



Biblioteca Universitaria de Granada



01533795



Prov. 9. 14/57 T  
15  
11

FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE GRANADA  
(Sección Biológicas)

TESIS DOCTORAL

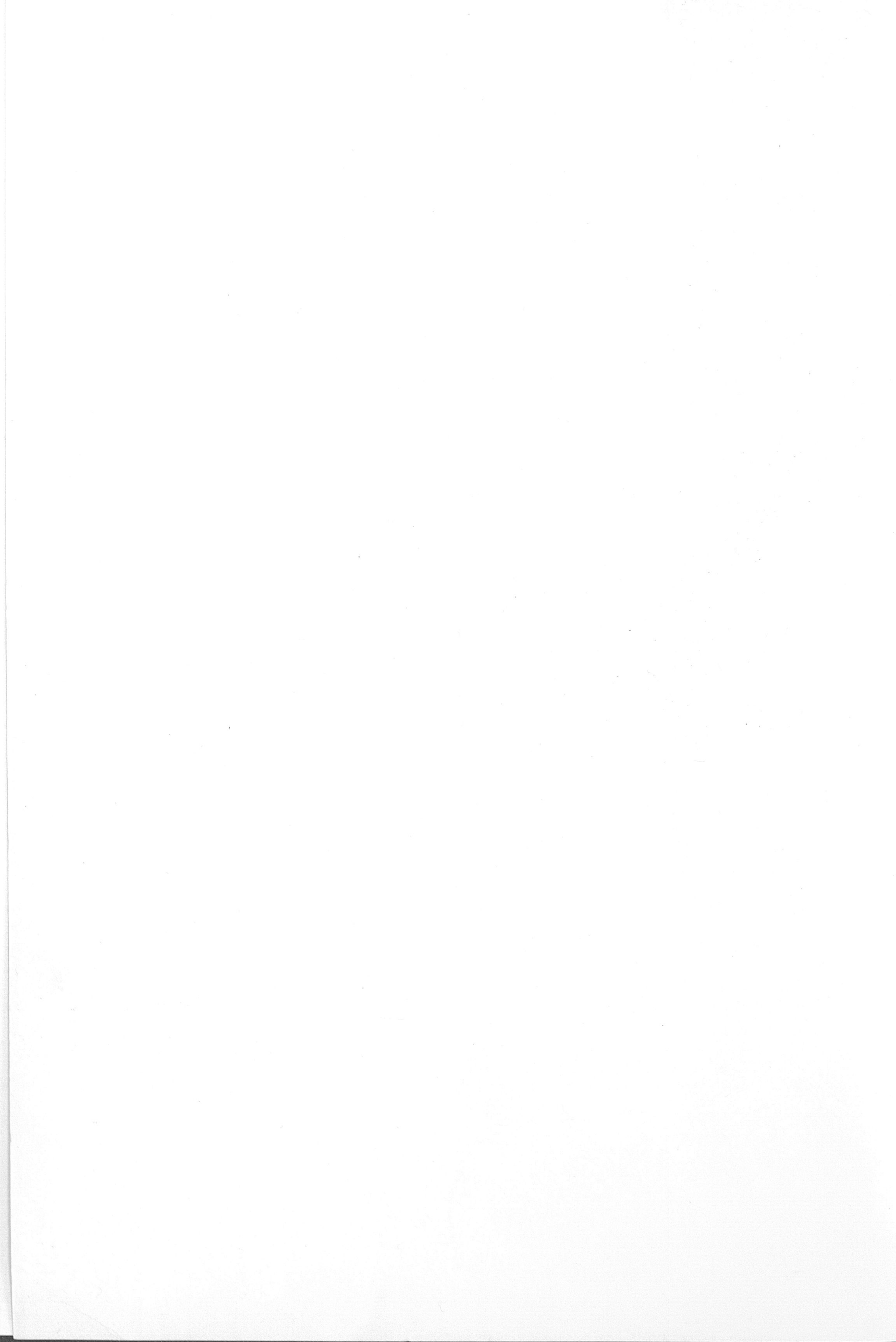
Comportamiento en microcosmos  
agrícolas de microorganismos  
manipulados genéticamente

por

Estrella Duque Martin de Oliva

1994

BIBLIOTECA	UNIVERSITARIA
GRANADA	
Nº Documento	519665544
Nº Copia	21215959



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE GRANADA  
(Sección Biológicas)

TESIS DOCTORAL

Comportamiento en microcosmos  
agrícolas de microorganismos  
manipulados genéticamente

por

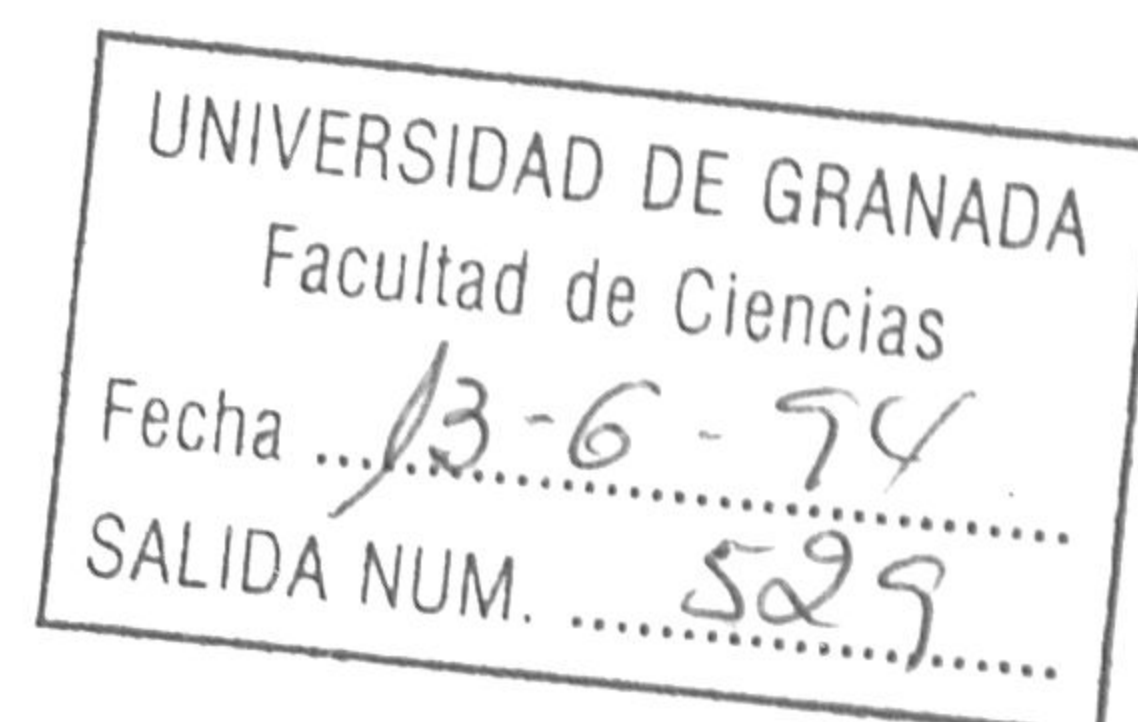
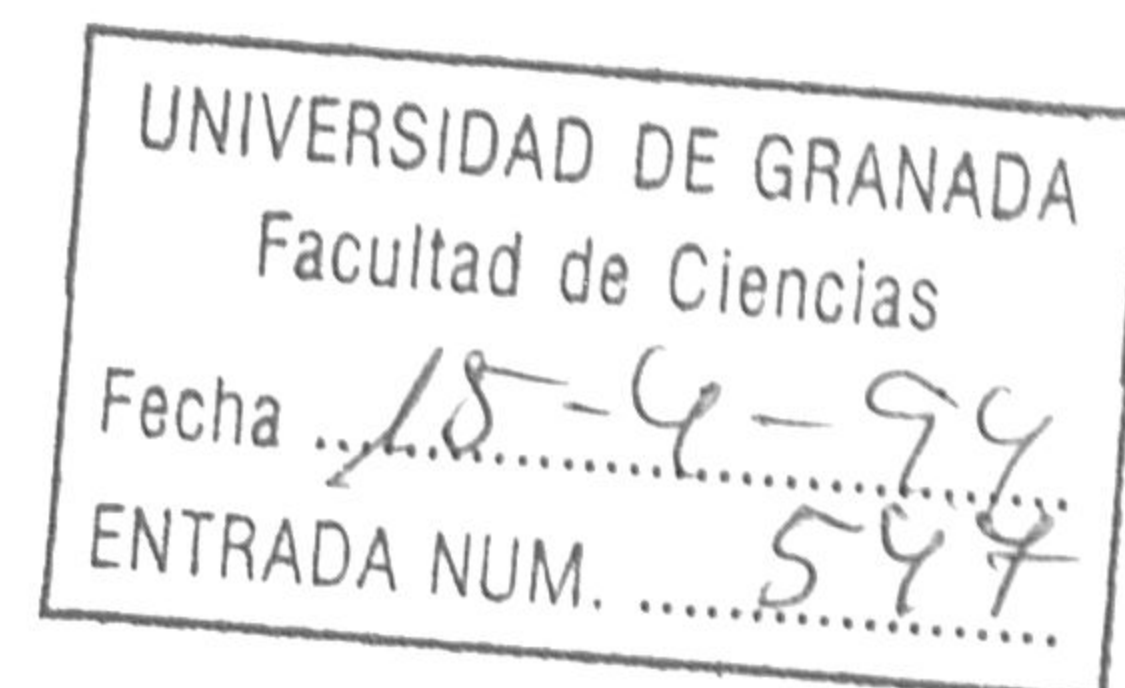
Estrella Duque Martín de Oliva

1994



Comportamiento en microcosmos  
agrícolas de microorganismos  
manipulados genéticamente

Memoria que presenta la licenciada en Biología  
Dña. Estrella Duque Martin de Oliva,  
para aspirar al grado de doctor.



Fdo.: Estrella Duque Martin de Oliva

V° B°  
El director

Fdo.: Juan Luis Ramos Martin.  
Doctor en Biología  
Investigador Científico del C.S.I.C.





Esta tesis doctoral ha sido  
realizada en la U. E. de  
Bioquímica y Biología Molecular  
y Celular de Plantas de la Estación  
Experimental del Zaidín (CSIC) de  
Granada.



A Juan Luis, los niños y a mi madre, que se merecen mucho más que la dedicación de esta tesis.



Al finalizar esta Tesis Doctoral, deseo expresar mi agradecimiento a aquellas personas e instituciones que han contribuido a su realización.

A la Comunidad Económica Europea que a través del programa BAP permitió mi reincorporación en el laboratorio y a Unión Española de Explosivos que a través de su continuo apoyo al grupo de Degradación de Tóxicos Orgánicos de la Estación Experimental del Zaidin permitió mi continuidad en el laboratorio.

Al Dr. Juan Luis Ramos, director de esta Tesis por su dedicación y ayuda a lo largo del período de Tesis y por conjugar los distintos apartados de la misma.

A mis compañeros del grupo por su inestimable ayuda todos los días, en especial a Maribel Ramos González, con quien compartí mi reincorporación y los estudios de suelos y transferencia de genes. A Paqui Godoy y Alí Haïdour por su ayuda con los análisis químicos y por compartir el proyecto del TNT. A María Angustias Reyes que con su cuidado antes y los cafés y amistad de ahora cuidó de muchas cosas que hicieron más agradable el trabajo de cada día. A Lola Fandila y Mati Gil con quienes he compartido un "invernadero" muy especial. A May Fandila que me introdujo en el procesado de texto y a Manolo Martínez que con su sonrisa y esmerada dedicación dibujó muchas de las Figuras. A mis entrañables amigos Javier Romero y Tere García quienes con su cariño y empeño hicieron posible la escritura de esta tesis, y finalmenta a M<sup>a</sup> Teresa Gonzalez por ejercer tan agradablemente la tutoría.



I N D I C E





	Página
A. INTRODUCCION.....	1
B. MATERIALES Y METODOS.....	30
B. ESTIRPES BACTERIANAS .....	31
B.2 CONSERVACION DE ESTIRPES BACTERIANAS .....	31
B.3 MEDIOS DE CULTIVO .....	31
B.4 ANTIBIOTICOS .....	35
B.5 AISLAMIENTO DE MUTANTES ESPONTANEOS RESISTENTES A ANTIBIOTICOS .....	35
B.6 SOLUCIONES FRECUENTEMENTE UTILIZADAS EN ESTE TRABAJO .....	36
B.7 EXPERIMENTOS EN SUELOS .....	38
B.7.1 SUELOS UTILIZADOS EN ESTE ESTUDIO .....	38
B.7.2 ESTIMACION DE CELULAS VIABLES EN SUELOS .....	42
B.8 ENRIQUECIMIENTO AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE BACTERIAS INDIGENAS DEL SUELO .....	42
B.8.1 ENRIQUECIMIENTO Y AISLAMIENTO DE BACTERIAS .....	42
B.8.2 CARACTERIZACION DE BACTERIAS AISLADAS .....	43
B.9 PLASMIDOS UTILIZADOS EN ESTE ESTUDIO .....	43
B.9.1 CARACTERISTICAS DE LOS PLASMIDOS .....	43
B.9.1.1 PLASMIDOS TOL .....	43
B.9.1.2 PLASMIDO SUICIDA DONADOR DE Tn5 .....	44
B.9.2 TRANSFERENCIA DE PLASMIDOS EN MEDIO SOLIDO .....	45
B.9.3 TRANSFERENCIA DE PLASMIDOS EN SUELOS .....	45

B.10 PREPARACION,SEPARACION ELECTROFORETICA Y VISUALIZACION DE PLASMIDOS TOL .....	46
B.11 ENSAYO ENZIMATICO DE LA ACTIVIDAD NITRITO REDUCTASA .....	47
B.12 METODOS ANALITICOS .....	48
B.12.1 AISLAMIENTO DE METABOLITOS .....	48
B.12.2 ANALISIS DE METABOLITOS POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION (HPLC) .....	50
B.12.3 ANALISIS DE CROMATOGRAFIA DE GASES- ESPECTROMETRIA DE MASAS (GC-MS).....	50
B.12.4 DETERMINACION DE NITRITO .....	50
B.12.5 DETERMINACION DE NITRATO .....	51
B.12.6 DETERMINACION DE PROTEINAS .....	51
B.12.7 RECOGIDA DE <sup>14</sup> CO <sub>2</sub> POR MINERALIZACION DE p-METIL- <sup>14</sup> C-BENZOATO EN SUELOS .....	52
C.RESULTADOS.....	54
C.1 COMPORTAMIENTO EN SUELOS AGRICOLAS DE BACTERIAS RECOMBINANTES QUE MINERALIZAN ALQUILAROMATICOS ..	55
C.1.1 SUPERVIVENCIA DE <u>PSEUDOMONAS putida</u> EN SUELOS..	57
C.1.1.1 SUPERVIVENCIA DE <u>P. putida</u> EEZ15 PORTANDO EL PLASMIDO pWW0-EB62 EN DIFERENTES SUELOS. ESTABILIDAD GENETICA DEL PLASMIDO RECOMBINANTE ..	57
C.1.1.2 SUPERVIVENCIA DE <u>P. putida</u> EEZ15 CON Y SIN PLASMIDOS TOL EN SUELOS .....	63
C.1.1.3 MULTIPLICACION DE <u>P. putida</u> EEZ15 (pWW0-EB62) EN SUELOS .....	66

C.1.1.4 SUPERVIVENCIA DE <u>P. putida</u> EEZ15 (pWW0-EB62) EN SUELOS SUPLEMENTADOS CON ACIDOS CARBOXILICOS AROMATICOS.....	68
C.1.1.5 EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA SUPERVIVENCIA DE EEZ15 (pWW0-EB62) EN SUELOS .....	72
C.1.1.6 SUPERVIVENCIA A LARGO PLAZO DE <u>P. putida</u> EEZ15 (pWW0-EB62) EN SUELOS ESTERILES .....	74
C.1.1.7 SUPERVIVENCIA DE <u>P. putida</u> EEZ15 (pWW0-EB62) EN SUELOS NO ESTERILES .....	76
C.1.2 TRANSFERENCIA DEL PLASMIDO TOL A OTRAS BACTERIAS EN SUELO .....	79
C.1.2.1 TRANSFERENCIA A <u>P. PUTIDA</u> , <u>ESCHERICHIA COLI</u> Y <u>ERWINIA CHRYSANTEMI</u> .....	79
C.1.2.2 EFECTO DE LA DENSIDAD CELULAR SOBRE LA TRANSFERENCIA DE TOL EN SUELOS.....	84
C.1.3 METABOLISMO DE p-METIL- <sup>14</sup> C-BENZOATO POR <u>P.putida</u> (pWWO-EB62) EN FLUVISOL10.....	87
C.2 DEGRADACION BIOLOGICA DE TNT .....	92
C.2.1 ENRIQUECIMIENTO Y AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS QUE UTILIZAN TNT.....	93
C.2.1.1 CARACTERIZACION DE LA CEPA C1S1 .....	94
C.2.1.2 METABOLISMO DE TNT Y OTROS NITROAROMATICOS POR LA CEPA C1S1 .....	94
C.2.1.3 EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO SOBRE EL METABOLISMO DE TNT POR LA CEPA C1S1 .....	100
C.2.1.4 METABOLISMO DE OTROS NITROAROMATICOS POR LA BACTERIA C1S1 .....	102

C.2.1.5 UTILIZACION DE FUENTES DE NITROGENO INORGANICO .....	106
C.2.1.6 ANALISIS DE INTERMEDIARIOS DEL METABOLISMO DE TNT POR EL C1S1 .....	106
C.2.2 CARACTERIZACION FISIOLOGICA DE LA CEPA <u>PSEUDOMONAS</u> sp. CLON A .....	110
C.2.2.1 AISLAMIENTO DE LA CEPA .....	110
C.2.2.2 FUENTES DE CARBONO QUE PUEDE UTILIZAR EL CLON A .....	111
C.2.2.3 EFECTO DE LA TEMPERATURA EN EL CRECIMIENTO DEL CLON A .....	111
C.2.2.4 REQUERIMIENTO DE O <sub>2</sub> POR EL CLON A EN SISTEMAS ESTANCOS .....	114
C.2.2.5 FUENTES DE NITROGENO QUE UTILIZA EL CLON A .	116
C.2.2.5.1 FUENTES DE NITROGENO INORGANICO .....	116
C.2.2.5.2 FUENTES DE NITROGENO ORGANICO .....	119
C.2.2.5.3 EFECTO DE LA ADICION DE EXTRACTO DE LEVADURA A MEDIOS CON TNT, DNT Y MNT COMO FUENTE DE N .....	119
C.2.2.5.4 CRECIMIENTO DEL CLON A CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE TNT .....	124
C.2.2.5.5 CRECIMIENTO DEL CLON A CON TNT EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE DNTs Y MNTs ....	128
C.2.2.5.6 CRECIMIENTO DEL CLON A EN PRESENCIA DE FUENTES DE N-INORGANICO Y ORGANICO Y ENSAYOS DE LA ACTIVIDAD NITRITO REDUCTASA EN ESAS CONDICIONES DE CULTIVO .....	130

C.2.2.5.7 EFECTO DE LA CARGA DE TNT Y NO <sub>3</sub> SOBRE SU ELIMINACION POR EL CLON A .....	135
C.2.2.6 CRECIMIENTO DEL CLON A EN AGUAS DE LAVADOS DE TANQUES DE PRODUCCION DE TNT .....	139
C.2.2.7 CRECIMIENTO DE <u>PSEUDOMONAS</u> CLON A EN AGUAS SINTETICAS .....	142
C.2.2 PRODUCTOS RESULTANTES DEL METABOLISMO DE TNT POR EL CLON A .....	145
C.2.4 CULTIVO CONTINUO DEL CLON A .....	148
C.2.4.1 CRECIMIENTO ESTANCO DE CLONES PROVENIENTES DE ENRIQUECIMIENTOS EN EL CULTIVO CONTINUO ....	148
C.2.4.2 CRECIMIENTO EN CULTIVO CONTINUO DEL CLON A 30-R-12-5-31 .....	153
C.2.5 PUESTA A PUNTO DE METODOS GENETICOS PARA EL CLON A	
C.2.5.1 AISLAMIENTO DE CEPAS RESISTENTES AL ANTIBIOTICO RIFAMPICINA.....	155
C.2.5.2 ANALISIS DE PLASMIDOS .....	155
C.2.5.3 MUTAGENESIS CON NITROSOGUANIDINA DEL CLON A .....	156
C.2.5.4 MUTAGENESIS DEL CLON A CON Tn5 .....	156
C.2.5.5 CONSTRUCCION DE CEPAS HIBRIDAS QUE MINERALIZAN TNT .....	157
 D. DISCUSION.....	 162
D.1 SUPERVIVENCIA Y FUNCIONAMIENTO EN SUELOS DE UNA CEPA DE <u>PSEUDOMONAS</u> <u>PUTIDA</u> PORTANDO UN PLASMIDO TOL RECOMBINANTE.....	162

D.2 METABOLISMO DE TNT POR CEPAS DE PSEUDOMONAS SP.  
CONSTRUCCION DE RUTAS HIBRIDAS..... 174

E. CONCLUSIONES..... 185

F. REFERENCIAS..... 189

A - I N T R O D U C C I O N





La degradación, o catabolismo, de compuestos orgánicos ha llamado la atención de numerosos microbiólogos, bioquímicos y genéticos de este siglo. El enfoque y el punto de interés ha variado con la naturaleza de la propia disciplina, pero en conjunto han contribuido a desentrañar las bases moleculares del metabolismo bacteriano (Dagley, 1986; Holloway, 1992).

Es difícil exagerar la importancia de la versatilidad metabólica bacteriana y de las leyes que regulan su funcionamiento. Las bacterias son organismos que gozan de una enorme plasticidad bioquímica, se adaptan con facilidad a cambios ambientales y son muy tolerantes a situaciones extremas en el medio donde habitan, como cambios a temperaturas, osmolaridad, bajos niveles de nutrientes, agentes que inducen estrés oxidativo, etc. (Csonka, 1989; Hengge-Aronis et al., 1993; Jenkins et al., 1990). Las bacterias constituyen, además, un sistema ideal para el desarrollo de modelos biológicos que no encuentra parangón en otros sistemas vivos. Los cambios evolutivos que se producen en las bacterias ocurren de manera constante, y debido a que se multiplican rápidamente, permiten el estudio de esos cambios, su control y su imitación en el laboratorio (Clarke y Slater, 1986; DeFlaun y Levi, 1989; Hall et al., 1983; Ramos y Timmis, 1987). El grupo de degradación de tóxicos orgánicos de la Estación Experimental del Zaidín ha centrado sus investigaciones en bacterias que degradan compuestos aromáticos naturales o sintetizados por la industria, en particular disolventes orgánicos y explosivos y ha prestado especial atención a la evolución en el laboratorio de rutas catabólicas para la eliminación de compuestos aromáticos que contaminan el medio

ambiente (Abril et al., 1989; Delgado, A. 1994; Delgado et al., 1992; Delgado y Ramos, 1994; Duque et al., 1993; Ramos et al., 1987b). Como ejemplos de compuestos aromáticos para los cuales se han construido rutas catabólicas in vitro se pueden citar las de degradación de p-etilbenzoato y p-etiltolueno (Abril et al., 1989; Ramos et al., 1987b); p-clorobenzoato (Reineke y Knackmuss, 1979; Rojo et al., 1987); 3,5-diclorobenzoato (Lehrbach et al., 1984; Ramos et al., 1986), clorosalicilatos (Lehrbach et al., 1984) y 2,4,6-trinitrotolueno (Duque et al., 1993). A parte de las grandes cantidades de disolventes orgánicos aromáticos que se sintetizan cada año (tolueno, etilbenceno, etc.), la industria química sintetiza grandes cantidades de cloroaromáticos y nitroaromáticos que se utilizan ampliamente como insecticidas, preservantes de maderas, colorantes, explosivos, etc., muchos de estos compuestos encuentran su camino hacia la biosfera y constituyen polucionantes medioambientales, de manera que diversas agencias del medio ambiente y otras organizaciones han declarado de interés prioritario la eliminación de los mismos (Leah y Colwell, 1990; MOPU, 1989; OCDE, 1994).

El interés por la estructura y las propiedades de los aromáticos no es reciente. Gibson y Subramanian (1984) describieron en una breve historia de la biodegradación que en 1761, John Hill, un controvertido médico inglés, publicó un artículo en el que llamaba la atención sobre el uso inmoderado del tabaco y sus efectos perjudiciales en la salud. Estos autores también describieron como cincuenta años más tarde se aislarían benzopirenos del alquitrán del tabaco y como en los años treinta del presente siglo, E.L. Kenneaway e I. Heiger establecieron que

otros compuestos aromáticos, los dibenzoantracenos, provocan cáncer de piel. En las últimas décadas hemos asistido a un auténtico alud de informaciones que ponían de manifiesto la capacidad mutagénica de aromáticos y la relación de determinados compuestos orgánicos con la inducción de tumores (Gelboin, 1980). Las bacterias han colonizado todos los medios. Las del suelo y del agua presentan un enorme abanico de capacidades catabólicas que les permite metabolizar una gran variedad de compuestos orgánicos naturales y sintéticos. Los estudios pioneros de ecología microbiana relacionada con la utilización de aromáticos data de principio siglo. Así Dagley (1986) relata que el trabajo de K. Stormer y N. L. Söhngen en 1906, fue el primero en describir el aislamiento de bacterias que utilizaban tolueno y benceno como única fuente de carbono y energía. Estudios posteriores establecieron que la capacidad de los microorganismos del suelo para degradar compuestos aromáticos se distribuía de manera ubicua (Gibson y Subramanian, 1984; Galli et al., 1992). El grupo de degradación de tóxicos orgánicos de Granada ha aislado en los últimos años de la provincia de Granada bacterias que crecen a expensas de contaminantes ubicuos, como son algunos alquilbencenos y nitrobenzoatos (Delgado, 1994). Las bacterias del suelo y otros microorganismos, fundamentalmente hongos, pueden crecer a expensas de hidrocarburos aromáticos no sólo con uno sino incluso con más anillos bencénicos como por ejemplo naftaleno (García-Valdés et al., 1988; Roselló-Mora et al., 1994; Yen y Gunsalus, 1982) y aromáticos policíclicos (Herbes y Schwall, 1978). Estas capacidades no son extrañas ya que a lo largo de miles de años, los microorganismos se han visto

expuestos a compuestos aromáticos naturales, que se han formado por pirólisis de compuestos orgánicos naturales, por ejemplo en los incendios forestales. El tipo de aromático que se produce depende de la temperatura de pirólisis; así, a temperaturas elevadas (2000 grados Celsius) se producen, preferentemente, hidrocarburos policíclicos no sustituidos; a temperaturas intermedias (800 grados Celsius), hidrocarburos con sustituciones alquílicas, y, a bajas temperaturas (150 grados C), los petróleos.

Los descubrimientos en el campo de la química orgánica registrados a finales del siglo pasado llamaron la atención sobre los mecanismos que utilizan los seres vivos en la asimilación de compuestos orgánicos. Así, el establecimiento por Friedrich A. Kekulé, de la estabilización por resonancia del anillo bencénico despertó el interés por descubrir los sistemas que empleaban los microorganismos para salvar la energía de activación necesaria para romper el anillo aromático y generar estructuras carbonadas asimilables.

Pero el esclarecimiento de esos mecanismos hubo de esperar hasta los años sesenta y setenta, cuando Dagley, Gibson, Ornston y sus colaboradores respectivos, establecieron que la estrategia seguida por los microorganismos consistía en desestabilizar el anillo aromático mediante la introducción de dos grupo hidroxilos (Dagley, 1971 y 1986; Gibson et al., 1968; Ornston, 1966). Así, el compuesto pasa a ser susceptible de ataque enzimático para rendir formas asimilables del carbono.

Para entender los mecanismos de la degradación microbiana de compuestos aromáticos es importante conocer como se regula la

expresión de las actividades enzimáticas implicadas en el proceso. Los trabajos pioneros de Stanier (1947) demostraron que las enzimas responsables de la degradación de ciertos aromáticos se sintetizaban en respuesta a la presencia de tales sustancias en los medios de cultivo. Posteriormente el mecanismo de control transcripcional de diversas rutas catabólicas de degradación de aromáticos se estudió con detalle, estando bien establecido el mecanismo de control de las implicadas en el metabolismo de tolueno (Franklin et al., 1981; Inouye et al., 1981; Ramos et al., 1987a), mandalato (Hegeman, 1966), naftaleno (Yen y Gunsalus, 1982), benzoato (Ornston y Parke, 1976) etc. El conocimiento de la bioquímica de una ruta metabólica, de las enzimas que intervienen y de la organización de los genes que determinan tales enzimas es imprescindible para entender la evolución seguida por las rutas e intentar su manipulación in vitro.

Conviene, sin embargo, dejar claro de antemano algunos conceptos habituales en el campo de la degradación biológica. En particular, los conceptos de compuestos biogénicos y xenobióticos, por un lado, y, por otro, los de mineralización, biotransformación y recalcitrancia de un compuesto. Los productos biogénicos, por ejemplo los ácidos benzoico y salicílico, son compuestos de síntesis industrial cuya estructura es igual o similar a los sintetizados por los seres vivos en alguna fase de su metabolismo; los xenobióticos se caracterizan por presentar estructuras o sustituyentes que raramente se encuentran en los naturales, como por ejemplo clorofenoles y dioxinas.

Los compuestos biogénicos son, en general, mineralizables; es decir, se convierten en  $\text{CO}_2$ , agua y formas inorgánicas por la

acción de los seres vivos, predominantemente por los microorganismos y como parte del constante reciclaje de los átomos de carbono. La mineralización de un compuesto implica su alteración estructural y la formación de intermediarios metabólicos que pueden servir de elementos estructurales de la célula o de combustible al oxidarse (Figura 1). Los intermediarios pueden convertirse en distintos compuestos orgánicos antes de su combustión final. En el proceso de transformación de un compuesto en otro, el substrato puede sufrir la pérdida de uno o más de sus elementos estructurales o sólo una mera reordenación de sus átomos (Ramos y Rojo, 1990; Ramos y Timmis, 1987).

El término biodegradación no indica la extensión en la que se ha alterado una molécula; tampoco señala si en el proceso se genera energía. Quizás resulte más apropiado hablar de biotransformación para referirse al proceso a través del cual un ser vivo modifica un compuesto sin llegar a mineralizarlo (Figura 1). Ahora bien, mientras que la mineralización de un compuesto orgánico es un hecho central y crítico para el mantenimiento de la vida en este planeta, la transformación parcial de un compuesto no tiene necesariamente un fin beneficioso: amén de poder formarse productos no mineralizables, en algunos casos el producto resultante puede ser incluso más tóxico y perjudicial que la sustancia de partida.

Ocurre también que no todos los compuestos orgánicos de la biosfera son susceptibles de ataque biológico, estos compuestos se dicen que son recalcitrantes. Desde el punto de vista termodinámico, y en las condiciones actuales de la tierra, todos

los compuestos orgánicos son inestables y tienden a su forma más estable, que es el anhídrido carbónico ( $\text{CO}_2$ ) en situación aerobia o el metano ( $\text{CH}_4$ ) en un ambiente anaerobio (Dagley, 1986; Young, 1984). Un aspecto importante en la lucha contra la contaminación química es el entender la razón o las razones por las que un compuesto es recalcitrante. Estas pueden ser muchas y diversas; entre ellas, que el compuesto sea tóxico para los microorganismos, que presenten estructuras químicas muy estables y resistentes al ataque biológico o que posea elementos estructurales que raramente se encuentran en la naturaleza. En general, la resistencia de un compuesto aromático al ataque por los seres vivos aumenta con el número de sustituyentes que tenga, cualquiera que sea su naturaleza química (Alexander, 1981; Dagley, 1981; Reineke y Knackmuss, 1988; Schmidt y Knackmuss, 1980).

Conviene señalar que, aunque en muchos casos un solo organismo es capaz de mineralizar un compuesto dado, en otros casos participan en el proceso varios organismos. Estos consorcios que actúan en la naturaleza pueden aislarse en el laboratorio y mantenerse de manera estable en cultivos continuos. Como ejemplos de degradación de compuestos por consorcios bacterianos y hongos cabe destacar la degradación de DDT (1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)-etano) (Subba-Rao y Alexander, 1985) de consorcios bacterianos cabe mencionar aquellos para el metabolismo del herbicida dalapón (Senior et al., 1976) y del plagicida paratión (Daughton y Hsieh, 1977). Recientemente en nuestro grupo de investigación se ha establecido un consorcio que mineraliza m-

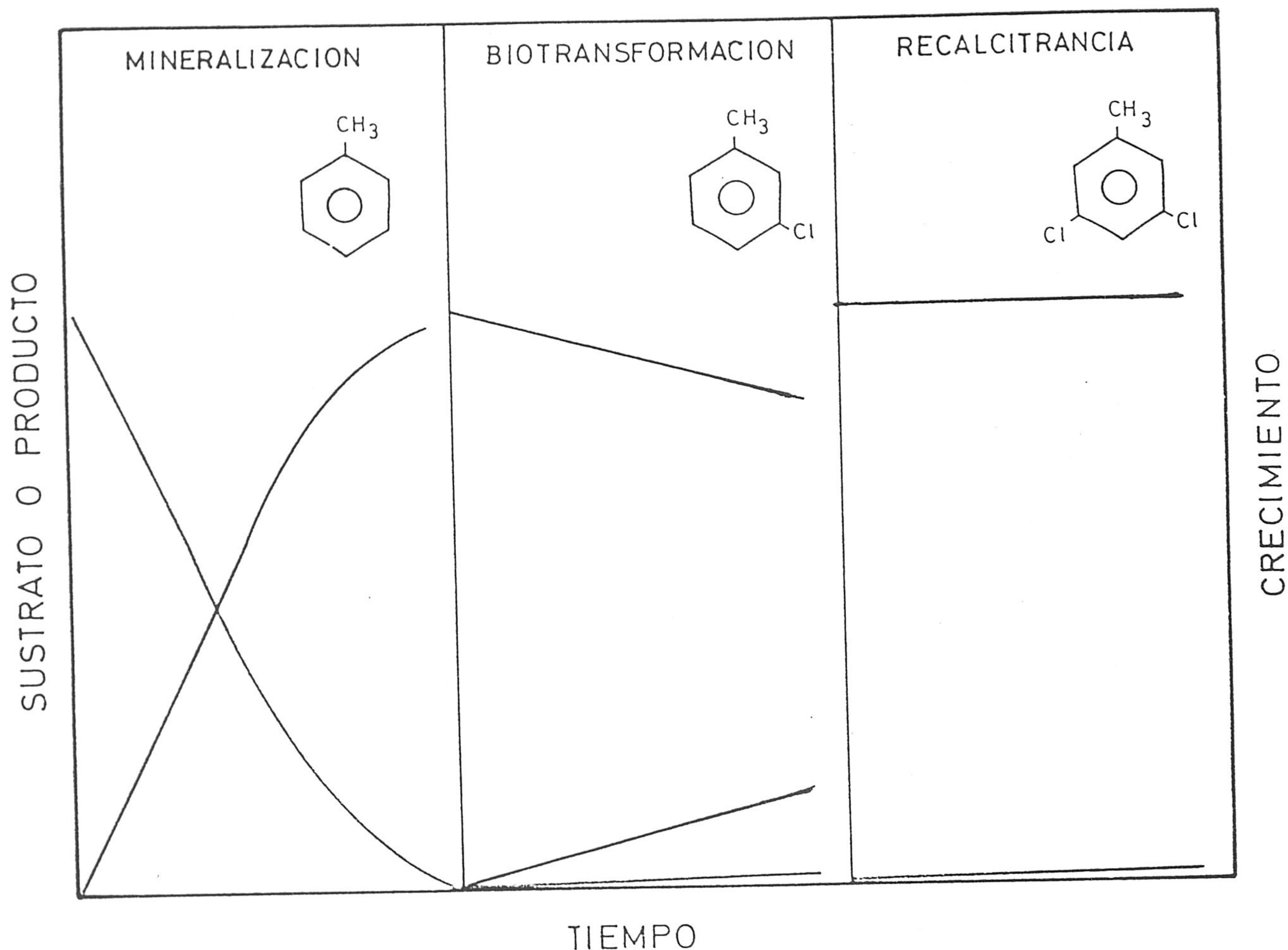


Figura 1. Mineralización, biotransformación y recalcitrancia de compuestos aromáticos. La mineralización consiste en la conversión de un compuesto en  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  y formas inorgánicas. Si un microorganismo, o una comunidad microbiana, posee una ruta catabólica para la mineralización de un compuesto, la concentración de éste (línea azul) disminuirá con el tiempo e incrementará la masa microbiana (panel izquierdo, línea roja). Por el proceso de transformación se entiende la conversión de un compuesto en otro sin ser mineralizado; el compuesto biotransformado desaparecerá con el tiempo y surgirán uno o varios productos (línea verde, panel central). La recalcitrancia indica que un compuesto es resistente al ataque por los seres vivos; los productos recalcitrantes no son metabolizados en ninguna extensión y, por consiguiente, no permiten el crecimiento celular (panel derecho).



nitrobenzoato y que está constituido por una levadura del género *Candida* y tres bacterias, dos del género *Pseudomonas* y una *Klebsiella* (M. D.Fandila y J.L.Ramos, datos no publicados).

La degradación de aromáticos ocurre en dos fases; la primera consiste en la activación del anillo mediante la introducción de dos grupos hidroxilos; la segunda, en la fisión o ruptura del anillo activado. El ejemplo más sencillo de activación del anillo aromático lo constituye la oxidación del benceno por la benceno dioxigenasa para producir un dihidrodiol, que posteriormente se oxida a catecol; este último compuesto es la verdadera forma activada del anillo (Gibson et al., 1968; Gibson et al., 1970b). Un mismo compuesto puede sufrir distintos tipos de ataques que conduzcan a la forma activada. Por ejemplo, el tolueno se puede degradar a través de cuatro vías: i) mediante el ataque directo al anillo aromático, que es oxidado por la tolueno dioxigenasa que rinde 3-metilcatecol (Figura 2) (Gibson et al., 1970a); ii) mediante el ataque a la cadena alquílica lateral ( $-\text{CH}_3$ ), que se oxida secuencialmente a su alcohol ( $-\text{CH}_2\text{OH}$ ), aldehído ( $-\text{CHO}$ ) y ácido carboxílico ( $-\text{COOH}$ ) correspondiente. El ácido benzoico resultante es descarboxilado y oxigenado para producir el catecol (Worsey y Williams, 1975); iii) la tercera vía es más compleja y ha sido descrita recientemente por varios grupos, el anillo aromático primero se hidroxila rindiendo p-cresol, entonces la cadena alquílica se oxida secuencialmente hasta rendir p-hidroxibenzoato que es de nuevo hidroxilado para rendir protocatecuato (Whited y Gibson, 1989; Wright y Olsen, 1994; Yen et al., 1991). La cuarta forma consiste en la hidroxilación del tolueno para rendir o-cresol que es de nuevo oxidado a 3-

metilcatecol (Shields et al., 1989). En algunos casos, los compuestos naturales presentan ya un grupo hidroxilo en su molécula. Acontece eso con el fenol, el cual se oxida a catecol por la acción de una fenol hidroxilasa (Ballou, 1982; Hughes et al., 1984; Young, 1984) (Figura 2). En algunas ocasiones, los anillos aromáticos se encuentran sustituidos con grupos metoxilo, nitro, amino, etc., en estos casos, la preparación del anillo para su rotura no solo implica su activación, es decir, su desestabilización química, sino también la eliminación de la sustitución. Por ejemplo, en el caso de p-metoxibenzoato, uno de los muchos compuestos que se forman en el metabolismo de ligninas, existe una enzima, la demetilasa hidroxilante del p-metoxibenzoato, que separa el grupo metoxilo e introduce un grupo hidroxilo; el p-hidroxibenzoato resultante se hidroxila posteriormente para producir 3,4-dihidroxibenzoato (Bernhardt et al., 1975).

En el caso de nitroaromáticos, el grupo nitro se suele reducir primero hasta hidroxilamino y entonces se produce una oxidación desaminativa que rinde el correspondiente substrato hidroxilado (Cain y Cartwright, 1960; Groenewegen et al., 1992; Haigler y Spain, 1993 y Rhys-Williams et al., 1993). En resumen, se puede decir que los seres vivos han desarrollado una serie de estrategias que conducen a la activación del anillo aromático consistente en la introducción de dos grupos hidroxilos adyacentes para destabilizar el anillo aromático y prepararlo para la acción posterior de las dioxigenasas que se encargaran de la fisión del mismo.

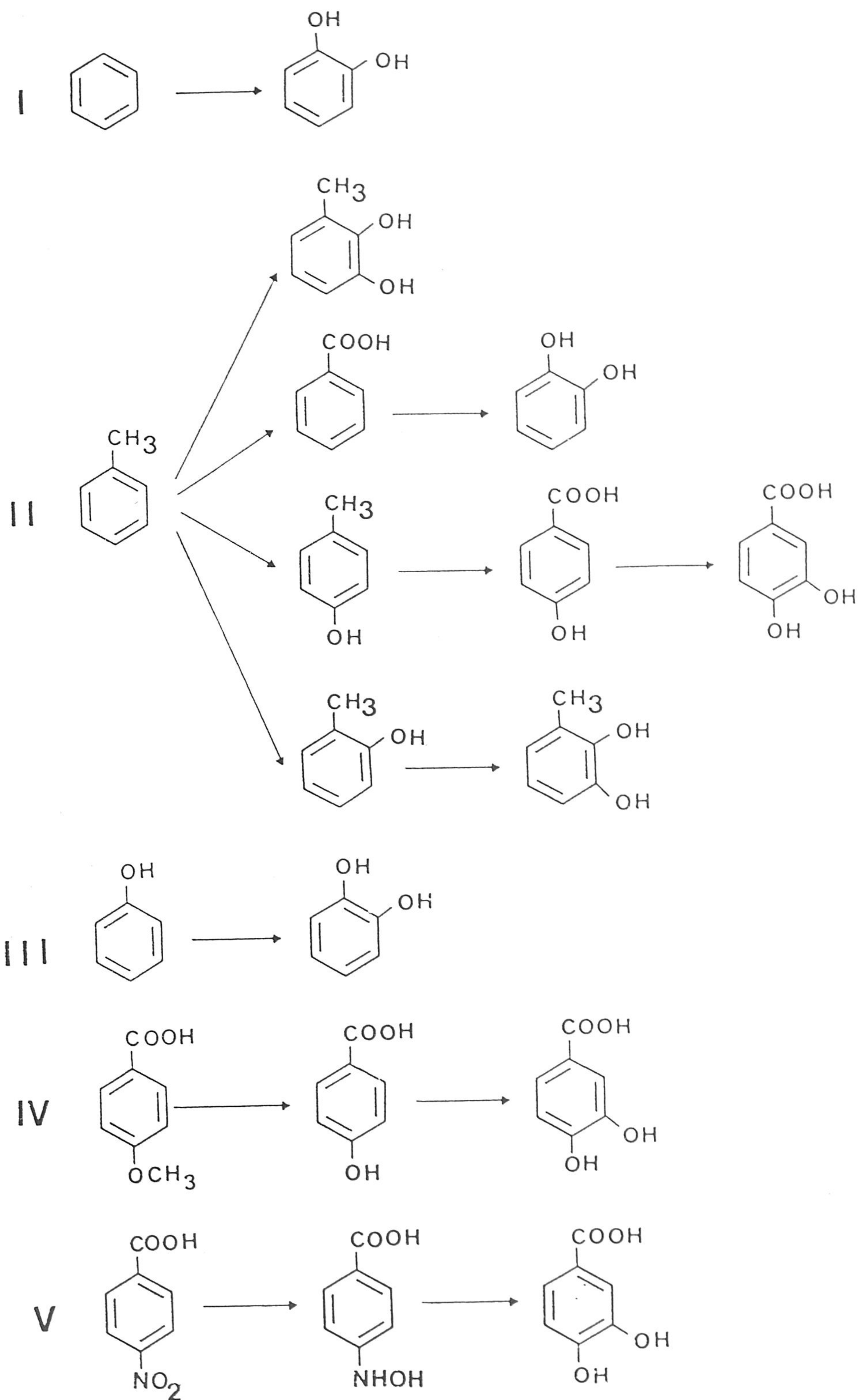


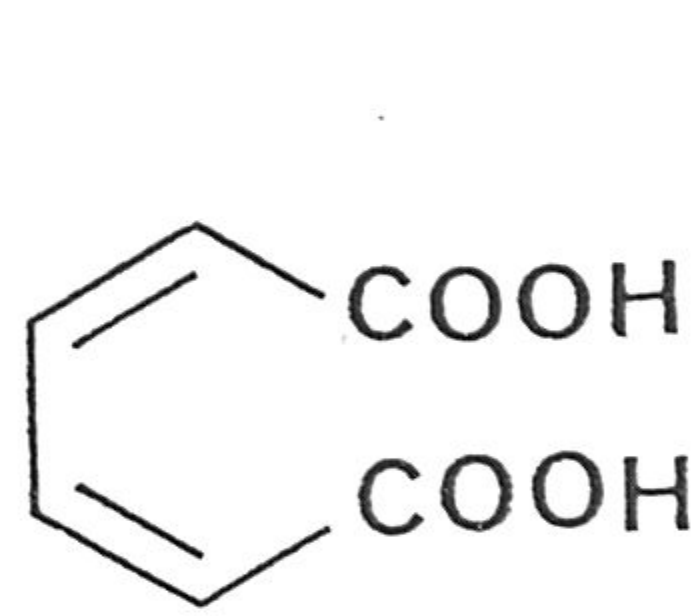
Figura 2. Activación del anillo aromático de diversos compuestos. I, benceno; II, tolueno; III, fenol; IV, p-metoxibenzoato y V, p-nitrobenzoato.

Uno de los aspectos más interesantes del metabolismo de los aromáticos nos lo ofrece la fisión del anillo aromático, una vez que lleva incorporados los dos sustituyentes hidroxilo. La rotura del anillo está siempre catalizada por una dioxigenasa; se denomina fisión orto (también, fisión intradiol), cuando ocurre entre los carbonos 1 y 2 del anillo aromático, y fisión meta (fisión extradiol), si se produce entre los carbonos dos y tres del anillo aromático (ver Dagley et al., 1986 para una amplia revisión). Los productos que se forman tras la fisión del anillo se transforman luego, a través de varios pasos, en compuestos que convergen en el ciclo de Krebs. La Figura 3 muestra algunas reacciones de fisión catalizadas por dioxigenasas.

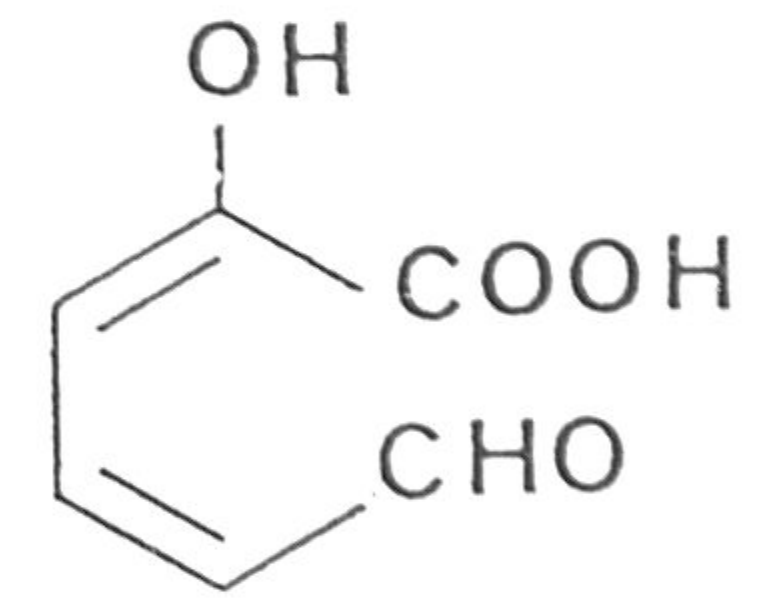
Con respecto al tipo de fisión que sufrirá un anillo aromático se puede decir que, en general, los aromáticos que contienen sustituyentes del tipo alquílico se metabolizan a través de rutas meta, esto es su fisión es mediada por catecol 2,3-dioxigenasas (ver Harayama et al., 1992 para una revisión); mientras que los aromáticos no sustituidos o con sustituyentes del tipo halogenado, por ejemplo cloro o bromo, se metabolizan a través de rutas orto esto es su fisión es mediada por catecol 1,2-dioxigenasas (Dorn y Knackmuss, 1978; Fujiwara et al., 1975; Ornston et al., 1966). Las rutas se llaman así en razón del tipo de rotura que sufre el anillo. La existencia de esas dos clases de fisión del anillo aromático se debe a dos factores: la especificidad de los reguladores de la ruta por sus efectores y la especificidad de las enzimas por sus correspondientes substratos.

No existe ninguna dioxigenasa que pueda atacar todos los posibles

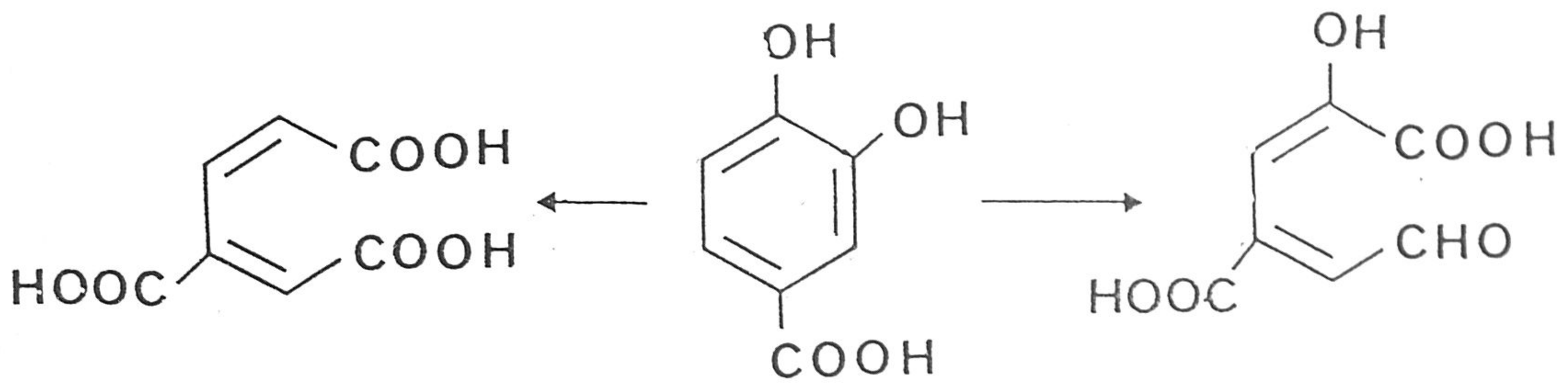
ORTO



META



catecol



3,4-dihidroxibenzoico

Figura 3. Fisión del anillo aromático catecol y 3,4-dihidroxibenzoato.

substratos derivados del catecol, aunque algunas reacciones cruzadas se han descrito en la literatura, pero en estos casos las actividades suelen ser inferiores al 10% del máximo con su substrato (ver Clarke y Slater, 1986 para una revisión). La separación de las rutas catabólicas constituye la base de la técnica de adaptación simultánea que fue descrita por Stanier en 1947 y que ha permitido, en general, estudiar diferentes rutas catabólicas en un mismo huésped.

La genética de la degradación de compuestos aromáticos por microorganismos adquirió especial interés después de 1970, cuando en el laboratorio de I.C. Gunsalus, se observó que la capacidad de algunas bacterias gram-negativas del género Pseudomonas para degradar compuestos como naftaleno, salicilato y alcanos de cadena de 6 a 10 carbonos, no sólo se perdía espontáneamente, sino que dicha capacidad era, además, transmisible por conjugación entre distintas cepas bacterianas (Dunn y Gunsalus, 1973). Ello sugería que la información genética que determinaba estas funciones metabólicas estaban asociadas a plásmidos transmisibles, lo cual se corroboró posteriormente al aislar dichos plásmidos (ver Frantz y Chakrabarty, 1986 y Sayler et al., 1990 para revisiones). Durante las dos últimas décadas han ido saliendo a la luz múltiples funciones catabólicas contra compuestos xenobióticos que están determinadas por plásmidos. Se puede citar a este respecto la degradación del herbicida 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (Don y Pemberton, 1981; Don et al., 1985) y la eliminación de solventes orgánicos, como el tolueno, xilenos y metilbencenos (Galli et al., 1992; Williams et al., 1992; Worsey y Williams, 1975), polihidroxicanoatos

(Steinbüchel et al., 1992). En algunas ocasiones, las funciones catabólicas no sólo implican a genes plasmídicos, sino que involucran también a genes cromosómicos. Este es el caso de la ruta de la degradación de 3-clorobenzoato de una bacteria del género Pseudomonas, aislada por el grupo de Hans J. Knackmuss (Dorn et al., 1974). Se ha puesto de manifiesto que las funciones plasmídicas relacionadas con la ruta se limitan a la de los genes específicos de dicha vía, mientras que otras enzimas son codificadas por genes cromosómicos (Ngai y Ornston, 1988; Rangnekar, 1988). Además, se ha de tener en cuenta que ciertas rutas catabólicas, como las de la degradación de benzoato e hidroxibenzoato, son de codificación cromosómica en la mayoría de los organismos (Ornston y Parker., 1976).

Se han estudiado con bastante detalle varios de los plásmidos implicados en rutas catabólicas. El mejor caracterizado, en cuanto a su organización estructural, quizás sea el plásmido TOL pWW0 de Pseudomonas. El plásmido TOL pWW0 ha constituido un elemento importante en la construcción de rutas híbridas descritas en este trabajo. La Figura 4 muestra la estructura física del mismo.

El plásmido TOL contiene los genes que determinan las enzimas implicadas en la degradación de tolueno a benzoato (ruta "upper") y de benzoato vía catecol, a intermediarios del ciclo de Krebs (ruta meta) (Kunz y Chapman, 1981; Worsey y Williams, 1975). Los genes de estas rutas, se agrupan formando dos operones, el operón "upper" que codifica las enzimas de la ruta "upper" y el operón meta que codifica las enzimas para la oxidación de benzoato. La Figura 5 resume la organización genética y bioquímica de los

genes y las enzimas de la ruta. En el caso de la degradación de tolueno codificada por el plásmido pWW0, los genes reguladores de las funciones catabólicas, los genes xylR y xylS, están codificados por el mismo plásmido TOL, y se localizan en 3' con respecto al operón meta. El modelo de regulación transcripcional de TOL fue propuesto por Ramos et al. (1987a) y ha sido corroborado recientemente a nivel transcripcional por Marqués et al. (1993) y revisado por Marqués y Ramos (1993). Se puede decir que la proteína XylR es el último regulador de las rutas de TOL, y éste regulador activado por substratos de la ruta "upper" que actúan como efectores y con los factores cromosómicos NtrA - un factor sigma - y la proteína IHF - una proteína que introduce dobleces en el ADN - estimula la transcripción de la ruta "upper". Asimismo el regulador XylR junto con NtrA estimula la transcripción del gen xylS, cuyo producto XylS, activa la transcripción de la ruta meta en un sistema en cascada (Marqués y Ramos, 1993).

En general, las rutas catabólicas están reguladas. Esto significa que solo se expresan en ciertas condiciones. La regulación suele ser, además, de tipo positivo; es decir, los genes se expresan o activan en respuesta a la presencia del substrato a degradar o a intermediarios de la ruta. En el mecanismo habitual interviene el regulador y el efector, éste último suele ser el primer substrato de la ruta.

Pero no siempre los inductores de la ruta son los substratos de éstas, a veces, los intermediarios metabólicos son los responsables de tal inducción. Eso ocurre con la ruta de degradación de clorobenzoatos de Pseudomonas sp. B13, en la que



el inductor de la misma es el ácido 2-cloromucónico, un metabolito derivado del clorobenzoato; los genes de esta ruta se expresan de forma continua, en ausencia incluso del substrato a degradar, aunque a muy bajo nivel. Las bajas concentraciones de las enzimas que se producen son, sin embargo, suficientes para permitir que, cuando el substrato entre en la célula, sea transformado en el intermediario correspondiente de forma que éste, a su vez, activa al regulador, que induce entonces altos niveles de expresión de las enzimas de la vía (Frantz et al., 1987 y Schmidt y Knackmuss, 1980).

En muchas bacterias, la presencia de ciertas fuentes de carbono inhibe la utilización de otras fuentes menos ricas. Así, mientras la enterobacteria Escherichia coli cataboliza glucosa, no consume o lo hace a muy baja tasa otros azúcares, como por ejemplo melibiosa (Webster et al., 1989). Ese fenómeno de represión catabólica se ha descrito recientemente en el control de las rutas de degradación de tolueno, codificada por el plásmido TOL. Marqués et al. (1994) y Duetz et al. (1994) han sugerido que los aminoácidos son fuertes inhibidores catabólicos de TOL y que este efecto se ejerce a nivel del operón "upper" pero no del meta. Este tipo de interacción es crítica cuando se diseñan estrategias de eliminación de contaminantes in situ. La estimulación e inhibición in situ de actividades catabólicas es un área emergente para el diseño racional del tratamiento biológico de sitios contaminados.

En resumen se puede decir que los elementos que componen una ruta catabólica son tres : i) las enzimas de la ruta que llevan a cabo las reacciones de transformación de un producto en otro, ii) los

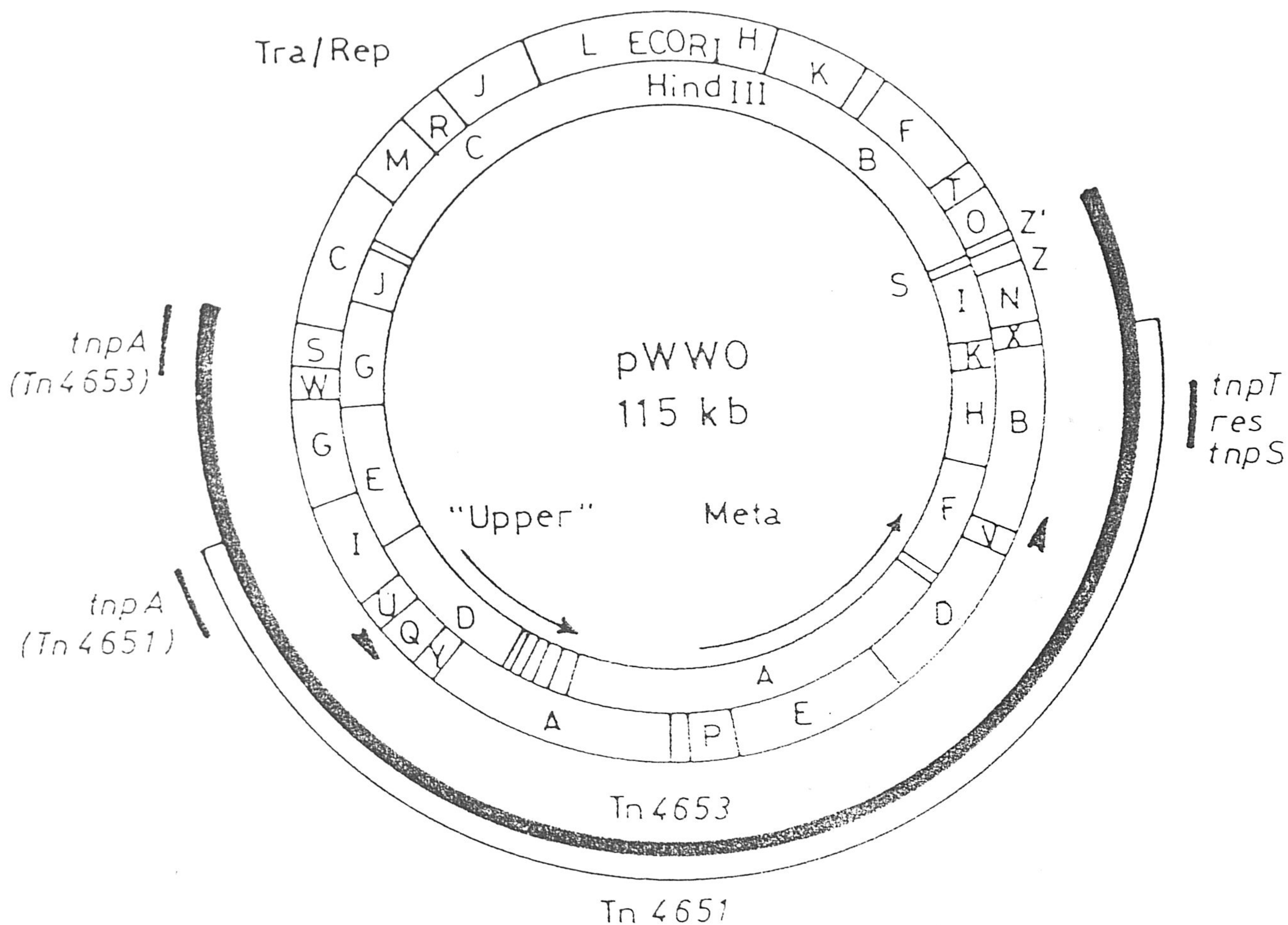


Figura 4. Representación del plásmido TOL pWWO de *P. putida* de acuerdo con Burlage et al., 1989; Timmis et al., 1985 y Tsuda e lino, 1988. Se representa los mapas de restricción del plásmido con las restrictasas *EcoRI* y *HindIII*; los fragmentos se nombran en orden alfabético, de acuerdo con su tamaño por orden decreciente. Se indica la región que contiene los genes degradativos organizados en los operones "upper" y *meta*, correspondiendo el sentido de las flechas, al de transcripción de estas unidades transcripcionales. Fuera del mapa se indica la localización de las regiones de las funciones de transferencia (Tra) y replicación (Rep). Asimismo se representan los dos transposones Tn4651 y Tn4653, indicándose la localización de los genes implicados en transposición: el gen *tnpA*, que codifica la transposasa, junto con los genes para las resolvasas (*tnpS* y *tnpT*) y el sitio *res*, necesario para la resolución de los cointegrados. Las puntas de flecha fuera del mapa representan las secuencias repetidas directas de 1,4 Kb implicadas en la deleción del fragmento de 39kb (Meulieu et al., 1981).

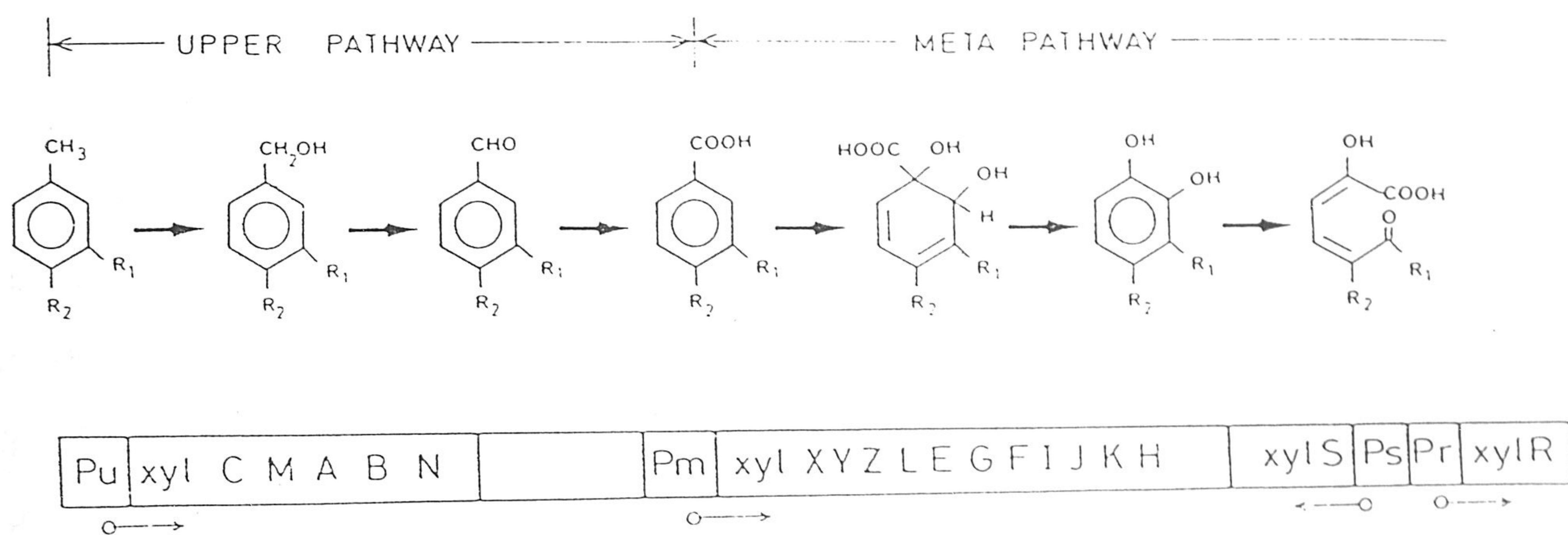


Figura 5. Organización física y genética de las rutas catabólicas del plásmido TOL *pWWO*. El orden de los genes es de acuerdo con Harayama y colaboradores (1989) y Harayama y Reikik (1990). Las reacciones son de acuerdo con Worsley y Williams (1975).

genes estructurales que determinan esas enzimas y, iii) los genes reguladores que determinan las proteínas que controlan la expresión de los genes estructurales. Cuanto mayor sea el conocimiento de cada uno de esos elementos de una ruta catabólica, más fácil será diseñar estrategias que permitan manipularlas para expandir el espectro de substratos metabolizados por microorganismos.

El número de ejemplos de rutas manipuladas mediante ingeniería genética es escaso y el objetivo central de la manipulación en el laboratorio de los elementos de las rutas catabólicas ha sido el de ampliar el número de compuestos que se pueden metabolizar a través de las mismas, poniendo especial énfasis en la eliminación de tóxicos recalcitrantes. Se distinguen tres formas fundamentales de expansión de rutas catabólicas: expansión horizontal, expansión vertical y ensamblaje de rutas (Ramos y Timmis, 1987). Con la primera se pretende aumentar el número de substratos metabolizados por una ruta para incluir análogos estructurales de los mismos. Esta expansión horizontal se consigue a través de mutaciones que aumentan el número de substratos o de efectores que una enzima o un regulador transforma o reconoce. Otra forma de lograr ese mismo propósito es mediante la incorporación de enzimas isofuncionales que permiten ampliar el espectro de análogos que se metabolizan a través de la ruta en cuestión.

Por expansión vertical se entiende la adición de elementos a una ruta básica preexistente, de forma que el organismo adquiere entonces capacidad para degradar nuevos compuestos. Las situaciones más complejas en el diseño y reestructuración de

rutas catabólicas en el laboratorio se dan cuando no existe una ruta que pueda ampliarse de forma vertical u horizontal para la degradación de ciertos compuestos. En esos casos, se impone construir nuevas rutas mediante el ensamblaje de elementos de rutas existentes.

Esas manipulaciones se llevan a cabo con las técnicas de la genética clásica y de la ingeniería genética, es decir, clonaje de genes, mutagénesis in vivo e in vitro y otras (Timmis et al., 1985). La bacteria Pseudomonas sp. B13 constituye un buen ejemplo para analizar esos tres tipos de manipulación, ya que su ruta de degradación de 3-clorobenzoato se ha podido expandir horizontal y verticalmente. Asimismo, la introducción de esa bacteria de varios segmentos de rutas catabólicas, que al ensamblarse forman una ruta nueva, ha permitido el metabolismo simultáneo de metil- y clorobenzoatos, procesos que son en principio incompatibles entre sí. Pseudomonas sp. B13 fue aislada por el grupo de Knackmuss (Dorn et al., 1974). El análisis de la ruta mediante ensayos bioquímicos e identificación de intermediarios quedó establecida en la secuencia de pasos que se recogen en la Fig.6. Tres de las enzimas de la ruta son críticas para el metabolismo de los intermediarios halogenados: catecol 1,2-dioxigenasa o pirocatecasa-2, ciclolactona isomerasa o isomerasa-2 y diene lactona hidrolasa. El interés por la expansión de la ruta para 3-clorobenzoato surgió de la observación de que esa bacteria no podía crecer a expensas del análogo 4-clorobenzoato. Reineke y Knackmuss (1978), establecieron que el paso limitante para ello lo constituía la primera enzima de la ruta, una benzoato dioxigenasa que no aceptaba al 4-clorobenzoato como substrato.

Sin embargo, el plásmido TOL de Pseudomonas determina una benzoato dioxigenasa que ejerce su acción enzimática en substratos muy diversos y es capaz de oxigenar benzoato, metilbenzoatos y 3- y 4-clorobenzoato (Reineke y Knackmuss, 1979; Jeenes y Williams, 1982). A pesar de ello, P. putida cuando porta el plásmido TOL, no puede crecer a expensas de los análogos clorados porque no posee la maquinaria para deshalogenar los intermediarios clorados que se forman y que constituyen productos suicidas de los que la célula no puede obtener energía ni esqueletos carbonados (Reineke y Knackmuss, 1988). La transferencia de los genes xylXYZL que codifican las tolueno dioxigenasa y ciclohexadieno carboxilato deshidrogenasa de TOL junto con su regulador xylS permitió la metabolización de 4-clorobenzoato hasta 4-clorocatecol, el cual se metabolizó hasta intermediarios del ciclo de Krebs. Este fue el primer ejemplo de evolución horizontal de una ruta catabólica (Figura 7) (Reineke y Knackmuss, 1979; Rojo et al., 1987).

Pseudomonas sp. B13 no puede crecer a expensas de clorosalicilatos porque carece del enzima salicilato hidroxilasa que transformaría éstos en los correspondientes catecoles. Lehrbach et al. (1984) clonaron a partir del plásmido NAH7 el gen nahG y nahR que codifican la salicilato hidroxilasa y su regulador NahR, respectivamente. Estos genes cuando se transfirieron a Pseudomonas sp. B13 permitió su crecimiento a expensas de clorosalicilatos (Figura 7). Este fue el primer ejemplo de evolución vertical de una ruta catabólica.

Pseudomonas sp. B13 portando los genes xylXYZL, xylS no crece a expensas de metilbenzoatos debido a que éstos se transforman en

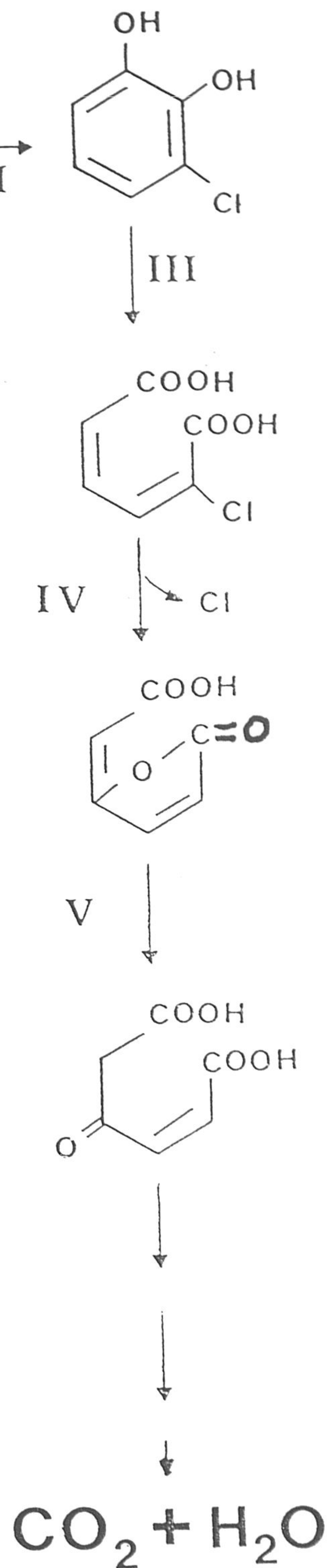


Figura 6. Ruta de eliminación de 3-clorobenzoato por *Pseudomonas* sp. B13. I, benzoato dioxigenasa; II, ciclohexadieno carboxilato deshidrogenasa; III, catecol 1,2-dioxigenasa o pirocatecase-2; IV, ciclolactona isomerasa o isomerasa-2 y V, diene lactona hidrolasa. Las enzimas que catalizan los pasos III, IV y V son de codificación plasmídica mientras que el resto son de codificación cromosómica (Tomado de Frantz y Chakrabarty, 1986).

EVOLUCION  
HORIZONTAL

EVOLUCION  
VERTICAL

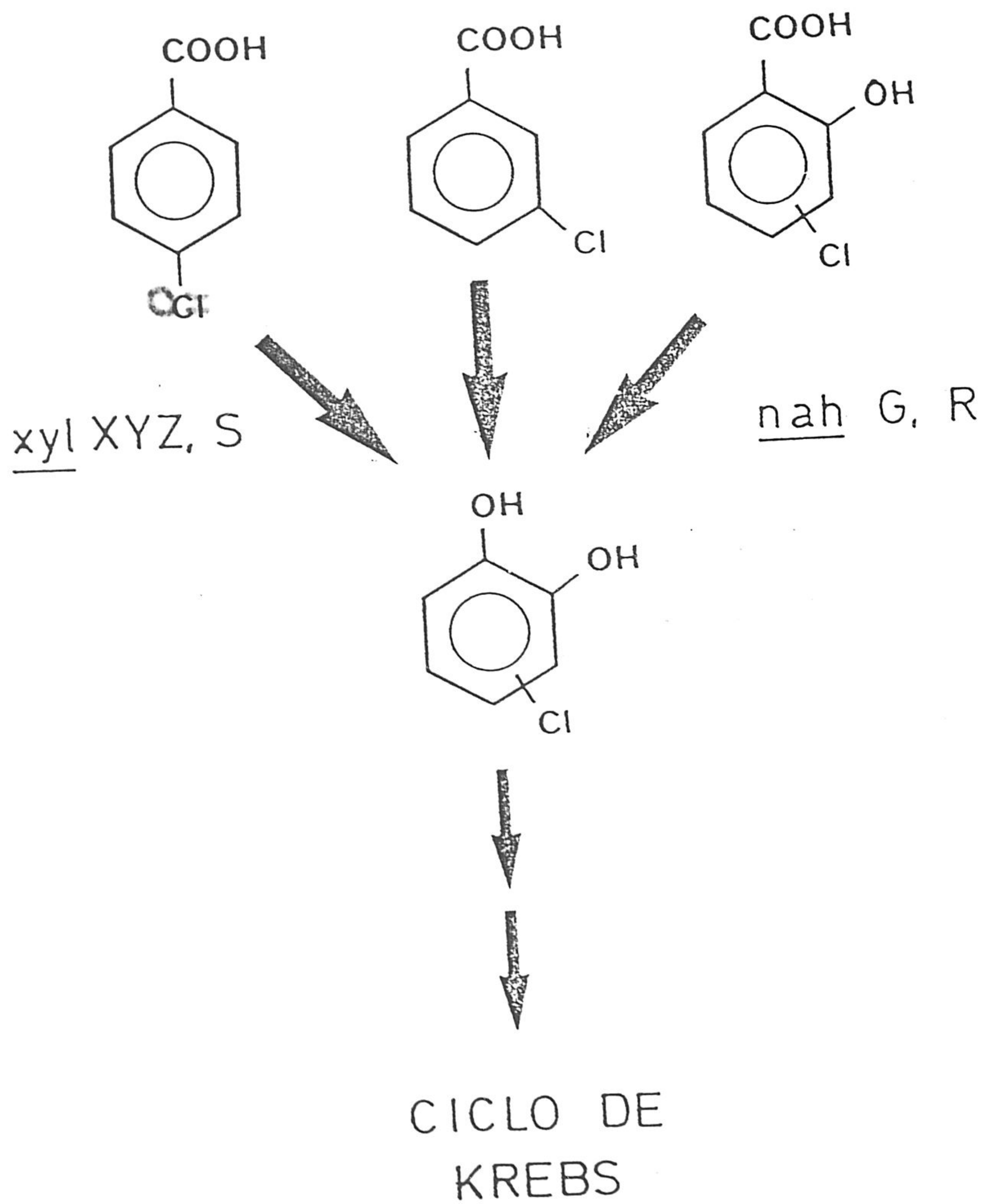


Figura 7. Evolución horizontal y vertical de la ruta del 3-clorobenzoato de *Pseudomonas* sp. B13. Los detalles de la construcción de las rutas modificadas se recogen en el texto.



$\gamma$ -metil-lactona que se acumula sin ser metabolizada. Rojo et al. (1987) clonaron en un vector de amplio espectro la  $\gamma$ -metil-lactona isomerasa de Alcalígenes que permitía la isomerización de  $\gamma$ -metil-lactona en  $\beta$ -metil-lactona, la cual fue metabolizada por una ruta cromosómica de B13. Esta bacteria presenta 4 segmentos ensamblados para crecer a expensas de metil- y clorobenzoatos, a saber, la benzoato dioxigenasa de TOL para la transformación del alquil- o clorobenzoato en el correspondiente alquil- o clorocatecol, los genes de B13 para la transformación de los catecoles en  $\gamma$ -lactona, el gen de Alcalígenes para conseguir la isomerización de ésta y finalmente una ruta cromosómica de B13 para metabolizar la  $\beta$ -lactona hasta intermediarios del ciclo de Krebs.

El plásmido pWW0-EB62 es un plásmido recombinante construido por Abril et al. (1989) y que permite el metabolismo de p-etiltolueno. La construcción implicó una serie de pasos, el primero de los cuales fue el modificar la ruta meta para permitir el metabolismo de p-etilbenzoato. La ruta meta no metaboliza p-etilbenzoato debido a que el regulador XylS no reconoce a éste como efector (Ramos et al., 1986) y porque la catecol 2,3-dioxigenasa, el enzima que rompe el anillo aromático, se inactiva por 4-etilcatecol (Ramos et al., 1987b). El mutante de xylS, xylS4, reconoce p-etilbenzoato y presenta una mutación puntual que condujo al cambio en la posición 45 del regulador, a saber Arg $\rightarrow$  Thr. Por otro lado un mutante de la catecol 2,3-dioxigenasa aislado mediante mutagénesis con nitrosoguanidina era resistente a la inactivación por p-etilcatecol y oxidaba éste al semialdehido correspondiente (Ramos et al., 1987b). El plásmido

mutante se denominó pWW0-EB6. La mutación xylS4 se recombinó en el plásmido pWW0-EB6 y dio lugar al plásmido pWW0-EB61 (Abril et al., 1989). Posteriormente pWW0-EB61 se mutagenizó con nitrosoguanidina y se aisló un mutante en la agrupación xylMA de manera que la tolueno monooxigenasa reconoce a p-etiltolueno como sustrato, y el plásmido mutante, pWW0-EB62, permitía el crecimiento de la bacteria en p-etiltolueno como única fuente de C y N.

Como se ha mencionado anteriormente el metabolismo de los nitroaromáticos se encuentra en general poco estudiado, a pesar que desde los años cuarenta se conocen los efectos perjudiciales de éstos sobre la salud (Chanon et al., 1944). En principio parece que los mononitroaromáticos como por ejemplo los nitrobenzoatos y nitrofenoles se pueden metabolizar mediante dos vías distintas, en una de ellas se libera el grupo nitro directamente (Bruhn et al., 1987; Spain et al., 1979; Zeyer y Kearney, 1984). En la segunda vía el grupo nitro se reduce vía nitroso hasta hidroxilamino, siendo el grupo hidroxilamino liberado como amonio en una deaminación oxidativa que rinde el correspondiente sustrato hidroxilado (Cain y Cartwright, 1960; Delgado, 1994; Groenewegen et al., 1992).

Recientemente Rhys-Williams et al. (1993) y Haigler y Spain. (1993) han aislado bacterias del género Pseudomonas que crecen a expensas de p-nitrotolueno como fuente de C y N. En este caso el p-nitrotolueno fue oxidado a p-nitrobenzoato en una secuencia de reacciones similares a las de oxidación de tolueno/xilenos por la ruta "upper" del plásmido TOL. El metabolismo del p-nitrobenzoato resultante no fue estudiado en detalle por ninguno

de los dos grupos arriba mencionados, aunque Haigler y Spain (1993) y Rhys-Williams et al. (1993) sugirieron que el p-nitrobenzoato se podría metabolizar vía 3,4-dihidroxibenzoato. Los aromáticos polisustituidos con grupos nitro pueden liberar éste como nitrito (Buncel, 1981). Así Lenke y Knackmuss (1992) han sugerido que la utilización de ácido pícrico (2,4,6-trinitrofenol) por Rhodococcus sp. como fuente de nitrógeno ocurre tras el ataque al anillo aromático por un ión hidruro y la liberación de un grupo nitro. El ataque por un ión hidruro generaría un intermediario de tipo sigma (Buncel, 1981), el cual pierde parcialmente la aromaticidad y se estabiliza tras liberar un grupo nitro como nitrito (Figura 8). En este trabajo de Tesis Doctoral se ha obtenido la primera evidencia para la utilización del mismo mecanismo en la eliminación de grupos nitro del anillo aromático del 2,4,6-trinitrotolueno (TNT).

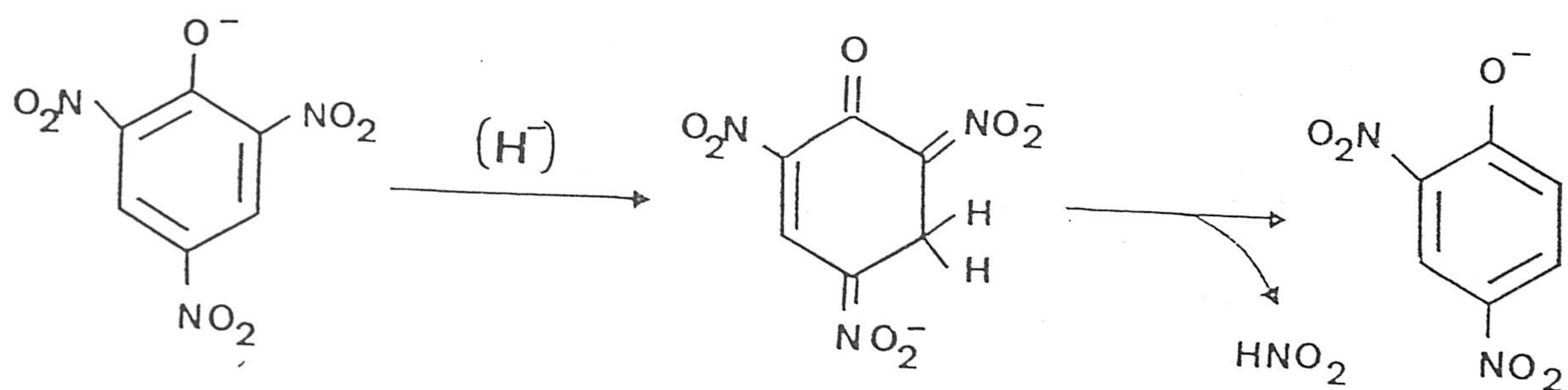


Figura 8. Mecanismo propuesto para la eliminación de nitrito a partir de ácido pícrico. El mecanismo fue propuesto por Lenke y Knackmuss (1992).

B - M A T E R I A L E S  
Y  
M E T O D O S



### B.1 ESTIRPES BACTERIANAS

Las estirpes bacterianas utilizadas en este trabajo junto con sus características más relevantes se recogen en la Tabla 1.

### B.2 CONSERVACION DE ESTIRPES BACTERIANAS

La conservación de bacterias a corto y medio plazo se hizo en placas de medios mínimos selectivos a 4°C, mientras que la conservación a largo plazo se hizo en 40% (v/v) de glicerol a -20°C y -70°C.

### B.3 MEDIOS DE CULTIVOS

La composición de los medios de cultivos utilizados en este trabajo se detallan a continuación. Como medio habitual las bacterias se cultivaron a 30°C en medio mínimo M9 o en el medio rico de Luria Bertani (LB) (Maniatis et al., 1982).

Composición del medio LB:

Bactotriptono.....	10g
Extracto de levadura.....	5g
NaCl.....	10g
H <sub>2</sub> O.....	hasta 1 litro

pH 7,0

Bactoagar(medio sólido).....	15g
------------------------------	-----

Tabla 1. Estirpes bacterianas utilizadas en este trabajo.

Organismo	Características relevantes	Origen
<u>Pseudomonas</u>		
<u>P. putida</u> 2440	Protótrofa	Franklin et al., 1981
<u>P. putida</u> EEZ15	2440 PT <sup>r</sup>	Ramos et al., 1991
<u>P. putida</u> EEZ3	2440 Rif <sup>r</sup> , Sm <sup>r</sup>	Ramos-González et al., 1991
<u>P. putida</u> PaW340	Nal <sup>r</sup> , Sm <sup>r</sup> , Trp <sup>-</sup>	S. Harayama
<u>Pseudomonas</u> sp. C1S1	TNT <sup>+</sup>	Duque et al., 1993
<u>Pseudomonas</u> sp. clón A	TNT <sup>+</sup>	Duque et al., 1993
<u>Escherichia coli</u> EEZ800	Protótrofa, Nal <sup>r</sup> , Sm <sup>r</sup>	Ramos-González et al., 1991.
<u>Erwinia chrysanthemi</u>	Protótrofa, Rif <sup>r</sup> , Sm <sup>r</sup>	Ramos-González et al., 1991

Abreviaciones: Nal<sup>r</sup>, Rif<sup>r</sup>, Sm<sup>r</sup> y PT<sup>r</sup> resistente a ácido nalidíxico, rifampicina, estreptomina y fosfotricina respectivamente. 2NT, 2-nitrotolueno y TNT, 2,4,6-trinitrotolueno.



Para el crecimiento de las bacterias en medio mínimo se utilizó una modificación del medio M9 (Maniatis et al., 1982):

10xM9.....100ml  
Solución A9("Goodies").....2,5ml  
MgSO<sub>4</sub> (1M).....1,0ml  
H<sub>2</sub>O.....hasta 1 litro

pH 7,0

Bactoagar (medio sólido)...22,5g

La solución 10xM9 consta de:

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>x12H<sub>2</sub>O.....70g  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....30g  
NH<sub>4</sub>Cl.....10g  
NaCl.....50g  
H<sub>2</sub>O.....hasta 1 litro

La solución A9 ("Goodies") tiene la siguiente composición:

HBO<sub>3</sub>.....300mg  
ZnCl<sub>2</sub>.....50mg  
MnCl<sub>2</sub>x4H<sub>2</sub>O.....30mg  
CoCl<sub>2</sub>.....200mg  
CuCl<sub>2</sub>x2H<sub>2</sub>O.....10mg  
NiCl<sub>2</sub>x6H<sub>2</sub>O.....20mg  
NaMoO<sub>4</sub>x2H<sub>2</sub>O.....30mg  
H<sub>2</sub>O.....hasta 1 litro

Como fuente de carbono en este medio mínimo se utilizó glucosa (0,5% p/v), acetato sódico (10mM), succinato sódico (10mM), benzoato sódico (5mM), 3- ó 4-metilbenzoato (5-25mM), 2,4,6-trinitrotolueno (TNT), tolueno, m-xileno y p-etiltolueno. El TNT se suministró como cristales por encima de su límite de solubilidad en agua. El tolueno, m-xileno y p-etiltolueno se suministraron en la fase gaseosa a través de una atmósfera saturada de los mismos, la cual se generó introduciendo una varilla hueca dentro del matraz de cultivo (en cultivos líquidos), o con una varilla cerrada por un extremo y depositada sobre la tapa de una placa de petri invertida (en cultivos sólidos). Para mantener la atmósfera, el frasco de cultivo líquido o la placa de petri se sellaron con papel de parafina. Cuando el  $\text{NH}_4\text{Cl}$  se omitió del medio M9, este medio y la solución 10xM9 se denominaron M8 y solución 10xM8, respectivamente. Como fuente de nitrógeno alternativa se utilizó  $\text{NaNO}_3$  (20mM), 2,4,6-trinitrotolueno (TNT), 2,6- y 2,4-dinitrotolueno, 2-, 3- y 4-nitrotolueno. El TNT, los DNTs y el 4NT se suministraron en exceso sobre su solubilidad en agua mediante la adición de cristales al medio de cultivo. Alternativamente estos compuestos se añadieron disueltos en dimetilformamida o en p-tert-butilphtalato, un compuesto inmisible con agua para alcanzar una concentración equivalente a 10mM. El 2- y 3-nitrotolueno se suministraron en la fase gaseosa como se indica arriba para el suministro de tolueno.

#### B.4 ANTIBIOTICOS

Los antibióticos se utilizaron a las siguientes concentraciones finales en el medio ( $\mu\text{g/ml}$ ): ácido nalidíxico, 10-20; ampicilina, 100; cloranfenicol, 30; estreptomina, 50-100; kanamicina, 25-50; rifampicina, 10-50 y tetraciclina, 10. Los antibióticos se prepararon 1000 veces concentrados en agua destilada y se esterilizaron por filtración a través de filtros estériles de nitrocelulosa de  $0,22\mu\text{m}$  de diámetro de poro, salvo el cloranfenicol que se preparó en etanol absoluto y la rifampicina y tetraciclina que se prepararon en metanol.

#### B.5 AISLAMIENTO DE MUTANTES ESPONTANEOS RESISTENTES A ANTIBIOTICOS.

Para seleccionar mutantes espontáneos resistentes a antibióticos de distintas cepas microbianas, primero se estimó el grado de resistencia de la bacteria a cada antibiótico utilizando en medio rico concentraciones crecientes del antibiótico test (10-100  $\mu\text{g/ml}$ ). Para aislar mutantes resistentes al antibiótico en cuestión se sembraron alrededor de  $10^9$ - $10^{10}$  células en medio sólido LB, suplementado con el antibiótico a una concentración a la que el crecimiento de la bacteria silvestre estuviera inhibido. Las colonias que aparecieron en las placas se purificaron en medio sólido LB suplementado con el antibiótico adecuado. Una colonia elegida al azar se mantuvo para experimentos posteriores. Las cepas resistentes a más de un antibiótico se obtuvieron en selecciones sucesivas, esto es, la selección de un mutante doble se hizo a partir de un mutante sencillo.

## B.6 SOLUCIONES FRECUENTEMENTE UTILIZADAS EN ESTE TRABAJO

**Solución de benzoato y sus derivados.** Estos compuestos aromáticos se prepararon en agua destilada a concentración 0,5M. Su disolución completa se consiguió añadiendo NaOH 10M hasta que el pH de la solución final alcanzó un valor de 9. Las soluciones se esterilizaron en el autoclave y se almacenaron a 4°C.

**Solución de TE.** Contenía 10mM de Tris-HCl pH 8,0 suplementado con 1mM de EDTA. Se esterilizó en el autoclave y se conservó a 4°C.

**Solución de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico.** Los cristales de fenol se fundieron a 55°C y se mezclaron con cloroformo y alcohol isoamílico en proporción 50:48:2 (v:v:v). A la mezcla se le añadió como antioxidante 8-hidroxiquinoleína (0,1% p/v). La solución se saturó con Tris-HCl 1M, pH 8,0, que se retiró y se adicionó sucesivamente hasta que la fase acuosa adquirió pH 8,0; entonces se retiró el Tris-HCl y se sustituyó por una solución de TE.

**Solución de fenol ácido.** Los cristales de fenol se fundieron a 55°C, entonces se añadió 8-hidroxiquinoleína como antioxidante (0,1% p/v) y la solución se saturó con acetato sódico 50mM, pH 4,8. La solución se almacenó a 4°C.

**Solución de bromuro de etidio.** Contenía 10 mg de bromuro de etidio en 100 ml de agua desionizada. Se mantuvo en oscuridad a temperatura ambiente.

**Solución de fosfinotricina.** Contenía 200 mg/ml de fosfinotricina en agua destilada. La solución se esterilizó por filtración a través de filtros de 0,22  $\mu\text{m}$  de diámetro.

**Solución de SDS/NaOH.** Solución de laurilsulfato sódico (SDS) al 1% (p/v) y NaOH 0,2 N. Esta solución es de preparación extemporánea.

**Tampón Tris-Borato-EDTA (10xTBE).** Un litro de una solución madre 10 veces concentrada contenía 108g de Tris-base, 55g de ácido bórico y 9,3 g de EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . El pH se ajustó a 8,2 con HCl comercial. La solución se esterilizó en el autoclave.

**Tampón de muestra para geles de agarosa.** Contenía glicerol al 30% (p/v) y azul de bromofenol al 0,7% (p/v).

**Solución de cloruro de N-naftil-etilen-diamino (NNDA).** A 100mg de este producto se añadieron a 500ml de agua destilada y se agitó hasta su disolución completa. Se almacenó a temperatura ambiente en la oscuridad.

**Solución de sulfanilamida.** A 5 g del compuesto se añadieron 200 ml de agua destilada, mientras se agitaba la solución se añadieron 100 ml de HCl comercial y una vez disuelto se añadieron 200 ml de agua. Se almacenó a temperatura ambiente en la oscuridad.

**Solución de trinitrotolueno (TNT) en agua.** En los ensayos en los que el TNT se utilizó en el medio de cultivo al límite de su solubilidad en agua, este se preparó de la siguiente manera: a un litro de agua se añadían 150mg de TNT, una cantidad de TNT por encima de su límite de solubilidad en agua (100mg/l). Tras agitar durante al menos 48h, el exceso de TNT se eliminó por filtración a través de un filtro de papel Wathman del tipo AM3 que retenía el exceso de TNT.

**Solución de aguas sintéticas.** A dos litros de agua destilada se le añadieron HNO<sub>3</sub> comercial, 1,9 ml; H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> comercial, 1,13 ml y 200mg de TNT disuelto en 2 ml de acetona, el pH se ajustó a 5,5 ó 7 con un álcali.

## **B.7 EXPERIMENTOS EN SUELOS**

### **B.7.1 SUELOS UTILIZADOS EN ESTE ESTUDIO.**

Los suelos utilizados en este trabajo fueron suelos de marga arenosos (pH 7,5 a 8,0). Las características físico-químicas de los mismos se recogen en la Tabla 2. Los suelos más utilizados en este trabajo fueron el suelo fluvisol-10 que era relativamente rico en materia orgánica (2,25% p/p) y tenía un bajo contenido en CaCO<sub>3</sub> (6,3% p/p) y el cambisol-1, el cual era relativamente pobre en materia orgánica (0,63% p/p) y tenía un alto contenido en CaCO<sub>3</sub> (23,4% p/p). Las características granulométricas de algunos de estos suelos se presentan en la Tabla 3.

Antes de su utilización los suelos se tamizaron a través de una

criba metálica de 4 mm. En los experimentos en que los suelos se esterilizaron, la esterilización se realizó en un autoclave a vapor fluyente (120°C, 1h), tres veces consecutivas esperando entre cada autoclavado unas 24h para permitir el enfriamiento de los suelos y la germinación de esporas, si las hubiese (Ciafardini y Marotta, 1989). La mayoría de los experimentos se llevaron a cabo a una humedad del 10 al 15% de la capacidad de campo. Las células se introdujeron en los suelos en 1 ml de tampón fosfato 50mM, con una densidad de aproximadamente  $10^8$  CFU ("Colony Forming Units" ó Unidades Formadoras de Colonia)/g de suelo ó a la densidad celular que se indica en cada caso.

Tabla 2. Características físico-químicas de los suelos utilizados en este trabajo.

Suelo número	Tipo	Materia orgánica	C/N	CaCO <sub>3</sub> <sup>a</sup>	pH	Cultivo
1	Cambisol	0,63	10,2	23,4	7,5	Olivo
2	Fluvisol	1,72	14,1	6,2	7,6	Patata
3	Regosol	0,47	9,7	32,2	8,3	Trigo
4	Regosol	0,64	9,5	41,7	8,3	Trigo
5	Solonchak <sup>b</sup>	0,84	11,6	23,4	7,9	Vid
6	Luvisol	0,48	9,3	26,7	7,8	Vid
7	Cambisol	0,46	7,7	12,0	8,0	Olivo
8	Regosol	2,71	9,7	30,8	7,5	Olivo
9	Fluvisol	2,53	9,5	8,4	8,5	Maíz
10	Fluvisol	2,25	10,1	6,4	8,0	Chirimoyo

a) Los datos están dados en tanto por ciento en peso

b) Este suelo contenía 28,1% (p/p) de CaSO<sub>4</sub>



Tabla 3. Análisis granulométrico de algunos de los suelos usados en este estudio.

nº de suelo	Tipo	% de suelo que fue:		
		Arena	Sedimento	Arcilla
1	Cambisol	57,42	27,61	14,97
3	Regosol	60,18	36,70	3,12
10	Fluvisol	61,08	32,47	6,45

Las determinaciones granulométricas fueron realizadas por D. Alfonso Fernández-Coto del Departamento de Físico-química Mineral de la Estación Experimental del Zaidín.

### **B.7.2 ESTIMACION DE CELULAS VIABLES EN SUELOS**

La estimación del número de células viables en los suelos (CFU) se realizó como se describe a continuación. Se tomaron 10 g de suelo que se añadieron a 90ml de tampón fosfato 50mM, la suspensión se mantuvo en agitación (150 rpm en un incubador Gallemkamp) a 30°C durante 1h. A continuación se realizaron diluciones seriadas (hasta  $10^7$ ) y las bacterias se sembraron en placas de medio selectivo para detectar entre  $10^1$  y  $10^8$  CFU/g de suelo. En cada determinación de CFU al menos se sembraron, por duplicado, tres diluciones en placas de medio sólido selectivo. Los valores presentados en la sección de Resultados representan la media de todas las diluciones contables.

### **B.8 ENRIQUECIMIENTO, AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE BACTERIAS INDIGENAS DEL SUELO.**

#### **B.8.1 ENRIQUECIMIENTO Y AISLAMIENTO DE BACTERIAS.**

Diez g de suelo sin esterilizar se añadieron a 90 ml de medio 1xM8 más la fuente de carbono y nitrógeno para la cual se deseaba seleccionar el microorganismo de interés (ver detalles específicos en la sección de Resultados). Tras mantener la suspensión en agitación durante una semana a 30°C, se realizaron diluciones seriadas que se sembraron en placas de medio selectivo. Las colonias que aparecieron en placas se purificaron mediante sucesivas estrias en medio mínimo hasta que en las placas de medio selectivo apareció un solo tipo de colonia. La pureza de los cultivos se comprobó mediante observación al

microscopio de cultivos teñidos o no con el método de gram y ensayos API (ver 2.8.2)

#### B.8.2 CARACTERIZACION DE BACTERIAS AISLADAS.

Las bacterias aisladas se caracterizaron utilizando procedimientos standard, a saber, tinción de gram y ensayos fisiológicos basados en el kit comercial API-20E (BioMérieux) para enterobacterias (ref.20 100) o el kit comercial API 20NE (BioMérieux) para identificación de bacterias gram negativas no enterobacteriáceas (ref. 20 050). Cuando se indica los cultivos puros se sometieron a ensayos de perfil de fosfolípidos mediante análisis gases-masas realizados por la compañía Microbial Identification Systems.

#### B.9 PLASMIDOS UTILIZADOS EN ESTE ESTUDIO

##### B.9.1 CARACTERISTICAS DE LOS PLASMIDOS

###### B.9.1.1 PLASMIDOS TOL.

Los plásmidos TOL de Pseudomonas putida confieren al organismo hospedador la capacidad de crecer en tolueno e hidrocarburos relacionados (Worsey y Williams, 1975). El plásmido TOL arquetipo utilizado en este trabajo fue pWW0 (IncP9, tolueno<sup>+</sup>, m-xileno<sup>+</sup>, p-etiltolueno<sup>-</sup>, Mob<sup>+</sup>, Tra<sup>+</sup>), el cual ha sido descrito con anterioridad en detalle (ver Assinder y Williams, 1990, para una revisión).

El plásmido pWW0-EB6, es un derivado de pWW0 que exhibe una mutación puntual en el gen xylE, que codifica para la catecol

2,3-dioxigenasa (C2,30). La C2,30 mutante exhibe un cambio en la posición 235, a saber, treonina→asparragina y es resistente a inactivación por p-etilcatecol (Ramos et al., 1987b; Wasserfallen, 1988).

El plásmido pWW0-EB62 es un derivado de pWW0-EB6 que porta además de la mutación en xylE otras dos mutaciones. Una, en el gen regulador xylS (xylS4, Arg45→Thr) que permite el crecimiento en p-etilbenzoato y otra en la agrupación de genes xylMA de manera que la tolueno monooxigenasa mutante admite como substrato al p-etiltolueno (Abril et al., 1989). Pseudomonas putida (pWW0-EB62) crece en tolueno, m-, y p-xileno, m-, y p-etiltolueno m- y p-metilbenzoato y m- y p-etilbenzoato. Los plásmidos pWW0-EB62K (Km<sup>r</sup>, m-xileno<sup>+</sup>) y pWW0-EB62T (Tc<sup>r</sup>, m-xileno<sup>+</sup>) se construyeron en nuestro laboratorio en Granada por M<sup>a</sup> Isabel Ramos-González, (Ramos-González et al., 1991) y portaban respectivamente un minitrasposón del tipo miniTn5 (Herrero et al., 1990) que codificaban resistencia a kanamicina y tetraciclina, respectivamente.

#### B.9.1.2 PLASMIDO SUICIDA DONADOR DE Tn5.

El plásmido autotransmisible pGS9 se utilizó como donador suicida de Tn5 a células de Pseudomonas sp. clón A. El plásmido codifica resistencia a cloranfenicol y kanamicina, esta última debida a Tn5. El plásmido contiene el origen de replicación p15A que no es reconocido en Pseudomonas y por tanto se comporta como un donador suicida de Tn5 (Selvaraj e Iyer, 1983).

### B.9.2 TRANSFERENCIA DE PLASMIDOS EN MEDIO SOLIDO.

Las bacterias donadoras y receptoras se cultivaron durante 10-12h en medio LB ó medio mínimo con los antibióticos adecuados. Alrededor de  $10^8$  células de estas cepas se recogieron independientemente por centrifugación, en una centrífuga de mesa a 12000 rpm durante 1 min. Las células se lavaron en 1 ml de LB dos veces y, finalmente, se mezclaron recogándose la mezcla por centrifugación. Las células sedimentadas se resuspendieron en  $25\mu\text{l}$  de medio LB, y se depositaron sobre un filtro estéril de nitrocelulosa tipo Millipore de  $0,22\mu\text{m}$  de diámetro de poro, que se depositó sobre la superficie de una placa de medio sólido LB. En cada ensayo se incluyeron controles de las bacterias donadoras y receptoras sin mezclar, las cuales se incubaron en las mismas condiciones que la mezcla de conjugación. Tras 12-16h a  $30^\circ\text{C}$ , las células se resuspendieron en 1 ml de tampón fosfato y se realizaron diluciones seriadas. Los transconjugantes se seleccionaron en medios mínimos apropiados que permitieron distinguirlos de los donadores y receptores. Las condiciones específicas se describen en las secciones correspondientes de Resultados. Los receptores en la mezcla de conjugación se contaron asimismo en placas de medio selectivo que permitían distinguirlos de los donadores. La frecuencia de transconjugantes se expresó como el número de transconjugantes por número de receptores.

### B.9.3 TRANSFERENCIA DE PLASMIDOS EN SUELOS.

En los experimentos de conjugación en suelos, las bacterias donadoras y receptoras se introdujeron sucesivamente en los

suelos para evitar la formación de puentes de conjugación antes de su introducción en los mismos. Los ensayos se realizaron a temperatura de 16-20°C, excepto cuando se indica. El número de células cultivables (CFU) del donador, receptor y transconjugante se determinaron como se indica en la sección 2.7.2 y se sembraron en medio selectivo para las cepas en estudio. Las placas se incubaron a 30°C y el número de colonias se contó a las 48h. Los resultados se expresaron como número de CFU de la cepa determinada por gramo de suelo y los valores dados fueron la media de todas las placas en las que fue posible contar células. Como controles se utilizaron suelos en los que se introdujeron sólo la cepa donadora o sólo la receptora, éstos se mantuvieron en las mismas condiciones que las muestras en las que donador y receptor se introdujeron conjuntamente.

#### **B.10 PREPARACION, SEPARACION ELECTROFORETICA Y VISUALIZACION DE PLASMIDOS TOL.**

Medio ml de un cultivo de Pseudomonas putida o Pseudomonas sp clón A portando un plásmido TOL y cultivadas durante la noche se centrifugó a 12000 rpm durante 1 min. Tras descartar el sobrenadante, las células se resuspendieron en 0,2 ml de una solución 25mM Tris-HCl suplementada con 25mM EDTA (pH 8,0) conteniendo 20% (p/v) de sacarosa y 1 mg de lisozima por ml. La lisozima se añadió justo en ese momento. Tras incubar 5 min a 4°C, las células se lisaron añadiendo 0,1 ml de una solución fresca que contenía 0,3 N de NaOH y 2% (p/v) de SDS. Tras mezclar suavemente por inversión, la suspensión viscosa resultante se incubó a 55°C durante 5 min para minimizar el ADN cromosómico

(Kado y Liu, 1981). Después de dos o tres extracciones con fenol cloroformo-alcohol isoamílico, 50 $\mu$ l de la fase acuosa se mezclaron con 8 $\mu$ l de tampón de carga y la preparación se sometió a electroforesis como se describe a continuación.

El gel de agarosa se preparó al 0,7% (p/v) en tampón TBE, utilizándose este mismo tampón en la separación electroforética. La mezcla ADN/tampón de carga se depositó en los pocillos del gel y se sometió a un campo eléctrico de 10V/cm durante 4h. La posición aproximada del frente electroforético se siguió visualmente observando la banda de azul de bromofenol. Cuando el frente alcanzó el borde del gel, la separación electroforética se detuvo y el gel se sumergió durante 10 min en una solución de bromuro de etidio, entonces se lavó con agua destilada y se expuso a la luz UV de 254nm en un transiluminador C-61 de la casa Ultraviolet Products Co. Los geles se fotografiaron con una cámara POLAROID provista con películas instantáneas 667, empleando un filtro Kenko R-1.

#### B.11 ENSAYO ENZIMATICO DE LA ACTIVIDAD NITRITO REDUCTASA

La actividad nitrito reductasa (NiR) en células de Pseudomonas sp. clón A se determinó *in situ* en células enteras permeabilizadas con bromuro de alquil-trimetil amonio (MTAB). Como mezcla de reacción se utilizó la descrita por Nicholas y Nason (1957) y Guerrero et al. (1981), a saber :

Tris-HCl, 500mM, pH7,5.....	0,2ml
KNO <sub>2</sub> , 5mM.....	0,1ml
Metil viológeno, 2mM.....	0,1ml
Ditionito sódico, 153mM.....	0,1ml

Suspensión bacteriana y

agua destilada.....hasta 1,0 ml

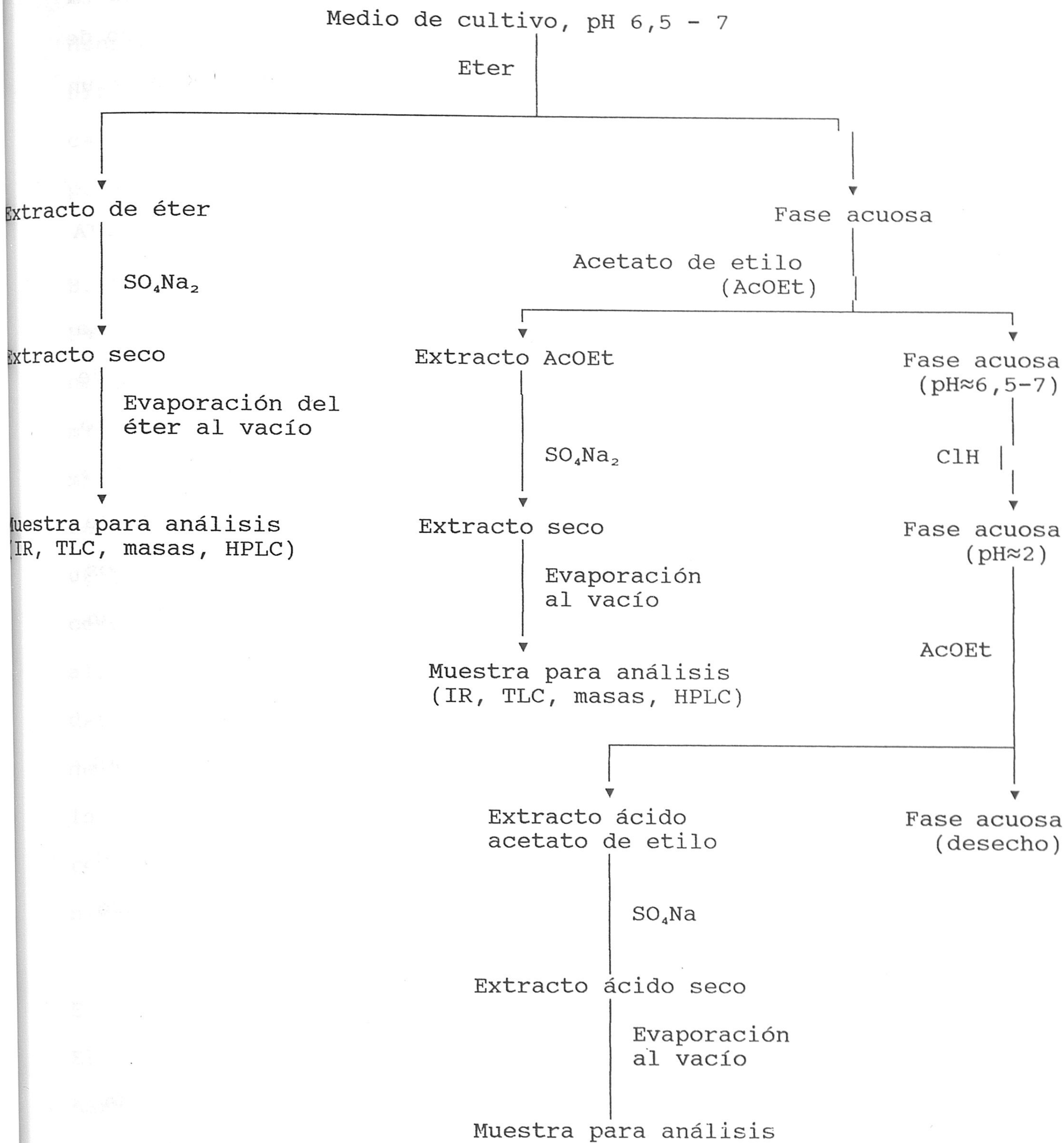
Se recogieron 10ml del cultivo por centrifugación y las células se lavaron dos veces en Tris-HCl 100 mM, pH 7,5 y se resuspendieron en 5 ml del mismo tampón. A 0,4 ml de la suspensión celular (aproximadamente 0,3-0,5 mg de proteínas) se le añadió 50µg/ml de MTAB para permeabilizar las células, tras incubarlo 20 min a 4°C se tomó una alícuota para el ensayo enzimático. A las células permeabilizadas se les añadieron los componentes de la mezcla de reacción menos el ditionito, que se adicionó en último lugar para iniciar la reacción. La mezcla de reacción se incubó a 30°C durante 30 min, y la reacción se detuvo agitando la mezcla vigorosamente hasta la oxidación del ditionito. El nitrito consumido en la reacción se determinó como se describe en la sección 2.12.4 de Materiales y Métodos. Una unidad de actividad NiR corresponde a la reducción de 1 µmol de nitrito por minuto.

## 2.12 METODOS ANALITICOS

### B.12.1 AISLAMIENTO DE METABOLITOS

Pseudomonas sp. clón A se cultivó durante distintos períodos de tiempo en condiciones aeróbicas a 30°C. Las células se separaron del medio de cultivo por centrifugación a 5000xg durante 10 minutos. El sobrenadante se enfrió a 4°C y se extrajo dos veces con éter etílico o acetato de etilo (pH 6,2 ó 2,0) como se indica en el esquema adjunto. Los extractos se secaron mediante la adición de sulfato sódico anhidro y el exceso de solvente se





ESQUEMA DE EXTRACCION DE METABOLITOS ACUMULADOS EN EL MEDIO DE CULTIVO

retiró por evaporación bajo presión a 35°C. Alternativamente, cuando se deseaba recuperar metabolitos volátiles, el exceso de solvente se evaporó a 20°C. Los metabolitos se disolvieron en un pequeño volumen de acetonitrilo.

#### **B.12.2 ANALISIS DE METABOLITOS POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION (HPLC).**

1-20  $\mu$ l de extractos de medio de cultivo preparados como se indica en el apartado anterior, o medio de cultivo libre de células, se inyectaron en un HPLC (Hewlet Packard 1050) provisto de una columna (10 cm x 0,5 cm) rellena con Hypersil-C18-ODS como fase sólida. Como fase móvil se utilizó una mezcla acetonitrilo:agua (60:40, v/v) a un flujo de 0,5 a 1 ml/min. Los compuestos aromáticos se detectaron a 254nm utilizando un detector UV/visible (Hewlet-Packard 1050).

#### **B.12.3 ANALISIS DE CROMATOGRAFIA DE GASES-ESPECTROMETRIA DE MASAS (GS-MS).**

Se llevaron a cabo en los servicios técnicos de la Universidad de Granada usando un cromatógrafo Hewlet-Packard 5890 acoplado a un espectrómetro de masas.

#### **B.12.4 DETERMINACION DE NITRITO**

El nitrito se determinó mediante la reacción de diazotación de Griess-Ilosway según el procedimiento descrito por Snell y Snell (1949). En general, se centrifugó un ml de una muestra del cultivo para separar las células. A 0,5 ml del sobrenadante se le añadieron 0,5 ml de una solución de sulfanilamida en HCl y 0,5

ml de una solución de NNDA. Transcurridos 10 min se determinó la densidad óptica de la muestra a 540 nm. La concentración de nitrito se determinó por interpolación del valor en una recta de calibrado obtenida con distintas concentraciones de nitrito potásico.

#### **B.12.5 DETERMINACION DE NITRATO.**

Para la determinación de nitrato se utilizó un electrodo ión selectivo de nitrato de la casa Crison modelo micro pH 2002. Diez ml de medio de cultivo se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 minutos en una centrífuga SORVALL modelo R5C. El sobrenadante se recogió en un tubo estéril y se congeló a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. A 5 ml del sobrenadante se le añadió agua hasta completar 50 ml, añadiéndose a continuación 1 ml de sulfato de aluminio (0,9 M) para minimizar interferencias. Entonces se determinó la conductividad de la muestra utilizando un electrodo de nitrato y un potenciómetro. La concentración de nitrato en la muestra se estimó por interpolación del valor obtenido en una recta de calibrado obtenida con distintas concentraciones de nitrato ( $10^{-4}$ - $10^{-1}$  M).

#### **B.12.6 DETERMINACION DE PROTEINA.**

El contenido de proteína se determinó siguiendo el método de Markwell et al.(1978). A alícuotas de  $50\mu\text{l}$  de muestra se adicionaron  $950\mu\text{l}$  de NaOH 0,4 N y 3 ml de la solución C. Tras agitar se incubó a temperatura ambiente durante 15 min. Posteriormente se adicionaron 0,3 ml del reactivo de Folin (Sigma art. 9001) diluido 1:1 en agua destilada y se incubó a

temperatura ambiente durante 30 min. La absorbancia de la muestra se determinó a 750 nm. Como muestras patrones se utilizaron diluciones seriadas de albúmina bovina que contenían 0, 30, 70, 150, 225 y 300  $\mu\text{g/ml}$ . La solución C se preparó antes de utilizarse y contenía 100 partes de la solución B y 1 de la solución A. La solución B contenía: 2,0% (p/v) de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0,4% (p/v) de NaOH, 0,16% (p/v) de tartrato sódico potásico y 1,0% (p/v) de SDS. La solución A contenía 4,0% (p/v) de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ . La concentración de proteína presente en las muestras ensayadas se estimó por interpolación en la curva standard que se preparó con albúmina bovina.

#### **B.12.7 RECOGIDA DE $^{14}\text{CO}_2$ POR MINERALIZACION DE p-METIL- $^{14}\text{C}$ -BENZOATO EN SUELOS.**

A 70g de suelo fluvisol-10 estéril se añadieron células de P. putida portando el plásmido TOL pWW0-EB62 cultivadas con p-metilbenzoato como fuente de carbono. La densidad celular inicial de células fue del orden de  $10^6$ - $10^7$  CFU/g de suelo. Las células se distribuyeron homogéneamente en el suelo utilizando una pipeta estéril. A continuación se añadió p-metil- $^{14}\text{C}$ -benzoato ( $5\mu\text{Ci}$  de actividad total) mezclado con p-metilbenzoato frío para obtener una actividad específica de  $0,5\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ . De nuevo se mezcló todo para obtener una distribución homogénea tanto de los microorganismos como del compuesto añadido, excepto en los casos donde se especifica lo contrario. Los recipientes con estos suelos se cerraron herméticamente y el  $^{14}\text{CO}_2$  generado se fijó en 20 ml de etanolamina que previamente se había depositado en un vaso de precipitado introducido dentro del tarro de ensayo.

Periódicamente se retiró 1 ml de la solución de etanolamina y a esta solución se le añadieron 5 ml de líquido de centelleo y se determinó el número de cuentas por minuto utilizando un detector de centelleo marca PACKARD modelo 1.500-TRI-CARB.



C - R E S U L T A D O S





La eliminación de xenobióticos de la biosfera por microorganismos es una de las aproximaciones más prometedoras de lucha contra la contaminación ambiental. En este estudio se han abordado dos aspectos distintos de lucha biológica, mediada por microorganismos recombinantes, contra la contaminación por aromáticos. Por un lado, se ha estudiado el comportamiento en suelos agrícolas de P. putida portando plásmidos TOL manipulados o no genéticamente con objeto de estudiar la supervivencia, la multiplicación y el funcionamiento de estos microorganismos en condiciones distintas a las de cultivo de laboratorio. Por otro lado, se ha aislado y manipulado genéticamente una cepa del género Pseudomonas para conseguir la mineralización de 2,4,6-trinitrotolueno (TNT), un nitroareno que es el explosivo utilizado más ampliamente.

#### **C.1 COMPORTAMIENTO EN SUELOS AGRICOLAS DE BACTERIAS RECOMBINANTES QUE MINERALIZAN ALQUILAROMATICOS.**

Una vez que se ha construido un microorganismo manipulado genéticamente para eliminar xenobióticos, es necesario evaluar su capacidad de supervivencia, y su comportamiento en condiciones distintas de las óptimas de laboratorio. Dentro del programa BAP ("Biotechnology Action Program") de la CE, el grupo de la Estación Experimental del Zaidín abordó el comportamiento en microcosmos constituidos por suelos agrícolas de Pseudomonas putida portando plásmidos TOL recombinantes. Dentro de ese programa el grupo del profesor K. Timmis del Centro Nacional de Biotecnología en Braunschweig (Alemania) estudió el comportamiento del mismo microorganismo en microcosmos acuáticos constituidos por aguas de una planta de tratamiento de aguas

urbanas. Los ensayos que se realizaron en nuestro grupo perseguían establecer un sistema modelo con una serie de ensayos standard que permitieran en el futuro, de manera fácil y rápida, evaluar el comportamiento de cualquier microorganismo recombinante en suelos. P. putida KT2440 es una cepa altamente versátil para recibir y expresar ADN recombinante. Esta cepa es la hospedadora natural del plásmido TOL pWW0, el cual codifica una ruta para la eliminación de tolueno vía benzoato y catecol (Kunz y Chapman, 1981; Worsey y Williams, 1975). P. putida KT2440 fue el hospedador elegido para expresar plásmidos recombinantes derivado de pWW0.

Para facilitar el seguimiento de Pseudomonas putida KT2440 en el suelo, se aislaron mutantes espontáneos de esta cepa resistentes al herbicida fosfinotricina (PTT). Los detalles del aislamiento de estos microorganismos los describieron Ramos y colaboradores (1991) y M.I. Ramos-González en su Tesis Doctoral (1993). En resumen, se encontró que concentraciones de alrededor de 1 mM de PTT impedían el crecimiento de P. putida KT2440 y conducían a una rápida inactivación de la glutamina sintetasa de esta bacteria. Entonces se aislaron mutantes resistentes a fosfinotricina en placas de medio mínimo con glucosa como fuente de carbono y conteniendo 1 mM del herbicida. Estos mutantes aparecieron con una frecuencia de alrededor de  $10^{-7}$  por célula y por generación (Ramos et al., 1991). Uno de los mutantes, denominado P. putida EEZ15, se utilizó en gran parte en los experimentos que se llevaron a cabo dentro de este trabajo. Como era de esperar los cultivos de las bacterias mutantes expuestas a PTT mantenían altos niveles de actividad glutamina sintetasa y crecían en

presencia del herbicida tan rápidamente como la cepa silvestre en ausencia de este inhibidor. Una serie de ensayos pusieron de manifiesto que el bloqueo en la entrada del herbicida al interior de la célula era, probablemente, el mecanismo responsable de la resistencia al mismo (Ramos-González, 1993).

#### C.1.1 SUPERVIVENCIA DE PSEUDOMONAS PUTIDA EN SUELOS.

##### C.1.1.1 SUPERVIVENCIA DE P. putida EEZ15 PORTANDO EL PLASMIDO pWW0-EB62 EN DIFERENTES SUELOS. ESTABILIDAD GENETICA DEL PLASMIDO RECOMBINANTE.

La supervivencia de P. putida EEZ15 (pWW0-EB62) se ensayó primero en diez suelos del área de Granada que se esterilizaron como se describió en Materiales y Métodos (Tablas 2 y 3). P. putida EEZ15 (pWW0-EB62) se introdujo en esos suelos a una densidad celular inicial (CFU "colony forming units") de alrededor de  $10^8$  CFU/g de suelo. En general las bacterias se añadieron a los suelos en relativo alto número ya que éstas se diseñaron para eliminar contaminantes. El número de bacterias cultivables (CFU) se estimó a lo largo del tiempo sembrando diluciones seriadas de las muestras de suelo en placas de medio mínimo con p-etilbenzoato como única fuente de carbono y con 1 mM de fosfotricina (PTT). En primer lugar se ha de indicar que inmediatamente después de la introducción de las bacterias en los suelos, la capacidad de recuperación de microorganismos de los mismos fue en todos los casos superior al 95% de las bacterias introducidas, excepto en el Solanckack suelo-5, rico en sulfato cálcico, del cual se recuperaron menos del 50% de la carga inicial. Estos resultados

sugieran que, en general, la introducción del microorganismo recombinante en los suelos no representó un choque ambiental para los mismos. Se observó que en el fluvisol-10 el número de CFU/g de suelo permaneció prácticamente constante en experimentos de hasta un mes (Figura 9). En todos los demás suelos del área de Granada, el número de bacterias decreció durante las dos primeras semanas, después el número de CFU/g de suelo permaneció relativamente constante. En estos casos, las bacterias se establecieron al nivel de entre  $10^3$  y  $10^6$  CFU/g de suelo (Ver Tabla 4). La Fig.9 muestra la supervivencia a lo largo del tiempo de la cepa en el fluvisol-10, el cambisol-1 - un suelo mediterráneo típico - y en el regosol suelo-3. Se ensayó asimismo la supervivencia de la cepa en un suelo procedente de un desierto de zinc en la región de Sommel en Bélgica, que se encuentra contaminado por metales pesados (gramos del metal por Kg de suelo: Zn 16,5; Pb 2,6 y Cu 6,7). En este suelo se observó que el número de CFU/g de suelo disminuía uniformemente con el tiempo hasta llegar a nuestros límites de detección (Fig.9).

El plásmido TOL pWW0-EB62 contiene dos segmentos de ruta catabólica, el segmento "upper" que permite el metabolismo de tolueno y xilenos hasta benzoato y toluatos y el segmento meta que permite la mineralización de los últimos (ver Introducción). Con objeto de estudiar si la introducción de las bacterias en el suelo tenía algún efecto sobre la estabilidad de las rutas catabólicas, las bacterias se añadieron al fluvisol suelo-10 y al cambisol suelo-1 estimándose a lo largo del tiempo el número de CFU/g suelo sembrando en placas con m-xileno, m-toluato y p-etilbenzoato como única fuente de C y energía. Los resultados

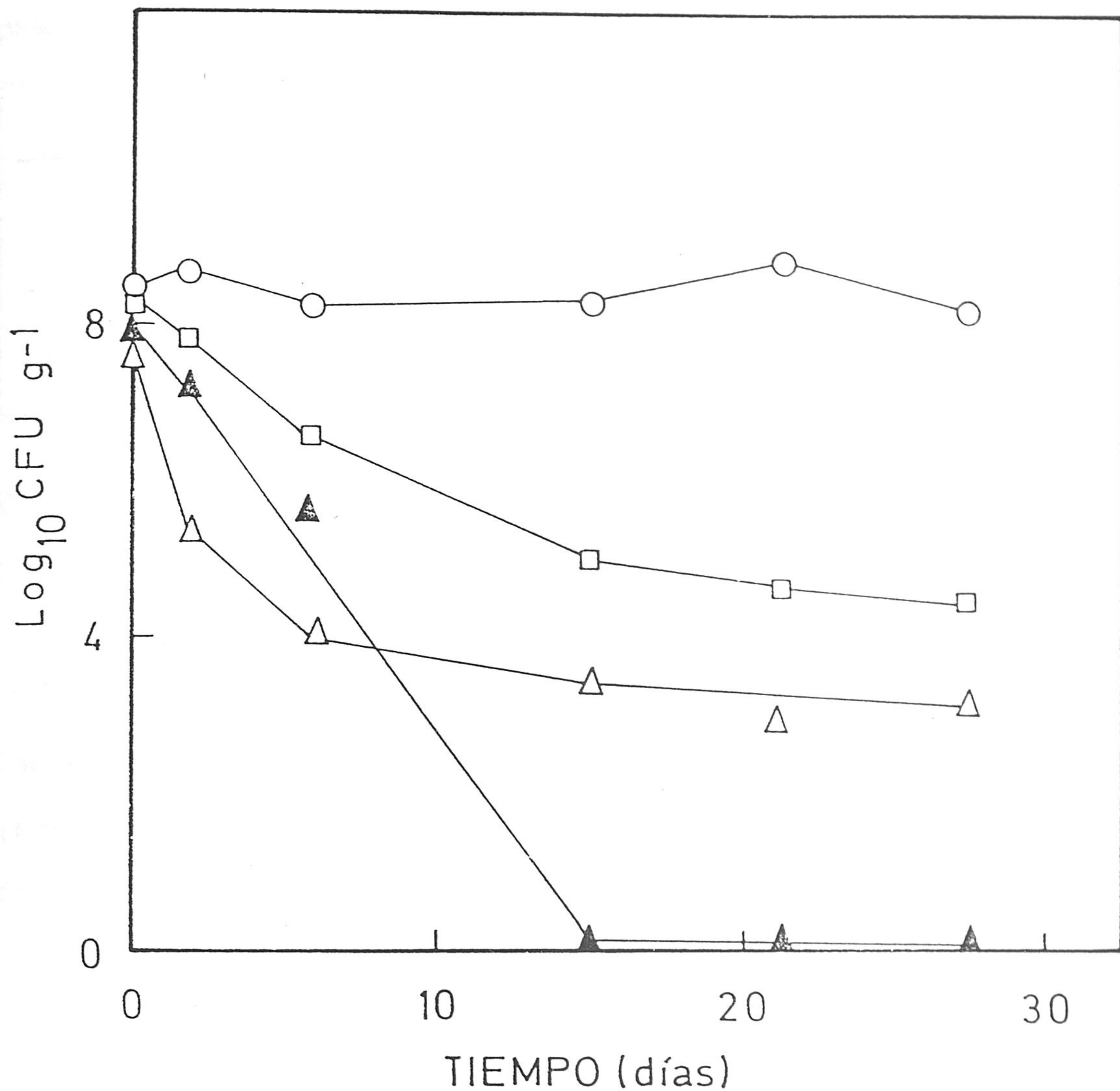


Figura 9. Supervivencia a lo largo del tiempo de *P. putida* EEZ15 (pWWO-EB62) en el laboratorio en diferentes suelos. *P. putida* EEZ15 (pWWO-EB62) se introdujo en suelos del área de Granada (cambisol-suelo 1 (□), regosol suelo-3(Δ), y fluvisol suelo-10 (○)) y en un suelo contaminado con metales pesados (▲) procedente de un desierto de zinc en Bélgica. Los suelos se inocularon a una densidad celular inicial de alrededor de  $10^8$  CFU/g de suelo. El número de CFU/g de suelo se determinó a los tiempos señalados sembrando en placas de medio selectivo con p-etilbenzoato como única fuente de carbono y 1 mM de fosfotricina.

Tabla 4. Supervivencia en distintos suelos de P. putida EEZ15 (pWWO-EB62)

Suelo número y tipo	CFU/g de suelo
Cambisol-1	$2 \times 10^3$
Fluvisol-2	$1 \times 10^5$
Regosol-3	$2 \times 10^5$
Regosol-4	$4 \times 10^6$
Solanchak-5	$< 10^2$
Luvisol-6	$3 \times 10^6$
Cambisol-7	$4 \times 10^4$
Regosol-8	$5 \times 10^5$
Fluvisol-9	$3 \times 10^7$
Fluvisol-10	$1 \times 10^8$

P. putida EEZ15 (pWWO-EB62) se introdujo en los suelos arriba indicados para alcanzar una densidad celular inicial del orden de  $10^8$  CFU/g de suelo. El número indicado en la tabla son las bacterias (CFU/g suelo) contadas tras un mes en los suelos mantenidos a  $17^{\circ}$ - $20^{\circ}$ C. Las bacterias se contaron en placas de medio mínimo M9 con p-etilbenzoato como fuente de C y 1 mM de PTT.

Tabla 5. Estabilidad de las rutas catabólicas del plásmido TOL pWWO-EB62 en bacterias introducidas en el suelo.

Suelo-1			Suelo-10		
m-xileno	4-EB	benzoato	m-xileno	4-EB	benzoato
$4 \times 10^5$	$6 \times 10^5$	$5 \times 10^5$	$2 \times 10^8$	$3 \times 10^8$	$2 \times 10^8$

*P. putida* (pWWO-EB62) se introdujo en los suelos arriba indicados para alcanzar una densidad celular inicial del orden de  $10^8$  CFU/g de suelo. El número indicado en la tabla son las bacterias (CFU/g suelo) contadas tras un mes en los suelos, mantenidos a  $17^{\circ}$ - $20^{\circ}$ C. Las bacterias se contaron en placas de medio mínimo con m-xileno (suministrado como vapor) o conteniendo 5 mM de p-etilbenzoato (4-EB) o benzoato.

obtenidos se muestran en la Tabla-5. Se observó que cuando se utilizó m-xileno o m-tolurato en lugar de p-etilbenzoato como fuente de carbono en los conteos de microorganismos, el número de CFU/g suelo fue similar al determinado con p-etilbenzoato en experimentos de hasta un mes de duración. Por otra parte el 100% de las colonias que crecieron en placas con p-etilbenzoato crecieron cuando se replicaron en placas con m-tolurato o m-xileno como fuente de C; asimismo el 100% de las bacterias que crecieron en placas con m-tolurato o m-xileno crecieron con p-etilbenzoato como fuente de C. Estos resultados sugerían que la información genética de las rutas catabólicas codificadas por el plásmido pWW0-EB62 es altamente estable en bacterias introducidas en suelos.

Se consideró de interés determinar si el plásmido TOL pWW0-EB62 en P. putida se mantenía de manera estable en la cepa. Para ello alrededor de  $10^8$  CFU/g de P. putida EEZ15 (pWW0-EB62) se introdujeron en el fluvisol suelo-10 y a lo largo del tiempo las bacterias se sembraron en placas de medio mínimo con fosfinotricina y glucosa - cuyo metabolismo requiere una ruta cromosómica - ó p-etilbenzoato - cuyo metabolismo requiere la ruta meta modificada de TOL -. El número de CFU/g suelo se mantuvo alrededor del número inicial de CFU/g suelo, siendo los conteos en ambos medios similares en experimentos de 1 mes de duración. Estos resultados sugerían que el plásmido recombinante pWW0-EB62 en P. putida EEZ15 se mantenía establemente en las bacterias introducidas en el suelo. Además, el 100% de las colonias que crecieron en placas de glucosa crecieron cuando se replicaron en placas con p-etilbenzoato como única fuente de



carbono y viceversa.

Para determinar si las bacterias rescatadas del suelo conservaban las propiedades de la cepa que se introdujo en los mismos, se determinó la tasa de crecimiento en medio mínimo con p-etilbenzoato, benzoato y glucosa de P. putida EEZ15 (pWW0-EB62) mantenida en el laboratorio sin pasar por el suelo y P. putida EEZ15-S (pWW0-EB62), que es un clón elegido al azar de entre los recuperados del suelo. Los tiempos de generación estimados para ambos microorganismos en p-etilbenzoato, benzoato y glucosa fueron 75, 60 y 90 minutos respectivamente. Para determinar si el pase por el suelo de P. putida EEZ15 (pWW0-EB62) afectó favorable o desfavorablemente a la misma, el clón anterior del suelo, el denominado P. putida EEZ15-S (pWW0-EB62) se introdujo de nuevo en el fluvisol-10, el cambisol-1 y el regosol-3, siguiéndose la supervivencia de nuevo en experimentos de un mes de duración. La supervivencia de este clón fue similar a la descrita anteriormente para la bacteria que se introdujo en el suelo por primera vez (no mostrado).

#### C.1.1.2 SUPERVIVENCIA DE P. putida EEZ15 CON Y SIN PLASMIDOS TOL EN SUELOS.

Esta serie de experimentos se diseñaron para estudiar si la presencia del plásmido TOL recombinante pWW0-EB62 tenía algún efecto beneficioso o perjudicial sobre la supervivencia de P. putida EEZ15 en suelos con y sin p-etilbenzoato. En esta serie de ensayos se utilizaron tres cepas, a saber, P. putida EEZ15 - libre de plásmido -, P. putida EEZ15 portando el plásmido TOL silvestre pWW0 y P. putida EEZ15 portando el plásmido

recombinante pWW0-EB62. Cada cepa se introdujo independientemente en dos suelos estériles (cambisol-1 y regosol-3) suplementados o no con 0,1% (p/p) p-etilbenzoato para alcanzar una densidad celular inicial del orden de  $10^8$  CFU/g suelo. En los suelos no suplementados la supervivencia de P. putida (pWW0-EB62), P. putida EEZ15 (pWW0) y P. putida EEZ15 fue similar, sin embargo la adición de 0,1% (p/p) de p-etilbenzoato favoreció el crecimiento de la cepa que portaba el plásmido pWW0-EB62, mientras que tuvo efectos negativos en la supervivencia de las otras dos cepas. La Figura 10 muestra los resultados obtenidos en el regosol-3, los cuales fueron similares a los obtenidos en el suelo cambisol-1. Por tanto, en estos suelos la presencia del plásmido recombinante pWW0-EB62 confirió ventajas a la célula huésped frente a células bien sin plásmido o con el plásmido silvestre pWW0 solo cuando los suelos estaban suplementados con p-etilbenzoato.

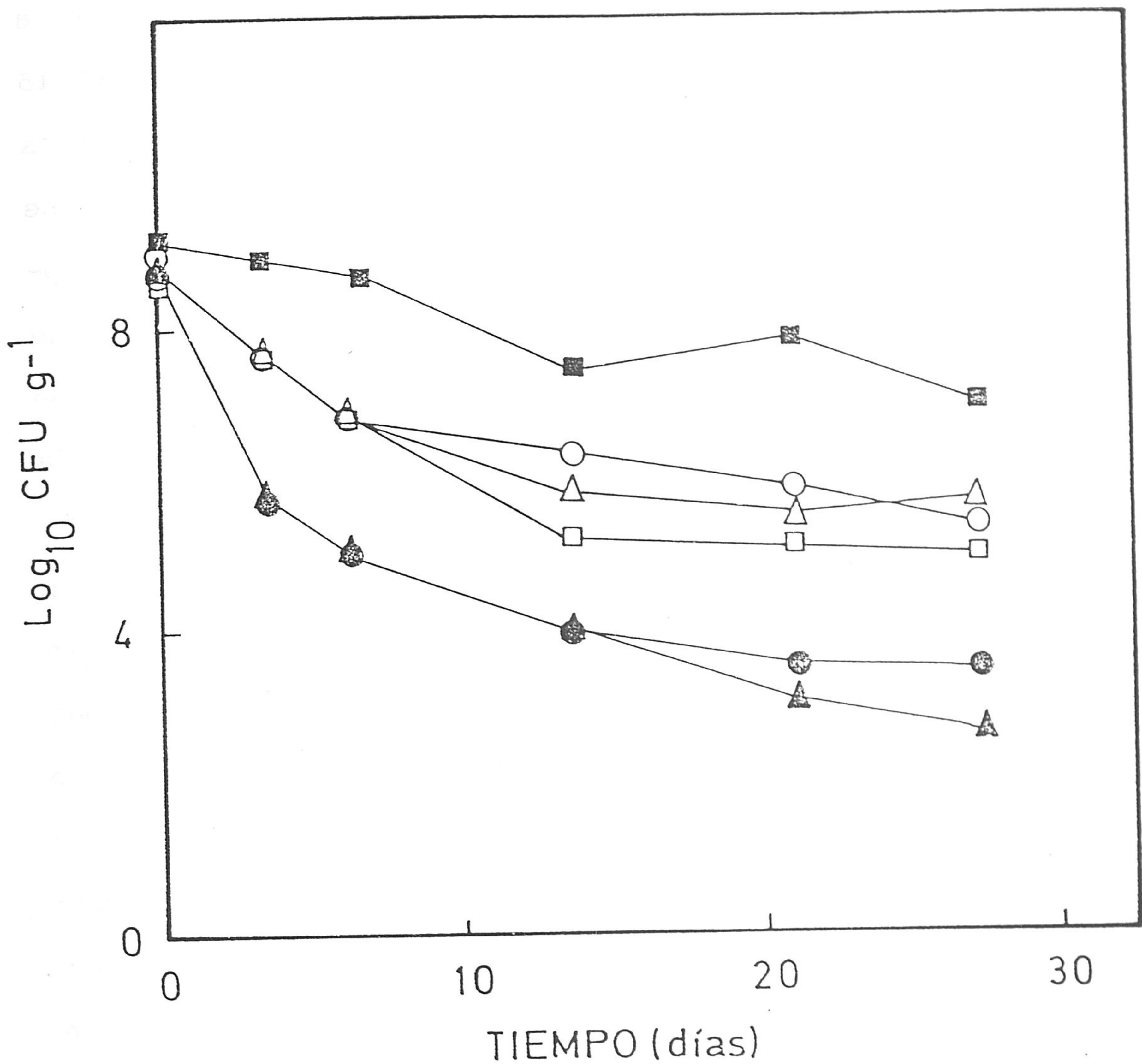


Figura 10. Supervivencia de *P. putida* EEZ15 portando o no el plásmido silvestre TOL o el plásmido recombinante pWW0-EB62 en el regosol suelo-3. Tarros independientes con 70 g de regosol suelo-3 suplementados (cerrados) o no (abiertos) con 0,01% (p/p) p-etilbenzoato se inocularon con *P. putida* EEZ15 ( $\Delta, \blacktriangle$ ), *P. putida* EEZ15 portando el plásmido TOL silvestre ( $\circ, \bullet$ ), y *P. putida* con el plásmido pWW0-EB62 ( $\square, \blacksquare$ ). Las bacterias (CFU/g suelo) se contaron en medio mínimo conteniendo 1 mM de fosfotricina más benzoato, m-metilbenzoato, y p-etilbenzoato, respectivamente, como fuente de carbono.

### C.1.1.3 MULTIPLICACION DE P. putida EEZ15 (pWWO-EB62) EN SUELOS.

La serie de experimentos anteriores indicaban que la bacteria P. putida EEZ15 (pWWO) sobrevivía en distintos suelos y en distintas condiciones. La serie de experimentos que se describen a continuación se diseñaron para determinar si P. putida EEZ15 (pWWO-EB62) se multiplicaba en el suelo. Para ello, tarros duplicados conteniendo suelo cambisol-1 y fluvisol-10 se inocularon con bacterias cultivadas en medio mínimo con p-etilbenzoato como fuente de carbono para alcanzar una densidad celular inicial de alrededor de  $10^4$  y  $10^6$  CFU/g de suelo. Se observó que en el suelo cambisol-1 el número de bacterias tendía a estabilizarse a alrededor de  $10^5$  CFU/g de suelo ( $8 \times 10^4$  a  $2 \times 10^5$ ), esto es, se observó un pequeño aumento cuando las bacterias se introdujeron a la densidad celular más baja y un pequeño descenso cuando las bacterias se introdujeron a densidades celulares más altas (Figura 11). En contraste en el fluvisol-10 el número de CFU/g de suelo incrementó con el tiempo hasta alcanzar densidades celulares del orden de  $10^8$  CFU/g suelo (Figura 11). Estos resultados sugerían que P. putida EEZ15 (pWWO-EB62) no sólo sobrevivía en suelos sino que en las condiciones adecuadas se multiplica hasta alcanzar niveles relativamente constantes.

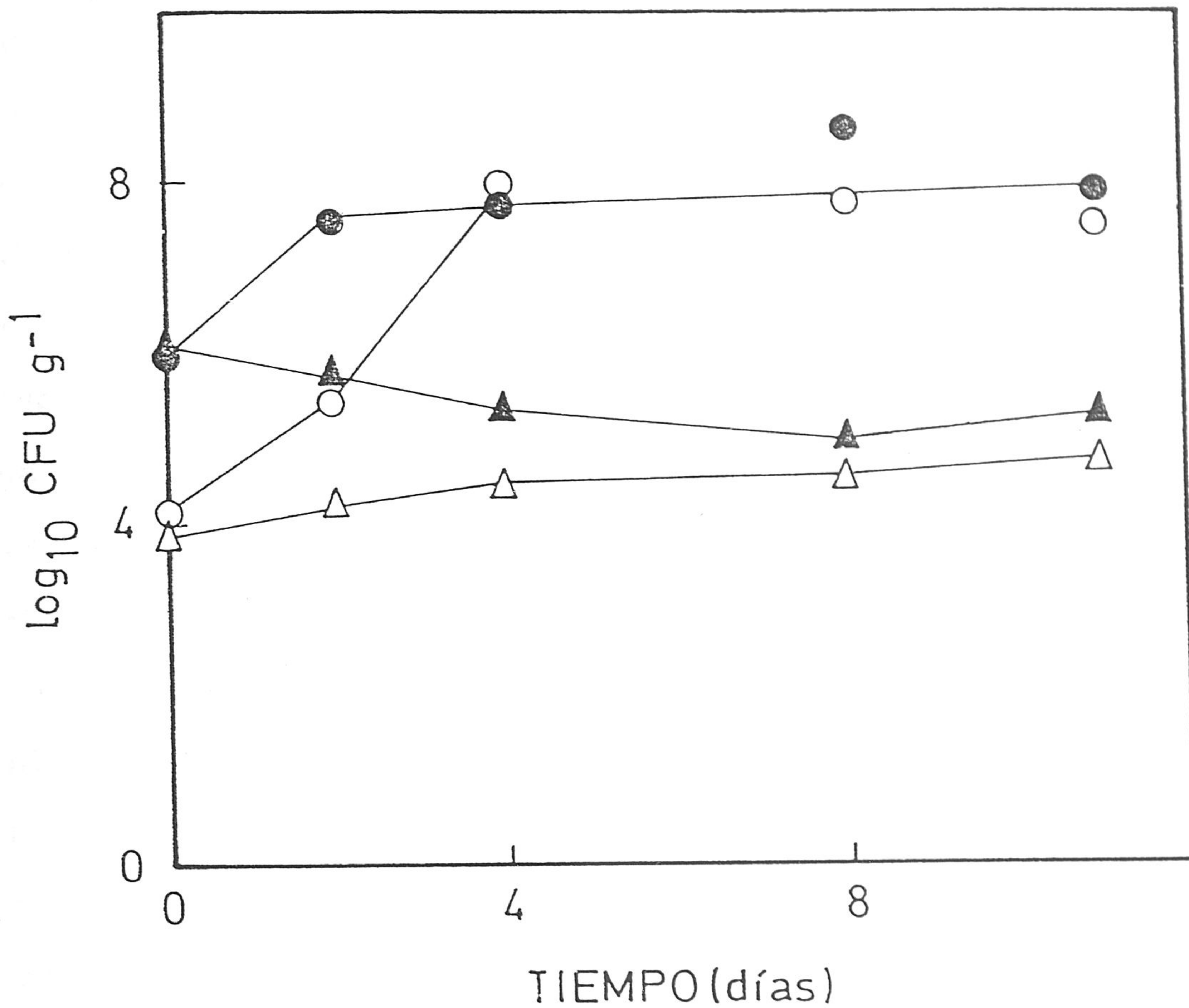


Figura 11. Multiplicación en suelos de *P. putida* (pWW0-EB62). Alrededor de  $10^4$  o  $10^6$  CFU/g de suelo se introdujeron en el fluvisol suelo-10 (círculos) o en el cambisol suelo-1 (triángulos). A los tiempos indicados se determinó el número de CFU/g de suelo en medio selectivo para el microorganismo.

#### C.1.1.4 SUPERVIVENCIA DE P.putida EEZ15 (pWW0-EB62) EN SUELOS SUPLEMENTADOS CON ACIDOS CARBOXILICOS AROMATICOS.

Tres ácidos carboxílicos aromáticos diferentes, a saber, p-etilbenzoato, p-clorobenzoato y salicilato se añadieron a los suelos en los cuales P. putida EEZ15 (pWW0-EB62) se había introducido a una densidad celular inicial de alrededor de  $10^8$  CFU/g de suelo. Estos aromáticos se eligieron porque los tres son efectores de la proteína XylS4, codificada por el gen mutante xylS4 presente en el plásmido recombinante pWW0-EB62, y por tanto esos compuestos podían inducir la síntesis de los enzimas de la ruta meta del plásmido pWW0-EB62 (Ramos et al., 1986). Sin embargo esta bacteria no puede metabolizar salicilato porque carece del enzima salicilato deshidrogenasa que permitiría su oxidación hasta catecol. El p-clorobenzoato se metaboliza por P. putida EEZ15 (pWW0-EB62) hasta el semialdehído del ácido 2-cloromucónico, en esta biotransformación la bacteria no obtiene energía y el intermediario resultante es tóxico para la célula (Reineke et al., 1982). Por otro lado el p-etilbenzoato es mineralizado por P. putida (pWW0-EB62). La Figura 12 resume las vías de metabolización de esos compuestos por este microorganismo recombinante.

Los suelos cambisol-1, regosol-3 y fluvisol-10 se suplementaron o no con p-etilbenzoato (0,01; 0,1 y 1 g/100 g de suelo) y se inocularon con alrededor de  $10^8$  CFU de P. putida EEZ15 (pWW0-EB62) por gramo de suelo. En los suelos cambisol-1 y regosol-3 los resultados fueron similares y la Figura 13 recoge los resultados obtenidos con el suelo cambisol-1. Bajas concentraciones de p-etilbenzoato (0,01 y 0,1% (p/p))

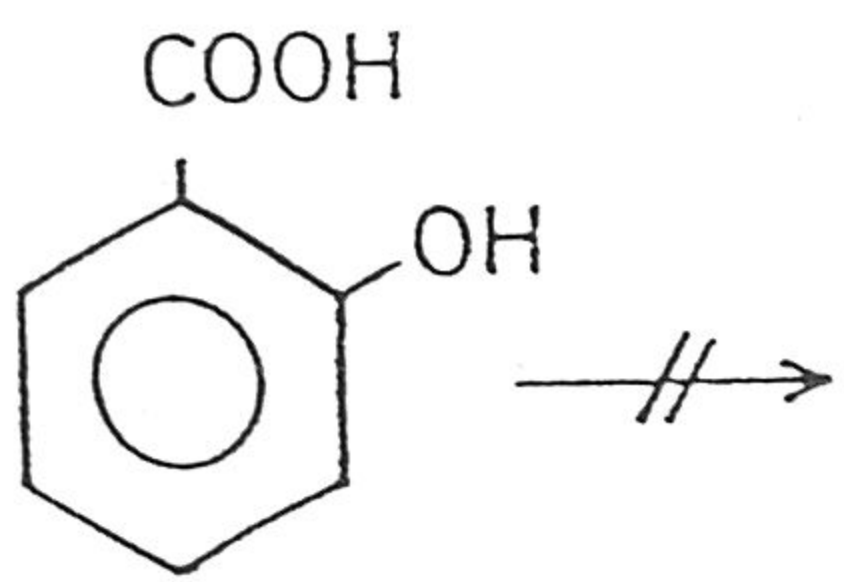
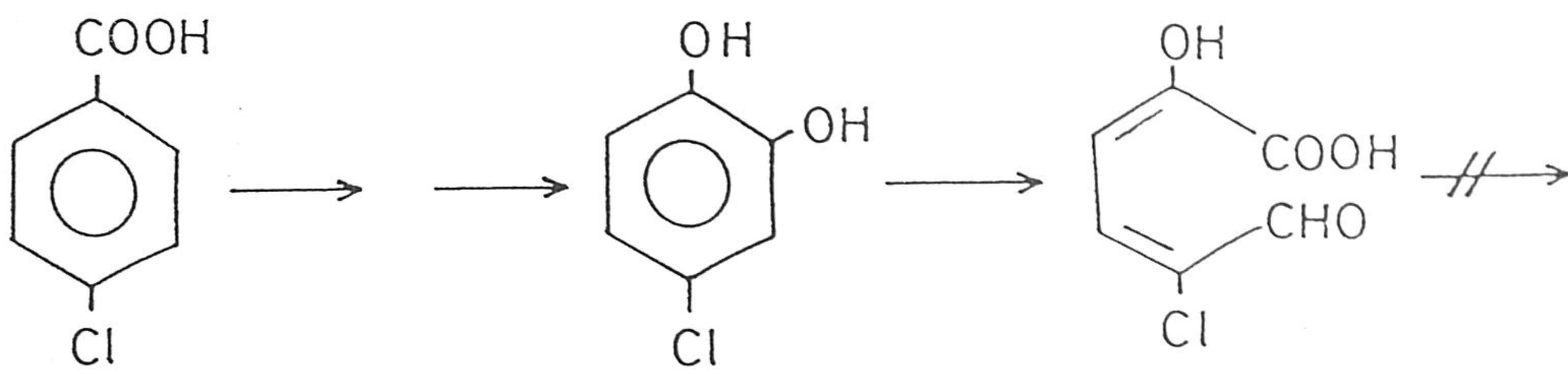
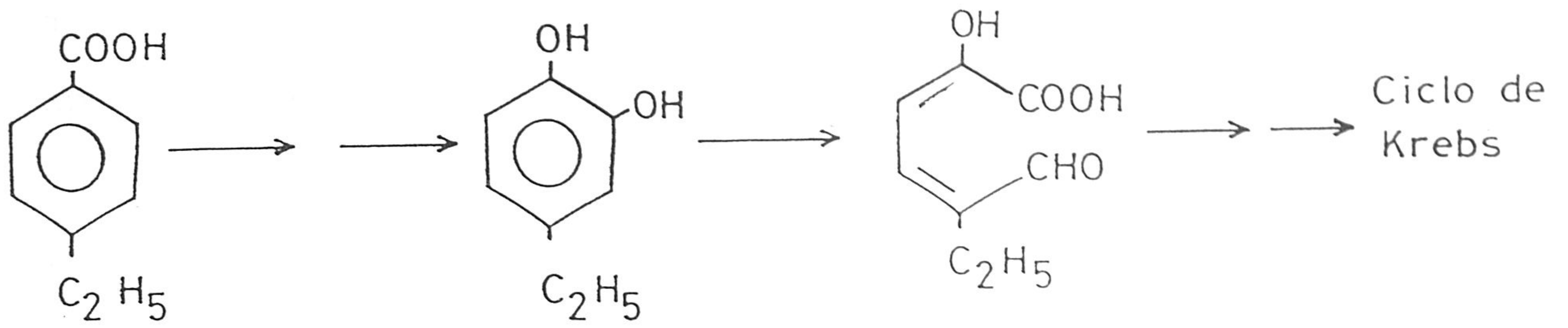


Figura 12. Metabolismo de distintos ácidos carboxílicos por *P. putida* (pWW0-EB62).

favorecieron la supervivencia de la bacteria, mientras que altas concentraciones (1% (p/p)) tenían un efecto perjudicial para la supervivencia del microorganismo. De hecho después de 18 días, el número de bacterias llegó a estar por debajo de nuestro límite de detección. Este efecto perjudicial se observó también cuando se añadió 1% (p/p) p-etilbenzoato a los suelos en los cuales P. putida EEZ15 (pWW0-EB62) había estado expuesta durante 18 días a bajos niveles de p-etilbenzoato (Figura 13).

En el suelo fluvisol-10 las concentraciones más bajas de p-etilbenzoato no ejercieron efecto sobre la supervivencia del microorganismo, mientras que la presencia de p-etilbenzoato a alta concentración (1% (p/p)) tuvo un efecto detrimental ya que el número de CFU/g suelo disminuía con el tiempo. Sin embargo en este suelo el efecto perjudicial no fue tan drástico como en los otros dos suelos ensayados en esta serie de experimentos.

En el suelo cambisol-1 se introdujo salicilato y p-clorobenzoato para alcanzar una concentración de 0,1% (p/p). El salicilato no tuvo aparentemente efecto alguno sobre la supervivencia de P. putida EEZ15 (pWW0-EB62), mientras que el p-clorobenzoato tuvo un claro efecto perjudicial. Esto se hizo especialmente evidente en las dos primeras semanas, si bien el número de CFU/g suelo se estabilizó después (Figura 13).



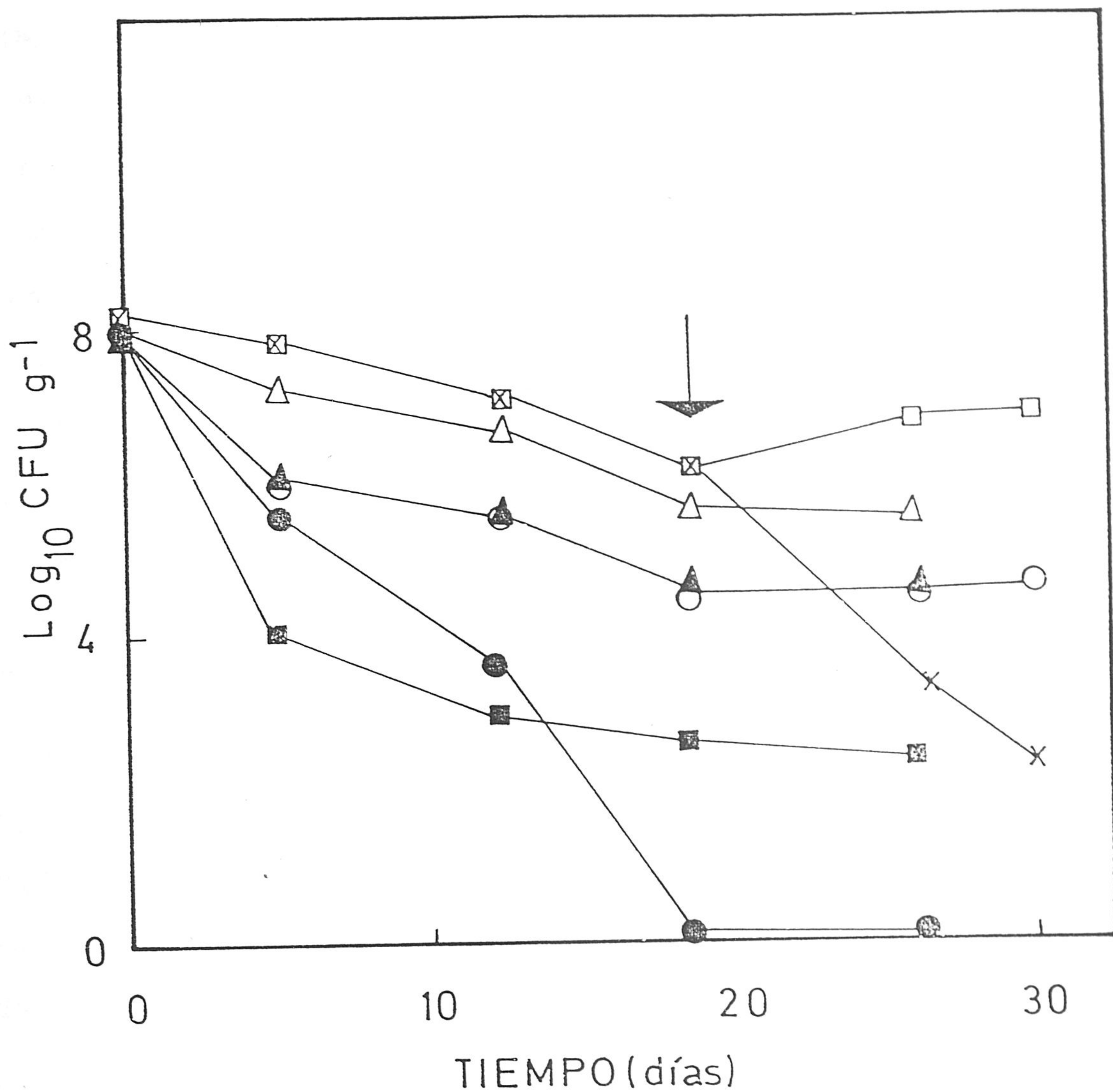


Figura 13. Supervivencia de *P. putida* EEZ15 (pWW0-EB62) en el suelo cambisol-1 suplementado con distintos ácidos carboxílicos. Las células se añadieron para alcanzar una densidad inicial de alrededor de  $10^8 \text{ CFU/g}$  de suelo a tarros conteniendo 70 g de suelo cambisol-1 sin adición de aromáticos (○) o suplementados con 0,01% (p/p) (Δ), 0,1% (p/p) (□) y 1% (p/p) (●) p-etilbenzoato, 0,1% (p/p) salicilato (▲), y con 0,1% (p/p) p-clorobenzoato (■). La flecha indica que a los 18 días se dividió el suelo del tarro (□) en dos partes, a una de las cuales se le añadió 1% (p/p) p-etilbenzoato (x) manteniéndose la otra como control.

#### C.1.1.5 EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA SUPERVIVENCIA DE EEZ15 (pWW0-EB62) EN SUELOS.

Alrededor de  $10^8$  CFU P. putida EEZ15 (pWW0-EB62) por gramo de suelo se introdujeron en los suelos cambisol-1 y fluvisol-10 suplementados o no con p-etilbenzoato (0,1% p/p). Los tarros se incubaron a 4, 25 y 37°C. En el suelo mediterráneo típico cambisol-1, la supervivencia de P. putida EEZ15 (pWW0-EB62) fue mejor a 4 y 25°C que a 37°C, ya que a esta última temperatura se redujo marcadamente su supervivencia, tanto en presencia como en ausencia de p-etilbenzoato. Así en el suelo cambisol-1 el nivel de establecimiento fue del orden de  $10^2$  CFU/g suelo tras 21 días de incubación frente a  $10^8$  CFU/g suelo al inicio del experimento (Tabla 6). En el suelo fluvisol-10 la supervivencia de esta bacteria a 4 y 25°C fue también mejor que a 37°C. Se ha de hacer notar que el nivel de establecimiento de P. putida EEZ15 (pWW0-EB62) en el suelo fluvisol-10 a 37°C fue  $10^5$  CFU/g tras 21 días de incubación, mientras que a 4°C el número de microorganismos fue de  $10^8$  CFU/g suelo.

Tabla 6. Supervivencia de P.putida EEZ15(pWW0-EB62) en un suelo típico mediterráneo cambisol suelo-1 y fluvisol suelo-10 a diferentes temperaturas<sup>a)</sup>.

Supervivencia de <u>P.putida</u> en:						
p-etil- benzoato	Cambisol suelo-1			Fluvisol suelo-10		
	4°C	25°C	37°C	4°C	25°C	37°C
-	10 <sup>-3</sup>	5x10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	5x10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-1</sup>	3x10 <sup>-3</sup>
+	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-8</sup>	1	1	10 <sup>-3</sup>

a) Dos tarros independientes duplicados se inocularon con P.putida EEZ15 (pWW0-EB62) a densidades de 2x10<sup>8</sup> y 5x10<sup>8</sup> CFU/g de suelo. Los valores dados son la media de la razón entre el número de CFU después de 30 días de incubación a la temperatura indicada y el número de CFU determinada en el momento de la inoculación. La desviación estándar era del 5 al 20% de los valores dados.

#### C.1.1.6 SUPERVIVENCIA A LARGO PLAZO DE P.putida EEZ15 (pWW0-EB62) EN SUELOS ESTERILES.

Los experimentos anteriores mostraron que la supervivencia de P.putida (pWW0-EB62) en el suelo fluvisol-10 se acercó al 100% en ensayos a corto plazo (1 mes). En esta serie de ensayos se ensayó la supervivencia a largo plazo en suelos estériles suplementados o no con 0,01% (p/p) de p-etilbenzoato. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 14. Se observó que el número de CFU/g de suelo disminuyó al nivel del 0,05% tras 12 meses en suelo no suplementado con el aromático. De nuevo la adición de bajas cantidades de p-etilbenzoato al suelo favoreció la supervivencia de la bacteria, la cual fue al menos 1 orden de magnitud más alto que en los suelos sin adición (Figura 14). En el suelo cambisol-1 se observó a corto plazo una disminución del número de CFU/g de suelo, en este suelo sin p-etilbenzoato el número de CFU disminuyó por debajo de nuestros límites de detección tras 2,5 meses, sin embargo en suelos suplementados con p-etilbenzoato (0,01% (p/p)) se detectaron al menos  $10^3$  CFU/g de suelo durante 9 meses.

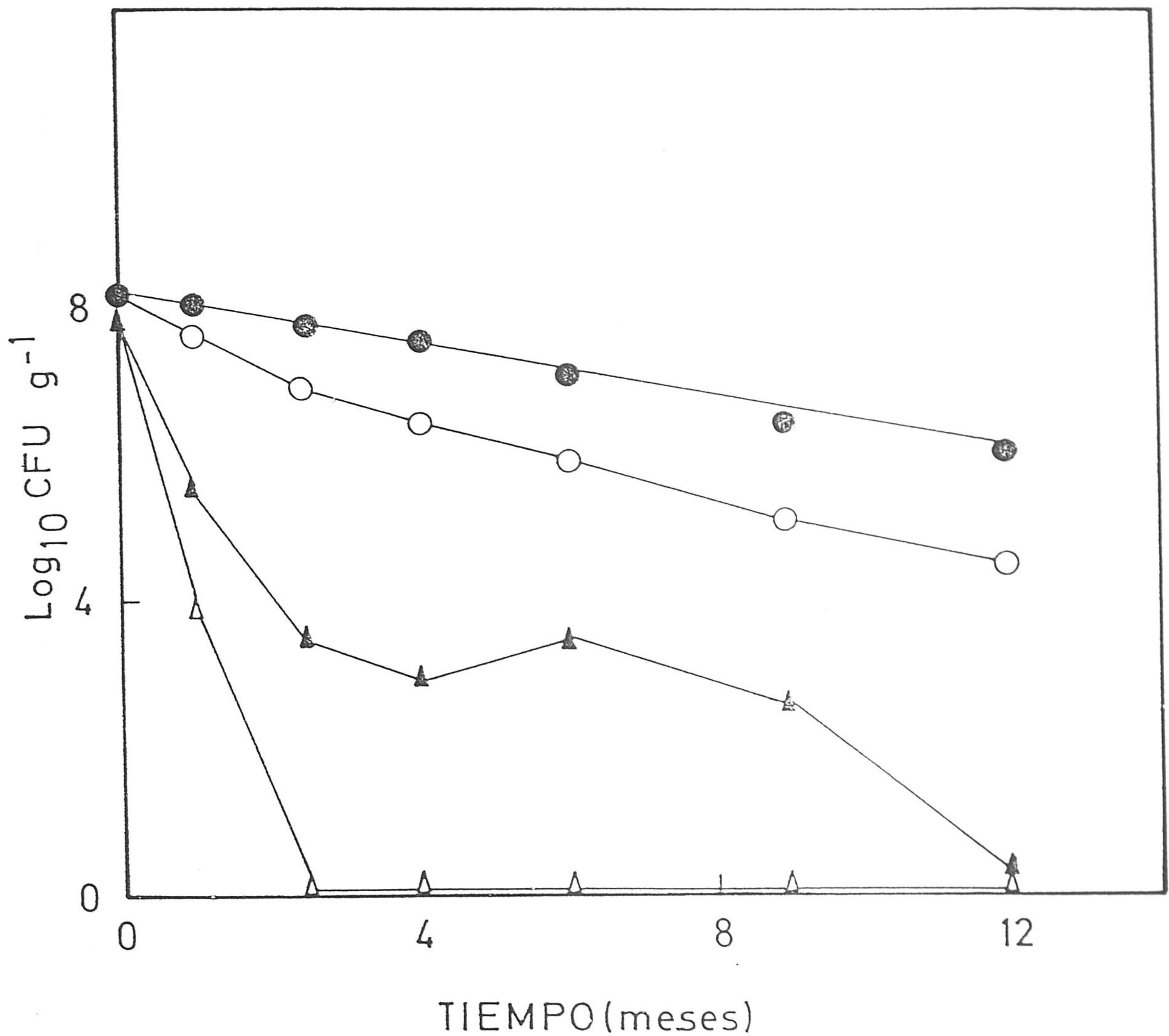


Figura 14. Supervivencia a largo plazo de *P. putida* EEZ15 (pWW0-EB62) en diferentes suelos. *P. putida* EEZ15 (pWW0-EB62) se introdujo en el fluvisol suelo-10 sin suplemento (○) ó con 0,01% (p/p) p-etilbenzoato (●) o en el cambisol suelo-1 sin suplemento (△) ó con 0,1% (p/p) p-etilbenzoato (▲). Otras condiciones como en la leyenda de la Figura 13.

### C.1.1.7 SUPERVIVENCIA DE P.putida EEZ15 (pWW0-EB62) EN SUELOS NO ESTERILES.

La presencia de microorganismos indígenas en el cambisol-1, regosol-3 y fluvisol-10 se estimó en alrededor de  $10^7$  microorganismos por g de suelo cuando el número de CFU se estimó en placas de medio mínimo con glucosa como fuente de carbono y amonio como fuente de nitrógeno. El número de microorganismos capaces de utilizar p-etilbenzoato como única fuente de carbono y energía por gramo de suelo fue inferior a  $10^4$ . En estos suelos no se encontraron microorganismos capaces de crecer en p-etilbenzoato como fuente de carbono y resistentes a 1 mM de PTT. Estos suelos se suplementaron o no con 0,1% (p/p) p-etilbenzoato. Para estudiar la supervivencia de P. putida EEZ15 (pWW0-EB62) la bacteria se inoculó a una densidad celular inicial de alrededor de  $10^8$  CFU/g de suelo. La supervivencia de la bacteria portando el plásmido pWW0-EB62 se estimó contando CFU en medio mínimo con 5 mM p-etilbenzoato como única fuente de carbono y energía y 1 mM PTT. En el fluvisol-10, el número de CFU/g de suelo de la cepa recombinante permaneció relativamente constante en el tiempo, tanto en suelos suplementados como no suplementados con p-etilbenzoato. Por el contrario, en el cambisol-1 y regosol-3 el número de CFU/g de suelo disminuyó con el tiempo, independientemente de la adición de p-etilbenzoato en el suelo. Es importante destacar que la disminución de CFU/g de suelo en el cambisol-1 fue más rápida en presencia de p-etilbenzoato que en su ausencia (Figura 15). Esto contrasta con los resultados obtenidos en suelos estériles. Si embargo, en el suelo regosol-3 la presencia de bajas concentraciones de p-etilbenzoato favorecía

la supervivencia de la bacteria manipulada al igual que en el caso de los suelos estériles.

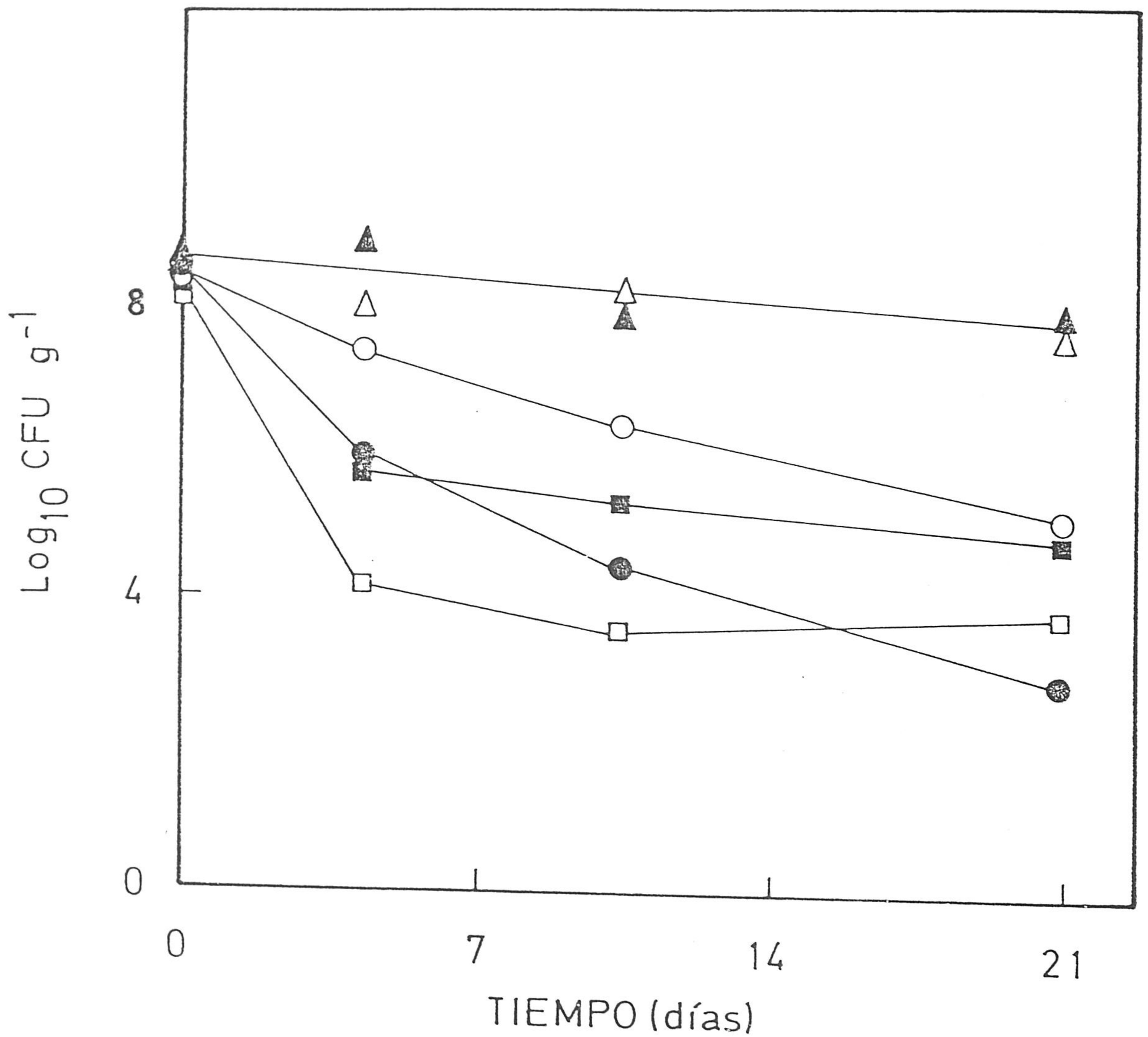


Figura 15. Supervivencia de *P. putida* en suelos no estériles con o sin la adición de p-etilbenzoato. Alrededor de  $10^8$  CFU/g de suelo de *P. putida* (pWW0-EB62) se introdujeron en el cambisol suelo-1 (O, ●) regosol suelo-3 (□, ■) y fluvisol suelo-10 (Δ, ▲) sin esterilizar y suplementados (●, ■, ▲) o no (O, □, Δ) con 0,1% (p/p) de p-etilbenzoato. El número de CFU/g suelo se determinó en placas de medio mínimo con 5 mM de p-etilbenzoato y 1 mM de fosfinotricina a los tiempos indicados.



## C.1.2 TRANSFERENCIA DEL PLASMIDO TOL A OTRAS BACTERIAS EN SUELO.

### C.1.2.1 TRANSFERENCIA A P. PUTIDA, ESCHERICHIA COLI Y ERWINIA CHRYSANTHEMI.

Estudios previos realizados en nuestro grupo por M<sup>a</sup> Isabel Ramos González (1993) mostraron que el plásmido TOL pWW0 y sus derivados recombinantes se transfieren y replican establemente en bacterias del género Pseudomonas pertenecientes al grupo I de ARNr, entre estas cabe mencionar P. putida, P. fluorescens, P. aeruginosa, etc. y algunas enterobacterias como E. coli, y Erwinia chrysanthemi, (Ramos-González et al., 1991; Ramos-González, 1993).

Los ensayos que se describen a continuación se diseñaron para estudiar si el plásmido TOL se transfería a estos microorganismos en suelos. P. putida EEZ15 (pWW0-EB62) se inoculó junto con receptores potenciales (P. putida EEZ3, E. coli EEZ8000 y Erwinia chrysanthemi EEZ28) en los suelos cambisol-1 y fluvisol-10. El donador y cada uno de los receptores se introdujeron de manera sucesiva en el suelo para evitar la formación de puentes de transferencia previos a la introducción de las bacterias. La densidad celular inicial de las cepas donadoras y receptoras fue del orden de 10<sup>8</sup> CFU/g de suelo. Las muestras de suelo se mezclaron y se mantuvieron a 15-17°C. Como control se hicieron ensayos en los cuales las bacterias donadoras y receptoras se introdujeron en tarros independientes en los mismos suelos y a similar densidad celular.

En los casos de transferencia intragenérica en el fluvisol-10 el nivel de supervivencia del donador EEZ15 (pWW0-EB62) y el receptor P. putida EEZ3 en los tarros conteniendo ambos

organismos fue similar al nivel de supervivencia observado en el tarro control, sugiriendo que la presencia de ambas bacterias no tiene efecto competitivo en estos suelos. La Figura 16 muestra la aparición de transconjugantes de P. putida EEZ3 con el tiempo, observándose que el número de transconjugantes/g de suelo aumentó con el tiempo. Se debe señalar que no es posible distinguir en los suelos entre los transconjugantes per se y la multiplicación de los transconjugantes, asimismo tampoco es posible distinguir entre transferencia de genes de la bacteria donadora y los transconjugantes actuando como donadores.

La transferencia intragenérica de genes se ensayó asimismo en el suelo cambisol-1, el cual contiene bajos niveles de materia orgánica. P. putida EEZ15 (pWW0-EB62) y P. putida EEZ3 se inocularon a una densidad celular de  $10^8$  CFU/g de suelo (Figura 17). En este suelo el número de microorganismos donadores y receptores disminuyó con el tiempo, pero se observaron transconjugantes después de 3 días de inoculación. El número de transconjugantes a las 2 semanas en este suelo era de alrededor de  $10^4$  CFU/g de suelo (Figura 17).

La transferencia intergenérica de genes se ensayó en el suelo fluvisol-10 usando P. putida EEZ15 (pWW0-EB62K) como donador y Erwinia chrysanthemi EEZ28 y Escherichia coli EEZ8000 como receptores. El plásmido pWW0-EB62K se utilizó en esta serie de ensayos porque E. chrysanthemi portando el plásmido TOL no crece en aromáticos como m-metilbenzoato, sin embargo si expresa la resistencia a kanamicina conferida por el marcador insertado en el plásmido utilizando un mini-Tn5-Km (Ramos-González et al., 1993., Herrero et al., 1990). El número de CFU de E. coli

disminuyó rápidamente con el tiempo, de hecho tras dos días en el suelo se recuperó solo alrededor del 1% del número inicial de microorganismos y 2 semanas más tarde disminuyó hasta alrededor del 0.01% de la densidad inicial. En contraste E. chrysanthemi sobrevivió bien en este suelo (del orden de  $10^7$  CFU/g de suelo a las 3 semanas). En ningún caso se encontraron transconjugantes resistentes a Km o capaces de crecer a expensas de p-etilbenzoato de E. coli o de Erwinia chrysanthemi EEZ28 (no mostrado).

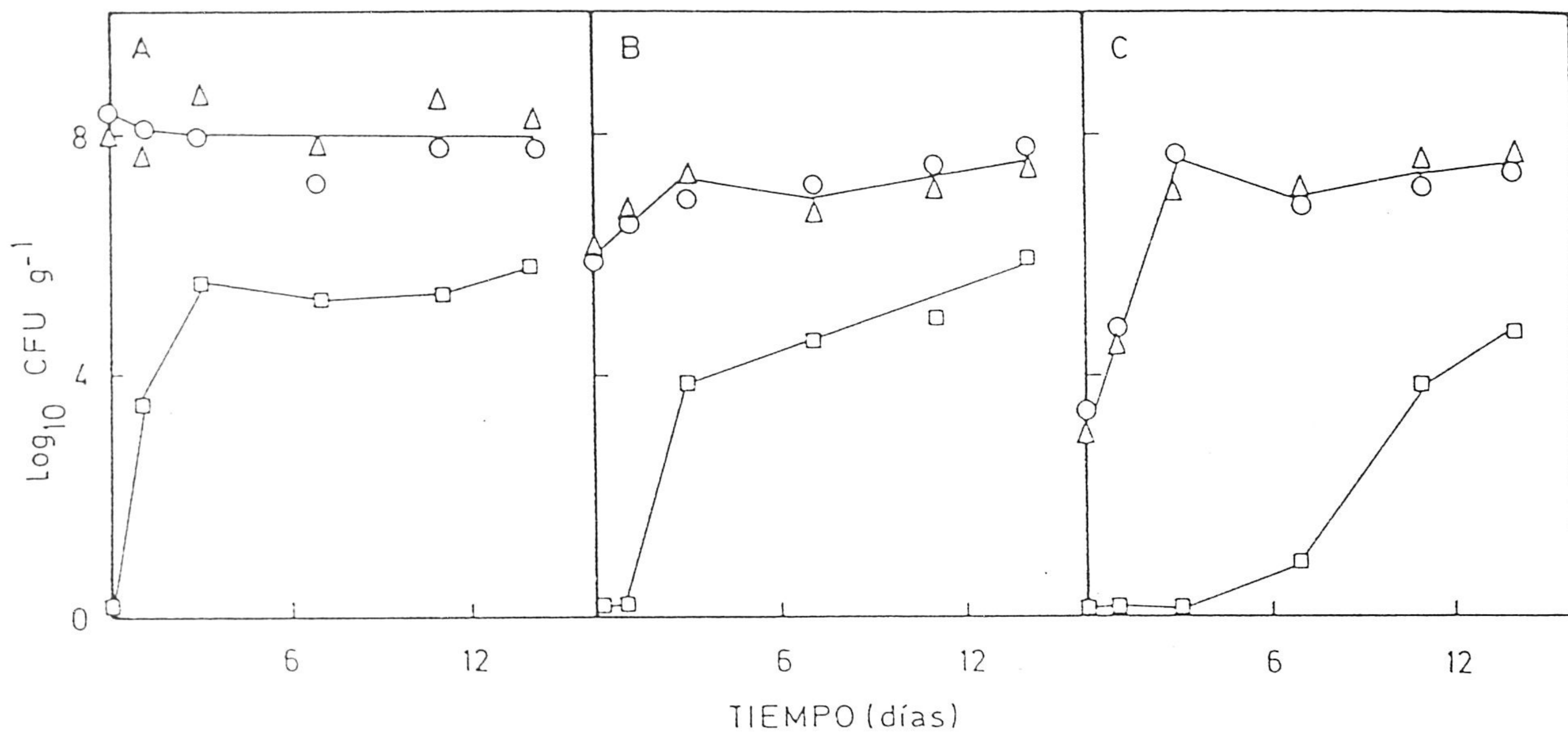


Figura 16. Transferencia intraespecífica del plásmido pWW0-EB62 en el suelo fluvisol. La bacteria donadora fue *P. putida* EEZ15 (pWW0-EB62) (O), la bacteria receptora fue *P. putida* EEZ3 ( $\Delta$ ), y los transconjugantes fueron *P. putida* EEZ3 (pWW0-EB62) ( $\square$ ). Las bacterias donadoras y receptoras se inocularon en el fluvisol-10 a las siguientes densidades iniciales:  $10^8 \text{ CFU/g}$  suelo (A),  $10^6 \text{ CFU/g}$  suelo (B), y  $10^4 \text{ CFU/g}$  suelo (C). El número de donadores, receptores, y transconjugantes se determinó a los tiempos indicados en placas selectivas. *P. putida* EEZ15 (pWW0-EB62) se seleccionó en medio mínimo M9 conteniendo 5 mM de p-etilbenzoato y 400  $\mu\text{g}$  de fosfotricina por ml. *P. putida* EEZ3 se seleccionó en medio mínimo M9 conteniendo 5 mM de benzoato como fuente de C, 50  $\mu\text{g}$  de rifampicina por ml, y 100  $\mu\text{g}$  de estreptomina por ml. *P. putida* EEZ3(pWW0-EB62) se seleccionó en medio mínimo M9 conteniendo 5 mM de p-etilbenzoato como fuente de C, 50  $\mu\text{g}$  de rifampicina por ml, y 100  $\mu\text{g}$  de estreptomina por ml.

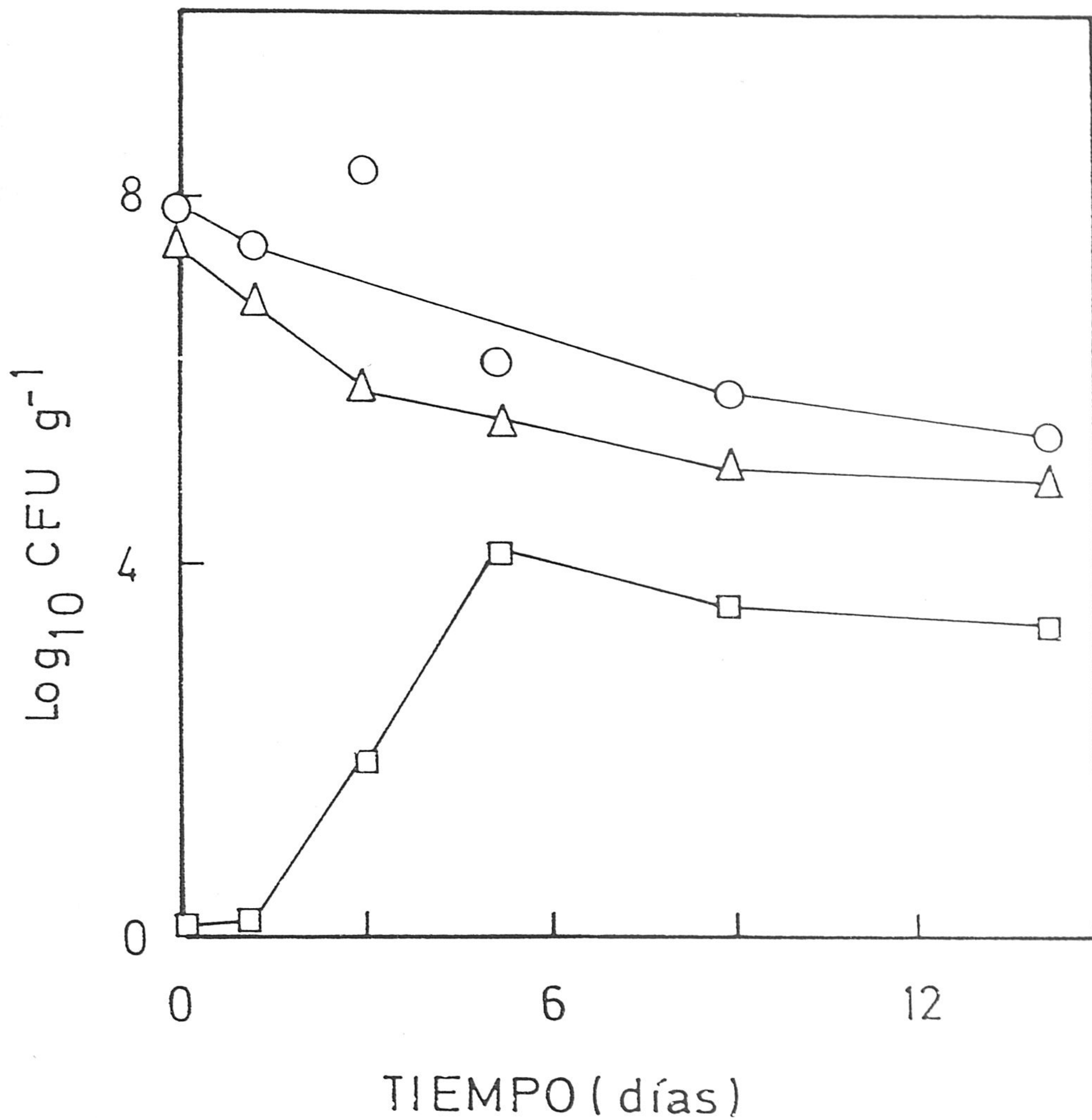


Figura 17. Transferencia intraespecífica del plásmido pWW0-EB62 en el suelo cambisol suelo-1. La bacteria donadora fue *P. putida* EEZ15 (pWW0-EB62) (O), la receptora fue *P. putida* EEZ3 (Δ), y los transconjugantes fueron *P. putida* EEZ3 (pWW0-EB62). Las bacterias donadoras y receptoras se inocularon a densidades iniciales de alrededor de 10<sup>8</sup> CFU/g en el suelo estéril cambisol. El número de donadores, receptores y transconjugantes (□) se determinaron a los tiempos señalados y en placas de medio selectivos.

### C.1.2.2 EFECTO DE LA DENSIDAD CELULAR SOBRE LA TRANSFERENCIA DE TOL EN SUELOS.

Estos estudios se realizaron en el fluvisol-10, un suelo relativamente rico en materia orgánica. *P. putida* EEZ15 (pWWO-EB62) y *P. putida* EEZ3 se inocularon a razón de 1:1 y a densidades celulares iniciales de alrededor de  $10^8$ ,  $10^6$  y  $10^4$  CFU/g de suelo. En general se observó que cuanto mayor fue la densidad celular inicial antes se detectaron los transconjugantes. En efecto, los transconjugantes se detectaron 24 h después de inocular los suelos a la mayor densidad celular inicial ( $10^8$  CFU/g de suelo) (Figura 16A), a las 48 h cuando se usó la densidad celular inicial intermedia (Figura 16B) y alrededor de 1 semana más tarde cuando se usó el inóculo más bajo (Figura 16C). Se observó que el número final de transconjugantes en todos los suelos fue del orden de  $10^5$  a  $10^6$  CFU/g de suelo después de 2 semanas de inoculación. En cierto modo esto era de esperar dado que independientemente de la densidad celular inicial, el número de donadores y receptores fueron también similares tras de 2 semanas en las tres condiciones, esto fue debido a multiplicación de las bacterias donadoras y receptoras en el suelo de manera que la densidad final fue notablemente superior a la inicial (Figura 16).

Se analizó también el efecto que la presencia de p-etilbenzoato ejercía sobre la transferencia de TOL en el suelo. La Fig. 19 muestra los resultados obtenidos en la transferencia de TOL desde *P. putida* EEZ15 (pWWO-EB62) a *P. putida* EEZ3 inoculados a una densidad celular de alrededor de  $10^8$  CFU/g de suelo. Se observó que la aparición de transconjugantes en los suelos con p-

etilbenzoato se retrasó en el tiempo con respecto a la aparición de transconjugantes en suelos sin p-etilbenzoato (ver Figura 16A). Esto se debió probablemente al efecto perjudicial de pequeñas concentraciones de p-etilbenzoato en la supervivencia de la bacteria receptora (Figura 18). Sin embargo el número de transconjugantes encontrados después de 2 semanas fue similar al número encontrado en suelos sin adición de p-etilbenzoato.

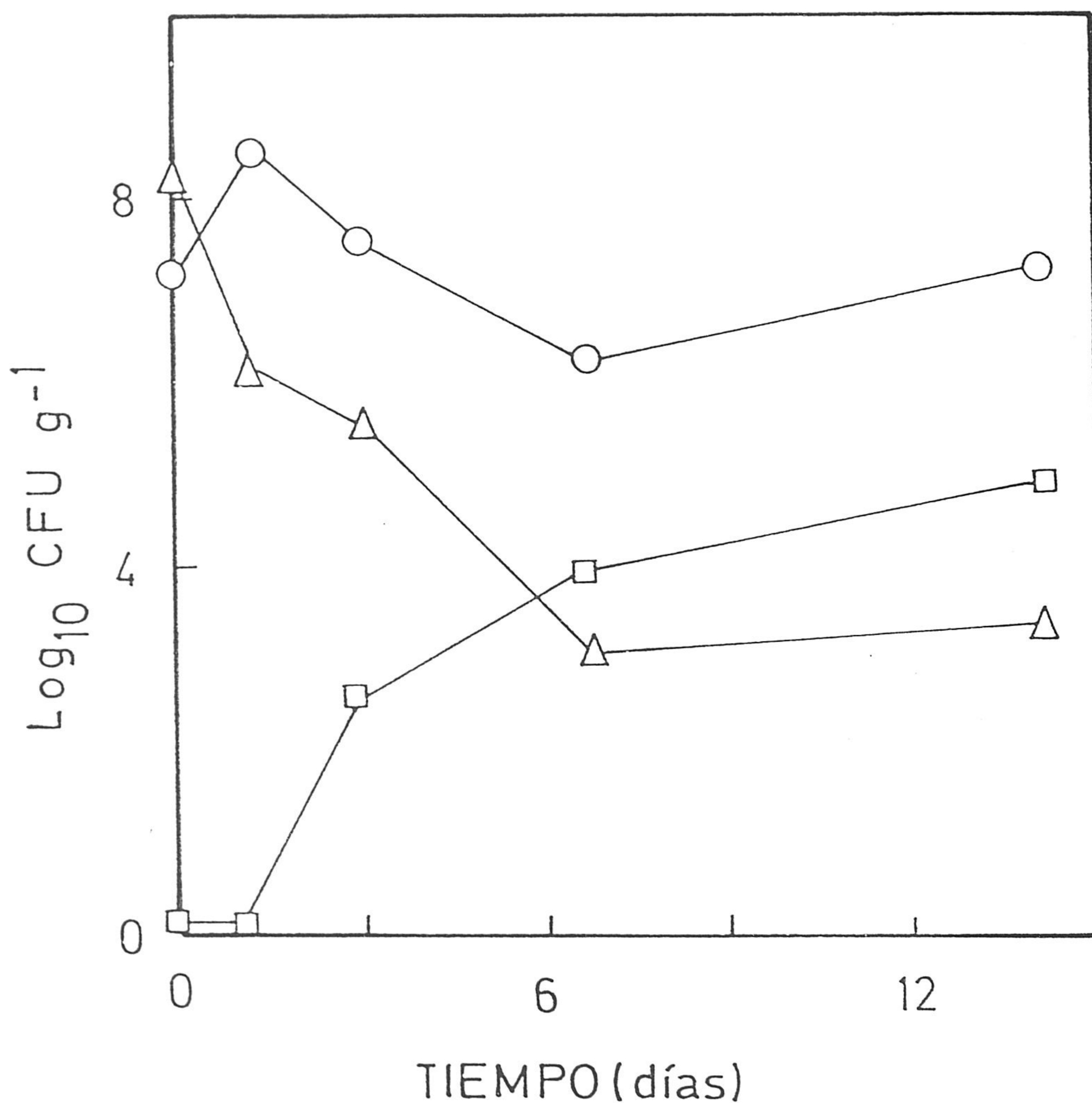


Figura 18. Transferencia intraespecífica del plásmido pWW0-EB62 en el suelo fluvisol suplementado con p-etilbenzoato. Las condiciones utilizadas fueron las mismas que las descritas en la Figura 16 excepto que el suelo fluvisol fue suplementado con 0,1% (p/p) p-etilbenzoato y el donador *P. putida* EEZ15 (pWW0-EB62) (O) y el receptor *P. putida* EEZ3 (Δ) se inocularon a densidades iniciales de alrededor de 10<sup>8</sup> CFU/g suelo. Los transconjugantes fueron *P. putida* EEZ3 (pWW0-EB62) (□)



### C.1.3 METABOLISMO DE p-METIL-<sup>14</sup>C-BENZOATO POR P.PUTIDA (pWW0-EB62) EN EL FLUVISOL-10.

Los resultados de las secciones anteriores sugerían que P. putida (pWW0-EB62) era capaz de crecer y establecerse en suelos del área de Granada, en particular en el fluvisol-10 rico en materia orgánica. El suelo fluvisol del área de Granada es por tanto un sistema ideal para estudiar si las rutas catabólicas del plásmido TOL se expresaban en respuesta a adiciones exógenas de alquilbenzoatos. Estos ensayos se realizaron en suelos estériles para evitar interferencias con microorganismos indígenas. La mineralización de p-metil-benzoato se siguió como desprendimiento de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> a partir de p-metil-<sup>14</sup>C-benzoato, en suelos estériles inoculados o no con P. putida EEZ15 (pWW0-EB62).

En ausencia de células no se detectó desprendimiento de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> a partir de p-metil-<sup>14</sup>C-benzoato lo que sugería que la descarboxilación del p-metil-<sup>14</sup>C-benzoato no tenía lugar de manera espontánea. P. putida (pWW0-EB62) se introdujo a una densidad celular inicial de alrededor de 10<sup>6</sup> CFU/g de suelo y se suplementó con 0,01% (p/p) de p-metil-<sup>14</sup>C-benzoato (0,5μCi/μmol). Se observó una fuerte evolución de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> (Figura 19) en las primeras 24 h, seguida de una evolución lineal de CO<sub>2</sub> marcado durante al menos un mes. En suelos suplementados con 0,01% (p/p) de p-metil-<sup>14</sup>C-benzoato (0,5μCi/μmol), la adición de glucosa (0,01-0,5% p/p) y/o KNO<sub>3</sub> (0,1% p/p) no afectó significativamente el desprendimiento de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>, sugiriendo que la adición de otra fuente de carbono o nitrógeno, no ejercía un efecto significativo sobre la mineralización del p-metil-<sup>14</sup>C-benzoato (no mostrado). El desprendimiento lineal de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> sugería que P. putida (pWW0-

EB62) permanecía metabólicamente activa durante al menos un mes. Para confirmar esta hipótesis se prepararon 4 tarros con suelos estériles, tres de ellos se inocularon con  $10^7$  CFU/g de suelo y se suplementaron con p-metil-benzoato 0,01% (p/p). Al mismo tiempo se añadió  $0,5\mu\text{Ci}$  de p-metil- $^{14}\text{C}$ -benzoato al control y a uno de los tarros inoculados. El compuesto radioactivo a los otros dos tarros se añadió a los 3 y 7 días respectivamente del inicio del ensayo. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 20, observándose que en el tarro control sin células no tuvo lugar desprendimiento de  $^{14}\text{CO}_2$ , mientras que los otros tres tarros, sí hubo desprendimiento de  $^{14}\text{CO}_2$ . Independientemente de cuando el compuesto radioactivo se añadió, el desprendimiento de  $^{14}\text{CO}_2$  fue relativamente lineal en el tiempo (Figura 20). Estos resultados confirmaron que, en general, las células introducidas en los suelos permanecían viables y funcionales.

En todos los experimentos anteriores, *P. putida* (pWW0-EB62) se introdujo homogéneamente en el suelo y se mezcló bien con p-metil- $^{14}\text{C}$ -benzoato, es decir que el compuesto radioactivo y las bacterias estaban en contacto. Se ensayó el efecto de introducir el substrato marcado y la bacteria a diferentes distancias y el efecto de esta variable sobre la mineralización de p-metil- $^{14}\text{C}$ -benzoato. Las bacterias y el compuesto se colocaron a las siguientes distancias: 0,5, 1, 5 y 10 cm. Se determinó el desprendimiento de  $^{14}\text{CO}_2$  con el tiempo (Figura 21) y se observó que cuanto más cerca estaba la bacteria del substrato marcado más pronto y mayor fue el desprendimiento de  $^{14}\text{CO}_2$ . Estos resultados sugieren que la transferencia de masa es necesaria para una eficiente mineralización del aromático.

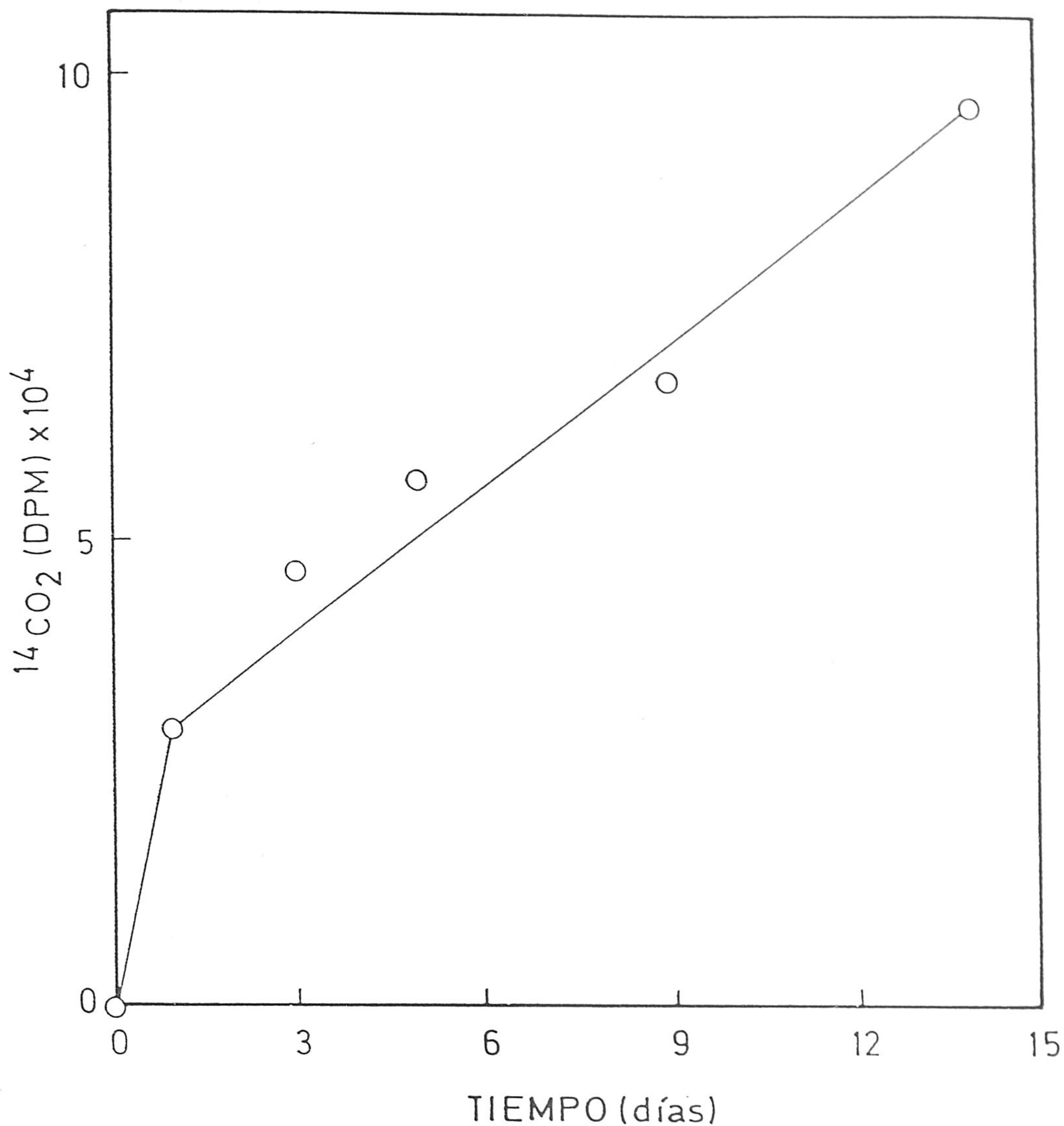


Figura 19. Desprendimiento de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de p-metil- $^{14}\text{C}$ -benzoato por *P. putida* (pWW0-EB62) en suelos. Tarros de 1 litro de volumen que contenían 70 g de suelo fluvisol se inocularon con *P. putida* (pWW0-EB62) para alcanzar una densidad inicial de  $10^2$  CFU/g de suelo. El suelo se suplementó con 0,01% (p/p) p-metilbenzoato ( $0,5\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ ) y el  $^{14}\text{CO}_2$  desprendido se recogió en etanolamina en un vaso de precipitado de 25 ml colocado en el centro del tarro. Las muestras se tomaron a los tiempos indicados y el  $^{14}\text{CO}_2$  se cuantificó con un contador de centelleo Packard.

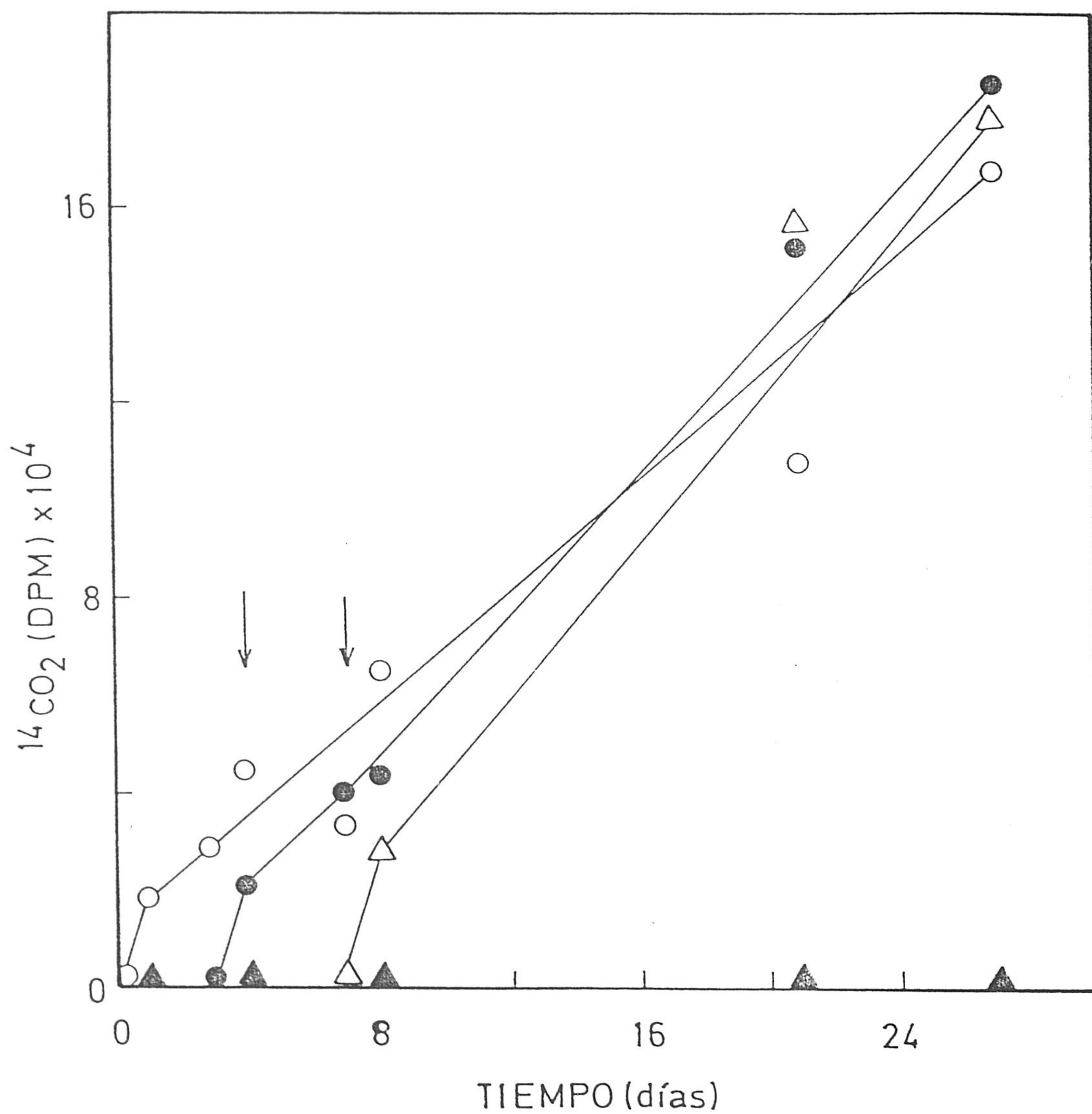


Figura 20. Desprendimiento de  $^{14}\text{CO}_2$  después de la adición de p-metil- $^{14}\text{C}$ -benzoato a diferentes tiempos. Las condiciones fueron las descritas en la figura 19 excepto que a los suelos se añadió 0,01% (p/p) de p-metil- $^{14}\text{C}$ -benzoato ( $0,5\mu\text{Ci/mol}$ ) a tiempo 0 (O) o cuando se indica con las flechas(●,Δ).

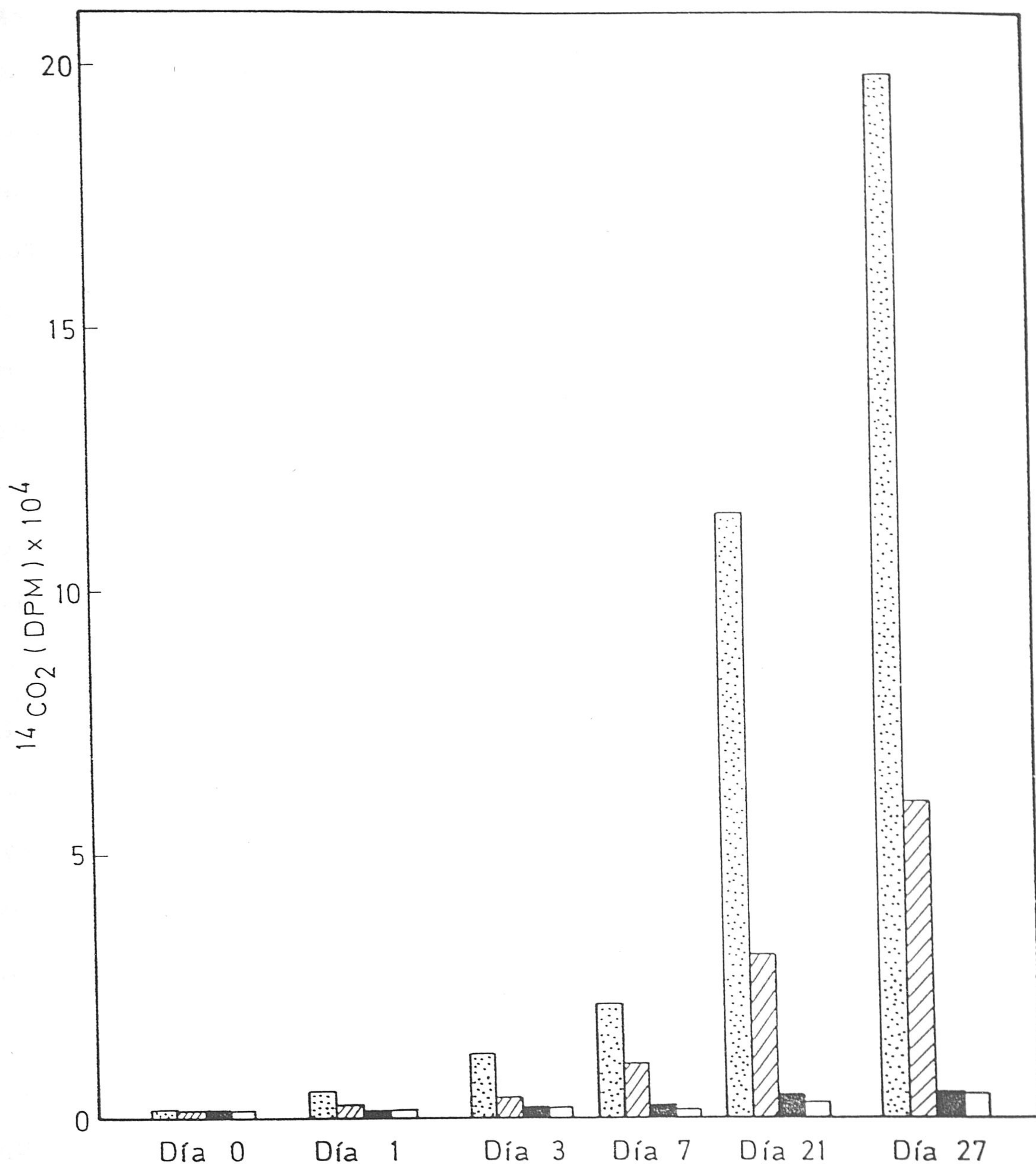


Figura 21. Desprendimiento de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de *p*-metil- $^{14}\text{C}$ -benzoato por *P. putida* (pWW0-EB62) introducida a diferentes distancias del compuesto marcado. A cuatro tarros diferentes con 70 g de suelo se le añadió *p*-metil- $^{14}\text{C}$ -benzoato ( $0,5\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ ) en un extremo del tarro. Alrededor de  $10^8$  CFU/g se colocaron a continuación para estar a una distancia de: 0,5, 1, 5, y 10 cm del compuesto marcado. El desprendimiento de  $^{14}\text{CO}_2$  a los tiempos indicados se estimó como se indica en Materiales y Métodos. Otras condiciones fueron como en la Figura 19.

## C.2 DEGRADACION BIOLOGICA DE TNT.

El TNT (2,4,6-trinitrotolueno) es el compuesto utilizado más ampliamente como explosivo tanto militar como civil. Dada su amplia utilización se considera como un polucionante ubicuo cuya eliminación es considerada de interés prioritario por diversas agencias del medio ambiente, en particular la EPA "Environmental Protection Agency" de USA. Asimismo la OCDE en su análisis de problemas medioambientales ha considerado el TNT y otros explosivos como polucionantes cuya eliminación es de interés prioritario (OCDE, 1994). La verdadera magnitud de la contaminación por TNT se ha considerado en zonas de Alemania y USA donde el explosivo ha estado almacenado desde la Segunda Guerra Mundial. Los problemas han surgido debido a pérdidas en los embalajes de almacenamiento que han permitido que con el tiempo el TNT escape a zonas próximas, dando lugar a la desertificación de las mismas y a la contaminación de acuíferos (Low, 1992; Preuss et al., 1993).

Los esfuerzos del grupo de degradación de tóxicos orgánicos de Granada se dirigieron en principio, al aislamiento y/o la construcción de microorganismos que mineralicen TNT en corrientes de desecho de una fábrica de explosivos, sin descartar su utilización en la eliminación del explosivo almacenado.

Al iniciar esta serie de estudios no se disponía de microorganismos que utilizaran este aromático como fuente de C ó N ó C y N. Por ello se diseñó una estrategia que permitiera el enriquecimiento en microorganismos que utilizaran este compuesto bien como fuente de C y N bien como fuente de N.

### C.2.1 ENRIQUECIMIENTO Y AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS QUE UTILIZAN TNT.

Se tomaron 5 muestras de suelo de la Fábrica de Unión Española de Explosivos que años atrás habían estado en contacto con TNT debido al rebose de las balsas de almacenamiento. Se iniciaron una serie de enriquecimientos que consistieron en:

- i) 10 g de suelo de la fábrica + 1xM8 + TNT en lasca (1 g/l).
- ii) 10 g de suelo de la fábrica + 1xM8 + TNT en lasca (1 g/l) + acetato, 10 mM.
- iii) Como ii) excepto que se utilizó glucosa (0,5% p/v) como fuente de C en lugar de acetato.

En total se manejaron 15 series de enriquecimientos (5 suelos x 3 condiciones).

Las suspensiones se incubaron a 30°C con agitación durante 1 semana o más hasta que se detectaron del orden de  $10^7$  CFU/ml en el frasco de cultivo al sembrar en placas de LB. Entonces 1/10 del volumen de cada frasco se transfirió al mismo medio fresco y se continuó la incubación. De manera que la dilución e incubación se repetía aproximadamente cada semana. Cada vez que se realizó una dilución se estimó el número total de colonias en medio rico LB y se sembraron diluciones en medio mínimo con TNT con y sin 10 mM de ácido acético ó 0,5% (p/v) de glucosa.

Aunque el número de células totales tras una semana de incubación se aproximaba siempre a  $10^7$  ml<sup>-1</sup>, no se detectaron clones que crecieran a expensas de TNT hasta la tercera semana, y éstos aparecían siempre en el enriquecimiento en el que se utilizó el

denominado suelo-1 y, en el caso en que se utilizaba 10 mM de ácido acético como fuente de C. Por esa razón se continuó el enriquecimiento con esa serie. Tres semanas más tarde en las siembras en medio mínimo con TNT como fuente de N y acetato como fuente de carbono apareció un solo tipo de colonias.

La tinción de gram de 10 colonias al azar reveló que eran bacterias gram negativas de forma bacilar. Los ensayos de API revelaron un patrón común a todas ellas, siendo oxidasa positiva, motil y pertenecientes al genero Pseudomonas, por esa razón se eligió un clón al azar y se denominó Pseudomonas sp. C1S1.

La bacteria utilizó TNT como fuente de N pero no como fuente de C, lo cual se puso de manifiesto por la falta de crecimiento de este clón en ausencia de ácido acético (10 mM).

#### C.2.1.1 CARACTERIZACION DE LA CEPA C1S1.

#### C.2.1.2 METABOLISMO DE TNT POR LA CEPA C1S1.

Debido a la limitada solubilidad del TNT en agua (100 mg/l) se ensayó, en primer lugar, el efecto que sobre el crecimiento celular tenía el suministro de TNT en lasca o disuelto en disolventes orgánicos como acetona y ter-butylphtalato. La concentración de TNT utilizada equivalía a la cantidad necesaria para alcanzar una concentración 1 mM.

Cuando el TNT se suministró en lasca o disuelto en ter-butylphtalato tras un período de latencia de 24-48 h se observó crecimiento de la bacteria que condujo a incrementos de la densidad celular a 660 nm de hasta aproximadamente 0,6; estos niveles tardaron en alcanzarse alrededor de una semana, a partir



de ese momento la densidad celular se mantuvo constante o disminuyó ligeramente. Cuando el TNT se añadió disuelto en acetona (la concentración final de ésta era del 2% (v/v)), se observó un período de latencia de alrededor de una semana, entonces la bacteria creció exponencialmente hasta alcanzar densidades celulares equivalentes a las alcanzadas cuando se añadía como substrato sólido. En base a los resultados anteriores, se decidió suministrar TNT en lascas a los cultivos de Pseudomonas sp. C1S1.

Se ensayó con acetato como fuente de carbono y con TNT suministrado en lascas como fuente de nitrógeno el efecto que la cantidad de TNT añadido al cultivo tenía sobre el crecimiento de esta bacteria. Para ello medios de cultivo mínimo se suplementaron con cantidades crecientes de TNT (0,027; 0,271 y 2,71 g/100 ml) y 10 mM de acetato. Puesto que las cantidades de TNT añadidas fueron superiores a la solubilidad de este compuesto en agua, parte del producto permaneció en forma de lasca; la concentración del TNT disuelto se estimó mediante análisis en el HPLC y ésta osciló entre 0,25 mM y 0,45 mM, de manera que a mayor cantidad de TNT añadido al medio de cultivo mayor fue la cantidad de TNT disuelto en el mismo. Se observó que cuanto mayor fue la cantidad de TNT añadida más rápido fue el crecimiento de la cepa, y que a mayor cantidad de TNT mayor fue la densidad celular final (Figura 22).

En todos los casos se determinó la acumulación de nitrito a partir de TNT a lo largo de la curva de crecimiento de la cepa C1S1. Se observó que la utilización de TNT por la cepa C1S1 conllevó la acumulación de  $\text{NO}_2^-$ , cuya concentración alcanzó una

concentración máxima de 0,6 mM y en general osciló entre 0,2 y 0,4 mM a lo largo de la curva de crecimiento. Esto sugería que la bacteria atacaba el anillo aromático removiendo el grupo nitro y que, probablemente, debido a una limitación en la reducción del nitrito resultante a amoníaco, el primero se acumuló en el medio de cultivo.

Puesto que la cepa C1S1 no utilizó TNT como fuente de carbono, era de esperar la acumulación de derivados aromáticos de TNT en el medio de cultivo. Para determinar la presencia de aromáticos derivados del metabolismo del TNT en los sobrenadantes de los cultivos, 25  $\mu$ l de medio libre de células se inyectaron en un HPLC y los productos se separaron en una columna de hipersil C-18 con un flujo de 0,5-1 ml/min con metanol/agua o acetonitrilo/agua como eluyentes, y los productos aromáticos se detectaron a 254 nm (ver detalles en Materiales y Métodos). Los análisis de la separación cromatográfica en HPLC revelaron la aparición de al menos tres productos aromáticos. El primer día se observó un pico ancho cuyo tiempo de retención fue a 2,33 min. Después de 7 días se observó un pico adicional a 2,03 min., manteniéndose el de 2,31 min. y después de 32 días además de los dos picos anteriores se observó un tercer pico a 3,00 min. La Figura 23 resume la observación sobre la acumulación de intermediarios cuando los cultivos se suplementaron con 0,27 g TNT/100 ml. Es de interés señalar que cuando los cultivos se suplementaron con 10 veces más de TNT (2,7 g/100 ml) se acumularon intermediarios que eluían a los mismos tiempos de retención, sugiriendo que la concentración de TNT no afectaba a los productos resultantes de su metabolismo. Estos productos y otros minoritarios no detectados en los

análisis directos de sobrenadantes se identificaron posteriormente mediante métodos químicos (ver apartado C.2.1.6).

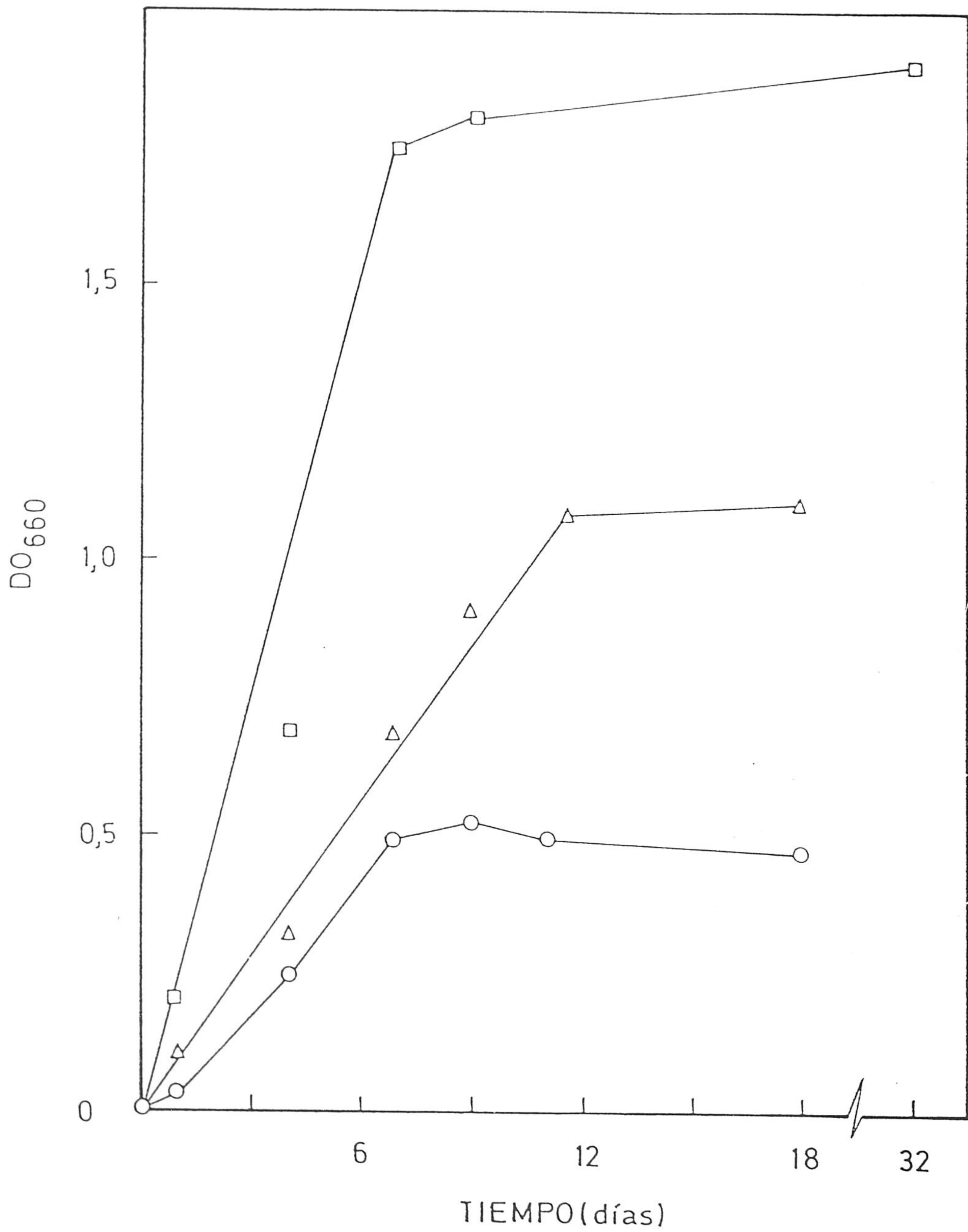


Figura 22. Efecto de la cantidad de TNT añadida al medio de cultivo sobre el crecimiento del clón C1S1. Cien mililitros de medio de cultivo con 10 mM de ácido acético y 0,027 g TNT (O), 0,27 g TNT ( $\Delta$ ) y 2,7 g TNT ( $\square$ ) se inocularon con la bacteria C1S1 cultivada en el mismo medio. A los tiempos indicados se determinó la densidad celular midiendo la turbidez del cultivo a 660 nm.

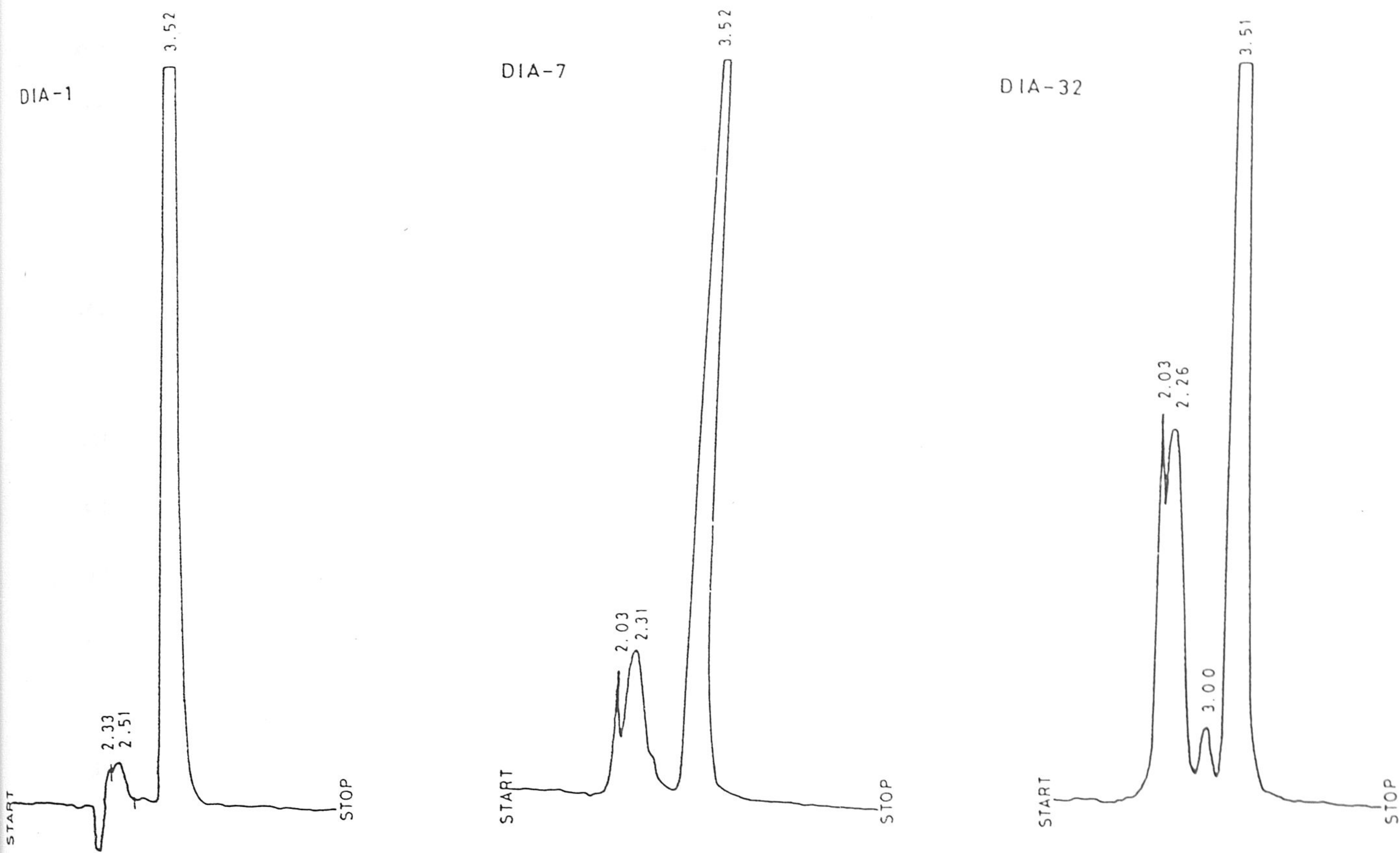


Figura 23. Perfil de elución de aromáticos en sobrenadantes de los cultivos de la bacteria C1S1. Se iniciaron cultivos del clón C1S1 en medios mínimos con 0,27 g/100 ml de TNT. Los cromatogramas que se muestran corresponden a 25 $\mu$ l del sobrenadante del cultivo después de 1, 7 y 32 días de cultivo. La elución se realizó a través de una columna de hipersil-C-18 con metanol::agua (75::25) y un flujo de 0,5 ml/min. El pico a 3,52 min. corresponde al TNT en disolución.

### C.2.1.3 EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO SOBRE EL METABOLISMO DE TNT POR LA CEPA C1S1.

Se ensayaron como fuente de carbono dos azúcares - glucosa y fructosa - dos ácidos carboxílicos - acético y succínico y un ácido carboxílico aromático, ácido benzoico. Todos los compuestos, excepto el ácido benzoico, fueron utilizados como fuente de C por la bacteria Pseudomonas sp. clón C1S1. La velocidad de crecimiento fue máxima en fructosa y succinato y en experimentos posteriores se eligió la fructosa como fuente de C para el crecimiento del microorganismo. La Figura 24 recoge el crecimiento de la bacteria a lo largo del tiempo con distintas fuentes de C y TNT como fuente de N.

Al igual que con ácido acético como fuente de carbono, con las otras fuentes de carbono se acumuló nitrito (concentración máxima 0,6 mM) y aparecían los mismos aromáticos derivados del metabolismo del TNT tal y como ocurría con ácido acético (no mostrado).

Esto sugiere que el mecanismo de acción de la bacteria sobre el TNT no varía con la fuente de carbono, aunque ésta afectó a la velocidad de crecimiento.

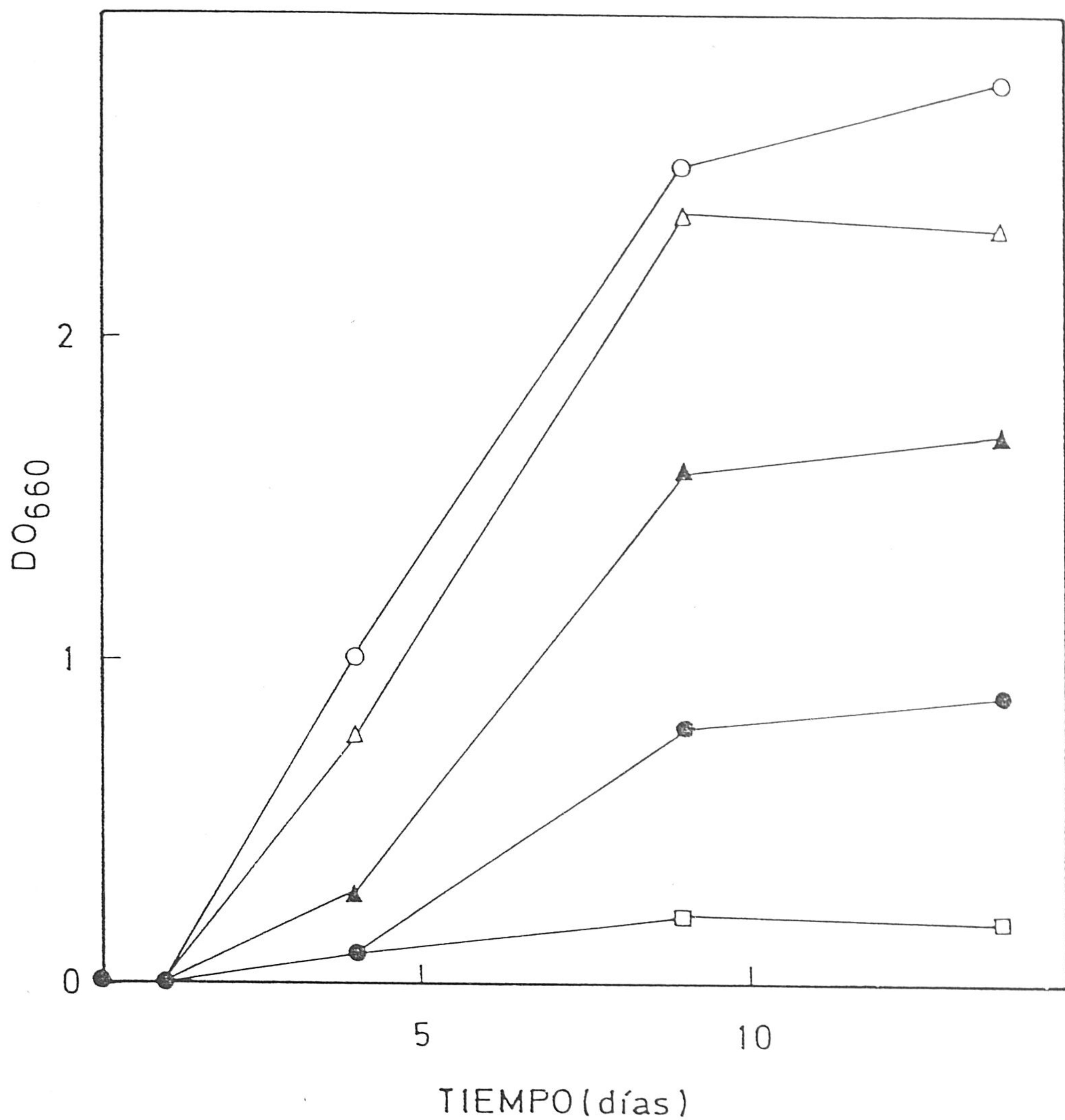


Figura 24. Efecto de la fuente de carbono sobre el crecimiento del clón C1S1 en medio mínimo con TNT. Cien mililitros de medio de cultivo con 0,27 g de TNT se suplementaron con las siguientes fuentes de carbono: fructosa (0,5% (p/v)), (○); glucosa (0,5% (p/v)) (●); ácido acético, 10 mM (Δ); ácido succínico, 10 mM, (▲) y ácido benzoico, 10 mM (□). A los tiempos indicados se determinó la turbidez del cultivo a 660 nm.

#### C.2.1.4 METABOLISMO DE OTROS NITROAROMATICOS POR LA BACTERIA C1S1.

Se ensayó si la bacteria C1S1 podía utilizar como fuente de nitrógeno los siguientes aromáticos: 2-, 3-, 4-nitrotolueno, 2,3-, 2,4-, 3,4-, y 2,6-dinitrotolueno y TNT. El crecimiento fue evidente con 2-nitrotolueno y TNT y menos notorio con 2,4- y 2,6-dinitrotolueno (Tabla 7).

El crecimiento en 2NT siguió una curva de crecimiento típica en la que se distinguían varios hechos que conviene hacer notar, i) una fase de latencia de unos 2 ó 3 días, ii) luego la bacteria creció exponencialmente y cuando alcanzó densidades celulares del orden de 0,6 a OD660, esto fue 3 días más tarde, entonces el crecimiento se detuvo. La adición al medio de cultivo de pequeñas cantidades de medio rico, tuvo un efecto notable sobre la fase de latencia, esto fue a mayor concentración de LB menor fue el tiempo de latencia. Así con la adición de 0,1% LB, el tiempo de latencia se acortó a 1 día y fue inexistente con 1% de LB. Sin embargo, la densidad celular que se alcanzó en todos los casos fue bastante similar (Figura 25).

En los medios de cultivo de la bacteria C1S1 en medio mínimo M8 con fructosa y los distintos nitroaromáticos se ensayó si aparecían productos del metabolismo de los mismos. A los 6 días se determinó la acumulación de nitrito y la aparición de productos resultantes de su transformación mediante análisis de sobrenadantes de los cultivos en el HPLC. La Tabla 7 recoge la concentración de  $\text{NO}_2^-$  en los medios de cultivo, y los tiempos de retención de los productos aromáticos encontrados en los análisis cromatográficos en el HPLC.

Como se deduce de la Tabla 7 el clón C1S1 era capaz de atacar



todos lo nitroaromáticos ensayados excepto el 3- y el 4-nitrotolueno.

Tabla 7. Acumulación de nitrito e intermediarios aromáticos a partir de nitroarenos en medios de cultivo mínimo por la bacteria C1S1.

Fuente de N	DO <sub>660</sub>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mM)	HPLC (Tiempo retención)		
2-NT	0,95	1,6	2,01	2,74	<u>4,50</u>
3-NT	0,04	0,40		<u>4,70</u>	
4-NT	0,04	0,02		<u>4,36</u>	
2,3-DNT	0,06	0,04		n.d.	
2,4-DNT	0,64	0,02	2,27	2,97	<u>3,80</u>
2,6-DNT	0,60	0,00		2,77	<u>3,70</u>
3,4-DNT	0,04	0,04	2,03	2,31	<u>3,31</u>
2,4,6-TNT	1,20	0,24	2,03	2,26	2,99 <u>3,50</u>

La bacteria C1S1 se cultivó en medio mínimo con 10 mM de acetato y 2- y 3-nitrotolueno suministrado en la fase gaseosa o 4-nitrotolueno, dinitrotoluenos y TNT añadidos como substratos sólidos. La concentración de nitrito se determinó a los 6 días en sobrenadantes de los cultivos, asimismo los compuestos aromáticos presentes en dichos sobrenadantes se detectaron a 254 nm tras separar los productos en HPLC en las condiciones indicadas en la leyenda de la Figura 23. El número subrayado indica el nitroaromático suministrado al cultivo.

NT, nitrotolueno; DNT, dinitrotolueno.

n.d., no determinado

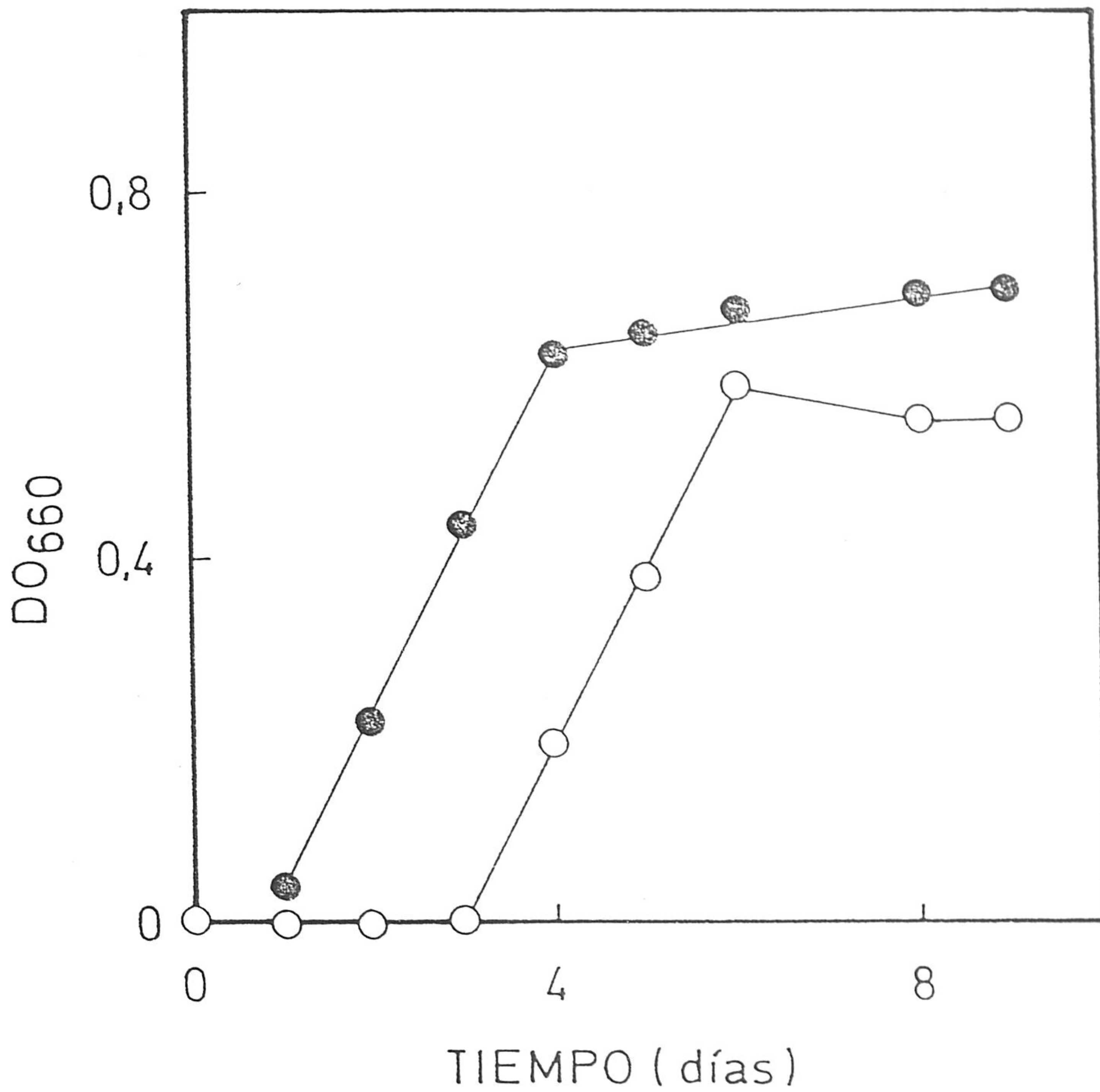


Figura 25. Efecto de la adición de 0,1% LB sobre el crecimiento del clón C1S1 en medio mínimo con 2NT. Las condiciones de cultivo son las descritas en la leyenda de la Figura 22 excepto que se utilizó 2NT como fuente de N. Símbolos cerrados, cultivo suplementado con 0,1% LB; símbolos abiertos, cultivo sin suplemento de LB.

#### C.2.1.5 UTILIZACION DE FUENTES DE NITROGENO INORGANICO.

Se ensayaron como fuentes de nitrógeno inorgánico para el crecimiento de la bacteria C1S1 en medio mínimo con 0,5%(p/v) de fructosa como fuente de carbono, nitrito (1 mM), nitrato (10 mM) y  $\text{NH}_4^+$  (10 mM). La cepa C1S1 creció hasta densidades celulares ( $\text{DO}_{660}$ ) del orden de 2 con amoníaco y nitrato y hasta densidades celulares del orden de 0,3 con nitrito (no mostrado).

#### C.2.1.6 ANALISIS DE PRODUCTOS RESULTANTES DEL METABOLISMO DEL TNT POR EL CLON C1S1.

Con objeto de analizar en mayor detalle la naturaleza de los productos resultantes del metabolismo del TNT por la bacteria C1S1 se realizaron cultivos de 1 litro de esta bacteria y se extrajeron los sobrenadantes para identificar intermediarios y subproductos, conforme al esquema que se indicó en Materiales y Métodos. Las células se cultivaron en medio mínimo con TNT como fuente de N y fructosa como fuente de C.

La extracción con éter perseguía favorecer la extracción de compuestos apolares, mientras que las extracciones con acetato de etilo perseguían extraer del medio acuoso los compuestos más polares. En el caso del acetato de etilo también se procedió a la extracción en medio ácido para aislar los posibles compuestos ácidos. Los productos aislados se analizaron mediante cromatografía de gases masas que se realizaron en los Servicios Técnicos de la Universidad de Granada. Los análisis de los productos aislados se realizaron con la colaboración de los miembros de nuestro grupo de investigación Francisca Godoy y Alí Haïdour.

Los productos resultantes del metabolismo del TNT se muestran en la Figura 26, esta figura recoge sólo un isómero de aquellos posibles, por ej. el compuesto V puede ser 2,4-dinitrotolueno ó 2,6-dinitrotolueno o una mezcla de ambos, al igual que el producto XI puede ser o- ó p-nitrotolueno.

Los productos se identificaron en muestras de cultivos de la bacteria C1S1 con distintas concentraciones de TNT y tomadas a distintos tiempos. En la Figura 26 se distinguen tres grupos de productos. El primer grupo incluye aquellos resultantes de la reducción total o parcial de uno o más grupo nitro en el anillo aromático, como por ejemplo el producto III, 2-amino-, 4,6-dinitrotolueno. Es de destacar también que se detectaron compuestos de alto peso molecular que se podían originar por condensación de anillos con formas reducidas de nitrógeno, entre ellos el dímero IV. El segundo grupo fueron productos resultantes de la oxidación de la cadena alquílica, como por ejemplo nitrobenzoatos. Estos dos tipos de reacciones condujeron a productos finales que no eran metabolizados por la bacteria y que por tanto disminuían la eficiencia de eliminación de TNT.

El último grupo de productos resultaron de la eliminación de uno o más grupos nitro de la molécula de TNT, y condujeron a la formación de dinitrotoluenos (compuesto V) y mononitrotoluenos (compuesto XI) y tolueno (compuesto XIV). Estos compuestos se han de considerar verdaderos intermediarios del metabolismo del TNT por el clón C1S1. La Figura 27 muestra los espectros de fraccionamiento correspondiente a uno de los dinitrotoluenos, uno de los mononitrotoluenos y tolueno, compuestos identificados en los sobrenadantes de los cultivos de la bacteria C1S1.

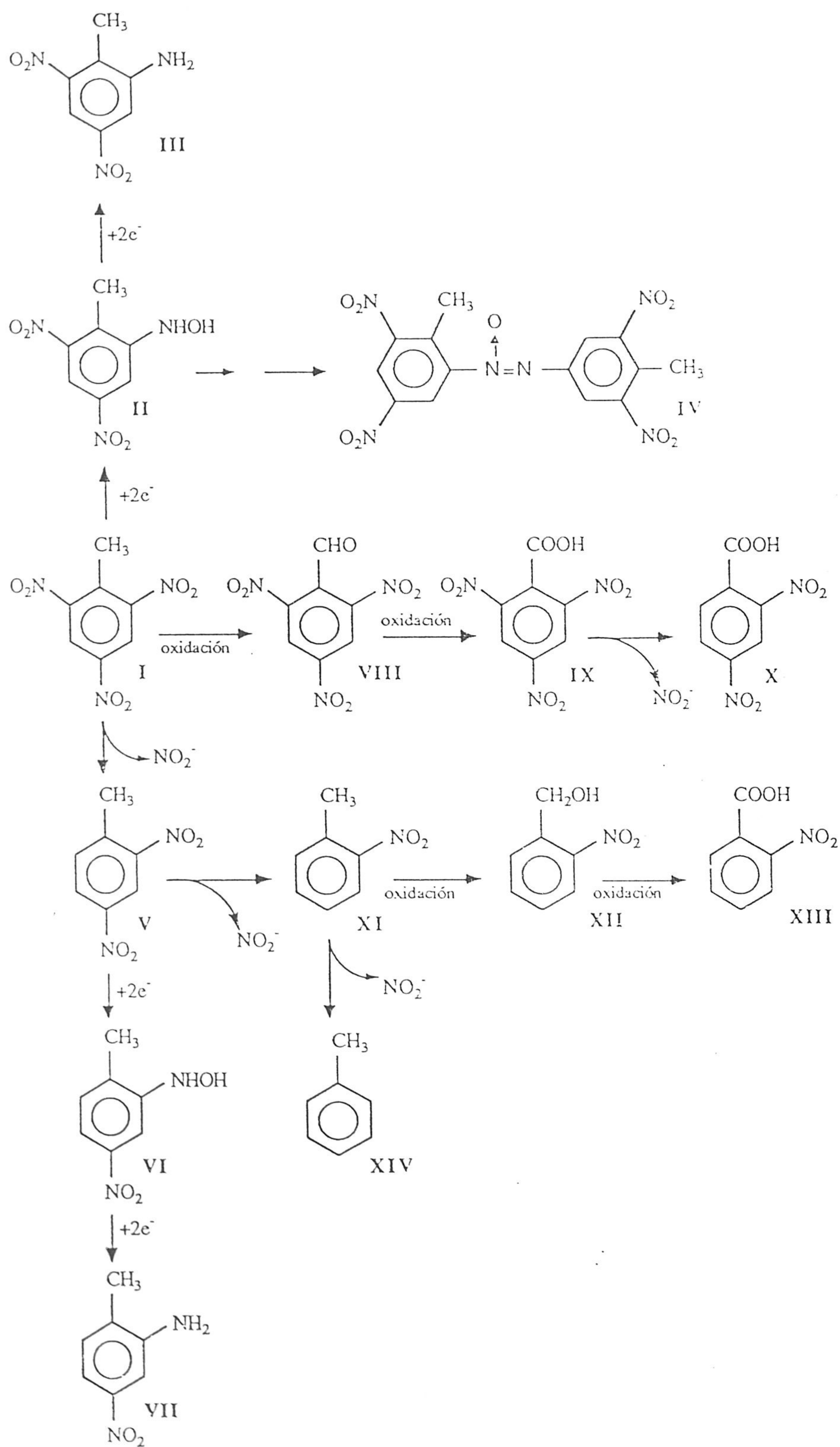


Figura 26. Productos identificados en los sobrenadantes del cultivo de *Pseudomonas* sp. C1S1 con TNT como fuente de N.

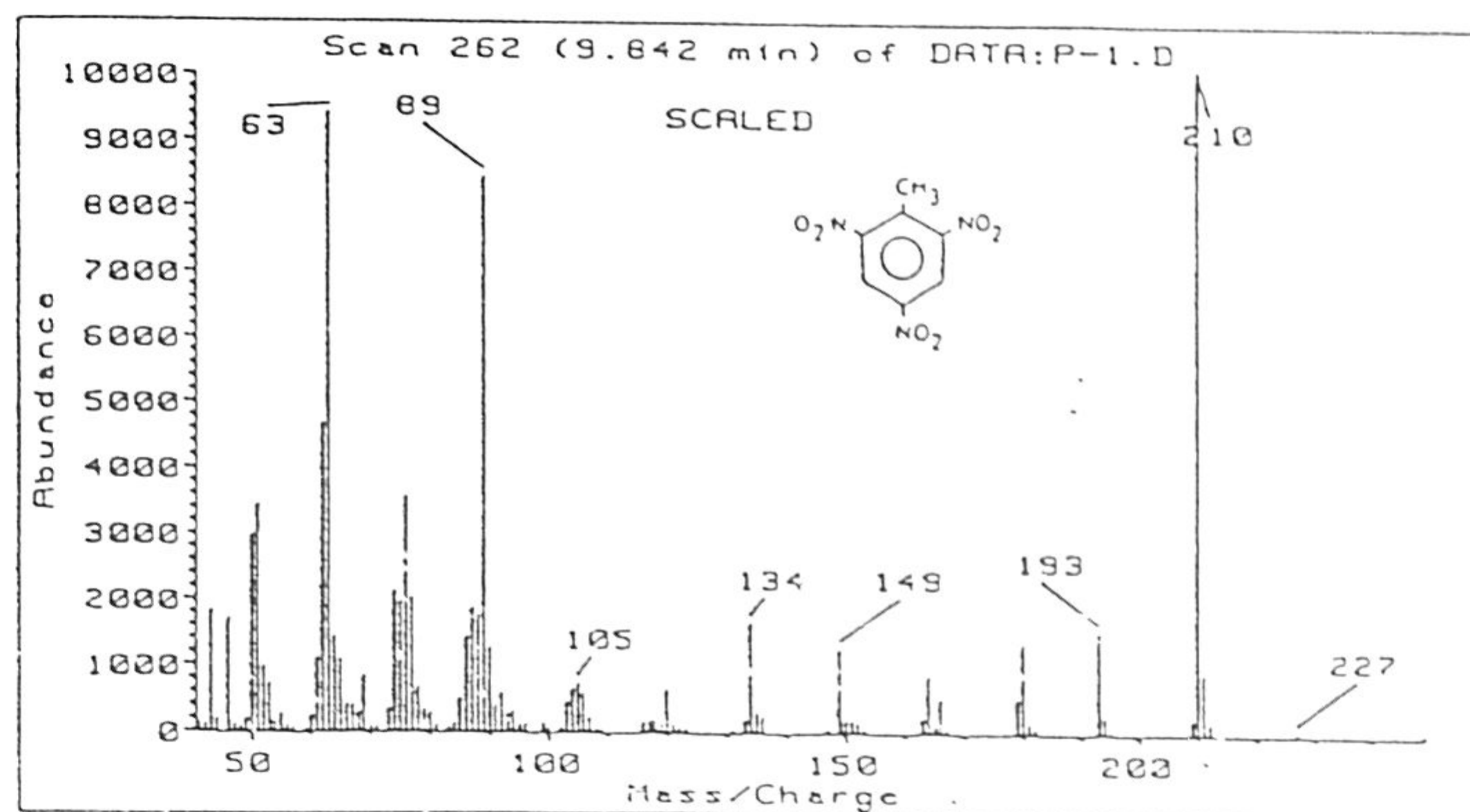
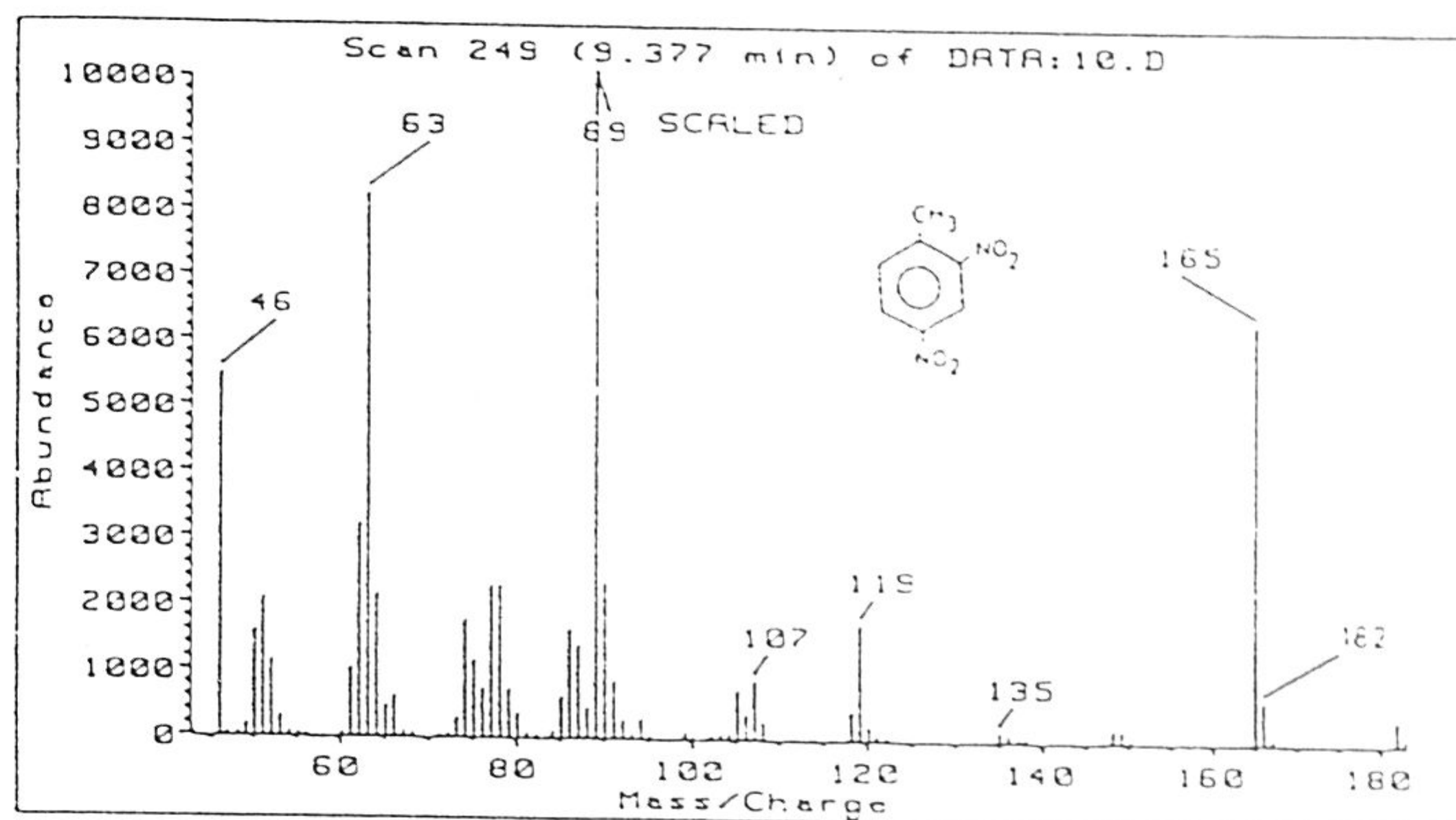
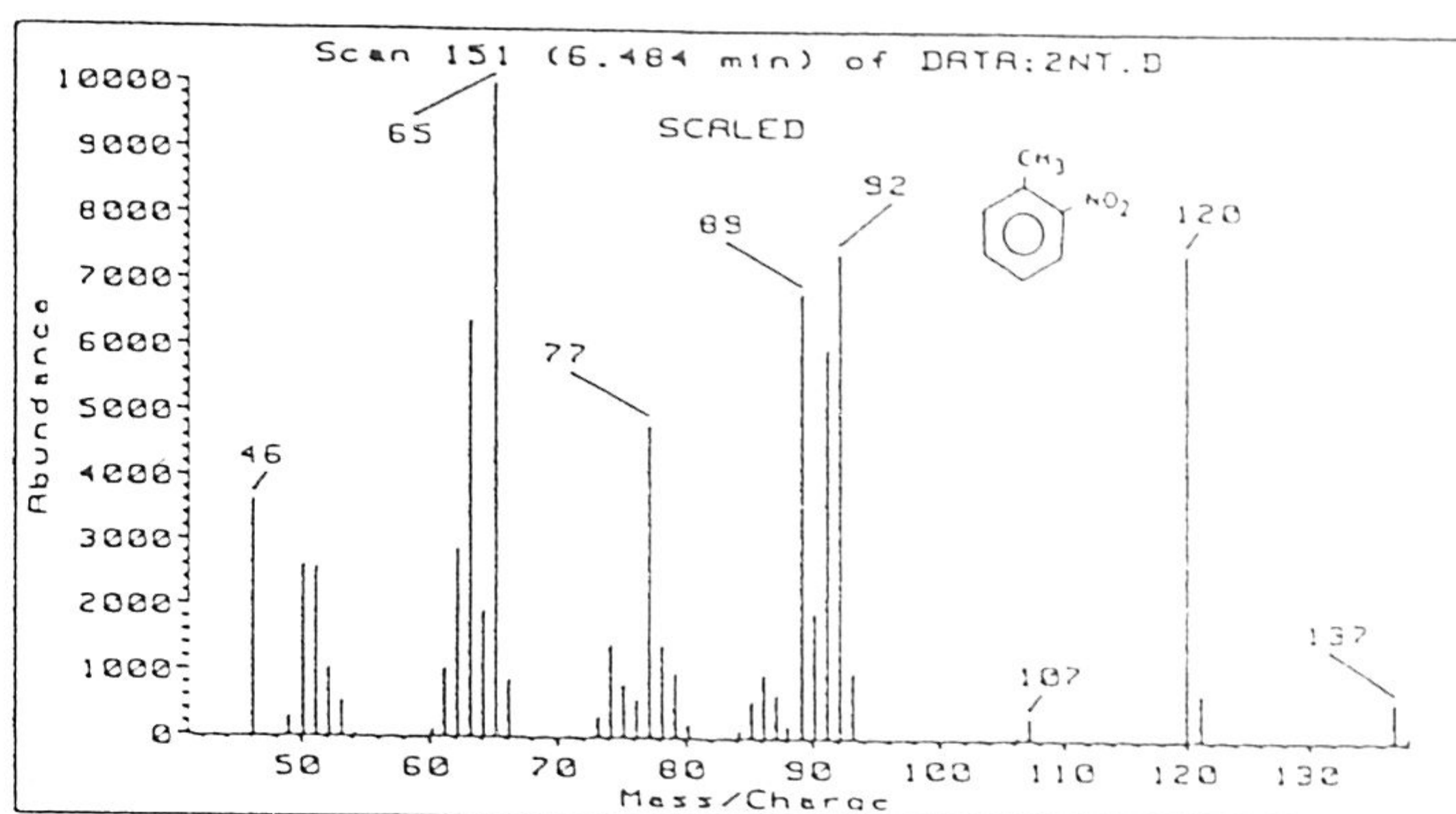
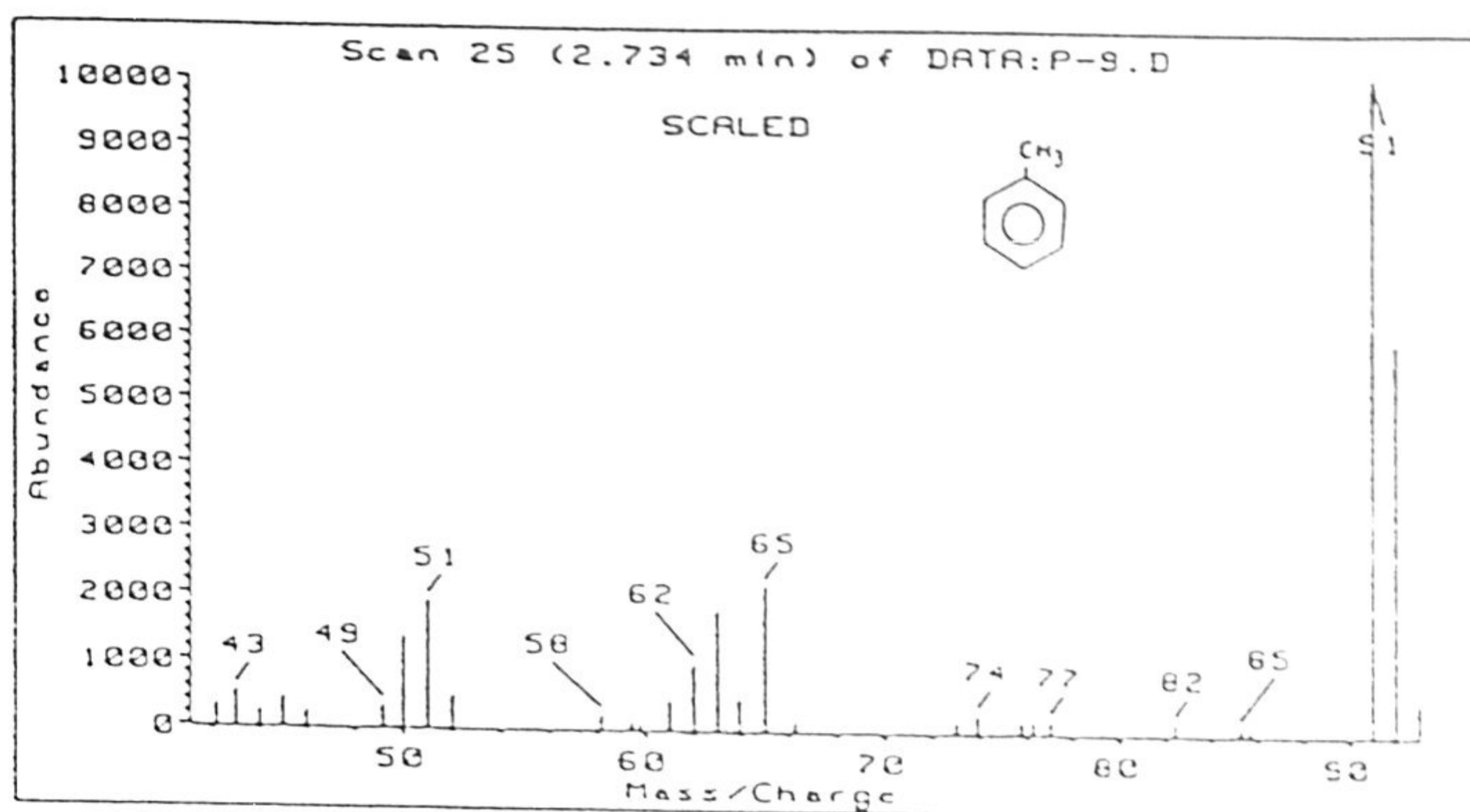


Figura 27. Espectro de masas de productos de la eliminación de grupos nitritos del TNT por la bacteria *Pseudomonas* sp. C1S1.

## C.2.2 CARACTERIZACION FISIOLOGICA DE LA CEPA DE Pseudomonas sp. CLON A.

### C.2.2.1 AISLAMIENTO DE LA CEPA.

La cepa denominada Pseudomonas sp. clón-A (clón-A en el resto de este trabajo) se consiguió a través de múltiples pases de enriquecimientos de la bacteria C1S1. Puesto que la bacteria C1S1 crecía lentamente con TNT como fuente de nitrógeno y fructosa como fuente de carbono y acumulaba nitrito en el medio de cultivo, se razonó que se podrían aislar clones derivados del C1S1 que crecieran más rápidamente con TNT sin acumular nitrito en el medio de cultivo. Para ello se mantuvieron cultivos estancos en fase exponencial de crecimiento a base de realizar diluciones del cultivo antes de que alcanzaran una  $DO_{660}$  mayor de 1,5. La primera serie de pases en cultivos estancos se realizó con exceso de TNT (TNT en lasca), y tras unos 50 pases se sembró en placas y uno de los clones aislados al azar se denominó clón 101b. El clón 101b crecía más rápidamente que el clón C1S1 en medio con TNT en lascas pero lentamente en medio con TNT por debajo de su límite de solubilidad. Con el clón 101b se inició otra serie de 50 pases como los descritos anteriormente, excepto que la concentración de TNT era de 100 mg/l, de manera que a medida que crecían las bacterias disminuía la concentración de TNT en el medio de cultivo. La bacteria resultante de estos pases se denominó clón-A. La bacteria es un bacilo gram negativo, presenta un flagelo polar y utilizando el sistema API y métodos de microbiología convencional se clasificó, al igual que su parental como perteneciente al género Pseudomonas. El test de API la adscribía al grupo I de ARNr sin distinguir entre P.



fluorescens y P. aeruginosa. Esta bacteria se depositó en la Colección de Cultivos NICM bajo patente y fue clasificada como P. aeruginosa por dicha Colección de Cultivos.

#### C.2.2.2 FUENTES DE CARBONO QUE PUEDE UTILIZAR EL CLON A.

Con TNT como fuente de nitrógeno, y al igual que la cepa parental, el clón-A utilizó eficientemente fructosa, glicerol, acetato, succínico y glucosa como fuente de C. Sin embargo, benzoato, 3-metilbenzoato y tolueno no fueron utilizados como fuente de C por esta bacteria (Tabla 8). Es de interés señalar que con los ácidos dicarboxílicos los cultivos creciendo con TNT acumularon nitrito en el medio de cultivo, siendo la concentración del mismo de hasta 240  $\mu\text{M}$  (Tabla 8).

Se ensayó si los N-aromáticos (TNT, 2,4-DNT y 2,6-DNT) podían ser utilizados como fuente de C por el clón-A, ninguno de esos N-aromáticos pudo actuar como fuente de C ó C y N.

#### C.2.2.3 EFECTO DE LA TEMPERATURA EN EL CRECIMIENTO DEL CLON A

Se ensayó con fructosa como fuente de C y 0,27 g TNT/100 ml como fuente de N el efecto que la temperatura tenía sobre el crecimiento de la bacteria clón-A. La Figura 28 muestra el crecimiento a distintas temperaturas a lo largo del tiempo. Se observó que la bacteria crecía óptimamente a 30°C siendo su crecimiento más lento a temperaturas más altas (37°C) y más bajas (25°C y 15°C). En los cultivos a 15°C, 25°C y 30°C no se detectó acumulación de  $\text{NO}_2^-$ , sin embargo en las bacterias incubadas a 37°C en los medios de cultivo se detectó hasta 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{NO}_2^-$ .

Tabla 8. CRECIMIENTO DEL CLON-A CON DISTINTAS FUENTES DE CARBONO Y ACUMULACION DE NITRITO A PARTIR DE TNT

Fuente de C	Crecimiento $A_{660}$	$\text{NO}_2^-$ (mM)
Fructosa	4,6	0
Glicerol	4,5	0
Acetato	1,1	0,15
Succinato	2,1	0,24
Glucosa	2,2	0,03
Benzoato	0,1	0

La bacteria clón-A se inoculó en 100 ml de medio de cultivo M8 suplementado con 0,27 g de TNT y 10 mM de glucosa o benzoato, 15 mM de ácido succínico, 20 mM de glicerol y 30 mM de ácido acético. El crecimiento ( $A_{660}$ ) en la tabla corresponde a la densidad del cultivo a los 15 días de iniciado el mismo. La concentración de  $\text{NO}_2^-$  se determinó en el sobrenadante de los cultivos.

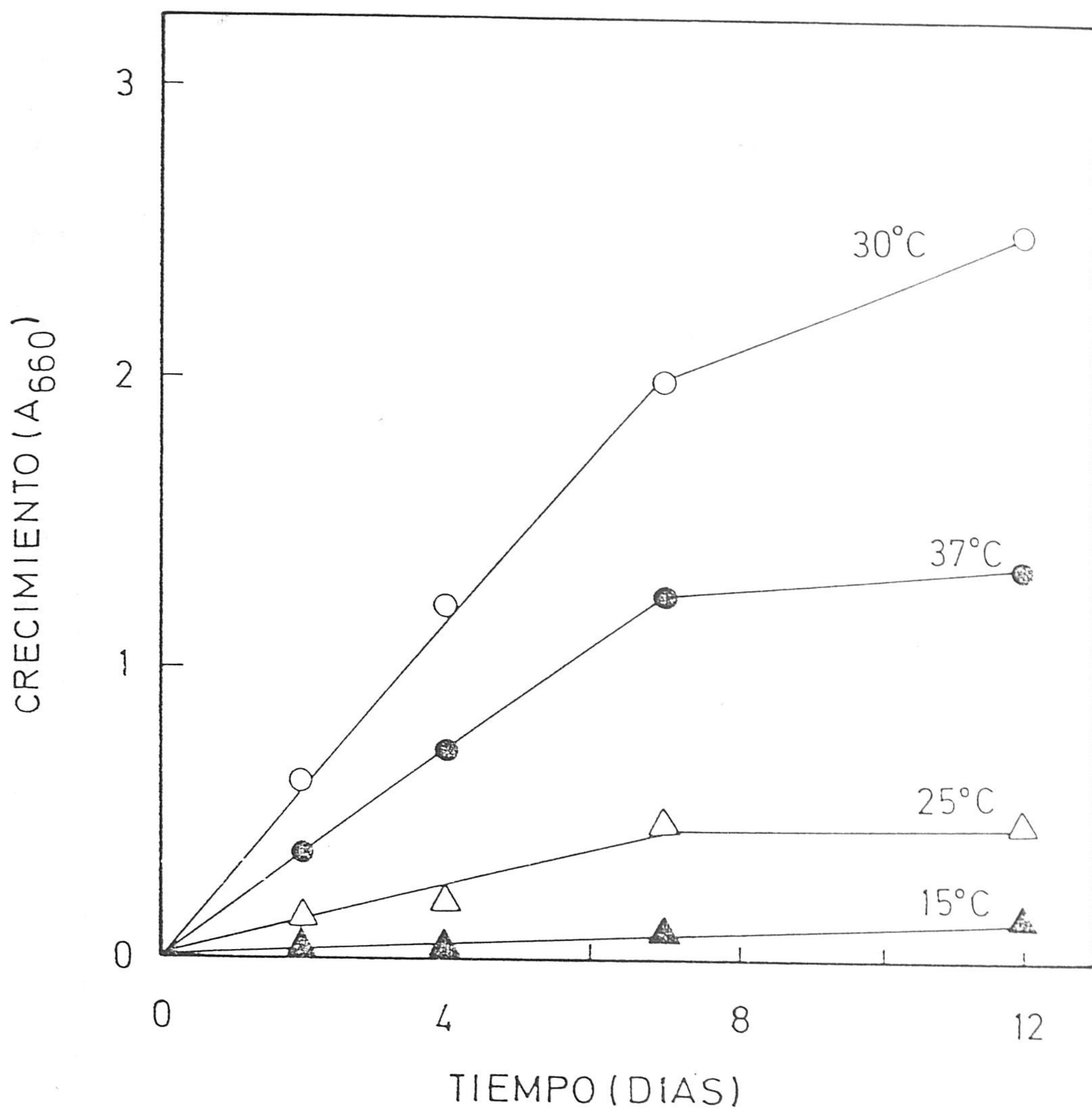


Figura 28. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento del clón-A con TNT como fuente de N. La bacteria clón-A se inoculó en medio M8 con fructosa (0,5% p/v) y 0,27 g de TNT. Los cultivos se incubaron con agitación a 15°C (▲), 25°C (△), 30°C (○) y 37°C (●). A los tiempos indicados se determinó la turbidez del cultivo a 660 nm.

#### C.2.2.4 REQUERIMIENTO DE O<sub>2</sub> POR EL CLON A EN SISTEMAS ESTANCOS.

Esta serie de ensayos se diseñaron para estudiar el efecto que sobre la utilización de TNT ejercía la presión de oxígeno en el medio de cultivo. Se consideraron tres condiciones, a saber, aerobiosis, anaerobiosis estricta y microaerobiosis.

Para establecer condiciones de anaerobiosis estricta los matraces de cultivo estériles con la bacteria clón A se sellaron con tapones de goma y se burbujearon con helio durante 30 min., el medio M8 contenía fructosa (0,5% p/v) como fuente de C y se probaron tres fuentes alternativas de N, a saber, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, TNT en lascas y NO<sub>3</sub><sup>-</sup>+TNT en lascas. En ningún caso se observó crecimiento, pero tanto en los cultivos con NO<sub>3</sub><sup>-</sup> como con NO<sub>3</sub><sup>-</sup>+TNT o TNT solo se acumularon altas concentraciones de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (hasta 1,2 mM) (Tabla 9). Estos resultados sugerían que la bacteria clón A es un aerobio estricto.

Se ensayó entonces el crecimiento del clón A en microaerobiosis, ello se consiguió utilizando botellas de 100 ml de capacidad que se llenaron con 50 ml de medio de cultivo y que se taparon herméticamente con tapones de rosca, de esta manera se mantuvo una cámara de aire sobre el medio de cultivo. El medio de cultivo utilizado contenía fructosa 0,5% (p/v) y TNT en lasca. La turbidez del cultivo llegó hasta DO<sub>660</sub> = 1,2, la cual era sólo del orden del 25% de los niveles alcanzados en cultivos aerobios (Tabla 9). Por tanto, los resultados de esta sección sugieren que la pO<sub>2</sub> es un factor importante en el control del proceso de eliminación de TNT por el clón A, y que en cualquier caso parece que las condiciones aerobias son las mejores para el cultivo del clón A con TNT.

Tabla 9. Crecimiento del clón A en distintas condiciones de oxigenación.

Condiciones	DO <sub>660</sub>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (μM)
Anaerobiosis	0,2	1200
Microaerobiosis	1,2	10
Aerobiosis	4,0	2

Las bacterias se cultivaron en medio M8 con fructosa (0,5% p/v) y TNT en lascas (1 g/l). A los 10 días se determinó la turbidez del cultivo y el nitrito acumulado.

#### C.2.2.5 FUENTES DE NITROGENO QUE UTILIZA EL CLON A.

Con objeto de determinar las fuentes de N que podía utilizar esta bacteria se realizaron ensayos de crecimiento en medio mínimo M8 con amonio, nitrato y nitrito como formas inorgánicas de N y TNT y diversos dinitro- y mononitrotoluenos como fuente de N-orgánico. Determinándose no sólo crecimiento con dichas fuentes de N, sino también acumulación de  $\text{NO}_2^-$  (en el caso de nitrato y nitroarenos) e intermediarios aromáticos (sólo en el caso de los nitroorgánicos) en los medios de cultivo. En estos ensayos se utilizó fructosa como fuente de carbono.

##### C.2.2.5.1 FUENTES DE NITROGENO INORGANICO

La Tabla 10 muestra que la bacteria creció hasta altas densidades con 10 mM de amonio o nitrato,  $\text{DO}_{660} > 2$  a las 48 h de iniciado el cultivo. La turbidez de los cultivos con nitrito fue del orden de 0,4. La limitación en el caso de nitrito sólo viene impuesta por el hecho de que este compuesto se suministró a baja concentración (1 mM) en los medios de cultivos para evitar su toxicidad. De hecho como consecuencia de la utilización de este compuesto por Pseudomonas clón A, la concentración de  $\text{NO}_2^-$  en el medio de cultivo disminuyó hasta niveles por debajo de nuestro límite de detección (Figura 29). Estos resultados eran de interés ya que sugerían que esta bacteria podía participar en la eliminación no sólo de TNT sino también del nitrato presente en aguas de lavado de tanques de producción de TNT.

Tabla 10. CRECIMIENTO DEL CLON-A CON DISTINTAS FUENTES DE N-INORGANICO.

Fuente de nitrógeno	Crecimiento bacteriano (A <sub>660</sub> )
Amonio	2,1
Nitrato	2,2
Nitrito	0,4

La bacteria Pseudomonas sp. clón-A se inoculó en medio de cultivo M8 con fructosa (0,5% (p/v)) y 10 mM NH<sub>4</sub>Cl ó 10 mM KNO<sub>3</sub> ó 1 mM NaNO<sub>2</sub>. La turbidez inicial (A<sub>660</sub>) de los cultivos fue inferior a 0,05 unidades. El valor de A<sub>660</sub> dado en la Tabla corresponde a las 48 h de iniciado el cultivo y corresponde a la turbidez máxima del mismo.

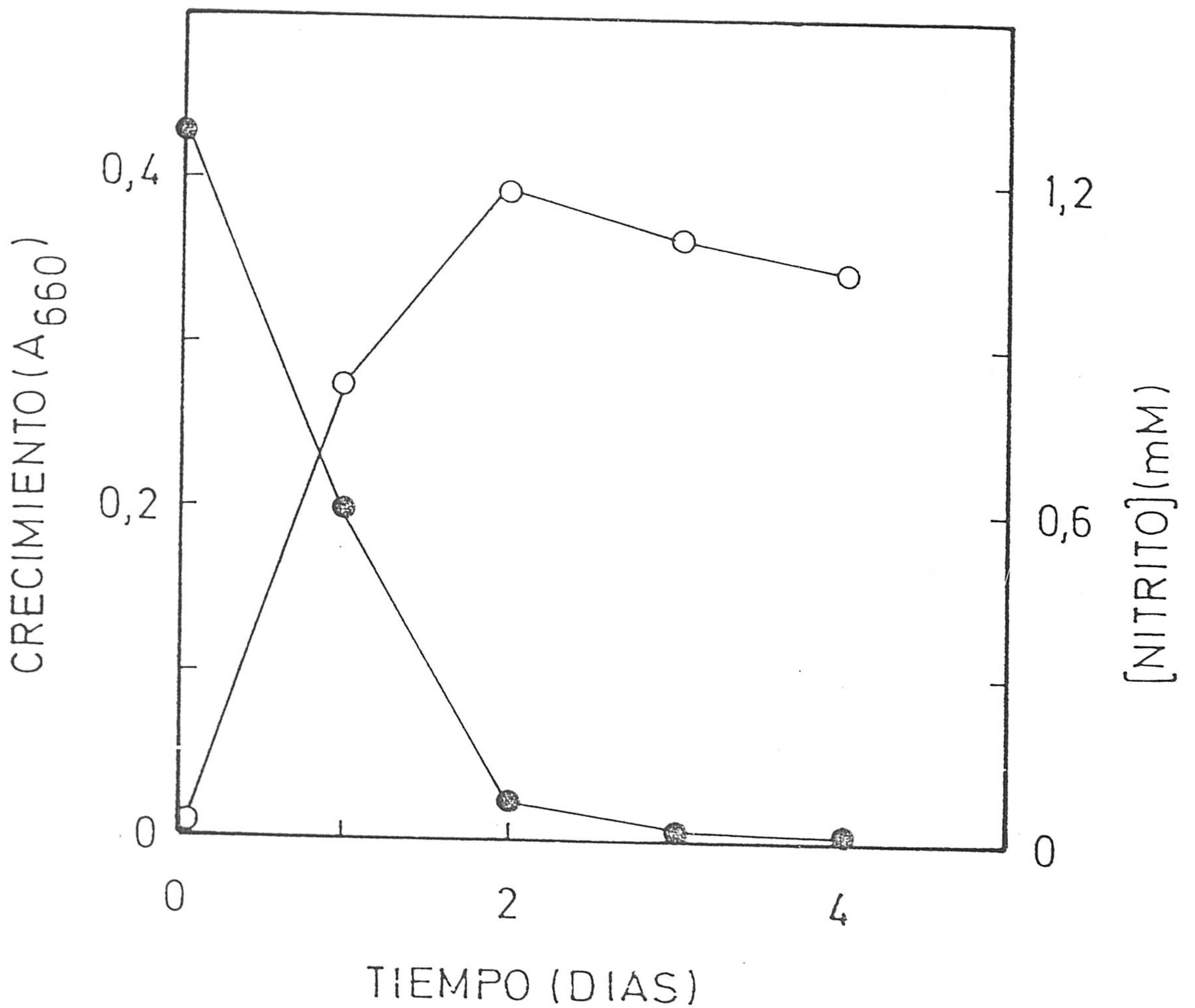


Figura 29. Crecimiento del clón-A con nitrito y utilización de éste por dicha bacteria. La bacteria clón-A se inoculó en M8 con fructosa como fuente de C (0,5% p/v) y 1,25 mM NO<sub>2</sub> como fuente de N. A los tiempos indicados se determinó la turbidez del cultivo [crecimiento (A<sub>660</sub>)] (○) y la concentración de NO<sub>2</sub> en el medio (●).



#### C.2.2.5.2 FUENTES DE NITROGENO ORGANICO

La Tabla 11 muestra que en medio mínimo M8 con fructosa como fuente de carbono la mejor fuente de N-orgánico para esta bacteria fue el TNT, y notablemente menos eficiente fueron 2,4-, 2,3-, 3,4- y 2,6-dinitrotolueno. Los mononitrotoluenos como 2-, 3- y 4-nitrotolueno no fueron utilizados como fuente de N para el crecimiento por esta bacteria. La cantidad de nitrito en los medios de cultivo con esos nitroaromáticos fue siempre inferior a 30  $\mu\text{M}$ .

El crecimiento del clón-A con TNT, y DNTs dio lugar a la aparición de compuestos aromáticos que se detectaron tras analizar muestras de sobrenadantes de los cultivos en un HPLC acoplado a un detector de ultravioleta como se describió en Materiales y Métodos. Los tiempos de retención de los productos resultantes se recogen en la Tabla 11. En el caso de los cultivos suplementados con 3-NT no se detectó en el medio de cultivo otro aromático salvo este hidrocarburo. En cultivos suplementados con 2-NT se observó la acumulación de al menos otros dos productos aromáticos, cuyos picos eran muy minoritarios. En el caso de los cultivos con 4-NT se detectaron al menos 3 compuestos aromáticos (Tabla 11). El 4-NT, aunque no era utilizado como fuente de N fue biotransformado eficientemente por el clón-A, así en el plazo de una semana desapareció al menos el 50% del total.

#### C.2.2.5.3 EFECTO DE LA ADICION DE EXTRACTO DE LEVADURA A MEDIOS CON TNT, DNT Y MNT COMO FUENTE DE N.

La pérdida de la capacidad de crecer en 2NT del clón-A con respecto a la cepa parental C1S1, sugería que la bacteria clón-A

podría requerir algún micronutriente para su crecimiento con 2NT. Por esta razón los cultivos se suplementaron con 0,1% (p/v) de extracto de levadura. Los cultivos así suplementados crecían rápidamente con 2NT no observándose acumulación de  $\text{NO}_2^-$  (Tabla 12).

El suplemento de extracto de levaduras a cultivos creciendo en 2,4-DNT y 2,6-DNT también resultó en la obtención de densidades celulares más altas y crecimiento bacteriano más rápido (Tabla 12). En contraste con 4NT el suplemento con extracto de levaduras no resultó en crecimiento celular indicando de nuevo la incapacidad de la bacteria para remover grupos nitro de este compuesto, aunque era biotransformado probablemente a p-aminotolueno.

Tabla 11. CRECIMIENTO DEL CLON-A CON DISTINTAS FUENTES DE N-ORGANICO

Fuente de N-orgánico	Crecimiento bacteriano $A_{660}$	$\text{NO}_2^-$ (mM)	HPLC (min)
TNT	2,50	0	1,21; 2,08; 2,28; 2,75; <u>3,46</u>
2,3DNT	0,48	0,01	1,23; 1,99; 2,83; <u>3,18</u> ; 4,23
3,4DNT	0,18	0,01	1,22; 2,23; <u>3,19</u>
2,4DNT	0,75	0,02	1,23; 1,99; 2,24; 2,44; <u>3,25</u>
2,6DNT	0,30	0,01	1,22; 1,84; 2,66; <u>3,22</u> ; 3,90
2NT	0,06	0,02	1,20; 1,83; <u>3,52</u>
3NT	0,02	0	<u>3,84</u>
4NT	0,00	0	1,29; 2,67; 3,17; <u>3,57</u>

La bacteria clón-A se inoculó en medios de cultivo M8 con fructosa como fuente de carbono. El 2-NT y 3-NT se suministraron en la fase gaseosa utilizando una varilla en forma de U. El resto de los nitroaromáticos se añadieron en sólido para que la cantidad fuera el equivalente a 10 mM en caso de disolución total. Dada la limitada solubilidad de éstos los cultivos se saturaron con el nitroaromático correspondiente y el resto quedó

en forma de cristales. La densidad inicial ( $A_{660}$ ) de los cultivos fue menor de 0,05 y el valor de  $A_{660}$  en la Tabla se registró a los 6 días. La concentración de nitrito se refiere a la máxima registrada a lo largo de los 6 días de incubación. Los análisis de aromáticos en el medio de cultivo corresponden igualmente al sexto día, para ello 25  $\mu$ l del sobrenadante libre de células se inyectaron en una columna de hipersil-C-18 y se eluyeron con acetonitrilo::agua (60::40) a un flujo de 0,7 ml/min. El tiempo de retención subrayado corresponde al nitroaromático suministrado.

Tabla 12. CRECIMIENTO DEL CLON-A EN MEDIO M8 CON TNT Y DNTs  
 SUPLEMENTADO CON EXTRACTO DE LEVADURAS

Fuente de nitrógeno	Crecimiento bacteriano $A_{660}$
Ninguna	0
Extracto de levaduras	0,2
2-NT	0,2
2-NT+Extracto de levaduras	1,9
4-NT	0,1
4-NT+Extracto de levaduras	0,3
2,4-DNT	1,7
2,4-DNT+Extracto de levaduras	4,2
2,6-DNT	2,2
2,6-DNT+Extracto de levaduras	4,2

Las condiciones de cultivo son las de la Tabla-11 excepto que donde se indica se suministró 0,1% (p/v) de extracto de levadura. La turbidez inicial del cultivo fue 0,05 y la final indicada se determinó 7 días más tarde.

#### C.2.2.5.4 CRECIMIENTO DEL CLON A CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE TNT.

El clón-A, al igual que su cepa parental Pseudomonas sp. C1S1 creció más rápidamente cuanto mayor fue la cantidad de TNT en los medios de cultivos (Figura 30). En estos experimentos el medio de cultivo se saturó con TNT y se añadieron cantidades crecientes de TNT en forma de cristales para alcanzar en 100 ml cantidades totales de 27 mg, 270 mg y 2700 mg. En los sobrenadantes de los medios de cultivo con distinta cantidad de TNT se encontraron siempre los mismos aromáticos resultantes del metabolismo del TNT y en todos los casos la concentración de nitrito fue inferior a 30  $\mu\text{M}$ . Es de interés señalar, por tanto, que el clón-A sobrevivió y utilizó TNT eficientemente cuando se suministró a altas concentraciones.

Se ensayó asimismo si el clón-A crecía en condiciones de baja concentración de TNT con fructosa como fuente de C. Para este tipo de ensayos se realizaron cultivos continuos, a saber, el clón-A se cultivó en cultivos de tipo estanco hasta alcanzar una  $\text{DO}_{660}$  próxima a 1, entonces el cultivo se transfirió a un fermentador (250 ml) al que se le suministró de manera continua TNT en medio fresco a una concentración de 100 mg/l y un flujo de 1,5 ml/hora. Al alcanzarse el equilibrio la turbidez a 660 nm del cultivo fue de 0,4, lo cual equivalía a aproximadamente  $10^7$  CFU  $\text{ml}^{-1}$ , entonces se determinó la cantidad de TNT en el influente y en el exfluente, observándose que la concentración de TNT en el exfluente quedaba por debajo de nuestro límite de detección en el HPLC (Figura 31) frente a los 100 mg/l detectados en el influente. Estos resultados sugerían que el clón-A

eliminaba eficientemente altas y bajas cantidades de TNT.

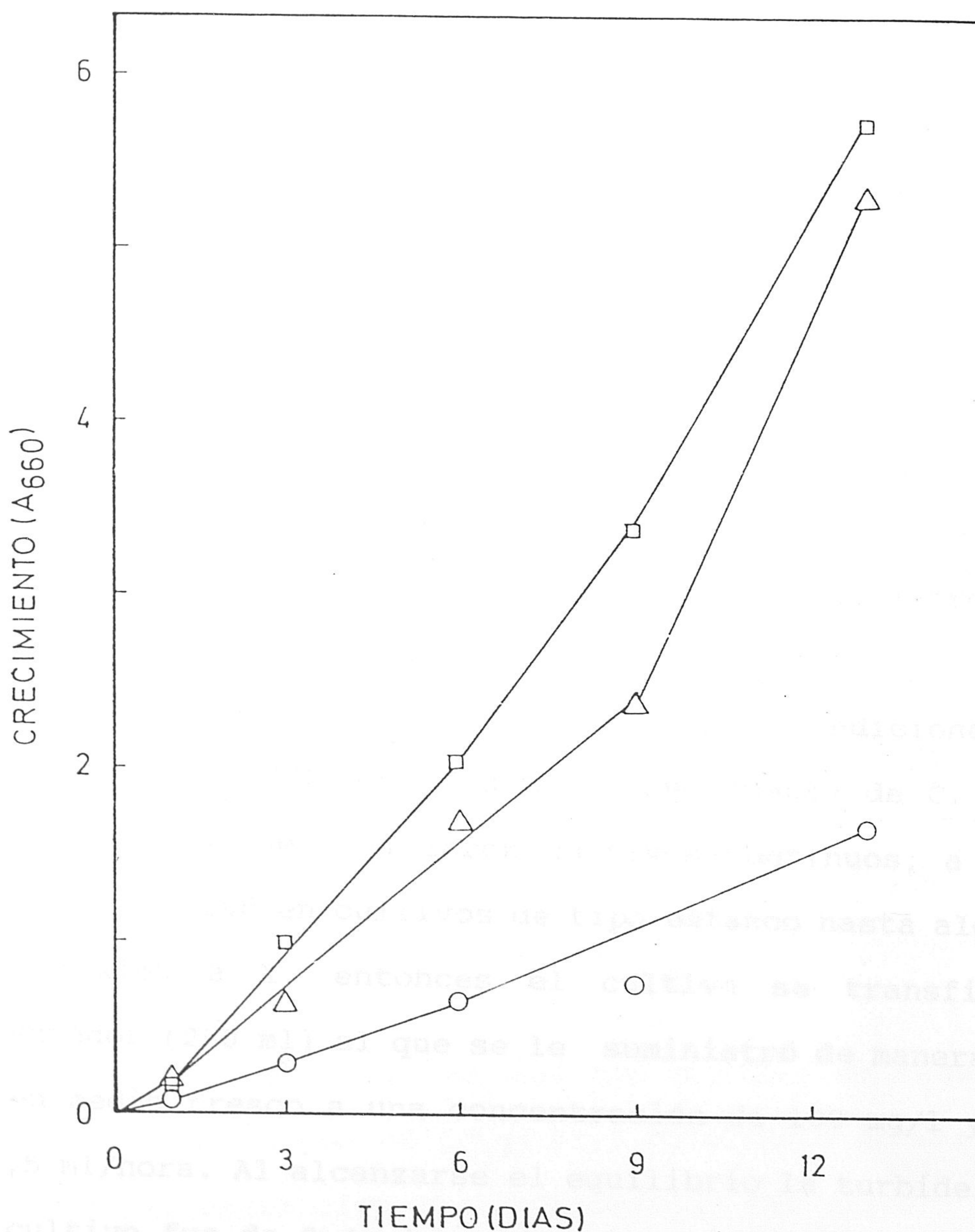


Figura 30. Efecto de la concentración de TNT sobre el crecimiento del clón-A. Cien mililitros de medio de cultivo M8 con fructosa (0,5% p/v) como fuente de carbono y 0,027 g TNT (o), 0,27 g TNT (Δ) y 2,7 g TNT (□) se inocularon con el clón-A. A los tiempos indicados se determinó la densidad celular del cultivo a 660 nm.



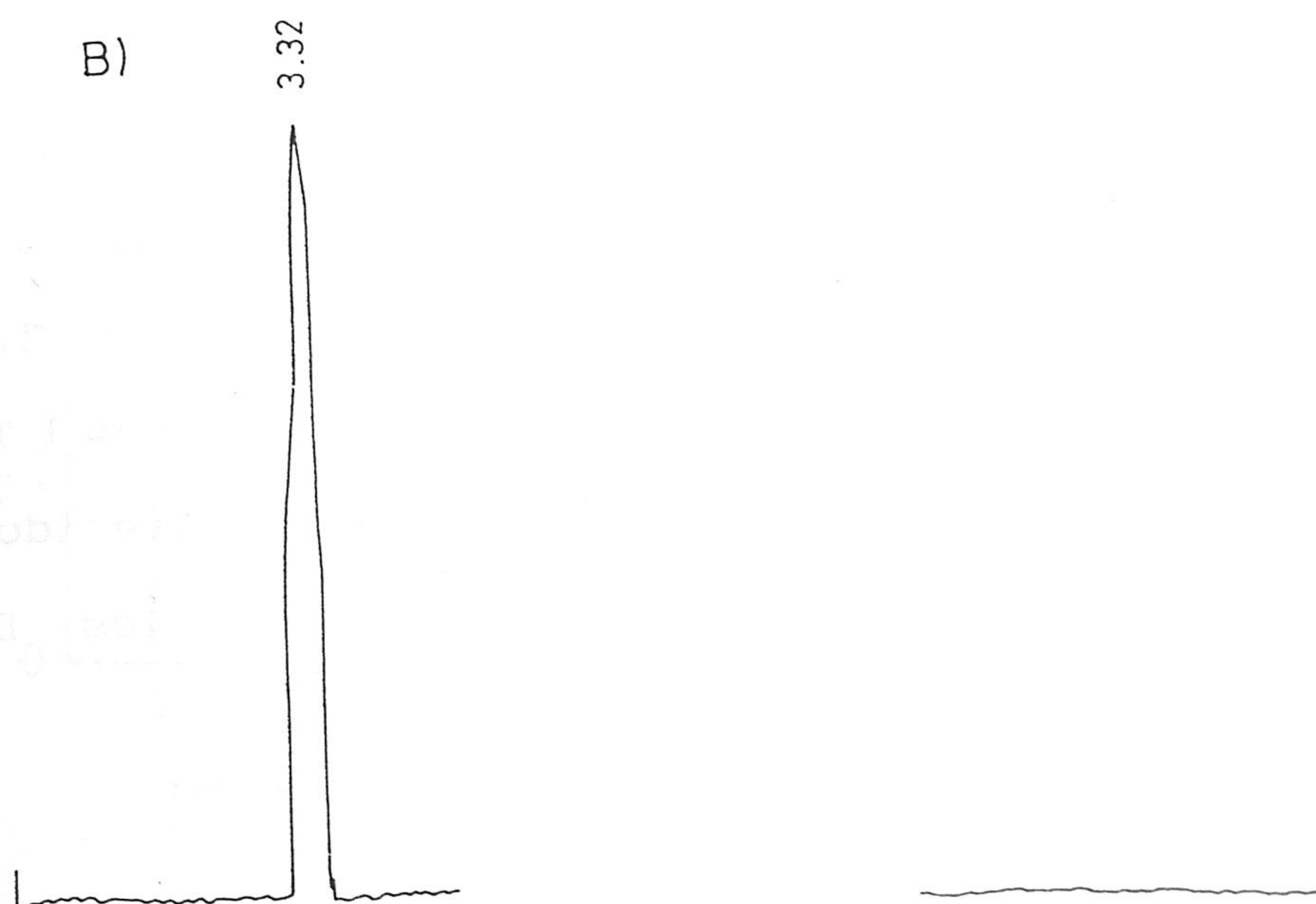
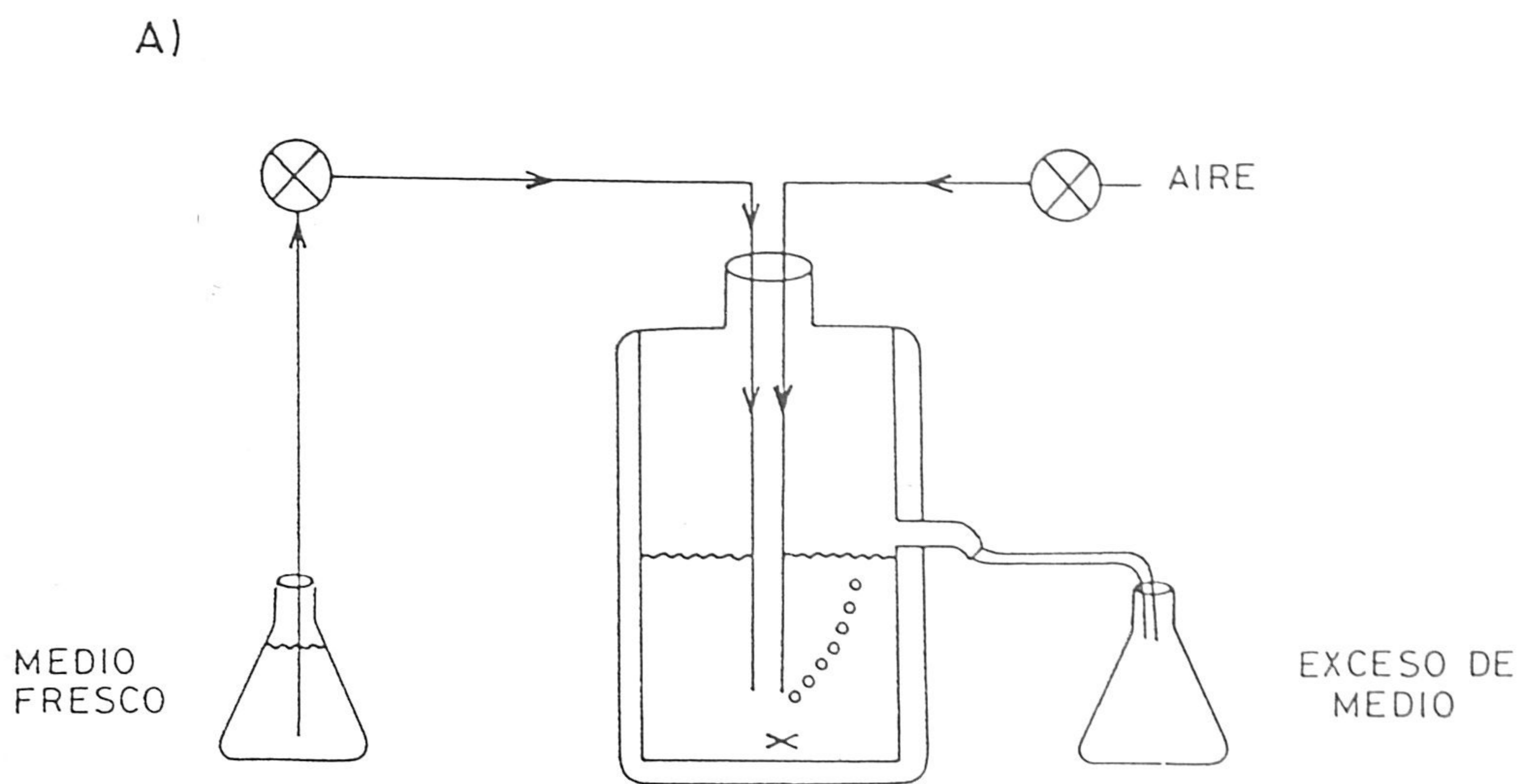


Figura 31. Cultivo del clón-A en medio con baja concentración de TNT. La bacteria clón-A se cultivó en un matraz erlenmeyer hasta  $A_{660} = 1$ , entonces se transfirió al fermentador (250 ml) que se alimentó con medio saturado en TNT y que se bombeó a un flujo de 1,5 ml/h. El cultivo se agitó con una mosca magnética y se aireó mediante burbujeo con aire estéril (A). Una vez establecido el equilibrio ( $A_{660} = 0,4$ ) se determinó la concentración de TNT en el medio fresco (influyente) y en el exceso de medio (exfluyente) tras cromatografiar 25  $\mu$ l del sobrenadante del cultivo a través de una columna hipersil C-18 en un HPLC como se describe en Materiales y Métodos (B). La concentración de TNT se interpoló del área resultante del pico correspondiente frente a una curva patrón realizadas en las mismas condiciones.

#### C.2.2.5.5 CRECIMIENTO DEL CLON A CON TNT EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE DNTs Y MNTs.

Dado que los análisis previos con el C1S1 sugerían que el metabolismo de TNT ocurría vía DNTs se ensayó si era posible el metabolismo simultáneo de TNT y DNTs. Ensayos de consumo de TNT en los que este compuesto se suministró a saturación (100 mg/l) indicaron que el TNT desaparecía en un 80% en un período de 48 h. En experiencias similares con 2,4DNT (100 mg/l) y 2,6DNT (100 mg/l) se encontró que en el plazo de una semana los cultivos consumían entre el 20 y el 30% de la cantidad inicial (Figura 32).

En ensayos con cultivos a los que se les suministró simultáneamente TNT (100 mg/l) y DNTs (100 mg/l) se observó que la presencia de DNTs retrasó el consumo de TNT, esto es, a las 48 horas se había consumido sólo entre el 25 y el 33% del TNT y se requerían 7 días para eliminar aproximadamente el 80% del TNT. En contraste el metabolismo de los DNTs se vio favorecido en presencia de TNT, así hasta cerca de 80% de los DNTs desaparecieron en una semana (Figura 32).

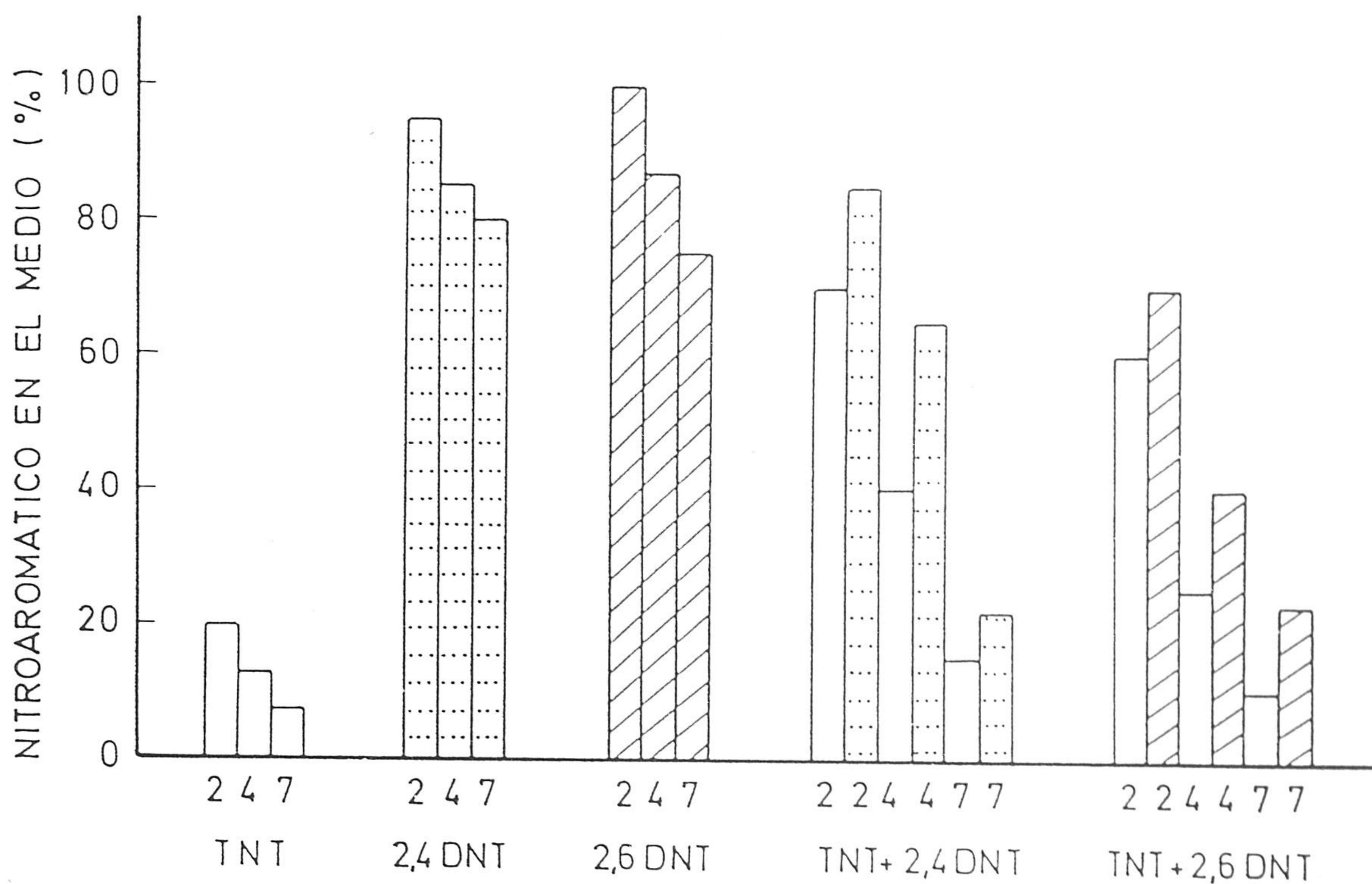


Figura 32. Consumo de TNT y 2,4- y 2,6-DNT por el clón-A. Células del clón-A a densidad celular ( $DO_{660} = 1$ ) se suspendieron en medio de cultivo con TNT, 2,4- y 2,6-DNT o TNT+2,4-DNT y TNT+2,6-DNT (100 mg/l de cada aromático). A los 2, 4 y 7 días se estimó el % del nitroaromático remanente en el medio de cultivo mediante cromatografía líquida en una columna de hipersil C-18 ODS. Como fase móvil se utilizó metanol::agua (70::30 v/v) a un flujo de 0,5 ml/min. Estas condiciones permitieron separar TNT (tiempo de retención 3,40 min.) de los DNTs (tiempo de retención 3,18 min).

#### C.2.2.5.6 CRECIMIENTO DEL CLON A EN PRESENCIA DE FUENTES DE N-INORGANICO Y ORGANICO Y ENSAYO DE LA ACTIVIDAD NITRITO REDUCTASA EN ESAS CONDICIONES DE CULTIVO.

Se estudió el crecimiento de la cepa clón-A con TNT y 10 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y 10 mM  $\text{KNO}_3$ . En todos los casos se observó que el crecimiento de esta bacteria en medio de cultivo con TNT y una fuente de N-inorgánico era más rápido que con TNT solo y similar a la velocidad de crecimiento con la fuente de N-inorgánico en ausencia del nitroareno. Sin embargo la turbidez final de los cultivos con TNT y  $\text{NO}_3^-$  o  $\text{NH}_4^+$  fue mayor que la alcanzada con los compuestos añadidos sin mezclar (Figura 33). Los cultivos con mezclas de TNT y N-inorgánico, al igual que aquellos con sólo el nitroaromático acumularon intermediarios aromáticos tras analizar los sobrenadantes de los cultivos en el HPLC en las condiciones standard descritas en Materiales y Métodos. Es de interés señalar que en los sobrenadantes de cultivos con  $\text{NO}_3^-$  y TNT se observaron al cabo de 6 días, además de los picos correspondientes a aromáticos más polares (que aparecieron también con sólo TNT, ver Tabla 11), picos de aromáticos menos polares que el TNT, en particular, aquellos con tiempos de retención de 7,43 y 8,85 (Figura 34). Estos picos se detectaron también en cultivos con sólo TNT, pero aparecieron tras concentrar los cultivos después de la extracción de aromáticos con éter. Observaciones similares se hicieron en los cultivos con  $\text{NH}_4^+$ +TNT.

Además se determinó el nivel de actividad nitrito reductasa (NiRasa) en cultivos con estas fuentes de N. Se encontró que en cultivos creciendo con sólo  $\text{NH}_4^+$ , los niveles de actividad NiRasa

eran indetectables mientras que con TNT,  $\text{NO}_3^-$  y TNT+ $\text{NO}_3^-$ , los cultivos presentaron altos niveles de actividad NiRasa, los cultivos con TNT+ $\text{NH}_4\text{Cl}$  también exhibieron actividad NiRasa pero a niveles más bajos (Tabla 13). Estos resultados sugieren que Pseudomonas sp. clón A expresó la actividad NiRasa en respuesta a TNT,  $\text{NO}_3^-$  y mezclas de TNT y  $\text{NO}_3^-$  ó TNT y  $\text{NH}_4^+$ . El hecho que la actividad NiRasa sea más alta en presencia de TNT sólo que en presencia de  $\text{NO}_3^-$  y que la bacteria crezca más rápidamente con  $\text{NO}_3^-$  que con TNT sugería que la velocidad de eliminación del grupo nitro del TNT, probablemente, constituya el factor limitante en la metabolización del mismo.

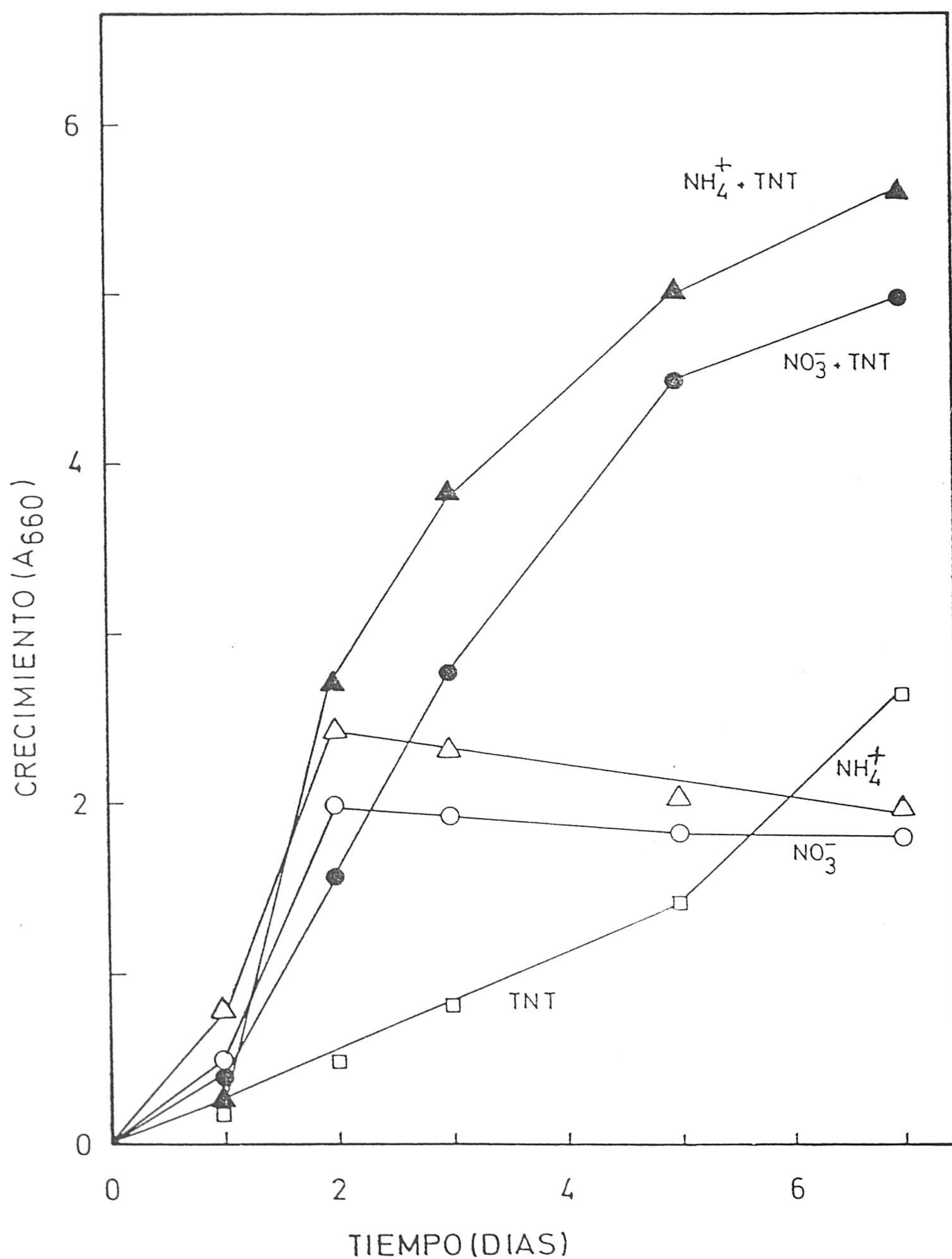


Figura 33. Efecto de la presencia de N-inorgánico y N-orgánico en el crecimiento del clón-A. La bacteria clón-A se inoculó en 100 ml M8 con fructosa (0,5% p/v) como fuente de C y las siguientes fuentes de N: 10 mM KNO<sub>3</sub> (○), 10 mM NH<sub>4</sub>Cl (△), 0,27 g TNT (□), 0,27 g TNT+10 mM KNO<sub>3</sub> (●) y 0,27 g TNT+ 10 mM NH<sub>4</sub>Cl (▲). A los tiempos indicados se determinó la turbidez del cultivo a 660 nm.

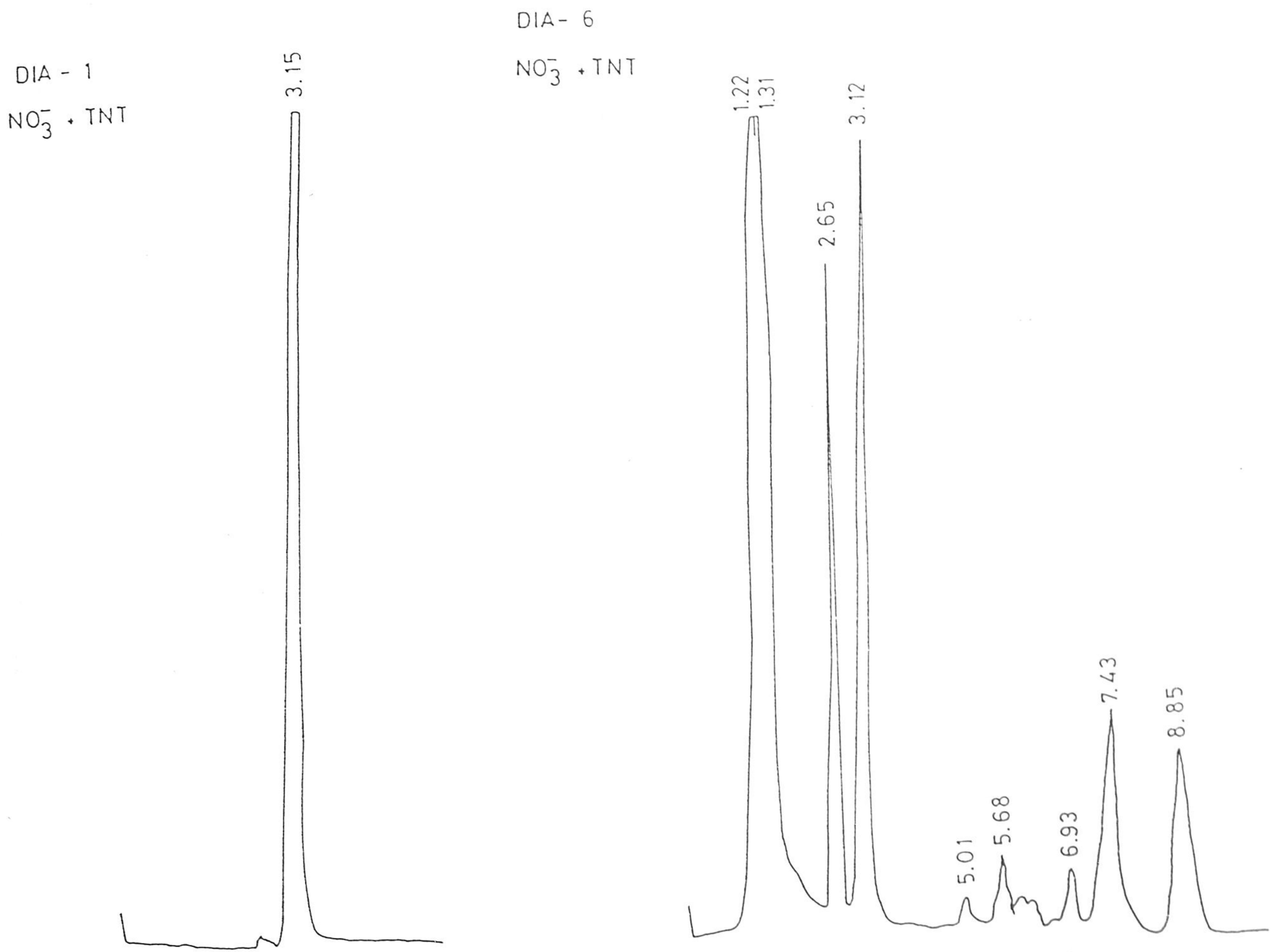


Figura 34. Metabolitos producidos por el clón-A creciendo con KNO<sub>3</sub> más TNT. La bacteria clón-A se inoculó en medio de cultivo M8 con 10 mM KNO<sub>3</sub> y 0,27 g TNT/100 ml. Justo después de introducir las bacterias y 6 días más tarde se analizaron en el HPLC 25 µl del sobrenadante de los cultivos tal como se indica en el pie de la Tabla 11.

Tabla 13. ACTIVIDAD NITRITO REDUCTASA DEL CLON-A CRECIENDO  
CON DISTINTAS FUENTES DE NITROGENO

Fuente de N	Nitrito reductasa Unidades/mg proteína
$\text{NO}_3^-$	14
$\text{NO}_3^- + \text{TNT}$	52
$\text{NH}_4^+$	0
$\text{NH}_4^+ + \text{TNT}$	4
TNT	37

La actividad nitrito reductasa se determinó in situ en células cultivadas en la fuente de N indicada. Una unidad de actividad nitrito reductasa correspondió al consumo de  $1 \mu\text{mol}$  de  $\text{NO}_2^-$  por minuto en las condiciones standard del ensayo a  $30^\circ\text{C}$  que se describen en Materiales y Métodos.



#### C.2.2.5.7 EFECTO DE LA CARGA DE TNT Y $\text{NO}_3^-$ SOBRE SU ELIMINACION POR EL CLON A.

Se estudió el efecto que la carga de TNT y  $\text{NO}_3^-$  ejercía sobre la utilización de estos compuestos por cultivos del clón A. Las condiciones experimentales incluyeron medios mínimos M8 suplementados con 20, 50 y 100 mM de  $\text{HNO}_3$  en ausencia y presencia de 1 g/l y 10 g/l de TNT en lasca. Como fuente de carbono se utilizó fructosa (0,5% p/v), la cual se añadió a la misma concentración a las 48 h y 72 h para evitar limitación en fuente de C. A lo largo del tiempo se determinó el número de células por ml del cultivo, la concentración de  $\text{NO}_3^-$  y la presencia o no de TNT en solución.

Se observó que la densidad celular inicial, alrededor de  $10^6$  CFU/ml incrementó en todos los casos entre 2 y 4 ordenes de magnitud independientemente de la concentración de  $\text{NO}_3^-$  y TNT, aunque a 10 g/l de TNT se observó cierta inhibición del crecimiento bacteriano (Tabla 14A). Ambos  $\text{NO}_3^-$  y TNT se consumieron simultáneamente aunque a la concentración más alta de TNT se observó la presencia de éste en solución durante al menos 48 h, aunque fue indetectable posteriormente. La observación de los matraces de cultivo revelaron que tras 48 h el TNT en lasca había desaparecido en el matraz en el que se había suministrado a concentración de 1 g/l pero no así en los matraces con 10 g/l. Cuando el  $\text{NO}_3^-$  se suplementó a concentración 20 mM, éste se consumió casi completamente tanto en presencia como ausencia de TNT, sin embargo cuando se suministró a concentraciones superiores, se detectó al final de la experiencia entre el 25 y el 75% de la concentración inicial (ver Tabla 14B).

El TNT en solución era prácticamente indetectable cuando se suministró a concentración de 1 g/l, indicando que la velocidad de metabolización era igual o superior a la de su solubilización. En cambio en condiciones de 10 g/l se detectó en solución durante al menos 72 h.

Tabla 14. Crecimiento del clón A en medio mínimo con distintas concentraciones de nitrato y TNT y el consumo de éstos. Treinta ml de medio mínimo M8 se suplementaron con 0,5% (p/v) de fructosa y HNO<sub>3</sub> y TNT para alcanzar las concentraciones que se indican abajo. El pH de los medios se ajustó a 7,0 con KOH. A tiempo t=0 h se añadió aproximadamente 2x10<sup>6</sup> células/ml y los cultivos se incubaron a 30°C con agitación. Donde se indica por \* se añadió 0,5% (p/v) de fructosa. A los tiempos indicados se determinó el número de células (CFU) por ml de cultivo (A), la concentración de nitrato (B) y TNT en solución (C).

Cultivo 1 → [HNO<sub>3</sub>] = 25 mM  
 Cultivo 2 → " = 50 mM  
 Cultivo 3 → " = 100 mM  
 Cultivo 4 → " = 25 mM; TNT = 30 mg  
 Cultivo 5 → " = 50 mM; " = 30 mg  
 Cultivo 6 → " = 100 mM; " = 30 mg  
 Cultivo 7 → " = 25 mM; " = 300 mg  
 Cultivo 8 → " = 50 mM; " = 300 mg  
 Cultivo 9 → " = 100 mM; " = 300 mg

A: Número de células por ml de cultivo (CFU/ml)

Cultivo número

Tpo. (h)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	2,1x 10 <sup>6</sup>								
24	2,4x 10 <sup>8</sup>	1,6x 10 <sup>9</sup>	1,1x 10 <sup>9</sup>	9,7x 10 <sup>7</sup>	3,2x 10 <sup>8</sup>	2x 10 <sup>8</sup>	8x 10 <sup>7</sup>	6,6x 10 <sup>7</sup>	1,9x 10 <sup>7</sup>
* 48	2,8x 10 <sup>9</sup>	1,8x 10 <sup>9</sup>	2x 10 <sup>9</sup>	2,5x 10 <sup>9</sup>	8x 10 <sup>9</sup>	8x 10 <sup>8</sup>	8,4x 10 <sup>8</sup>	8,7x 10 <sup>8</sup>	3,5x 10 <sup>7</sup>
* 72	6,5x 10 <sup>9</sup>	3,5x 10 <sup>9</sup>	1,6x 10 <sup>10</sup>	3x 10 <sup>9</sup>	1,8x 10 <sup>10</sup>	1,4x 10 <sup>10</sup>	4,2x 10 <sup>9</sup>	2,4x 10 <sup>9</sup>	1x 10 <sup>9</sup>
144	5,1x 10 <sup>9</sup>	1,7x 10 <sup>10</sup>	1,0x 10 <sup>10</sup>	1x 10 <sup>9</sup>	1,7x 10 <sup>9</sup>	9,5x 10 <sup>8</sup>	1,5x 10 <sup>9</sup>	2,8x 10 <sup>7</sup>	5x 10 <sup>8</sup>

B: Concentración de  $\text{NO}_3^-$  (mM)

Cultivo número

Tpo. (h)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	20	46	103	20	42	103	20	46	103
24	15	34	72	16	41	87	17	40	88
48	5,7	24	63	7,1	23	76	1,3	36	78
72	4,5	21	58	5,1	21	49	1,2	32	74
144	0,8	21	28	0,8	17	22	0,2	23	71

C: TNT en solución (mg/l)

Cultivo número

Tpo (h)	4	5	6	7	8	9
0	-	-	-	-	-	-
24	10	10	10	100	100	100
48	<1	<1	13	26	25	41
72	<1	<1	<1	16	12	5
144	<1	<1	<1	<1	<1	<1

#### C.2.2.6 CRECIMIENTO DEL CLON A EN AGUAS DE LAVADOS DE TANQUES DE PRODUCCION DE TNT.

La fábrica de Unión Española de Explosivos en Quintanilla de Sobresierra (Burgos) nos suministró aguas procedentes de las corrientes de lavado de tanques de la fabricación de TNT.

Las aguas ácidas (pH 2,0) se diluyeron o no a la mitad y el pH se ajustó a 7 con NaOH. El análisis de HPLC de la muestra de agua neutralizada reveló que además de TNT (pico 3,30 en la Figura 35), la muestra contenía al menos 4 compuestos aromáticos más, cuyos tiempos de retención fueron 1,32; 1,50; 2,25 y 2,78. La naturaleza de estos compuestos no se determinó. A las aguas diluidas o no se les añadió fructosa como fuente de C, fosfatos, NaCl y micronutrientes para alcanzar la concentración típica del medio M8. Asimismo se añadió o no 50 mg TNT/100 ml y se ensayó el crecimiento bacteriano y el consumo de TNT.

Como se observa en la Tabla 15, las bacterias crecieron óptimamente ( $A_{660}=2$ ) en aguas diluidas a la mitad y suplementadas con TNT. Los análisis de TNT en las aguas mediante HPLC revelaron que el TNT desaparecía completamente del medio de cultivo. En efecto en la Figura 35 se muestra que el pico de 3,30 min. correspondiente a TNT desaparecía completamente, asimismo desapareció el pico correspondiente al producto con un tiempo de retención de 2,78 min.. En contraste en las aguas diluidas a la mitad y sin suplementar con TNT, el crecimiento fue notoriamente inferior ( $A_{660}=0,4$ ) aunque el TNT desapareció completamente. En las aguas sin diluir no se observó crecimiento independientemente del suplemento con TNT.

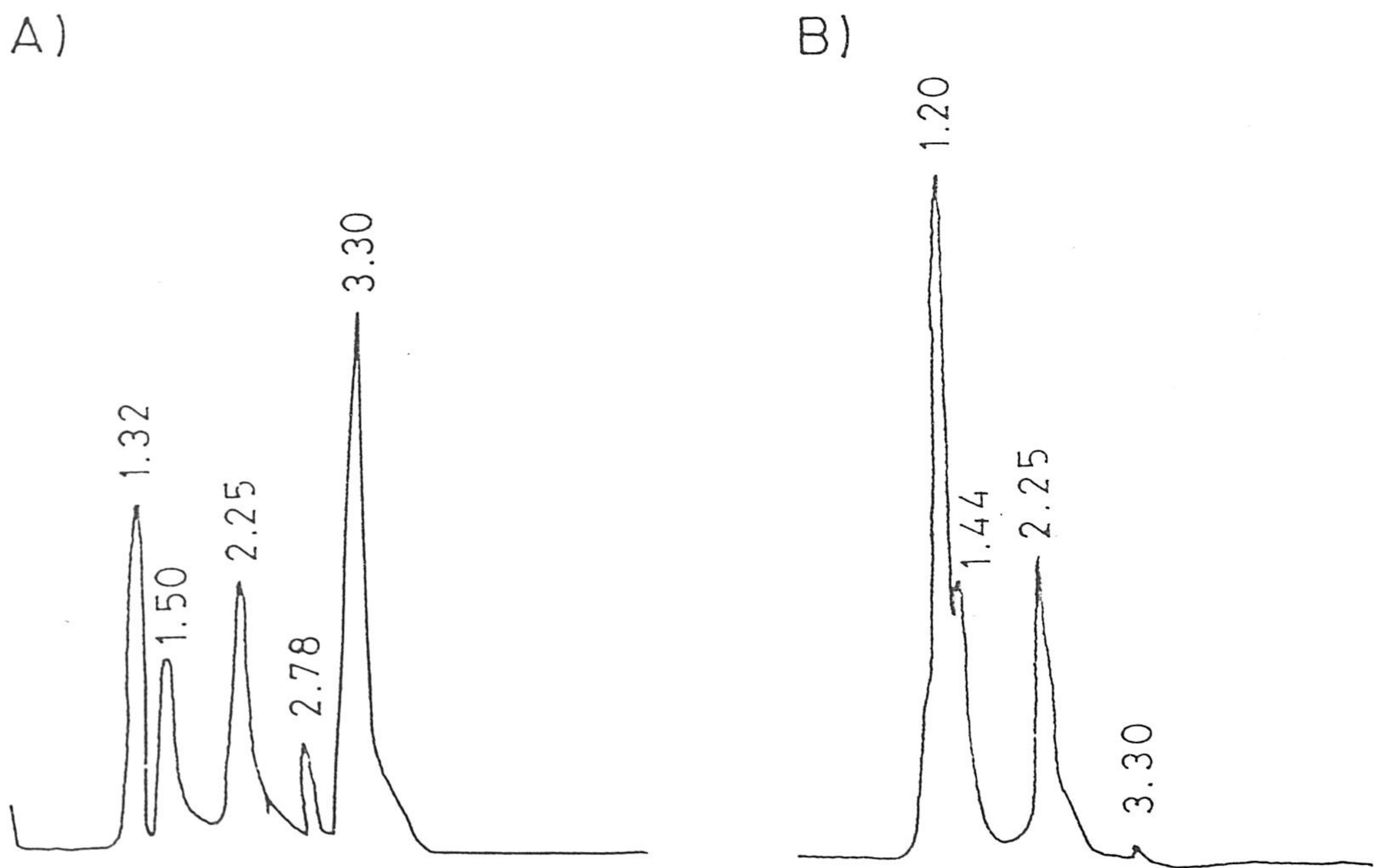


Figura 35. Consumo de TNT en aguas de la factoría de Burgos por el clón A. Las aguas de la factoría se diluyeron al 50%, el pH se ajustó a 7,0 con NaOH y se suplementaron con nutrientes para alcanzar las concentraciones standard del medio M8. El medio se suplementó con TNT como se describe en el texto y los aromáticos en la muestra se detectaron a 254 nm tras su separación en las condiciones standard utilizadas en los análisis de HPLC (A). Este medio se inoculó con la bacteria clón-A tras seis días de crecimiento se analizaron los compuestos aromáticos en las aguas (B). El pico 3,30 min. corresponde a TNT.

Tabla 15. CRECIMIENTO DEL CLON A EN AGUAS DE LA FACTORIA  
PROVENIENTES DE PRODUCCION DE TNT

Aguas de la factoría	Crecimiento bacteriano (A <sub>660</sub> ) <u>6 días</u>
50% Aguas ácidas	0,40
50% Aguas ácidas+TNT	2,00
100% Aguas ácidas	0,05
100% Aguas ácidas+TNT	0,10

Las aguas ácidas de la factoría tenían un pH=2 y mediante extracción se determinó que contenían 8-9 mg TNT/100 ml. El pH se neutralizó (pH 7,0) con NaOH y el agua se diluyó a la mitad (50% agua) o no se diluyó (100%). A las aguas diluidas al 50% se le añadió o no 50 mg TNT/100 ml. A las aguas así tratadas se le añadió medio M8, fructosa y micronutrientes para alcanzar las concentraciones utilizadas en los medios de cultivo standard. A esos medios de cultivo se le añadió 1 ml de un cultivo del clón-A cultivado con TNT como fuente de N para alcanzar una A<sub>660</sub> inicial de 0,05.

#### C.2.2.7 CRECIMIENTO DE PSEUDOMONAS CLON A EN AGUAS SINTÉTICAS.

Con objeto de no depender de la producción de TNT en fábrica se diseñó un medio de cultivo que denominamos "aguas sintéticas" que contenía: TNT 60 mg/l; 1,98 ml de ácido nítrico (200 mg N/l) y 1,0 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> comercial (1000 mg/l) ó "1/2 agua sintética" que contiene la mitad de los componentes (ver soluciones en Materiales y Métodos). El pH de estas aguas es aproximadamente de 1,5. Tras añadir medio M8 para alcanzar las concentraciones standard de los medios de cultivo el pH se ajustó con un álcali (KOH, NaOH y Ca(OH)<sub>2</sub>) o fosfato hasta 5,5 y 7.

En los medios sintéticos se ensayó el crecimiento del clón A en cultivos estancos de pequeño volumen. En medio "1/2 aguas sintéticas" se observó crecimiento bacteriano a ambos pH mientras que en las "aguas sintéticas" sólo se observó crecimiento a pH 7,0 (Tabla 16). Las "aguas sintéticas" se han utilizado en estudios de escalado del proceso a 2 y 20 litros, experiencias que no se contemplan en este trabajo de Tesis Doctoral.

En las "aguas sintéticas" a pH 7,0 se ensayó el efecto de la cantidad de TNT y de la densidad celular inicial sobre el consumo de TNT. Se observó que al cabo de 3 días el TNT había sido consumido en su totalidad, independientemente de la carga celular y la carga de TNT. Sin embargo en el primer día se observaron diferencias notables ya que a cualquier concentración de TNT a mayor densidad celular inicial mayor consumo de TNT (Tabla 17).



Tabla 16. Crecimiento del clón-A en "aguas sintéticas" y "1/2 aguas sintéticas".

Medio	pH	DO <sub>660</sub>
Aguas sintéticas	5,5	0,03
	7,0	1,75
1/2 Aguas sintéticas	5,5	1,40
	7,0	1,75

La composición de las aguas sintéticas se describe en el texto. La DO<sub>660</sub> inicial en todos los casos fue inferior a 0,1 unidad. El valor de DO<sub>660</sub> dado corresponde a la densidad máxima que se alcanzó siempre 3 días después de iniciado el cultivo. Otras condiciones fueron las standard de cultivo.

Tabla 17. Efecto de la concentración de TNT en las "aguas sintéticas" y de la carga celular sobre el consumo de TNT por el clón A.

TNT (mg/l)	DO <sub>660</sub> (inicial)	DO <sub>660</sub> (final)	% TNT consumido	
			24 h	72 h
30	0,05	1,9	71	100
60	0,05	1,9	30	100
100	0,05	2,1	5	100
30	0,40	3,3	93	100
60	0,40	2,4	66	100
100	0,40	2,7	48	100

El % TNT consumido se estimó mediante extrapolación del área del pico correspondiente al TNT en cromatogramas tomados al inicio del experimento y a los tiempos indicados. La DO<sub>660</sub> final corresponde a las 72 h de iniciado el cultivo.

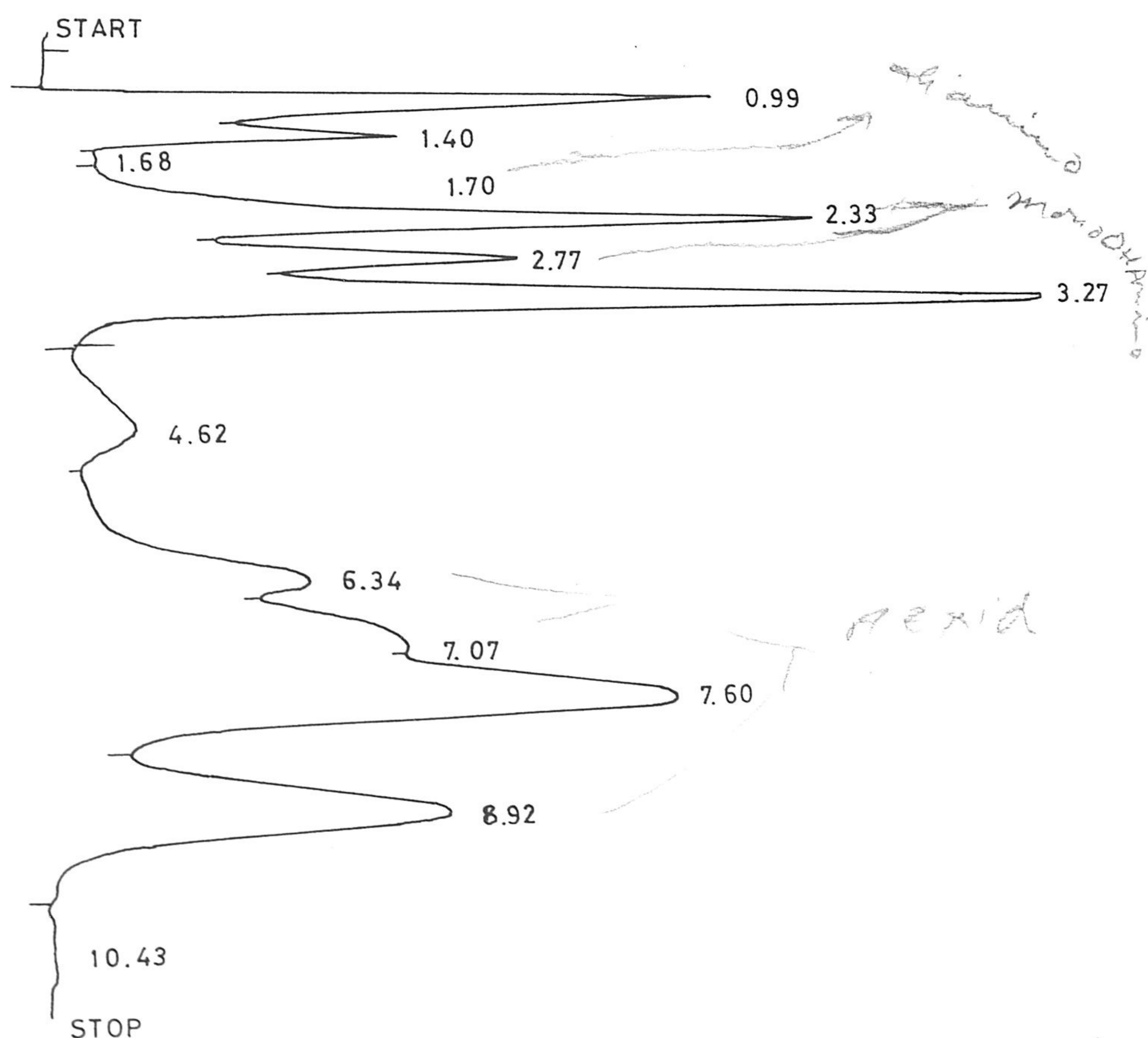
### C.2.3 ANALISIS DE LOS PRODUCTOS RESULTANTES DEL METABOLISMO DEL TNT POR EL CLON A.

Tres litros resultantes de seis cultivos de 500 ml cada uno del clón A en medio mínimo con fructosa como fuente de C y TNT a saturación como fuente de N se recogieron por centrifugación. Los productos presentes en los sobrenadantes libres de células se extrajeron de acuerdo con el esquema mostrado en Materiales y Métodos y los extractos resultantes se resuspendieron en 1 ml de acetonitrilo::agua (75::25, v/v) y se analizaron fundamentalmente mediante HPLC y gases-masas.

Los análisis de HPLC se realizaron en las condiciones standard descritas en Materiales y Métodos. La Figura 36 muestra un cromatograma de un extracto tipo. Con objeto de identificar los productos presentes los extractos se fraccionaron en columnas de sílica y las fracciones resultantes que contenían un sólo producto se analizaron mediante HPLC, espectrometría de infrarrojos, GC-MS y <sup>1</sup>H-NMR. Estos análisis se realizaron en este grupo de investigación por Francisca Godoy y Alí Haïdour utilizando las facilidades de los Servicios Técnicos de la Universidad de Granada. Estos análisis permitieron asignar inequívocamente un compuesto a la mayoría de los productos detectados en HPLC. Así los picos más hidrofóbicos en el cromatograma (tiempos de retención [tr]=8,03 min. y 9,36 min.) correspondieron a los azoxidímeros de la Figura 26. El pico cuyo tiempo de retención era 3,30 min. correspondió a TNT sin transformar mientras que los picos con tr=1,72 min., 2,40 min. y 2,83 min. correspondieron a 2,6-diamino-4-nitrotolueno, 2-amino-4,6-dinitrotolueno y 4-hidroxi laminotolueno, respectivamente.

Análisis previos sugerían que la eliminación de grupos nitro de la molécula de TNT procedía secuencialmente originando 2,4- y 2,6-dinitrotolueno, 2- y 4-nitrotolueno y tolueno. Ninguno de estos productos se han detectado como mayoritarios en nuestros extractos, probablemente debido a que el clón A utiliza eficientemente esos compuestos en presencia de TNT. La no detección de tolueno se debió probablemente a que en el proceso de extracción no se tomaron precauciones encaminadas a evitar su evaporación.

Merece resaltarse que el clón A, a diferencia del clón parental C1S1, parece haber perdido la capacidad de oxidar TNT a derivados con un grupo alcohol o carboxilo.



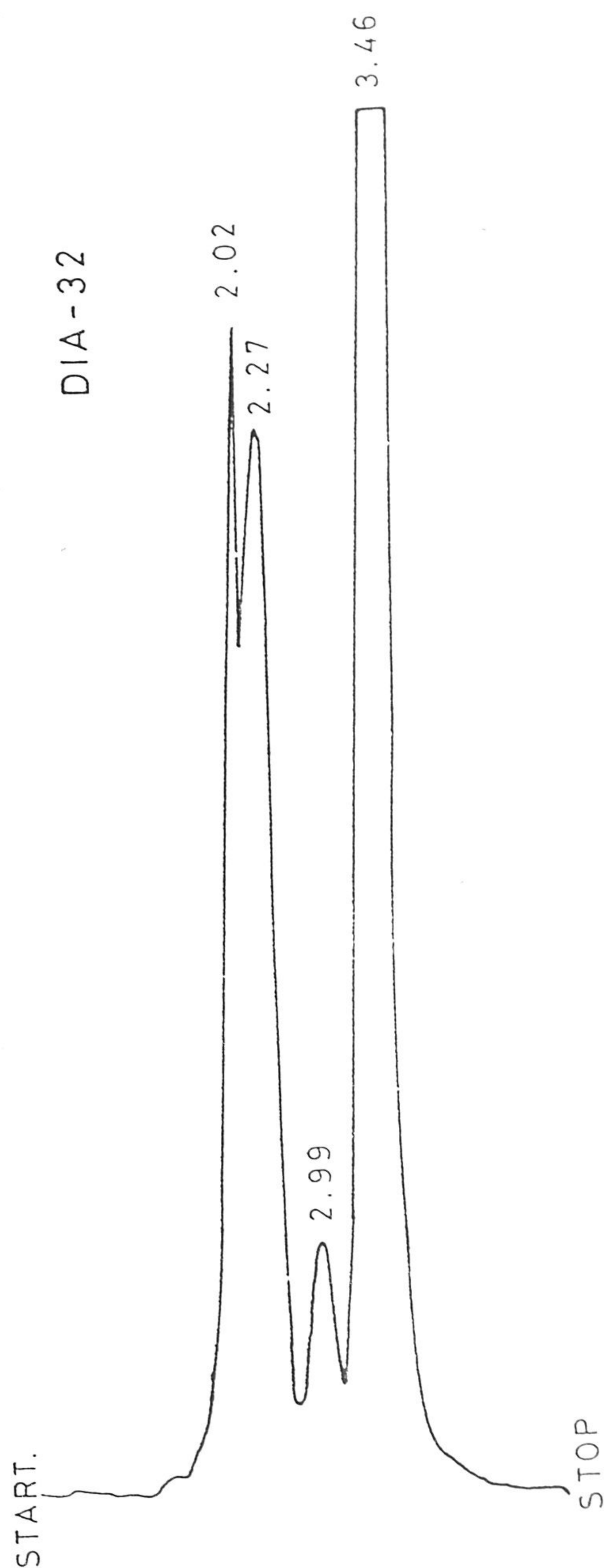


Figura 36. Cromatograma standard del extracto de éter etílico de un cultivo de *Pseudomonas* sp. clón-A. Los productos presentes en 25  $\mu$ l de un extracto se separaron en una columna de hipersil C-18 utilizando una mezcla acetonitrilo::agua (60::40, v::v). La detección de los productos aromáticos se realizó a 254 nm.

#### C.2.4 CULTIVO CONTINUO DEL CLON A.

Con objeto de seleccionar derivados del clón A que utilizaran TNT más eficientemente que el clón A se establecieron cultivos continuos de esta bacteria con TNT como factor limitante, tras esta estrategia se perseguía enriquecer en utilizadores más eficientes de TNT que generaran menos productos secundarios. Para ello se iniciaron cultivos continuos del clón-A en medio M8 con 1% (p/v) de fructosa como fuente de C y TNT a concentración de 80 mg/l. El pH del cultivo se mantuvo a 7,0, el nivel de oxígeno fue saturante (4 litro aire filtrado/litro de cultivo) y la temperatura 30°C. Se realizaron 3 series consecutivas cuya duración fue de entre 15 y 20 días cada una. De cada serie se seleccionó una bacteria para iniciar la siguiente. De la serie-1 se seleccionó un clón denominado clón/A/30. De esta bacteria se seleccionó un mutante resistente a rifampicina que se denominó A/30/R. La selección del mutante resistente a rifampicina permitió añadir este antibiótico a concentración 10µg/ml, lo cual permitió operar los cultivos continuos en esterilidad durante períodos de tiempo prolongados. A partir del clón A/30/R se seleccionó el clón A/30/R/12 y de éste otro clón denominado clón A/30/R/12/5. Además se inició una nueva fase de enriquecimiento utilizando el clón A/30/R/12/5 pero utilizando TNT a menor concentración (70 mg/l) al clón seleccionado se denominó A/30/R/12/5/31.

##### C.2.4.1 CRECIMIENTO ESTANCO DE CLONES PROVENIENTES DE ENRIQUECIMIENTOS EN EL CULTIVO CONTINUO.

Se utilizó el clón A y tres de sus formas aisladas a partir de

cultivos continuos, a saber: A/30/R/12, A/30/R/12/5 y A/30/R/12/5/31.

Las bacterias se cultivaron en medio mínimo con fructosa (0,5% p/v) y TNT al 70% del nivel de saturación, TNT en lasca y aguas sintéticas (TNT a saturación + 15 mM  $\text{NO}_3^-$ ). Se determinó el crecimiento, nitrito acumulado en el medio de cultivo y la acumulación de derivados del TNT por esas bacterias.

Las Figuras 37 y 38 muestran que en todas las condiciones ensayadas el comportamiento de los clones derivados del clón A fue similar al de la cepa parental. Se observó que las bacterias no crecían o crecían poco en TNT al 70% del nivel de saturación, pero alcanzaban  $\text{DO}_{660}$  del orden de 4 en los otros casos. En ningún caso se encontró acumulación de nitrito en los medios de cultivo. Los extractos de éter de los cultivos en las tres condiciones fueron similares entre sí y similares a los que se obtuvieron con el clón A en las mismas condiciones.

En el caso de los extractos de aguas sintéticas se observó que los clones A/30/R/12/5 y 30/R/12/5/31 acumularon menos cantidad de diversos derivados de productos resultantes del metabolismo del TNT que los clones A y A 30/12 (ver Figura 39)

Es de interés hacer notar que aunque con TNT al 70% de saturación no se observó crecimiento significativo, los distintos clones acumularon derivados del TNT, indicando que estas bacterias eran capaces de metabolizar TNT a baja concentración. La falta de crecimiento se debe probablemente a que la cantidad de N disponible no es suficiente.

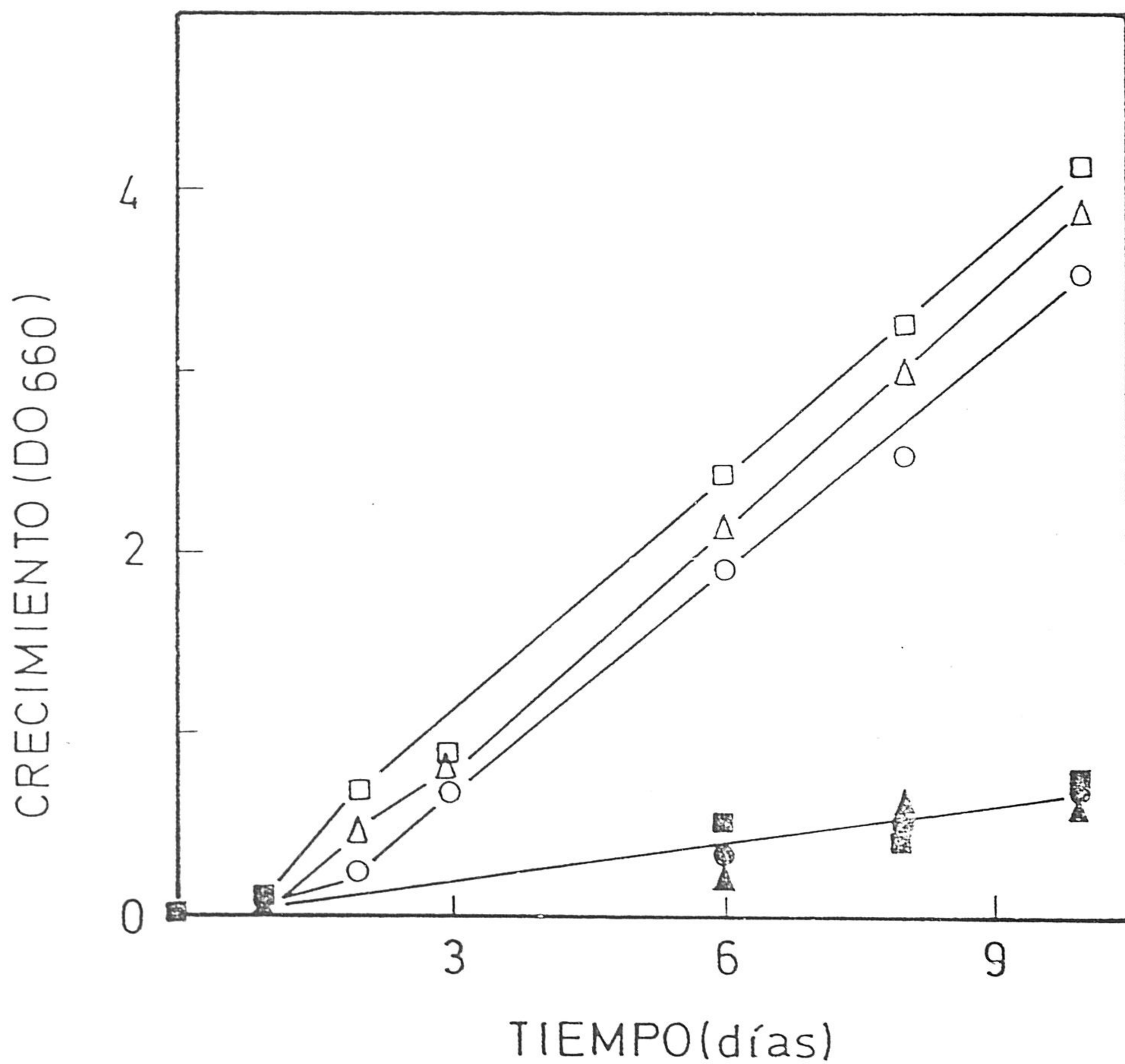


Figura 37. Crecimiento del clón A y algunos de sus derivados en medio mínimo con TNT. El medio de cultivo y las condiciones fueron las standards utilizadas a lo largo de este trabajo con 0,5% p/v de fructosa y TNT suministrado en lascas (símbolos abiertos) ó 70 mg/l (símbolos cerrados). A los tiempos indicados se estimó el crecimiento bacteriano como turbidez (DO) a 660 nm. ○, ● clón A; △, ▲, clón A 30/12/; □, ■ clón A 30/R/12/5/31.



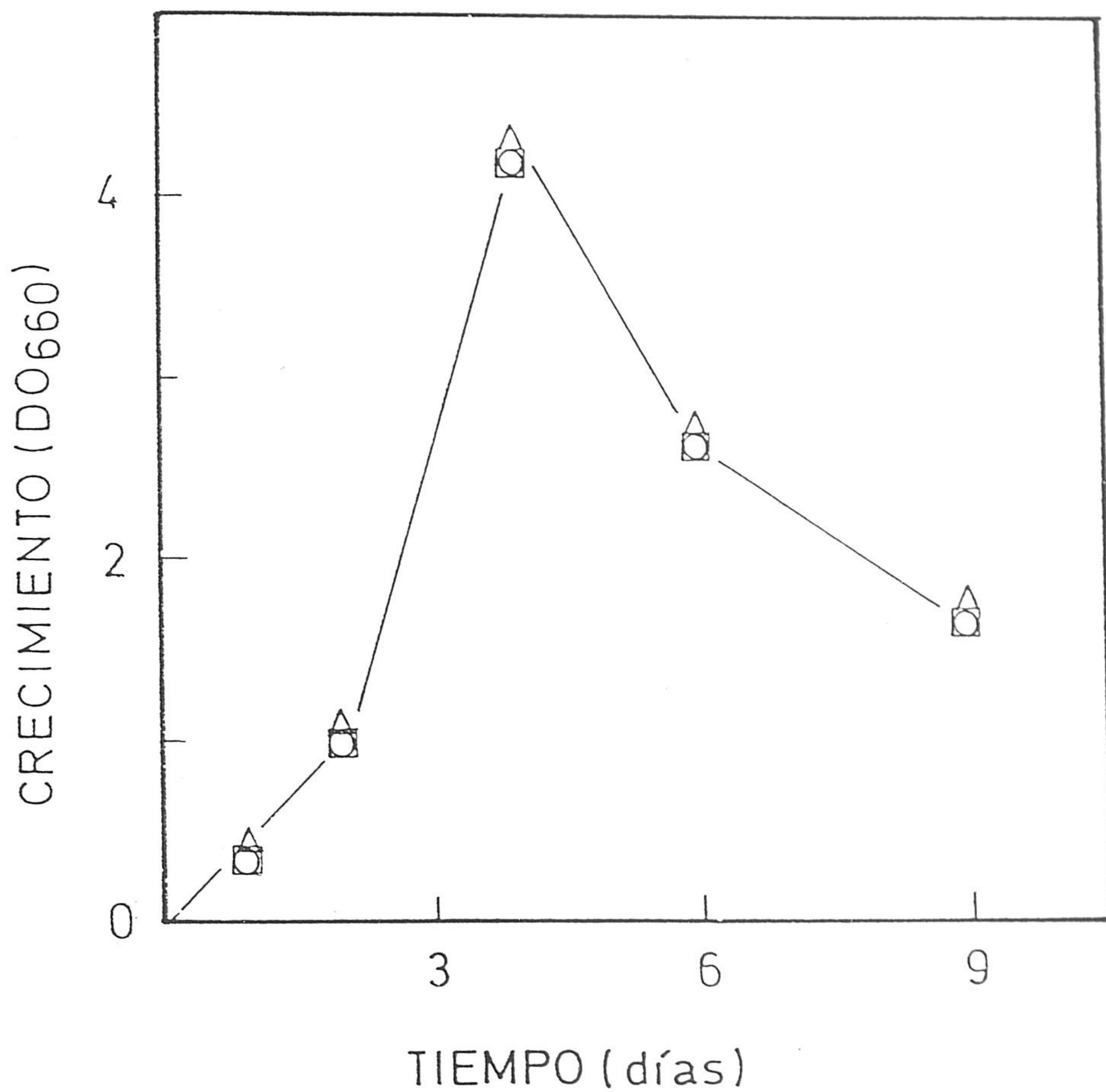


Figura 38. Crecimiento del clón A y algunos de sus derivados en aguas sintéticas. Las condiciones fueron las mismas de la Figura 37 excepto que el medio de cultivo contenía 100 mg/l TNT y 15 mM  $\text{HNO}_3$  como fuente de nitrógeno. ○, clón A; Δ, clón A 30/12/ y □, clón A 30/R/12/5/31.

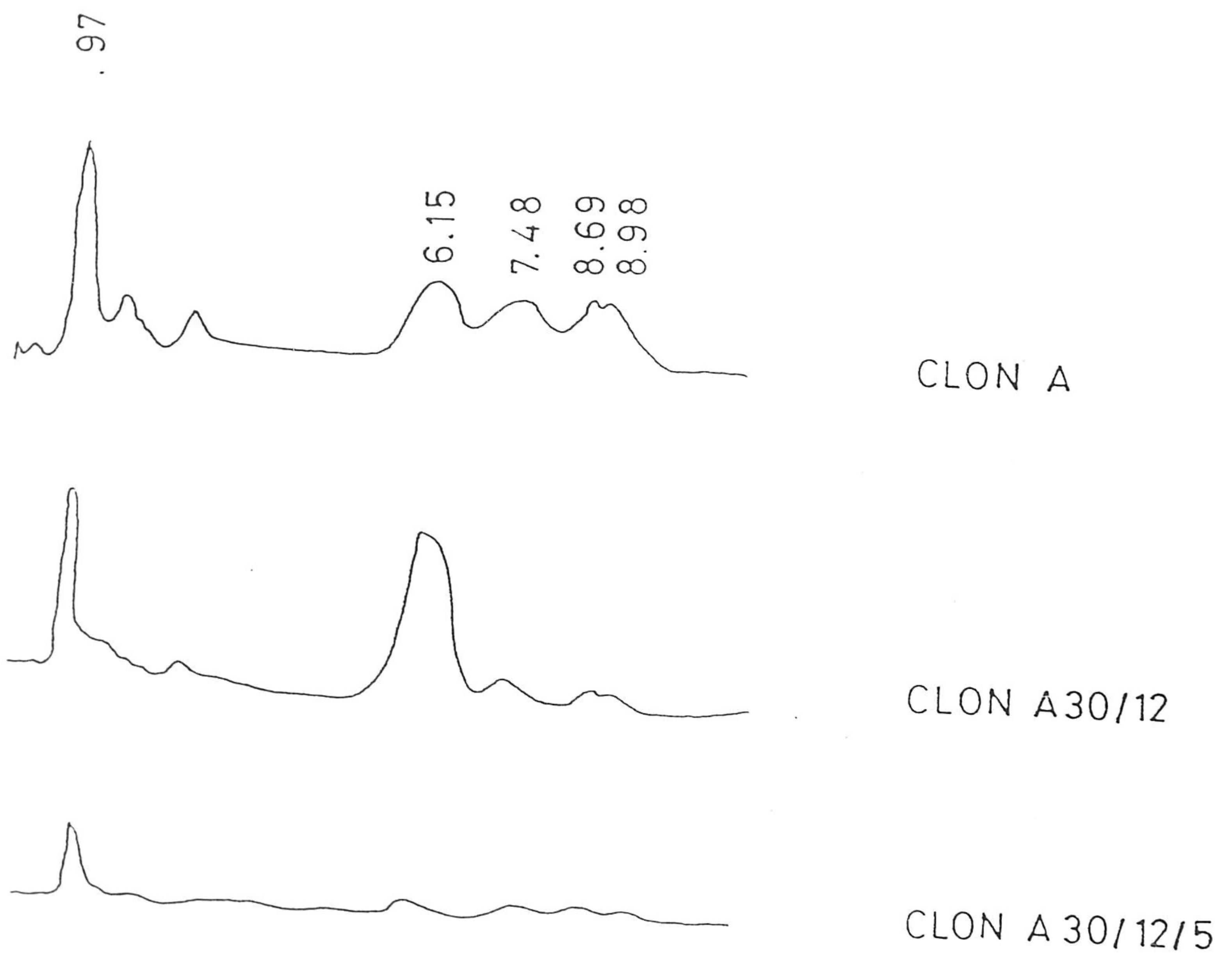


Figura 39. Cromatogramas de extractos de éter etílico de sobrenadantes del cultivo en aguas sintéticas del clón A y algunos de sus derivados. Los extractos se realizaron a partir de 20 ml de medio de cultivo de bacterias crecidas durante 10 días en las condiciones descritas en el texto. Las condiciones de los cromatogramas fueron las standard descritas en Materiales y Métodos.

#### C.2.4.2 CRECIMIENTO EN CULTIVO CONTINUO DEL CLON A-30/R/12/5/31.

La Figura 40 muestra el establecimiento en cultivo continuo del clón A/30/R/12/5/31, una de las bacterias derivadas a partir del clón A en este tipo de sistema.

Primero, la bacteria clón A/30/R/12/5/31 se cultivó en 50 ml de medio mínimo con TNT como fuente de N y fructosa (0,5% p/v) como fuente de C, entonces se transfirió al reservorio del sistema de cultivo continuo y se añadieron 200 ml para completar el volumen del tanque (aprox. 250 ml) de manera que la  $DO_{660}$  inicial era del orden de 0,5 unidades. Al tanque de cultivo se suministró un flujo continuo de  $2 \text{ ml h}^{-1}$  de medio mínimo que contenía 1% (p/v) de fructosa y TNT al 70% del nivel de saturación. La bacteria se estableció en equilibrio a una  $DO_{660}$  del orden de 0,35 unidades, lo que representó alrededor de  $10^7$  células  $\text{ml}^{-1}$ . En el tanque de crecimiento la concentración de TNT se mantuvo por debajo del límite de detección en el HPLC y no se detectó acumulación de nitrito. El efluente del tanque de cultivo se recogió de manera continua, sobre acetato de etilo. Fracciones de 100-120 ml se extrajeron con éter etílico, se concentraron y se analizaron en el HPLC. Se encontró que en el sistema continuo se producían los mismos productos derivados del TNT que en el sistema estanco (no mostrado).

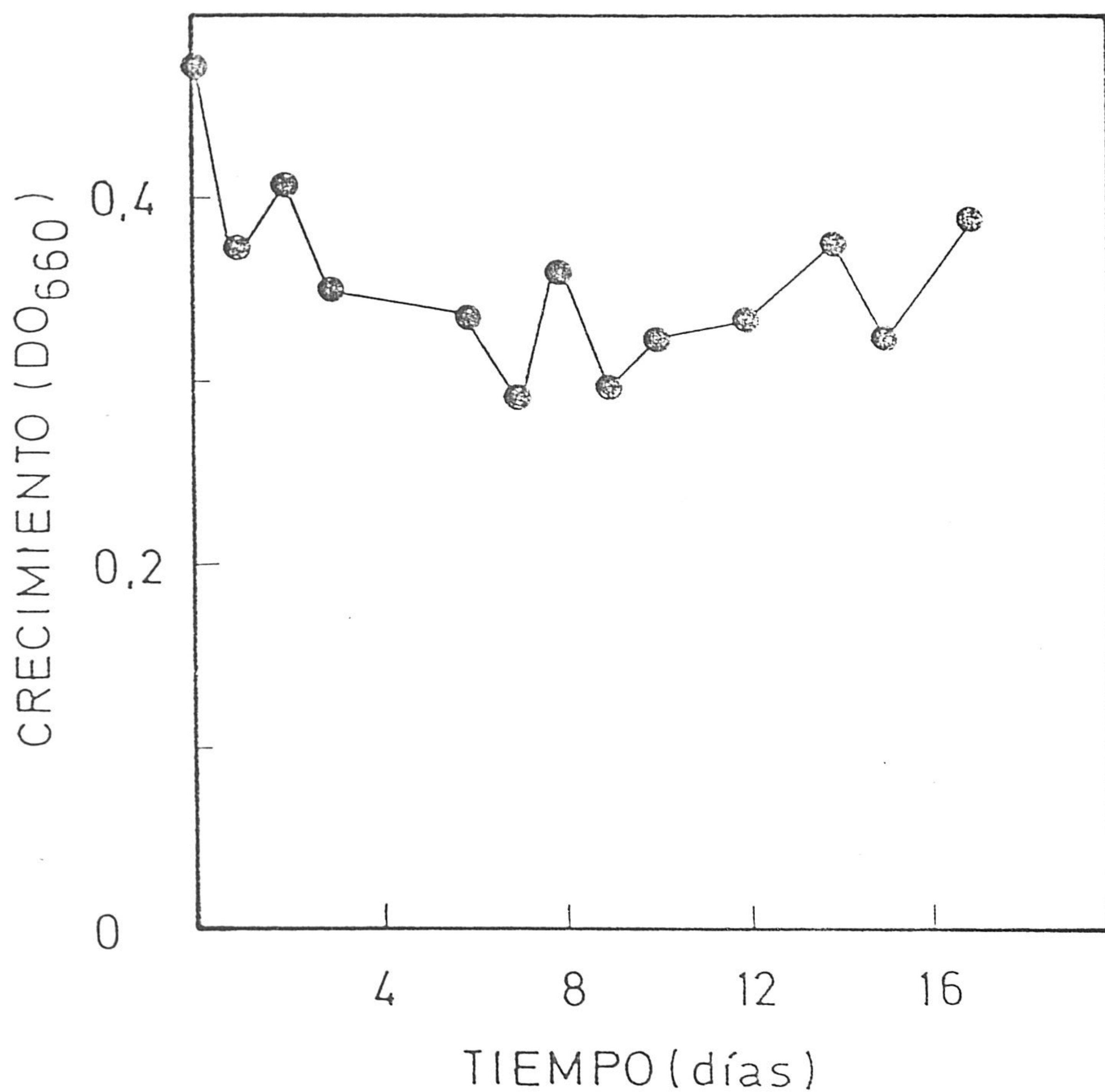


Figura 40. Crecimiento en cultivo continuo del clón A 30-R-12-5-31. El medio de cultivo y la velocidad de dilución se dan en el texto. La temperatura se mantuvo a 30°C mediante circulación de agua en la camisa del reactor y el volumen de aire (0,8 l/litro cultivo/min) era saturante para el crecimiento bacteriano. A los tiempos indicados se determinó la densidad celular en una alicuota tomada del efluente del reactor.

## C.2.5 PUESTA A PUNTO DE METODOS GENETICOS PARA EL CLON A.

### C.2.5.1 AISLAMIENTO DE CEPAS RESISTENTES AL ANTIBIOTICO RIFAMPICINA.

La resistencia a antibióticos facilita la contraselección de la bacteria en ensayos de conjugación para la transferencia de ADN desde el clón-A a otros clones o viceversa. Para seleccionar clones resistentes a rifampicina de la bacteria Pseudomonas sp. clón A se sembraron alícuotas de 100  $\mu$ l de un cultivo del clón-A que contenía alrededor de  $10^9$  células/ml en placas de LB suplementadas con 20  $\mu$ g/ml rifampicina. La frecuencia de resistentes a rifampicina fue del orden de  $4 \times 10^{-8}$ . Una de las colonias se purificó y se denominó clón/A/R20.

### C.2.5.2 ANALISIS DE PLASMIDOS.

Utilizando el método de Kado y Liu (1988) se preparó ADN bacteriano, el cual se fraccionó en geles de agarosa al 0.8% (p/v) en TBE y se tiñó con bromuro de etidio. Se utilizó P. putida, P. putida (TOL) y Pseudomonas sp. clón-A y Pseudomonas sp. clón/A/R20. La banda cromosómica se observó en las cuatro muestras. El plásmido TOL era claramente visible (115 kb) en la preparación de P. putida (TOL). En las muestras del clón-A y del clón/A/R20 se observó una banda plasmídica ligeramente mayor que la de TOL y de menor intensidad.

Se realizaron ensayos de conjugación con Pseudomonas EEZ15 como receptor y el clón A como donador en presencia y ausencia de E. coli RK600 como plásmido auxiliar para estudiar si el carácter de crecer en TNT era transferible a otras cepas de Pseudomonas.

En ningún caso se encontraron transconjugantes capaces de crecer a expensas de TNT como fuente de N.

#### C.2.5.3 MUTAGENESIS CON NITROSOGUANIDINA DEL CLON A.

La cepa clón/A/R<sup>"</sup> y su parental sensible a rifampicina fueron resistentes a mutagénesis con nitrosoguanidina (NTG). En efecto después de 30 minutos en presencia de 0,2 mg NTG/ml más del 90% del cultivo bacteriano sobrevivió. En controles con E. coli ET8000, esa concentración de NTG condujo a una supervivencia del orden del 0,1% en el mismo período de incubación. Estos resultados desaconsejaron la utilización de este agente mutagénico para inducir mutaciones en este organismo.

#### C.2.5.4 MUTAGENESIS DEL CLON A CON Tn5.

Se ha utilizado en estos ensayos la bacteria clón/A/R20. El donador de Tn5 ha sido el plásmido pGS9. Tn5 lleva un marcador de resistencia a kanamicina (Km). Para conseguir la transferencia y transposición de Tn5 era necesario inhibir el sistema de restricción del clón/A/R20 mediante choque térmico, lo cual se consiguió incubando la cepa a 42°C durante 30 min.

La frecuencia de inserción de Tn5 en el clón/A/R20 fue del orden de  $10^{-6}$  por célula receptora. Entre los clones que portaron el transposón Tn5 (seleccionados como resistentes a Km) se ensayó si alguna bacteria era incapaz de crecer con TNT como fuente de N. Todos los clones que portaron Tn5 (aprox. 1000) crecieron con TNT como fuente de N.

#### C.2.5.5 CONSTRUCCION DE CEPAS HIBRIDAS QUE MINERALIZAN TNT.

Dentro de este capítulo se pretendía transferir el plásmido TOL de Pseudomonas putida, que permite la mineralización de tolueno a bacterias que transforman TNT hasta tolueno como las aisladas en nuestros estudios. En nuestro grupo se había determinado previamente que el plásmido TOL pWWO-EB62K, marcado con resistencia a kanamicina, se podía transferir a bacterias del género Pseudomonas del grupo I de ARNr, como eran las cepas que degradan TNT (Ramos-González et al; 1991).

Los análisis químicos realizados en nuestro grupo de investigación y descritos anteriormente permitieron establecer que parte de TNT era transformado hasta tolueno por las distintas bacterias aisladas a lo largo de este proyecto. Ello incluía la bacteria original Pseudomonas sp. C1S1, su forma mejorada Pseudomonas sp. clón A y derivadas de la misma a través de una serie de enriquecimientos en cultivo continuo incluyendo la bacteria Pseudomonas sp. clón A 30/12/5/31.

Se realizaron ensayos de conjugación mezclando derivados resistentes a rifampicina del clón C1S1, clón A y clón 30/R/12/5/31 y Pseudomonas putida (pWWO-EB62K) y se seleccionaron transconjugantes de los primeros que eran resistentes a Km y que crecieron en tolueno como única fuente de C. La frecuencia de transconjugantes fue del orden de  $10^{-6}$  a  $5 \times 10^{-8}$  dependiendo de la cepa.

De cada serie de conjugaciones se seleccionaron 24 transconjugantes independientes y se determinó si eran capaces de crecer en TNT como única fuente de C y N. Se encontró una cierta variabilidad entre los clones pero, en general, se observó

que los transconjugantes eran capaces de crecer con TNT como fuente de C y N.

Las Figuras 41 y 42 muestran el crecimiento con TNT como única fuente de C y N de algunos de los clones derivados del C1S1, clón A y clón A30/R/12/5/31. Se observó que el crecimiento de los clones derivados del clón A 30/R/12/5/31 fueron los que crecieron mejor con TNT como fuente de C y N, ya que alcanzaron  $DO_{660} > 3$  en comparación con la de los otros clones  $DO_{660} < 1$ .

Un hecho común a todos los clones que utilizaron TNT como fuente de C y N es que acumularon nitrito en el medio de cultivo (ver Figura 42B para el clón A 30/R/12/5/31 (TOL)). Ello se interpretó como que el crecimiento de la bacteria no estaba balanceado. Para comprobarlo se añadió al medio de cultivo cantidades trazas de fructosa (0,01% p/v) y se siguió a lo largo del tiempo la evolución del nitrito en el medio de cultivo. Se observó que tras la adición de fructosa, el nitrito desapareció del medio de cultivo, aunque se volvió a acumular una vez que se consumió la fructosa (Figura 42B). La adición sucesiva de fructosa en el tiempo permitió la eliminación del nitrito y el crecimiento bacteriano hasta altas densidades celulares (Figura 43).

Se ha de indicar que al igual que los cultivos parentales las bacterias que utilizaron TNT como fuente de C y N aún conservaron la capacidad de reducir TNT a derivados con grupos amino e hidroxilamina y de formar azoxidímeros.



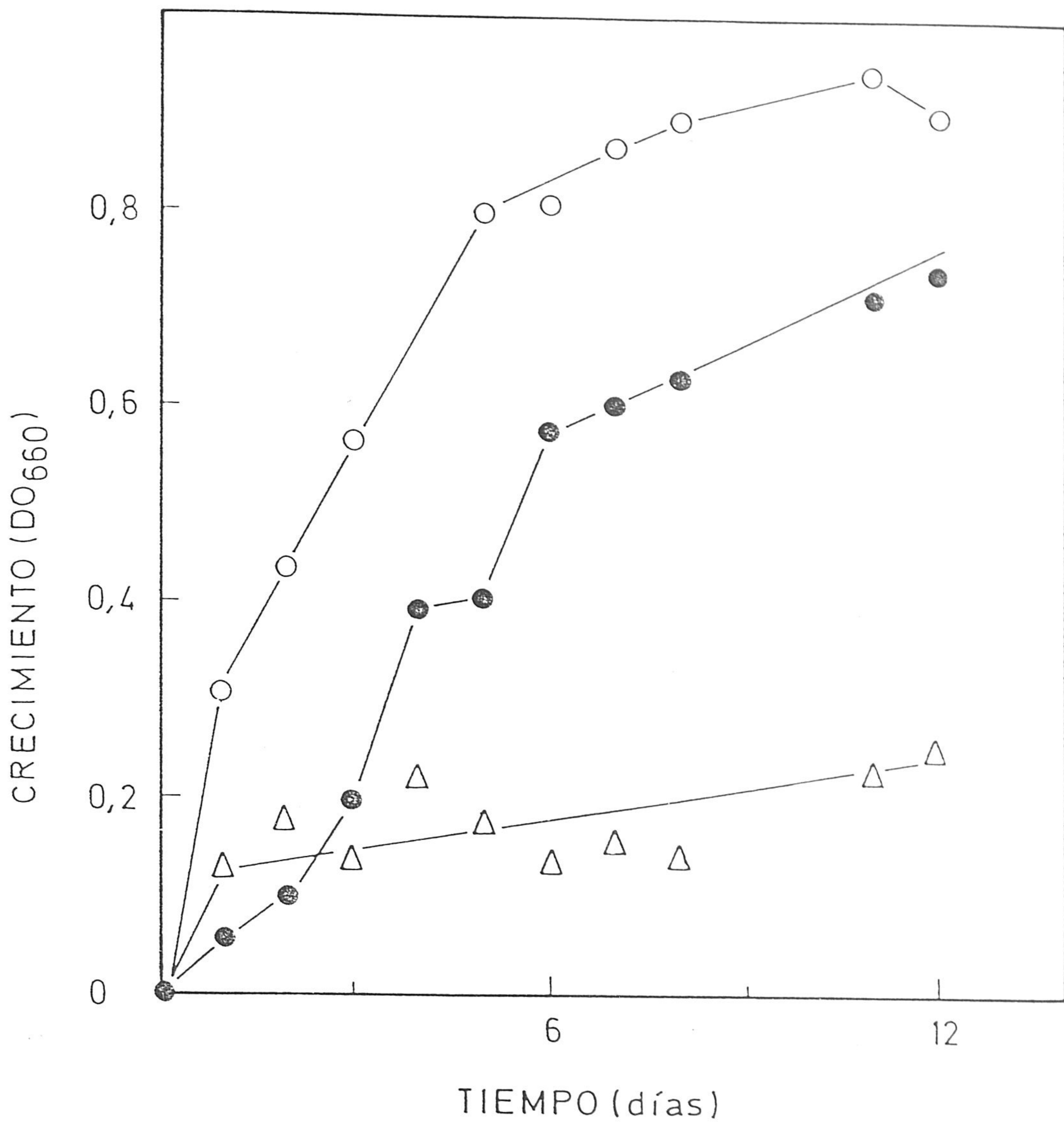


Figura 41. Crecimiento de transconjugantes derivados del C1S1 con TNT como única fuente de C y N. El medio de cultivo utilizado fue el medio standard M8 con 600 mg TNT litro. A los tiempos indicados se determinó la turbidez del cultivo. o, ● dos transconjugantes independientes del clón A, Δ, Control sin TOL.

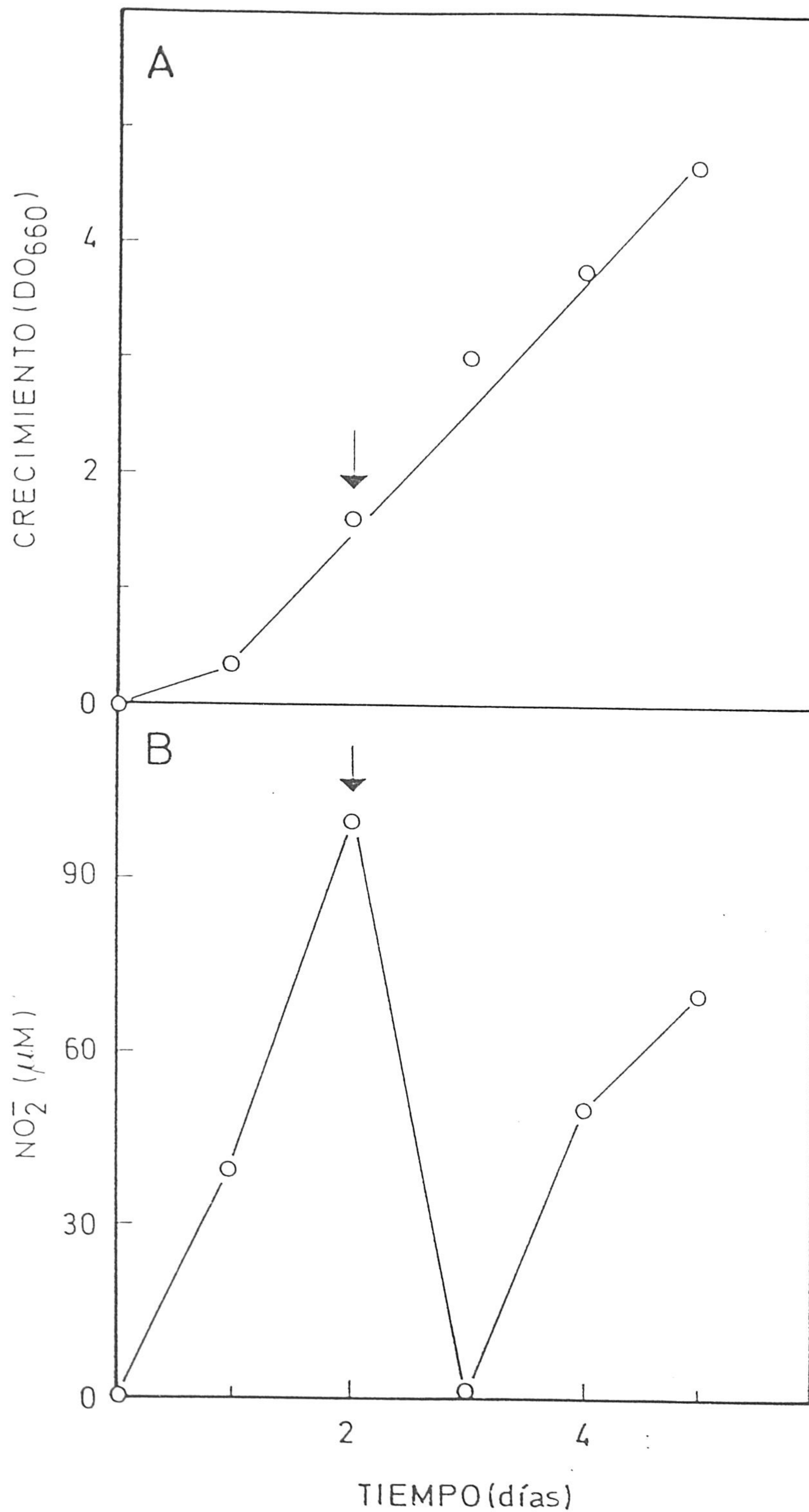


Figura 42. Crecimiento de un transconjugantes del clón A 30/R/12/5/31 portando el plásmido TOL con TNT como fuente de C y N (A) y acumulación de nitrito (B). Condiciones como en la Figura 41. Donde se indica con una flecha al cultivo se añadió 0,01% (p/v) de fructosa.

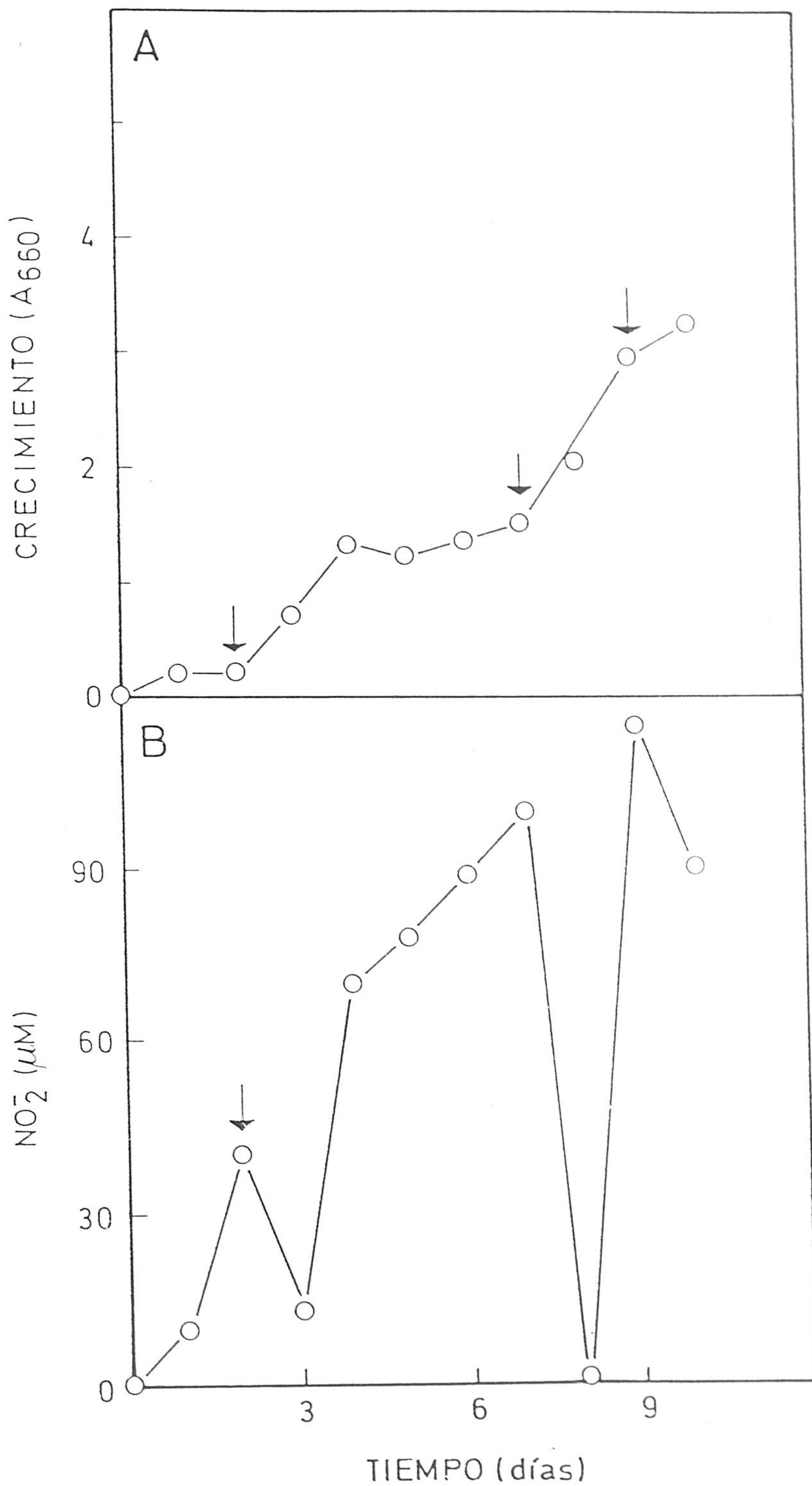


Figura 43. Crecimiento (A) y acumulación de nitrito (B) por un transconjugante del clón A 30/R/12/31/5 con TNT como fuente de C y N. Condiciones como en la Figura 42.



D - D I S C U S S I O N



#### D.1 Supervivencia y funcionamiento en suelos de una cepa de P. putida portando un plásmido TOL recombinante.

La eficiencia de los microorganismos manipulados genéticamente en la eliminación in situ de polucionantes depende tanto de su capacidad de supervivencia, una vez que los microorganismos son introducidos en el sitio a descontaminar, como de la adecuada expresión y el funcionamiento apropiado de las rutas catabólicas in situ. Por ello, una vez construido un microorganismo recombinante, éste debe ser sometido a una serie de ensayos que permitan evaluar su capacidad de supervivencia y su potencial para eliminar el compuesto polucionante en las condiciones que prevalecen en el medio en el que ha de funcionar. Además, es de interés evaluar aquellos factores bióticos, fundamentalmente depredadores, y abióticos, temperatura, pH, tensión de oxígeno, etc, que estimulen o inhiban el funcionamiento del microorganismo en el medio ambiente. Dadas las imposiciones de la legislación vigente en cuanto a la liberación de microorganismos manipulados genéticamente (Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 1990 y Boletín Oficial del Congreso de Diputados, 1993), esta serie de estudios se han de realizar en el laboratorio utilizando microcosmos. Por microcosmos se entiende la extracción de una parte de un ecosistema natural y su transferencia al laboratorio para realizar ensayos en condiciones de contención física, esto implica una serie de medidas de seguridad que evitan que el organismo recombinante escape del laboratorio (Tiedje, et al., 1989).

Para facilitar el seguimiento de P. putida portando plásmidos

recombinantes en suelos se utilizó un mutante del hospedador natural que era resistente al herbicida fosfotricina (PTT). La fosfotricina se eligió como marcador porque es un potente inhibidor de la glutamina sintetasa de distintos microorganismos (Calanduoni y Villafranca, 1986; Florencio y Ramos, 1985 y Lea et al., 1984), y porque, aunque otros investigadores habían aislado bacterias resistentes a PTT del suelo (Bartsch y Tebbe, 1989), en las muestras de suelos con las que nosotros trabajamos no aparecieron microorganismos resistentes a PTT y capaces de utilizar p-etilbenzoato como fuente de carbono (Ramos et al., 1991). La cepa de P. putida resistente a PTT se denominó P. putida EEZ15. La utilidad de este marcador de resistencia en Pseudomonas se puso de manifiesto tanto en nuestros ensayos en microcosmos con suelos no estériles y descritos en la sección de Resultados como en los ensayos con bacterias autosuicidas de Pseudomonas realizados en nuestro grupo en colaboración con el departamento de Microbiología de la Universidad Técnica de Dinamarca (Jensen et al., 1993; Molin et al., 1993).

La supervivencia de P. putida EEZ15 sin plásmido, o portando bien el plásmido natural pWW0 o bien el plásmido recombinante pWW0-EB62, fue similar en distintos suelos de la zona de Granada. Estos ensayos incluyeron suelos de marga arenosos de pH en el intervalo de entre 7,0 y 8,0 y que presentaban distinto contenido en materia orgánica y CaCO<sub>3</sub>. El nivel de supervivencia varió con el tipo de suelo utilizado pero no se pudo establecer una correlación directa entre el número de células viables en los suelos y el contenido en materia orgánica, la razón C/N o el contenido en carbonato cálcico del suelo. Aunque, en general, se



puede decir que en suelos ricos en materia orgánica la supervivencia fue mejor.

Una observación de interés es que cuando los suelos se suplementaron con pequeñas cantidades de p-etilbenzoato (0,01 y 0,1% (p/p)), la bacteria portando el plásmido recombinante pWW0-EB62 sobrevivió mejor que la cepa sin plásmido o portando el plásmido TOL silvestre pWW0. Por tanto, la cepa portadora del plásmido pWW0-EB62 presentaba una clara ventaja selectiva cuando se introducía en suelos polucionados con el contaminante. Aunque pWW0-EB62 confería ventajas selectivas al hospedador en suelos con p-etilbenzoato, se debe hacer notar que por encima de ciertos niveles este polucionante es tóxico para Pseudomonas putida EEZ15 con y sin plásmido TOL, afectando notablemente su supervivencia. Así cuando la concentración de p-etilbenzoato en suelos fue igual o superior al 1% (p/p) el número de CFU/g de suelo de P. putida (pWW0-EB62) disminuyó progresivamente con el tiempo hasta quedar por debajo de nuestro límite de detección (50 CFU/g de suelo). Por tanto, en el diseño de bacterias recombinantes será importante también evaluar la capacidad de tolerar y crecer en presencia de altas concentraciones del polucionante. En este contexto se ha de mencionar que aunque nuestro grupo de investigación ha estudiado en detalle las rutas catabólicas de eliminación de tolueno por P. putida, la aplicación de estas bacterias en la eliminación de este disolvente orgánico se ha visto limitada por la alta sensibilidad de P. putida a este compuesto. Sin embargo recientemente en nuestro grupo se ha aislado una bacteria del género Pseudomonas que tolera concentraciones de hasta el 90% (v/v) de tolueno en el medio de

cultivo (Ramos, Haïdour y Duque, resultados sin publicar). Bacterias del género Pseudomonas que toleran concentraciones de hasta el 20% (v/v) de tolueno se habían aislado también previamente por otros grupos (Cruden et al., 1992; Inoue y Horikoshi, 1989 e Inoue et al., 1991).

Nosotros hemos comprobado que la presencia del plásmido TOL (natural o recombinante) puede tener efectos deletéreos para el hospedador si las bacterias se exponen a productos que son transformados en intermediarios tóxicos. Esto se observó cuando P. putida (pWW0-EB62) se expuso a p-clorobenzoato, el cual fue transformado en el semialdehído del ácido 2-cloromucónico, un compuesto tóxico para Pseudomonas putida (Reineke et al., 1982).

Puesto que los problemas de contaminación ambiental son a menudo complejos, implicando a veces más de un compuesto, conviene considerar al diseñar una bacteria recombinante que ésta sea tan versátil como fuera posible. La construcción de bacterias que degradan alquil- y haloaromáticos, es sin embargo posible, como demostraron Rojo y colaboradores (1987) al construir una cepa con rutas híbridas ensambladas capaz de mineralizar simultáneamente 3- y 4-clorobenzoato y 4-metilbenzoato.

En P. putida el plásmido TOL pWW0 y su derivado pWW0-EB62 fueron muy estables cuando las bacterias portadoras se introdujeron en distintos suelos de la zona de Granada. Esto viene avalado por los siguientes hechos: i) el número de bacterias que se recuperaron de los suelos (CFU/g suelo) fue similar cuando las bacterias se contaron en medios con diferentes fuente de carbono y cuya asimilación requería una ruta cromosómica, por ejemplo glucosa, o requería una ruta meta modificada o no, por ejemplo

p-etilbenzoato y m-metilbenzoato, respectivamente, o requería la ruta "upper" y meta de TOL, como para la asimilación de tolueno y ii) El 100% de las bacterias P. putida (pWW0-EB62) recuperadas de los suelos en placas con glucosa como fuente de carbono mantuvieron la capacidad de utilizar p-etilbenzoato y m-xileno como fuente de carbono, y viceversa.

Se ha de señalar también que el plásmido TOL pWW0-EB62 es muy estable en bacterias que se multiplican en suelos sin suplementar con alquilbenzoatos (ver Figura 11). Estos resultados están en concordancia con las observaciones de otros investigadores (Duetz y van Andel, 1991; Duetz et al., 1994). Las únicas situaciones en las que se ha observado inestabilidad del plásmido TOL o sus rutas catabólicas fue en medios con benzoato, donde el aromático se asimila preferentemente a través de la vía cromosómica orto (Keshavaraz et al., 1985) y cuando el plásmido TOL se transfirió a Pseudomonas sp. B13 y Erwinia chrysanthemi EEZ28 (Jeenes et al., 1982; Ramos-González et al., 1991). La alta estabilidad de la cepa recombinante utilizada en este estudio está también en consonancia con los resultados de Drahos et al., 1986 y los del grupo de Lindow (Lindow et al., 1989; Lindow, 1992) que demostraron que la multiplicación de Pseudomonas aureofaciens marcadas con los genes lacZY de Escherichia coli o con los genes ice en suelos era similar a la de la cepa parental no marcada. En esta línea se encuentran también los resultados de los grupos de F. O'Gara (Dowling et al., 1992) y W. Werstrate (Höfte et al., 1992) que demostraron que cepas de Pseudomonas fluorescens y Pseudomonas aeruginosa, marcadas con los genes bph para degradación de bifenilos y los genes lacZY para la asimilación

de lactosa, se multiplicaron y conservaron sus capacidades competitivas a un nivel similar al de las cepas parentales correspondientes en microcosmos edáficos polucionados o no. Aunque el número de ejemplos no es excesivamente alto parece que, en general, la adquisición de nuevos fenotipos para la degradación de compuestos orgánicos por bacterias del genero Pseudomonas no conducen a efectos perjudiciales sobre la cepa, y que la ventaja selectiva más obvia que le confiere es, precisamente, la de utilizar el polucionante y establecerse en nichos contaminados por el mismo. Observaciones similares se han realizado con otras bacterias del suelo como por ejemplo Rhizobium (Beringer y Bartchs, 1988).

Además, P. putida EEZ15 (pWW0-EB62) no sólo sobrevivió y se multiplicó en suelos, sino que las bacterias introducidas en el suelo se mostraron funcional en cuanto que las rutas catabólicas de TOL fueron capaces de mineralizar metilbenzoatos en suelos. Esto se puso claramente de manifiesto en nuestros ensayos con un substrato marcado con  $^{14}\text{C}$  como p-metil- $^{14}\text{C}$ -benzoato. En efecto, se observó que en suelos inoculados con P. putida (pWW0-EB62) y suplementados con el substrato radioactivo se produjo un desprendimiento lineal de  $^{14}\text{CO}_2$  durante al menos un mes. Por otro lado, los ensayos con  $^{14}\text{C}$  demostraron que la adición a los suelos de glucosa o de nitrato no tuvieron efecto perjudicial o beneficioso sobre el metabolismo del p-metilbenzoato, ya que la velocidad de desprendimiento de  $^{14}\text{CO}_2$  durante un mes no se vio afectada. En cualquier caso la mineralización efectiva del polucionante requirió una transferencia de masa apropiada, lo cual se dedujo del hecho de que en los suelos inoculados con P.

putida (pWW0-EB62) el desprendimiento de  $^{14}\text{CO}_2$  era mayor cuanto más próximos se encontraron el aromático y el microorganismo portador de TOL.

La temperatura de incubación de los suelos es un factor que afecta a la persistencia de la bacteria en los mismos. P. putida (pWW0-EB62) sobrevivió mejor a bajas temperaturas 4°C y 25°C que a altas temperaturas 37°C. El suplemento de los suelos con p-etilbenzoato benefició la supervivencia de la bacteria a 25°C pero no a 37°C. Esto pudo haberse debido al hecho de que el regulador XylS, responsable de la activación de la ruta meta de TOL (Franklin et al., 1981; Inouye et al., 1981; Ramos et al., 1986) no se sintetizó cuando las bacterias se incubaron a 37°C (Ramos et al., 1988). Nuestra observación está en concordancia con los datos de Höfte et al., (1992) sobre el comportamiento en suelos de P. aeruginosa marcada o no con ADN recombinante. Por tanto, la síntesis dependiente de temperatura de enzimas y reguladores, así como la termoestabilidad de éstos, pueden ser factores que afecten a la mineralización de polucionantes.

Nuestros estudios han puesto de manifiesto que P. putida EEZ15 (pWW0-EB62) se puede establecer tanto en suelos estériles como no estériles, tanto en presencia como en ausencia de presión selectiva. Esto se ha observado también en la rizosfera de plantas de maíz (C. Ramos y M. C. Ronchel, resultados sin publicar), y en los estudios realizados en Braunschweig sobre la capacidad de esta cepa para establecerse en microcosmos constituidos por aguas residuales de una planta de tratamiento de aguas urbanas (Dwyer et al., 1988; Pipke et al., 1992). En aguas urbanas residuales P. putida (pWW0-EB62) eliminó

eficientemente p-etilbenzoato indicando que no solamente se establece en el nicho ecológico sino que también es funcional como agente descontaminante (Pipke et al., 1992). En resumen, se puede decir que la cepa P. putida (pWW0-EB62) es altamente versátil en la colonización de distintos microcosmos y es funcional en los mismos.

Los plásmidos catabólicos codifican la información para la mineralización de un gran número de compuestos aromáticos como tolueno y m- y p-xileno (Williams, 1981); o-xileno (Galli et al., 1992); alcanfor (Rheinwald et al., 1973); naftaleno (Dunn y Gunsalus, 1973); salicilato (Chakrabarty et al., 1973) etc. El plásmido TOL pWW0 de 115 kilobases se considera el plásmido arquetipo de los plásmidos TOL y es el más estudiado de los plásmidos catabólicos de Pseudomonas (Assinder y Williams, 1990). Este plásmido es autotransferible (Williams y Murray, 1974; Wong y Dunn, 1974) como es el caso de otros plásmidos catabólicos de Pseudomonas (ver Frantz y Chakrabarty, 1986, para una revisión). Bradley y Williams (1982) demostraron que P. putida pWW0 presentaba un gran número de pili flexibles en distintas condiciones de cultivo y sugirieron que los genes de los pili se expresaban constitutivamente, lo cual facilitaría su transferencia a otros microorganismos. Así distintos grupos (Benson y Shapiro, 1978; Bradley y Williams, 1982; Nakazawa, 1978 y Ramos-González et al., 1991) encontraron que el plásmido TOL se transfería a alta frecuencia a distintas estirpes de P. putida, así como a otras bacterias del género Pseudomonas pertenecientes al grupo I de ARN ribosómico. Sin embargo, el espectro de huésped del plásmido TOL es relativamente restringido

y, además de en estas bacterias se ha encontrado que sólo se replica en ciertas enterobacteriáceas como Escherichia coli (Jacoby et al., 1978 y Ramos-González et al., 1991) y Erwinia chrysanthemi (Ramos-González et al., 1991). Aquí se ha de hacer notar que aunque E. chrysanthemi es una bacteria receptora del plásmido TOL, esta bacteria portando pWW0-EB62 no crecía en xilenos o alquilbenzoatos debido a que los genes catabólicos del plásmido TOL se escindieron como un fragmento de 39 kilobases (Ramos-González et al., 1991), dejando un plásmido deleciónado carente de funciones catabólicas. El seguimiento del plásmido TOL en esta bacteria se hizo en base a la introducción de un marcador de kanamicina en el mismo fuera del segmento de las 39 kilobases que se escindía (Ramos-González et al., 1991).

En experimentos realizados en el laboratorio se puso de manifiesto que las capacidades biodegradativas del plásmido recombinante pWW0-EB62 se transfirieron al mismo espectro de huéspedes y con frecuencias similares a las del plásmido silvestre (Ramos-González, 1993). Con objeto de evaluar la capacidad de autotransmisión del plásmido TOL recombinante pWW0-EB62 en suelos se realizaron ensayos de conjugación en suelos estériles con Pseudomonas putida EEZ3 (pWW0-EB62), o su derivado marcado con kanamicina pWW0-EB62K (Ramos-González et al., 1991), como donadores y distintas cepas marcadas diferencialmente como receptoras, a saber, P. putida EEZ15, Escherichia coli EEZ8000 y Erwinia chrysanthemi EEZ28. En ensayos realizados con bacterias introducidas a una densidad celular del orden de  $10^8$  CFU/g suelo sólo se obtuvieron transconjugantes en el caso de P. putida EEZ15 como receptor, pero no en los casos en los que E. coli EEZ8000

y E. chrysanthemi EEZ28 actuaron como receptores. La diferencia de los resultados en suelos con respecto a los resultados de placas se pueden explicar en base a dos acontecimientos distintos, a saber, E. coli EEZ8000 no fue capaz de establecerse en los suelos utilizados en estos estudios; así en el fluvisol suelo-10 a los dos días el número de CFU/g suelo de esta enterobacteria fue del orden del 1% de la carga inicial y aún 2 ordenes de magnitud más bajo a la semana de su introducción en suelos. Puesto que la frecuencia de transferencia de TOL a E. coli EEZ8000 en el laboratorio es del orden de  $10^{-4}$  por receptor, esto hace que la detección de transconjugantes de esta cepa de E. coli en suelos estuviese por debajo de nuestro nivel de detección. Erwinia sp. EEZ28 se estableció en los suelos utilizados en este estudio a un nivel del orden de  $10^7$  CFU/g de suelo, pero dado que la frecuencia máxima de transferencia de pWW0-EB62K a esta bacteria en placas fue del orden de  $10^{-7}$  por receptor (Ramos-González et al., 1991), de nuevo nos encontramos por debajo del nivel de detección de transconjugantes en el suelo. Esto, es la pobre supervivencia del receptor y/o la baja frecuencia de intercambio de genes afecta significativamente a la transferencia de TOL en suelos.

Van Elsas et al. (1988 y 1990) y Stozky et al. (1990) han observado transferencia intraespecífica entre cepas de Pseudomonas fluorescens utilizando el plásmido promiscuo RP4 en ensayos realizados en rizosfera de plantas, un nicho ecológico especialmente rico en nutrientes (Dowling et al., 1992). En concordancia con nuestras observaciones, Nüblein et al., (1992) observaron transferencia intraespecífica de pWW0-EB-62 entre



cepas de *P. putida* en microcosmos constituidos por aguas urbanas residuales, observación que estaba en concordancia con la de McClure et al., (1989) con respecto a la transferencia de plásmidos entre pseudomonádaceas en microcosmos acuáticos. Como se ha mencionado anteriormente, en este estudio se detectó transferencia intraespecífica de TOL en distintos tipos de suelos; sin embargo, conviene señalar que ésta se vio afectada por una serie de factores bióticos y abióticos. Entre los factores abióticos cabe señalar el tipo de suelo utilizado, así en un suelo rico en materia orgánica, como el fluvisol-10, los transconjugantes de la cepa receptora aparecieron antes que en un suelo pobre en materia orgánica, como el cambisol-1 (ver Figuras 16 y 17). Asimismo el número de transconjugantes en el fluvisol-10 fue al menos 1 orden de magnitud superior que el número de los mismos en un suelo relativamente pobre en materia orgánica como el cambisol-1 (ver Figuras 16 y 17). También se observó que la temperatura de incubación de los suelos fue crítica, mientras que en placas de LB la temperatura óptima de transferencia es de alrededor de 30°C (Ramos-González, 1993), la transferencia óptima en suelos ocurrió a temperaturas en el intervalo de 17° a 20°C. La presencia de contaminantes tóxicos para la cepa receptora también resultaron en un retardo en cuanto al tiempo necesario para detectar transconjugantes. Un factor que influyó igualmente en la detección de transconjugantes fue la carga celular inicial de bacterias. En nuestros ensayos la razón receptor/donador fue de 1 y la carga celular se varió de 2 en 2 ordenes de magnitud, se observó que la aparición de transconjugantes fue más rápida cuanto mayor fue la carga celular

inicial. Cuando la carga inicial fue del orden de  $10^8$  CFU/gramo de suelo los transconjugantes se detectaron a las 24 h, mientras que cuando se introdujeron a baja densidad celular (por ejemplo  $10^4$  CFU/g suelo) los transconjugantes se comenzaron a detectar después de varios días de incubación y una vez que el número de receptores y donadores alcanzaron alta densidad celular en los suelos y del orden de  $10^7$  CFU/g suelo (ver Figura 16).

En resumen, se puede decir que la dispersión del plásmido recombinante pWW0-EB62 o sus derivados está limitada a pseudomonadáceas del grupo ARNr I y a algunas enterobacteriáceas en el laboratorio, y que en suelos el nivel de dispersión está limitado no sólo por el espectro de huésped sino también por la densidad celular y una serie de factores abióticos como temperatura, naturaleza del suelo y presencia de polucionantes que pueden afectar la supervivencia bien del donador o bien del receptor.

## 2. Metabolismo de TNT por cepas de Pseudomonas sp. Construcción de rutas híbridas para la mineralización del explosivo.

Los compuestos nitroorgánicos, en general, son compuestos de síntesis que se caracterizan por presentar grupos funcionales del siguiente tipo: 1) nitroaromáticos; 2) ésteres de nitrato y 3) nitroaminas. La naturaleza peligrosa de estos compuestos emana de su alto poder energético y de su alta toxicidad para los sistemas biológicos. Los vertidos de aguas industriales residuales procedentes de la fabricación de explosivos, productos farmacéuticos, azo-colorantes, plagicidas y herbicidas nitrados,

etc, junto con la amplia utilización de estos compuestos, han dado lugar a que suelos y aguas superficiales y subterráneas se encuentren contaminadas con una amplia variedad de compuestos nitroorgánicos. Por esa razón la eliminación de nitroorgánicos es un área de acción prioritaria (OCDE, 1994). Se ha de reseñar, no obstante, que algunos nitroorgánicos que aparecen sobre la biosfera son productos naturales sintetizados por hongos y bacterias y que se han identificado como compuestos con actividad bactericida. Entre éstos cabe destacar el cloranfenicol, el 3-nitropropanol y la p-nitrobencilpenicilina (Kaplan, 1989). Una diferencia importante entre los nitroaromáticos de síntesis - que son, en general, resistentes a la degradación por los seres vivos - y los naturales, es el número de sustituyentes del tipo nitro en las moléculas; así los explosivos, herbicidas y colorantes suelen presentar múltiples grupos nitro como en el caso de la trinitroglicerina y el TNT (2,4,6-trinitrotolueno), mientras que los naturales se encuentran monosustituidos.

Con objeto de eliminar los nitroaromáticos del medio ambiente se han seguido distintos tipos de tratamiento, incluyendo: i) aproximaciones físicas, tales como la absorción a carbón activo, filtración e incineración. Los problemas asociados con los tratamientos físicos son los altos costes o como en el caso de la incineración la generación de óxidos de nitrógeno, los cuales están implicados en la lluvia ácida; ii) aproximaciones químicas, tales como la extracción con distintos solventes y precipitación con surfactantes comerciales tales como el Duoquat T-50 y Duomeen (Okamoto y Wang, 1978). Los tratamientos con surfactantes quedaron totalmente desaconsejados tras los estudios de Kaplan

y Kaplan (1982), en los que demostraron que los complejos nitroorgánico/surfactante presentaban incrementada mutagenicidad con respecto a los niveles de mutagenicidad de nitroaromáticos per se. Se ha de hacer notar en este punto que los surfactantes per se no mostraron actividad mutagénica. Los mismos autores estudiaron como alternativa la extracción de TNT y otros nitroaromáticos con disolventes orgánicos, tales como cloruro de metileno, formamida, dimetilformamida, acetonitrilo, etc. Los tratamientos con estos solventes se descartaron bien porque los nitroaromáticos tuvieron problemas de solubilidad, bien porque los solventes per se indujeron mutaciones en las cepas ensayadas en el test de Ames (Kaplan y Kaplan, 1982). Ante los inconvenientes anteriormente señalados la alternativa biológica, incluyendo tratamientos de tipo estanco o continuo, podría ofrecer una vía eficaz en el tratamiento de desechos industriales ricos en nitroaromáticos.

Los estudios previos al inicio de este trabajo revelaron que el TNT podía ser biotransformado no solo por microorganismos sino también por hongos (Parrish, 1977; Won et al. 1974) y por mamíferos, (Lemberg y Callaghan, 1945), pero en esos procesos, en general, no se observó la fisión del anillo aromático. La toxicidad en mamíferos incluye daños en el hígado y anemia. Además, el TNT es tóxico para peces, cefalópodos, algas verdes unicelulares y ostras. El TNT inhibe el crecimiento de hongos y bacterias gram positivas (Kaplan, 1989).

Recientemente se describió la mineralización de TNT por el hongo Phanerochaete chrysosporum (Fernando et al., 1992), sin embargo un estudio posterior del grupo de Crawford (Spiker et al., 1992)

desmintió al primero.

Al iniciarse los estudios de mineralización de TNT no cabía duda de que la meta propuesta era de alto interés, pero por otra parte los antecedentes de la literatura no eran esperanzadores. Sin embargo, también en la literatura existían algunos casos en que compuestos nitroaromáticos de síntesis con uno y dos grupos nitro podían ser utilizados como fuente de N por microorganismos (Cain y Cartwright, 1960; Groenengeven et al., 1992; Haigler y Spain, 1993). Nuestra estrategia inicial consistió en enriquecer muestras de suelos en microorganismos capaces de utilizar TNT como fuente de C ó N ó C y N. Nuestros ensayos de enriquecimiento consideraron distintas combinaciones de TNT con azúcares y ácidos carboxílicos. La incubación de suelos de una fábrica de explosivos con TNT como fuente exógena de N y con el suplemento de ácido acético como fuente de carbono resultó en el aislamiento de microorganismos que utilizaron el nitroaromático como única fuente de N, aunque éste no era utilizado como fuente de C. Tras siembra y purificación de distintos clones se concluyó que existía un solo tipo bacteriano que fue asignado al grupo de las Pseudomonas de ARNr I de acuerdo con ensayos de API, análisis del perfil de fosfolípidos y pruebas realizadas por la colección de cultivos tipo NCIM en la que se depositó el microorganismo bajo patente. La cepa se denominó Pseudomonas sp. C1S1. El crecimiento de la bacteria fue relativamente lento y a lo largo de la curva de crecimiento acumuló nitrito. Estos resultados sugirieron que al menos un grupo nitro de la molécula de TNT era eliminado por la bacteria Pseudomonas sp. C1S1. Los análisis de productos presentes en los sobrenadantes de medio de cultivo de esta

bacteria revelaron que como subproducto del metabolismo del TNT por la bacteria aparecían dinitrotoluenos, mononitrotoluenos y tolueno. Estos resultados indicaron la eliminación progresiva de los tres grupos nitro del anillo aromático. Las células cultivadas en TNT presentaron actividad nitrito reductasa sugiriendo que el nitrito era reducido hasta amoníaco, el cual sería, probablemente, incorporado en nitrógeno orgánico vía glutamina sintetasa como ocurre en Pseudomonas fluorescens (Betlach et al., 1981) y P. aeruginosa (Janssen et al., 1980). En un principio se especuló que la eliminación de los dos primeros grupos nitro podría ocurrir vía la formación de un complejo de tipo sigma, también llamado de Meisenheimer (Buncel, 1981). El mecanismo de reacción proponía el ataque del anillo aromático por un ión hidruro (que in vivo podría ser donado por el NAD(P)H) dando lugar al complejo de Meisenheimer, que se inestabiliza y pierde parcialmente su aromaticidad. De manera espontánea este complejo tiende a estabilizarse mediante la liberación de un grupo nitro y la recuperación de la aromaticidad, de acuerdo con el esquema propuesto en la Figura 44.

En nuestro grupo de investigación Alí Haïdour ha obtenido evidencias de la formación del complejo de Meisenheimer (Haïdour y Ramos, 1994, enviado a publicación). Las evidencias químicas se obtuvieron mediante  $^1\text{H-NMR}$  de alta resolución de productos trazas presente en extractos de sobrenadantes de cultivos de la bacteria Pseudomonas sp. clón A.

Un mecanismo similar había sido propuesto por Lenke y Knackmuss

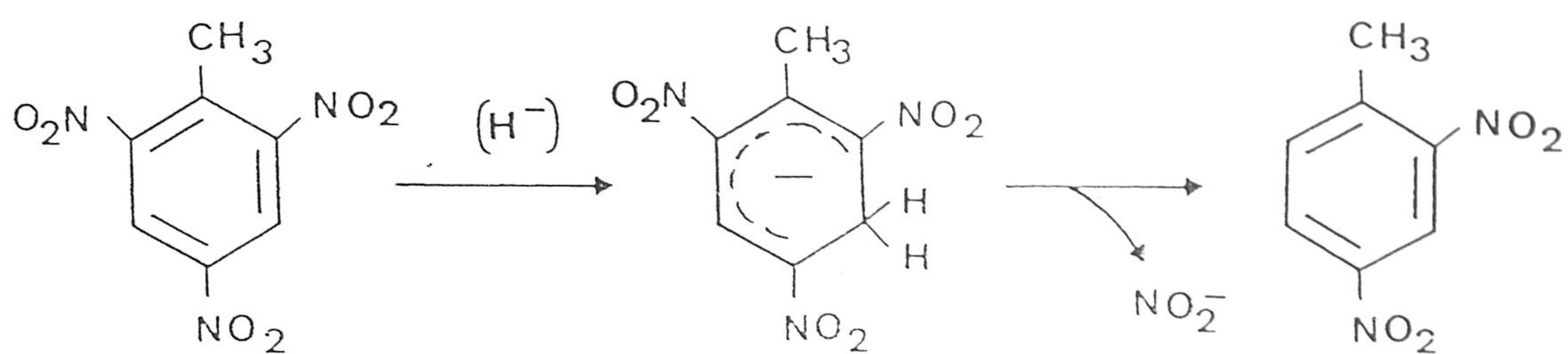


Figura 44. Propuesta para la formación del complejo de Meisenheimer por reducción de TNT y su estabilización liberando un grupo nitro.

en la eliminación de un grupo nitro de la molécula de ácido pícrico (2,4,6-trinitrofenol) por la bacteria Rhodococcus sp. La propuesta de eliminación del grupo nitro se presentó en la Figura 8 en la sección de Introducción, y es similar al propuesto por nosotros.

La eliminación del segundo grupo nitro podría ocurrir de manera similar a la descrita para el primer grupo nitro, sin embargo el mecanismo para la eliminación del segundo y el tercer grupo nitro no se ha elucidado todavía.

Los análisis de gases-masas realizados por F. Godoy y A. Haïdour en nuestro grupo de investigación pusieron de manifiesto que la bacteria Pseudomonas sp. C1S1 oxidaba la cadena alquílica a hasta el ácido carboxílico correspondiente, y que los grupos nitro podían ser reducidos, vía hidroxilamino, hasta amino. Además se detectaron productos resultantes de la condensación de formas reducidas del TNT del tipo de los azoxidímeros, compuestos que también se han detectado como productos de la biotransformación del TNT por microorganismos que no pueden utilizar el TNT como fuente de N (McCormick et al., 1970; Stiztman, 1974). No se han descrito hasta la fecha bacterias que crezcan a expensas de los azoxidímeros.

El hecho de que el crecimiento de la bacteria Pseudomonas sp. C1S1 fuera relativamente lento, acumulara nitrito en el medio de cultivo y diera lugar a la aparición de formas reducidas u oxidas no productivas del TNT, sugerían que podría ser posible la selección de clones más eficientes que el original en la eliminación del TNT. Con este objetivo se realizaron dos series distintas de enriquecimientos. Una, en un sistema tipo estanco,

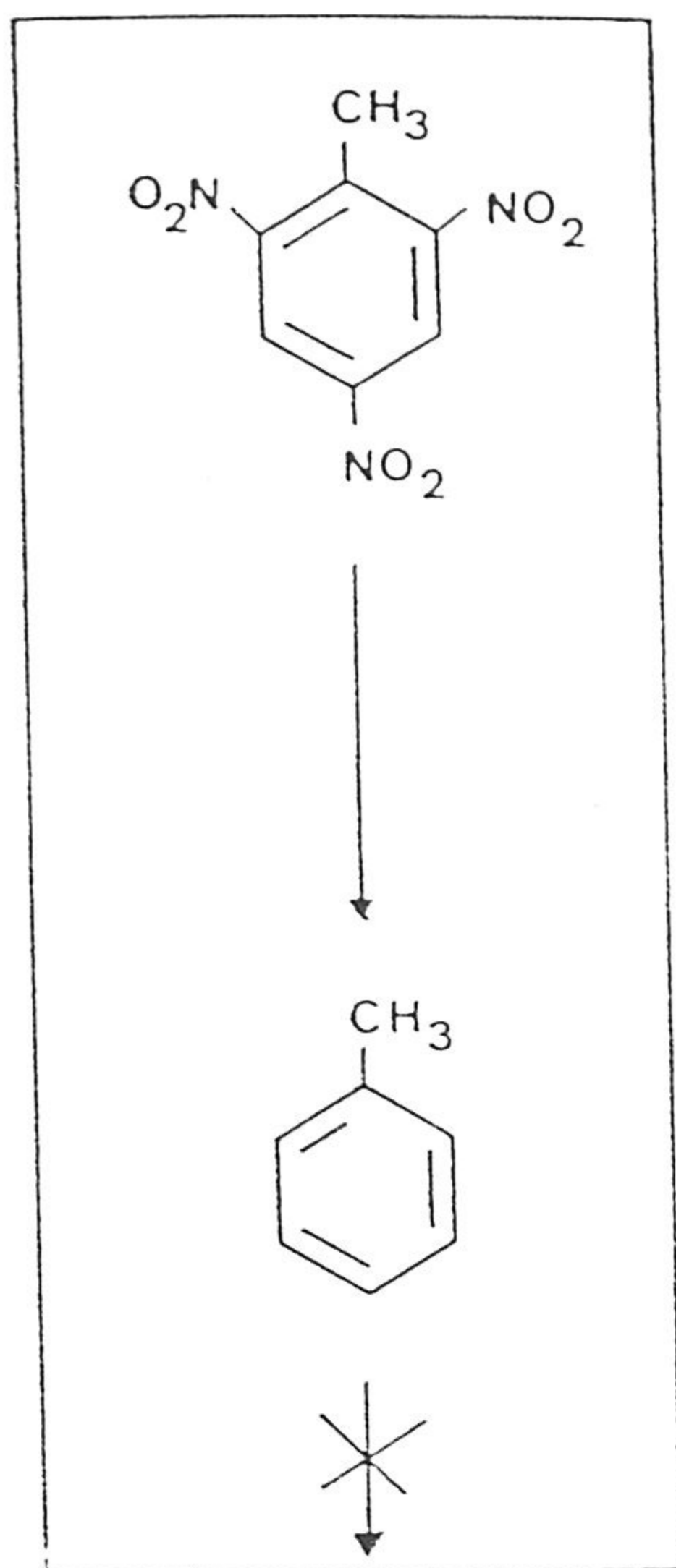


en el que las bacterias se mantuvieron en fase exponencial de crecimiento mediante pases sucesivos, y otra, en fase continua. La primera fase se realizó en cultivos estancos y tras realizar del orden de 100 pases sucesivos con distintos tiempos de incubación de los cultivos (24-72 h) y distintas concentraciones de TNT desde sobresaturación con el substrato en lasca o en solución, (100-70 mg/l) se aisló un clón derivado del C1S1 que se denominó clón A. El clón A conservó las características del parental en cuanto a temperatura óptima de crecimiento, tolerancia a altas concentraciones de TNT, utilización de fructosa y otras azúcares como fuente de C y requerimiento estricto de oxígeno para su crecimiento; en cambio creció más rápidamente que la parental. Los análisis de sobrenadantes del clón A revelaron que no acumulaba nitrito a lo largo de la curva de crecimiento. Asimismo este clón no acumuló productos resultantes de la oxidación de la cadena alquílica del TNT. La ausencia de acumulación de nitrito se vio asociada con el hecho de que esta bacteria presentaba niveles de actividad nitrito reductasa del orden de 5 veces superiores a las del clón C1S1. La pérdida de la capacidad de oxidar TNT se puede deber a alguna mutación espontánea. Sin embargo el clón A seguía acumulando productos resultantes de la reducción de grupos nitro a amino y la formación de azoxidímeros. Con objeto de seleccionar clones aún más eficientes se realizaron enriquecimientos en cultivo continuo con TNT como factor limitante, tras una amplia serie de cultivos en continuo se seleccionó un clón denominado clón A-30/R/12/5/31 que acumuló menos productos de reducción que el clón A, aunque los análisis revelaron que cualitativamente eran

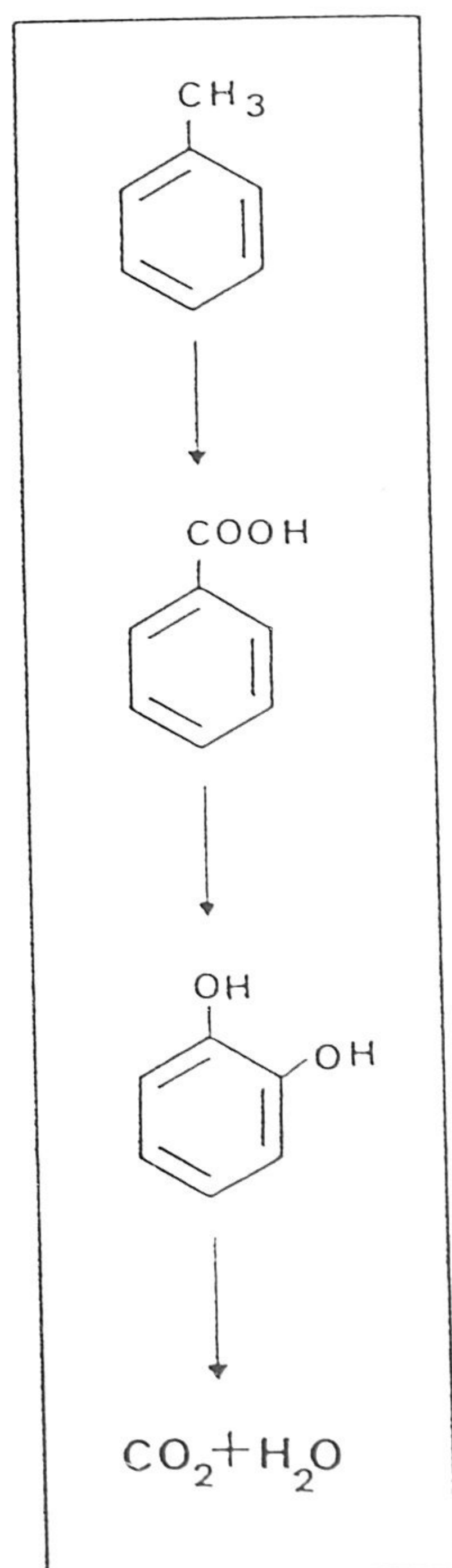
idénticos. La estrategia desarrollada en este estudio fue similar a la que utilizó el grupo de Knackmuss (Dorn et al., 1974) en la selección de la bacteria Pseudomonas sp. B13 que crece a expensas de 3-clorobenzoato, excepto que en este caso el cultivo continuo utilizó dos substratos benzoato y 3-clorobenzoato y con el tiempo se disminuía la concentración del primero y se incrementaba la del segundo.

El clón A-30/R/12/5/31 se consideró como la forma mejorada, que no óptima, para iniciar nuevas fases de estudio. En la siguiente fase, se planteó la posibilidad de construir una ruta híbrida para la mineralización de TNT bajo la filosofía que se recoge en la Figura 45 y que se describe a continuación. Dado que las cepas Pseudomonas sp. C1S1, clón A y clón A-30/R/12/5/31 pertenecen al grupo I de ARNr y utilizan TNT como fuente de N generando tolueno como un subproducto y, dado que el plásmido TOL es autotransferible y se replica y expresa en Pseudomonas del grupo I de ARNr, se razonó que sería posible la transferencia del plásmido TOL a las bacterias C1S1, clón A y clón A-30/R/12/5/31 y la selección de transconjugantes capaces de crecer a expensas del TNT como única fuente de C y N. En primer lugar se ha de reseñar que la frecuencia de transferencia del plásmido TOL silvestre quedó en múltiples ensayos de conjugación por debajo de nuestros límites de detección de transconjugantes, esto es alrededor de  $10^{-8}$  por receptor. Por esa razón se decidió utilizar un plásmido TOL marcado con resistencia a kanamicina, y eliminar las barreras de restricción de ADN del hospedador mediante calentamiento del mismo a 42°C (Benson y Shapiro, 1978; Nakazawa, 1978). Cuando se realizaron estos ensayos se encontraron

*Pseudomonas* sp.  
clon A



*P. putida*  
(TOL)



*Pseudomonas* sp.  
clon A (TOL)

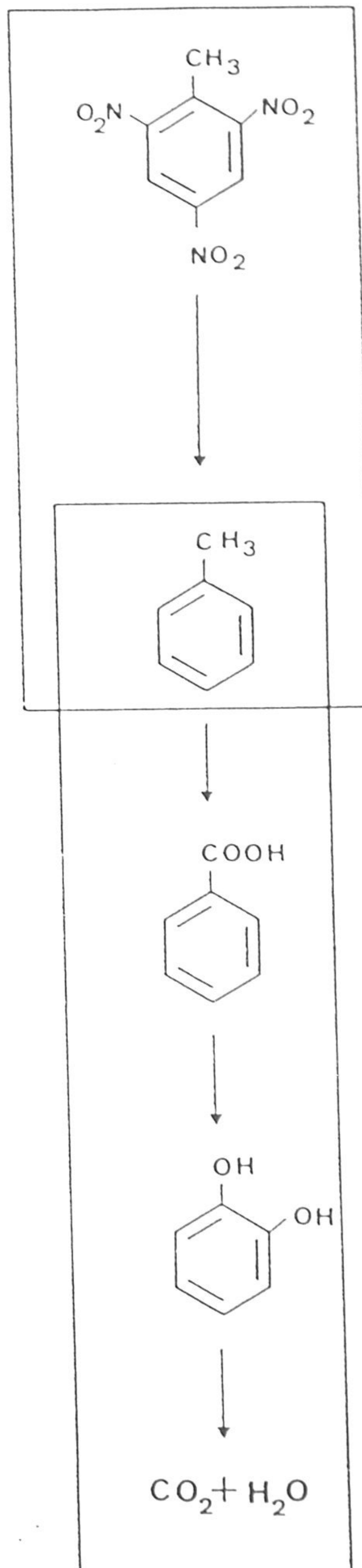


Figura 45. Construcción de una ruta híbrida para mineralizar TNT.

transconjugantes resistentes a kanamicina con una frecuencia del orden de  $10^{-7}$  por receptor, sugiriendo que la transferencia de TOL a esta cepa se encuentra muy limitada. Todos los transconjugantes que se obtuvieron crecieron en tolueno como fuente de C y eran capaces de utilizar TNT como fuente de C y N. Aquí cabe destacar que los degradadores más eficientes fueron aquellas bacterias derivadas, de la forma mejorada y denominada clón A-30/R/12/5/31 (ver Figuras 41, 42 y 43). Esta bacteria mineraliza alrededor del 50% del TNT suministrado apareciendo el resto como productos no mineralizables. Esto sin duda representa un serio handicap para la utilización de esta bacteria en sistemas industriales.

Dado que la formación de azoxidímeros es un proceso que ocurre de manera espontánea y a partir de formas parcialmente reducidas de TNT (Haïdour y Ramos, 1994 enviado a publicación), el grupo de degradación de tóxicos orgánicos de La Estación Experimental del Zaidín realizó nuevos enriquecimientos para encontrar degradadores de TNT, pero en condiciones de anaerobiosis. En esta nueva serie de enriquecimientos se encontró una bacteria perteneciente al género Klebsiella, denominada clón JLR11 que utiliza TNT en anaerobiosis y que transforma el TNT en ácido 3,4-dihidroxibenzoico, el cual se acumula como producto final. Dado que la degradación del último compuesto está relativamente extendida entre aerobios del suelo, parece que una combinación de tratamientos anaeróbicos y aeróbicos puede contribuir a solventar el problema de la mineralización de TNT a nivel industrial.

E - C O N C L U S I O N E S



En este apartado se distinguen dos grupos de conclusiones, aquellas referentes al comportamiento de P. putida EEZ15 (pWW0-EB62) en microcosmos edáficos y las referentes a la construcción de una ruta híbrida para la mineralización de TNT.

En cuanto al comportamiento de P. putida (pWW0-EB62) en microcosmos edáficos se concluye:

1. La bacteria P. putida portando el plásmido TOL recombinante pWW0-EB62 se establece en microcosmos constituidos por suelos agrícolas. La supervivencia de P. putida (pWW0-EB62) es mejor en suelos ricos en materia orgánica que en suelos pobres en materia orgánica.
2. El plásmido TOL pWW0-EB62 no confiere ventajas selectivas al hospedador en cuanto a su supervivencia en suelos, salvo cuando éstos se suplementaron con p-etilbenzoato a concentración del orden de 0,1-0,01 % (p/p).
3. La bacteria P. putida (pWW0-EB62) se multiplica en suelos cuando se introduce a una densidad celular inferior a la capacidad de carga del mismo.
4. La temperatura de incubación del suelo afectó a la supervivencia de la bacteria. Las bacterias en los suelos sobrevivieron mejor a bajas temperaturas (4-25°C) que a altas temperaturas (37°C).

5. El plásmido TOL pWW0-EB62 se mantiene establemente en bacterias introducidas en el suelo. La estabilidad concierne tanto a la ruta "upper", que codifica la oxidación de los hidrocarburos aromáticos a sus ácidos carboxílicos correspondientes, como a la ruta meta que codifica las enzimas para la oxidación de los últimos a intermediarios del ciclo de Krebs.
6. Ensayos con p-metil-<sup>14</sup>C-benzoato demostraron que las rutas de TOL se expresan en bacterias introducidas en suelos en respuesta a la adición de substratos, manteniéndose funcionales durante períodos de al menos 1 mes.
7. Se detectó transferencia del plásmido TOL pWW0-EB62 desde P. putida EEZ15 a otras Pseudomonas en suelos cuando las bacterias se introducían a alta densidad celular y la temperatura de incubación era de alrededor de 17°C.

En relación con la degradación biológica de TNT se han obtenido las siguientes conclusiones:

1. La bacteria Pseudomonas sp. C1S1 utiliza TNT como fuente de N pero no como fuente de C. La bacteria libera progresivamente grupos nitro del anillo de TNT, apareciendo en el medio de cultivo nitrito, dinitrotoluenos, mononitrotoluenos y tolueno. La acumulación de nitrito fue transitoria a lo largo del crecimiento debido a que éste se asimilaba a través de la nitrito reductasa.



2. Pseudomonas sp. C1S1, además de la reacción de eliminación de grupos nitros, es capaz de reducir éstos vía hidroxilamino hasta grupos amino. Las formas reducidas del TNT no fueron asimilables por esta bacteria. La bacteria también oxida el grupo alquílico (-CH<sub>3</sub>) hasta carboxilo (-COOH).
3. Pseudomonas sp. clón A es un derivado del clón C1S1 que crece más rápidamente con TNT como fuente de N que la cepa parental y no acumula nitrito en el medio de cultivo. La bacteria perdió la capacidad de oxidar TNT aunque mantiene la de reducir grupos nitro a amino en el anillo aromático.
4. Pseudomonas sp. clón A elimina TNT en aguas procedentes de corrientes de lavado de tanques de producción del compuesto, ello requiere la previa neutralización de las mismas y la adicción de una fuente de C, tal como fructosa y el suplemento de fosfato y micronutrientes.
5. Pseudomonas sp. clón A-30/R/12/5/31 es un derivado del clón A que se obtuvo en cultivo continuo, este clón produce menos formas reducidas del TNT que el clón A.
6. La transferencia del plásmido pWW0-Km - que codifica una ruta de asimilación de tolueno - a Pseudomonas sp. clón A-30/R/12/5/31 confiere a ésta la capacidad de utilizar tolueno como fuente de C y permite la construcción de una ruta híbrida para la mineralización de TNT.



F - R E F E R E N C I A S



Abril, M. A., C. Michán, K. N. Timmis y J. L. Ramos. 1989. J. Bacteriol. 171, 6782-6790.

Alexander, M. 1981. Science 221, 132-138.

Assinder, S. J. y P. A. Williams. 1990. Adv. Microb. Physiol. 31, 1-69.

Ballou, D. P. 1982. En: "Flavins and flavoproteins" (V. Massey y C. H. Williams, eds), pp. 301-310. Elsevier. Amsterdam.

Bartsch, K. y C. Tebbe. 1989. Appl. Environ. Microbiol. 55, 711-716.

Benson, S. y J. Shapiro. 1978. J. Bacteriol. 135, 278-280.

Berlinger, J. E. y J. M. Bartch. 1988. En: "The release of genetically-engineered microorganisms", (M. Sussman, C. H. Collins, F. A. Skinner y D. E. Stewart-Tull, eds), pp.29-46. Academic Press. Londres.

Bernhardt, F. H., H. Pachowsky y H. Standinger. 1975. Eur. J. Biochem. 57, 241-256.

Betlach, M. R., J. M. Tiedje y R. B. Firestone. 1981. Arch. Microbiol. 129, 135-140.

Boletín Oficial de las Cortes Generales. nº 33.1 Proyecto de Ley

121/000019.

Bradley, D. E. y P. A. Williams. 1982. *J. Gen. Microbiol.* 128, 3019-3024.

Bruhn, C., H. Lenke y H.-J. Knackmuss. 1987. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 208-210

Buncel, A. 1981. En: "The chemistry of amino, nitroso and nitro compounds and their derivatives" (S. Pata, ed) pp. 1225-1260. John Wiley and Sons. Interscience Publ. Chichester.

Burlage, R. S., S. W. Hooper y G. S. Sayler. 1989. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 1323-1328.

Cain, R. B. y N. J. Cartwright. 1960. *Nature* 185, 868-869.

Calanduoni, J. A. y J. Villafranca. 1986. *Biorg. Chem.* 14, 163-169.

Ciafardini, G. y B. Marotta. 1989. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 1273-1278.

Clarke, P. H. y J. H. Slater. 1986. En: "The bacteria" (J. Sokatch, ed.), vol. X, pp. 71-144. Academic Press. New York.

Csonka, L. N. 1989. *Microbiol. Rev.* 53, 121-147.

- Chakrabarty, A. M., G. Chou e I. C. Gunsalus. 1973. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 70, 1137-1140.
- Chanon, H. J., G. T. Mills y R. T. Williams. 1944. Biochem. J. 38, 70-85.
- Cruden, D. L., J. H. Wolfran, R. D. Rogers y Gibson, D. T. 1992. Appl. Environ. Microbiol. 58, 2723-2729.
- Dagley, S. 1971. Adv. Microb. Physiol. 6, 1-46.
- Dagley, S. 1981. En: "Microbial degradation of xenobiotic and recalcitrant compounds" (T. Leisinger, A.M. Cook, R. Hüter and T. Nüesch, eds), pp. 181-186. Academic Press, New York.
- Dagley, S. 1986. En: "The bacteria" (J.R. Sokatch, ed), vol X, pp. 527-586. Academic Press. New York.
- Daughton, C. G. y D. P. H. Hsieh 1977. Appl. Environ. Microbiol. 34, 174-184.
- Deflaun, M. F. y S. B. Levy. 1989. En: "Gene transfer in the environment" (S. B. Levy y R. V. Miller, eds), pp. 1-33. McGraw-Hill Publ. New York.
- Delgado, A. 1994. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. Granada.
- Delgado, A., E. Duque, y J.L. Ramos. 1992. Microb. Releases, 1,

23-28.

Delgado, A. y J. L. Ramos. 1994. *J. Biol. Chem.* 269, 8059-8062.

Diario Oficial de las Comunidades Europeas. nº L 117/1. Directiva 90/219/CEE.

Don, R. H. y J. M. Pemberton. 1981. *J. Bacteriol.* 145, 681-686.

Don, R. H., A. J. Weightman, H.-J. Knackmuss y K. N. Timmis. 1985. *J. Bacteriol.* 161, 85-90.

Dorn, E., M. Hellwig, W. Reineke y H.-J. Knackmuss. 1974. *Arch. Microbiol.* 99, 61-70.

Dorn, E. y H.-J. Knackmus. 1978. *Biochem. J.* 174, 73-84.

Dowling, D. N., B. Boesten, D. J. O'Sullivan, P. Stephens, J. Morris y F. O'Gara. 1992. En: "Pseudomonas. Molecular biology and biotechnology" (E. Galli, S. Silver y B. Withold, eds), pp. 408-414. American Society for Microbiology. Washington D. C.

Drahos, D. J., B. C. Hemming y S. McPearson. 1986. *Bio/Technology*, 4, 439-443.

Duetz, W., S. Marqués, C. de Jong, J. L. Ramos y J. van Andel. 1994. *J. Bacteriol.* En prensa.



- Duetz, W. A. y J. van Andel. 1991. *J. Gen Microbiol.* 137, 1369-1374.
- Dunn, N. W. e I. C. Gunsalus. 1973. *J. Bacteriol.* 114, 974-979.
- Duque, E., A. Haïdour, F. Godoy y J. L. Ramos. 1993. *J. Bacteriol.* 175, 2278-2283.
- Dwyer, D. F., F. Rojo y K. N. Timmis. 1988. En: "The release of genetically-engineered microorganism" (M. Sussman, C. H. Collins, F. A. Skinner y E. D. Stewart-Tull, eds), pp. 77-88 Academic Press. Londres.
- Elsa, J. D. van, J. T. Trevors y M.E. Strodub. 1988. *FEMS Microbiol. Ecol.* 53, 299-306.
- Elsas, J. D. van, J. T. Trevors, M. E. Starodub y L. S. van Overbeek. 1990. *FEMS Microbiol. Ecol.* 73, 1-12.
- Fernando, T., J. A. Bumpus y S. D. Aust. 1990. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1666-1671.
- Florencio, F. J. y J. L. Ramos. 1985. *Biochim. Biophys. Acta* 838, 39-48.
- Franklin, F.C.H., M. Bagdasarian, M. M. Bagdasarian y K. N. Timmis. 1981. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 7458-7462.

- Frantz, B. y A. M. Chakrabarty. 1986. En: "The bacteria" (J. R. Sokatch, ed), vol X, pp. 295-324. Academic Press. New York.
- Frantz, B., K. L. Ngai, D. K. Chatterjee, L. N. Ornston y A. M. Chakrabarty. 1987. J. Bacteriol. 169, 704-709.
- Fujiwara, M., L. A. Golovleva, Y. Saeki, M. Nozaki y O. Hayaishi. 1975. J. Biol. Chem. 250, 4848-4855.
- Galli, E., P. Barbieri y G. Bestetti. 1992. En: "Pseudomonas. Molecular biology and biotechnology" (E. Galli, S. Silver y B. Withold, eds), pp. 268-276. American Society for Microbiology. Washington D.C.
- García-Valdés, E., E. Cozar, R. Rotger, J. Lalucat y J. Ursing. 1988. Appl. Environ. Microbiol. 54, 2478-2485.
- Gelboin, H. V. 1980. Physiol. Rev. 60, 1107-1166.
- Gibson, D. T., G. E. Cardini, F. C. Maseles y R. E. Kallio. 1970b. Biochemistry 9, 1631-1635.
- Gibson, D. T., M. Hensley, H. Yoshioha y T. J. Malbry. 1970a. Biochemistry 9, 1626-1630.
- Gibson, D. T., J. R. Koch y R. E. Kallio. 1968. Biochemistry 7, 2653-2662.

- Gibson, D. T. y V. Subramanian. 1984. En: "Microbial degradation of organic compounds" (D. T. Gibson, ed.), pp. 181-252. Marcel Dekker Inc. New York.
- Groenewegen, P. E. J., P. Breeuwer, J. M. L. M. van Helvort, A. A. M. Langenhoff, F. P. de Vries y J. A. M. de Bont. 1992. J. Gen. Microbiol. 138, 1599-1605.
- Guerrero, M. G., J. M. Vega y M. Losada. 1981. Annu. Rev. Plant. Physiol. 32, 169-204.
- Haigler, B. E. y J. C. Spain. 1993. Appl. Environ. Microbiol. 59, 2239-2243.
- Hall, B. G., S. Yokayama y D. Calhoun. 1983. Mol. Biol. Evol. 1, 109-124.
- Harayama, S., M. Rekik. 1990. Mol. Gen. Genet. 221, 113-120.
- Harayama, S., M. Rekik, M. Wubbolts, K. Rose, R. A. Leppik y K. N. Timmis. 1989. J. Bacteriol. 171, 5048-5055.
- Harayama, S., A. Wasserfallen, P. Cerdan y M. Rekik. 1992. En: "Pseudomonas. Molecular biology and biotechnology" (E. Galli, S. Silver y B. Withold, eds.), pp. 223-230. American Society for Microbiology. Washington D. C.

- Hegeman, G. D. 1966. J. Bacteriol. 91, 1140-1154.
- Hengge-Aronis, R., R. Lange, N. Henneberg y D. Fisher. 1993. J. Bacteriol. 175, 259-265.
- Herbes, S. E. y L. R. Schwall. 1978. Appl. Environ. Microbiol. 35, 306-316.
- Herrero, M., V. de Lorenzo y K. N. Timmis. 1990. J. Bacteriol. 172, 6557-6567.
- Hofte, M., M. Mergeay y W. Verstrate. 1990. Appl. Environ. Microbiol. 56, 1046-1052.
- Holloway, B. W. 1992. En: "Pseudomonas. Molecular biology and biotechnology" (E. Galli, S. Silver y B. Withold, eds.), pp. 9-12. American Society for Microbiology. Washington D. C.
- Hughes, E. H., R. C. Bayly y R. A. Skurray. 1984. J. Bacteriol. 158, 79-83.
- Inoue, A., M. Yamamoto y K. Horikoshi 1991. Appl. Environ. Microbiol. 57, 1560-1562.
- Inoue, A. y K. Horikoshi. 1989. Nature 338, 264-266.
- Inouye, S., A. Nakazawa y T. Nakazawa. 1981. J. Bacteriol. 148,

413-418.

Jacoby, G. A., J. E. Rogers, A. E. Jacob y R. W. Hedges. 1978. Nature 274, 179-180.

Janssen, D. B., H. J. M. op den Camp, P. J. M. Leenen y C. van der Drift. 1980. Arch. Microbiol. 124, 197-203.

Jeenes, D. J., W. Reinecke, H.-J. Knackmuss y P. A. Williams. 1982. J. Bacteriol. 150, 180-187.

Jeenes, D. J. y P. A. Williams. 1982. J. Bacteriol 150, 188-194.

Jensen, L. B., J. L. Ramos, Z. Kaneva y S. Molin. 1993. Appl. Environ. Microbiol. 59, 3713-3717.

Jenkins, D. E. , S. A. Chaison y A. Martin. 1990. J. Bacteriol. 172, 2779-2781.

Jones, R. A., M.W. Broder y G. Stotzky. 1991. Appl. Environ. Microbiol. 57, 3212-3219.

Kado, C. I. y S. T. Liu. 1981. J. Bacteriol. 145, 1365-1373.

Kaplan, D. L. y A. M. Kaplan. 1982. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 28, 33-38.

- Kaplan, D. L. 1989. En: "Biotechnology and biodegradation. Advances in applied biotechnology" (D. Kamely, A. M. Chakrabarty y G. Omenn, eds), pp. 155-181. Portfolio Pu. Houston.
- Keshavaraz, T. M. D. Lilly y P. H. Clarke. 1985. J. Gen. Microbiol. 131, 1193-1203.
- Kunz, D. A. y P. J. Chapman. 1981. J. Bacteriol. 146, 952-964.
- Lea, P. J., K. W. Joy, J. L. Ramos y M. G. Guerrero. 1984. Phytochem. 23, 1-6.
- Leah, J. G. y R. R. Clowell. 1990. Microbiol. Rev. 54, 305-315.
- Lehrbach, P. R., J. Zeyer, W. Reineke, H.-J. Knackmuss y K. N. Timmis. 1984. J. Bacteriol. 158, 1025-1032.
- Lenke, H. y H.-J. Knackmuss. 1992. Appl. Environ. Microbiol. 58, 2933-2937.
- Lindow, S. V. 1992. En: "Pseudomonas. Molecular biology and biotechnology" (E. Galli, S. Silver, B. Withold, eds), pp. 399-407. American Society for Microbiology. Washington D. C.
- Lindow, S. E., N. J. Panopoulos y B. L. McFarland. 1989. Science 244, 1300-1307.
- Low, E. von. 1992. En: "100th Heraeus Conference: A workshop on

biodegradation of pollutants". Bonn.

Maniatis, T., E. F. Fritsch y J. Sambrook. 1982. "Molecular cloning. A laboratory manual". Cold Spring Harbor Press. New York., U.S.A.

Marqués, S. y J. L. Ramos. 1993. Mol. Microbiol. 9, 923-929.

Marqués, S., J. L. Ramos y K. N. Timmis. 1993. Biochim. Biophys. Acta. 1216, 227-236.

Marqués, S., K. N. Timmis y J. L. Ramos. 1994. J. Bacteriol. En prensa.

Markwell, M. A., S. M. Haas, L. L. Bieber y N. E. Tolbert. 1978. Anal. Biochem. 87, 206-210.

McClure, N. C., A. J. Weightmon y J. C. Fry. 1989. Appl. Environ. Microbiol. 55, 2627-2634.

McCormik, N. E., F. E. Feherry y H. S. Levinson. 1976. Appl. Environ. Microbiol. 31, 949-958.

Meulieu, P., G. D. Robert y P. Broda. 1981. Mol. Gen. Genet. 184, 97-101.

Molin S., L. B. Jensen, C. S. Kristensen y J. L. Ramos. 1993. En:

- "Trends in Microbial ecology" (R. Guerrero y C. Pedrós-Aliu, eds). Spanish Society for Microbiology. Barcelona.
- MOPU. 1989. Análisis de Calidad de Aguas. Ministerio de Obras Públicas y Urbanismo. Dirección General de Obras Hidráulicas. Madrid.
- Nakazawa, T. 1978. J. Bacteriol. 133, 527-535.
- Nicholas, D. J. D. y A. Nason. 1957. Methods Enzymol. 3, 981-984.
- Ngai, K. L. y L. N. Ornston. 1988. J. Bacteriol. 170, 2412-2413.
- Nüblein, K., D. Maris, K. N. Timmis y D. F. Dwyer. Appl. Environ. Microbiol. 58, 3380-3386.
- OCDE. 1994. En: "Biotechnology for a clean environment: prevention, detection and remediation". OCDE Press, Paris.
- Okamoto Y. y J. Y. Wang. 1977. J. Org. Chem. 42, 1261-1262.
- Ornston, L. N. 1966. J. Biol. Chem. 241, 3800-3810.
- Ornston, L. N. y D. Parke. 1976. J. Bacteriol. 125, 475-488.
- Parrih, F. W. 1977. Appl. Environ. Microbiol. 34, 232-233.
- Pipke, R., I. Wagner Dobler, K. N. Timmis y D. F. Dwyer. 1992.



- Appl. Environ. Microbiol. 58, 1259-1265.
- Prens, A., J. Fimpel y G. Diekert. 1993. Arch. Microbiol. 159, 345-353.
- Ramos, J. L., E. Duque y M. I. Ramos-González. 1991. Appl. Environ. Microbiol. 57, 260-266.
- Ramos, J. L., M. González-Carrero y K. N. Timmis. 1988. FEBS Lett. 226, 241-246.
- Ramos, J. L., N. Mermod y K. N. Timmis. 1987a. Mol. Microbiol. 1, 295-300.
- Ramos, J. L. y F. Rojo. 1990. Investigación y Ciencia. 164, 72-79.
- Ramos, J. L., A. Stolz, W. Reineke y K. N. Timmis. 1986. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 8467-8471.
- Ramos, J. L. y K. N. Timmis. 1987. Microbiological Sciences. 4, 228-237.
- Ramos, J. L., A. Wasserfallen, K. Rose y K. N. Timmis. 1987b. Science 235, 593-596.
- Ramos-González, M. I. 1993. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. Granada

- Ramos-González, M. I., E. Duque y J. L. Ramos, 1991. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 3020-3027.
- Rangnekar, V. M. 1988. *J. Bacteriol.* 170, 1907-1922.
- Reineke, W., D. J. Jeenes, P. A. Williams y H.-J. Knackmuss. 1982. *J. Bacteriol.* 150, 195-201.
- Reineke, W. y H.-J. Knackmuss. 1978. *Biochim. Biophys. Acta* 542, 412-420.
- Reineke, W. y H.-J. Knackmuss. 1979 *Nature (London)*. 277, 385-386.
- Reineke, W. y H.-J. Knackmuss. 1988. *Annu. Rev. Microbiol.* 42, 263-287.
- Rheinwald, J. G., A. M. Chakrabarty e I. C. Gunsalus. 1973. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70, 825-829.
- Rhys-Williams, W., S. C. Taylor y P. A. Williams. 1993. *J. Gen. Microbiol.* 139, 1967-1972.
- Rojo, F., D. H. Pieper, K. H. Engesser, H.-J. Knackmuss y K. N. Timmis. 1987. *Science* 238, 1395-1397.
- Roselló-Mora, J., J. Lalucat y E. García-Valdés. 1994. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 966-972.

- Sayler, G. S., S. W. Hooper, A. C. Layton y J. M. King. 1990. *Microb. Ecol.* 19, 1-20.
- Schmidt, E. y H.-J. Knackmuss. 1980. *Biochem. J.* 192, 339-347.
- Selvaraj, G. y Y. N. Iyer. 1983. *J. Bacteriol.* 134, 225-238.
- Senior, E., A. T. Bull y J. M. Slater. 1976. *Nature* 263, 476-479.
- Shields, M. S., S. O. Montgomery, P. J. Chapman y S. M. Pritchard. 1989. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 1624-1629.
- Snell, F. D. y C. T. Snell. 1949. En: "Colorimetric methods of analysis", vol 3, pp. 804-805. Van Nostrand Co Inc. New York.
- Spain, J., O. Wyss y D. T. Gibson. 1979. *Biochim. Biophys. Res. Comm.* 88, 634-641.
- Spiker, J. K., D. L. Crawford y R. L. Crawford. 1992. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3199-3202.
- Stanier, R. Y. 1947. *J. Bacteriol.* 54, 339-348.
- Steinbüchel, A., N. Krüger, M. Valentin, A. Timm, A. Pries, E. Hustede y H. G. Schlegel. 1992. En: "Pseudomonas. Molecular biology and biotechnology" (E. Galli, S. Silver y B. Withold, eds) pp. 315-328. American Society for Microbiology. Washington D.C.

- Stitzman, M. E. 1974. *J. Chem. Engineer. Data* 19, 179-181
- Stotzky, G., L. R. Zeph, M. A. Devanas. 1990. En: "Assessing Ecological Risks of Biotechnology" (L. R. Ginzburg ed) Butterworth-Heinemann. Boston.
- Subba-Rao, R. V. y M. Alexander. 1985. *Appl. Environ. Microbiol.* 19, 509-516.
- Tiedje, J., R. K. Colwell, Y. L. Grossman, R. E. Hodson, R. E. Lenski, R. N. Mack y P. R. Regal 1899. *Ecology* 70, 298-315.
- Timmis, K. N., P. R. Lehrbach, S. Harayama, R. H. Don, N. Mermod, S. Bas, R. Leppik, A. J. Weightman, W. Reineke y H.-J. Knackmuss. 1985. En: "Plasmids in bacteria" (D. R. Helinski, S. Cohen, S. D. B. Clowell, D. A. Jackson y A. Hollaender, eds.), pp. 719-739. Plenum Press. New York.
- Tsuda, M. y T. Iino, 1988. *Mol. Gen. Genet.* 213, 72-77.
- Vorbeck, C., H. Lenke, P. Fischer y H.-J. Knackmuss. 1994. *J. Bacteriol.* 176, 932-934.
- Wasserfallen, A. 1988. Tesis Doctoral. Universidad de Ginebra. Ginebra. Suiza.
- Webster, C., L. Gardner y S. Busby. 1989. *Gene* 83, 207-213.

- Weger, L. A., P. Dunbar, W. F. Mahafee, B. J. J. Lugtenberg y G. S. Sayler. 1991. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 3641-3644.
- Whited, G. M. y D. T. Gibson. 1989. *J. Bacteriol.* 173, 3010-3016.
- Williams, P. 1981. *TIBS* 7, 23-26.
- Williams, P., S. J. Assinder, P. de Marco, K. J. O'Donnell, C. L. Poh, L. Shaw y M. K. Winsor. 1992. En: "Pseudomonas. Molecular biology and biotechnology" (E. Galli, S. Silver y B. Withold, eds) pp. 341-352. American Society for Microbiology. Washington D. C.
- Williams, P. A. y K. Murray. 1974. *J. Bacteriol.* 120, 416-423.
- Won, W. D., Heckly, R. J., Glover, D. J. y Hoffsommer, J. C. 1974. *Appl. Environ. Microbiol.* 27, 513-516.
- Wong, C. L. y N. W. Dunn. 1974. *Genet. Res.* 23, 227-232.
- Worsey, M. J. y P. A. Williams. 1975. *J. Bacteriol.* 122, 7-13.
- Wright, A. y R. H. Olsen. 1994. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 235-242.
- Yen, K. M. e I. C. Gunsalus. 1982. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 79, 874-878.
- Yen, K. M., M. R. Karl, L. M. Blatt, M. J. Simon, R. B. Winter,

P. R. Fausset, H. S. Leu, A. A. Harcourt y K. K. Cheu. 1991. J. Bacteriol. 173, 5315-5327.

Young, L. Y. 1984. En: "Microbial degradation of organic compounds" (D. T. Gibson, ed.) pp. 487-523. Marcel Dekker. New York.

Zeyer, J. y P. C. Kearney. 1984. J. Agr. Food Chem. 32, 238-242.



DILIGENCIA:

Reunido el Tribunal examinador en el día de  
la fecha, constituido por:

- D. Jorge Lucret Jo
- D. Ma Dolores Juanz Ortez
- D. M. Hilde B. con Agel
- D. Fruito J. rier Francisco Bellido
- D. Emilio Omer. e. Arroyu


para juzgar la Tesis Doctoral del Licenciado Don

Eduell Duque Martin de Olis  
se acordó por UNANIMIDAD otorgar la califica-  
ción de APTO "COM LAUDE"

y para que conste, se extiende firmada por los  
componentes del Tribunal, la presente diligen-  
cia.

Granada, a 10 de Junio de 1974.

El Secretario,

  
El Presidente,

  
El Vocal,

  
El Vocal,

  
El Vocal,





