1998) New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria. *Applied Environmental Microbiology* **64** (6): 2240-2246.
- Annweiler, E., Richnow, H. H., Antranikian, G., Hebenbrock, S., Garms, C., Franke, S., et al.** (2000) Naphthalene degradation and incorporation of naphthalene-derived carbon into biomass by the thermophile *Bacillus thermoleovorans*. *Applied Environmental Microbiology* **66**:518-523.
- APPEA: Australian Petroleum Production and Exploration Association Ltd.** (2004) Oceans, oil spills.
- Arengi F.L.G., Pinti, M., Galli, E., Barbieri, P.** (1999) Identification of the *Pseudomonas stutzeri* OX1 toluene-O-xylene monooxygenase regulatory gene (*toxR*) and of its cognate promoter. *Applied Environmental Microbiology* **65**:4057-4063.
- Applegate, B.M., Kehrmeier, S.R., Sayler, G.S.** (1998) A chromosomally based *toxR*-*luxCDABE* whole-cell reporter for benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene (BTEX) sensing. *Applied Environmental Microbiology* **64** (7): 2730-2735.
- Atlas, R.M.** (1995) Petroleum Biodegradation and Oil Spill Bioremediation. *Marine Pollution Bulletin* **31**: 178-182.
- Baquero, F., Martínez, J.L., Cantón, R.** (2008) Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current opinions in biotechnology* **19**(3): 260-265.
- Barry, C.** (2007) Slick Death: Oil-spill treatment kills coral. *Science News* **17**: 67.

- Baumann, B., van der Meer, J.R.** (2007) Analysis of bioavailable arsenic in rice with whole cell living bioreporter bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**: 2115–2120.
- Baumann, P.R.** (2001) "Environmental Warfare: 1991 Persian Gulf War". State University of New York College at Oneonta. Retrieved 2009-10-28.
- Belkin, S.** (2003) Microbial whole-cell sensing systems of environmental pollutants. *Current opinion in microbiology* **6**(3): 206-212.
- Bertoni, G., Fujita, N., Ishihama, A., de Lorenzo, V.** (1998) Active recruitment of σ 54-RNA polymerase to the Pu promoter of *Pseudomonas putida*: role of IHF and α CTD. *EMBO Journal* **17**:5120-5128.
- Bertoni, G., Marqués, S., de Lorenzo, V.** (1998) Activation of the toluene- responsive regulator XylR causes a transcriptional switch between σ 54 and σ 70 promoters at the divergent Pr/Ps region of the TOL plasmid. *Molecular Microbiology* **27**:651-659.
- Besteman, K., Lee, J-O., Wiertz, F.G.M., Heering, H.A., Dekker, C.** (2003) Enzyme-coated carbon nanotubes as single-molecule biosensors. *Nano Letters* **3**(6): 727-730.
- Bethesda Research Laboratories.** (1986) BRL pUC host: *E. coli* DH5 α TM competent cells. *Bethesda Research Laboratory Focus*. **8**:9-12.
- Boldrin, B., Tiehm, A., Fritzsche, C.** (1993) Degradation of phenanthrene, fluorene, fluoranthene, and pyrene by a *Mycobacterium* sp. *Applied Environmental Microbiology* **59**(6): 1927-1930.
- Boll, M., Fuchs, G., Heider, J.** (2002) Anaerobic oxidation of aromatic compounds and hydrocarbons. *Current Opinion in Chemical Biology*. **6** (5): 604-611.
- Boonchan, S., Britz, M. L., Stanley, G. A.** (1998) Surfactant-enhanced biodegradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia*. *Biothechnology Bioengineering* **59**:482-494.
- Boonchan, S., Britz, M. L., Stanley, G. A.** (2000) Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures. *Applied and Environmental Microbiology* **66**(3): 1007-1019.
- Bosma, T.N.P., Middeldorp, P.J.M., Schraa, G., and Zehnder, A.J.B.** (1997) Mass transfer limitation of biotransformation: quantifying bioavailability. *Environmental Science&Technology* **31**: 248–252.
- Boyd, J. N., Kucklick, J. H., Scholz, D.K.S., Walker, A.H., Pond, R.G., Bostrom, A.** (2001) *Effects of oil and chemically dispersed oil in the environment*. Health and 51 Environmental Sciences Departement. Cape Charles: American Petroleum Institute. **63**: 2-14.
- British Petroleum,** (2010) Deepwater Horizon. Accident investigation report.
- British Petroleum.** (2010b) BP Confirms Successful Completion of Well Kill Operations in Gulf of Mexico.

- Bruschi, M., Barton, L.L., Goulhen, F., Plunkett, R.M.** (2006) Enzymatic and genomic studies on the reduction of mercury and selected metallic oxyanions by sulphate-reducing bacteria. *Sulphate-reducing bacteria: environmental and engineered systems*. **Chapter:** 460-482.
- Burlage, R.S., Hooper, S.W., Sayler, G.S.** (1989) The TOL (pWW0) Catabolic Plasmid. *Applied and Environmental Microbiology* **55** (6): 1323-1328.
- Busch, A., Lacal, J., Martos, A., Ramos, J.L., Krell, T.** (2007) Bacterial sensor kinase TodS interacts with agonistic and antagonistic signals. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* **104**(34): 13774-13779.
- Canadian Centre for Occupational Health and Safety** (2013) Health Effects of Toluene.
- Carmona, M., de Lorenzo, V., Bertoni, G.** (1999) Recruitment of RNA •• polymerase is a rate-limiting step for the activation of the σ_{54} promoter Pu of *Pseudomonas putida*. *Journal of Biological Chemistry* **274**:33790-33794.
- Chiti, G., Marrazza, M., Mascini, M.** (2001) Electrochemical DNA biosensor for environmental monitoring. *Analytica Chimica Acta* **427**(2): 155-164.
- Choi, K.H., Kumar, A., 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. *Journal of Microbiological Methods* **64**:391-397.
- Christiansen, J.A., Spraker, P.W.** (1982) Improving effluent quality_ of petrochemical wastewaters with mutant bacterial cultures. Proc. 37th Ind. Waste Conf., Purdue University. 567-576.
- Chugani, S.A., Parsek, M.R., Chakrabarty, A.M.** (1998) Transcriptional repression mediated by LysR-type regulator CatR bound at multiple binding sites. *Journal of Bacteriology* **180**:2367-2372.
- Cobet, A.B., Guard, H.E.** (1973) Effect of a bunker fuel on the beach bacterial flora. *International oil spill conference proceedings*. **1973**(1): 815-819.
- Coenye, T., Vandamme, P.** (2003) Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environmental microbiology* **5**(9): 719-729.
- Cohen, S., Chang, A.C.Y., Hsu, L.** (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proceeding of the National Academy of Science* **69**: 2110-2114.
- Collier, L.S., Gaines, G.L., Neidle, E.L.** (1998) Regulation of benzoate degradation in *Acinetobacter* sp. strain ADP1 by BenM, a LysR-type transcriptional activator. *Journal of Bacteriology* **180**:2493-2501.
- Contag, C.H., Jenkins, D., Contag, P.R., Negrin, S.R.** (2000) Use of reporter genes for optical measurements of neoplastic disease in vivo. *Neoplasia* **2**: 41-52.
- Dandie, C.E., Thomas, S.M., Bentham, R.H., 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. *Journal of Applied Microbiology*. **97**:246-255.

Dash, H.R., Manqwani, N., Chakraborty, J., Kumari, S., Das, S. (2013) Marine bacteria: potential candidates for enhanced bioremediation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **97**(2): 561-571.

Daunert, S., Barrett, G., Feliciano, J.S., Shetty, R.S., Shrestha, S., Smith-Spencer, W. (2000) Genetically engineered whole-cell sensing systems: Coupling biological recognition with reporter genes. *Chemistry Reviews* **100**(7): 2705-2738.

Di Gennaro, P., Rescalli, E., Galli, E., Sello, G., 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. *Research in Microbiology*. **152**: 641-651.

Díaz, E., Prieto, M. (2000) Bacterial promoters triggering biodegradation of aromatic pollutants. *Current Opinion in Biotechnology* **11**: 467-475.

Dimock, C.W., Lake, J.L., Norwood, C.B., Bowen, R.D., Hoffman, E.J., Kyle, B., Quinn, J.G. (1980) Field and laboratory methods for investigating a marine gasoline spill. *Environmental science technology* **14**(12): 1472-1475.

Duque, E., Molina-Henares, A.J., de la Torre, J., Molina-Henares, M.A., del Castillo, T., Lam, J., Ramos, J.L. (2007) Towards a genome-wide mutant library of *Pseudomonas putida* strain KT2440. *Pseudomonas Chapter*: 227-251.

Dyksterhouse, S.E., Gray, J.P., Herwig, R.P., Lara, J.C., Staley, J.T. (1995) *Cycloclasticus pugetii* gen. nov., sp. nov., an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium from marine sediments. *International Journal of Systems Bacteriology* **45**:116-123.

Dzyadevych, S.V., Mai Anh, T., Soldatkin, A.P., Jaffrezic-Renault, N., Chovelon, J.M. (2002) Development of enzyme biosensor based on pH-sensitive field-effect transistors for detection of phenolic compounds. *Bioelectrochemistry* **55**(1): 79-81.

European Environmental Agency (2006) Environmental statement.

Faksness, L.G., Brandvik, P.J. (2008) Distribution of water soluble components from Arctic marine oil spills- A combined laboratory and field study. *Cold Regions Science and Technology* **54** (2): 97-105.

Figueras, A. (2008) ¿Qué hacer ante un derrame de petróleo en el mar? *Blogs Madri+d*

Fountain, H. (2010) Advances in oil spill cleanup lag since Valdez. *New York Times*.

Franzetti, A., Caredda, P., Ruggeri, C., Colla, P.L., Tamburini, E., Papacchini, M., 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., Hicks, R.J., Li, S.W., Brockman, F. J. (1988) Plasmid incidence in bacteria from deep subsurface sediments. *Applied Environmental Microbiology* **54**: 2916-2923.

- Freire, R.S., Duran, N., Kubota, L.T.** (2002) Development of a laccase based flow-injection electrochemical biosensor for determination of phenolic compounds and its application for monitoring remediation of Kraft El paper mill effluent. *Analytica Chimica Acta* **463**: 229-238.
- Fujinami, S., Oikawa, Y., Araki, T., Shinmura, Y., Midorikawa, R., Ishizaka, H., Kato, C., Horikoshi, K., Ito, M., Tamegai, H.** (2014) Genome sequence of the deep-sea denitrifier *Pseudomonas* sp. Strain MT-1, isolated from the Mariana Trench. *Genome announcements* **2**(6): 1313-1314.
- Gauthier, M.J., Lafay, B., Christen, R., Fernandez, L., Acquaviva, M., Bonin, P., Bertrand, J.C.** (1992) *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen. nov., sp. nov., a new extremely halotolerant, hydrocarbondegrading marine bacterium. *International Journal of Systems Bacteriology* **42**:568-576.
- Gerardi, M.H.** (1982) Superbugs: Bacteria for wastewater treatment plants. *Public Works* **113** (12): 37-38.
- Gibson, D.T., Zylstra, G.H., Chauhan, S.** (1990) Biotransformations catalyzed by toluene dioxygenase from *Pseudomonas putida* F1. *Pseudomonas: biotransformations, pathogenesis and evolving biotechnology*. **Chapter**: 121-132.
- Gilewicz, M., Ni'matuzahroh, T., Nadalig, H., Budzinski, P., Doumenq, V., Michotey, J.C., Bertrand, J.C.** (1997) Isolation and characterization of a marine bacterium capable of utilizing 2-methylphenanthrene. *Applied Microbiology and Biotechnology* **48**:528-533.
- Goldman, J.C., Caron, D.A., Dennett, M.R.** (1987) Regulation of gross growth efficiency and ammonium regeneration in bacteria by substrate C:N ratio. *Limnology and Oceanography* **32** (6): 1239-1252.
- Golyshin, P.N., Chernikova, T.N., Abraham, W.R., Lünsdorf, H., Timmis, K.N., Yakimov, M.M.** (2002) *Oleiphilaceae* fam. nov., to include *Oleiphilus messinensis* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium that obligately utilizes hydrocarbons. *International Journal of Systematic Bacteriology* **52** (Pt 3): 901-911.
- Golyshin, P.N., Chernikova, T.N., Abraham, W.R., Lunsdorf, H., Granek, V., Rishpon, J.** (2002) Detecting endocrine-disrupting compounds by fast impedance measurements. *Environmental Science, Technology* **36**: 1574-1578.
- Greer, C.W., Wyglinski, J., Michel, C., Fortin, N., Sanschagrín, S., Niemi, A., Whyte, L.G., King, T.L., Lee, K., Yergeau, E.** (2014) Natural attenuation potential for oil in ice in the Canadian Arctic marine environment. *Conference: 37th Arctic and Marine Oil Spill Program*. Alberta, Canada.
- Gundlach, E. R., Boehm, P. D., Marchand, M., Atlas, R. M., Ward, D. M., Wolfe, D. A.** (1983) The fate of amoco cadiz oil. *Science* **8** (4606): 122-9.
- Hanahan, D.** (1983) Studies on the biotransformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*. **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.

- Harayama, S., Kasai, Y., Hara, A.** (2004) Microbial communities in oil-contaminated seawater *Current Opinion in Biotechnology* **15**: 205-214.
- Harms, H.** (2006) Biosensing of heavy metals. In: *Molecular Microbiology of Heavy Metals*. Eds Nies DH, Silver S. Springer Verlag Berlin Heidelberg, pp 143-157.
- Harms, H., Wells, M.C., van der Meer, J.R.** (2006) Whole-cell living biosensors - are they ready for environmental application? *Applied Microbiology and Biotechnology* **70**: 273-80.
- Hazen, T.C., Dubinsky, E.A., DeSantis, T.Z., Andersen, G.L., Piceno, Y.M., Singh, N., et al** (2010) Deep-sea oil plume enriches indigenous oil-degrading bacteria. *Science* **330**(6001):204-208.
- Hedlund, B.P., Geiselbrecht, A.D., Bair, T.J., Staley, J.T.** (1999) Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by a new marine bacterium, *Neptunomonas naphthovorans* gen. nov., sp. nov. *Applied Environmental Microbiology* **65**: 251-259.
- Heipieper, H.J., Weber, F.J., Sikkema, J., Keweloh, H., de Bont, J.A.M.** (1994) Mechanisms of resistance of whole cells to toxic organic solvents. *Trends in biotechnology* **12**(10): 409-415.
- Heitzer, A., Applegate, B., Kehrmeier, S., Pinkart, H., Webb, O.F., Phelps, T. J., et al.** (1998) Physiological considerations of environmental applications of *lux* reporter fusions. *Journal of Microbiological Methods* **33**: 45-57.
- Herbert, D.** (1976) Stoichiometric aspects of microbial growth. Continuous culture : 6 applications and new fields. Ellis Horwood. 1-30.
- Herranz, S., Marazuela, M.D., Moreno-Bondi, M.C.** (2012) Automated portable array biosensor for multisample microcystin analysis in freshwater samples. *Biosensors and Bioelectronics*. **33**:50-55.
- Hoff, R.Z.** (1993) Bioremediation: an overview of its development and use for oil spill cleanup. *Marine Pollution Bulletin* **29**: 476-481.
- Horvath, R.S.** (1972) Microbial co-metabolism and the degradation of organic compounds in nature. *Bacteriological Reviews* **36**: 146-155.
- Huff, J.** (2007) Benzene-induced cancers: abridged history and occupational health impact. *International Journal of Occupational and Environmental Health* **13** (2): 213-221.
- Hull, S.J., Kapuskinski R.B.** (1987) Efficacy of bioaugmentation products as predicted by a model of steady-state flocculent cultures. Proc. 42nd Ind. Waste Conf., Purdue University. 297-308.
- Hynninen, A., Tönismann, K., Virta, M.** (2012) Improving the sensitivity of bacterial bioreporters for heavy metals. *Bioengineered Bugs* **1** (2): 132-138.
- Inouye, S., A. Nakazawa, Nakazawa, T.** (1987) Expression of the regulatory gene *xylS* on the TOL plasmid is positively controlled by the *xylR* gene product. *Proceedings of National Academy of Science* **84**:5182-5186.

- ITOPF: The international tanker owner pollution federation limited.** (2013) Weathering process.
- Jernelöv, A.** (2010) The Threats from Oil Spills: Now, Then, and in the Future. *Ambio* **39** (5-6): 353-366.
- Jishage, M., Kvint, K., Shingler, V., Nystrom, T.** (2002) Regulation of σ factor competition by the alarmone ppGpp. *Genes&Development* **16**: 1260–1270.
- Johnsen, A.R., Wick, L.Y., Harms, H.** (2005) Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environ Pollut* **133**: 71–84.
- 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. *Journal of Bacteriology* **182**:2018-2025.
- Jun, Y., Qiliang, L., Tianlig, Z., Zongze, S.** (2008) Polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium *Novosphingobium* sp. H25 isolated from deep sea and its degrading genes. *Wei sheng wu xue bao* **48**(9): 1208-1213.
- Jurado, P., Fernandez, L.A., de Lorenzo, V.** (2003) σ^{54} levels and physiological control of the *Pseudomonas putida* Pu promoter. *Journal of Bacteriology* **185**: 3379–3383.
- Kalscheuer, R., Stöveken, T., Malkus, U., Reichelt, R., Golyshin, P.N., Sabirova, J.S., Ferrer, M., Timmis, K.N., Steinbüchel, A.** (2007) Analysis of storage lipid accumulation in *Alcanivorax borkumensis*: Evidence for alternative triacylglycerol biosynthesis routes in bacteria. *Journal of bacteriology* **189**(3): 918-928.
- Kasper, D.L., Braunwald, E., Hauser, E., Longo, D., Jameson, J.L., Fauci, A. S.** (2004) Harrison's Principles of Internal Medicine, 16th ed., McGraw-Hill Professional, p. 618, ISBN 0071402357.
- Kessler, B., de Lorenzo, V., Timmis, K.N.** (1993) Identification of a *cis*-acting sequence within the *Pm* promoter of the TOL plasmid which confers XylS-mediated responsiveness to substituted benzoates. *Journal of molecular biology* **230**(3): 699-703.
- Kim, T.J., Lee E.Y., Kim, Y.J., Cho, K.S., Ryu, H.W.** (2003) Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Burkholderia cepacia* 2A-12. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **19**:411-417.
- Kingston, P.F.** (2002) Long-term Environmental Impact of Oil Spills. *Spill Science Technology Bulletin*, **7** (1-2): 53-61.
- Keck, J., Sims, R.C., Coover, M., Park, K., Symons, B.** (1989) Evidence for cooxidation of polynuclear aromatic hydrocarbons in soil. *Water Research* **12**: 1467-1476.
- Konry, T., Novoa, A., Cosnier, S., Marks, R.S.** (2003) Development of an “Electroptode” Immunosensor: Indium Tin Oxide-Coated Optical Fiber Tips Conjugated with an Electropolymerized Thin Film with Conjugated Cholera Toxin B Subunit. *Analytical Chemistry* **75**: 2633-2639.

- Kooyman, S.** (2010) Ecological effects of acute oil spills. Norwegian University of life sciences. PhD thesis.
- Kumar, A.G., Vijayakumar, L., Joshi, G., Peter, D.M., Dharani, G., Kirubakaran, R.** (2014) Biodegradation of complex hydrocarbons in spent engine oil by novel bacteria consortium isolated from deep sea sediment. *Bioresource Technology* **170**: 556-564.
- Kuppardt, A.** (2010) Improvement of bioreporter bacteria-based test systems for the analysis of arsenic in drinking water and rhizosphere. Helmholtz. Centre for environmental research-UFZ.
- Kushwah, B.S., Upadhyaya, S.C., Shukla, S., Sikarwar, A.S., Sengar, R.M.S., Bhadauria, S.** (2011) Performance of nanopolyaniline-fungal enzyme based biosensor for water pollution. *Advanced materials letters* **2**(1): 43-51.
- Lacal, J., Busch, A., Guazzaroni, M-E., Krell, T., Ramos, J.L.** (2006) The TodS-TodT two-component regulatory system recognizes a wide range of effectors and works with DNA-bending proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103** (21): 8191-8196.
- Lau, P.C.K., Wang, Y., Patel, A., Labbé, D., Bergeron, H., Brousseau, Y., et al.** (1997) A bacterial basic region leucine zipper histidine kinase regulating toluene degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 1453-1458.
- Laurie, A.D., Lloyd-Jones, G.** (1999) The *phn* genes of *Burkholderia* strain RP007 constitute a divergent gene cluster for polycyclic aromatic hydrocarbon catabolism. *Journal of bacteriology* **181**(2): 531-540.
- Leff, L.G., Kernan, R.M., McArthur, J.V., Shimkets, L.J.** (1995) Identification of aquatic *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* by hybridization with species-specific rRNA gene probes. *Applied and environmental microbiology* **61**(4): 1634-1636.
- Leveau, J.H., Konig, F., Fuchslin, H., Werlen, C., Van Der Meer, J.R.** (1999) Dynamics of multigene expression during catabolic adaptation of *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4) to the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetate. *Molecular Microbiology* **33**:396-406.
- Lewis, C., Beggah, S., Pook, C., Guitart, C., Redshaw, C., van der Meer, J.R., et al.** (2009) Novel use of a whole cell *E. coli* bioreporter as a urinary exposure biomarker. *Environmental Science Technology* **43**: 423-428.
- Liao, V., Chien, M.T., Tseng, Y.Y., Ou, K.L.** (2006). Assessment of heavy metal bioavailability in contaminated sediments and soils using green fluorescent protein-based bacterial biosensors. *Environmental Pollution* **142**: 17-23.
- Lin, Y., Lu, F., Wang, J.** (2004) Disposable Carbon Nanotube Modified Screen-Printed Biosensor for Amperometric Detection of Organophosphorus Pesticides and Nerve Agents. *Electroanalysis* **16**: 145-149.
- Litchfield, C.D.** (1993) In situ biorremediation: basis and practices. In *Biotreatment of Industrial and Hazardous Waste*. MA Levin and MA Gealt (eds.) New York: McGraw-Hill, Inc., pp. 167-196.

- Liu, J., Lu, Y.** (2003) A colorimetric lead biosensor using DNAzyme-directed assembly of gold nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society* **125**(22): 6642-6643.
- Liu, J., Lu, Y.** (2004) Accelerated color change of gold nanoparticles assembled by DNAzymes for simple and fast colorimetric Pb²⁺ detection. *Journal of the American Chemical Society* **126**(39): 12298-305.
- Loockwood, A.P.M.** (1976) Effects of pollutants on aquatic organisms. *Society for experimental biology seminar series*.
- Lubchenco, J.** (2010) *Science summary Related to the DWH-MC-252 Oil Spill*. Science summit workshop: NOAA.
- Lubick, N.** (2010) Why oil from the Exxon Valdez lingers. *Nature* Published online 17th January 2010
- Mallat, E., Barceló, D., Barzen, C., Gauglitz, G., Abuknesha, R.** (2001) Immunosensors for pesticide detection in natural waters. *Trends in Analytical Chemistry* **20**(3): 124-132.
- Mallat, E., Barzen, C., Klotz, A., Brecht, A., Gauglitz, G., Barceló, D.** (1999) River analyzer for chlorotriazines with a direct optical immunosensor. *Environmental Science and Technology* **33**: 965-971.
- Marazuela, M., Moreno-Bondi, M.** (2002) Fiber-optic biosensors. An overview. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **372**(5-6): 664-682.
- Marqués, S., Gallegos, M.T., Manzanera, M., Holtel, A., Timmis, K.N., Ramos, J.L.** (1998) Activation and repression of transcription at the double tandem divergent promoters for the XylR and XylS genes of the TOL plasmid of *Pseudomonas putida*. *Journal of Bacteriology* **180**: 2889-2894.
- Marsch, J.L., Erfle, M., Wykes, E.J.** (1984) The pIC plasmid and phage vector with versatile cloning sites for recombinant selection by insertional inactivation. *Gene* **32**: 481-485.
- Maugeri, T.L., Gugliandolo, C., Caccamo, D., Stackebrandt, E.** (2002) Three novel halotolerant and thermophilic *Geobacillus* strains from shallow marine vents. *Systematic and Applied Microbiology* **25**: 450-455.
- McFall, S.M., Chugani, S.A., Chakrabarty, A.M.** (1998) Transcriptional activation of the catechol and chlorocatechol operons: variations on a theme. *Gene* **223**: 257-267.
- MEGDIS-MAR (Mediterranean Integrated Geographical Information System on Marine Pollution Risk Assessment and Response)** (2016)
- Meighen, E.A.** (1994) Genetics of bacterial bioluminescence. *Annual Reviews of Genetics* **28**: 117-139.
- Melcher, R.J., Apitz, S.E., Hemmingsen, B.B.** (2002) Impact of irradiation and polycyclic aromatic hydrocarbon spiking on microbial population in marine sediment for future aging and biodegradability studies. *Applied Environmental Microbiology* **68**: 2858-2868.
- Miller, J.** (1972) Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor. New York, USA.

- Miller, W.G., Lindow, S.E.** (1997) An improved GFP cloning cassette designed for prokaryotic transcriptional fusions. *Gene* **191**: 149-153.
- Misteli, T., Spector, D.L.** (1997) Application of the green fluorescent protein in cell biology and biotechnology. *Nature Biotechnology* **15**: 961-964.
- Mohammed, D., Ramsubhag, A., Beckles, D.M.** (2006) An assessment of the biodegradation of petroleum hydrocarbons in contaminated soil using non-indigenous, commercial microbes. *Water, air & soil pollution* **182**: 349-356.
- Molina, L., Ramos, C., Duque, E., Ronchel, M.C., García, J.M., Wyke, L., Ramos, J.L.** (2000) Survival of *Pseudomonas putida* KT2440 in soil and in the rizosphere of plants under greenhouse and environmental conditions. *Soil biology and biochemistry* **32**(3): 315-321.
- Mosqueda, G., Ramos-González, M.I., Ramos, J.L.** (1999) Toluene metabolism by the solvent-tolerant *Pseudomonas putida* DOT-T1 strain, and its role in solvent impermeabilization. *Gene* **232**(1): 69-76.
- Mu, Y., Jia, D., He, Y., Miao, Y., Wu, H.L.** (2011) Nano nickel oxide modified non-enzymatic glucose sensors with enhanced sensitivity through an electrochemical process strategy at high potential. *Biosensors and bioelectronics* **26**(6): 2948-2952.
- Mueller, J.G., Chapman, P.J., Blattmann, B.O., Pritchard, P.H.** (1990) Isolation and characterization of a fluoranthene-utilizing strain of *Pseudomonas paucimobilis* **56**(4): 1079-1086.
- Naether, D.J., Slawtschew, S., Stasik, S., Engel, M., Olzog, M., Wick, L.Y., Timmis, K.N., Heipieper, H.J.** (2013) Adaptation of the hydrocarbonoclastic bacterium *Alcanivorax borkumensis* SK2 to alkanes and toxic organic compounds: a physiological and transcriptomic approach. *Applied and environmental microbiology* **79**(14): 4282-4293.
- National Research Council.** *Oil in the Sea: Inputs, Fates, and Effects*; The National Academies Press: Washington, DC, 1985.
- Neff, J.M., Stubblefield, W.A.** (1995) Chemical And Toxicological Evaluation of Water Quality following the Exxon Valdez Oil Spill. In Wells, P. G., Butler, J. N. , Huges, J. S. (eds) *Exxon Valdez Oil Spill: Fate and Effects in Alaskan Waters*, pp. 141- 177. Philadelphia: American Society for Testing and Materials.
- Neff, J.M.** (1990). Composition and Fate of Petroleum and Spill Treating Agents in the Marine Environment. In: J.R. Geraci and D.J. St. Aubin (eds.), *Sea Mammals and Oil: Confronting the Risks*. Academic Press, New York, NY. pp. 1-33.
- Nishimura, A., Morita, M., Nishimura, Y., Sugino, Y.** (1990) A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucleic Acids Research* **18**: 6169.

- Nivens, D.E., McKnight, T.E., Moser, S.A., Osbourn, S.J., Simpson, M.L., Sayler, G.S.** (2004) Bioluminescent bioreporter integrated circuits: potentially small, rugged and inexpensive whole-cell biosensors for remote environmental monitoring. *Journal of Applied Microbiology* **96**(1): 33-46.
- Nyer, E.K., Bourgeois, H.J.** (1980) Operational troubleshooting in industrial biological treatment systems. Proc. 35th Ind. Waste Conf., Purdue University. 849-854.
- Nyugen, B.H., Denner, E.B.M., Dang, T.C.H., Wanner, G., Stan-Lotter, H.** (1999) *Marinobacter aquaeolei* sp. Nov., a halophilic bacterium isolated from a Vietnamese oil-producing well. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**: 367-375.
- O'Neill, E., Ng, L.C., Sze, C.C., Shingler, V.** (1998) Aromatic ligand binding and intramolecular signalling of the phenol-responsive σ^{54} -dependent regulator DmpR. *Molecular Microbiology* **28**:131-141.
- O'Neill, E., Sze, C.C., Shingler, V.** (1999) Novel effector control through modulation of a preexisting binding site of the aromatic- responsive σ^{54} -dependent regulator DmpR. *Journal of Biological Chemistry* **274**:32425-32432.
- Ocean Studies Board and Marine Board** (2003). Oil in the Sea III: Inputs, Fates, and Effects; The National Academies Press: Washington, DC.
- Office of Response and Restoration. National Oceanic and Atmospheric Administration.** (2007) Emergency response: responding to oil spills.
- Ogawa, N., Mcfall, S.M., Klem, T.J., Miyashita, K., Chakrabarty, A.M.** (1999) Transcriptional activation of the chlorocatechol degradative genes of *Ralstonia eutropha* NH9. *Journal of Bacteriology* **181**:6697-6705.
- Ordinioha, B., Brisibe, S.** (2013) The human health implications of crude oil spills in the Niger delta, Nigeria: An interpretation of published studies. *Nigerian medical journal* **54**(1): 10-16.
- Palecek, E.** (2002) Past, present and future of nucleic acids electrochemistry. *Talanta* **56** (5): 809-19.
- Park, K.S., Sims, R.C., Dupont, R.R., Doucette, W.J., Matthews, J.E.** (1990). Fate of PAH compounds in two soil types: Influence of volatilization, abiotic loss, and biological activity. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **9**:187-195.
- Paul, E.A., Clark, F.G.** (1989) Soil Microbiology and Biochemistry. San Diego: Academic Press.
- Pérez, C., Lores, M., Velando, A.** (2010) Oil pollution increases plasma antioxidants but reduces coloration in a seabird. *Oecologia*, **163** (4): 875-884.
- Peterson, C.H., Rice, S.D., Short, J.W., Esler, D., Bodkin, J.L., Ballachey, B.E., Irons, D.B.** (2003) Long-Term Ecosystem Response to the Exxon Valdez Oil Spill. *Science* **302** (5653): 2082-2086.

- Pezeshki, S.R., Hester, M.W., Lin, Q., Nyman, J.A.** (2000) The effects of oil spill clean-up on dominant US Gulf coast marsh macrophytes: a review. *Environmental Pollution* **108**: 129-139.
- Phoenix, P., Keane, A., Patel, A., Bergeron, H., Ghoshal, S., Lau, P.C.** (2003) Characterization of a new solvent-responsive gene locus in *Pseudomonas putida* F1 and its functionalization as a versatile biosensor. *Environmental Microbiology* **5**(12): 1309-1327.
- Pillon, A., Servant, N., Vignon, F., Balaguer, P., Nicolas, J.C.** (2005) Estrogenic activity of cosmetic components in reporter cell lines: parabens, UV screens, and musks. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. **68** (4): 239-251.
- Ramos, C., Molina, L., Mølbak, L., Ramos, J.L.** (2000) A bioluminescent derivative of *Pseudomonas putida* KT2440 for deliberate release into the environment. *FEMS Microbiology Ecology* **34** (2): 91-102.
- Ramos, J.L., N. Mermod, Timmis, K.N.** (1987) Regulatory circuits controlling transcription of TOL plasmid operon encoding meta-cleavage pathway for degradation of alkylbenzoates by *Pseudomonas*. *Molecular Microbiology* **1**:293-300.
- Ramos, J.L., Duque, E., Godoy, P., Segura, A.** (1998) Efflux pumps involved in toluene tolerance in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *Journal of Bacteriology* **180** (13): 3323-3329.
- Ramos-Díaz, M.A., Ramos, J.L.** (1998) Combined physical and genetic map of the *Pseudomonas putida* KT2440 chromosome. *Journal of Bacteriology* **180** (23): 6352-6353.
- Rice, J.F., Fowler, A.A., Arrage, D.C., White, D.C., Sayler, G.S.** (1995) Effects of external stimuli on environmental bacterial strains harbouring an *algD-lux* bioluminescent reporter plasmid for the study of corrosive biofilms. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **15**: 318-328.
- Ripp, S.A., Sayler, G.S.** (2005) Environmental assessment: bioreporter systems. *Molecular microbial ecology*. **Chapter**: 289-313.
- Rodríguez-Conde, S.** (2011) Potencial de las bacterias del suelo en la biorremediación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs)". Estación Experimental del Zaidín. Tesis doctoral.
- Rodríguez-Herva, J.J., García, V., Hurtado, A., Segura, A., Ramos, J.L.** (2007) The *ttgGHI* solvent flux pump operon of *Pseudomonas putida* DOT-T1E is located on a large self-transmissible plasmid. *Environmental microbiology* **9**(6): 1550-1561.
- Rodríguez-Mozaz, S., López de Alda, M.J., Marco, M.P., Barceló, D.** (2005) Biosensors for environmental monitoring: A global perspective. *Talanta* **65**: 291-297.
- Rodríguez-Trigo, G., Zock, J.P., Isidro Montes, I.** (2007) Health Effects of Exposure to Oil Spills. *Archivos de bronconeumología* **43** (11): 628-635.
- Rogers, K.R.** (2006) Recent advances in biosensor techniques for environmental monitoring. *Analytica Chimica Acta* **568**: 222-231.

- Rojas, A., Duque, E., Mosqueda, G., Golden, G., Hurtado, A., Ramos, J.L., Segura, A.** (2001) Three efflux pump are required to provide efficient tolerance to toluene in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *Journal of Bacteriology* **183** (13): 3967-3973.
- Romine, M.F., Stillwell, L.C., Wong, K.K., Thurston, S.J., Sisk, E.C., Sensen, C., Gaasterland, T., Fredrickson, J.K., Saffer, J.D.** (1999) Complete sequence of a 184-kilobase catabolic plasmid from *Sphingomonas aromaticivorans* F199. *Journal of Bacteriology* **181**: 1585-1602.
- Röling, W.F.M., Milner, M.G., Jones, D.M., Lee, K., Daniel, F., Swannell, R.J.P., Head, I.M.** (2002) Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology* **68**(11): 5537-5548.
- Rowe-Taitt, C.A., Hazzard, J.W., Hoffman, K.E., Cras, J.J., Golden, J.P., Liegler, F.S.** (2000) Simultaneous detection of six biohazardous agents using a planar waveguide array biosensor. *Biosensors and Bioelectronics* **10**: 579-589.
- Rozmarynowycz, M.J.** (2009) Design and characterization of cyanobacterial bioreporters to measure phosphorus availability in marine systems. College of Bowling Green State University. Tesis doctoral.
- Rusling, J.F.** (2004) Sensors for toxicity of chemicals and oxidative stress based on electrochemical catalytic DNA oxidation. *Biosensors and bioelectronics* **20**(5): 1022-1028.
- Sabirova, J.S., Ferrer, M., Lünsdorf, H., Wray, V., Kalscheuer, R., Steinbüchel, A., et al.** (2006) Mutation in a “tesB-Like” Hydroxyacyl-Coenzyme A-Specific Thioesterase Gene Causes Hyperproduction of Extracellular Polyhydroxyalkanoates by *Alcanivorax borkumensis* SK2. *Journal of Bacteriology* **188** (23): 8452-8459.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F, 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., et al.** (2008) Anthracene biodegradation and surface activity by an iron-stimulated *Pseudomonas* sp. *Bioresource Technology*. **99**:2644-2649.
- Schimdhauser, T.J., Helinski, D.R.** (1985) Regions of broad-host-range plasmid RK2 involved in replication and stable maintenance in nine species of gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology* **164**: 446-455.
- Segura, A., Rojas, A., Hurtado, A., Huertas, M.J., Ramos, J.L.** (2003) Comparative genomic analysis of solvent extrusion pumps in *Pseudomonas* strains exhibiting different degrees of solvent tolerance. *Extremophiles* **7** (5): 371-376.
- Seifert, M., Haindl, S., Hock, B.** (1999) Development of an enzyme linked receptor assay (ELRA) for estrogens and xenoestrogens. *Analytica Chimica Acta* **386** (3): 191-199.
- Selifonova, O.V., Eaton, R.W.** (1996) Use of an ipb-lux fusion to study regulation of the isopropylbenzene catabolism operon of *Pseudomonas putida* RE204 and to detect hydrophobic pollutants in the environment. *Applied Environmental Microbiology* **62**: 778-783.

- Seiple, K.T., Morriss, A.W.J., Paton, G.I.** (2003) Bioavailability of hydrophobic organic contaminants in soils: fundamental concepts and techniques for analysis. *Eur J Soil Sci* **54**: 809–818.
- Sepic, E., Bricelj, M., Leskovsek, H.** (1998) Degradation of fluoranthene by *Pasteurella* sp. IFA and *Mycobacterium* sp. PYR-1: Isolation and identification of metabolites. *Journal of Applied Microbiology* **85**:746-754.
- Sevilla, E., Yuste, L., Rojo, F.** (2015) Marine hydrocarbonoclastic bacteria as whole-cell biosensors for *n*-alkanes. *Microbial biotechnology* **8**(4): 693-706.
- Shaner, Nathan C., Campbell, R.E., Steinbach, P.A., Giepmans, B.N.G., Palmer, A. E; Tsien, R.Y.** (2004) Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. Red fluorescent protein. *Nature Biotechnology* **22** (12): 1567–72.
- Shetty, R.S., Ramanathan, S., Badr, I.H., Wolford, J.L., Daunert, S.** (1999) Green fluorescent protein in the design of a living biosensing system for l-arabinose. *Analytical Chemistry* **71**: 763–768.
- Shingler, V.** (1996) Signal sensing by σ^{54} -dependent regulators: derepression as a control mechanism. *Molecular Microbiology*.19:409-416.
- Shingler, V., Moore, T.** (1994) Sensing of aromatic compounds by the DmpR transcriptional activator of phenol-catabolizing *Pseudomonas* sp. strain CF600. *Journal of Bacteriology* **176**: 1555–1560.
- Shingler, V.** (2003) Integrated regulation in response to aromatic compounds: from signal sensing to attractive behaviour. *Environmental Microbiology* **5**: 1226–1241.
- Siegfried, K., Endes, C., Bhuiyan, A.F., Kuppardt, A., Mattusch, J., Van der Meer, J. R., et al.** (2012) Field testing of arsenic in groundwater samples in Bangladesh using a test kit based on a lyophilized bioreporter bacteria. *Environmental Science Technology* **46** (6): 3281-3287.
- Sierra-García, I.N., Correa, J., Pantaroto, S., Pereira, A., Vaz dos Santos, E., Maia, V.** (2014) New hydrocarbon degradation pathways in the microbial metagenome from Brazilian petroleum reservoirs. *PLOS ONE* **9** (2): 1-13.
- Silva, R.C.F.S., Almeida, D.G., Rufino, R.D., Luna, J.M., Santos, V.A., Sarubbo, L.A.** (2014) Applications of biosurfactants in the petroleum industry and the remediation of oil spills. *International Journal of Molecular Sciences* **15**(7): 523-542.
- Silva-Jiménez, H., García-Fontana, C., Cadirci, B.H., Ramos-González, M.I., Ramos, J.K., Krell, T.** (2012) Study of the TmoS/TmoT two-component system: towards the functional characterization of the family of TodS/TodT like systems. *Microbial biotechnology* **5**(4): 489-500.
- Silva-Rocha, R., Martínez-García, E., Calles, B., Chavarría, M., Arce-Rodríguez, A., de Las Heras, A., et al.** (2013) The Standard European Vector Architecture (SEVA): a coherent platform for the analysis and deployment of complex prokaryotic phenotypes. *Nucleic Acids Research* **41** (D1): 666-675.

- Smet, M.J., Kingma, J., Witholt, B.** (1978) The effect of toluene on the structure and permeability of the outer and cytoplasmic membranes of *Escherichia coli* **506** (1): 64-80.
- Sobrinho, H.B., Luna, J.M., Rufino, R.D., Porto, A.L.F., Sarubbo, L.A.** (2013) Biosurfactants: Classification, properties and environmental applications. Recent developments in biotechnology. 1st ed volume 11. Studium Press LLC; Houston, USA.
- Spaink, H.P., Okker, P.J., Wijffelman, C.A., Pees, E. and Lugtenberg, B.J.** (1987) Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1JI. *Plant Molecular Biology* **9**: 27-39.
- Spaink, H.P., Okker, R.J., Wiifferlman, C.A., Pees, E., Lugtenberg, B.J.** (1987) Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1JI. *Plant Molecular Biology* **9** (1): 27-39.
- Speight, J.G.** (1991) The Chemistry and Technology of Petroleum, Marcel Dekker, New York.
- Spooner, R.A., Lindsay, K., Franklin, F.C.H.** (1986) Genetic, functional and sequence analysis of the *xylR* and *xylS* regulatory genes of the TOL plasmid pWW0. *Journal of general microbiology* **132**: 1341-1358.
- Stephenson, D., Stephenson, T.** (1992) Bioaugmentation for enhancing biological wastewater treatment. *Biotechnology Advances* **10** (549-559).
- Sticher, P., Jaspers, M.C., Stemmler, K., Harms, H., Zehnder, A.J., van der Meer, J.R.** (1997) Development and characterization of a whole-cell bioluminescent sensor for bioavailable middle-chain alkanes in contaminated groundwater samples. *Applied Environmental Microbiology* **63**: 4053-4060.
- Swannell, R.P.J., Lee, K., McDonagh, M.** (1996). Field Evaluations of Marine Oil Spill Bioremediation. *Microbiological Reviews* **60**: 342-365.
- Tauriainen, S., Karp, M., Chang, W., Virta, M.** (1998) Luminescent bacterial sensor for cadmium and lead. *Biosensors Bioelectronics* **13**: 931-938.
- Tecon, R., Beggah, S., Czechowska, K., Sentchilo, V., Chronopoulou, P.M., McGenity, T.J., et al.** (2010) Development of a multistrain bacterial bioreporter platform for the monitoring of hydrocarbon contaminants in marine environments. *Environmental Science Technology* **44**: 1049-1055.
- Tecon, R., Binggeli, O., Van der Meer, J.R.** (2009) Double-tagged fluorescent bacterial bioreporter for the study of polycyclic aromatic hydrocarbon diffusion and bioavailability. *Environmental Microbiology* **11**(9): 2271-2283.
- Tecon, R., Wells, M., Van der Meer, J.R.** (2006) A new green fluorescent protein-based bacterial biosensor for analysing phenanthrene fluxes. *Environmental Microbiology* **8**(4): 697-708.
- Thibault, G.T., Tracy, K.D.** (1979) Demonstration of a mutant bacterial additive for enhancement of operational stability in oxygen activated sludge. Proc. 34th Ind. Waste Conf. Purdue University. 235-243.

- Tinikul, R., Thotsaporn, K., Thaveekarn, W., Jitrapakdee, S., Chaiyen, P.** (2012) The fusion *Vibrio campbellii* luciferase as a eukaryotic gene reporter. *Journal of Biotechnology* **161**(2-3): 346-353.
- Tover, A., Zernant, J., Chugani, S.A., Chakrabarty, A.M., Kivisaar, M.** (2000) Critical nucleotides in the interaction of CatR with the pheBA promoter: conservation of the CatR-mediated regulation mechanisms between the pheBA and catBCA operons. *Microbiology* **146**:173-183.
- Trojanowicz, M.** (2002) Determination of pesticides using electrochemical enzymatic biosensors. *Electroanalysis* **14**(19): 1311-1328.
- Trögl, J., Kubicová, L., Parik, P., Hálová, J., Demnerová, K., Ripp, S., Saylor, G.S.** (2007) Response of the bioluminescent bioreporter *Pseudomonas fluorescens* HK44 to analogs of naphthalene and salicylic acid. *Folia microbiologica* **52**(1): 3-14.
- Tsien, R.Y.** (1998) The green fluorescent protein. *Annual Review of Biochemistry* **67**: 509–544.
- Tsutsumi, H., Kono, M., Takai, K., Manabe, T., Haraguchi, M., Yamamoto, I., et al.** (2000) Bioremediation on the shore after an oil spill from the *Nakhodka* in the sea of Japan. III. Field tests of a bioremediation agent with microbiological cultures for the treatment of an oil spill. *Marine pollution bulletin* **40**(4): 320-324.
- Turner, K., Xu, S., Pasini, P., Deo, S., Bachas, L., Daunert, S.** (2007) Hydroxylated polychlorinated biphenyl detection based on a genetically engineered bioluminescent whole-cell sensing system. *Analytical chemistry* **79**: 5740–5745.
- U.S Coast Guard** (2011) On Scene Coordinator Report on Deepwater Horizon Oil Spill (Report).
- U.S. Occupational Safety. Health Administration. Phenanthrene** (OSHA IMIS CN 85-01-08)
- Urban, A., Eckermann, S., Fast, B., Metzger, S., Gehling, M., Ziegelbauer, K., et al.** (2007) Novel whole-cell antibiotic biosensors for compound discovery. *Applied Environmental Microbiology* **73**: 6436–6443.
- Valentine, R.C.** (1964) Bacterial ferredoxin. *Bacteriology Reviews* **28**(4): 497-517.
- Valls, M., Buckle, M., de Lorenzo, V.** (2002) In vivo UV laser footprinting of the *Pseudomonas putida* σ^{54} *Pu* promoter reveals that integration host factor couples transcriptional activity to growth phase. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 2169–2175.
- Van der Meer, J.R., Belkin, S.** (2010) Where microbiology meets microengineering: design and applications of reporter bacteria. *Applied and Industrial Microbiology* **8**: 511-522.
- Van der Meer, J.R., Tropel, D., Jaspers, M.** (2004) Illuminating the detection chain of bacterial bioreporters. *Environmental microbiology* **6**(10): 1005-1020.
- Verschuere, K.** (2001) Handbook of environmental data on organic chemicals. Volumes 1-2. 4th ed. Jhon Wiley&Sons. New York.

- Vogel, S.K., Schulz, A., Rippe, K. (2002) Binding affinity of Escherichia coli RNA polymerase σ^{54} holoenzyme for the glnAp2, nifH and nifL promoters. *Nucleic Acids Research* **30**: 4094–4101.
- Walter, U., Beyer, M., Klein, J., Rehm, H.J. (1991) Degradation of pyrene by *Rhodococcus* sp. UW1. *Applied Microbiology Biotechnology* **34**: 671–676.
- Wang, Z., Fingas, M.F. (2003) Development of oil hydrocarbon fingerprinting and identification techniques. *Marine Pollution Bulletin* **47** (9-12): 423–452.
- Weissenfels, W.D., Beyer, M., Klein, J. (1990) Degradation of phenanthrene, fluorene, and fluoranthene by pure bacteria cultures. *Applied Microbiology Biotechnology* **32**: 479–484.
- Werlen, C., Jaspers, M.C.M., van der Meer, J.R. (2004) Measurement of biologically available naphthalene in gas and aqueous phases by use of a *Pseudomonas putida* biosensor. *Applied and environmental microbiology* **70**(1): 43–51.
- West, J.E., O'Neill, S.M., Ylitalo, G.M., Incardona, J.P., Doty, D.C., Dutch, M.E. (2014) An evaluation of background levels and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in naturally spawned embryos of Pacific herring (*Clupea pallasii*) from Puget Sound, Washington, USA **499**: 114–124.
- Wider, E.A. (2010) Bioluminescence in the ocean: origins of biological, chemical and ecological diversity. *Science* **328**: 704–708.
- Wick, L.Y., Colangelo, T., Harms, H. (2001) Kinetics of mass transfer limited bacterial growth on solid PAHs. *Environmental Science Technology* **35**: 354–361.
- Williardson, B.M., Wilkins, J.F., Rand, T.A., Schupp, J.M., Hill, K.K., Keim, P., Jackson, P. (1998) Development and testing of a bacterial biosensor for toluene-based environmental contaminants. *Applied and Environmental Microbiology* **64** (3): 1006–1012.
- Wood, K.V., Gruber, M.G. (1996) Transduction in microbial biosensors using multiplexed bioluminescence. *Biosensors and Bioelectronics* **11**: 207–214.
- Yakimov, M.M., Giuliano, L., Denaro, R., Crisafi, E., Chernikova, T.N., Abraham, *et al.* (2004). *Thalassolitus oleivorans* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium that obligately utilizes hydrocarbons. *International Journal of Systematic Bacteriology and Evolutionary Microbiology* **54**: 141–148.
- Yakimov, M.M., Giuliano, L., Gentile, G., Crisafi, E., Chernikova, T.N., Abraham, *et al.* (2003) *Oleispira antartica* gen. nov., sp. nov., a novel hydrocarbonoclastic marine bacterium isolated from Antarctic coastal sea water. *International Journal of Systematic Bacteriology* **53**: 779–785.
- Yakimov, M.M., Golyshin, P.N., Lang, S., Moore, E.R.B., Abraham, W.R., Lünsdorf, H., Timmis, K. N. (1998) *Alcalinovorax borkumensis* gen. nov., sp. nov., a new, hydrocarbon-degrading and surfactant-producing marine bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**: 339–348.

- Yakimov, M.M., Timmis, K.N., Golyshin P.N.** (2007) Obligate oil-degrading marine bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* **18**(3): 257-266.
- Zeinali, M., Vossoughi, M., Ardestani, S.K.** (2008). Naphthalene metabolism in *Nocardia otitidiscaviarum* strain TSH1, a moderately thermophilic microorganism. *Chemosphere* **72**:905-909.
- Zhang, G.Y., Ling, J.Y., Sun, H.B., Luo, J., Fan, Y.Y., Cui, Z.J.** (2009) Isolation and characterization of newly isolated polycyclic aromatic hydrocarbons-degrading *Janibacter anophelis* strain JY11. *Journal of Hazardous Materials* **172**:580-586.
- Zhang, D., He, Y., Wang, Y., Wang, H., Wu, L., Aries, E., Huang, W.E.** (2012) Whole-cell bacterial bioreporter for actively searching and sensing of alkanes and oil spills. *Microbial biotechnology* **5**(1): 87-97.
- Zhuang, W.Q., Tay, J.H., Maszenan, A.M., Tay, S.T.** (2003) Isolation of naphthalene-degrading bacteria from tropical marine sediments. *Water Science Technology* **47**:303-308.
- Zitredes, T.G.** (1977) Using customized 'bugs' for biological waste treatment. *Plant Engineering*. 117-119.
- Zylstra, G.B., McCombie, W.R., Gibson, D.T., Finette, B.A.** (1988) Toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1: genetic organization of the *tod* operon. *Applied and Environmental Microbiology*. **54** (6): 1498-1503.