

~~T. Prov. 22/36~~
t 4/61

Facultad de Ciencias
UNIVERSIDAD DE GRANADA

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha ... 9-2-99
ENTRADA NUM. ... 376

**SISTEMAS DE CONTENCIÓN BIOLÓGICA:
COLONIZACIÓN PROGRAMADA DE SUELOS
Y RIZOSFERA DE PLANTAS
POR CEPAS DE *Pseudomonas putida***


BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
Nº Documento <u>613371847</u>
Nº Copia <u>15494093</u>

Lázaro Molina Delgado
1999

UNIVERSIDAD DE GRANADA
3 FEB. 1999
COMISION DE DOCTORADO

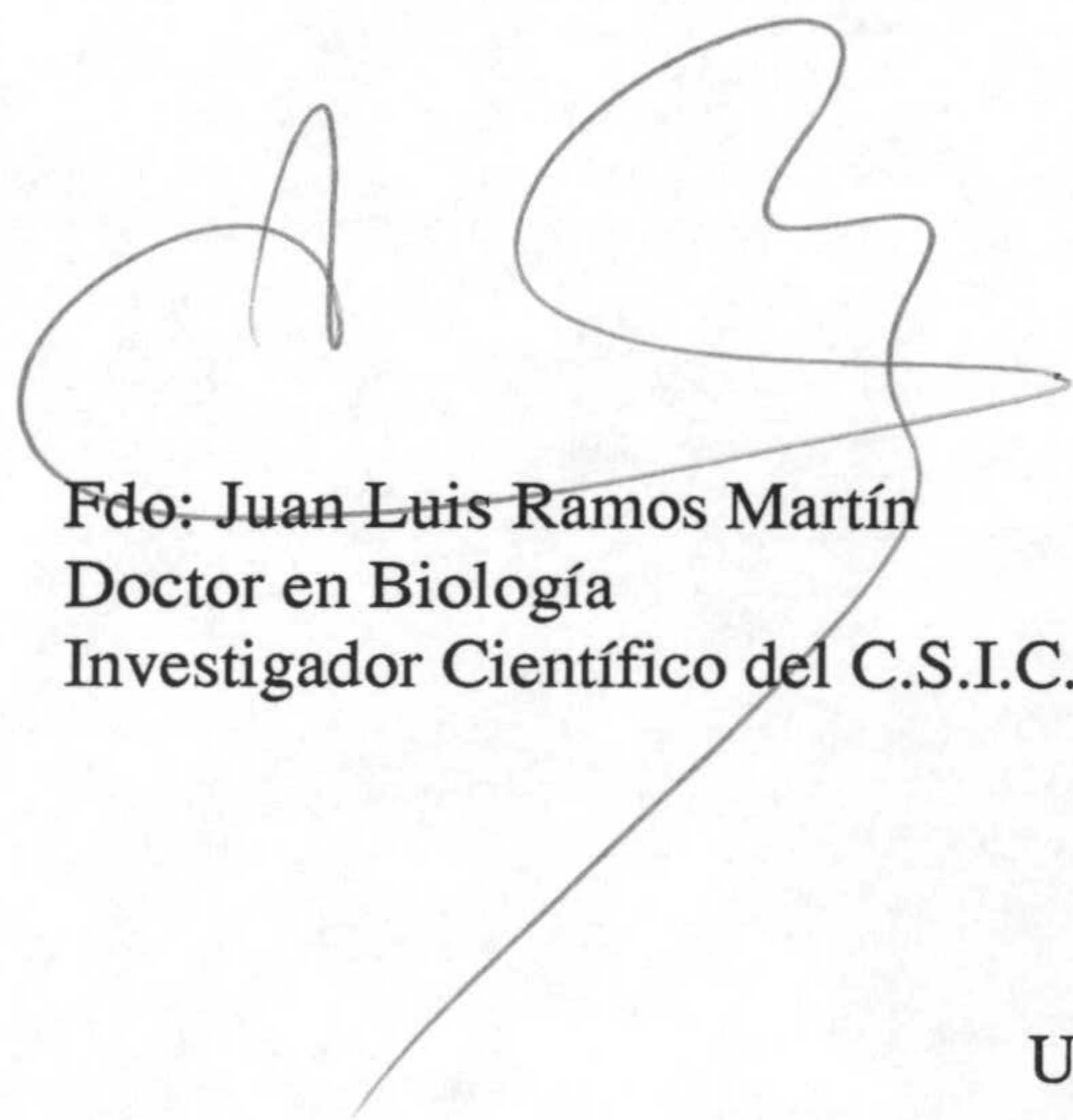
**SISTEMAS DE CONTENCIÓN BIOLÓGICA: COLONIZACIÓN
PROGRAMADA DE SUELOS
Y RIZOSFERA DE PLANTAS
POR BACTERIAS DEL GÉNERO *Pseudomonas***

Memoria que presenta el Licenciado en
Ciencias Biológicas Lázaro Molina Delgado
para aspirar al título de doctor



Fdo: Lázaro Molina Delgado

V° B°
Los directores



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



Fdo: Cayo Ramos Rodríguez
Doctor en Biología
Profesor Ayudante
Universidad Técnica de Dinamarca

Universidad de Granada
1999

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en la
Unidad Estructural de Bioquímica y Biología
Molecular y Celular de Plantas de la Estación
Experimental del Zaidín (C.S.I.C.), Granada.

A mi familia, especialmente
a mi padre y a mi madre.

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

Al Dr. D. Juan Luis Ramos, director del grupo de Degradación de Tóxicos Orgánicos de la Estación Experimental del Zaidín, por haberme permitido formar parte de su grupo de investigación y por ofrecerme la oportunidad de desarrollar este tema de trabajo de gran interés.

A los Dres. D. Juan Luis Ramos y D. Cayo Ramos, directores de esta Tesis Doctoral, por la confianza mostrada en mí y por todo lo que he aprendido en el plano científico trabajando con ellos.

A GX-Biosystems por haber financiado durante estos años mi trabajo y por acogerme tan gratamente en su laboratorio.

Al Prof. Søren Molin, por el interés mostrado siempre en mi trabajo y por aceptarme en su grupo de investigación durante una estancia corta en la Universidad Técnica de Dinamarca.

A Juan Luis por nombrarme "Gerente" de una de las empresas "más importantes del mundo", GX-Biosystem-España.

A Cayo por dar sentido a todos estos resultados cuando yo había perdido el rumbo, por frenar mis ataques de nervios, por saber decir en cada momento las palabras justas para tranquilizarme, en definitiva por portarse como casi un padre.

Al resto de los doctores del grupo: Ana, Maribel, Estrella, Frank "Paco Hidalgo", M. Carmen y Manolo ; y a las grandes señoras de la Biodegradación: Carmina, Silvia, Asun y Mari Trini por saber resolver tan amablemente todas aquellas dudas científicas planteadas.

A Chechu y Gilberto, quienes no siendo doctores han ejercido como tales.

A Susana y M. Carmen "la Reina de la Biología Molecular", compañeras del "Little Lab", por haber aportado su granito de arena en este trabajo y por soportar tan estoicamente los fenómenos paranormales y telecinéticos provocados por mi presencia.

A mis niñas: M. José, la compañera y amiga eterna; Upe, la alegría y la razón en la proporción justa; Coral, la enemiga infiltrada que todos deseábamos tener y M. Ángeles, otra gran señora de la que muchos tendríamos que aprender, por compartir tantos buenos y malos momentos y por ofrecerme siempre el apoyo moral necesario.

A mis chicas: M. Mar "La Chica", la chanerilla más grande de todas; Raquel, la dulzura personificada y Patricia G. por mostrarme que existen virtudes devaluadas que todos tendríamos que revalorizar.

A Ana Segura y Manolo, por saber soportar diariamente mi conversación tritemática: Danmark, Tesis y anexo. Espero que esa tortura que os he impuesto termine pronto.

Al Patxi 2, por esas conversaciones tan profundas y necesarias.

A los nuevos fichajes del grupo: Patricia "mi becaria" y Ana Hurtado, por mostrar tanta curiosidad y por hacerme sentir útil en este mundo científico.

A Mariam, Maxi, Miguel, Abraham y Juan por colaborar en la creación de este ambiente de trabajo tan grato y cordial.

A May, Carmen, M. Angustias y Amparo, porque su labor en los trabajos del grupo es de vital importancia.

A "La Peña", la gente más dicharachera de este barrio del "Sidín". Pepo, Cori, Estefi, David y "Chica" con vosotros ya tengo 12 hermanos.

A Tara, por ayudarme a evadirme de los problemas mundanos en compañía de P.A de A. (Morris, 1996).

A Carolina y Adela, las mejores amigas que se pueden tener al otro lado del Atlántico.

A la generación "Becarios 94" por estar dispuestos a ayudar en cada momento con vuestra experiencia y por ser los mejores inquilinos de esta ilustre casa.

A los petroleros/as de Dinamarca: Verónica, M. Dolores, Felipe, Cristina, Sandra, Marissa, Xana, Mario, Enrico, Enrique, Vicent, Elena, Lali,... por haberme facilitado tantas cosas en un país extraño y por crear el ambiente más "hyggelig".

A mi gente: sobre todo a Manolo, Belén, Toñi, Lola, Paco, Manoli, Dori y Miguel, por mostrarme que la amistad es el mejor tónico reconstituyente.

Y muy especialmente a mi familia; a mis padres, hermanos y sobrinos por creer siempre en mis capacidades, por hacerme sentir alguien especial y por constituir ese refugio de paz y cariño tan necesario en los peores momentos. Esta Tesis va por vosotros.

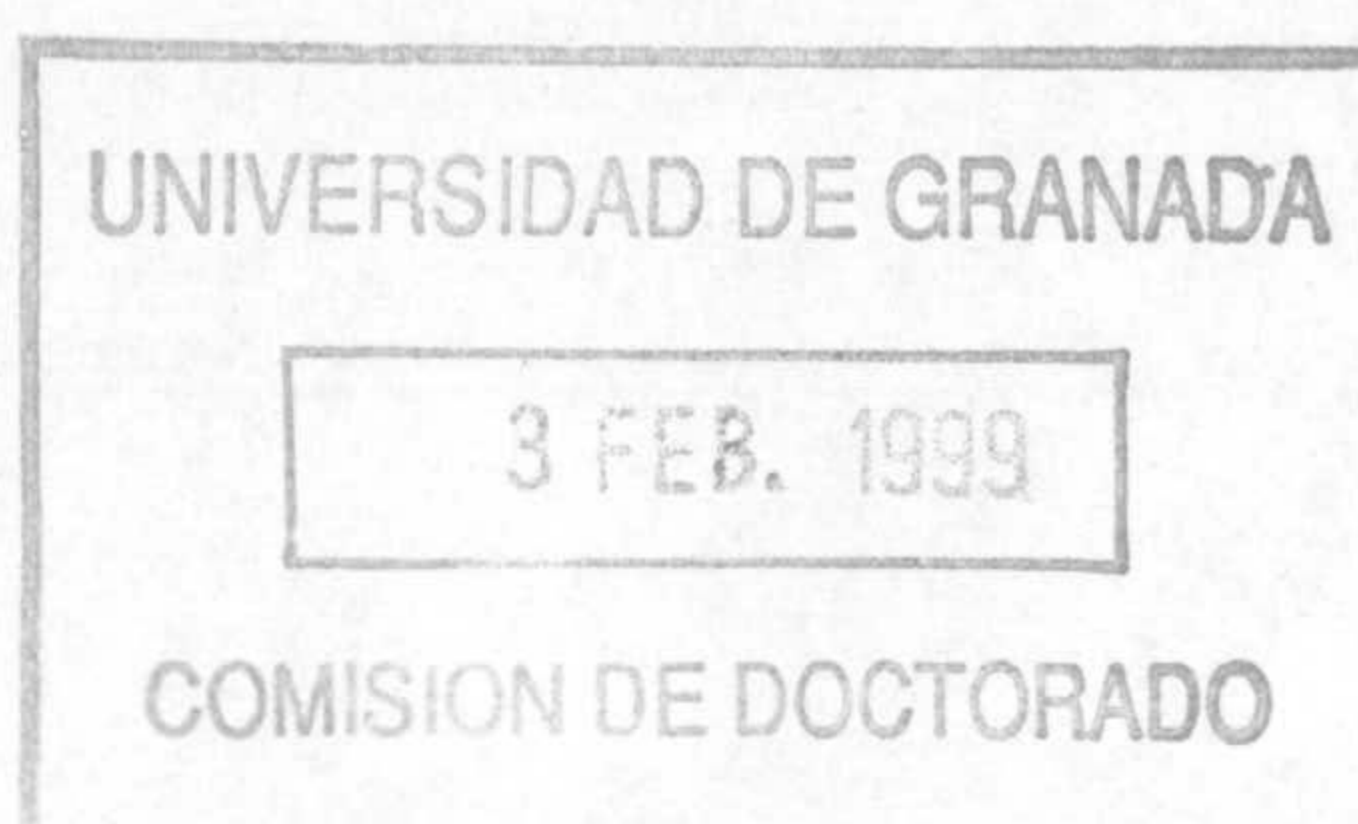
ÍNDICE

ÍNDICE**ABREVIATURAS****ÍNDICE DE FIGURAS****ÍNDICE DE TABLAS**

INTRODUCCIÓN	1
1. La rizosfera	3
1.1. El entorno rizosférico	3
1.2. Heterogeneidad espacial de la actividad microbiana en la rizosfera	3
1.3. Introducción de inoculantes bacterianos en la rizosfera	4
2. Degradación biológica de contaminantes orgánicos en la rizosfera	5
3. Permanencia de los microorganismos introducidos en el medioambiente	7
4. Sistemas marcadores para la detección de microorganismos en entornos medioambientales.	9
5. Sistemas de activos de contención biológica	13
5.1. Genes matadores	14
5.2. Control del suicidio bacteriano	15
5.3. Bacterias suicidas para la eliminación de alquilbenzoatos	16
5.4. Bacterias suicidas en la rizosfera de plantas	19
6. Genes de la degradación de prolina en procariotas	21
6.1. Organización genética y bioquímica de la degradación de la prolina	21
6.2. Regulación de los genes del catabolismo de la prolina	23
OBJETIVOS	27
MATERIALES Y MÉTODOS	31
1. Cepas bacterianas	33
1.1. Conservación de las cepas bacterianas	34
2. Plásmidos	34
3. Medios de cultivo	40
3.1. Medios ricos	40

3.2. Medios mínimos	40
3.3. Antibióticos	41
4. Curvas de crecimiento	42
5. Tráferencia de plásmidos por conjugación	42
6. Estabilidad de las inserciones en las cepas construidas	43
7. Aislamiento de ADN plasmídico	43
7.1. Método "Qiapreps"	43
7.2. Método de lisis alcalina	43
8. Transformación de células de <i>E. coli</i>	44
8.1. Preparación de células competentes.	
8.2. Transformación	45
9. Manipulación de ADN	45
9.1. Restricción de ADN	45
9.2. Desfosforilación de ADN	46
9.3. Electroforesis de ADN en geles de agarosa	46
9.4. Recuperación de fragmentos de ADN de geles de agarosa	47
9.5. Ligación de ADN	47
9.6. Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa termorresistente (PCR)	47
10. Secuenciación de ADN	48
11. Tráferencia de adn a membrana por el metodo de "southern blot" e hibridacion	50
11.1. Tráferencia por capilaridad	50
11.2. Marcaje de ADN lineal	50
11.3. Prehibridación e hibridación	51
11.4. Reacción Inmunológica	51
12. Microcosmos edáficos	52
13. Experimentos de colonización de la rizosfera	53
13.1. Aislamiento y caracterización preliminar de cepas bacterianas de la rizosfera del maíz	53
13.2. Plantas utilizadas	54
13.3. Esterilización de semillas	54
13.4. Inoculación de semillas	54
13.5. Experimentos en el invernadero.	55

13.6. Supervivencia de cepas bacterianas en la rizosfera y en el suelo no rizosférico	55
14. Supervivencia de microorganismos en condiciones medioambientales	56
14.1. Localización, descripción y preparación de la parcela experimental	56
14.1.1. Liberación de cepas no modificadas genéticamente	56
14.1.2. Liberación de una cepa portadora de un sistema de contención biológica	56
14.2. Liberación en suelos sin planta	58
14.3. Liberación en la rizosfera	58
15. Medidas de bioluminiscencia	58
16. Detección de células bioluminiscentes en la rizosfera	59
17. Ensayo enzimático de la actividad β-galactosidasa	59
 RESULTADOS	 63
 I. COLONIZACIÓN DE LA RIZOSFERA DE PLANTAS DE INTERÉS AGRÍCOLA POR UNA CEPA BIOLUMINISCENTE DERIVADA DE <i>Pseudomonas putida</i> mt-2 EN CONDICIONES CONTROLADAS DE INVERNADERO	 65
1. Caracterización preliminar de la cepa bioluminiscente <i>P. putida</i> S1B1	66
2. Supervivencia de <i>P. putida</i> S1B1 en microcosmos edáficos	67
2.1. Supervivencia en suelos tipo cambisol	67
2.2. Supervivencia en suelos tipo fluvisol	69
2.3. Supervivencia de la cepa <i>P. putida</i> S1B1 en microcosmos edáficos en competencia con la cepa <i>P. putida</i> KT2442-5	70
3. Supervivencia de una cepa de <i>P. putida</i> S1B1 en la rizosfera de diversas plantas de interés agrícola	71
3.1. Colonización de la rizosfera de maíz	71
3.1.1. Supervivencia de la cepa <i>P. putida</i> S1B1 en competencia con la cepa <i>P. putida</i> KT2442-5	72
3.2. Colonización de la rizosfera de plantas de haba y tomate	74



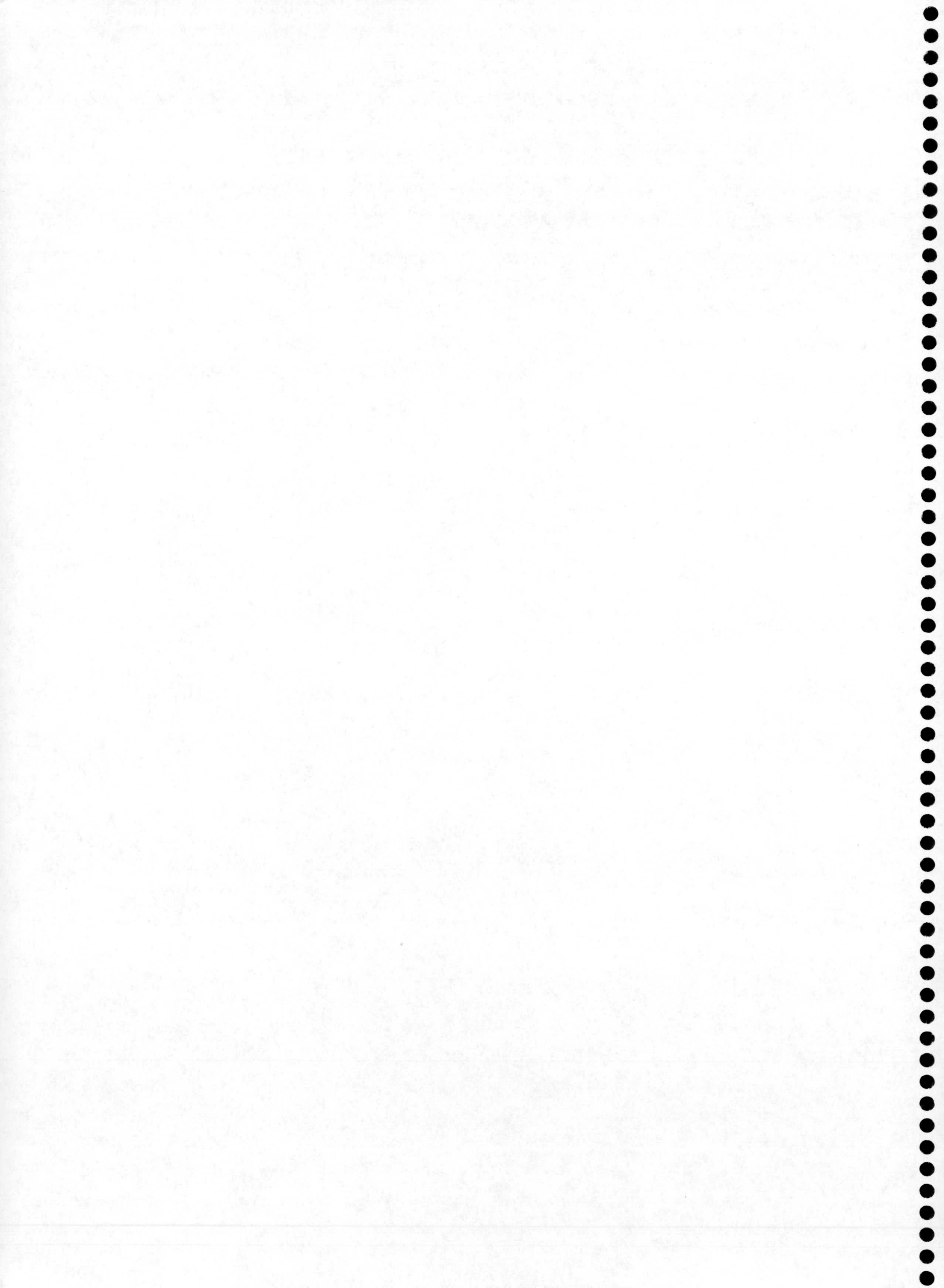
4. Determinación del patrón de colonización <i>in situ</i> de la rizosfera de plantas por la cepa <i>P. putida</i> S1B1	76
4.1. Colonización de la rizosfera de plantas de maíz, acelga, tomate, espinaca y haba cultivadas en vermiculita	76
4.2. Colonización de la rizosfera de plantas de maíz cultivadas en suelo	79
II. ESTUDIOS DE COMPETENCIA ENTRE LA CEPA BIOLUMINISCENTE <i>P. putida</i> S1B1 Y CEPAS INDÍGENAS AISLADAS DE LA RIZOSFERA DE PLANTAS DE MAÍZ BAJO CONDICIONES CONTROLADAS DE INVERNADERO	81
1. Establecimiento y supervivencia de <i>P. putida</i> S1B1 en microcosmos edáficos en presencia de cepas aisladas de la rizosfera del maíz	82
1.1. Estudios de competencia en suelo estéril.	82
1.1.1. Supervivencia de <i>P. putida</i> S1B1 en microcosmos edáficos estériles donde se había establecido previamente uno de los aislados naturales y viceversa	84
1.1.1.1. Establecimiento previo de los aislados naturales de la rizosfera	86
1.1.1.2. Establecimiento previo de <i>P. putida</i> S1B1	87
1.2. Estudios de competencia en suelo no estéril	93
1.2.2. Efecto de la temperatura sobre las relaciones competitivas de <i>P. putida</i> S1B1 y las cepas <i>P. putida</i> EEZ-201-L y <i>P. chlororaphis</i> EEZ-204-L en microcosmos edáficos no Estériles	94
1.2.3. Efecto de la introducción de la cepa <i>P. putida</i> S1B1 en suelos no estériles sobre la supervivencia de la microbiota natural del suelo	95
2. Establecimiento y supervivencia de la cepa <i>P. putida</i> S1B1 en la rizosfera de plantas de maíz en presencia de cepas indígenas aisladas de este nicho ecológico	101
2.1. Estudios de competencia en suelo estéril	101
2.2. Estudios de competencia en suelo no estéril	104

2.2.1. Competencia entre <i>P. putida</i> S1B1 y algunos aislados naturales en la rizosfera de plantas de maíz cultivadas en suelo no estéril	104
2.2.2. Efecto de la colonización de la rizosfera de plantas de maíz por <i>P. putida</i> S1B1 sobre la supervivencia de poblaciones bacterianas indígenas de este nicho ecológico	106
3. Estudio comparativo de la colonización de la rizosfera <i>in situ</i> por las cepas <i>P. putida</i> EEZ-201-L, <i>P. chlororaphis</i> EEZ-204-L y <i>P. fluorescens</i> EEZ-205-L	108
3.1. Colonización de la rizosfera de plantas crecidas en vermiculita	108
3.2. Colonización de la rizosfera de plantas de maíz cultivadas en suelo fluvisol no estéril	112
 III. SUPERVIVENCIA EN CONDICIONES MEDIOAMBIENTALES DE CEPAS DERIVADAS DE <i>Pseudomonas putida</i> mt-2 PORTADORAS O NO DE UN SISTEMA ACTIVO DE CONTENCIÓN BIOLÓGICA	 115
1. Supervivencia de cepas derivadas de <i>P. putida</i> mt-2 sin sistema de contención biológica en condiciones medioambientales	116
1.1. Supervivencia de la cepa <i>P. putida</i> S1B1 en suelos sin planta	116
1.2. Supervivencia la cepa KT2442 en la rizosfera	117
1.2.1. Supervivencia en la rizosfera de haba, ensayo de otoño-invierno	119
1.2.2. Supervivencia en la rizosfera de maíz, ensayo de primavera-verano	119
2. Supervivencia en condiciones medioambientales de la cepa <i>P. putida</i> CMC4 portadora de un sistema activo de contención biológica	122
2.1. Liberación de otoño-invierno	123
2.1.1. Supervivencia en suelos sin planta	124
2.1.2. Supervivencia en la rizosfera	124
2.1.3. Supervivencia en el suelo no rizosférico	125
2.1.4. Evaluación del efecto de la introducción de cepas modificadas genéticamente sobre la supervivencia de la microbiota del suelo	127

2.2. Liberación de primavera-verano	129
2.2.1. Supervivencia en suelos sin planta	129
2.2.2. Supervivencia en la rizosfera	130
2.2.3. Supervivencia en el suelo no rizosférico	132
2.2.4. Evaluación del efecto de la introducción de la cepa contenida biológicamente sobre la supervivencia de la microbiota natural del suelo	132
2.3. Aparición de mutantes resistentes a la lisis celular inducida por el gen <i>gef</i>	134
2.4. Detección de la presencia de 3-metilbenzoato en la rizosfera de maíz	134
2.5. Dispersión de los microorganismos introducidos dentro del área experimental	136
IV. CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL OPERÓN DEL CATABOLISMO DE LA PROLINA DE <i>Pseudomonas putida</i> KT2442	137
1. Aislamiento y secuenciación del operón del catabolismo de la prolina de <i>P. putida</i> KT2442	138
2. Secuenciación de los genes que constituyen el operón del catabolismo de la prolina de <i>P. putida</i> KT2442	142
2.1 Secuenciación del inserto del plásmido pLCR12	142
2.2. Secuenciación del inserto del plásmido pLCR4	150
2.3. Secuenciación del resto de la secuencia del gen <i>putA</i> de <i>P. putida</i> KT2442	150
3. Análisis de la región intergénica entre <i>putA</i> y <i>putP</i> y de la expresión de estos genes utilizando fusiones transcripcionales	154
3.1. Estudios preliminares de la expresión del gen <i>putP</i>	154
3.3. Estudios preliminares de la expresión del gen <i>putA</i>	157
4. Complementación de cepas de mutantes de <i>S. typhimurium</i> y <i>E. coli</i> incapaces de utilizar prolina con los genes <i>putA</i> y/o <i>putP</i> de <i>P. putida</i>	158

DISCUSIÓN	161
1. Colonización de diversos entornos edáficos por un derivado bioluminiscente de <i>P. putida</i> mt-2 en condiciones controladas de laboratorio	164
2. Efecto de la introducción en suelos de la cepa bioluminiscente <i>P. putida</i> S1B1 sobre la supervivencia de cepas bacterianas aisladas de la rizosfera	166
3. Supervivencia de la cepa <i>P. putida</i> KT2442 y su derivado bioluminiscente <i>P. putida</i> S1B1 bajo condiciones medioambientales	167
4. Validación en condiciones ambientales de un sistema activo de contención biológica para la eliminación de contaminantes ambientales	169
5. Sistemas de contención biológica dependientes del exudado de raíz: caracterización del operón del catabolismo de la prolina de <i>P. putida</i> KT2440	172
CONCLUSIONES	177
BIBLIOGRAFÍA	181

INTRODUCCIÓN



1. LA RIZOSFERA.

1.1. El entorno rizosférico.

El término rizosfera, propuesto por Hiltner en 1904, hace referencia a la fracción del suelo en contacto directo con la raíz que se encuentra bajo la influencia biológica y física de la misma (Curl *et al.*, 1986; Lussenhop *et al.*, 1991; Russell, 1977). Este entorno es extremadamente complejo y con una actividad biológica muy intensa (Lynch, 1982; Schipper *et al.*, 1987) donde los microorganismos metabolizan los nutrientes exudados por la raíz (Lynch, 1990; Lynch *et al.*, 1991). La composición de estos exudados depende de la edad de la planta, del estatus fisiológico y de las condiciones ambientales (Barber *et al.*, 1977; Rovira, 1969). Se ha estimado que un 20% o un porcentaje mayor del peso seco de la planta es liberado a través de la raíz (Barber *et al.*, 1976; Hamlen *et al.*, 1972; Vancura, 1988; Whipps, 1987). Este material se compone fundamentalmente por células desprendidas de la raíz (Hawes *et al.*, 1986), mucílagos, exudados y lisados, los cuales contienen aminoácidos, proteínas, azúcares, carbohidratos complejos, alcoholes, vitaminas y hormonas.

Las bacterias de la rizosfera pueden en algunos casos promover la liberación de exudados de la raíz (Barber *et al.*, 1976; Prikryl *et al.*, 1980; Vancura, 1988) a través de la producción de reguladores del crecimiento de plantas, vitaminas, toxinas, enzimas celulíticos u otros compuestos, o a través de la alteración de la disponibilidad de los nutrientes (Klein *et al.*, 1988; Lynch, 1982; Vancura, 1988). Los recursos base en la rizosfera no son sólo complejos desde el punto de vista químico, sino que no están distribuidos homogéneamente (Loper *et al.*, 1984; Lynch, 1990; Lynch *et al.*, 1991).

1.2. Heterogeneidad espacial de la actividad microbiana en la rizosfera.

Las densidades microbianas encontradas en la rizosfera son en general del orden de 10^9 células por g de suelo o raíz (Curl *et al.*, 1986), 100-1000 veces superior a la encontrada en el suelo no rizosférico. Sin embargo, este gran número de microorganismos no debe traducirse como la existencia de gran actividad fisiológica para todos los microorganismos asociados a la rizosfera. Los ecólogos de este hábitat han considerado, desde hace mucho tiempo, que la rizosfera es un medio oligotrófico, donde el crecimiento de los microorganismos está muy limitado por la baja concentración a la que se encuentran las fuentes de carbono disponibles. En general, los microorganismos que habitan la rizosfera se encuentran en fase estacionaria de crecimiento, con baja tasa de división (Bowen *et al.*, 1976).

En la actualidad, se puede encontrar una actividad microbiana relativamente alta en los ápices radicales o en lugares donde comienzan a emerger raíces laterales, donde los microorganismos han recibido un pulso temporal de carbono gracias a los exudados radiculares o los lisados celulares. Estas variaciones espaciales en la disponibilidad de los nutrientes, además de las diferencias en la composición de los compuestos derivados de las plantas en partes distintas de las raíces, pueden condicionar el crecimiento y el cometabolismo de compuestos xenobióticos.

Algunos autores han descrito la existencia de una actividad microbiana relativamente alta en los ápices radiculares o en los lugares de emergencia de las raíces laterales, donde los microorganismos pueden recibir un pulso temporal de carbono gracias a los exudados radiculares o los lisados celulares.

Las diferencias fisiológicas entre zonas diferentes de la raíz también pueden influenciar en la heterogeneidad de la comunidad rizosférica. Los primeros estudios sobre la comunidad microbiana de la rizosfera sugirieron que los *Pseudomonadaceae* son los microorganismos predominantes asociados con las raíces de plantas, constituyendo entre el 30-90% de los organismos cultivables en medios sólidos (Vancura, 1980). Estudios más recientes, donde se han utilizado técnicas que permiten la detección de microorganismos oligotróficos, muestran que existe una gran diversidad en la comunidad de microorganismos asociados con las raíces, y que estas comunidades varían entre diferentes especies de plantas, o incluso, para la misma especie de planta, cultivada en suelos distintos (Laguerre *et al.*, 1996). Las comunidades microbianas asociadas con plantas individuales pueden también diferir de una raíz a otra. Los factores que favorecen esta variabilidad son: el potencial óxido-reducción, el gradiente de difusión de gases, la estructura y transición de las comunidades microbianas en una zona de la raíz que se extiende radialmente desde la superficie de la misma. Otro factor que ejerce una influencia decisiva es la presencia de protozoos y nemátodos, los cuales permiten la renovación de la comunidad microbiana, la liberación del nitrógeno mineralizado de la biomasa microbiana y los cambios en los tipos y cantidades de sustratos que están disponibles para los microorganismos competentes en la rizosfera.

1.3. Introducción de inoculantes bacterianos en la rizosfera.

La introducción de cepas bacterianas en la rizosfera de plantas con fines agrícolas viene realizándose desde hace décadas. Los objetivos perseguidos con estas liberaciones de microorganismos al medio ambiente, que en general se realiza mediante la inoculación de semillas de la planta correspondiente con el microorganismo en cuestión, son

diversos: 1) suplemento de nutrientes a las plantas, como ocurre durante la asociación simbiótica de cepas de *Rhizobium* fijadoras de nitrógeno en las raíces de leguminosas, 2) potenciar el crecimiento vegetal, utilizando las cepas de *Pseudomonas fluorescens*, que producen hormonas vegetales; 3) controlar el ataque de patógenos, mediante el uso de cepas bacterianas productoras de antibióticos y, más recientemente, 4) en la degradación de compuestos contaminantes de carácter xenobiótico.

A continuación se describe más en detalle la utilización de microorganismos en la rizosfera de plantas para la eliminación de contaminantes ambientales, por ser esta práctica agrícola de especial relevancia para esta Tesis Doctoral.

2. DEGRADACIÓN BIOLÓGICA DE CONTAMINANTES ÓRGANICOS EN LA RIZOSFERA.

Las moléculas orgánicas de origen natural son mineralizadas fácilmente, así como los compuestos químicos de origen industrial con una estructura similar a compuestos orgánicos de origen biológico. Sin embargo, algunos **xenobióticos** (compuestos de origen no biológico que poseen elementos estructurales no encontrados normalmente en los compuestos naturales) pueden ser recalcitrantes, o pueden ser transformados en productos recalcitrantes. En términos evolutivos, podría decirse que algunos de estos compuestos químicos de origen industrial están presentes en el entorno desde hace relativamente poco tiempo, de forma que la evolución natural de las rutas catabólicas necesarias para su degradación no se ha producido todavía. En otros casos, la acumulación de compuestos químicos en la biosfera es el resultado de la movilización de grandes cantidades de un compuesto tóxico determinado. Como consecuencia de la acumulación progresiva de contaminantes en la biosfera, surgen entornos hostiles a los sistemas biológicos. Estas reflexiones dejan patente la necesidad de desarrollar y aplicar técnicas que favorezcan la eliminación o detoxificación de estos contaminantes. Por este motivo, la degradación biológica constituye uno de los desafíos más interesantes de investigación en la actualidad, en particular la optimización de las posibilidades biodegradativas de los microorganismos o, en otras palabras, la aceleración de la evolución de actividades catabólicas

Se deben seguir una serie de pasos para la protección del entorno frente a la contaminación: disminución de la producción de compuestos tóxicos y recalcitrantes, sustitución de este tipo de compuestos por otros que sean fácilmente mineralizables, etc. Sin embargo, estos cambios necesitan un tiempo y de una alta inversión. Por otro lado, los efectos nocivos de muchos de estos compuestos no han sido todavía investigados.

Esto hace necesaria la aplicación de una serie de medidas para la eliminación o la detoxificación de estos contaminantes. Una de las estrategias a seguir es la optimización de las posibilidades biodegradativas de los microorganismos, la aceleración de la evolución de nuevas actividades. (Ramos *et al.*, 1994)

La evolución experimental de catabólicas ofrece un potencial considerable para acelerar la evolución de bacterias capaces de degradar compuestos químicos tóxicos de naturaleza industrial. Se han aplicado con éxito varias estrategias para la construcción de bacterias capaces de eliminar un amplio espectro de disolventes orgánicos, como por ejemplo los derivados del tolueno, gran número de compuestos clorados derivados de la actividad industrial (clorobenzoatos y clorofenoles), bifenilos policlorados reactivantes y explosivos, como el 2,4,6-trinitrotolueno (Abril *et al.*, 1989 y Rojo *et al.*, 1987).

Durante los últimos años se han publicado gran cantidad de artículos que apuntan la posibilidad de utilizar sistemas planta-microorganismo para el tratamiento de suelos contaminados (Shimp *et al.*, 1993; Anderson *et al.*, 1995). Previamente, al final de la década de los 70 y principio de los 80, ya aparecieron en la bibliografía estudios esporádicos que demostraban los efectos beneficiosos de las plantas en la degradación biológica de ciertos compuestos orgánicos, como los organofosfatos (Hsu *et al.*, 1979) y paratión (Reddy *et al.*, 1983). A principio de los 90 se recupera el interés por este área de investigación y empieza a aumentar la lista de compuestos orgánicos cuya degradación biológica se ve acelerada por la presencia de plantas, como por ejemplo hidrocarburos aromáticos (Aprill *et al.*, 1990), pentaclorofenol (Ferro *et al.*, 1994) y disolventes orgánicos como el tricloroetileno (Walton *et al.*, 1992).

Hasta la fecha, se conoce muy poco acerca de los mecanismos a través de los cuales las plantas ejercen influencia sobre los organismos degradadores. La aplicación con éxito de sistemas planta-microorganismos contra un amplio espectro de contaminantes requiere un mayor conocimiento de cómo la presencia de la planta ejerce su influencia sobre los microorganismos y de los beneficios y limitaciones del uso de plantas para aumentar la actividad de microorganismos degradadores introducidos como de la población indígena del suelo. La explicación propuesta más común para la influencia de las plantas sobre la biodegradación de compuestos xenobióticos es el incremento general del número de células y de la actividad microbiana que se da en la rizosfera, como el resultado de aporte de fuentes de carbono a través de la liberación de exudados radiculares.

Además de la liberación de estos exudados, las plantas pueden ejercer otro tipo de efectos sobre la comunidad microbiana del suelo que favorezcan la eliminación de contaminantes. En algunos casos, los análogos de algún compuesto xenobiótico contenido

en los exudados radicales podrían seleccionar fortuitamente la proliferación de microorganismos que metabolicen o cometabolizen compuestos xenobióticos. La evapotranspiración del agua por las plantas también podría favorecer el transporte de compuestos solubles por la superficie de la raíz donde podrían ser degradados por la microbiota de la rizosfera. En algunos casos, podría pensarse que la rizosfera no tenga efecto significativo sobre la degradación de ciertos xenobióticos; por ejemplo, si la población degradadora no está presente en el suelo en cuestión o si no son competitivos en la rizosfera, o si estos microorganismos pueden crecer independientemente del sustrato; entonces su presencia en la rizosfera es superflua. La predicción del efecto de la rizosfera para un compuesto específico requiere el conocimiento de sus características químicas, de su ruta degradativa y el conocimiento de la influencia del crecimiento de la raíz de la planta sobre los microorganismos que están involucrados en el proceso degradativo.

En resumen, la predicción del llamado "efecto rizosférico" para la degradación de un compuesto específico requiere el conocimiento de sus características químicas, de su ruta biodegradativa y de la influencia del crecimiento de la raíz de la planta a utilizarse sobre los microorganismos que están involucrados en el proceso degradativo. En la **Tabla 1** se muestran los compuestos orgánicos para los que se ha estudiado hasta la fecha la influencia de la presencia de plantas en la degradación de los mismos.

3. PERMANENCIA DE LOS MICROORGANISMOS INTRODUCIDOS EN EL MEDIOAMBIENTE.

Todas las aplicaciones biotecnológicas de microorganismos manipulados genéticamente en entornos ambientales, no contenidos físicamente, ha generado controversias tanto en la opinión pública como en la comunidad científica. Se posee una cantidad de datos relativamente pequeña acerca de cómo los microorganismos recombinantes sobreviven y se multiplican en el entorno (Ramos *et al.*, 1995), o de cómo es de estable el ADNr, o hasta qué niveles se produce la transferencia del material genético recombinante. Para algunos científicos, el término permanencia implica el establecimiento de un microorganismo a un nivel que asegure la realización de una función específica. Para otros, significa solamente que el microorganismo pueda sobrevivir en el medioambiente a cualquier densidad celular. En cualquier caso, la capacidad del microorganismo para sobrevivir en el entorno y su comportamiento es más importante que la definición exacta de este término.

Tabla 1. Estudios de la degradación de xenobióticos en la rizosfera.

Compuesto	Efecto de la rizosfera	Referencia
Paratión	Aumento de 4 veces de la mineralización.	Reddy y Sethunathan, 1983 Hsu y Bartha, 1979
TCE, tricloroetileno	Incremento pequeño de la mineralización	Walton y Anderson, 1990
3-clorobenzoato	Aumento del nº de degradadores y un menor duración de la fase lag.	Haby y Crowley, 1996
Bifenilo	Aumento de la degradación tras la inserción de los genes <i>bhp</i> en un pseudomonado.	Brazil <i>et al.</i> , 1995
Dicamba (ácido 3, 6-dicloro-2-metoxibenzoico)	Desaparición más rápida de este compuesto en suelos con plantas.	Krueger <i>et al.</i> , 1991
Hidrocarburos poliaromáticos	Mayor grado de desaparición de estos compuestos en suelos con plantas.	Aprill <i>et al.</i> , 1990
Diazanon	Mayor mineralización en suelos con plantas.	Hsu y Bartha, 1979
2,4-diclorofenoxiacético	Mayor proporción de degradadores en la rizosfera de la caña de azúcar	Sandman y Loos, 1984
Fenantreno	No ejerce ningún efecto	Ferroet <i>al.</i> , 1994
Pentaclorofenol	Mayor grado de mineralización	Ferro <i>et al.</i> , 1994
Clordano, hetacloraldina	No ejerce ningún efecto.	Singhet <i>al.</i> , 1991
Atracina	Formación de intermediarios en la rizosfera del maíz. Evidencias de menor grado de mineralización en la rizosfera.	Sieber <i>et al.</i> , 1981, Mandelbaum <i>et al.</i> , 1993. Anderson y Coat, 1995

Desde los primeros años de este siglo, se han introducido varias cepas de *Rhizobium* en áreas agrícolas con el fin de aprovechar los beneficios evidentes de la asociación simbiótica de este microorganismo con las raíces de plantas leguminosas (Stacey, 1985). Diatloff (1977) describió la permanencia en el medio ambiente de dos cepas de *Rhizobium* durante 12 años después de su introducción. Ambas cepas tuvieron un comportamiento estable en los términos de morfología de las colonias, sensibilidades a antibióticos, estudios serológicos y sus propiedades simbióticas. Posteriormente, Brunel y colaboradores (1988) llegaron a las mismas conclusiones. Estos autores liberaron tres cepas de *Bradyrhizobium japonicum* que fueron capaces de sobrevivir en ausencia de sus hospedadores durante 13 años. Estas y posteriores investigaciones hacen esperar un comportamiento similar de otras bacterias gram-negativas liberadas en el medioambiente.

La posibilidad de introducir microorganismos transgénicos en el medioambiente, que podrían sobrevivir y multiplicarse durante largos períodos de tiempo en los entornos donde se han liberado, hace necesario el desarrollo de técnicas de detección más sensibles (Tiedje *et al.*, 1989), especialmente considerando que poblaciones residuales indetectables podrían persistir e influenciar al ecosistema (Levin y Harwell, 1986). Por otro lado, y aunque una pequeña parte de la comunidad científica se dedica a tratar de responder estas cuestiones, también se ha tratado de encontrar soluciones para controlar la supervivencia de los microorganismos liberados al medio ambiente, mediante el diseño de sistemas activos de contención biológica (sistemas ABC). Aunque la contención biológica no es absoluta, puede ayudar a reducir algunas de las incertidumbres asociadas con la liberación de microorganismos.

A continuación, y por ser de especial relevancia para esta Tesis Doctoral, se describen tanto el uso de marcadores para la detección de microorganismos en el medioambiente, como la construcción de cepas bacterianas contenidas biológicamente.

4. SISTEMAS MARCADORES PARA LA DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS EN ENTORNOS MEDIOAMBIENTALES.

Tradicionalmente, el seguimiento de microorganismos introducidos en el medio ambiente se ha venido realizando mediante marcadores de resistencias a determinados antibióticos como sistemas marcadores para el seguimiento de microorganismos (Glandorf, 1992; Haas, 1989; Kasahara y Hattori, 1991; Parkinson *et al.*, 1971). Esta técnica es simple, rápida, sensible y se ha utilizado con éxito en determinados entornos. Sin embargo, esta estrategia de selección posee varios inconvenientes: la existencia en estos entornos de poblaciones resistentes a los antibióticos utilizados, los límites de detección pueden ser demasiados altos (Drahos, 1991a; Dragos, 1991b; Drahos *et al.*, 1986; Ford y Olson, 1988) y la posibilidad de la inestabilidad de estos marcadores a lo largo del tiempo. Sin embargo, algunos mutantes resistentes a algunos antibióticos pueden ser muy estables y similares en todos los fenotipos medidos al tipo parental silvestre no marcado (Brockwell *et al.*, 1977; Glandorf y Mills, 1991; Renwick y Jones, 1985).

Muchos de los problemas asociados con la detección de microorganismos en el entorno vienen dados por la entrada de las células introducidas en estados fisiológicos, que aún siendo viables, no son cultivables (Colwell *et al.*, 1985; Roszak y Colwell, 1987). Estos microorganismos no pueden ser detectados por los métodos de siembra en placa tradicionales (Byrd *et al.*, 1991; Colwell *et al.*, 1985). Esto ha hecho necesaria la búsqueda de marcadores fisiológicos y/o metabólicos.

-lacZ.

Los genes *lacZ* y *lacY* de *Escherichia coli* K-12 codifican la β -galactosidasa y la permeasa de la lactosa, respectivamente. Los microorganismos que expresan estos genes pueden detectarse mediante crecimiento en placas que contengan el compuesto cromogénico X-gal, cuyo producto de degradación desarrolla colonias de color azul. Este sistema se ha utilizado como sistema marcador para *Pseudomonadaceae* fluorescentes, aprovechando el hecho de que estos microorganismos no pueden utilizar lactosa como fuente de carbono por carecer de estos genes. Para ello, los dos genes se insertaron de una manera estable en el cromosoma de una cepa de *Pseudomonas aureofaciens*, mediante la utilización de un derivado de Tn7 (Barry, 1986; Barry, 1988; Barry, 1988; Grinter, 1983).

Las regiones terminales de la inserción Tn7::*lacZY*, que tampoco se han encontrado en entornos edáficos, pueden ser detectadas por PCR e hibridación con ADN extraído directamente del suelo. Mediante el uso de este sistema marcador se han podido detectar hasta 10 UFC por g de suelo (Höfte *et al.*, 1990).

-inaZ.

Este gen codifica una proteína de la membrana externa que interviene en la formación de núcleos de hielo (Lindow *et al.*, 1978; Maki *et al.*, 1974). Loper y Henkels (1992) utilizaron este fenotipo para el desarrollo de un sistema se combinó el recuento en placa de las bacterias del suelo y su detección *in situ*.. La población bacteriana que contiene este gen puede ser estimada por el cálculo del número de núcleos de hielo presentes. El límite de detección por esta técnica está situado en 104 células por raíz (Loper y Henkels, 1992). Una ventaja de este método con el anterior es la posibilidad de la enumeración y estudio de la expresión de este gen sin la necesidad de cultivar estas bacterias.

-xyIE.

Este gen está presente en el plásmido TOL pWW0 de *P. putida* y codifica la catecol 2,3-digoxigenasa. Esta enzima es la responsable de la transformación del catecol (compuesto no coloreado) en un producto amarillo, el semialdehído del ácido hidroximucónico. Este gen se ha utilizado como marcador para el seguimiento en el medio ambiente de un gran número de microorganismos gram-negativos (Winstanley *et al.*, 1989) y, además, a la bacteria gram-positiva *Streptomyces lividans* (Wipat *et al.*, 1991). La actividad digoxigenasa se ha medido en células intactas de muestras medioambientales; sin embargo, no se ha encontrado una relación directa entre el número de células o la biomasa y dicha actividad. El límite de detección, para este sistema, en ecosistemas

acuáticos, donde ha sido utilizado mayoritariamente, está situado en 10^3 UFC por ml (Morgan *et al.*, 1989).

-2,4-diclorofenoxiacetato monooxigenasa.

Esta enzima permite la conversión del fenoxiacetato en fenol. King y colaboradores (1991) construyeron cepas de *Pseudomonas aureoginosa* y *P. putida* portadoras de plásmidos que contenían el gen responsable de esta actividad. Las colonias de cepas portadoras de este gen pueden detectarse como se detalla a continuación: en primer lugar se añade fenoxiacetato sobre las colonias a analizar con la ayuda de un atomizador, la incubación durante 1 hora permite la producción de fenol. Posteriormente, se adiciona por atomizado ferrocianida potásica y después este compuesto más 4-aminoantipirina. Bajo condiciones alcalinas, este último compuesto se condensa con el fenol para la producción de una antipirina de color rojo. La utilización de este método permite un límite de detección de aproximadamente 10^3 UFC por ml. Sólo puede ser utilizado en células incapaces de metabolizar fenol.

-Proteína de la fluorescencia verde (Gfp).

Esta proteína de 238 aminoácidos (27 Kdaltons) codificada por el gen *gfp* (del inglés, Green Fluorescent Protein), de la medusa amarilla *Aequorea victoria*, emite luz de fluorescencia verde tras la excitación con luz azul (Prasher *et al.*, 1992). El fluoróforo se produce por la ciclación autocatalítica de tres residuos de la proteína (serina-65, dehidrotirosina-66 y glicina-67) (Cody *et al.*, 1993; Shimomura, 1979) y se forma en presencia de una molécula de O_2 . (Heim *et al.*, 1994). Esta proteína se ha utilizado para la visualización de la expresión de genes y para la localización subcelular de proteínas en un amplio espectro de organismos (*E. coli*, *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster*) (Chalfie *et al.*, 1994; Wang y Hazelrigg, 1994).

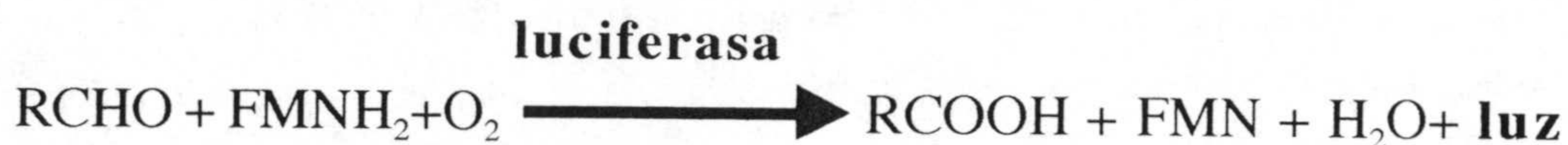
-Bioluminiscencia.

La construcción de sistemas marcadores basados en la bioluminiscencia conlleva la introducción de los genes para la emisión de luz. Estos genes clonados bien de las bacterias marinas *Vibrio fischeri* o *Vibrio harveyi* (genes *lux*), bien de organismos eucariotas tipo luciérnagas (genes *luc*). Hastings y colaboradores (1985), Meighen (1988, 1991), Silverman y colaboradores (1989) y Stewart y Williams (1992) han descrito extensamente la biología molecular y la bioquímica de la producción de luz por estas cepas bacterianas. En la actualidad se dispone de una amplia gama de vectores y minitransposones que contienen estos genes, lo que permite el marcaje de microorganismos y el seguimiento de los mismos en el medioambiente sin necesidad de

extracción. Esta técnica es particularmente valiosa en entornos terrestres y aguas dulces donde no existen otros organismos productores de bioluminiscencia (Schmidt *et al.*, 1989). La producción de luz a partir de microorganismos marcados con los genes *luc* se ha utilizado con éxito para la detección de *Rhizobium meliloti* (Palomares *et al.*, 1989).

La reacción de la bioluminiscencia bacteriana es el resultado de la actividad del enzima luciferasa que requiere una fuente reductora, oxígeno y el sustrato n-tetradecilaldehído, aunque también actúan como sustratos otros aldehídos grasos de larga cadena como el dodecanal o el decanal.

La reacción de producción de luz por estos microorganismos es la siguiente:



Los genes estructurales del enzima luciferasa, *luxA* y *luxB*, tienen un tamaño de 2Kb. Los genes *luxI* y *R* están involucrados en la regulación de la producción de luciferasa y operan a través de un mecanismo de autoinducción. Los genes *luxC, D* y *E* codifican la reductasa de ácidos grasos para la síntesis del sustrato aldehídico. Existen otros genes en este operón de función desconocida (**Figura 1**) (Meighen, 1991).

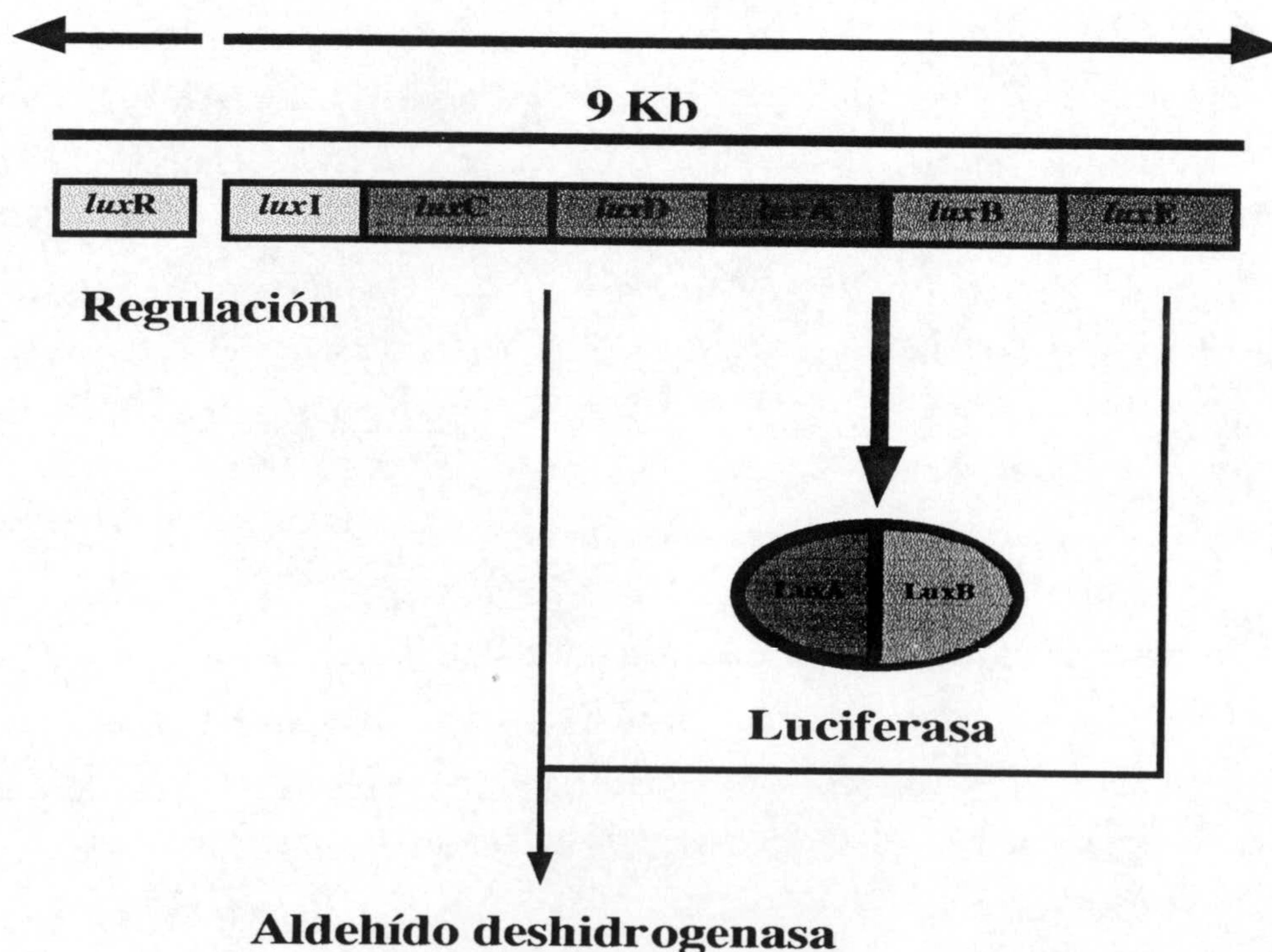


Figura 2. Organización estructural y funcional del operón *lux* de *Vibrio harveyi*. En esta figura se muestra la organización genética del operón de la producción de bioluminiscencia de *V. Harveyi*, así como el sentido de la transcripción de los genes que lo componen y sus productos génicos.

La luz producida por estos sistemas es suficiente para la detección de colonias a simple vista en la oscuridad. Se han empleado estos sistemas para la localización *in situ* de organismos marcados. Shaw y Kado (1986) siguieron visualmente y por luminometría la infección de tubérculos de patata por *Erwinia carotovora*. Estos autores detectaron además la bioluminiscencia producida por *Xanthomonas campestris* marcada con este sistema, durante la infección de hojas de coliflor mediante la exposición de estas hojas a películas de rayos X. Fravel y colaboradores (1990) utilizaron este sistema para la detección de una cepa de *Enterobacter cloacae*, portadora del sistema luminiscente en un plásmido, en la rizosfera y encontraron una correlación entre la concentración de células viables y la producción de bioluminiscencia. Posteriormente, esta técnica se empleó para el estudio de la colonización de tejidos por *Salmonella typhimurium* (Contag *et al.*, 1995) y en la colonización de raíces de plantas por los agentes biocontroles potenciales *Pseudomonas fluorescens* (de Weger *et al.*, 1991), *Xanthomonas campestris* (Shaw *et al.*, 1992) y *Enterobacter cloacae* (Rattray *et al.*, 1995)

Estos genes se han utilizado además para la detección de naftaleno en suelo (King *et al.*, 1990) mediante el uso de cepas de *Pseudomonadaceae* marcados solamente con los genes estructurales del enzima luciferasa (*luxA,B*). En este caso, se necesitó la adición del compuesto aldehídico y el nivel mínimo de detección fue de 10^3 - 10^4 UFC por cm de raíz (1000 veces superior al obtenido por los sistemas de marcado con los genes *lacZ,Y*). Otras utilidades de este sistema fueron la cuantificación del crecimiento de biofilms de *P. fluorescens* (Mittelman *et al.*, 1992) y el estudio de las interacciones planta-*Bradyrhizobium japonicum* (O'Kane *et al.*, 1988) y planta-*Rhizobium leguminosarum* (Chabot *et al.*, 1996).

5. SISTEMAS DE ACTIVOS DE CONTENCIÓN BIOLÓGICA.

En el laboratorio, la supervivencia de los microorganismos puede controlarse fácilmente mediante biológicos como físicos. Por el contrario, en el medioambiente se hace necesario encontrar vías para controlar la vida y la muerte microbiana en condiciones donde agentes selectivos exógenos no pueden ser realmente aplicados. La solución, en esencia, sería la construcción de microorganismos capaces de destruirse a sí mismos mediante la expresión de genes *matadores o suicidas* cuando la función para la que han sido liberados se haya realizado. Este tipo de sistemas se conoce con el nombre de sistemas activos de contención biológica (sistemas ABC)

Los sistemas ABC constan de dos elementos: un elemento *matador*, responsable de la muerte celular, y un elemento control que activa la función *matadora* bajo condiciones definidas.

5.1. Genes matadores.

Un elemento matador ideal debe en primer lugar ser universal, en otras palabras que induzca la muerte de un amplio espectro de microorganismos. Por otro lado, una vez activada la función matadora, la muerte celular debe ser rápida y los efectos deben ser específicos para el microorganismo. Además, el segmento genético insertado que contenga la función *matadora*, debe ser estable; de esta manera se minimiza la posibilidad de aparición de formas resistentes.

La familia de genes *hok* (Host Killing) (**Tabla 2**) cumple la mayoría de estos requisitos. Estos genes son pequeños y están disponibles en una gran variedad de vectores y minitrasposones, que pueden ser utilizados en un amplio abanico de bacterias gram-negativas y en *Bacillus subtilis*. Las proteínas codificadas por estos genes son altamente eficientes en la inducción de la muerte celular, incluso en pequeñas cantidades. Al menos tres genes pertenecientes a esta familia se han utilizado en la construcción de sistemas de contención biológica: el gen *hok* del plásmido R1 de *Escherichia coli* y los genes cromosómicos de *E. coli* K12 *relF* y *gef* (Molin *et al.*, 1993). Las proteínas codificadas por estos genes son polipéptidos homólogos de aproximadamente 52 aminoácidos. La proteína Hok está involucrada en el mantenimiento de la cepa hospedadora del plásmido de bajo número de copias R1, sin embargo, la función fisiológica de RelF o de Gef es desconocida. Tras la división celular, se induce la síntesis de Hok en las células hijas carentes del plásmido R1, la proteína *matadora* se inserta en la membrana celular de forma similar a las porinas, el potencial de membrana se colapsa y la ARNasa periplásmica se libera al citoplasma degradando los ácidos nucleicos. Como consecuencia de esta cadena de acontecimientos, se produce la muerte celular (Poulsen *et al.*, 1989).

Otra porina utilizada con éxito en la construcción de sistemas de contención biológica es la proteína de lisis del bacteriófago ϕ X174, codificada por el gen *E* (Ronchel *et al.*, 1998). Tras la síntesis, la proteína E se oligomeriza formando un tunel que atraviesa la membrana celular y, como consecuencia, el material citoplasmático se libera al exterior conduciendo a la muerte celular (Witte *et al.*, 1990)

Una vía totalmente distinta para la inducción de la muerte bacteriana utilizada en contención biológica consiste en el ataque directo a los ácidos nucleicos por las nucleasas. De entre ellas, se han utilizado con éxito las endonucleasas de ADN y ARN sintetizadas y excretadas por *Serratia marcescens* y *Staphylococcus aureus* (A. K. Bej y S. Molin, resultados no publicados), así como la colicina E3, que posee actividad ARNasa actuando sobre el extremo 3' del ARN procariótico 16S (Díaz *et al.*, 1994).

Tabla 2. Genes suicidas pertenecientes a la familia *hok*.

Gen	Localización	Referencia
<i>hok</i>	Plásmido R1	Gerdes <i>et al.</i> , 1986
<i>srnB</i>	Plásmido F	Thisted <i>et al.</i> , 1995
<i>flm</i>	Plásmido F	Loh <i>et al.</i> , 1988
<i>pnd</i>	Plásmido R16, R64 y R482	Nielsen y Gerdes, 1995
<i>relF</i>	Cromosoma de <i>E. coli</i> K12	Poulsen <i>et al.</i> , 1989
<i>gef</i>	Cromosoma de <i>E. coli</i> K12	Poulsen <i>et al.</i> , 1989
<i>hokA</i>	Cromosoma de <i>E. coli</i> K12	Pedersen y Gerdes, 1996
<i>hokB</i>	Cromosoma de <i>Hafnia alvei</i>	Pedersen y Gerdes, 1996

5.2. Control del suicidio bacteriano.

En el laboratorio, el sistema de control de la muerte bacteriana utilizado más frecuentemente se basa en la fusión de un gen *suicida* al promotor del operón de la lactosa (P_{lac}), cuya expresión se reprime por la proteína LacI. En presencia de lactosa o del análogo de la misma isopropiltiogalactóxido (IPTG), la proteína LacI se libera del promotor P_{lac} y éste se expresa libremente. Sin embargo, en el medio ambiente no sería práctico, ni económico, controlar la supervivencia de microorganismos liberados intencionadamente utilizando una señal química exógena. El control de la muerte celular a través de compuestos presentes en el medioambiente, o a través de cambios en las condiciones físicas del entorno (por ejemplo: temperatura, humedad, etc.) resultaría más conveniente.

Se han descrito estrategias de contención biológica para la eliminación de microorganismos inmediatamente después de la liberación de éstos al medio ambiente. Molin y colaboradores (1987) construyeron una cepa de *E. coli* la que el gen *hok* se clonó bajo el control del promotor del operón de biosíntesis de triptófano. En el laboratorio, la expresión del gen *suicida* puede reprimirse añadiendo triptófano al medio de cultivo. Por el contrario, cuando las células son liberadas al medio ambiente, donde el triptófano es prácticamente inexistente, la expresión del gen *hok* se desreprime conduciendo a la muerte celular.

El sistema descrito anteriormente, aunque eficiente, no podría utilizarse cuando se desea que los microorganismos persistan en el medio ambiente hasta que se haya concluido la función para la que han sido diseñados. La estrategia idónea consistiría en lo siguiente: analizar la función que debe cumplir el microorganismo en el medio ambiente, definir los cambios que deben producirse una vez terminada la función y diseñar el

elemento de control que responda de la forma más adecuada a estos cambios. En los apartados siguientes se ilustra esta estrategia en el ámbito de la biodegradación:

5.3. Bacterias suicidas para la eliminación de alquilbenzoatos.

Las bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* poseen una gran versatilidad metabólica y son capaces de mineralizar una amplia variedad de compuestos aromáticos. En muchos casos, los enzimas implicados en el metabolismo de estos compuestos son codificados por genes plasmídicos, razón por la cual esta información se ha propagado eficientemente en la naturaleza.

El plásmido TOL (pWW0) de *Pseudomonas putida* (Williams y Murray, 1974) se considera el plásmido arquetipo de degradación de tolueno y porta la información genética necesaria para la degradación de éste y otros alquilbencenos. *P. putida* (pWW0) utiliza como fuente de carbono y energía para su crecimiento tolueno, *m*- y *p*-xileno, *m*-etilolueno y 1,2,4-trimetilbenceno (Worsey y Williams, 1975). En primer lugar, los hidrocarburos se oxidan hasta sus correspondientes ácidos carboxílicos (benzoatos) en una serie de reacciones que constituyen la denominada ruta *upper*. Posteriormente, los benzoatos se oxidan vía catecol a los intermediarios del ciclo de Krebs a través de la llamada ruta *meta* (**Figura 2A**). Los enzimas correspondientes a cada una de estas dos rutas están codificados por dos operones diferentes, el *upper* y el *meta*, regulados por las proteínas XylR y XylS, respectivamente (Harayama y Timmis, 1989; Marqués y Ramos, 1993) (**Figura 2B**). El operón *meta*, uno de los más extensos descritos hasta la fecha en procariotas, consta de 13 genes cuya transcripción es activada por el regulador XylS a partir del promotor P_m en presencia de benzoato o derivados sustituidos (**Figura 2B**).

El grupo de Degradación de Tóxicos Orgánicos de la Estación Experimental del Zaidín ha construido cepas contenidas biológicamente derivadas de *P. putida* KT2440 capaces de degradar alquilbenzoatos. El sistema de contención biológica consta de dos elementos: un elemento matador y un elemento regulador de la expresión del elemento matador (Contreras *et al.*, 1991; Ronchel *et al.*, 1995). El elemento matador se basa en el gen *gef* de *E. coli*. La expresión de este gen se encuentra bajo el control del promotor sintético $P_{A1-04-03}$ (P_{lac}) (Bujard *et al.*, 1987). El elemento regulador se basa en el regulador XylS y en una fusión del gen *lacI* de *E. coli* al promotor P_m de la ruta *meta* del plásmido TOL (pWW0) de *P. putida*.

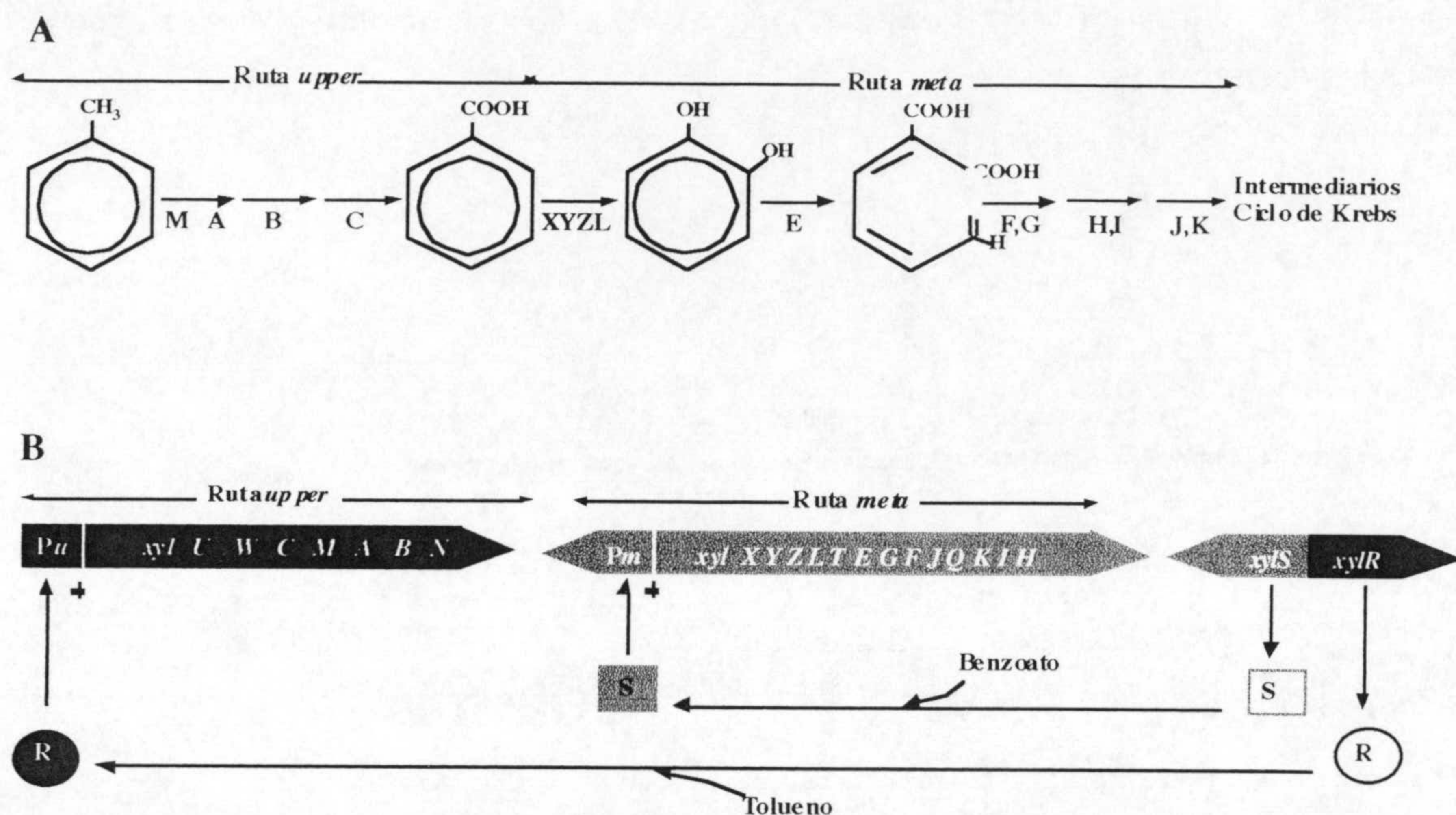


Figura 2. Rutas metabólicas codificadas por el plásmido TOL (pWW0) de *P. putida*. Los enzimas implicados (A) son los siguientes: MA, tolueno monooxigenasa; B, alcohol benzílico deshidrogenasa; C, benzaldehído deshidrogenasa; XYZ, toluato 1,2-dioxigenasa; L, 1,2-dihidroxi-ciclohexadieno 1-carboxilato deshidrogenasa; E, catecol 2,3-dioxigenasa; F, semialdehído 2-hidroximucónico hidrolasa; G, semialdehído 2-mucónico deshidrogenasa; H, oxalacetoato tautómera; J, 2-hidroxi-2,4-pentadienoato hidratasa; K, 4-hidroxi-2-oxoalacetoato hidrolasa. La sección B de esta figura muestra la parte de la regulación de las rutas biodegradativas del plásmido TOL más relevante para el diseño del sistema de contención biológica. La activación ejercida por cada proteína sobre los promotores correspondientes se indica con el signo "+". Los símbolos abiertos y cerrados muestran las proteínas XylS (S) y XylR (R), inactivas y activadas por la presencia de efectores, respectivamente

El modelo mostrado en la **Figura 3** predice que en presencia de efectores de la proteína XylS, un amplio espectro de alquil, cloro, y otros benzoatos halosustituidos (Ramos et al., 1986), la expresión de la proteína Gef no se produce y la célula sobrevive degradando el compuesto contaminante. Una vez que dicho compuesto desaparece del entorno o la cepa coloniza un espacio no contaminado el promotor P_m deja de ser inducido, esto produce la ausencia de proteína LacI en la célula hospedadora; el gen *gef* es capaz de expresarse y, como consecuencia de todo esto, la célula muere.

La funcionalidad del sistema en respuesta a señales químicas se determinó primero en *E. coli* (Contreras et al., 1991) y, posteriormente, el sistema se transfirió a *P. putida*. Se construyeron dos cepas contenidas de *P. putida*: *P. putida* EEZ30 que contenía el elemento matador en un mini-Tn5 integrado en el cromosoma (Jensen et al., 1993), y el elemento control (*xylS*, $P_m::lacI$) en el plásmido de amplio espectro de huésped pCC102 (Ronchel et al., 1995); y *P. putida* CMC4 que contiene ambos elementos en un mini-Tn5 integrado en el cromosoma (Ronchel, 1997) (**Figura 4**). La cepa *P. putida* EEZ32, que contenía el elemento regulador en el plásmido pCC102 y un mini-Tn5 carente del gen

suicida integrado en el cromosoma (Ronchel *et al.*, 1995), se utilizó como control en todos los ensayos.

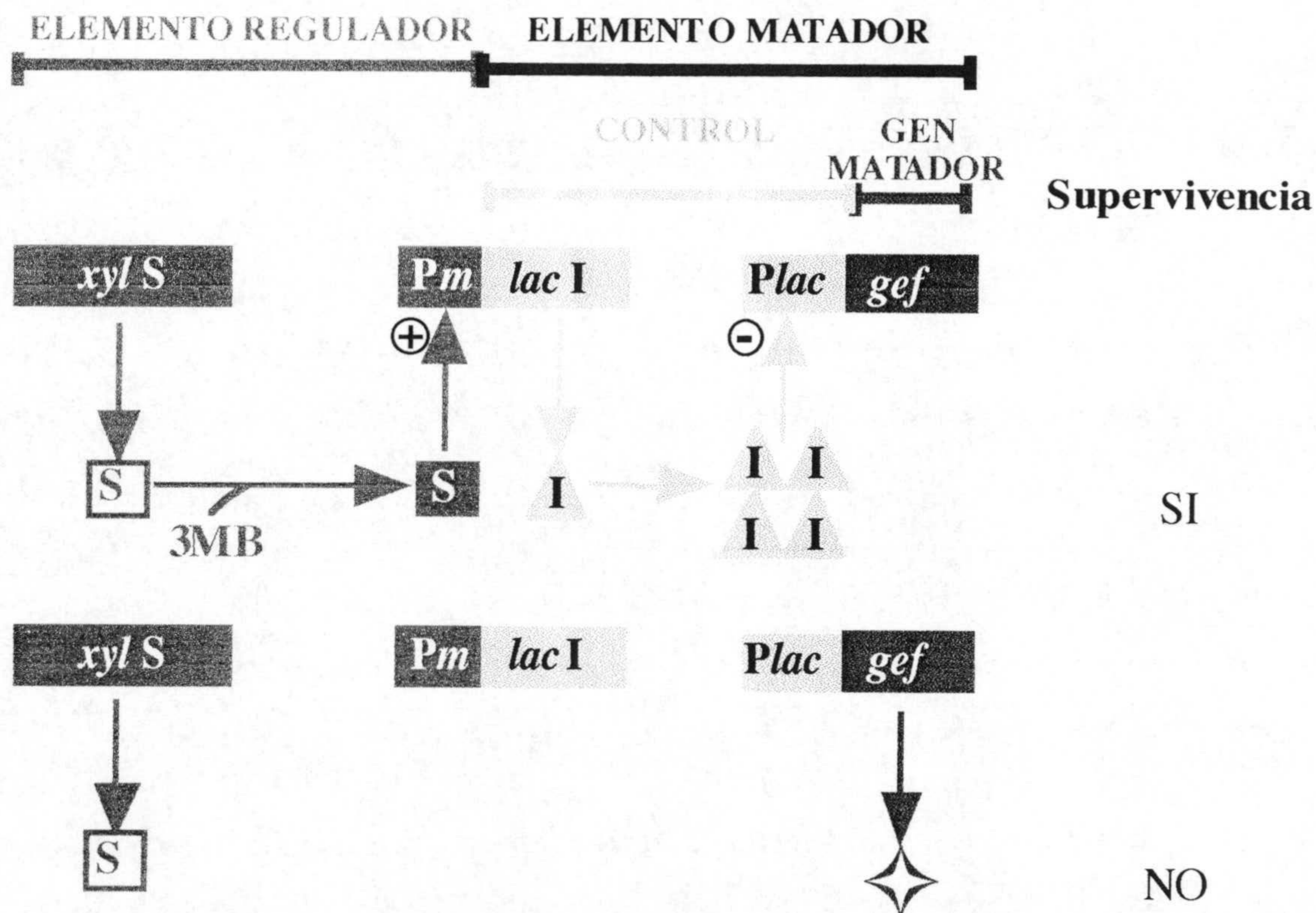


Figura 4. Sistema de contención biológica para bacterias que degradan alquilbenzoatos. El gen *xylS* se expresa constitutivamente a bajo nivel, sintetizándose un regulador inactivo XylS (S). En presencia de 3-metilbenzoato (3MB), u otro efector, XylS se activa y estimula la transcripción desde el promotor P_m , expresándose el represor LacI (I) que forma tetrámeros que inhiben la transcripción desde el promotor P_{lac} , no se produce la expresión de la proteína Gef y la cepa sobrevive degradando el contaminante. La desaparición de dicho compuesto provoca la falta de inducción del promotor P_m , lo cual provoca la ausencia de la proteína LacI en la célula hospedadora; se produce la expresión de la proteína letal y la célula muere.



Cepas de <i>P. putida</i>	Elemento matador	Elemento control
EEZ32		Plásmido pCC102 (<i>XylS</i> , <i>P_m::lacI</i> , <i>Km^R</i>)
CMC4		

Figura 5. Elemento matador y elemento control de la cepa de *P. putida* contenida biológicamente utilizada en este trabajo, *P. putida* CMC4; y su control *P. putida* EEZ32. Tc^R y Km^R , genes codificadores de resistencia a tetraciclina y a kanamicina, respectivamente. Los rectángulos negros muestran los bordes de los mini-transposones integrados en el cromosoma de cada cepa.

Ronchel y colaboradores (1995) demostraron que el sistema de contención biológica fue funcional tanto en condiciones controladas de cultivo en el laboratorio, como en ecosistemas edáficos constituidos por suelos agrícolas y microcosmos acuáticos constituidos por aguas cristalinas del río Maitenas (Güejar Sierra, Granada), y aguas saladas del Océano Atlántico (El Rompido, Huelva). Como se describe en el apartado de *Resultados*, en este trabajo se ha realizado el paso siguiente en el estudio de este sistema, que ha consistido en la realización de la primera liberación controlada mundial de bacterias portadoras de un sistema de contención biológica al medio ambiente.

5.4. Bacterias suicidas en la rizosfera de plantas.

Como ya se ha mencionado anteriormente, la rizosfera de las plantas constituye un ecosistema complejo, donde el suplemento continuo de nutrientes a baja concentración vía exudados radiculares, estimula el crecimiento bacteriano (Dowlin y O'Gara, 1994). Además en la rizosfera se aceleran algunos procesos biodegradativos microbianos. Por ejemplo, la eliminación de compuestos aromáticos por *P. putida* se realiza a mayor velocidad en sistemas con plantas que en sistemas desnudos (C. Ramos, datos no publicados).

Desde un punto de vista comercial, el uso de bacterias recombinantes en la rizosfera de plantas, como agentes de control biológico frente a distintas plagas y como promotores del crecimiento de plantas, requeriría diseñar sistemas de contención biológica que permitan controlar la población bacteriana para prevenir su dispersión al medioambiente fuera de la rizosfera. En este caso, a diferencia del sistema de contención dependiente de 3-metilbenzoato descrito anteriormente, en el cual la concentración de un compuesto concreto determina la vida o la muerte del microorganismo portador de dicho

sistema, las señales que modulan las interacciones entre las plantas y los microorganismos son complejas y poco conocidas. Sin embargo, existen estrategias generales que podrían aplicarse en el control biológico de microorganismos de interés agrícola. Cuando un microorganismo abandona la rizosfera de una planta, se desencadenan una serie de respuestas a distintos estreses (carencia de elementos nutricionales, gradientes de pH, cambios de temperatura, etc.). Los genes codificadores de las proteínas involucradas en este tipo de respuestas, tales como las implicadas en la esporulación de algunas bacterias gram-positivas o en los cambios morfológicos y metabólicos que se producen en algunas gram-negativas, podrían fusionarse a un gen matador para la conformación de un sistema de contención biológica dependiente de la raíz de plantas.

Un conocimiento más profundo de la ecología microbiana y de las relaciones simbióticas permitiría definir con mayor precisión la supervivencia de bacterias asociadas a ciertas partes específicas de plantas. Se han identificado ciertos genes que responden a los exudados de la raíz y se han descubierto algunos de los compuestos específicos que son responsables de la regulación de la expresión genética de los mismos (Oberbeek y Van Elsas, 1995). De hecho, la inserción de genes suicidas en un circuito control que incluya señales de plantas es posible. En estos sistemas, las células que escapen del entorno influenciado por la señal producida por la planta estarían condenadas a la muerte.

Como se describe en el apartado de *Resultados*, en este trabajo se describen los experimentos preliminares de la construcción de un sistema de contención biológica dependiente del exudado de la raíz de plantas. La señal seleccionada fue la presencia del aminoácido prolina en el exudado radicular, por tratarse de uno de los aminoácidos más abundantes en dichos exudados y es utilizado de una manera óptima como fuente de carbono y/o nitrógeno por cepas de *P. putida* derivadas de *P. putida* mt-2 (C. Ramos, datos no publicados). En este trabajo se ha llevado a cabo la clonación, secuenciación y caracterización preliminar de los genes implicados en el metabolismo de la prolina de *P. putida* KT2442. El futuro diseño de sistemas de contención biológica activa que permitan la supervivencia de las cepas portadoras en presencia de prolina o exudado de la raíz, y conlleven a la muerte celular en ausencia de este aminoácido se lleva a cabo en la actualidad por la tesisnanda Susana Vílchez Tornero en el grupo de Degradación de Tóxicos Orgánicos dentro de la Estación Experimental del Zaidín CSIC-Granada).

6. GENES DE LA DEGRADACIÓN DE PROLINA EN PROCARIOTAS.

6.1. Organización genética y bioquímica de la degradación de la prolina.

Los dos genes requeridos para la utilización de la prolina exógena como fuente de carbono y nitrógeno (genes *put*) están localizados en el minuto 22 de los mapas genéticos de *Salmonella typhimurium* (Sanderson y Roth, 1983) y de *Escherichia coli* K12 (Bachmann, 1981). El gen *putP* codifica la mayor permeasa para la prolina, una proteína integral de membrana de aproximadamente 35kDa (Chen y Maloy, 1991; Graham et al., 1984; Hanada et al., 1985; Hahn y Maloy, 1988; Menzel y Roth, 1981) que cataliza el cotrasporte tipo simporte sodio-prolina a través de la membrana citoplasmática (Cairney et al., 1984; Chen et al., 1985 y Ratzkin y Roth, 1978). La K_m para la entrada de prolina por este sistema es de 2 μ M (Wood y Zadworny, 1979). Además, existen dos sistemas de transporte de betaínas que también pueden transportar prolina (Cairney et al., 1985; Cairney et al., 1985), una permeasa de baja afinidad (K_m , 300 μ M) codificada por el gen *proP* y una permeasa codificada por el gen *proU* que es inducida por alta osmolaridad (Csonka, 1982).

La degradación del aminoácido prolina a glutamato, en organismos procariotas (Maloy, 1987) y en las mitocondrias de organismos eucariotas (Hayward et al., 1993; Wang y Brandiss, 1987), es llevada a cabo por dos enzimas; la prolina deshidrogenasa (PHD; E.C. 1.5.99.8) y la 1-pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa (P5CDH; E.C. 1.5.1.12). Sin embargo, mientras que en eucariotas son dos genes distintos los que codifican la PHD y la P5CDH, *put1* y *put2* respectivamente (Krywicky y Brandiss, 1984; Wang y Brandiss, 1987), en Enterobacterias (Allen et al., 1993; Ling et al., 1994; Xia et al., 1995), *Rhodobacter capsulatus* (Keuntje et al., 1995), *Bradyrhizobium japonicum* (Straub et al., 1996) y *Rhizobium meliloti* (Jiménez-Zurdo et al., 1997) es un único péptido de 135 kDa (Chen y Maloy, 1991; Graham et al., 1984; Hanada et al., 1985; Hahn y Maloy, 1988; Menzel y Roth, 1981), codificado por el gen *putA*, el que cataliza estos dos pasos para la degradación de la prolina. La reacción catalizada por la prolina deshidrogenasa acopla la oxidación de prolina con la reducción de un cofactor flavín adenina dinucleótido (FAD) fuertemente asociado a la proteína PutA (Brown y Wood, 1993; Menzel y Roth, 1981). La 1-pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa acopla la oxidación de la 1-pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa con la reducción de NAD⁺. Además de estas actividades catalíticas, la proteína PutA es un regulador transcripcional que reprime la expresión de los genes *put* en ausencia de prolina.

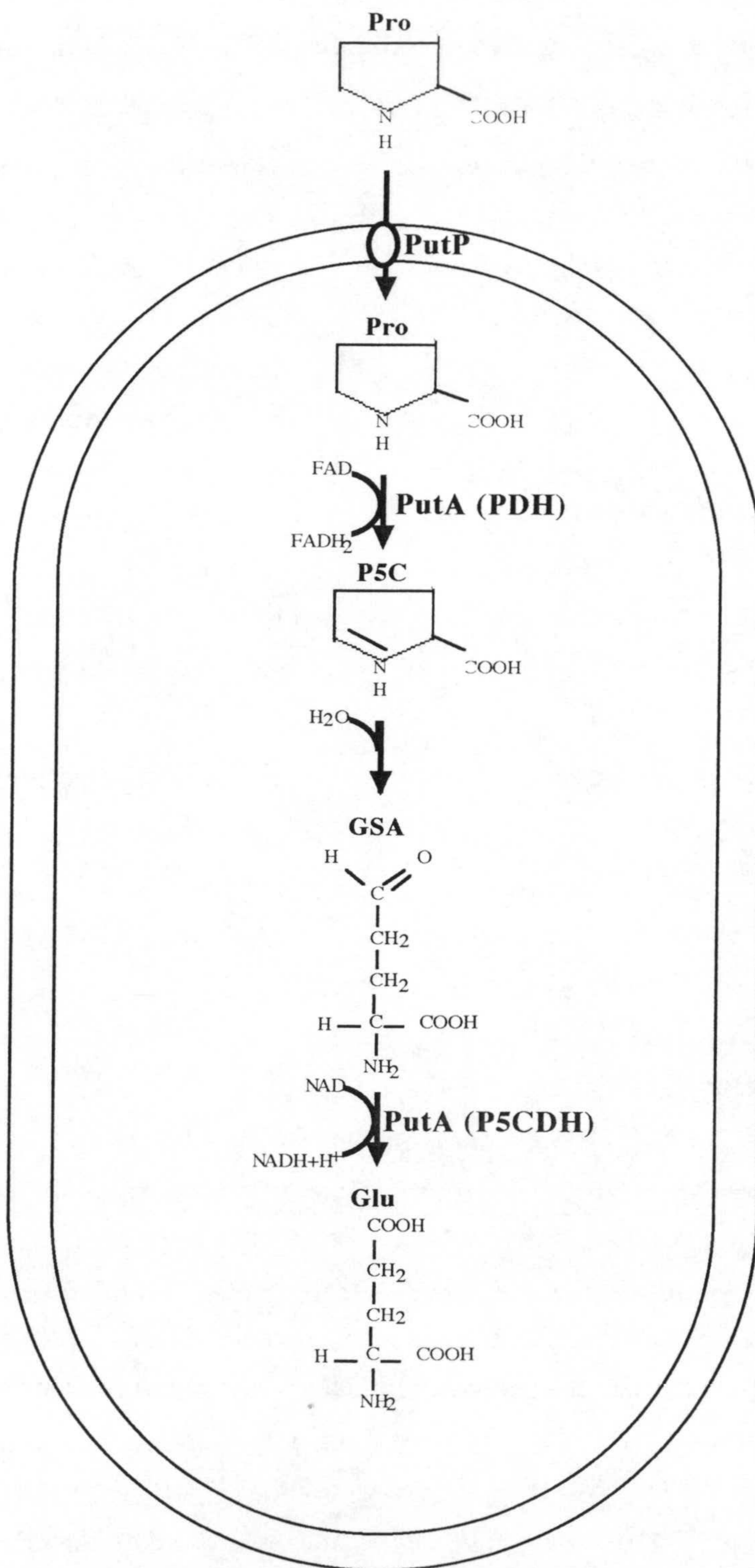


Figura 5. Bioquímica de la degradación de la prolina hasta glutamato. Se muestra tanto la ruta del catabolismo de la prolina (Pro) hasta glutamato (Glu), así como el papel desempeñado por cada uno de las actividades codificadas por los genes que constituyen el operón *put*. P5C, pirrolina-5-carboxilato; GSA, semialdehído del ácido glutámico. El papel y la nomenclatura de los productos genéticos de este operón se describe en el texto.

6.2. Regulación de los genes del catabolismo de la prolina.

Los genes *putA* y *putP* forman un operón (Hanh y Maloy, 1986) y se transcriben divergentemente (Maloy y Roth, 1983) a partir de una región de aproximadamente 400 pb (Nakao *et al.*, 1987) que corresponde a la región reguladora. Esta región contiene en *E. coli* K12 una zona promotora para el gen *putA*, un sitio potencial de unión para adenosín monofosfato cíclico (AMP) y 5 promotores potenciales para *putP* (*putPp1-putPp5*) (Nakao *et al.*, 1987). En *S. typhimurium* se han identificado sólo dos promotores, *putAp* y *putPp*, separados por 30 pb y que solapan con el operador *putPAo* (Maloy y Roth, 1983; Hahn y Maloy, 1986)

En ausencia de prolina, la proteína PutA se une específicamente al sitio operador de la región reguladora *put* (Brown y Wood, 1993; de Ostrovsky *et al.*, 1991). Se ha propuesto el siguiente modelo para explicar como la proteína PutA autorregula su propia expresión (**Figura 6**). En ausencia de prolina, esta proteína permanece en el citoplasma, donde se une a los operadores, evitando la expresión de los genes *put*. Para este efecto represor parecen ser necesarios factores adicionales puesto la proteína PutA purificada no reprime la transcripción desde la región control. El factor "anfitrión de integración" (IHF) parece ser un posible candidato (O'Brien *et al.*, 1992) debido a que en la región control *put* aparecen sitios muy similares a los sitios consenso *ihf* (Friedman 1988; Goodrich *et al.*, 1990; Kur *et al.*, 1989). IHF es una proteína similar a las histonas que consta de dos subunidades codificadas por el gen *himA* (Miller, 1984) y el gen *himD* (Flamm y Weisberg, 1985) que intervienen, además de la lisogenización por el fago λ , en muchos procesos celulares (Friedman, 1988).

Cuando se dispone de una cantidad suficiente de prolina, la proteína PutA se une a este aminoácido y se asocia funcionalmente con la cadena de transporte de electrones en la membrana citoplasmática, donde es activa enzimáticamente (Ekena *et al.*, 1990). La disminución resultante en los niveles de PutA libera la expresión de los operadores, conllevando a la expresión de los genes *put* (Maloy, 1987; Maloy y Stewart, 1993). La plena inducción del operón *put* requiere la presencia de oxígeno u otro aceptor final de electrones (Maloy y Roth, 1983), además de la proteína receptora de adenosín monofosfato (AMP) y de AMP cíclico (Hahn y Maloy, 1986; Maloy y Roth, 1983).

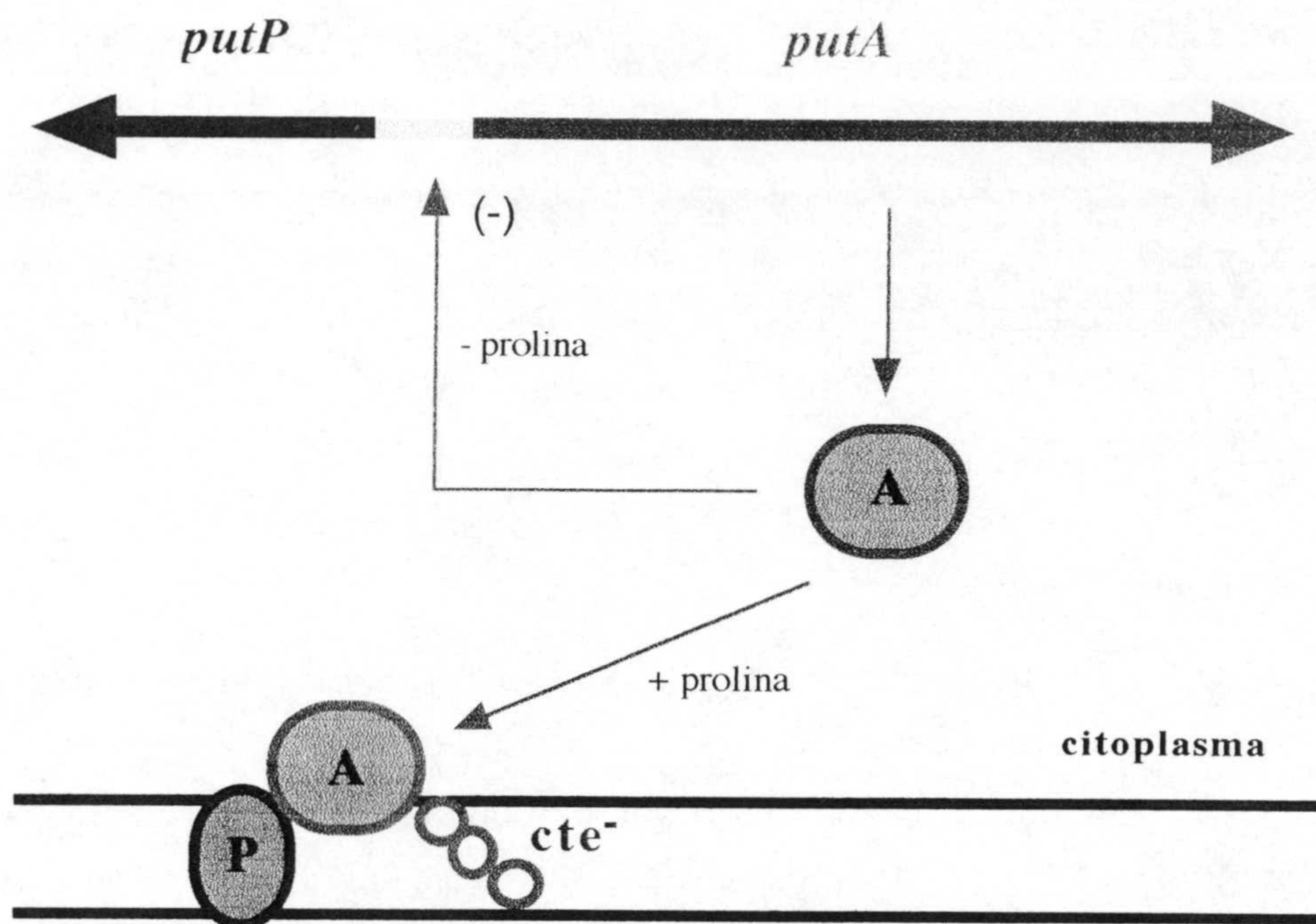
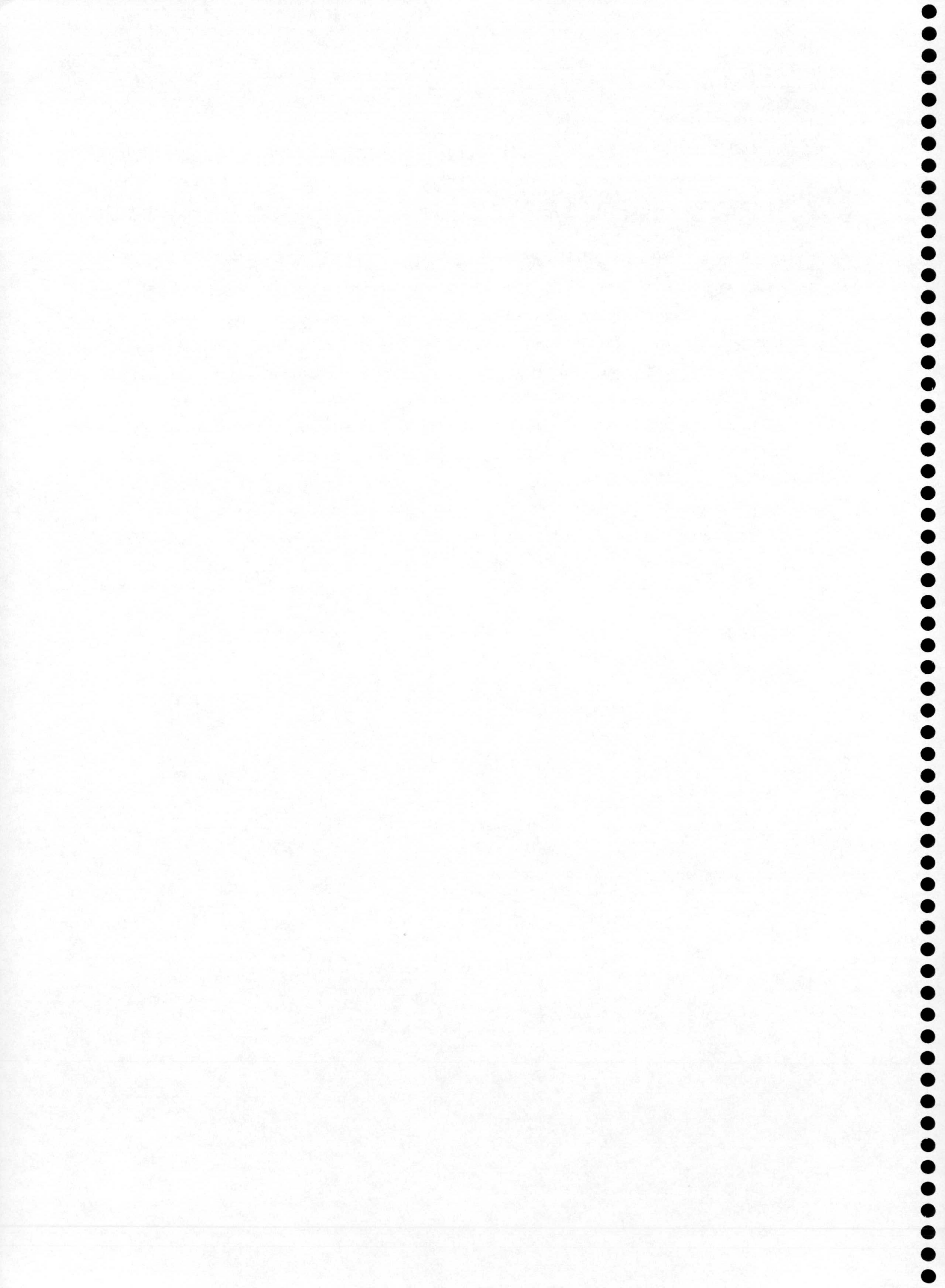


Figura 6. Modelo de regulación del operón *put* por la proteína PutA. En ausencia de prolina, la proteína PutA (A) permanece en el citoplasma y se une al ADN en la zona reguladora del operón del catabolismo de la prolina reprimiendo la transcripción de dicho operón. En presencia de prolina, PutA se asocia con la membrana para llevar a cabo la degradación de la prolina, este hecho provoca la inducción de los genes *put*. Cte^- , cadena transportadora de electrones; P, producto del gen *putP*.

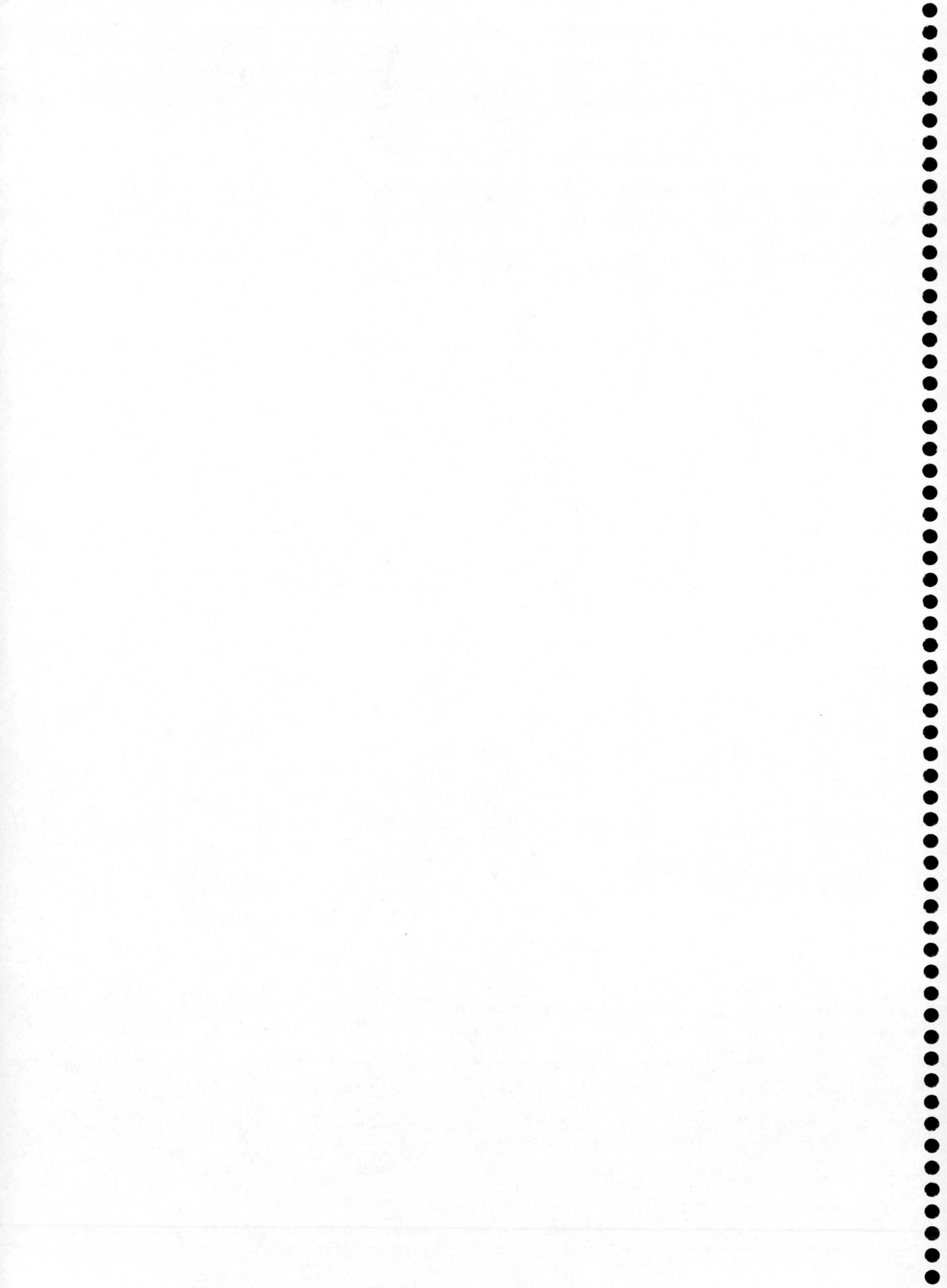
El mecanismo de la regulación mediada por PutA parece ser bastante diferente al de otros represores por dos motivos. Primero, en muchos casos, la unión del inductor (por ejemplo, *lacI*) o la liberación del correpresor (por ejemplo, *trpR*) induce un cambio conformacional el cual reduce la afinidad de un represor citoplasmático por el operador (Beckwith, 1987; Yanofsky y Crawford, 1987). Por el contrario, la inducción de los genes *put* parece depender directamente de la localización de la proteína PutA en la célula: la prolina induce un cambio conformacional en el represor PutA, el cual secuestra la proteína PutA en la membrana citoplasmática donde es incapaz de unirse al operador. Segundo, la proteína PutA es mucho mayor (130 kDa) que la mayoría de los represores bien caracterizados (Takeda *et al.*, 1983).

Ya que la prolina puede constituir la única fuente de nitrógeno, se puede esperar que el operón *put* sea regulado por nitrógeno. La represión catabólica del operón *put* de las cepas de *Klebsiella* y de *E. coli* se puso de manifiesto durante condiciones de hambre de nitrógeno (Pahal *et al.*, 1978; Prival y Magasanik, 1971). Por el contrario, este fenómeno no se observó en el caso del operón de *S. typhimurium*; esta cepa es incapaz de crecer en medio con glucosa como fuente de carbono y prolina como única fuente de

nitrógeno (Prival y Magasanik, 1971). Todo lo expuesto anteriormente parece demostrar la existencia de una jerarquía de la regulación por nitrógeno del operón *put* en estas tres Enterobacterias tan próximas: en *Klebsiella* se produce altos niveles de inducción de este operón durante condiciones de hambre de nitrógeno; en *E. coli*, y en estas mismas condiciones, este operón se induce hasta niveles intermedios; mientras que en *S. typhimurium* no se produce la inducción de este operón en condiciones de hambre de nitrógeno (Chen y Maloy, 1991). El fenómeno de la regulación por nitrógeno se ha estudiado extensivamente en Enterobacterias (Keener *et al.*, X). Este fenómeno requiere al menos los productos de tres genes: *ntrA*, *ntrB* y *ntrC*. El primero de ellos codifica un factor sigma (σ^{54}) que confiere especificidad al holoenzima ARN polimerasa por promotores regulados por nitrógeno. El producto del gen *ntrB* es una fosforilasa que defosforila la proteína NtrC cuando se dispone de un exceso de nitrógeno. La proteína NtrC fosforilada es un activador que se une a "sitios intensificadores" y cataliza la isomerización del complejo σ^{54} -ARN polimerasa-promotor cerrado a un complejo abierto. Se han encontrado las secuencias consenso para el sitio de unión de la proteína NtrC y para los promotores *ntrA* (Keener *et al.*, X).

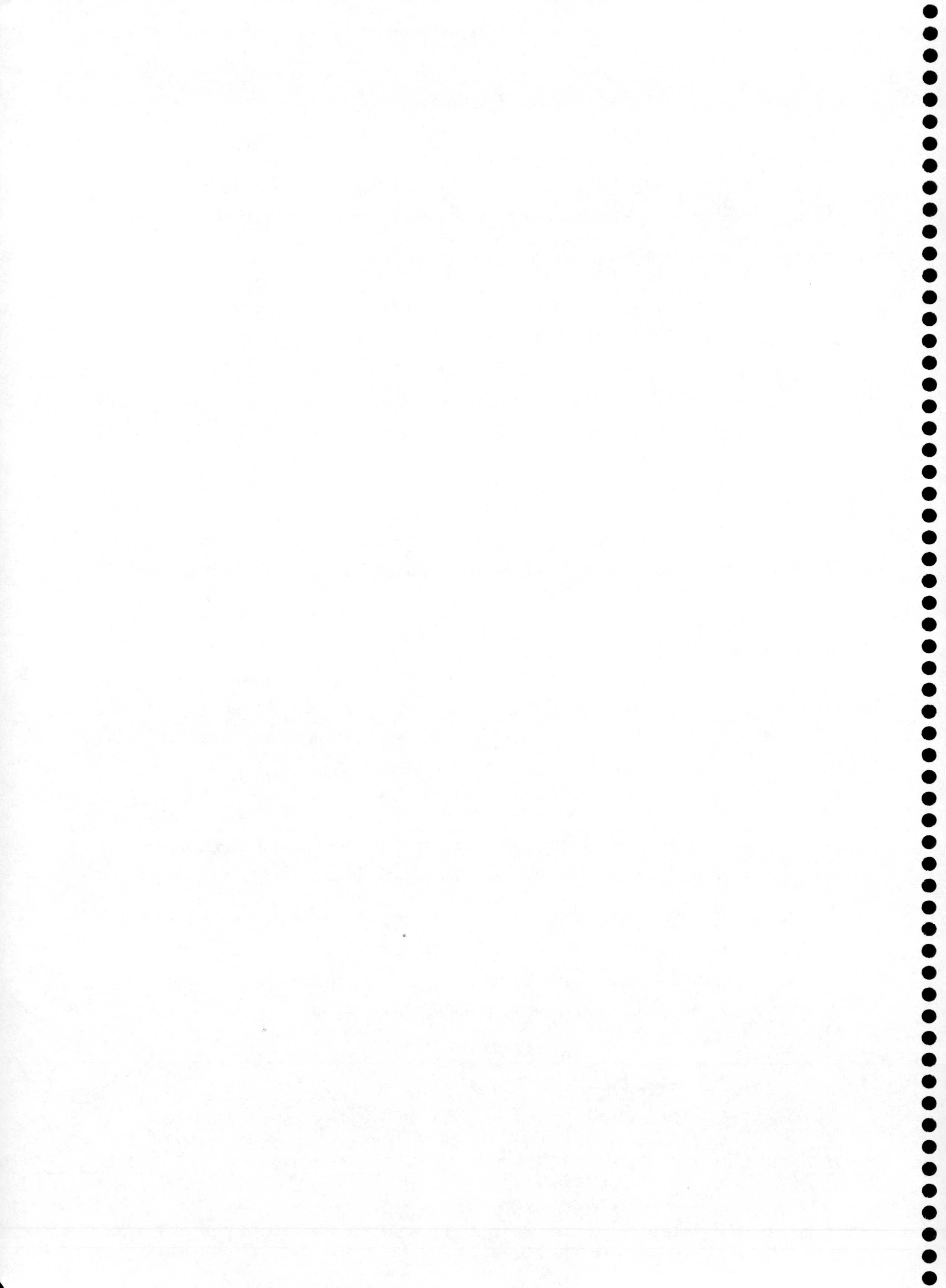


OBJETIVOS

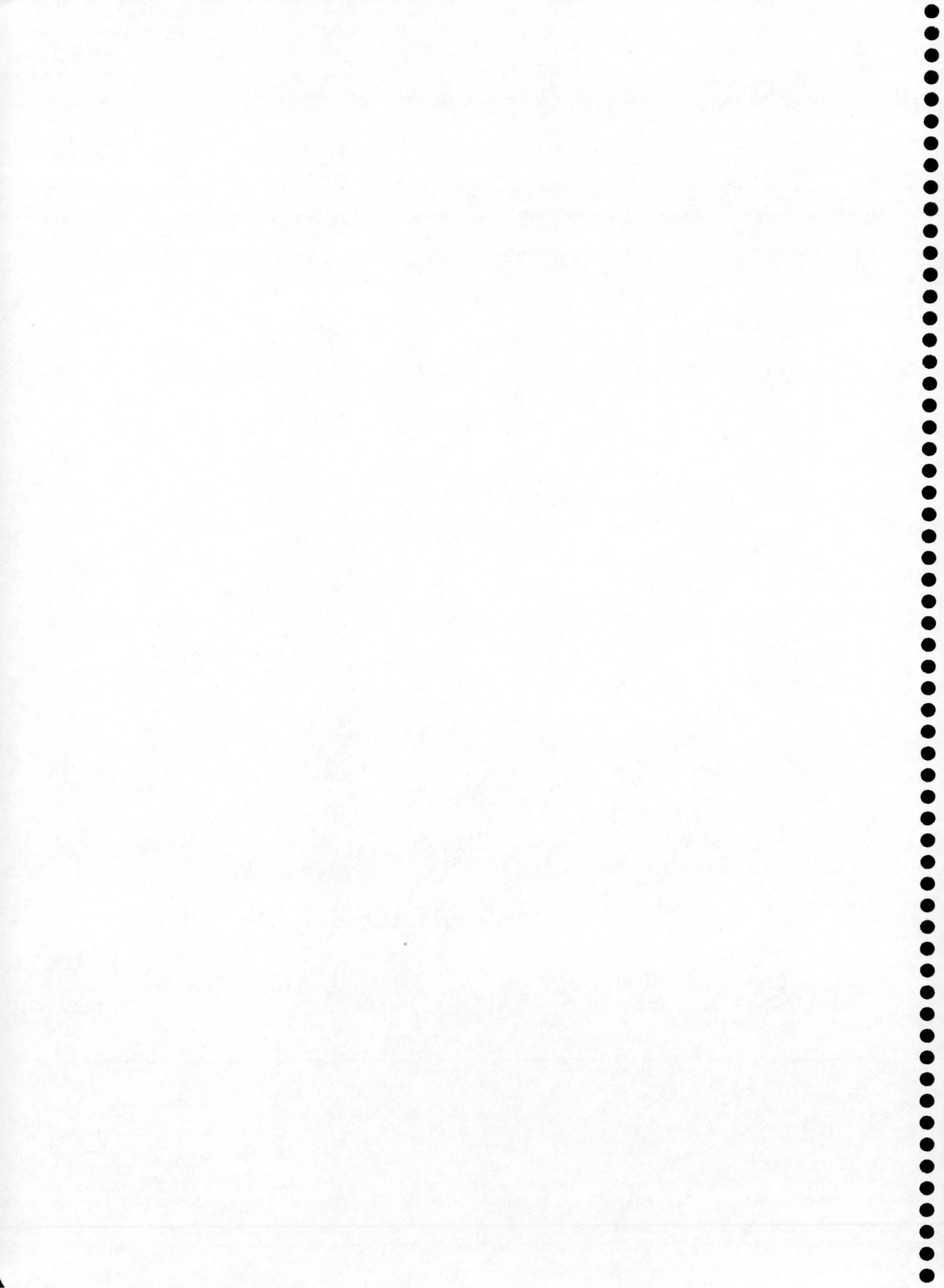


En la *Introducción* de este trabajo, se ha planteado la posibilidad de introducir en el medioambiente microorganismos manipulados genéticamente como agentes biodegradadores de compuestos xenobióticos. Así mismo, se ha descrito el entorno rizosférico como un hábitat enriquecido en nutrientes, debido al aporte de fuentes de carbono y nitrógeno que suponen los exudados radiculares, en el que tanto la supervivencia como la actividad biodegradadora de microorganismospodría verse favorecidos. Finalmente, y con objeto de controlar la supervivencia y evitar la dispersión de las bacterias recombinantes fuera de la zona de aplicación, se ha planteado la posibilidad de la dotación a estos microorganismos de los denominados sistemas activos de contención biológica Utilizando cepas derivadas de *P. putida* mt-2 como microorganismo objeto de estudio, en este trabajo se plantearon los siguientes objetivos concretos:

1. Estudiar, tanto en condiciones controladas como medioambientales, la colonización de diversos entornos edáficos, influenciados o no por los exudados radiculares de plantas de interés comercial, por una cepa bioluminiscente derivada de *P. putida* mt-2.
2. Determinar, tanto en condiciones controladas como medioambientales, las relaciones competitivas establecidas entre el derivado bioluminiscente de *P. putida* mt-2 y cepas indígenas concretas aisladas de la rizosfera de plantas, o poblaciones indicadoras de la microbiota natural del suelo.
3. Estudiar el comportamiento de cepas derivadas de *P. putida* mt-2 portadoras de un sistema activo de contención biológica para la degradación de alquilbenzoatos en condiciones medioambientales.
4. Realizar una caracterización preliminar del operón del catabolismo de la prolina de *P. putida* como punto de partida para la construcción de cepas portadoras de sistemas activos de contención biológica inducibles por señales químicas aportadas por el exudado radicular.



MATERIALES Y MÉTODOS



1. CEPAS BACTERIANAS

En este trabajo se han utilizado cepas bacterianas de colecciones de cultivos tipo, de la colección del grupo de Biodegradación de Tóxicos Orgánicos de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC-Granada), y cepas cedidas por otros grupos de investigación. Además, se han utilizado cepas aisladas de la rizosfera de plantas de maíz. Las estirpes utilizadas en este trabajo se recogen en la **Tabla 1** junto con sus genotipos o características más relevantes.

Tabla 1. Estirpes bacterianas utilizadas en este trabajo.

Estirpe bacteriana	Características ^a	Referencia
<i>Pseudomonas putida</i>		
KT2440	Cm ^R , <i>hsdMR</i>	Franklin <i>et al.</i> , 1981
KT2442	Rif ^R derivada de KT2440	Franklin <i>et al.</i> , 1981
UWC1	Rif ^R derivada de KT2440	Ramos-González <i>et al.</i> , 1994
KT2442-5	Rif ^R , Sm ^R derivada de KT2442	Este trabajo
S1B1	Rif ^R , miniTn5-Km- <i>luxAB</i>	C. Ramos ^b
CMC4	3MB ⁺ , miniTn5-Km- <i>xylS</i> - <i>P_m::lacI</i> - <i>P_{lac}::gef</i> (pWW0)	Ronchel, 1997
CMC5	miniTn5-Tc- <i>P_m::luxAB</i>	M.C. Ronchel ^b
EEZ32	(pCC102; Km ^R , <i>xylS</i>) miniTn5-Tc (pCC102; Km ^R , <i>xylS</i>) (pWW0, 3MB ⁺)	Ronchel <i>et al.</i> , 1995
<i>Escherichia coli</i>		
S17-1 λ pir	Sm ^R Pro r ⁻ m ⁺ RecA ⁻ Tp ^R	Simon <i>et al.</i> , 1981
CC118 λ pir	Ω RP4-Tc::Mu-Kn::Tn7 λ pir Rif ^R Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>araD</i> 139 Δ <i>lacX74 galK galE phoA20 thi-1</i> <i>rpsE rpoB argE</i> (Am) <i>recA1</i> λ pir	Herrero <i>et al.</i> , 1990
HB101	Sm ^R <i>supE44 hsdS20</i> (<i>r_B m_B</i>) F ⁻ <i>recA13 ara14 proA2 lacY1</i> <i>galK2 rpsL20 xyl5 mtl1</i>	Boyer y Roulland-Dussoix, 1969
RM2	<i>trp lacZ rpsL thi</i> F ⁻	J.M. Wood, 1981
EM150	Δ (<i>putAP</i>)100 F ⁻ <i>hds-5</i> Δ (<i>lac-proAB</i>) <i>supE</i>	Hann <i>et al.</i> , 1988
DH5 α	<i>hi lacI^qlacZ</i> (pPC6; Put ⁺ C) <i>recA endA</i> ϕ 80d <i>lacZ dml5</i>	Bethesda Research Laboratory
<i>Salmonella typhimurium</i>		
LT2	Cepa silvestre	Ratzkin <i>et al.</i> , 1978
MS916	Tc ^R <i>putP1094-Tn10</i> derivada de LT2	D.R. Hahn y S.R. Maloy, 1987
MS1139	Tc ^R <i>putA810-Tn10</i> derivada de LT2	D.R. Hahn y S.R. Maloy, 1987

Aislados de la rizosfera de plantas de maíz

<i>Pseudomonas putida</i> EEZ-201	Ap ^R Cm ^R Et ^R Sm ^R Vn ^R Nal ^R Tc ^R	Este trabajo
<i>Agrobacterium radiobacter</i> EEZ-202	Sm ^R Nal ^R	Este trabajo
<i>Pseudomonas aureofaciens</i> EEZ-203	Ap ^R Cm ^R Et ^R Sm ^R Vn ^R	Este trabajo
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> EEZ-204	Ap ^R Cm ^R Et ^R Nal ^R	Este trabajo
<i>Pseudomonas fluorescens</i> EEZ-205	Nal ^R Vn ^R	Este trabajo
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> EEZ-206	Ap ^R Cm ^R Vn ^R Nal ^R	Este trabajo
<i>Serratia rubidaea</i> EEZ-207	Ap ^R Vn ^R Tc ^R	Este trabajo
<i>Acinetobacter baumannii</i> EEZ-208	Ap ^R Vn ^R Pip ^R	Este trabajo
<i>Klebsiella oxytoca</i> EEZ-209	Et ^R Vn ^R	Este trabajo
<i>Serratia liquefaciens</i> EEZ-210	Et ^R Vn ^R	Este trabajo

Aislados de la rizosfera modificados genéticamente

<i>Pseudomonas putida</i> EEZ-201-L	Ap ^R Cm ^R Et ^R Sm ^R Vn ^R Nal ^R Tc ^R miniTn5-luxAB-Km	Este trabajo
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> EEZ-204-L	Ap ^R Cm ^R Et ^R Nal ^R miniTn5-luxAB-Km	Este trabajo
<i>Pseudomonas fluorescens</i> EEZ-205-L	Nal ^R Vn ^R miniTn5-luxAB-Km	Este trabajo
<i>Pseudomonas putida</i> EEZ-206-L	Ap ^R Cm ^R Vn ^R Km ^R miniTn5-luxAB-Km	Este trabajo

^aLas abreviaturas utilizadas para designar las resistencias a antibióticos corresponden a: Ap, ampicilina; Cm, cloramfenicol; Et, eritromicina; Km, kanamicina; Nal, ácido nalidíxico; Rif, rifampicina; Sm, estreptomicina; Tc, tetraciclina; Vn, vancomicina.

^bDepartamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de Plantas, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada.

^cPut⁺, capacidad de utilizar el aminoácido prolina como fuente de carbono y nitrógeno.

1.1. Conservación de las estirpes bacterianas.

La conservación de cepas a corto plazo se realizó a 4°C en estría en placas del correspondiente medio sólido suplementado con los antibióticos adecuados. A largo plazo se hizo por congelación a -80°C de cultivos líquidos suplementados con glicerol 40% (v/v).

2. PLÁSMIDOS

En la **Tabla 2** se relacionan los plásmidos construídos o aislados por otros autores utilizados en este trabajo junto con sus características más relevantes. Los plásmidos de nueva construcción se describen en los apartados correspondientes de *Resultados*.

Tabla 2. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmido	Características	Referencia
pCC102	Km ^R <i>xylS</i> P _m :: <i>lacI</i>	Contreras et al., 1991
pCK220	Ap ^R Km ^R Mob ⁺ Tra ⁻ miniTn5- <i>luxAB</i> -Km	C. Stenberg, DTU ^a
pCRR831	Tc ^R <i>cos mob</i> RK2, Put ⁺	EEZ ^b
PMD1405	Ap ^R <i>lacZ</i> PBR replicón	M. Drummond ^c
pPC6	Ap ^R , Put ⁺	Hann et al., 1988
pRK600	Cm ^R ColE1 <i>ori V</i> RK2 Mob ⁺ Tra ⁺	Kessler et al., 1992
pSM1350	Km ^R miniTn5- <i>xylS</i> -P _m :: <i>lacI</i> -P _{lac} :: <i>gef</i>	Soren Molin, DTU ^a
pUC19	Ap ^R	Viera y Messing, 1982
pWW0	IncP9 Mob ⁺ Tra ⁺ 3MB ⁺	Worsey y Williams, 1975

^aDepartamento de Microbiología, Universidad Técnica de Dinamarca., Lyngby, Dinamarca.

^bDepartamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de Plantas, Estación Experimental del Zaidín (CSIC-Granada).

^cUnidad de Fijación de Nitrógeno, Brighton, Inglaterra.

^dPut⁺, capacidad de utilizar el aminoácido prolina como fuente de carbono o nitrógeno.

pCC102: plásmido derivado de pKT231 (Bagdasarian et al., 1981), contiene el gen *xylS2* y una fusión del promotor P_m del plásmido TOL pWW0 de *P. putida* al gen *lacI* de *E. coli*.

pCRR831: plásmido derivado del vector de clonación pLAFR3 (Ramos-González, 199-), aislado por complementación de una genoteca de *P. putida* generada en el vector mencionado anteriormente con la cepa de *E. coli* RM2.

pMD1405: Vector de bajo número de copias (10 a 15 por célula) para ensayo de promotores. Contiene el gen '*lacZ*, que codifica para la β-galactosidasa, desprovisto de su promotor natural, el sitio de unión al ribosoma y los 8 primeros codones. ColE1, Ap^r (M.Drummond, Unidad de Fijación de Nitrógeno, Brighton, Inglaterra) (**Figura 1**).

pPC6: plásmido derivado del vector de clonación pBR322 (Bolivar et al, 1977), que posee un fragmento *AatII* de 6,8 kb del cromosoma de *Salmonella typhimurium* en el que se incluye el operón del catabolismo de la prolina de este microorganismo (**Figura 2**).

pRK600: plásmido auxiliar utilizado para movilizar plásmidos Mob⁺, Tra⁺. Es portador del sistema de replicación del plásmido ColE1 cuyo espectro de huésped se restringe a *E. coli*, comportándose como vector suicida en *Pseudomonas* al no ser capaz de replicarse en este organismo. Además, lleva la región de transferencia del plásmido pRK2 que permite la movilización de plásmidos *mob*⁺ a un amplio espectro de huéspedes.

pSM1350: plásmido derivado del plásmido pUT-Km en el cual se ha clonado en el sitio de restricción *NottI* el fragmento que contiene el gen *xylS2* y las fusiones $P_m::lacI$ (del plásmido pCC102) y $P_{AI-04/03}::gef$ (del plásmido pLBJ89, Jensen *et al.*, 1993).

pUC18/19: vectores de clonación que codifican resistencia a ampicilina (**Figura 3**). Carecen del gen *rop* que controla el número de copias de los plásmidos con el origen de replicación de pBR322 (Bolivar *et al.*, 1977) por lo que están presentes en alto número de copias por célula (aproximadamente 200). Estos plásmidos poseen el fragmento α del gen *lacZ* que codifica 99 aminoácidos de la región amino terminal de la β -galactosidasa expresados desde P_{lac} . Los plásmidos con alguna inserción en alguna de las dianas de la región con sitios múltiples de clonación, situados entre P_{lac} y el fragmento α de *lacZ*, pueden ser reconocidos en medio LB sólido suplementado con IPTG y X-gal. Esto es debido a que las colonias que portan dichas inserciones permanecen blancas al no complementar la mutación cromosómica *lacZ* $\Delta 15M$ presente en los huéspedes adecuados tipo *E. coli* JM109. En contraste, las células de *E. coli* con la mutación y portando los vectores sin inserto, adquieren una coloración azul. La secuenciación de los insertos es posible utilizando tanto el cebador universal como el reverso, ya que estos hibridan con las secuencias adyacentes al sitio de clonación múltiple.

pUT: plásmidos suicidas construidos a partir del vector pGP704 (Miller *et al.*, 1988). Estos plásmidos contienen el gen que codifica resistencia a ampicilina, presentan el origen de replicación del plásmido pR6K y su replicación es dependiente de la proteína π . Los plásmidos pertenecientes a la serie pUT portan las dos repeticiones invertidas de 19 pb del transposón Tn5. En presencia de la transposasa de Tn5, las secuencias de ADN incluidas entre dichas secuencias invertidas son transponibles. Estas secuencias transponibles se denominan mini-Tn5.

pWW0: plásmido TOL arquetipo de *P. putida*. Codifica las rutas catabólicas para el metabolismo de tolueno, *m*-xileno y 3-metilbenzoato (Worsey y Williams, 1975).

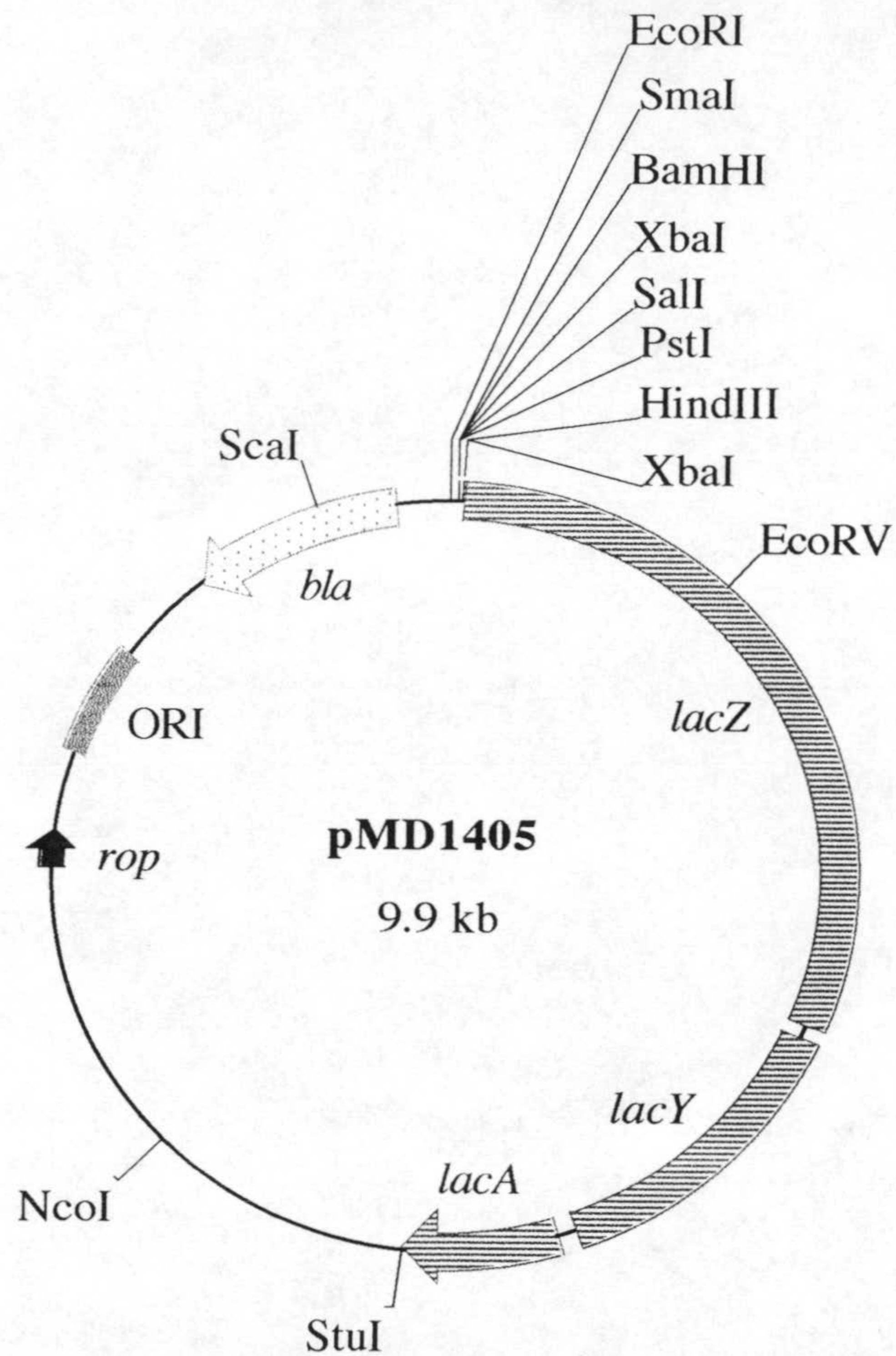


Figura 1. Esquema del plásmido pMD1405. Mapa de restricción (sitios únicos) y mapa genético del plásmido pMD1405. Se muestra la localización de los genes '*lacZ* que codifica el enzima β -galactosidasa; *lacY*, que codifica la permeasa para la lactosa; *lacA*, que codifica la β -galactósido transacetilasa cuya función es transferencia de un grupo acetilo desde acetil.coA hasta los β -galactósidos y el gen *bla* que codifica resistencia al antibiótico ampicilina. Además muestra el origen de transcripción (ORI)

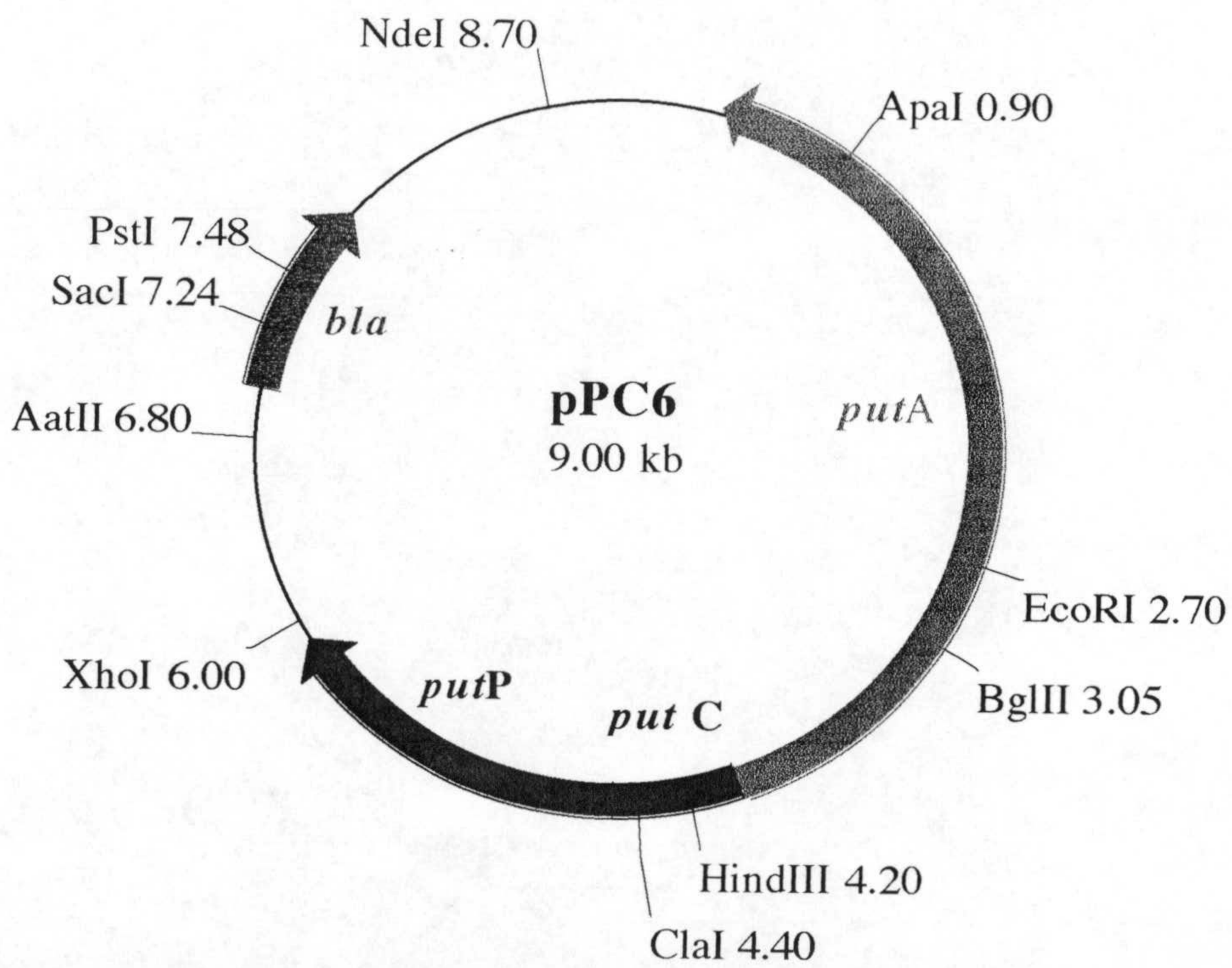


Figura 2. Esquema del plásmido pPC6. Mapa de restricción y mapa genético del plásmido pPC6. Se muestra la localización de los genes *putP*, que codifica la permeasa de la prolina; *putA*, que codifica las actividades prolina oxidasa y prolina deshidrogenas que catalizan la conversión del aminoácido prolina en glutamato, es el regulador positivo del operón del catabolismo de la prolina; *putC*, región reguladora de este operón y el gen *bla* que codifica resistencia al antibiótico ampicilina.

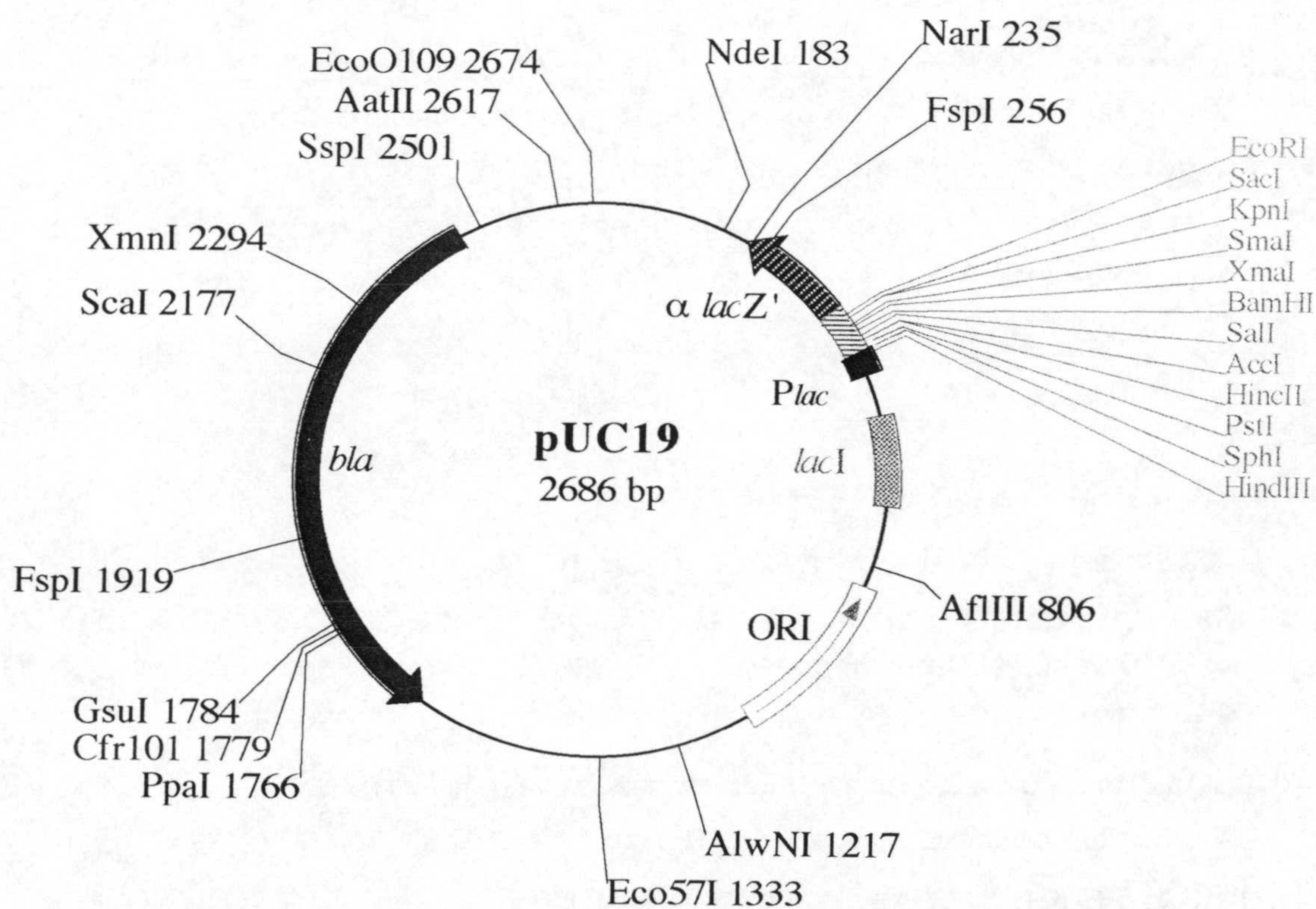


Figura 3. Esquema del plásmido pUC19. Se muestra el mapa de restricción (sitios únicos de restricción), así como la localización del fragmento α del gen *lacZ*, la del gen *lacI*, que codifica el inhibidor del operón de la lactosa; la del gen *bla*, que codifica la resistencia a ampicilina y la del origen de replicación (ORI).

3. MEDIOS DE CULTIVO

La composición de los medios de cultivo utilizados en este trabajo se detalla a continuación. Todos los medios y soluciones se esterilizaron por calor húmedo en un autoclave a 121°C y 1 atmósfera de presión. En el caso de los antibióticos y aminoácidos, se esterilizaron por filtración utilizando filtros estériles de nitrocelulosa o policarbonato de 0,22 µm de diámetro de poro.

3.1. Medios ricos.

Como medio habitual de crecimiento de las cepas de *E. coli* y *Pseudomonas* se utilizó el medio Luria-Bertani (LB) (Bertani, 1951) cuya composición fue la siguiente: bacto triptona, 10 g; extracto de levadura, 5 g; NaCl, 10 g; H₂O, hasta 1 l.

Para la preparación de medio sólido se añadió bactoagar a una concentración final de 1,5% (p/v) y se esterilizó en el autoclave.

La selección de Pseudomonadaceas fluorescentes a partir de muestras de suelo se realizó en medio agar King B (King *et al*, 1954), cuya composición fue la siguiente: peptona, 30 g; K₂HPO₃, 1,5 g; MgSO₄, 1,5 g; glicerol (80% v/v), 10 ml; agar, 10 g; H₂O, hasta 1 l.

3.2. Medios mínimos.

Para el cultivo de células de *E. coli* o del género *Pseudomonas* en medio mínimo se utilizó una modificación del medio M9 (Maniatis *et al*., 1982) cuya composición fue la siguiente: solución 10 x M9, 100 ml; solución A9, 2,5 ml; MgSO₄ x 7H₂O (1M), 1ml; citrato férrico amónico 6‰ (p/v), 1 ml; H₂O, hasta 1 l. Las soluciones empleadas en este medio se prepararon por separado y se esterilizaron en el autoclave.

La composición de la solución 10 x M9 fue: Na₂HPO₄ x 12H₂O, 70 g; KH₂PO₄, 30 g; NH₄Cl, 10 g; NaCl, 5 g; H₂O, hasta 1 l.

La solución 10 x M8, idéntica a la anterior pero sin fuente de nitrógeno, se utilizó para la preparación de medio mínimo conteniendo una fuente de nitrógeno diferente al cloruro amónico.

La composición de la solución A9 fue la siguiente: HBO₃, 300 mg; ZnCl₂, 50 mg; MnCl₂ x 4H₂O, 30 mg; CoCl₂, 200 mg; CuCl₂ x 2H₂O, 10 mg; NiCl₂ x 6H₂O, 20 mg; NaMoO₄ x 2H₂O, 30 mg; H₂O, hasta 1 l.

Para el cultivo de células de *S. typhimurium* en medio mínimo se utilizó el medio NCN ("neither carbon nor nitrogen source", Ratzkin *et al*, 1978) conteniendo las fuentes de carbono y nitrógeno deseadas. La composición de este fue la siguiente: K₂HPO₄, 7g; KHPO₄, 3 g; MgSO₄, 0,12 g; H₂O, hasta 1 l.

Como fuentes de carbono se utilizaron las que se detallan a continuación a las concentraciones finales que se indican:

a) Glucosa: se preparó una solución concentrada al 1,12 M se esterilizó en el autoclave, se almacenó a 4°C y se añadió al medio a una concentración final de 28 mM.

b) Benzoato, 3-metilbenzoato, *p*-hidroxifenilacético y succinato: se prepararon soluciones concentradas 0,5 M a pH 7,0. Estas soluciones se esterilizaron en el autoclave, se almacenaron a temperatura ambiente y se utilizaron a una concentración final de 5 mM (benzoato, succinato), 10 mM (*p*-hidroxifenilacético) y de 5 a 15 mM (3-metilbenzoato).

Como fuente de nitrógeno, carbono o de carbono y nitrógeno se utilizaron los aminoácidos prolina y glicina. Se prepararon soluciones concentradas 1 M y se esterilizaron por filtración, se almacenaron a 4°C y se utilizaron a una concentración final de 20 mM.

Para el cultivo de células de *E. coli*, los cultivos en medio mínimo se suplementaron con tiamina a una concentración final de 0,05 mM a partir de una solución 200 veces concentrada y esterilizada por filtración.

Para la preparación de medios sólidos se añadió bactoagar a una concentración final de 2,2% (p/v).

3.3. Antibióticos.

Los antibióticos se prepararon en soluciones 1000 veces concentradas en H₂O destilada, excepto el cloranfenicol que se preparó en etanol absoluto, y la rifampicina y la tetraciclina que se disolvieron en metanol. Las soluciones preparadas en H₂O se esterilizaron por filtración y se almacenaron a -20°C. Los antibióticos se utilizaron a las concentraciones finales indicadas en µg/ml: ácido nalidíxico (Nal), 20 ó 30, ampicilina (Ap), 20 ó 100; cloramfenicol, (Cm), 30; estreptomicina (Sm), 25; kanamicina (Km), 50; rifampicina (Rif), 50 y tetraciclina (Tc), 15.

Para establecer el espectro de resistencias/sensibilidad a antibióticos de cepas aisladas de la rizosfera de plantas se utilizaron discos impregnados con las siguientes cantidades de antibióticos (suministrados por bioMérieux, 69280, Marcy-Francia) en µg: ácido nalidíxico, 30; ampicilina, 10; cloramfenicol, 15; estreptomicina, 10; kanamicina, 30; neomicina (Ne), 30; piperacilina (Pip), 100; rifampicina, 30; tetraciclina, 30; y vancomicina (Vn), 30.

Para evitar el crecimiento de hongos en las placas en las que se deseaba hacer conteos de bacterias en suelos no estériles se utilizó cicloheximida (40µg/ml). Esta se

preparó como una solución 1000 veces concentrada en H₂O destilada que se esterilizó por filtración y se almacenó a -20°C.

4. CURVAS DE CRECIMIENTO.

Las cepas a estudiar se cultivaron a 30°C con agitación durante 10-14 horas en medio LB suplementado con los antibióticos apropiados. Este cultivo se diluyó hasta una turbidez a 660 nm (DO₆₆₀) comprendida entre 0,02 y 0,04 en el medio en el que se quería estudiar el comportamiento de la cepa en cuestión. Se siguió el incremento de la DO₆₆₀ cada 30 minutos, hasta que el cultivo alcanzó la fase estacionaria de crecimiento.

El tiempo de generación se calculó según la siguiente fórmula:

$$g = \ln 2 (t - t_0) / \ln (DO / DO_0)$$

Donde, g es el tiempo de generación; t, el tiempo transcurrido hasta alcanzar la fase logarítmica tardía; t₀, tiempo transcurrido hasta alcanzar la fase logarítmica temprana; DO, turbidez del cultivo a tiempo t; y DO₀, turbidez del cultivo a tiempo t₀.

5. TRANSFERENCIA DE PLÁSMIDOS POR CONJUGACIÓN

La transferencia de ADN plasmídico a cepas de *Pseudomonas* o de *E. coli* se realizó mediante conjugación.

La movilización a *P. putida* de los plásmidos con un origen de transferencia *oriT* del plásmido pRP4 se realizó mediante conjugación tripartita (de Lorenzo y Timmis, 1994) en la que participaron la cepa de *E. coli* donadora (portadora del plásmido a movilizar), la cepa de *P. putida* receptora y la cepa auxiliar de *E. coli* HB101 (pRK600). El plásmido pRK600 determina funciones de transferencia pero no se replica en *Pseudomonas*.

Se partió de cultivos incubados a 30°C con agitación durante 12-16 horas de las cepas donadora y receptora del plásmido en cuestión así como de la cepa portadora del plásmido auxiliar cuando fue necesario. Se recogieron aproximadamente 10⁸ células de cada cultivo mediante centrifugación a 12000 g durante 2 minutos, y el sedimento se lavó 2 veces con 1 ml de tampón 1 x M9. Posteriormente las células se mezclaron y se recogieron por centrifugación a 12000 g durante 2 minutos. A continuación se suspendieron en 50 µl de tampón 1 x M9 y se depositaron sobre un filtro de nitrocelulosa estéril de 0,22 µm de diámetro de poro colocado sobre la superficie de una placa de LB sólido y se incubó a 30°C durante 6-8 horas. Transcurrido este tiempo el filtro con las células se transfirió a un tubo con 5 ml de tampón 1 x M9, y las células se suspendieron por agitación. A partir de esta suspensión se hicieron diluciones seriadas

en el mismo tampón y se sembraron placas de medio selectivo para los transconjugantes; éstos fueron receptores que habían adquirido el plásmido de los donadores. Las placas se incubaron a 30°C hasta la aparición de los transconjugantes. Las cepas donadora, receptora, y auxiliar cuando así se requería, se sometieron al mismo tratamiento y se sembraron en placas del mismo medio selectivo, sirviendo de esta manera como controles negativos de la conjugación.

Se hicieron siembras en los medios correspondientes para la selección de las cepas donadora, receptora, y auxiliar en su caso, con objeto de realizar el conteo del número de bacterias totales iniciales presentes en el cruzamiento. La frecuencia de transconjugantes se expresó como el número de transconjugantes en función del número de receptores.

6. ESTABILIDAD DE LAS INSERCIONES DE MINITRANSPOSONES EN EL CROMOSOMA DE LAS CEPAS CONSTRUIDAS

Para comprobar la estabilidad de las inserciones del miniTn5-*luxAB*-Km en el cromosoma de las cepas aisladas de la rizosfera, éstas y sus controles se cultivaron en medio líquido LB sin antibióticos. Cada 7-8 generaciones los cultivos se diluyeron en medio fresco hasta una DO₆₆₀ de 0,03. El proceso se repitió hasta que se alcanzaron unas 50 generaciones en total. En ese momento se sembraron diluciones de los distintos cultivos en medio LB con los antibióticos adecuados y se analizó el fenotipo bioluminiscente.

7. AISLAMIENTO DE ADN PLASMÍDICO

Para el aislamiento de ADN plasmídico se utilizaron los métodos que se describen a continuación, dependiendo del grado de pureza requerida para el uso posterior del ADN y del tamaño del plásmido en cuestión.

7.1. Método "Qiapreps"

El sistema "Qiapreps spin plasmid kit" (Qiagen, ref. 27104) se utilizó para la preparación rápida de ADN plasmídico libre de ARN para su uso en secuenciación y clonación, partiendo de un volumen de cultivo de 3 ml y siguiendo las instrucciones del fabricante.

7.2. Método de la lisis alcalina

Para el aislamiento de plásmidos a pequeña escala se utilizó el método de la lisis alcalina (Maniatis *et al.*, 1982). Este método se utilizó para la comprobación de plásmidos de nueva construcción.

Se partió de un volumen de 1,5 ml de cultivo. Las células se recogieron por centrifugación a 12000g durante 5 minutos. Tras eliminar el sobrenadante, éstas se suspendieron en 100 µl de GTE, y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación se añadieron 200 µl de solución de lisis, se agitó el tubo por inversión y se incubó la mezcla durante 5 minutos en un baño de hielo. El lisado se neutralizó añadiendo 150 µl de tampón acetato sódico 3M pH 4,8 y, tras mezclar el contenido del tubo por inversión, se incubó durante 5 minutos en un baño de hielo. Las proteínas, el ADN cromosómico y los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 12000g durante 10 minutos y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio. Posteriormente, se añadieron 2 volúmenes de etanol frío y la mezcla se incubó a -20°C durante 30 minutos. El ADN se precipitó por centrifugación a 12000g durante 15 minutos. El precipitado se lavó 2 veces con etanol 70% (v/v) y se centrifugó a 12000g durante 5 minutos. El sedimento de ADN se dejó secar a 37°C y se resuspendió en 50 µl de TE.

La composición de las soluciones empleadas en este procedimiento fue la siguiente:

- GTE: glucosa, 50 mM; Tris-HCl (pH 8,0), 25 mM; y EDTA-Na₂, 10 mM. Esta solución se esterilizó en el autoclave y se conservó a 4°C.
- Solución de lisis: lauril sulfato sódico (SDS), 1% (p/v); y NaOH, 0,2 N. Esta solución fue de preparación extemporánea a partir de soluciones concentradas al 10% (p/v) de SDS y de 2 N de NaOH.
- Tampón acetato sódico pH 4,8: acetato sódico 5 M, 60 ml; ácido acético glacial, 11,5 ml; H₂O, hasta 100 ml. El pH se ajustó a 4,8 con ácido acético glacial. La solución se esterilizó en el autoclave y se conservó a 4°C.
- TE: Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM; EDTA-Na₂, 1 mM. Esta solución se esterilizó en el autoclave y se almacenó a 4°C.

8. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS DE *Escherichia coli*

8.1. Preparación de células competentes

La preparación de células competentes de *E. coli* para su transformación posterior se realizó utilizando el método de Nishimura *et al.* (1990). La cepa correspondiente de *E. coli* se inoculó en 3 ml de LB suplementado con los antibióticos adecuados, y se incubó a 37°C con agitación durante 12-16 horas. Este cultivo se diluyó 100 veces en 50 ml de solución A y se incubó a 37°C con agitación hasta alcanzar la fase exponencial temprana de crecimiento (DO₆₆₀ = 0,5). A partir de este momento se

trabajó en frío, ya que de este modo, la eficiencia de transformación fue 10 veces superior. Las células se mantuvieron en un baño de hielo durante 10 minutos, y se recogieron por centrifugación a 12000g durante 5 minutos a 4°C. A continuación se resuspendieron cuidadosamente en 0,5 ml de solución A fría (4°C). Posteriormente se añadieron 2,5 ml de solución B fría (4°C) y la mezcla se agitó cuidadosamente. La suspensión celular se dividió en alícuotas de 150 µl que se mantuvieron a -80°C hasta el momento de su uso.

Las soluciones empleadas se conservaron a 4°C. Su composición fue la siguiente:

- Solución A: LB suplementado con MgSO₄ x 7H₂O, 10 mM; y glucosa, 0,2% (p/v).
- Solución B: LB suplementado con: glicerol, 36% (v/v); polyetilenglicol (PEG)-7500, 12% (p/v); y MgSO₄ x 7H₂O, 12 mM.

8.2. Transformación

La transformación de células competentes de *E. coli* con ADN plasmídico, se realizó utilizando el método descrito por Nishimura *et al.* (1990).

Una alícuota de la suspensión celular, mantenida a -80°C, se transfirió a un baño de hielo y se añadieron 0,1-1 µg de ADN. La mezcla se incubó primero en un baño de hielo durante 30-45 minutos, a continuación a 42°C durante 1 minuto y, finalmente, en un baño de hielo durante 1-2 minutos. Posteriormente, se añadió 1 ml de LB y las células se incubaron durante 1 hora a 37°C con agitación para permitir la expresión de el(los) gen(es) de resistencia a antibiótico(s) codificado(s) en el plásmido introducido. Las células que habían adquirido el plásmido, y por tanto la resistencia al(los) antibiótico(s), se seleccionaron sembrando alícuotas de 50-200 µl de la suspensión celular en placas de LB sólido suplementado con el(los) antibiótico(s) adecuado(s). Las placas se incubaron a 37°C hasta la aparición de colonias, generalmente durante 16-24 horas.

9. MANIPULACIÓN DE ADN

9.1. Restricción de ADN

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

correspondiente diez veces concentrado suministrado por la casa comercial,; y 0,5-5 unidades del enzima de restricción, en volúmenes finales de 10-40 μ l completados con H₂O o TE. Las digestiones se llevaron a cabo incubando las mezclas de reacción durante 2 horas a la temperatura indicada por el fabricante.

9.2. Defosforilación de ADN

El ADN digerido por enzimas de restricción se sometió a una extracción con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico, tras añadir 0,1 volumen de acetato sódico 3M pH 7,0 (tal como se describió en el apartado 8 de esta sección). El sedimento de ADN se resuspendió en 90 μ l de Tris-HCl 10 mM pH 8,3, se añadieron 10 μ l de tampón de defosforilación (Boehringer Mannheim, ref. 1243284) y una unidad de fosfatasa alcalina de intestino de ternera (Boehringer Mannheim, ref. 713023). La mezcla se incubó durante 30 minutos a 37°C y posteriormente se detuvo la reacción incubando la mezcla a 56°C durante 30 minutos tras añadir una solución de SDS al 0,5% (p/v), EDTA 5 mM pH 8,0 y 100 μ g/ml de proteinasa K (Boehringer Mannheim, ref. 100144). Tras dejar enfriar la mezcla a temperatura ambiente durante 15 minutos se realizó una extracción de proteínas con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico y el ADN de la fase acuosa se precipitó como se describió anteriormente (apartado 8 de esta sección).

9.3. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Se llevó a cabo según Sambrook *et al.* (1989), utilizando geles de agarosa preparados en tampón TAE. Los fragmentos de ADN menores de 500 pb se separaron en geles de agarosa al 1,5% (p/v). En el resto de los casos los geles de agarosa se prepararon al 0,8 % (p/v) en TAE. Por cada 5 μ l de muestra a analizar se añadió 1 μ l de tampón de carga, y la mezcla se depositó en un pocillo del gel, sumergido en una cubeta con el mismo tampón. La separación se realizó por electroforesis horizontal a un voltaje de 50-100 V/cm.

Para la visualizar el ADN los geles se tiñeron por inmersión en una solución de bromuro de etidio (10 mg/ml) durante 15 minutos y, después de lavar con agua, se expusieron a luz ultravioleta de 254 nm en un transiluminador. El tamaño de los fragmentos de ADN se estimó por comparación con el patrón de restricción del AND del fago λ cortado con el enzima *Hind*III.

La composición de los tampones y soluciones utilizados en este proceso fue la siguiente:

- Tampón de carga: glicerol, 30% (v/v); azul de bromofenol, 0,3% (p/v); azul de xilencianol, 0,3% (p/v).

- Tampón TAE : Tris-Base, 4,84 g, ácido acético glacial, 1,14 ml; EDTA-Na₂ 0,5M, pH 8, 0,2 ml; H₂O, hasta 1 l. Este tampón se preparó a partir de una solución 50 veces concentrada y esterilizada en el autoclave.

El marcador de peso molecular se preparó de la siguiente forma: se cortaron 80 µl de ADN de fago λ (250 µg/ml) con 1,5 unidades/µg ADN de la enzima *Hind*III. Una vez digerido el ADN, la mezcla se incubó a 80°C para separar las regiones cohesivas de λ, posteriormente se añadieron 80 µl de tampón de carga y se completó el volumen hasta 400 µl con TE. La concentración final de ADN en la solución fue de 50 µg/ml.

9.4. Recuperación de fragmentos de ADN de geles de agarosa

Una vez identificado el fragmento de ADN que se deseaba recuperar, como se ha descrito en el apartado anterior, se cortó el trozo de agarosa del gel que contenía el fragmento con ayuda de un bisturí. El ADN se separó de la agarosa utilizando el sistema comercial "QiaEx" (Qiagen, ref. 20021), según las instrucciones del fabricante.

9.5. Ligación de ADN

Los fragmentos de ADN que se deseaban ligar se mezclaron en una proporción vector:inserto de 1:3. La reacción se llevó a cabo añadiendo 0,1 volúmenes de tampón de ligación (Boehringer Mannheim, ref. 1243292) y 1 unidad de ADN-ligasa del fago T4 (Boehringer Mannheim, ref. 481220) en un volumen final de 10-15 µl completado con H₂O o TE. La mezcla de reacción se incubó a 8-12°C durante 12-24 horas.

9.6. Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa termorresistente (PCR).

Este método se utilizó para la amplificación de fragmentos de ADN contenidos en plásmidos. Los cebadores utilizados se muestran en la **Tabla 3**.

La reacción de amplificación de la región reguladora del operón del catabolismo de la prolina de *P. putida* a partir del plásmido pSL4 (ver **Tabla 3**) se realizó conforme al siguiente protocolo: ADN molde (pSL4), 0,05-1 µg; cebador, 0,3 µM; tampón Taq ADN-polimerasa (10 x), 2,5 µl; dNTPs, 0,2 mM de cada uno; ADN-polimerasa Taq, 2 U; H₂O, hasta 25 µl.

La amplificación de esta región se realizó así: en primer lugar, la mezcla de reacción se incubó a 94°C para desnaturalizar el ADN molde. Posteriormente se

realizaron las extensiones utilizando un programa que consistía en 25 ciclos de 15 seg a 94°C (desnaturalización), 30 seg a 55°C (anillamiento) y 1 min a 72°C (extensión). Finalmente, y para completar la extensión, un ciclo de 10 minutos a 72°C.

La amplificación de los genes *luxAB* de *Vibrio harveyi* a partir del plásmido pCK220 (ver **Tabla 3**) se realizó utilizando el sistema "Ready to go PCR beads" (Qiagen, ref 27104) según las instrucciones del fabricante.

Tabla 3. Cebadores utilizados para la amplificación de ADN.

Cebador	Secuencia	1ª base de homología
PUTC1	5'-TATATGCATGCGTGTGCCCTGGCGT-3'	ATG ^a del gen <i>putP</i> de <i>P.putida</i>
PUTC2	5'-TCTCTGGATCCCATTTCTTATCCTGCTTATTGC-3'	ATG ^a del gen <i>putA</i> de <i>P.putida</i>

^aATG, codón de iniciación del gen correspondiente.

^bR, corriente abajo del extremo 3'

10. SECUENCIACIÓN DE ADN

La secuenciación de las construcciones de nueva creación y los fragmentos de ADN amplificados por PCR se llevó a cabo por el servicio de secuenciación automática del Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra utilizando un secuenciador Applied Biosystems (modelo 373 STRECHT). El método de secuenciación utilizado fue el ABI PRISMTM Dye Terminator con "AmpliTaq" ADN Polimerasa (Perkin Elmer, ref. 402122), basado en la utilización de dideoxinucleótidos marcados con cromóforos fluorescentes. Los cebadores utilizados se muestran en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Cebadores utilizados para la secuenciación de ADN.

Cebador	Secuencia	Localización ^c
Universal y reverso:		
U-21 (21-mer)	5'-ACGCACTTCGGCAATGGCGT-3'	F-Adyacente al sitio múltiple de clonación del pUC19
REV (17-mer)	5-'ACAGGAAACAGCTATGAC-3'	R-Adyacente al sitio múltiple de clonación del pUC19
Fragmento de pCRL4^a		
4U1	5'-ACGCACTTCGGCAATGGCGT-3'	F-251
4RU4	5'-ATCCGGGTAGTCGCCCACCTA-3'	F-322
4UR2	5'-CAACAACCCCAGCGGTCT-3'	F-583
4RU1	5'-GCCACCCCCACGCGAACCG-3'	F-1196
4UR2	5'-TGGCCGGTATTAATGGCCA-3'	R-224
4UR1	5'-ACGCCATTGCCGAAGTGCGT-3'	R-270
4R4	5'-TAGGTGGGCGACTACCCGGGA-3'	R-322
4R3	5'-AAGGTAGGCTCCTTGACCAGC-3'	R-752
4R2	5'-CGGTTCGCGGTGGGGGGTGGC-3'	R-1216
4R1	5'-TTCGGCGTGACTGGCTCGTG-3'	R-1623
Fragmento de pCRL12^b		
12U	5'-CACCCTTCCTGCTCGGGGCGG-3'	F-385
12U2	5'-CGGGTGCAACCAGGTGCAAC-3'	F-766
12U5	5'-CTTCTCGGCCCATCCTGAGC-3'	F-935
12U3	5'-GGGTGGTCGCAGCCTGGGTA-3'	F-1161
12U4	5'-CGTGCTGATCTCCACCGGTGG-3'	F-1660
12U6	5'-TTCCTGCGCAAGAATGCTTC-3'	F-2132
12U7	5'-GGCCGGTATCGTGGTGGGTG-3'	F-2343
12RU4	5'-CCCACGCGACTGCCATAGGACC-3'	F-2382
12RU3	5'-TTGATAGCAGTGCGGAAGGT-3'	F-2646
12UR1	5'-GTTGCACCTGGTTGCACCCG-3'	R-785
12UR2	5'-CCACCGGTGGAGATCAGCACG-3'	R-1680
12UR3	5'-GAAGCATTCTTGCGCAGGAA-3'	R-2151
12R7	5'-GGTCCTATGGCAGTCGCGTGGG-3'	R-2359
12R6	5'-ACCTTCCGCACTGCTATCAA-3'	R-2666
12R5	5'-TAGCCGTAAGTCCGCGAATTA-3'	R-2893

^apCRL4, plásmido derivado de pUC19 que contiene un fragmento *Pst*I de 2.0 kb del plásmido pCRR831. En este fragmento se encuentra una parte del gen *putA* de *P. putida*.

^bpCRL12, plásmido derivado de pUC19 que contiene un fragmento *Pst*I de 4,3 kb del plásmido pCRR831 que codifica la permeasa PutP (simporte prolina/Na⁺) de *P. putida*.

^cLa letra en la localización de cada oligonucleótido indica la dirección de la secuenciación ; F, corriente abajo del extremo 5'; R, corriente abajo del extremo 3'. Los números representa la posición de la primera base del oligonucleótido con respecto al sitio de restricción *Pst*I correspondiente del plásmido indicado.

11. TRANSFERENCIA DE ADN A MEMBRANA POR EL METODO DE "SOUTHERN BLOT" E HIBRIDACION.

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

11.1. Transferencia por capilaridad.

Las muestras de ADN plasmídico, digeridas con los enzimas de restricción seleccionados o sin digerir, se separaron en geles de agarosa y se transfirieron a membranas de nylon de 0,45 μm de diámetro de poro cargadas positivamente (Boehringer Mannheim, ref 1417240), siguiendo el protocolo de transferencia alcalina descrito por Reed y Mann (1985).

La membrana, del tamaño del gel, se sumergió NaOH 0,4 N, durante 5 min; entonces el gel se transfirió a una solución 0,25 N de HCl hasta que se produjo el viraje de color del indicador azul de bromofenol, de azul a amarillo, aproximadamente 10 min, este tratamiento ácido produjo roturas del ADN, facilitando su posterior transferencia. El gel se introdujo de nuevo en NaOH 0,4 N, hasta que se observó de nuevo el cambio de color del indicador, ahora de amarillo a azul.

Sobre un cristal, se colocó una tira de papel Whatman 3MM, del mismo ancho que el gel, de manera que los extremos quedasen sumergidos en la solución de transferencia, colocada en un reservorio inferior. Sobre el papel se colocó el gel en posición invertida y sobre éste la membrana, sobre la cual se depositaron tres tiras de papel Whatman 3MM, abundante papel absorbente y un peso de aproximadamente 0,5 Kg, de esta forma la solución de transferencia asciende por capilaridad a través del gel arrastrando el ADN hasta la membrana, donde quedó covalentemente retenido. La transferencia total del ADN del gel a la membrana requirió entre 12-16 h.

La membrana se lavó en 2xSSC durante 5 min permitiendo su neutralización y la eliminación de posibles restos de agarosa, para asegurar la fijación del ADN a la membrana, se expuso, una vez seca, a luz UV (254 nm) durante 3 min por cada lado.

Las membranas se conservaron a temperatura ambiente selladas en bolsas de plástico hasta su utilización.

11.2. Marcaje de ADN lineal.

El marcaje de la sonda con digoxigenina y la detección de los híbridos ADN-ADN se realizó utilizando el kit de Boehringer Mannheim (ref. 1093657). Las sondas de ADN se marcaron con digoxigenina-dUTP, mediante extensión con el fragmento Klenow de la ADN-polimerasa de *E. coli*, y utilizando como cebadores una mezcla

aleatoria de hexanucleótidos. El marcaje de la sonda y su recuperación se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante.

11.3. Prehibridación e hibridación.

Se utilizó un horno de hibridación (Techne Hybridiser HB-1D, Cambridge). Tras 2-8 horas de prehibridación a 42°C con la solución de hibridación se retiró parcialmente esta solución, manteniéndose 2,5 ml/100 cm². Entonces se añadieron 20-200 ng de sonda marcada y desnaturalizada, y posteriormente se realizó la hibridación durante 6-15 horas a 42°C. El lavado de las membranas se realizó en las siguientes condiciones de fuerza iónica y temperatura: dos lavados de 5 min cada uno a temperatura ambiente en 2xSSC; un lavado de 10 min a temperatura ambiente con 1xSSC; y un último lavado de 10 min a 68°C en 0,1xSSC. Cuando se emplearon sondas heterólogas se omitió el último lavado.

La composición de la solución de hibridación fue la siguiente:

5xSSC; Formamida, 50% (v/v); 0,02% (p/v) SDS; 5% (p/v) Agente bloqueante; H₂O hasta 20 ml/100 cm² de membrana.

11.4. Reacción Inmunológica.

Tras lavar la membrana con solución tampón 1, esta se incubó en 100 ml de solución tampón 2 durante 30 minutos. A continuación se lavó con tampón 1 y se incubó con 20 ml de solución de anticuerpo (anti-digoxigenina-fosfatasa alcalina conjugado) diluido en tampón 1 durante 30 min. Posteriormente, se realizaron dos lavados de 15 min con 100 ml de tampón para eliminar el anticuerpo no unido. A continuación la membrana se equilibró con 20 ml de solución tampón 3 durante 2 minutos y finalmente se incubó con 10 ml de la solución colorante durante 12-24 horas en oscuridad. La reacción se detuvo lavando con 50 ml de TE durante 5 minutos.

La composición de las soluciones utilizadas en este proceso fueron las siguientes:

- Tampón 1: Tris-HCl pH 7, 100 mM; y NaCl, 150 mM.
- Tampón 2: Bloqueante 0,5% (p/v) en tampón 1.
- Tampón 3: Tris-HCl pH 9,5, 100 mM; NaCl, 100 mM; y MgCl₂, 50 mM.
- Solución de anticuerpo: Anticuerpo anti-digoxigenina-fosfatasa alcalina conjugado, preparado en 20 ml de tampón 1 a una concentración final de 150 mU/ml.
- Solución colorante: NBT, 45 µl; X-fosfato, 35 µl; y tampón 3, c.s.p. 10 ml.

Tanto el bloqueante como la solución de nitroblue tetrazolium (NBT) y 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (X-fosfato) fueron suministradas en un kit comercial de Boehringer Mannheim (ref. 1093657).

12. MICROCOSMOS EDÁFICOS.

Los estudios en microcosmos intentan reproducir en el laboratorio un ambiente natural, en este caso el suelo, con la intención de controlar distintas condiciones propias del hábitat de origen (temperatura, humedad, etc.).

Se utilizaron dos tipos de suelos de marga arenosos cuyas características físico-químicas se describen en la **Tabla 5**. Las características granulométricas de estos suelos se muestran en la **Tabla 6**.

Tabla 5. Características físico-químicas de los suelos utilizados.

Tipo	Materia orgánica	Relación C/N	CaCO ₃ (% p/p)	pH	Procedencia
Cambisol	0,6	10,2	20,4	7,5	Olivo
Fluvisol	2,3	10,1	6,4	8,0	Chirimoyo

Tabla 6. Características granulométricas de los suelos:

Tipo	Composición (%)		
	Arena	Sedimento	Arcilla
Cambisol	57,42	27,61	14,97
Fluvisol	61,08	32,47	6,45

Antes de su utilización, los suelos se tamizaron a través de una criba metálica de 4 mm. Cuando fue necesario los suelos se esterilizaron en el autoclave a vapor fluyente a 120°C durante 1 hora, tres veces consecutivas, esperando entre cada esterilización aproximadamente 24 horas para permitir el enfriamiento del suelo y la germinación de esporas de microorganismos gram-positivos y de hongos, si las hubiese (Ciafardini y Marotta, 1989).

Se llenaron recipientes de cristal con 70-90 g de suelo. El inóculo se preparó como se indica a continuación: células cultivadas durante 10-12 horas a 30°C con agitación en el medio apropiado y suplementado con los antibióticos requeridos, se recogieron por centrifugación a 6000 g y 15°C durante 15 minutos. Las células se lavaron dos veces con tampón 1 x M9 y posteriormente se resuspendieron en el mismo tampón a la densidad requerida. Se añadió 1 ml de esta suspensión celular a cada uno de los microcosmos y las células se mezclaron con el suelo con la ayuda de una varilla de

vidrio estéril. Los microcosmos se mantuvieron tapados a una temperatura constante de 25 °C, salvo que se especifique lo contrario.

Periódicamente se tomaron alícuotas de 10 g de suelo, se suspendieron en 90 ml de tampón 1 x M9 y se mantuvieron en un agitador a 200 rpm y 30°C durante 30-60 minutos. A continuación se hicieron diluciones seriadas y las bacterias se sembraron en placas de medio selectivo. La primera muestra (indicada como "muestra a tiempo=0") se tomó 2 horas después de la inoculación. La toma de muestras se prolongó durante al menos 14 días. Por este método, el límite mínimo de detección fue de 100 UFC por g de suelo.

13. EXPERIMENTOS DE COLONIZACIÓN DE LA RIZOSFERA.

13.1. Aislamiento y caracterización preliminar de cepas bacterianas de la rizosfera del maíz.

Para el aislamiento de bacterias de la rizosfera de plantas de maíz, cultivadas tanto en condiciones controladas en un invernadero, como en condiciones medioambientales en una parcela con largo historial de cultivo de esta planta. Se partió de tres sistemas radiculares distintos que se sacudieron vigorosamente en bolsas de plástico para liberar el suelo no adherido a la raíz. La fracción de suelo adherido a la raíz, la rizosfera, se extrajo mediante la suspensión de los sistemas radiculares en medio mínimo M9 agitación a 200 rpm durante 30 min a temperatura ambiente. A partir de esta suspensión se realizaron diluciones seriadas que se sembraron en placas de 1/10 de LB o medio mínimo M9 glucosa, glicerol o ácido *p*-hidroxifenilacético como única fuente de carbono. Se seleccionaron y purificaron un total de 14 colonias representativas de los distintos tipos morfológicos presentes en las placas.

Las bacterias aisladas se caracterizaron utilizando procedimientos estándares, tales como tinción de Gram y ensayos fisiológicos y metabólicos. La tinción de Gram se realizó utilizando el sistema "Acustain Gram Stain" (Sigma, ref HT90).

Cuatro cepas se identificaron como Gram positivas, denominadas EEZ-101 a EEZ-104, y 10 Gram negativas, denominadas EEZ-201 a EEZ-210 (**Tabla 1**). Estas cepas se clasificaron a nivel de género o especie mediante análisis de fosfolípidos totales llevado a cabo por Microbial Identification System Inc, Essex Junction VT, USA.

Posteriormente, se realizó un test de resistencia/sensibilidad a antibióticos a las 14 cepas por el método de difusión en agar (Sukupolvi *et al.*, 1984). Los antibióticos se adicionaron en discos a las siguientes cantidades en µg: ácido nalidíxico, 30;

ampicilina, 10; cloranfenicol, 15; estreptomina, 10; kanamicina, 30; neomicina, 30; piperacilina, 100; rifampicina, 30; tetraciclina, 30; y vancomicina 30.

13.2. Plantas utilizadas.

En este estudio se emplearon semillas de distintas plantas de interés agrícola: acelga (*Beta vulgaris*), espinaca (*Spinacia oleracea*) y tomate (*Lycopersum esculentus*), variedad América 3 suministradas por Semillas Fitó; haba (*Vicia faba*), variedad Aguadulce, suministradas por Gil Mascarell Hnos. S.L y maíz (*Zea mays*), variedad de ciclo corto, suministradas por Bolívar S.L. (Granada).

13.3. Esterilización de semillas.

La superficie de las semillas se esterilizó mediante incubación durante 20 minutos con agitación en una solución que contenía 4 mM de HgCl₂ y 1ml/l de Tween 80. Entonces, las semillas se lavaron cuatro veces consecutivas en agua estéril durante 5 min.

13.4. Inoculación de semillas.

El inóculo se preparó como se indica a continuación: células cultivadas durante 10-12 horas a 30°C con agitación en el medio apropiado y suplementado con los antibióticos requeridos, se recogieron por centrifugación a 6000 g y 15°C durante 15 minutos. Las células se lavaron dos veces con tampón 1 x M9 y, posteriormente, se resuspendieron en el volumen necesario del mismo tampón a la densidad celular requerida para cada experimento. Las semillas a utilizar se sumergieron en la correspondiente suspensión bacteriana, entonces se incubaron a 30°C con agitación (200 rpm) durante 30 minutos. Posteriormente, se decantó la suspensión celular y las semillas se dejaron secar sobre papel de filtro durante 30 min.

En los experimentos de coinoculación de semillas con dos cepas bacterianas distintas, las suspensiones celulares se mezclaron a la densidad celular requerida inmediatamente antes de la inmersión de las semillas.

Para el recuento de las bacterias adheridas a la semilla, se introdujeron tres de éstas en tubos de ensayo con tampón 1 x M9 [desde 1ml para las semillas de pequeño tamaño (acelga, espinaca, tomate y maíz) a 5ml para las semillas de haba]. La suspensión se agitó vigorosamente durante 2 min para separar las bacterias de la semilla y, posteriormente, se hicieron diluciones seriadas de esta solución bacteriana que se sembraron en placas del medio requerido conteniendo los antibióticos apropiados.

13.5. Experimentos en el invernadero.

Las condiciones de mantenimiento del invernadero fueron las siguientes: temperatura, 25°C; humedad relativa, 50%, mantenida mediante un atomizador de agua; y fotoperiodo natural.

Se utilizaron tubos de cristal (15 cm de longitud x 3 cm de diámetro), conteniendo 200 gramos de suelo tipo cambisol tamizado, para los experimentos de colonización de la rizosfera de plantas por cepas bacterianas en suelo estéril. Tras añadir 50 ml de H₂O a cada tubo, el suelo se esterilizó como se describió en el apartado 12 de esta sección. Posteriormente, tres semillas de maíz, inoculadas con la(s) cepa(s) a estudiar a la densidad celular requerida, se sembraron en cada tubo a 1 cm de profundidad.

Para los experimentos realizados en suelo no estéril, macetas de 10 cm de diámetro se llenaron con 800 g de una mezcla cambisol: arena en relación 3:2. En cada maceta se sembraron 3-4 semillas inoculadas con las cepas correspondientes. En este caso se procedió a riegos semanales por capilaridad. El riego de las macetas se realizó semanalmente y por capilaridad, para ello, las macetas se situaron en bandejas de plástico de 60 cm de longitud x 30 cm de anchura x 10 cm de profundidad, en las que se vertieron aproximadamente 3 l de H₂O.

13.6. Supervivencia de cepas bacterianas en la rizosfera y en el suelo no rizosférico.

Tras la germinación de las semillas y la aparición de la primera hoja (tiempo=0), se tomaron muestras a distintos intervalos de tiempo para determinar el número de UFC presentes tanto en la rizosfera como en el suelo no rizosférico. Para ello, se extrajeron del suelo las raíces de las plantas a analizar y el suelo no rizosférico se separó de las raíces sacudiéndolas en una bolsa de plástico. El conteo del número de UFC por g de suelo no rizosférico se realizó como se describió en el apartado 12 de esta sección.

Para calcular el número de UFC por g de suelo rizosférico en primer lugar se determinó el peso del conjunto formado por la rizosfera y raíz. Posteriormente, y para separar la porción correspondiente a la rizosfera, este conjunto se introdujo en un matraz Erlenmeyer con 90 ml de medio mínimo M9 sin fuente de carbono y se agitó durante 30 minutos en un agitador de mesa Heidolph a 200 rpm. A partir de esta solución, se hicieron diluciones seriadas que se sembraron en medio selectivo. Tras la extracción del suelo rizosférico, se determinó el peso de la raíz limpia y el valor obtenido se sustrajo del peso del conjunto formado por la raíz y la rizosfera, obteniéndose así el peso del suelo que conformaba la rizosfera.

14. SUPERVIVENCIA DE MICROORGANISMOS EN CONDICIONES MEDIOAMBIENTALES.

14.1. Localización, descripción y preparación de la parcela experimental.

En primer lugar se obtuvieron los permisos pertinentes del Ministerio de Obras Públicas y Transporte, en la actualidad Ministerio de Medioambiente, para llevar a cabo liberaciones al medioambiente de microorganismos manipulados genéticamente en condiciones controladas. La parcela experimental donde se realizó la liberación de cepas bacterianas se localiza dentro del área experimental de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC-Granada). Se trata de un campo de ensayos agrícolas controlado de unos 96 m², rodeado de una valla de aproximadamente 1,5 m de altura.

Por disposición de las autoridades competentes, antes de iniciar la liberación de microorganismos, el suelo de la parcela se excavó hasta una profundidad de aproximadamente 3 metros y, posteriormente, se procedió a cubrir el área excavada tanto basal como lateralmente con tres capas de plástico de 1 mm de espesor cada una. A continuación, se restituyó la tierra desplazada de la parcela.

14.1.1. Liberación de cepas no modificadas genéticamente.

Semillas de haba o maíz, inoculadas con la cepa de *P. putida* KT2442 como se describe en el apartado 13.4 de esta sección, se sembraron en la parcela experimental en filas paralelas, manteniendo una distancia de aproximadamente 1 m entre ellas y alternando las filas sembradas con semillas inoculadas con otras sembradas con semillas no inoculadas. Para evitar la propagación del microorganismo fuera de la parcela experimental, ésta se rodeó con una zona tampón sin inocular de unos 2 metros de anchura.

14.1.2. Liberación de una cepa portadora de un sistema de contención biológica.

Los ensayos realizados para estudiar el comportamiento en condiciones medioambientales de la cepa contenida biológicamente *P. putida* CMC4 (**Tabla 1**) y su control *P. putida* EEZ32 (**Tabla 1**) se realizaron en macetas distribuidas en subzonas dentro de la parcela experimental. En una tanda de macetas, que contenía suelo suplementado o no con 0,01% (p/p) de 3-metilbenzoato, se sembraron semillas inoculadas con la cepa portadora del sistema de contención biológica, o con la cepa control carente del mismo. Otra tanda de macetas, en las cuales no se introdujeron semillas, contenían suelo inoculado con las cepa contenida o con la cepa control (**Figura 4**).

Para evitar la contaminación cruzada de las diferentes subáreas con las cepas introducidas, los grupos de macetas se separaron entre sí por una zona de terreno de un metro de distancia. Además, el área experimental se rodeó de una zona de seguridad de 1 m. en la que tampoco se introdujo ningún tipo de microorganismo (**Figura 4**).

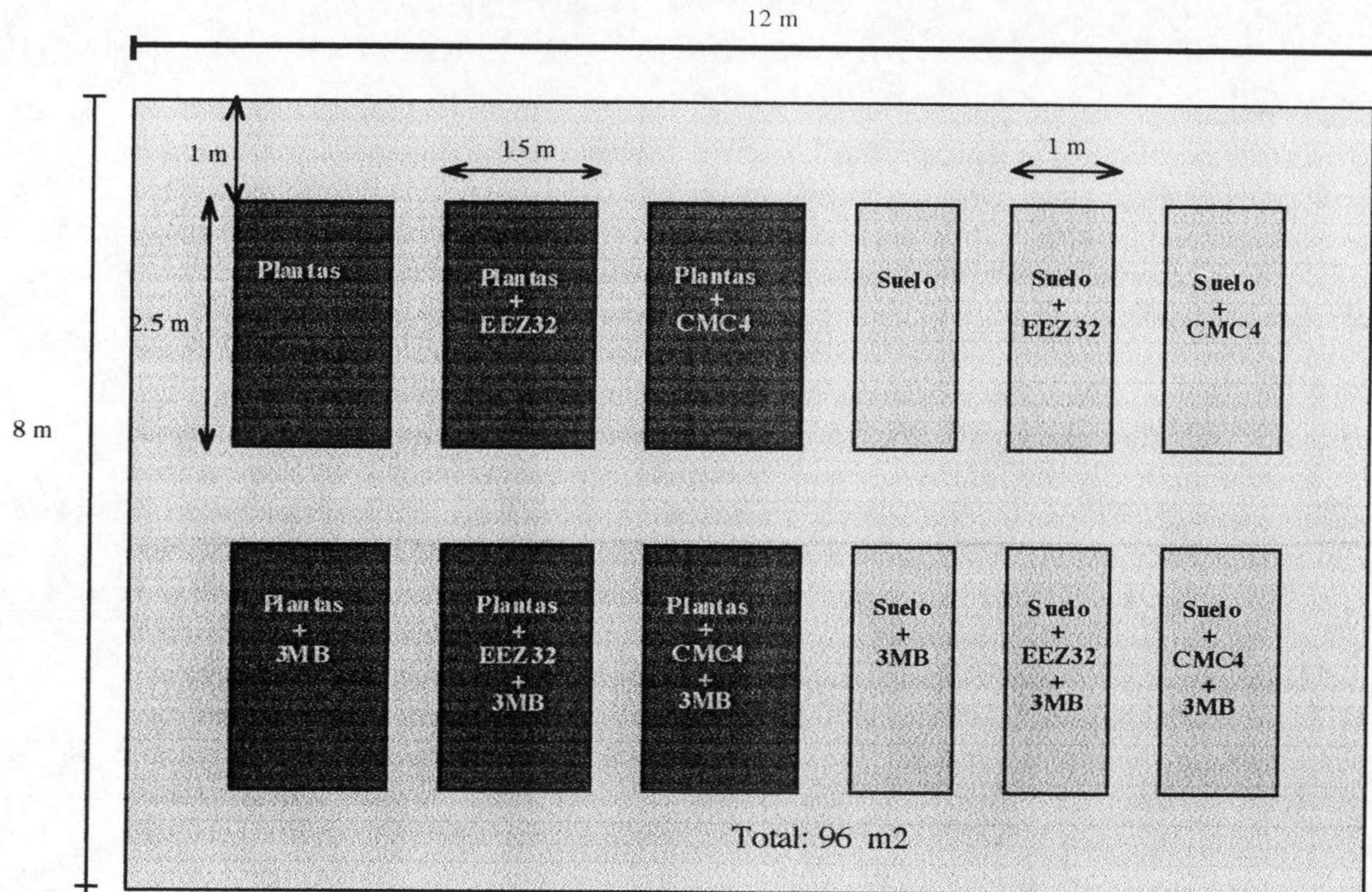


Figura 4. Diseño de la parcela experimental. Se muestra la distribución de las distintas subáreas en las que se dividió la parcela experimental en el ensayo de liberación de la cepa contenida biológicamente *P. putida* CMC4 y su control *P. putida* EEZ32.

14.2. Liberación en suelos sin planta.

La liberación de cepas bacterianas en suelos sin planta se realizó en mesocosmos consistentes en macetas de 10 cm x 13 cm o en macetas de 40 cm de diámetro x 45 cm de profundidad, las cuales se llenaron con 1 ó 40 kg, respectivamente, de suelo cambisol.

La inoculación de mesocosmos, consistentes en macetas que contenían 1 Kg de suelo, se realizó mezclando con el suelo 10 ml de una suspensión bacteriana que contenía una densidad celular de 10^8 UFC por ml. El procedimiento a seguir fue el descrito en el apartado 12 de esta sección para los microcosmos inoculados en el invernadero. Los mesocosmos de 40 Kg de suelo, utilizados para la liberación de la cepa bioluminiscente *P. putida* S1B1 (**Tabla 1**), se inocularon utilizando un preinoculó consistente en 1 Kg de suelo mezclado con 10 ml de una solución bacteriana que contenía 10^9 UFC de la cepa bacteriana correspondiente. Posteriormente se mezcló todo el contenido del mesocosmos para homogeneizar la distribución de la cepa estudiada.

Estos mesocosmos se regaron con una frecuencia semanal, a partir del sistema de riego por aspersión instalado en el área experimental de la Estación Experimental del Zaidín.

14.3. Liberación en la rizosfera.

En las liberaciones llevadas a cabo en el periodo de primavera-verano se utilizaron semillas de maíz de ciclo corto, en los ensayos de otoño-invierno se utilizaron semillas de haba. Las semillas se inocularon con la cepa correspondiente como se describe en el apartado 13.4 de esta sección y posteriormente se plantaron a aproximadamente 1 cm de profundidad.

El sistema y frecuencia de riego fue el mismo que el empleado en el apartado anterior.

15. MEDIDAS DE EMISIÓN DE LUZ.

La actividad luciferasa se determinó en cultivos líquidos según Rattray *et al.* (1995) como se describe a continuación: a 0,5 ml de una suspensión bacteriana con una turbidez de 0,01 a 660 nm se añadieron 0,4 ml de una solución de *n*-decanal al 0,01% (vol/vol) y el patrón de emisión de luz se registró en un luminómetro LKB1250 durante 1 min. La actividad luciferasa se estimó como la altura del pico de emisión de luz, en unidades de luz relativa por unidad de turbidez.

Para la detección de la cepa bioluminiscente de *P. putida* S1B1 (Rif^R Km^R) en muestras de suelo se siguió un protocolo similar al descrito por Shaw *et al.* (1992): un g del suelo a analizar se inoculó en 5 ml de medio LB con Km y cicloheximida. Tras 24 h

de incubación a 30°C, se determinó la emisión de luz utilizando una alícuota de 0.5 ml del cultivo como se describió anteriormente. El límite de detección de la cepa *P. putida* S1B1 en muestras de suelo usando esta técnica se estableció en 5 UFC por g de suelo (C. Ramos, datos no publicados).

16. DETECCIÓN DE LA LUMINISCENCIA POR AUTORADIOGRAFÍA Y POR CÁMARA DETECTORA O CONTADORA DE FOTONES.

Para la detección de la bioluminiscencia por autorradiografía, se llenaron tubos de cristal de 35 cm de longitud x 3 cm de diámetro con 200 g de vermiculita y se regaron con 75 ml de agua. Una semilla de la planta a analizar, inoculada con la cepa bioluminiscente a estudiar, se sembró en tubo a 1 cm de profundidad. Las semillas se incubaron a una temperatura 25°C y un fotoperiodo natural en un invernadero. Después de 1 a 2 semanas crecimiento, se extrajeron las plantas y las raíces, limpias de vermiculita, se situaron en un papel de filtro impregnado de *n*-decilaldehído al 0,01% (v/v), y se cubrieron con una capa de plástico. Las raíces, en estas condiciones, se expusieron a una película Kodak XRP5 RP X-Omat durante un periodo de tiempo no inferior a 4 h.

Para la visualización de la bioluminiscencia mediante el uso de una cámara CCD Hamamatsu C-2400, tubos de plástico de 15 cm de longitud x 3 cm de diámetro se llenaron con 50 g de suelo fluvisol no estéril, que se incubaron en una cámara de crecimiento a una temperaturas día/noche de 25/18°C con un fotoperiodo de 12 h. Transcurridos 6 días después de la siembra, las raíces se extrajeron, se situaron sobre un papel del filtro y se cubrieron con un material plástico transparente impregnado de *n*-decanal. Las muestras se introdujeron en una cámara oscura, en la que estaba situada la cámara CCD. Para la toma de una fotografía de transmisión, se encendió el dispositivo de iluminación interna de la cámara oscura y las muestras se expusieron a un campo luminoso durante 3-5 segundos. Posteriormente, la puerta se cerró y las muestras se expusieron a un campo oscuro durante 5 minutos. Las imágenes obtenidas por la cámara CCD se procesaron con el "software" Argus-10 y se sometieron a un posterior tratamiento mediante el uso del programa Adobe Photoshop.

17. ENSAYO ENZIMÁTICO DE LA ACTIVIDAD β -GALACTOSIDASA.

La medida de actividad β -galactosidasa se realizó en células permeabilizadas según el método descrito por Miller (1972). Este sistema se basa en una reacción colorimétrica en la que el *o*-nitrofenil- β -galactopiranosido (ONPG), sustrato incoloro de

la β -galactosidasa, es hidrolizado por el enzima obteniéndose galactosa y *o*-nitrofenol, un compuesto de color amarillo cuya concentración se determinó espectrofotométricamente.

Se partió de 3 ml de cultivo en el medio seleccionado suplementado con los antibióticos correspondientes en cada caso que habían sido incubados a 30°C durante 12-14 horas. Estos cultivos se diluyeron 100 veces en 3 ml del mismo medio por duplicado y se incubaron en agitación a 30°C durante 1 h. Posteriormente se procedió a la inducción de uno de los duplicados añadiendo una solución de la fuente de carbono y/o nitrógeno seleccionada hasta conseguir una concentración final 0.5 mM para el caso de los compuestos utilizados como fuente de carbono y 20mM para el caso de la fuente de nitrógeno.

Generalmente, tras 5 horas de incubación en agitación a 30°C, se tomaron alícuotas de 100 μ l de cultivo a las que se añadió 100 μ l de una solución de bromuro de alquil-trimetil-amonio (MATAB) con objeto de permeabilizar las células y se incubaron en hielo durante 20 minutos. La determinación de la actividad β -galactosidasa se realizó en un baño a 30°C, tras añadir a una mezcla de células permeabilizadas 0,8 ml de tampón Z y 0,2 ml de solución de ONPG. La reacción se detuvo añadiendo 2 ml de una solución 0,5 M de NaCO₃. La concentración de *o*-nitrofenol se estimó espectrofotométricamente determinando la absorbancia a 420 nm. Para cada muestra se realizó además una medida a 550 nm para corregir la turbidez y se determinó también la densidad celular de los cultivos utilizados en los ensayos midiendo su turbidez a 660 nm.

La actividad β -galactosidasa expresada en unidades de Miller se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Unidades } \beta\text{-galactosidasa} = \frac{A_{420} - 1,7 \times A_{550}}{t \times Y \times A_{660}} \times 1000$$

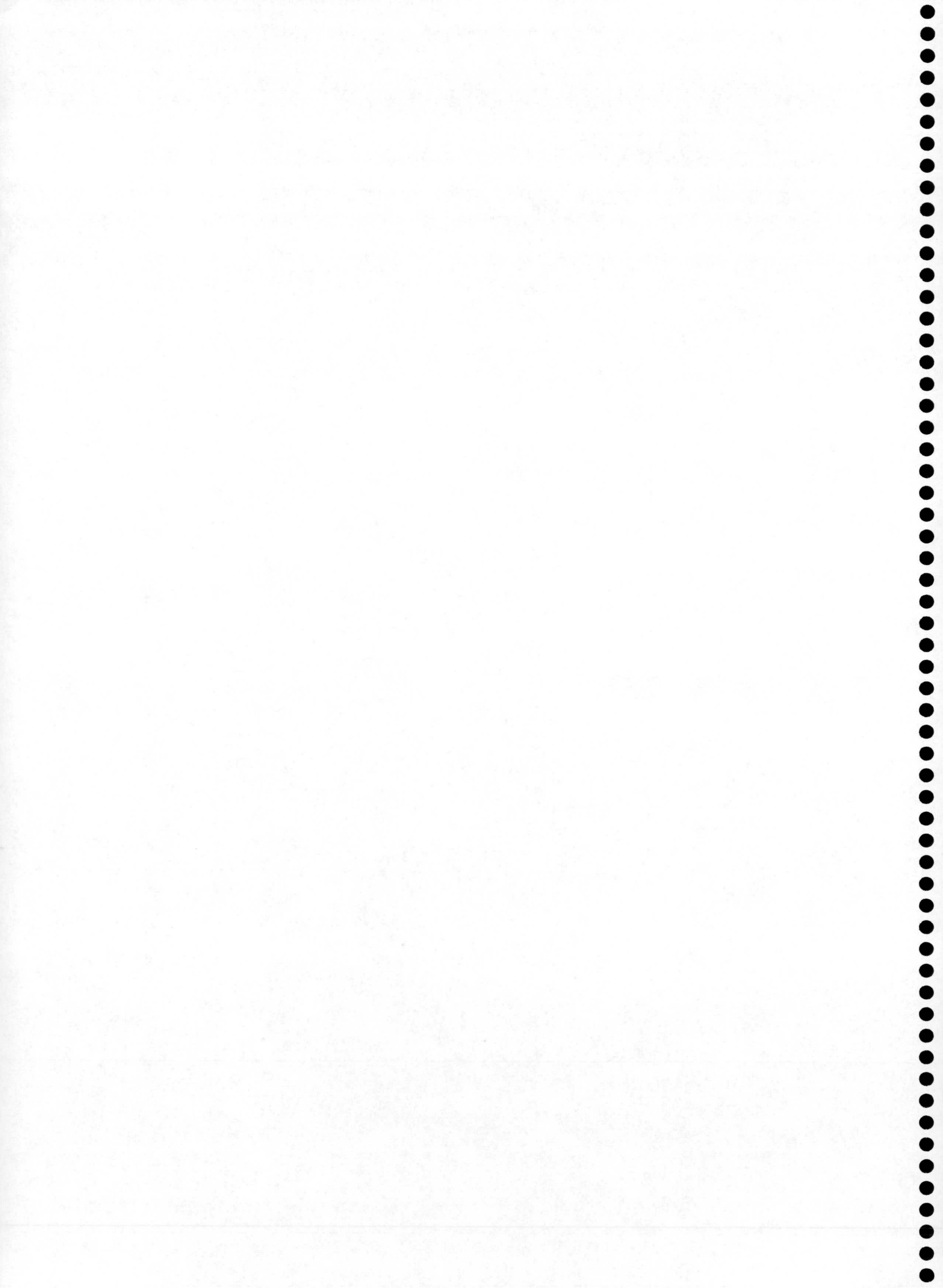
Donde t representa el tiempo de ensayo en minutos y V el volumen de células permeabilizadas que se utilizó en el ensayo en mililitros.

Las soluciones empleadas en este ensayo se conservaron a 4°C y su composición fue la siguiente:

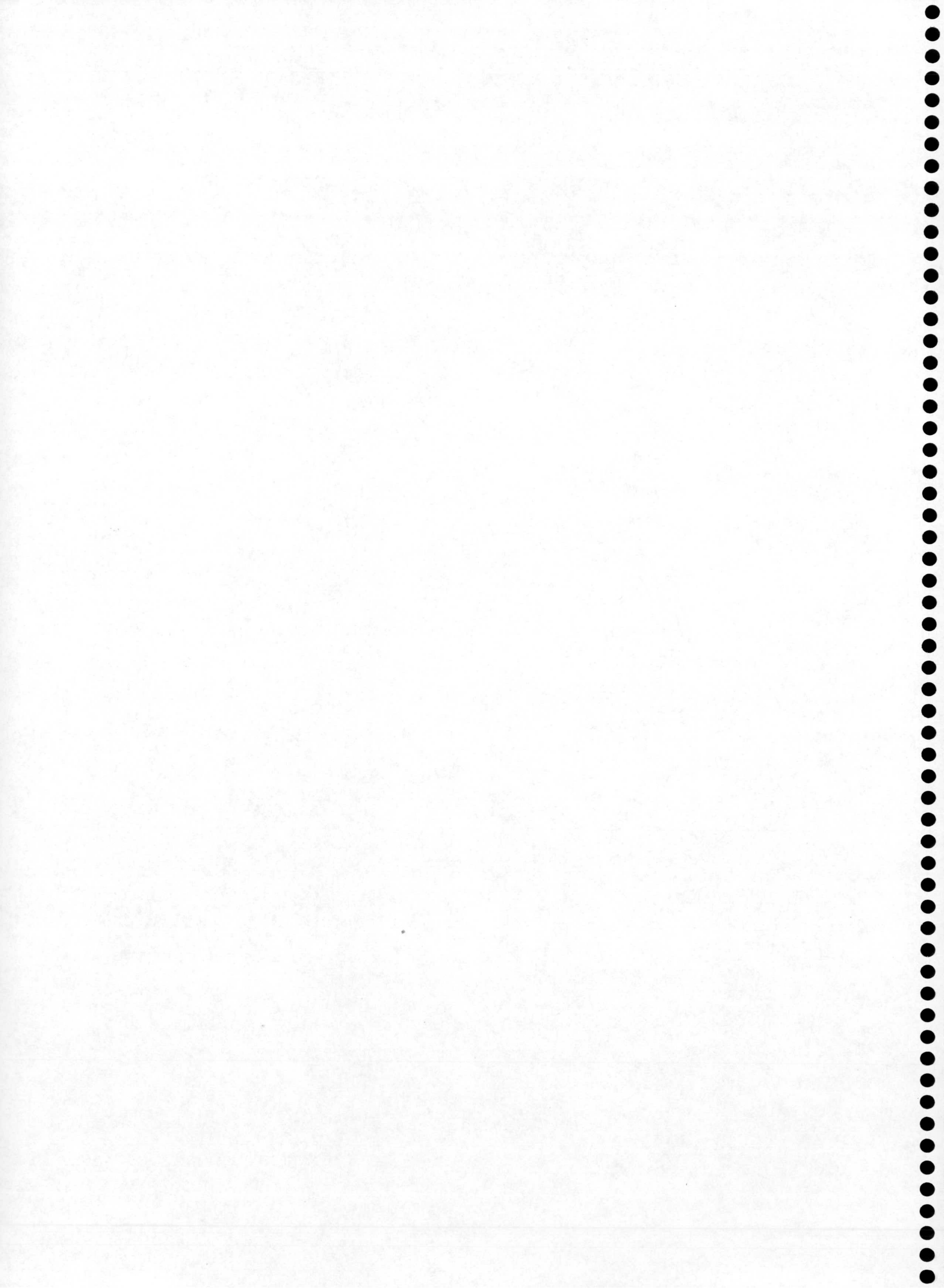
-MATAB: 20 mg de bromuro de alquil-trimetil-amonio en una solución de 0,2 M de Tris-HCl pH 8.

-Tampón Z: Na₂HPO₄, 60 mM; NaH₂PO₄, 40 mM; KCl, 10 mM; MgSO₄, 1mM; b-mercaptoetanol, 50 mM. Esta solución es estable a 4°C

-ONPG: 40 mg de *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido se disolvieron en 10 ml de tampón fosfato 0,1 M pH 7. Esta solución es estable a 4°C en la oscuridad.



RESULTADOS



I. COLONIZACIÓN DE LA RIZOSFERA DE PLANTAS DE INTERÉS AGRÍCOLA POR UNA CEPA BIOLUMINISCENTE DERIVADA DE *Pseudomonas putida* mt-2 EN CONDICIONES CONTROLADAS DE INVERNADERO.

Como ya se mencionó en la sección de *Introducción* de esta Tesis Doctoral, las cepas del género *Pseudomonas*, y en concreto las derivadas de la *P. putida* mt-2, poseen una gran capacidad metabólica siendo capaces de degradar una gran variedad de compuestos recalcitrantes. Esta característica, unida al hecho de que estas cepas se establecen y sobreviven bien en microcosmos edáficos (Ramos *et al.*, 1991; Ronchel *et al.*, 1995), las hacen candidatas a ser utilizadas como agentes en la eliminación de contaminantes orgánicos del medio ambiente.

Hasta la fecha, existen pocos datos sobre la supervivencia de estas cepas en entornos naturales y sobre los posibles efectos que la introducción de las mismas en el medio ambiente podrían ejercer sobre la microbiota indígena del suelo. Una aproximación lógica a esta cuestión sería el estudio del comportamiento de estas cepas en condiciones controladas para, de una parte, evitar la selección de cepas incapaces de establecerse en el entorno problema o capaces de afectar la supervivencia de la población natural del emplazamiento elegido y, por otra parte, estudiar el efecto de la modificación de algunas de las condiciones del entorno (temperatura, humedad, etc) como aproximación a la variabilidad característica del medio ambiente.

Una dificultad añadida al estudio de la supervivencia de un microorganismo en entornos naturales es la selección de un sistema de seguimiento eficaz. Tradicionalmente se han empleado marcadores de resistencia a determinados antibióticos, pero este sistema sólo permite el estudio del comportamiento de un microorganismo *ex situ*. En este trabajo, el seguimiento de las cepas utilizadas en placas de medio selectivo se ha completado con el marcaje de las mismas con los genes codificadores de la luciferasa de *V. harveyi*. Este sistema permite la detección bioluminiscente de las células que lo portan sin eliminar el resto de la población bacteriana, lo que permite el estudio de interacciones entre las distintas comunidades bacterianas de un entorno y posibilita la realización de estudios *in situ*.

En este capítulo se describe la supervivencia de un derivado bioluminiscente de la cepa *P. putida* KT2440 en comparación a la cepa parental, en entornos edáficos

desnudos o influenciados por los exudados de la raíz de distintas plantas de interés agrícola y el estudio *in situ* del patrón de colonización de la rizosfera de estas plantas de interés comercial. Los experimentos descritos se realizaron en condiciones de humedad y temperatura controladas en un invernadero.

1. CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE LA CEPA BIOLUMINISCENTE *P. putida* S1B1.

La cepa bioluminiscente *P. putida* S1B1, un derivado bioluminiscente de *P. putida* KT2442, contiene en el cromosoma una inserción de un mini-Tn5/*luxAB*-Km. La expresión de los genes *luxAB* se produce de forma constitutiva a partir de un promotor cromosómico (C. Ramos, datos no publicados).

En primer lugar se comprobó la estabilidad del transposón mini-Tn5/*luxAB*-Km en el cromosoma de *P. putida* S1B1 como se describe en el apartado 6 de *Materiales y Métodos*. Tras crecer esta cepa durante más de 50 generaciones en ausencia del antibiótico kanamicina, el 100% de las colonias mantuvieron la resistencia a dicho antibiótico y mostraron el fenotipo bioluminiscente después del crecimiento, lo que sugiere que el mini-Tn5 se mantiene estable en el cromosoma en ausencia de presión selectiva.

A continuación se comprobó que la inserción descrita anteriormente no afectó al crecimiento de la cepa *P. putida* S1B1 en medio rico y en medio mínimo. El tiempo de generación de esta cepa, calculado como se describe en el apartado 4 de *Materiales y Métodos*, fue similar al calculado para la cepa parental *P. putida* KT2442 tanto en medio rico LB (aproximadamente 55 minutos), como en medio mínimo con diferentes fuentes de carbono y/o nitrógeno (glucosa, benzoato o prolina, aproximadamente 110, 100 y 95 min, respectivamente). Los resultados se muestran en la **Tabla 1.I**.

Tabla 1.I. Tiempos de generación de las cepas *P. putida* KT2442 y su derivado luminescente *P. putida* S1B1 en distintos medios de cultivo. Cultivos estacionarios de las cepas *P. putida* KT2442 o *P. putida* S1B1 se diluyeron en los medios indicados hasta alcanzar una turbidez de 0,02 (D.O._{660nm}). A continuación, se siguió el crecimiento de estas cepas en los distintos medios durante la fase exponencial en la que se estimó el tiempo de generación que se expresa en minutos.

Cepas	LB	M9-glucosa	M9-benzoato	M8-prolina
KT2442	53	111	103	96
S1B1	55	110	98	93

2. SUPERVIVENCIA DE *P. putida* S1B1 EN MICROCOSMOS EDÁFICOS.

Los experimentos descritos a continuación se realizaron para comprobar si la inserción del mini-Tn5::*luxAB*-Km en el cromosoma de S1B1 afectaba a la supervivencia de esta cepa en entornos edáficos.

2.1. Supervivencia en suelos tipo cambisol.

P. putida S1B1 o *P. putida* KT2442 se introdujeron en microcosmos que contenían 90 g de suelo cambisol (pobre en materia orgánica) a dos densidades celulares diferentes, a saber, 10^4 y 10^8 UFC por g de suelo. Los microcosmos se incubaron a 25°C en un invernadero (*Materiales y Métodos*, apartado 12). Siete días después de la inoculación, e independientemente de la densidad celular inicial y de la cepa inoculada se detectaron alrededor de 10^6 a 10^7 UFC por g de suelo. Esta densidad celular se mantuvo durante 21 días y, al final del ensayo (30 días), se detectaron aproximadamente 10^4 - 10^5 UFC por g de suelo para ambas cepas (**Figura 1.I**)

A continuación, se determinó la supervivencia a largo plazo de ambas cepas en suelo cambisol. Para ello, *P. putida* S1B1 o *P. putida* KT2442 se introdujeron en microcosmos de suelo cambisol a una densidad celular de aproximadamente 10^5 UFC por g de suelo. El comportamiento de ambas cepas fue similar, el número de UFC por g de suelo disminuyó progresivamente a lo largo del tiempo y, al cabo de 70 días, no se detectó la presencia de ninguna de ellas mediante siembra en placas de medio selectivo (límite de detección, 100 UFC por g de suelo) (**Figura 2.I**).

El fenotipo bioluminiscente de la cepa *P. putida* S1B1 se utilizó para comprobar la supervivencia a largo plazo de esta cepa en el suelo. A partir del día 70, y hasta el final del ensayo, (370 días), esta cepa se detectó en las muestras de suelo mediante enriquecimiento selectivo y la posterior medida de la emisión de luz como se describe en el apartado 15 de *Materiales y Métodos*.

Dado que en todos los casos analizados el comportamiento de ambas cepas fue similar, independientemente del tamaño inicial del inóculo y del tiempo de muestreo, puede afirmarse que la inserción del mini-Tn5 en el cromosoma de *P. putida* S1B1 no afectó a la supervivencia de esta cepa en suelo cambisol.

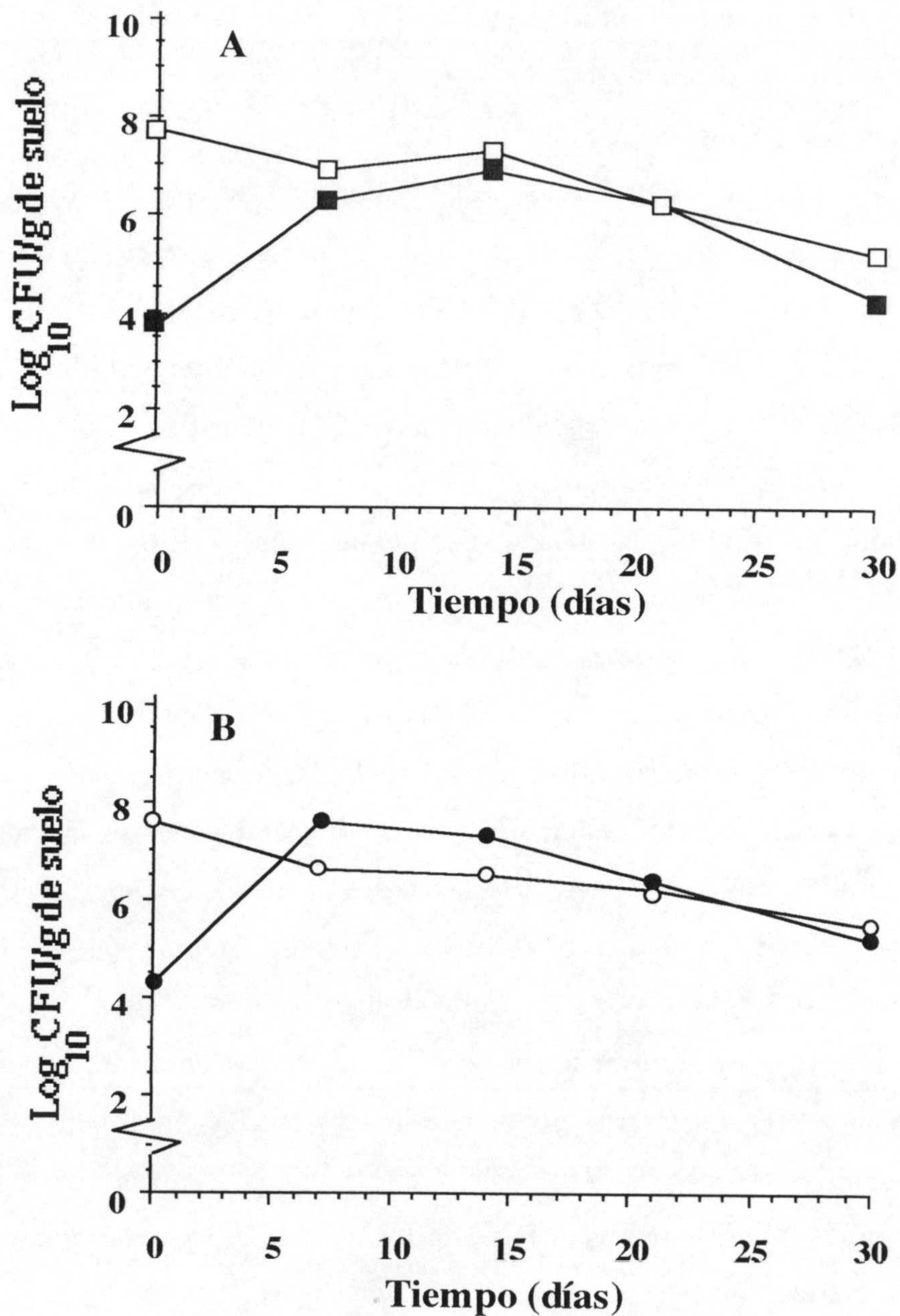


Figura 1.I. Supervivencia de la cepa *P. putida* KT2442 y su derivado bioluminiscente *P. putida* S1B1 en suelo cambisol. Un suelo cambisol (90 g) se inoculó con dos densidades celulares diferentes, 10⁴ (símbolos cerrados) y 10⁸ (símbolos abiertos) UFC por g de suelo de las cepas *P. putida* KT2442 (A) o *P. putida* S1B1 (B). Los microcosmos se incubaron a 25°C en un invernadero. A los tiempos indicados se estimó el número de UFC por g de suelo de cada una de las cepas mediante siembra en placas de medio selectivo.

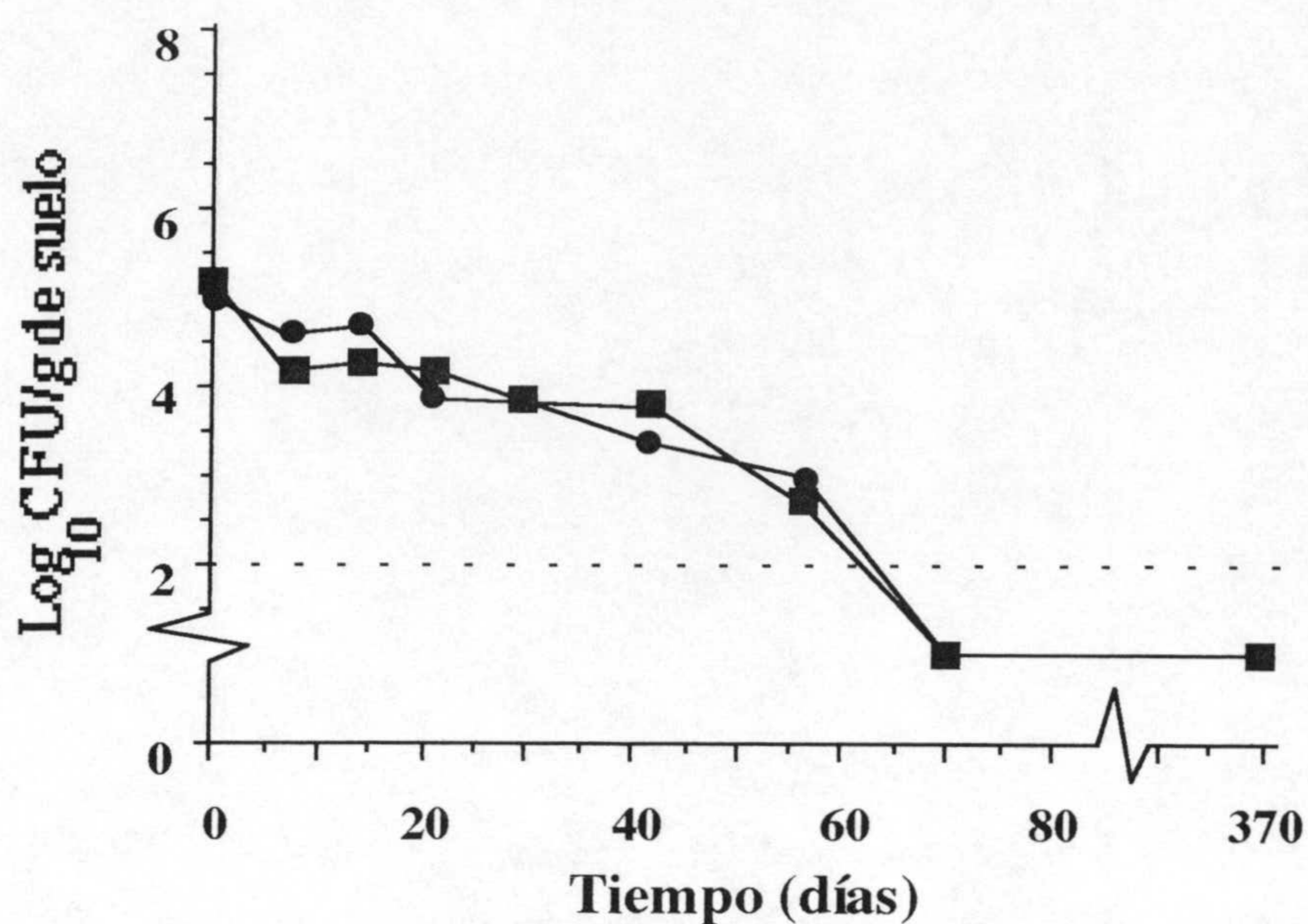


Figura 2.I. Supervivencia a largo plazo de la cepa *P. putida* KT2442 y su derivado bioluminiscente *P. putida* S1B1 en microcosmos con suelo tipo cambisol. *P. putida* KT2442 (cuadrados) y *P. putida* S1B1 (círculos) se introdujeron en microcosmos que contenían 90 g de suelo cambisol a una densidad celular inicial de aproximadamente 10^5 UFC por g de suelo. Los microcosmos se incubaron a 25°C. A los tiempos indicados se determinó el número de UFC/g de suelo de cada una de las placas mediante siembra en placas de medio selectivo.

2.2 Supervivencia en suelo tipo fluvisol.

P. putida S1B1 o *P. putida* KT2442 se introdujeron en microcosmos que contenían 90 g de suelo fluvisol (rico en materia orgánica) a una densidad celular de aproximadamente 10^6 UFC por g de suelo. Ambas cepas se mantuvieron a una densidad relativamente constante en este tipo de suelo durante al menos 1 mes, 10^6 - 10^7 UFC por g de suelo (**Figura 3.I**). Este valor fue aproximadamente dos órdenes de magnitud superior al alcanzado en el cambisol, 30 días después de la introducción en los microcosmos (**Figura 1.I y 2.I**). Estos resultados indicaron que la inserción del miniTn5 en el cromosoma de *P. putida* S1B1 tampoco afectó a la supervivencia de esta cepa en suelo fluvisol.

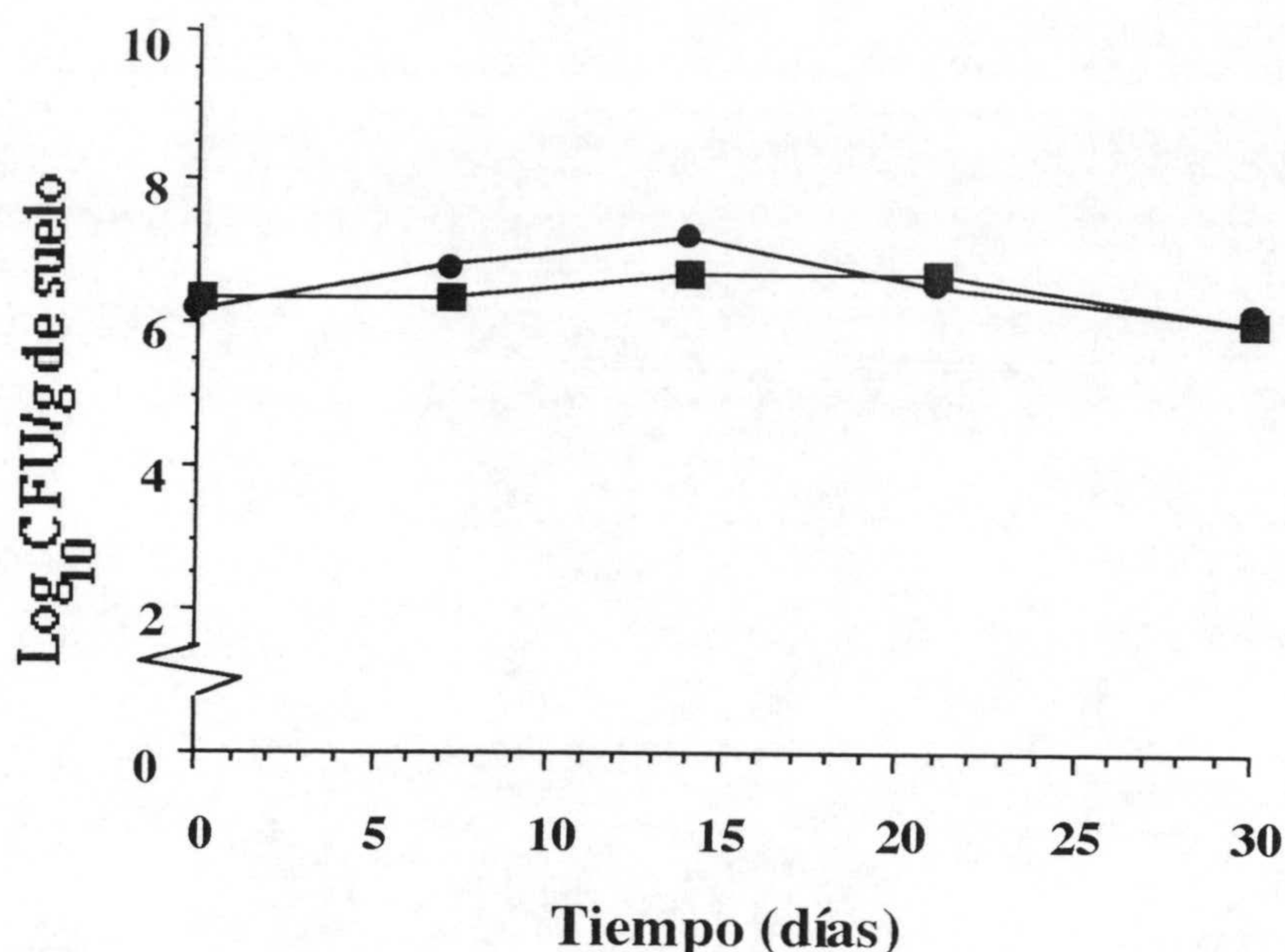


Figura 3.I. Supervivencia de la cepa *P. putida* KT2442 y su derivado bioluminiscente *P. putida* S1B1 en suelo fluvisol. *P. putida* S1B1 (círculos) y *P. putida* KT2442 (cuadrados) se introdujeron independientemente en microcosmos que contenían 90 g de suelo fluvisol a una densidad celular de aproximadamente 10^6 UFC por g de suelo. Los microcosmos se incubaron a 25°C. A los tiempos indicados se calculó el número de UFC/g de suelo de cada una de las placas mediante siembra en placas de medio selectivo

2.3. Supervivencia de la cepa *P. putida* S1B1 en microcosmos edáficos en competencia con la cepa *P. putida* KT2442-5.

Este experimento se realizó para estudiar si la inserción del miniTn5/*luxAB*-Km en el cromosoma de *P. putida* S1B1 confería a esta cepa desventajas competitivas con respecto a la cepa parental *P. putida* KT2442. Para poder diferenciar ambos tipos celulares en placas de medio selectivo, en primer lugar se seleccionó un derivado espontáneo de *P. putida* KT2442 resistente a estreptomicina, *P. putida* KT2442-5 (ver **Tabla 1** de *Materiales y Métodos*).

Microcosmos edáficos que contenían 90 g de suelo cambisol se inocularon a una densidad celular inicial de 10^7 UFC por gramo de suelo de las cepas *P. putida* S1B1 y *P. putida* KT2442-5. El número de UFC por g de suelo a lo largo del tiempo fue similar para ambas cepas, estableciéndose al final del ensayo en aproximadamente 10^4 - 10^5 UFC por g de suelo. Estos resultados sugirieron que ninguna de las dos cepas presentaron ventajas competitivas sobre la otra (**Figura 4.I**).

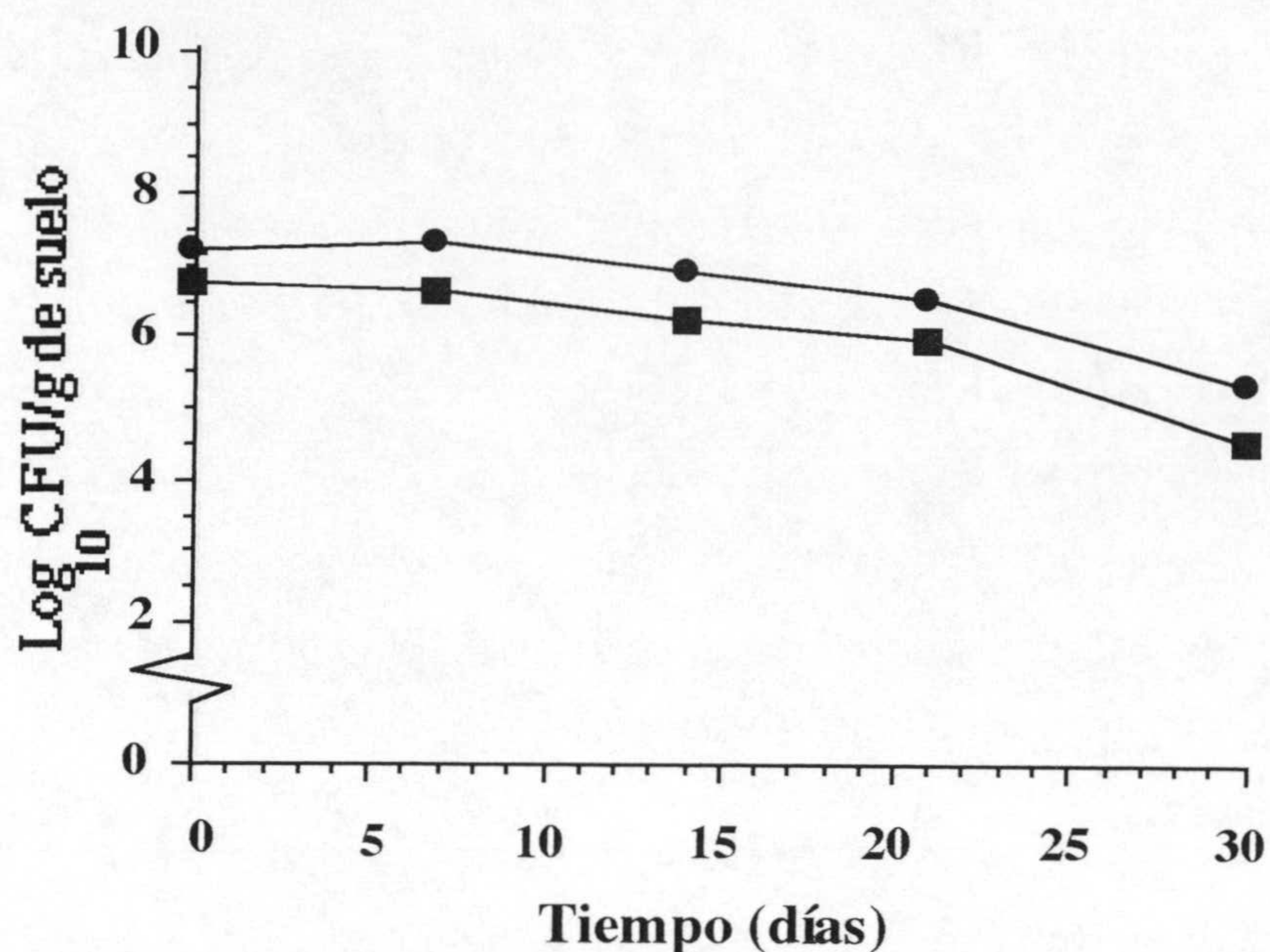


Figura 4.1. Supervivencia de la cepa *P. putida* S1B1 en microcosmos edáficos en competencia con la cepa *P. putida* KT2442-5. Noventa gramos de suelo cambisol se inocularon con aproximadamente 10^7 UFC/g de suelo de las cepas *P. putida* KT2442-5 (símbolos cuadrados) y *P. putida* S1B1 (símbolos circulares). Los microcosmos se incubaron a 25°C en un invernadero. A los tiempos indicados se determinó el número de UFC/g de suelo de cada una de las placas mediante siembra en placas de medio selectivo.

3. SUPERVIVENCIA DE UNA CEPA DE *P. putida* S1B1 EN LA RIZOSFERA DE DIVERSAS PLANTAS DE INTERÉS AGRÍCOLA.

Los experimentos descritos a continuación se realizaron para estudiar la colonización de la rizosfera de diversas plantas de interés agrícola por la cepa bioluminiscente *P. putida* S1B1 y su cepa parental *P. putida* KT2442. Además se comprobó si la inserción del mini-Tn5/*luxAB*-Km en el cromosoma de *P. putida* S1B1 afectaba a la supervivencia de la cepa en la rizosfera de las plantas a estudiar.

3.1. Colonización de la rizosfera de maíz.

En primer lugar se estudió el efecto de la densidad del inóculo utilizado sobre el establecimiento y la supervivencia de cada una de las cepas en la rizosfera de plantas de maíz. Semillas de maíz se inocularon con la cepa *P. putida* KT2442 o con su derivado bioluminiscente *P. putida* S1B1 a tres densidades celulares diferentes, a saber, aproximadamente 10^4 , 10^6 , 10^8 UFC por semilla. Estas semillas se sembraron en macetas que contenían 1 Kg de una mezcla de suelo cambisol no estéril y arena (*Materiales y Métodos*, apartado 13.5).

Tras la aparición de la primera hoja (7 días después de sembrar las semillas) se detectaron alrededor de 10^7 - 10^8 UFC por g de suelo rizosférico independientemente del tamaño del inóculo y la cepa bacteriana utilizada. Durante la semana siguiente el número de células en la rizosfera disminuyó ligeramente hasta niveles de aproximadamente 10^6 - 10^7 UFC por g de suelo rizosférico. A partir de este momento y hasta el final del ensayo, la densidad celular se mantuvo relativamente constante al mismo nivel (**Figura 5.I**). En general, el número de UFC por g de suelo rizosférico fue de dos a tres órdenes de magnitud mayor que en el suelo no rizosférico, alcanzando a los 30 días una densidad celular de 10^3 - 10^4 UFC por g de suelo (**Figura 5.I**).

3.1.1 Supervivencia de la cepa *P. putida* S1B1 en competencia con la cepa *P. putida* KT2442-5.

Este experimento se realizó para estudiar si la inserción del mini-Tn5/*luxAB*-Km en el cromosoma de *P. putida* S1B1 confería a esta cepa desventajas competitivas en la rizosfera con respecto a la cepa parental *P. putida* KT2442. Para poder diferenciar ambos tipos celulares en placas de medio selectivo, se utilizó la cepa parental *P. putida* KT2442-5 (Sm^R) en lugar de la cepa parental *P. putida* KT2442.

Se inocularon semillas de maíz con aproximadamente 10^7 UFC por semilla de cada una de las cepas. Éstas se sembraron en macetas de 1 Kg con una mezcla de suelo cambisol y arena no estériles (*Materiales y Métodos*, apartado 13.5). Tras 7 días de cultivo, ambas cepas se establecieron en la rizosfera y en el suelo no rizosférico a una densidad celular de aproximadamente 10^6 y 10^4 UFC por g de rizosfera y suelo no rizosférico respectivamente. El número de células de ambas cepas se mantuvo relativamente constante a este nivel hasta el final del ensayo tanto en la rizosfera como en el suelo no rizosférico. Estos resultados sugirieron que, en las condiciones estudiadas, ninguna de las dos cepas presenta ventajas competitivas sobre la otra durante la colonización de la rizosfera de plantas de maíz (**Figura 6.I**).

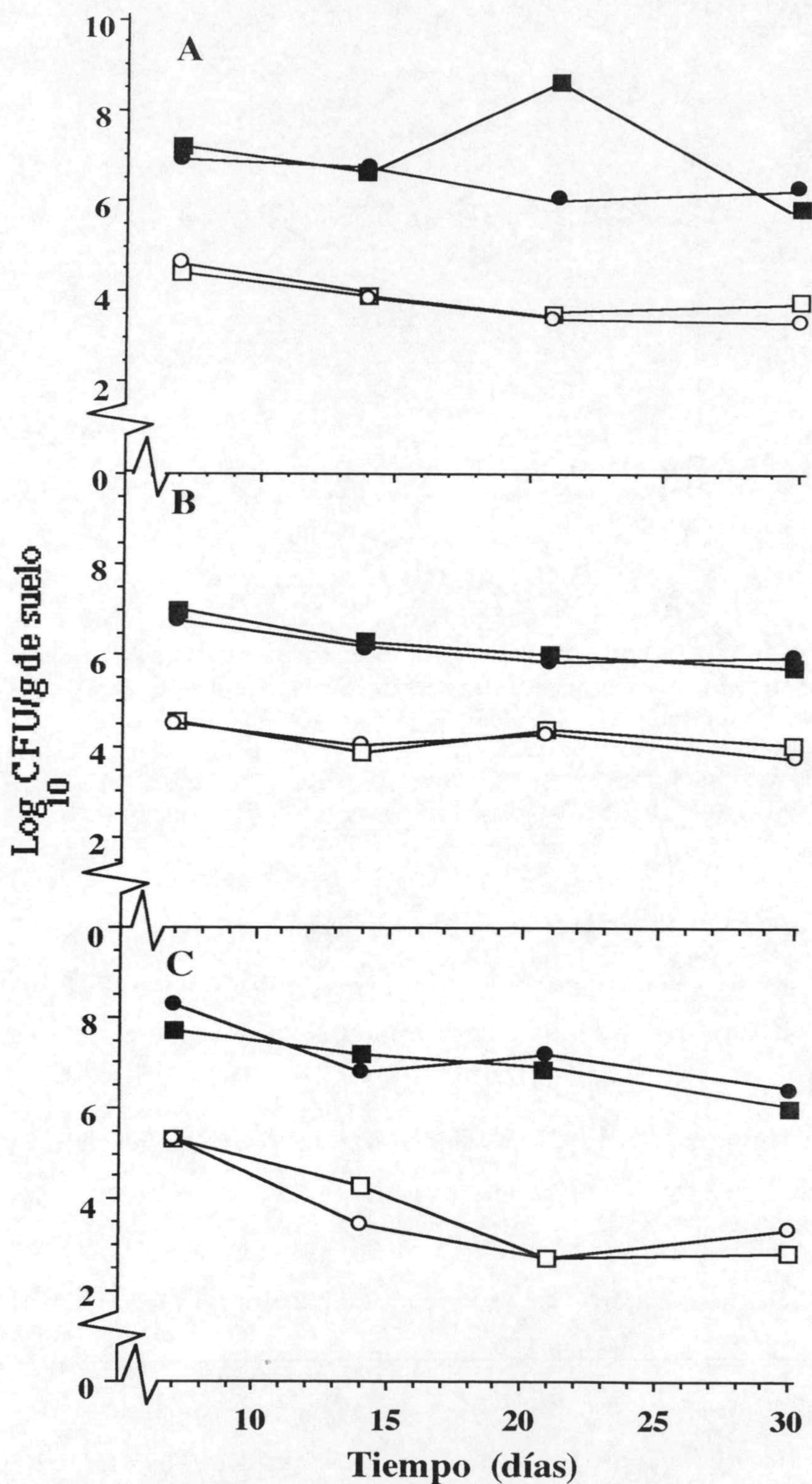


Figura 5.I. Supervivencia de la cepa *P. putida* KT2442 y de su derivado bioluminiscente *P. putida* S1B1 en la rizosfera y suelo en masa de plantas de maíz. Semillas de maíz se inocularon con 10^4 (A), 10^6 (B) o 10^8 UFC/semilla (C) de las cepas *P. putida* KT2442 (cuadrados) o *P. putida* S1B1 (círculos) y se sembraron en macetas conteniendo una mezcla de suelo cambisol no estéril y arena. A los tiempos indicados se determinó el número de UFC tanto en la rizosfera (símbolos cerrados) como en el suelo no rizosférico (símbolos abiertos) mediante recuento en placas de medio no selectivo.

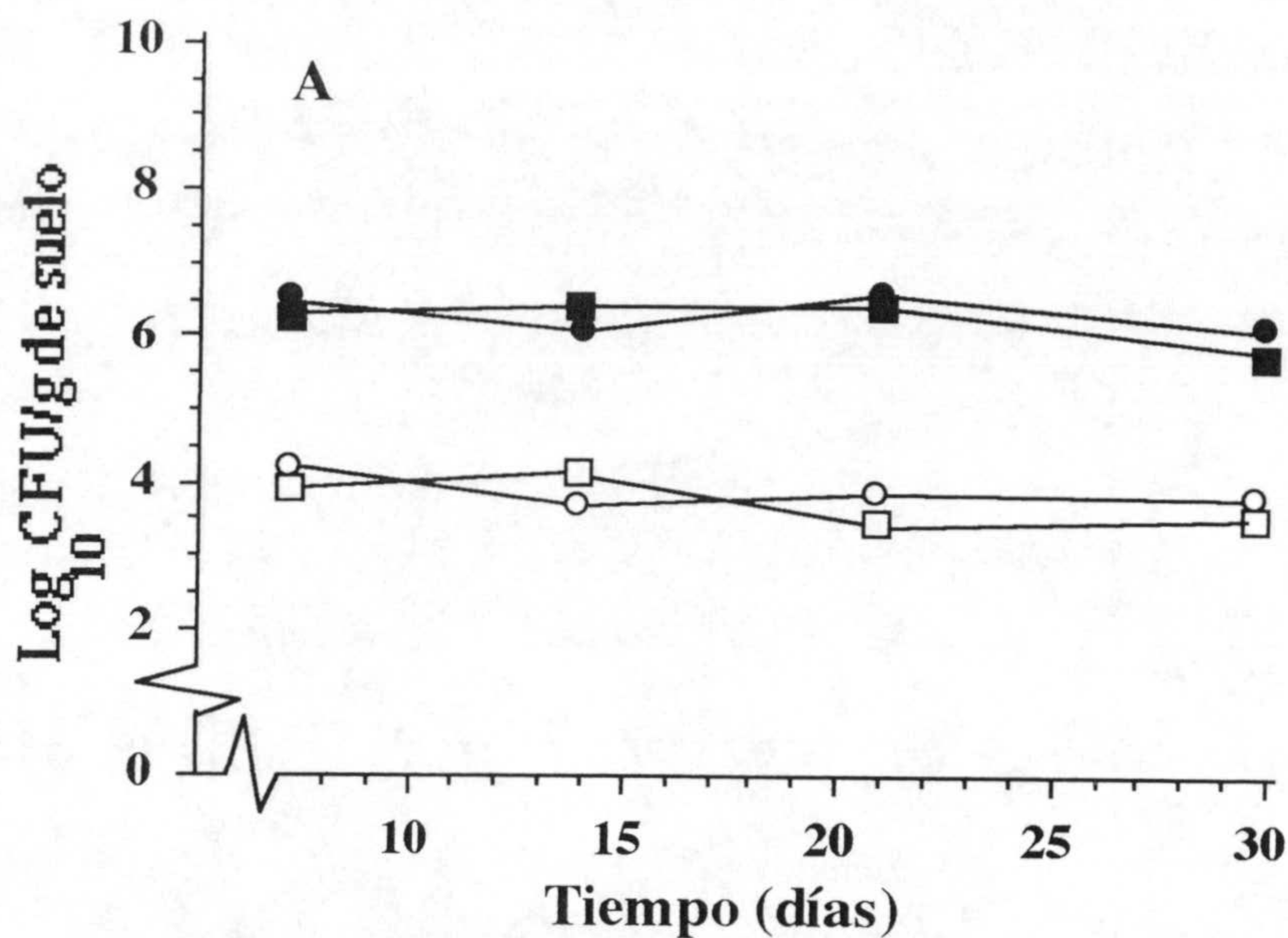


Figura 6.1. Supervivencia de la cepa *P. putida* S1B1 en la rizosfera y en suelo no rizosférico de plantas de maíz en competencia con *P. putida* KT2442-5. Semillas de maíz se inocularon con aproximadamente 10^6 UFC/semilla de las cepas *P. putida* KT2442-5 (cuadrados) y *P. putida* S1B1 (círculos). Las semillas se sembraron en microcosmos edáficos no estériles y se incubaron a 25°C en un invernadero. A los tiempos indicados se determinó el número de UFC de ambas cepas presentes tanto en el suelo rizosférico (símbolos cerrados) como en el suelo no rizosférico (símbolos abiertos).

3.2. Colonización de la rizosfera de plantas de haba y tomate.

Una vez comprobado que no existían diferencias significativas en la supervivencia en la rizosfera de maíz de la cepa bioluminiscente con respecto a su cepa parental, se estudió el establecimiento y colonización de la misma en la rizosfera de otras plantas de interés comercial. Se seleccionaron las plantas de haba (*Vicia faba*) y tomate (*Lycopersicon esculentum*) por ser cultivos de cierta importancia económica y característicos de la zona.

Semillas de haba y tomate se inocularon con aproximadamente 10^6 UFC de la cepa *P. putida* S1B1. Las semillas se sembraron en macetas con 1 Kg de una mezcla de suelo cambisol y arena no estéril (*Materiales y Métodos*, apartado 13.5). Siete días después de la siembra, la cepa en estudio se había establecido en la rizosfera de haba y tomate a una densidad celular de aproximadamente 10^8 UFC/g de suelo rizosférico. Durante el transcurso de una semana, el número de UFC disminuyó ligeramente hasta 10^6 - 10^7 UFC por g de suelo rizosférico y, posteriormente, se mantuvo relativamente constante al mismo nivel (**Figura 7.I**).

Sin embargo, en el suelo no rizosférico, el grado de colonización por parte de estas cepas fue de 2 a 3 órdenes de magnitud inferior, alcanzando a los 30 días una densidad celular de 10^4 UFC por g de suelo (**Figura 7.I**).

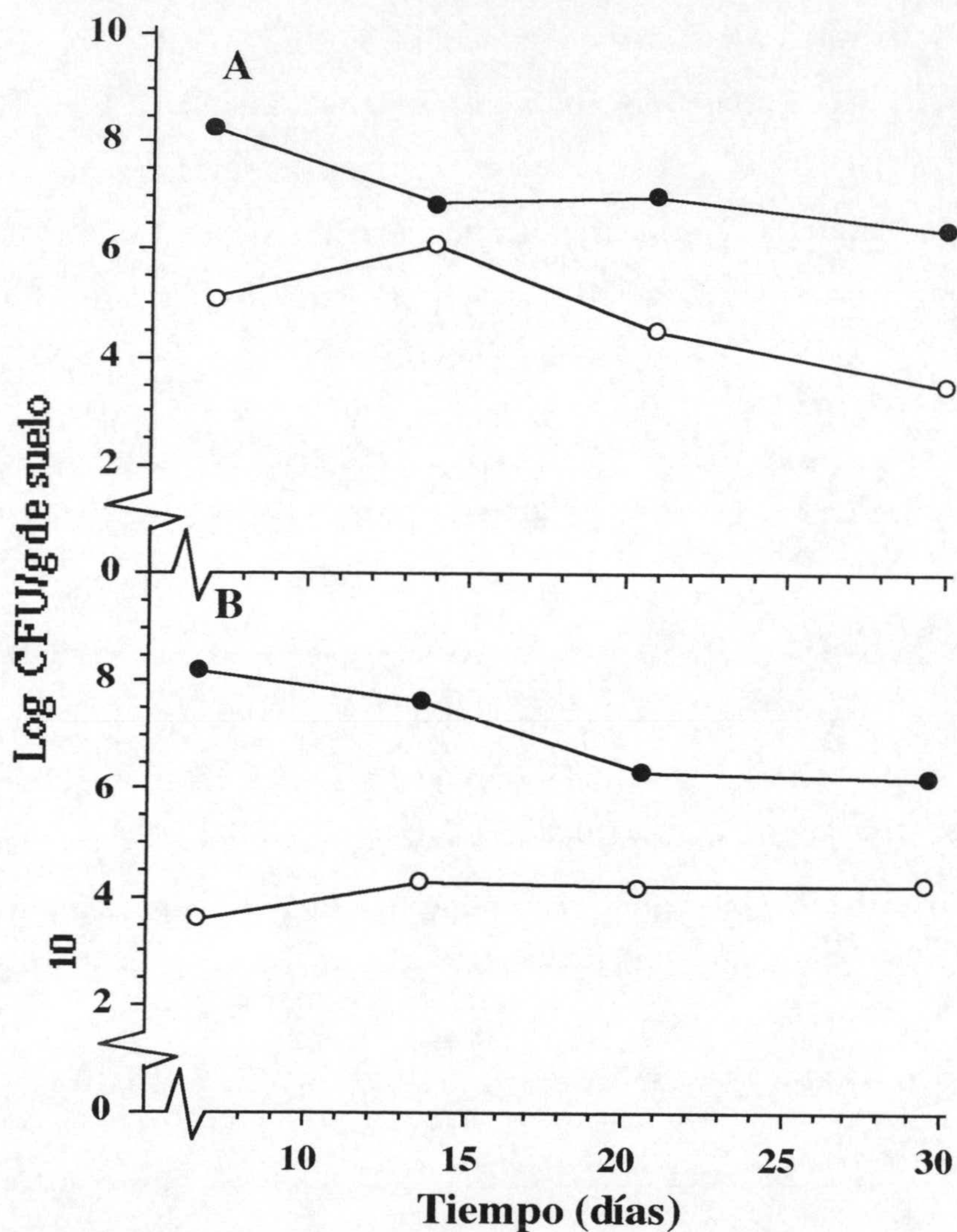


Figura 7.I. Supervivencia de la cepa bioluminiscente *P. putida* S1B1 en la rizosfera y suelo no rizosférico de plantas de haba y tomate. Semillas de haba (A) y tomate (B) se inocularon con aproximadamente 10^6 UFC de la cepa *P. putida* S1B1. Las semillas se sembraron en macetas que contenían 1Kg de una mezcla de suelo cambisol y arena no estéril y se incubaron a 25°C en un invernadero. A los tiempos indicados se determinó el número de UFC/g de suelo rizosférico (símbolos cerrados) y suelo no rizosférico (símbolos abiertos).

4. DETERMINACIÓN DEL PATRÓN DE COLONIZACIÓN DE LA RIZOSFERA DE PLANTAS *in situ* POR LA CEPA *P. putida* S1B1.

Semillas estériles de acelga, espinaca, haba, maíz y tomate se inocularon con aproximadamente 10^6 UFC/semilla de la cepa *P. putida* S1B1. Las semillas se sembraron en dos sustratos distintos: vermiculita y suelo tipo fluvisol, y se incubaron en un invernadero a 25°C. El fenotipo bioluminiscente de la cepa en estudio se utilizó para determinar *in situ* el patrón de colonización de la misma en la rizosfera de la planta correspondiente. Para ello se utilizaron dos técnicas diferentes para la detección de la bioluminiscencia: autorradiografiado o detección de la emisión de fotones con una cámara CCD (ver apartado 16 de *Materiales y Métodos*).

4.1. Colonización de la rizosfera de plantas de maíz, acelga, tomate, espinaca y haba cultivadas en vermiculita.

En los casos que se especifican a continuación la emisión de luminiscencia en las raíces se detectó mediante autorradiografiado. La emisión de bioluminiscencia en la rizosfera de plantas de maíz cultivadas durante 7 ó 14 días en vermiculita por parte de la cepa *P. putida* S1B1 fue más intensa en la parte de la raíz cercana a la semilla, aunque también se detectó bioluminiscencia en otros puntos aislados a lo largo de toda la raíz. Mediante la técnica utilizada se observó emisión de luz en la parte aérea de esta planta (**Figura 8.I**).

En el caso de plantas de acelga, espinaca y tomate, se detectó la emisión de luz en las raíces colonizadas por *P. putida* S1B1 tanto a los 7 días como a los 14 días después de la siembra. En todos estos casos el patrón de bioluminiscencia fue homogéneo a lo largo de toda la raíz. Catorce días después de la siembra, las plantas de tomate mostraron bioluminiscencia en la región correspondiente al nervio central de las primeras hojas (**Figura 8.I**).

En el caso de las raíces de plantas de haba, la emisión de luz detectada mediante autorradiografía se localizó mayoritariamente en las raíces secundarias cercanas a la semilla y, en menor grado, la raíz principal en toda su longitud (**Figura 9.I**).

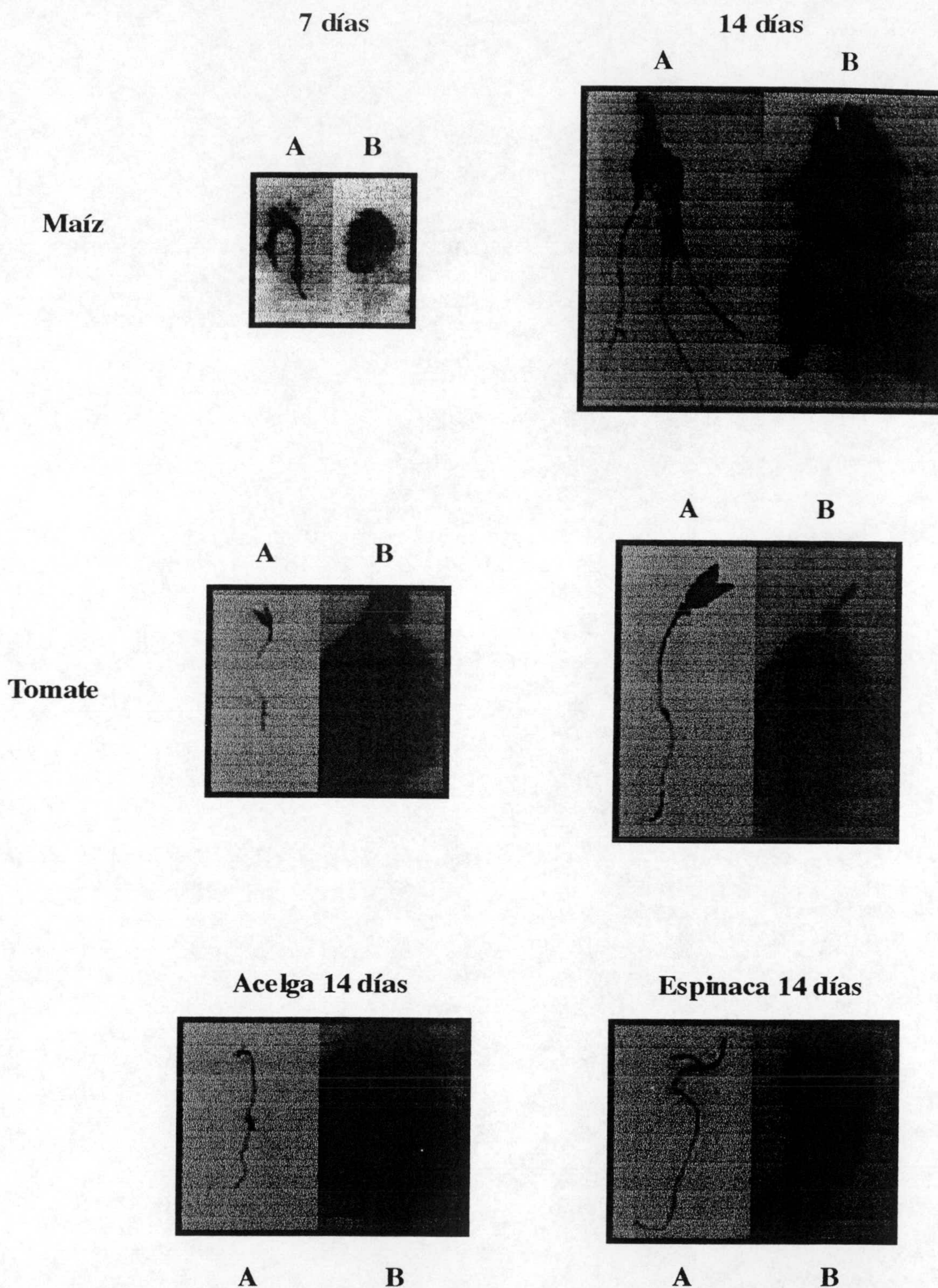


Figura 8.I. Detección de bioluminiscencia *in situ* en la rizosfera de algunas plantas de interés comercial *in situ* colonizadas por la cepa *P. putida* S1B1. Semillas de maíz, tomate, acelga y espinaca se inocularon con aproximadamente 10^6 UFC/semilla de la cepa *P. putida* S1B1. Las semillas se sembraron en vermiculita y se incubaron a 25°C en un invernadero. A los tiempos indicados, se analizó el patrón de emisión de luz en las raíces mediante autorradiografiado. Se muestran tanto las fotografías de las raíces de las plantas estudiadas (A) como las autorradiografías obtenidas en la oscuridad (B).

UNIVERSIDAD DE GRANADA
3 FEB. 1989
COMISION DE DOCTORADO

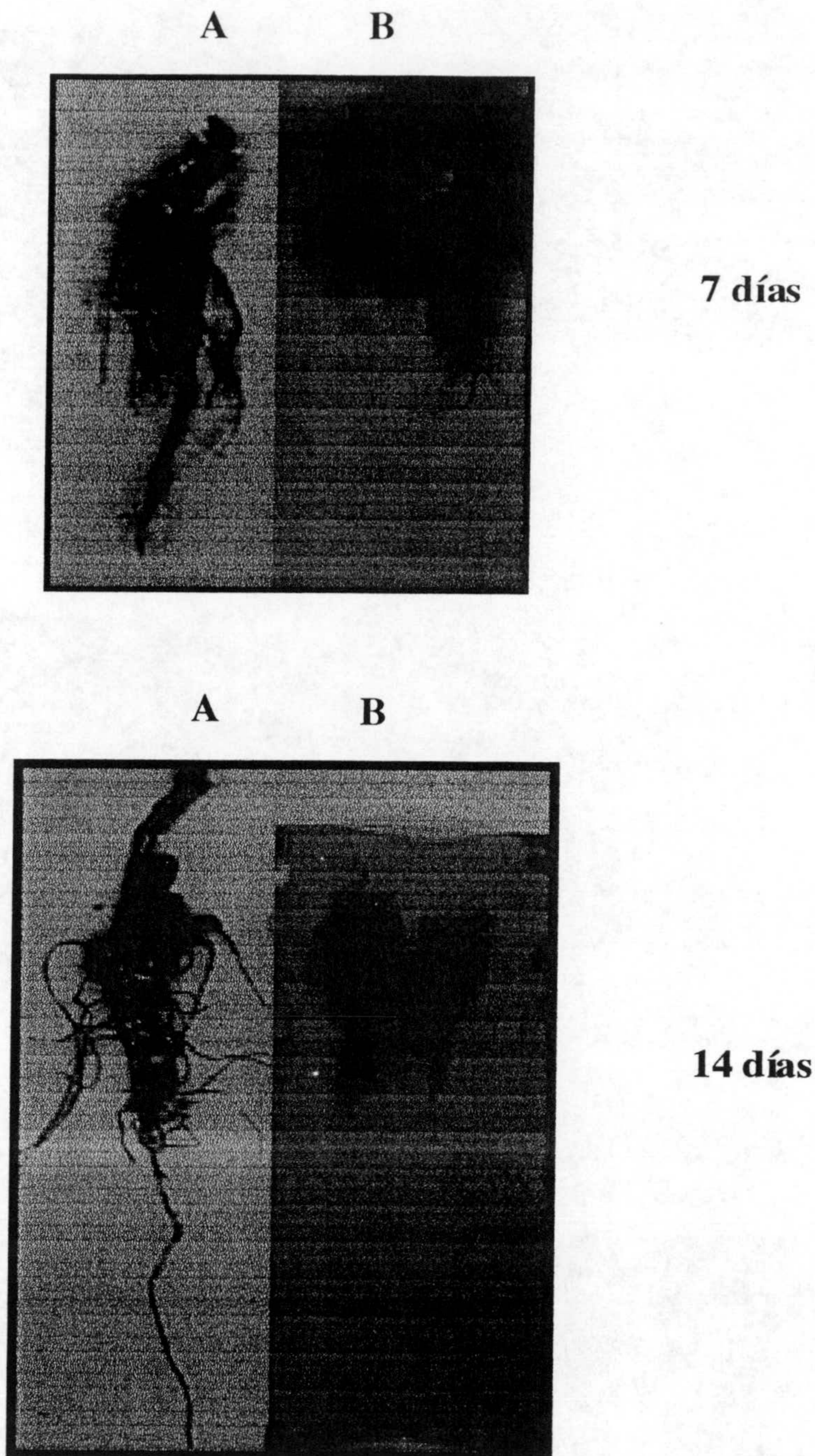


Figura 9.I. Detección de bioluminiscencia *in situ* en la rizosfera de plantas de haba *in situ* colonizadas por la cepa *P. putida* S1B1. Semillas de haba se inocularon con aproximadamente 10^6 UFC/semilla de la cepa *P. putida* S1B1. Las semillas se sembraron en vermiculita y se incubaron a 25°C en un invernadero. A los tiempos indicados, se analizó el patrón de emisión de luz en las raíces mediante autorradiografiado. Se muestran tanto las fotografías de las raíces de las plantas estudiadas (A) como las autorradiografías obtenidas en la oscuridad (B).

4.2. Colonización de la rizosfera de plantas de maíz cultivadas en suelo fluvisol.

Para la realización de esta serie de experimentos se inocularon semillas de maíz con la cepa *P. putida* S1B1 a una densidad celular de aproximadamente 10^6 UFC/semilla. Las semillas se sembraron en microcosmos que contenían 50 g de suelo fluvisol no estéril y se incubaron a 25°C en una cámara de cultivo con un fotoperiodo de 12 horas de iluminación y 12 horas de oscuridad. Seis días después de la siembra, las raíces se extrajeron y el patrón de emisión de las mismas se analizó mediante el uso de una cámara CCD.

El patrón de emisión de luz observado fue similar al obtenido para las raíces de plantas de maíz cultivadas en vermiculita y obtenido mediante autorradiografiado. En general, se detectó mayor emisión de luz en la zona de la raíz, aunque también se detectaron puntos bioluminiscentes en otras zonas de la misma (**Figura 10.I**).

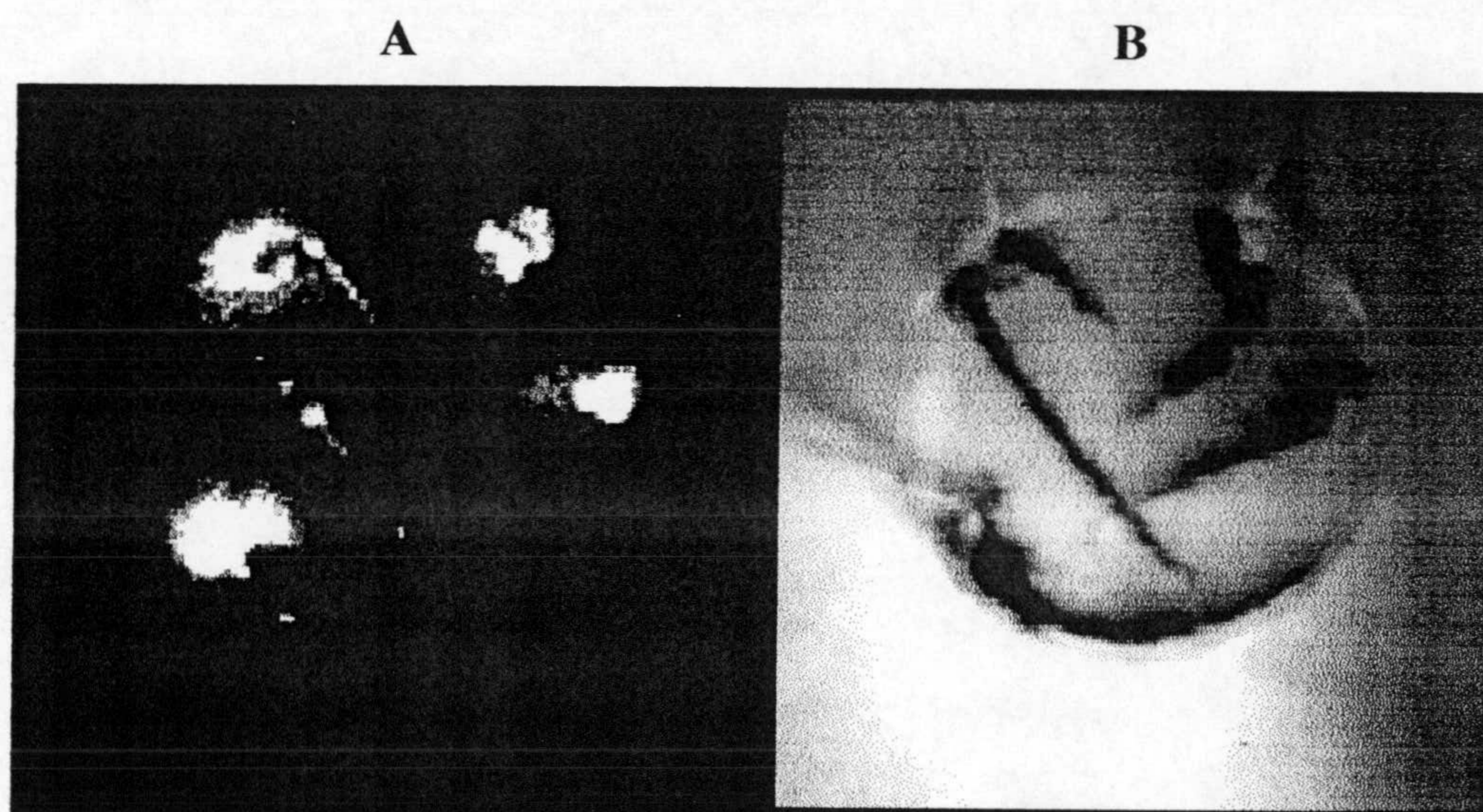
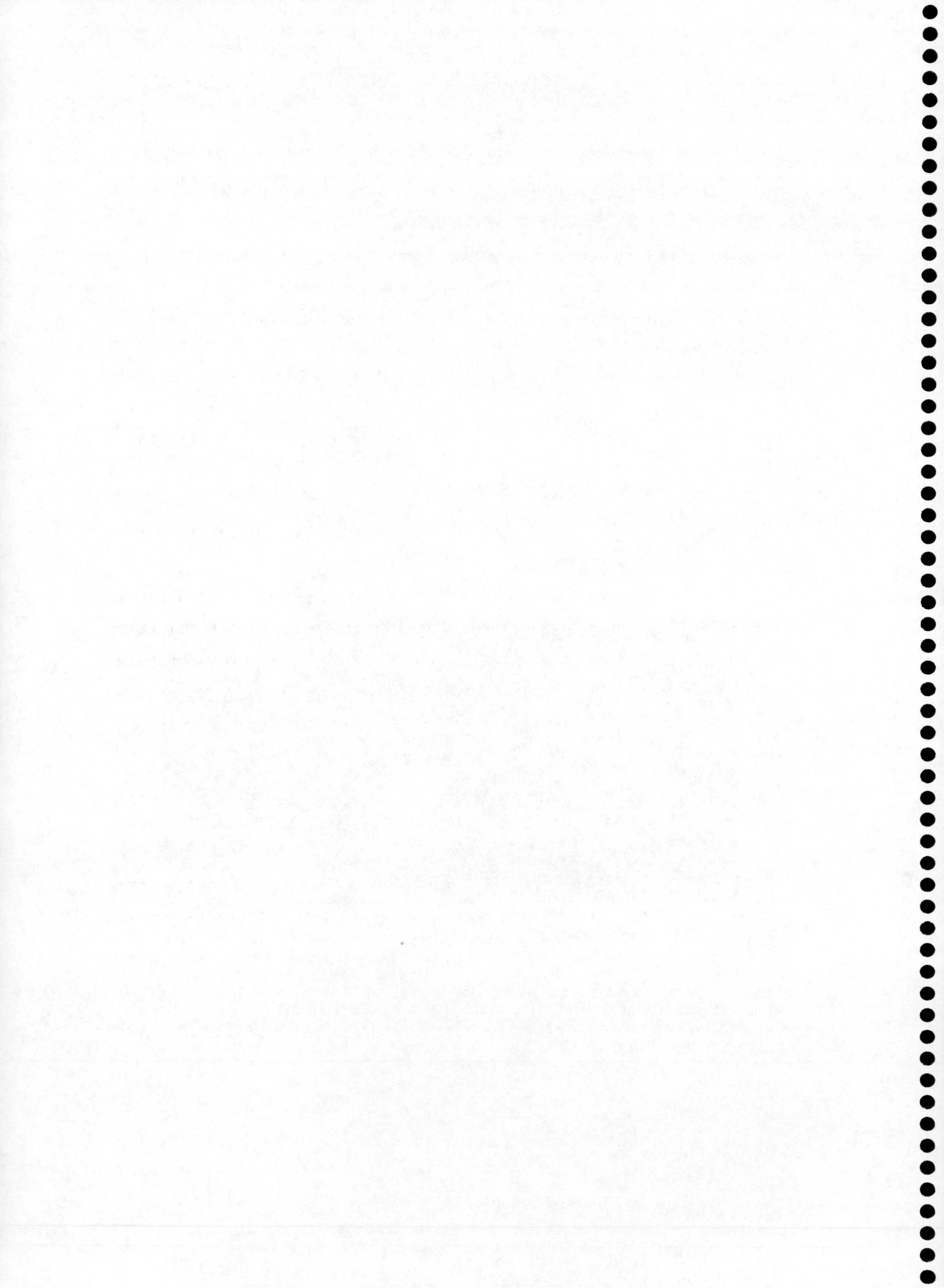


Figura 10.I. Detección de bioluminiscencia *in situ* en la rizosfera de plantas de maíz cultivadas en suelo fluvisol y colonizadas por la cepa *P. putida* S1B1. Semillas de maíz se inocularon con 10^6 UFC/semilla de la cepa *P. putida* S1B1. Las semillas se sembraron en suelo fluvisol no estéril y se incubaron a 25°C en una cámara de cultivo. Al cabo de 6 días de la siembra, se analizó el patrón de emisión de luz en las raíces mediante el uso de una cámara CCD. Se muestran tanto las imágenes obtenidas por dicha cámara obtenidas en la oscuridad (**A**) como las fotografías de las raíces de las plantas estudiadas (**B**).



II. ESTUDIOS DE COMPETENCIA ENTRE LA CEPA BIOLUMINISCENTE *P. putida* S1B1 Y CEPAS INDÍGENAS AISLADAS DE LA RIZOSFERA DE PLANTAS DE MAÍZ BAJO CONDICIONES CONTROLADAS DE INVERNADERO.

De los experimentos descritos en el capítulo anterior se concluyó que la cepa bioluminiscente *P. putida* S1B1 se establece y sobrevive a alta densidad celular tanto en microcosmos edáficos desnudos como en la rizosfera de varias plantas de interés comercial cultivadas bajo condiciones controladas de invernadero (temperatura y humedad relativa constantes). La inserción del miniTn5/*luxAB*-Km en el cromosoma de esta cepa no afectó a la supervivencia de la misma en suelos desnudos o bajo la influencia de los sistemas radiculares de plantas; por otro lado, el fenotipo bioluminiscente facilitó la detección *in situ* de la cepa en la rizosfera de plantas así como en muestras de suelo.

El paso siguiente en la investigación fue el estudio de los efectos de la introducción de la cepa bioluminiscente sobre poblaciones naturales de la microbiota del suelo. Los estudios sobre el impacto que puede ejercer cualquier factor exógeno a un entorno natural, ya sea en sus características físico-químicas o sobre sus capacidades biológicas, es un área en pleno desarrollo debido a la creciente preocupación y necesidad de la preservación de este tipo de entornos.

En este capítulo se describe el estudio de los posibles efectos que la introducción de la cepa *P. putida* S1B1, un microorganismo modificado genéticamente, podría ejercer sobre poblaciones indicadoras de la microbiota natural del suelo, así como sobre microorganismos específicos aislados de la rizosfera de plantas de maíz cultivadas en condiciones naturales. Los experimentos descritos se realizaron en condiciones de humedad y temperatura controladas.

1. ESTABLECIMIENTO Y SUPERVIVENCIA DE *P. putida* S1B1 EN MICROCOSMOS EDÁFICOS EN PRESENCIA DE CEPAS AISLADAS DE LA RIZOSFERA DE PLANTAS DE MAÍZ.

Se analizó el comportamiento de *P. putida* S1B1 en microcosmos edáficos en comparación con tres cepas gram-positivas (EEZ-101, EEZ-102 y EEZ-103) y cuatro gram-negativas (EEZ-201, EEZ-202, EEZ-203 y EEZ-204), todas ellas aisladas de la rizosfera de plantas de maíz (**Tabla 1**, *Materiales y Métodos*).

1.1. Estudios de competencia en suelo estéril.

Los experimentos descritos a continuación se realizaron en suelo estéril con objeto de comparar la supervivencia de *P. putida* S1B1 con respecto a los aislados naturales en ausencia tanto de otras cepas bacterianas naturales del suelo como de exudado de raíz de plantas. En primer lugar, cada una de las cepas en estudio se introdujo independientemente en microcosmos edáficos compuestos de suelo cambisol estéril a dos densidades celulares diferentes, 10^5 y 10^8 UFC por g de suelo. Treinta días después de la inoculación se determinó el número de células presentes en muestras de suelo, mediante conteo en placas de medio selectivo. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 1.II**. Tras este periodo de tiempo, la densidad celular alcanzada en el suelo por cada una de las cepas introducidas fue independiente de la densidad celular inicial. En general, las bacterias gram-negativas del género *Pseudomonas* se establecieron a densidades celulares más elevadas; así, *P. putida* S1B1, *P. putida* EEZ-201 y *Pseudomonas chlororaphis* EEZ-204 lo hicieron a densidades de aproximadamente 10^6 - 10^8 UFC por g de suelo. Las cepas gram-positivas, pertenecientes al género *Bacillus* (EEZ-101 y EEZ-102) y la cepa *Micrococcus luteus* EEZ-103, así como el resto de las cepas gram-negativas (*Agrobacterium radiobacter* EEZ-202 y *Pseudomonas aerofaciens* EEZ-203), se establecieron a niveles más bajos, comprendidos entre 10^5 - 10^3 UFC por g de suelo (**Tabla 1.II**).

Tabla 1.II. Establecimiento en suelo estéril de las cepas bacterianas aisladas de la rizosfera de maíz en comparación con *P. putida* S1B1. Noventa gramos de suelo cambisol estéril se inocularon con cada una de las cepas aisladas de la rizosfera del maíz a densidades celulares de 10^5 o 10^8 UFC por g de suelo. Treinta días después de la inoculación, se determinó el número de UFC por g de suelo para cada una de las cepas mediante conteo en placas de medio selectivo.

Cepa bacteriana	Log ₁₀ CFU/g de suelo,	Log ₁₀ CFU/g de suelo,
	t=0 ^a	t=30 ^a
S1B1	5'15 7'85	7'50 6'80
EEZ-101	5'15 7'55	3'93 3'35
EEZ-102	5'10 7'20	3'75 4'30
EEZ-103	5'10 7'85	5'20 5'65
EEZ-201	5'95 8'65	6'65 6'95
EEZ-202	4'80 7'70	4'40 5'15
EEZ-203	5'05 7'85	5'00 5'40
EEZ-204	5'35 7'70	6'25 6'80

^aLos resultados son la media de al menos dos repeticiones. La varianza estuvo comprendida entre el 1y el 14%.

A continuación se inoculó la cepa *P. putida* S1B1 simultáneamente con cada una de las siete cepas descritas anteriormente a tres densidades celulares diferentes: 1) *P. putida* S1B1 a 10^4 - 10^5 UFC por g de suelo y el aislado natural correspondiente a la misma densidad celular; 2) *P. putida* S1B1 a 10^4 - 10^5 UFC por g de suelo y el aislado natural a 10^7 - 10^8 UFC por g de suelo; y 3) *P. putida* S1B1 a 10^7 - 10^8 UFC por g de suelo y el aislado natural a aproximadamente 10^4 - 10^5 UFC por g de suelo. Tras 21 días de incubación, se determinó el número de células presentes en la muestra de suelo mediante conteo en placas de medio selectivo. Los resultados se muestran en la **Tabla 2.II**. Tras este período de tiempo, *P. putida* S1B1 se estableció a una densidad celular comprendida entre 10^6 y 5×10^7 UFC por g de suelo, independientemente de la densidad inicial a la que se inoculó, y de la presencia de cualquiera de los aislados naturales en el suelo. Este valor es similar al obtenido cuando *P. putida* S1B1 se inoculó sola en microcosmos edáficos estériles (**Tabla 1.II**).

La densidad de establecimiento de las rizobacterias gram-positivas varió entre las 10^3 - 10^4 UFC por g de suelo de las cepas EEZ-101 y EEZ-102 (*Bacillus alvei* y *Bacillus sphaericus* respectivamente), hasta las aproximadamente 10^5 UFC por g de suelo a las que consiguió establecerse *M. luteus* EEZ-203 (**Tabla 2.II.A**). Las

rizobacterias gram-negativas aquí estudiadas se establecieron generalmente a niveles más altos, con la excepción de la cepa *A. radiobacter* EEZ-202, que lo hizo a una densidad celular próxima a 10^5 UFC por g de suelo. Las demás rizobacterias gram-negativas aquí estudiadas superaron las 10^6 UFC por g de suelo: *P. putida* EEZ-201 y *P. chlororaphis* EEZ-203 alcanzaron niveles de 10^7 - 10^8 UFC por g de suelo y *P. aerofaciens* de 10^6 UFC por g de suelo (**Tabla 2.II.B**). En todos los casos analizados, e independientemente de la densidad celular del inóculo inicial, los valores obtenidos fueron similares a los estimados anteriormente cuando las cepas se inocularon en ausencia de *P. putida* S1B1 (**Tabla 1.II**).

De todos estos resultados puede concluirse que, en las condiciones utilizadas no existen desventajas competitivas entre la cepa *P. putida* S1B1 y las rizobacterias en estudio. *P. putida* S1B1 se estableció en suelo estéril a una densidad celular de aproximadamente 10^6 - 10^7 UFC por g de suelo, independientemente de la densidad celular del inóculo inicial y de la presencia o ausencia de los aislados naturales estudiados. La presencia de *P. putida* S1B1 en el suelo no tuvo efectos negativos detectables sobre la supervivencia de los aislados naturales estudiados.

1.1.1. Supervivencia de *P. putida* S1B1 en microcosmos edáficos estériles donde se había establecido previamente uno de los aislados naturales y viceversa.

Para esta serie de experimentos se seleccionaron tres de las rizobacterias que se establecieron en los microcosmos edáficos a mayor densidad celular: *Micrococcus luteus* EEZ-103, como la cepa gram-positiva que logró establecerse en entornos edáficos a mayor densidad celular y, por el mismo motivo, *P. putida* EEZ-201 y *P. chlororaphis* EEZ-204 como gram-negativas.

Tabla 2.II. Competencia entre *P. putida* S1B1 y aislados naturales de la rizosfera del maíz en suelo cambisol estéril. Microcosmos consistentes en 90 g de suelo cambisol estéril se inocularon a tres densidades celulares diferentes: 1) *P. putida* S1B1 a 10^4 - 10^5 UFC/g de suelo y el aislado natural correspondiente a la misma densidad; 2) *P. putida* S1B1 a 10^4 - 10^5 UFC/g de suelo y el aislado natural a 10^7 - 10^8 UFC/g de suelo; y 3) *P. putida* S1B1 a 10^7 - 10^8 UFC/g de suelo y el aislado natural a 10^4 - 10^5 UFC por g de suelo.

A) Competencia con bacterias gram-positivas:

Cepas inoculadas	Densidad celular inicial, $t = 0^a$	Cepa a considerar	$t = 21$ días ^a
S1B1:EEZ-101	4'8:4'5	S1B1	7'2
		EEZ-101	3'7
S1B1:EEZ-101	4'9:7'3	S1B1	6'8
		EEZ-101	4'3
S1B1:EEZ-101	7'5:4'8	S1B1	6'7
		EEZ-101	3'6
S1B1:EEZ-102	4'8:4'3	S1B1	7'2
		EEZ-102	4'0
S1B1:EEZ-102	4'7:7'5	S1B1	7'6
		EEZ-102	3'6
S1B1:EEZ-102	7'3:4'4	S1B1	7'3
		EEZ-102	4'4
S1B1:EEZ-103	4'8:5'0	S1B1	7'5
		EEZ-103	4'9
S1B1:EEZ-103	4'5:7'2	S1B1	6'9
		EEZ-103	4'8
S1B1:EEZ-103	7'8:4'6	S1B1	6'9
		EEZ-103	4'5

B) Competencia con bacterias gram-negativas:

Cepas inoculadas	Densidad celular inicial, $t = 0^a$	Cepa a considerar	$t = 21$ días ^a
S1B1:EEZ-201	5'2:5'3	S1B1	6'4
		EEZ-201	7'3
S1B1:EEZ201	5'0:7'6	S1B1	6'2
		EEZ-201	7'6
S1B1:EEZ-201	7'2:4'6	S1B1	6'5
		EEZ-201	7'9
S1B1:EEZ-202	4'7:5'6	S1B1	6'2
		EEZ-202	3'7
S1B1:EEZ-202	5'3:8'2	S1B1	5'9
		EEZ-202	4'6
S1B1:EEZ-202	8'0:5'9	S1B1	6'8
		EEZ-202	4'3
S1B1:EEZ-203	4'9:4'5	S1B1	6'8
		EEZ-203	6'2
S1B1:EEZ-203	4'6:7'8	S1B1	6'7
		EEZ-203	6'2
S1B1:EEZ-203	7'6:5'7	S1B1	6'7
		EEZ-203	5'9
S1B1:EEZ-204	4'9:5'0	S1B1	6'5
		EEZ-204	7'6
S1B1:EEZ-204	5'5:7'5	S1B1	6'3
		EEZ-204	7'6
S1B1:EEZ-204	8'5:5'2	S1B1	6'7
		EEZ-204	7'3

^aLos resultados son la media de al menos dos repeticiones. La varianza estuvo comprendida entre el 1y el 14%.

1.1.1.1. Establecimiento de los aislados naturales de la rizosfera.

Microcosmos compuestos de 500 g de suelo cambisol estéril se inocularon independientemente con cada una de las rizobacterias naturales seleccionadas a una densidad celular de aproximadamente 10^5 - 10^6 UFC por g de suelo. Al cabo de los 7 días, se separaron 150 g de suelo de cada uno de estos microcosmos, se determinó el número de UFC por g de suelo de la rizobacteria en cuestión en esta fracción del microcosmos original y se inoculó con 10^7 - 10^8 UFC (densidad celular alcanzada por la rizobacteria estudiada) por g de suelo UFC por g de suelo de la cepa *P. putida* S1B1. Transcurridos 30 días, se repitió el proceso: se separaron 150 g de los 350 restantes, se determinó el número de UFC por g de suelo de la rizobacteria en cuestión en esta fracción del microcosmos original y se inoculó con 10^6 UFC por g de suelo UFC por g de suelo de la cepa *P. putida* S1B1. Como control se utilizaron las fracciones de suelo donde no se inoculó la cepa *P. putida* S1B1 y microcosmos donde sólo se inocularon esta cepa. A diferentes intervalos de tiempo se determinó el número de cada una de las cepas presentes en los suelos mediante siembra en placas de medio selectivo.

El número de UFC por g de suelo de la cepa *P. putida* S1B1 se estableció al cabo de los 70 días de duración del experimento en niveles relativamente constantes en todos los microcosmos, entre 10^6 y 10^7 UFC por g de suelo. Esto ocurrió así independientemente de la presencia o ausencia de los aislados naturales y del tiempo en que esta cepa, *P. putida* S1B1, se introdujo en los microcosmos (**Figura 1.I**).

En la **Figura 2.II** se muestra la supervivencia de las poblaciones de las rizobacterias naturales en las condiciones descritas anteriormente. El comportamiento de la cepa *P. putida* EEZ-201 no pareció verse afectado por la introducción de la cepa *P. putida* S1B1 transcurridos 7 días desde el inicio del ensayo. Esta rizobacteria, en estas condiciones, mantuvo aproximadamente la misma densidad celular a lo largo del tiempo que el control, no inoculado con la cepa bioluminiscente, 10^6 UFC por g de suelo (**Figura 2.II.A**). Sin embargo, la introducción de la cepa bioluminiscente transcurridos 30 días de la inoculación de la cepa *P. putida* EEZ-201 conlleva a una disminución de la densidad celular de éste último microorganismos hasta niveles de 10^4 UFC por g de suelo. Posteriormente, la densidad celular de esta cepa volvió a establecerse en aproximadamente 10^6 UFC, nivel de establecimiento mostrado por esta cepa en estos entornos. En las mismas condiciones experimentales, la cepa *P. chlororaphis* EEZ-204 se estableció a densidades celulares aproximadas de 10^4 - 10^5 UFC por g de suelo tanto

en los microcosmos donde no se inoculó la cepa *P. putida* S1B1, como en los que esta última cepa se introdujo 30 días después del inicio del experimento (**Figura 2.II.B**). En el caso de la introducción de la cepa bioluminiscente transcurridos 7 días desde el inicio del ensayo, la capacidad colonizadora de la cepa *P. chlororaphis* EEZ-204 aumentó hasta niveles de 10^6 UFC por g de suelo (**Figura 2.II.B**). Independientemente de la introducción de la cepa *P. putida* S1B1, *M. luteus* EEZ-103 se mantuvo en todos los microcosmos en densidades celulares de aproximadamente 10^5 - 10^6 UFC por g de suelo.

1.1.1.2. Establecimiento previo de la cepa *P. putida* S1B1.

Microcosmos compuestos de 500 g de suelo cambisol estéril se inocularon con la cepa *P. putida* S1B1 a una densidad celular de aproximadamente 10^7 UFC por g de suelo. Al cabo de los 7 días, se separaron 150 g de suelo de cada uno de estos microcosmos y se inoculó una de las rizobacterias seleccionadas a una densidad celular aproximada de 10^6 - 10^7 UFC por g de suelo. Transcurridos 30 días, se repitió el proceso: se separaron 150 g de los 350 g restantes y se inoculó con alguna de las rizobacterias seleccionadas a una densidad celular de aproximadamente 10^6 UFC por g de suelo. Como control se utilizaron las fracciones de suelo donde sólo se inoculó la cepa *P. putida* S1B1 y microcosmos donde no se inoculó esta cepa y sí la rizobacteria en cuestión. A diferentes intervalos de tiempo se determinó el número de cada una de las cepas presentes en los suelos mediante siembra en placas de medio selectivo.

El número de UFC por g de suelo de la cepa *P. putida* S1B1 se estableció al cabo de los 70 días de duración del experimento en niveles relativamente constantes en todos los microcosmos controles, entre 10^7 y 10^8 UFC por g de suelo (**Figuras 3.II.A, 3.II.B y 3.II.C**). En los casos en los que *P. putida* EEZ-201 se introdujo en estos microcosmos 7 días después del inicio del ensayo, o en los casos en los que tanto esta misma bacteria (**Figura 3.II.A**), como *P. chlororaphis* EEZ-204 (**Figura 3.II.B**) o como *M. luteus* EEZ-103 (**Figura 3.II.C**) se introdujeron a los 30 días después del inicio del ensayo la densidad celular de la cepa bioluminiscente fue decayendo paulatinamente con respecto a los valores de establecimiento de esta cepa en los microcosmos controles, alcanzando al final del ensayo niveles de 10^3 - 10^4 UFC por g de suelo, esto es un valor inferior en 3-4 órdenes de magnitud al inicial. En los demás casos, o sea, la inoculación de *P. chlororaphis* EEZ-204 o *M. luteus* EEZ-103 7 días después del inicio de este experimento no significó variación en la densidad celular

alcanzada por la cepa *P. putida* S1B1 con respecto a la de los microcosmos control inoculados con esta cepa (**Figuras 3.II.B y C**).

En la **Figura 4.II** se muestra el la supervivencia de las poblaciones de las rizobacterias naturales en las condiciones descritas anteriormente. El comportamiento de las cepas *P. putida* EEZ-201 (**Figura 4.II.A**), *P. chlororaphis* EEZ-204 (**Figura 4:II.B**) y *M. luteus* EEZ-103 (**Figura 4.II.C**) no pareció verse afectado por la presencia de la cepa *P. putida* S1B1, ni del tiempo en el que fueron inoculadas. Sus comportamientos fueron similares a los microcosmos controles y se establecieron a densidades celulares de 10^6 UFC en el caso de *P. putida* EEZ-201 (**Figura 4.II.A**); 10^5 - 10^6 para el caso de *P. chlororaphis* EEZ-204 (**Figura 4.II.B**); y 10^5 - 10^4 para *M. luteus* EEZ-103 (**Figura 4.II.C**).

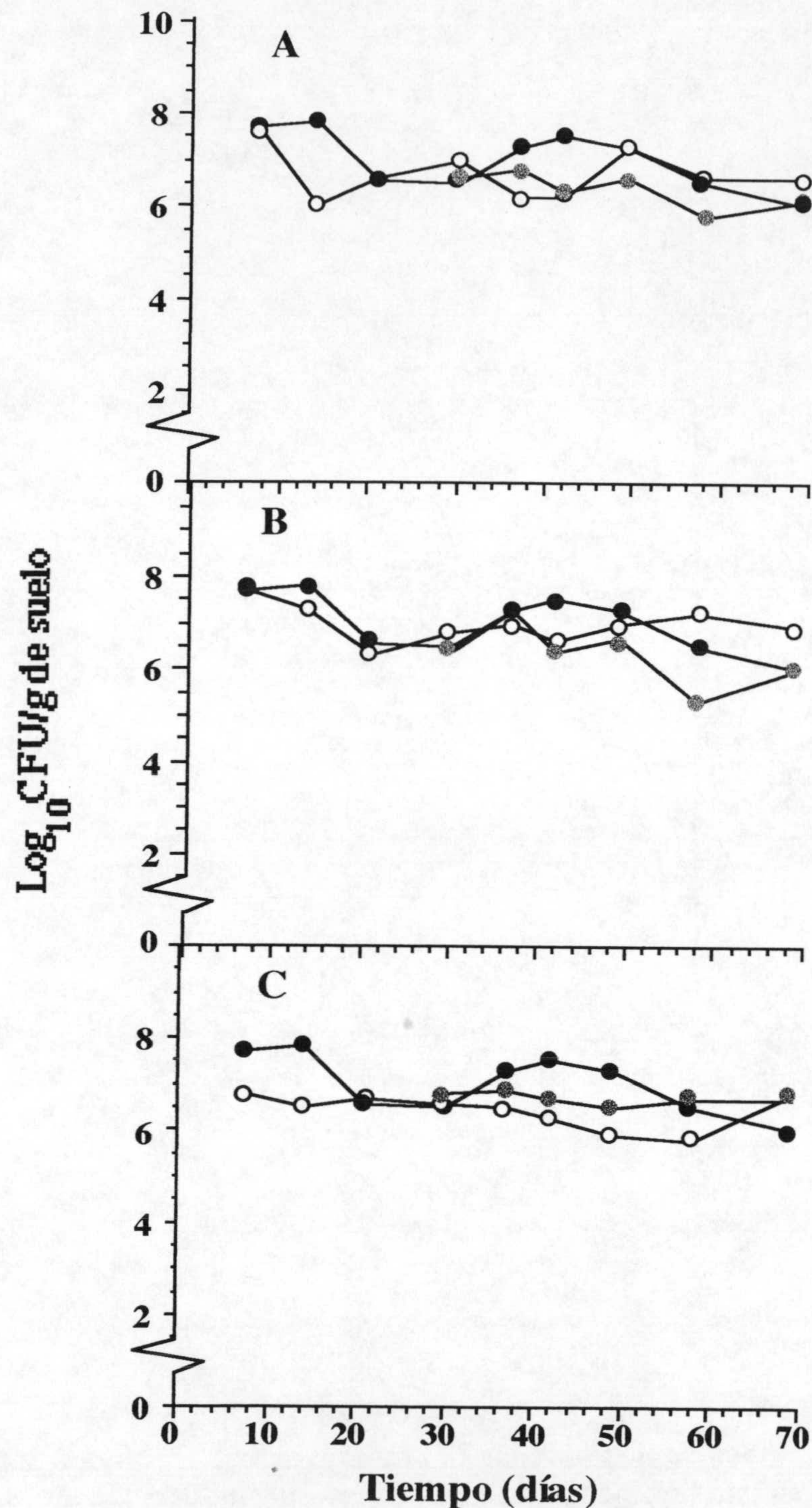


Figura I.II. Supervivencia de la cepa *P. putida* S1B1 en microcosmos edáficos estériles donde se había establecido previamente algunas de las rizobacterias naturales. Microcosmos compuestos de 500 g de suelo cambisol estéril se inocularon con *P. putida* EEZ-201 (A), *P. chlororaphis* EEZ-304 (B) o *M. luteus* EEZ-103 (C) a una densidad celular de aproximadamente 10^5 - 10^6 UFC por g de suelo. Al cabo de los 7 días, se separaron alícuotas de 150 g de suelo de cada uno de estos microcosmos, que se inocularon con 10^7 - 10^8 UFC por g de suelo de la cepa *P. putida* S1B1, y se siguió el comportamiento tanto de la rizobacteria como de *P. putida* S1B1 (círculos blancos). Transcurridos 30 días, se repitió el proceso con las fracciones originales no inoculadas a los 7 días. En este caso el número de UFC por g de suelo de la cepa *P. putida* S1B1 que se introdujo fue 10^6 UFC por g de suelo (círculos grises). Como control se utilizaron las fracciones de suelo donde no se inoculó la cepa *P. putida* S1B1 y microcosmos donde sólo se inoculó esta cepa (círculos negros). A diferentes intervalos de tiempo se calculó el número de cada una de las cepas presentes en los suelos mediante siembra en placas de medio selectivo.

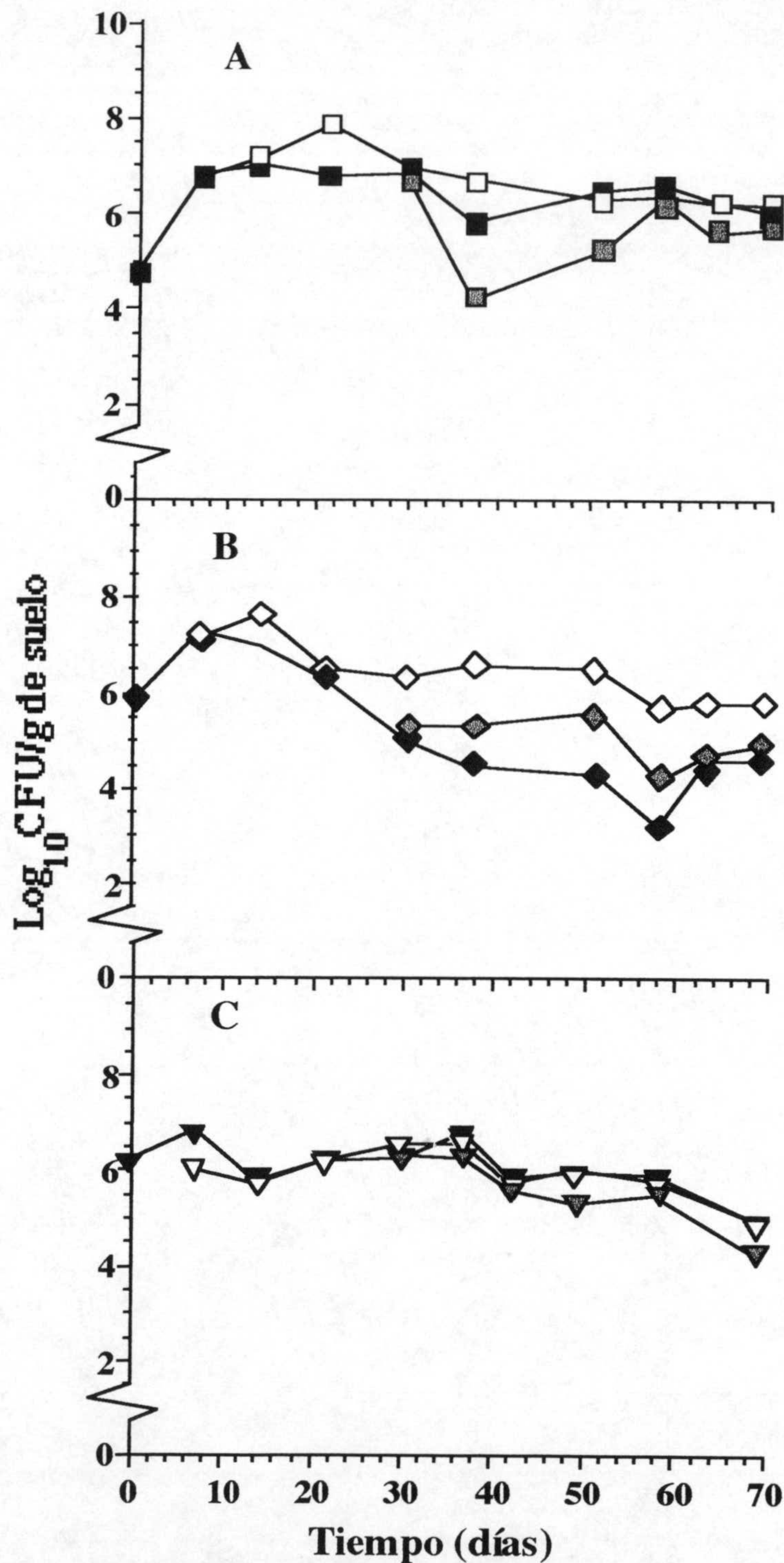


Figura 2.II. Supervivencia de las cepas *P. putida* EEZ201, *P. chlororaphis* EEZ-204 y *M. luteus* EEZ-103 en microcosmos edáficos estériles donde se habían establecido previamente. Microcosmos compuestos de 500 g de suelo cambisol estéril se inocularon con *P. putida* EEZ-201 (A), *P. chlororaphis* EEZ-304 (B) o *M. luteus* EEZ-103 (C) a una densidad celular de aproximadamente 10^5 - 10^6 UFC por g de suelo. Al cabo de los 7 días, se separaron alícuotas de 150 g de suelo de cada uno de estos microcosmos, que se inocularon con 10^7 - 10^8 UFC por g de suelo de la cepa *P. putida* S1B1, y se siguió el comportamiento tanto de la rizobacteria (símbolos blancos) como de *P. putida* S1B1. Transcurridos 30 días, se repitió el proceso con las fracciones originales no inoculadas a los 7 días. En este caso el número de UFC por g de suelo de la cepa *P. putida* S1B1 que se introdujo fue 10^6 UFC por g de suelo. Se determinó el número de UFC tanto de la rizobacteria inoculada originariamente (símbolos azules) como el de la introducida posteriormente *P. putida* S1B1. Como control se utilizaron las fracciones de suelo donde no se inoculó la cepa *P. putida* S1B1 (símbolos negros) y microcosmos donde sólo se inoculó esta cepa. A diferentes intervalos de tiempo se determinó el número de cada una de las cepas presentes en los suelos mediante siembra en placas de medio selectivo.

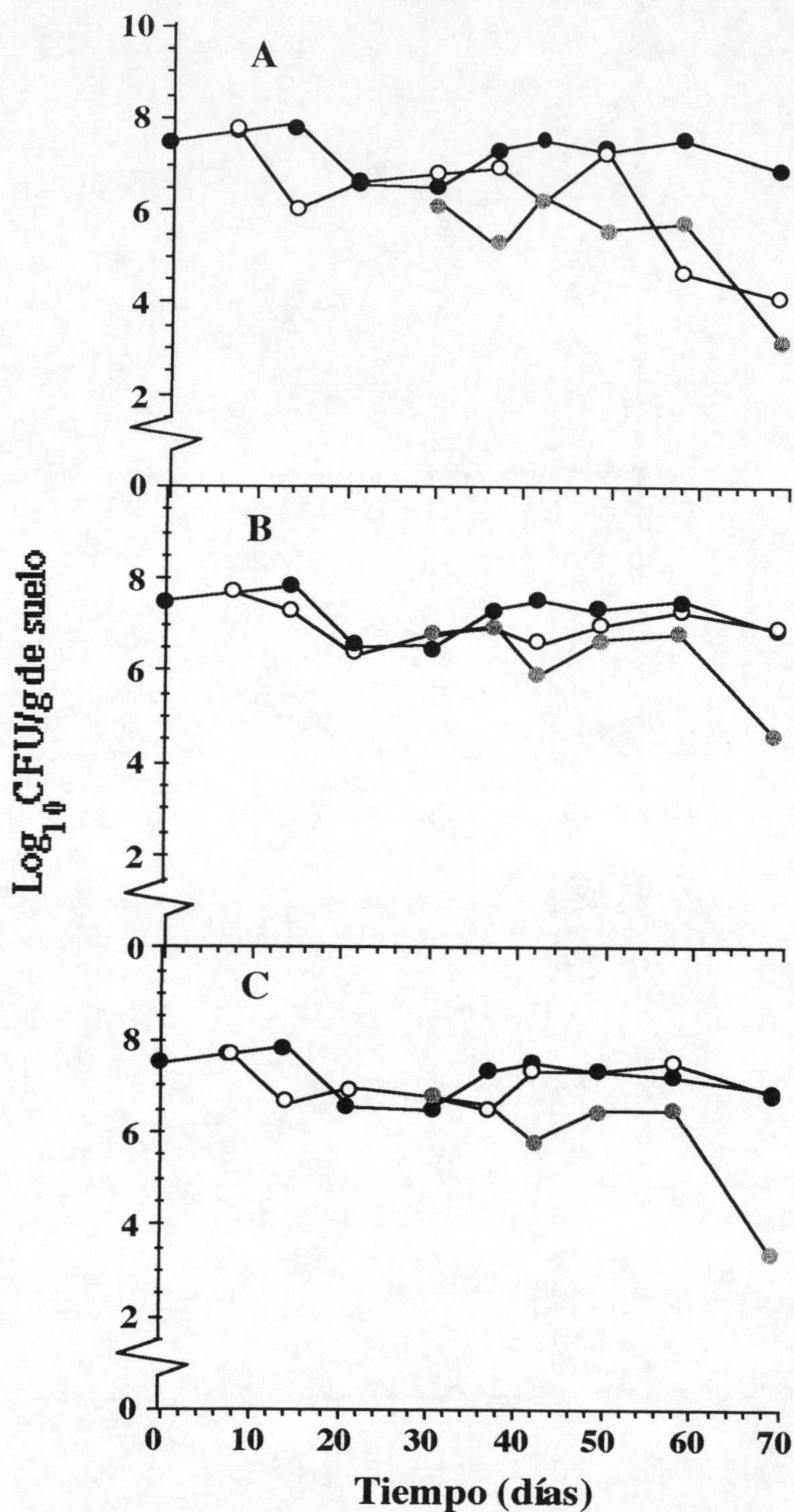


Figura 3.II. Supervivencia de la cepa *P. putida* S1B1 en los microcosmos donde se había establecido anteriormente a la inoculación de las rixobacterias seleccionadas.

Microcosmos compuestos de 500 g de suelo cambisol estéril se inocularon con la cepa *P. putida* S1B1 a una densidad celular de aproximadamente 10^7 UFC por g de suelo. Al cabo de los 7 días, se separaron alícuotas de 150 g de suelo de cada uno de estos microcosmos y se inocularon con cada una de las rixobacterias seleccionadas (*P. putida* EEZ-201, A; *P. chlororaphis*, B o *M. luteus*, C) a una densidad celular de 10^6 - 10^7 UFC por g de suelo. Se siguió el comportamiento tanto de estas poblaciones como de la cepa *P. putida* S1B1 inoculada a este tiempo (círculos blancos). Transcurridos 30 días, se repitió el proceso y las alícuotas obtenidas se inocularon con alguna de las rixobacterias seleccionadas a una densidad celular de 10^6 UFC por g de suelo. Se siguió tanto el comportamiento de estas poblaciones como de la cepa bioluminiscente inoculada a este tiempo (círculos azules). Como control se utilizaron las fracciones de suelo donde sólo se inoculó la cepa *P. putida* S1B1 (círculos negros) y microcosmos donde no se inoculó esta cepa y sí la rixobacteria en cuestión. A diferentes intervalos de tiempo se calculó el número de cada una de las cepas presentes en los suelos mediante siembra en placas de medio selectivo.

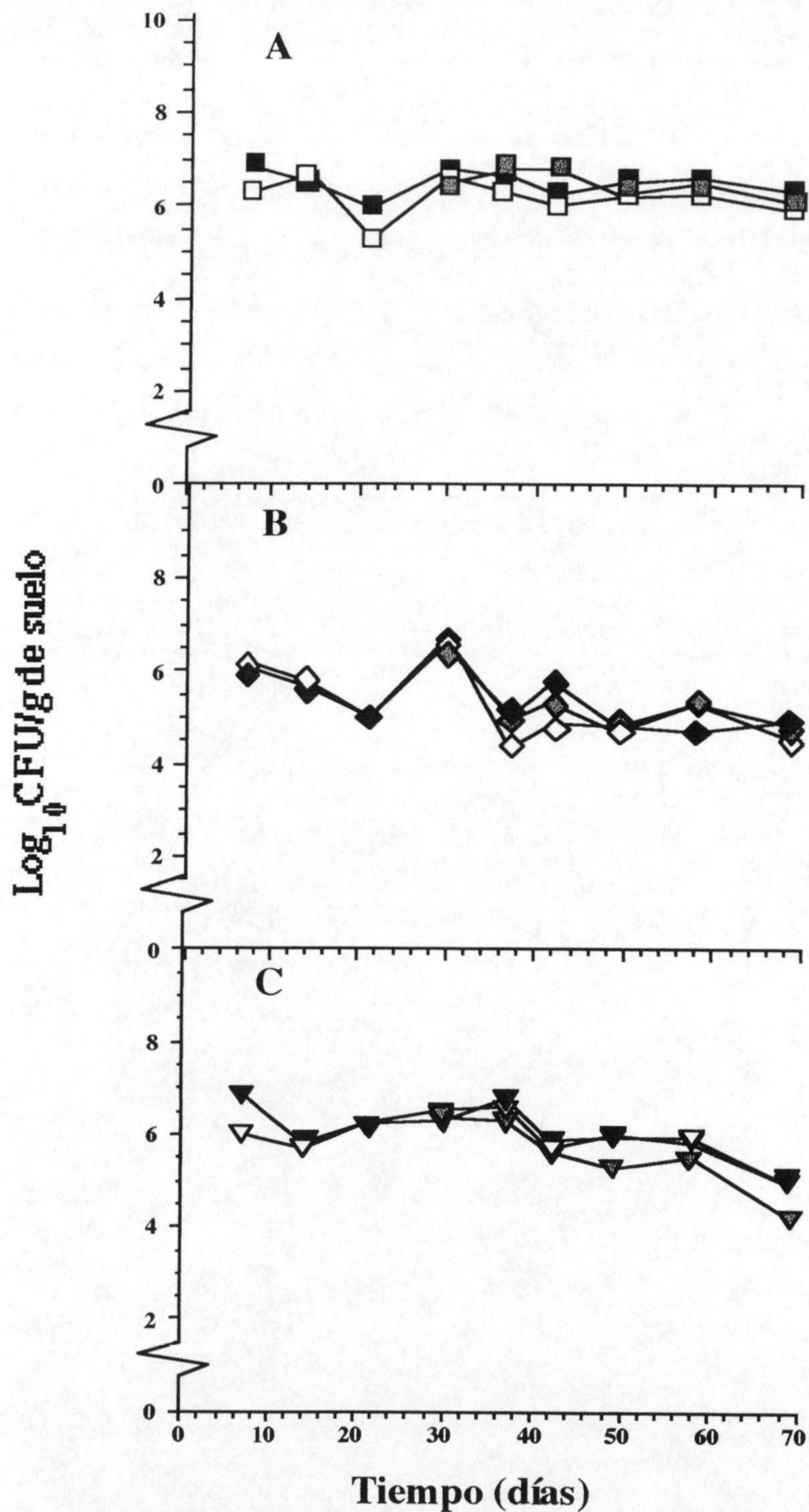


Figura 4.II. Supervivencia de las cepas *P. putida* EEZ-201, *P. chlororaphis* EEZ-204 y *M. luteus* EEZ-103 en los microcosmos donde se había establecido anteriormente la cepa bioluminiscente *P. putida* S1B1. Microcosmos compuestos de 500 g de suelo cambisol estéril se inocularon con la cepa *P. putida* S1B1 a una densidad celular de aproximadamente 10^7 UFC por g de suelo. Al cabo de los 7 días, se separaron alícuotas de 150 g de suelo de cada uno de estos microcosmos y se inocularon con cada una de las rizobacterias seleccionadas (*P. putida* EEZ-201, **A**; *P. chlororaphis*, **B** o *M. luteus*, **C**) a una densidad celular de 10^6 - 10^7 UFC por g de suelo. Se siguió el comportamiento tanto de estas poblaciones (símbolos blancos) como de la cepa *P. putida* S1B1 inoculada a este tiempo. Transcurridos 30 días, se repitió el proceso y las alícuotas obtenidas se inocularon con alguna de las rizobacterias seleccionadas a una densidad celular de 10^6 UFC por g de suelo. Se siguió tanto el comportamiento de estas poblaciones (símbolos azules) como de la cepa bioluminiscente inoculada a este tiempo. Como control se utilizaron las fracciones de suelo donde sólo se inoculó la cepa *P. putida* S1B1 y microcosmos donde no se inoculó esta cepa y sí la rizobacteria (símbolos negros) en cuestión. A diferentes intervalos de tiempo se calculó el número de cada una de las cepas presentes en los suelos mediante siembra en placas de medio selectivo.

1.2. Estudios de competencia en suelo no estéril.

Una vez analizado el establecimiento, la supervivencia y las relaciones competitivas con aislados naturales del suelo de la cepa *P. putida* S1B1 en suelo estéril, se procedió a realizar ensayos de competencia en suelo no estéril. Esta característica permite, por un lado, establecer las relaciones de competencia de la cepa en estudio en un ambiente más cercano a las condiciones naturales y, por otro lado, determinar el efecto de la introducción de la cepa en cuestión sobre poblaciones bacterianas de la microbiota indígena del suelo.

2.2.1. Construcción de derivados bioluminiscentes de las cepas aisladas de la rizosfera del maíz.

Las resistencias a antibióticos presentes en las cepas aisladas de la rizosfera del maíz (**Tabla I**, *Materiales y Métodos*) no permiten la selección exclusiva de las mismas a partir de muestras de suelo no estéril. Con objeto de facilitar la selección de estas cepas tras su inoculación en microcosmos edáficos no estériles se procedió al marcaje de algunas de estas cepas con el miniTn5/*luxAB*-Km presente en el plásmido pCK220 (apartado 2, *Materiales y Métodos*). La inserción de este miniTn5 en el cromosoma de estas cepas permite, por un lado la identificación bioluminiscente de las colonias aisladas del suelo y, por otro lado, confiere resistencia al antibiótico kanamicina, hecho que aparece a niveles relativamente bajos entre las poblaciones indígenas en el suelo en estudio (inferiores a 10^3 UFC por g de suelo en medio LB).

La transferencia del mini-Tn5/*luxA,B*-Km al cromosoma de las cepas *P. putida* EEZ-201, *P. chlororaphis* EEZ-204 y *P. fluorescens* EEZ-205 (**Tabla I**, *Materiales y Métodos*) se realizó mediante conjugación tripartita en la que participaron los aislados naturales correspondientes como cepas receptoras y como donador la cepa *E. coli* S17 λ pir (*Materiales y Métodos*, apartado 5). Los transconjugantes se seleccionaron en medio mínimo M9 con benzoato como única fuente de carbono adicionado con los antibióticos ácido nalidíxico y kanamicina. Transconjugantes Nal^R y Km^R de estas cepas aparecieron con una frecuencia de aproximadamente 10^{-7} por receptor. De entre las colonias que mostraron un fenotipo bioluminiscente tras la exposición de las mismas a *n*-decanal, se seleccionó el clon de cada cepa que produjo mayor emisión de luz. Los clones seleccionados se denominaron *P. putida* EEZ-201-L, *P. chlororaphis* EEZ-204-L y *P. fluorescens* EEZ-205-L.

La inserción del mini-Tn5/*luxAB*-Km en el cromosoma de estas cepas fue estable como se dedujo de que el 100% de las colonias obtenidas mantuvieron la resistencia al antibiótico kanamicina y mostraron el fenotipo bioluminiscente tras el cultivo durante 50 generaciones en medio LB sin antibiótico.

1.2.2. Efecto de la temperatura sobre las relaciones competitivas de la cepa *P. putida* S1B1 y las cepas *P. putida* EEZ-201-L o *P. chlororaphis* EEZ-204-L en microcosmos edáficos no estériles.

El objetivo de este experimento fue determinar la influencia de la temperatura, uno de los parámetros de mayor variabilidad en condiciones medioambientales, en las relaciones competitivas en suelo no esteril de la cepa *P. putida* S1B1 con otras cepas pertenecientes al género *Pseudomonas* aisladas de entre la microbiota natural de la rizosfera de maíz. Para ello, se introdujeron aproximadamente 10^6 UFC por g de suelo de cada una de las cepas bioluminiscentes derivadas de los aislados naturales con la misma densidad celular de *P. putida* S1B1. Los microcosmos se mantuvieron en un invernadero a 25°C, o se incubaron en estufas a 30 ó 37°C. Como control, se utilizaron microcosmos inoculados independientemente con cada uno de los microorganismos utilizados a la misma densidad celular. Las cepas *P. putida* EEZ-201-L y *P. chlororaphis* EEZ-204-L se seleccionaron en placas de medio mínimo M9 con benzoato como única fuente de carbono suplementadas con los antibióticos kanamicina y ácido nalidíxico; la cepa S1B1 se seleccionó en el mismo medio pero con rifampicina y kanamicina.

El comportamiento de las 4 cepas en estudio en los microcosmos incubados a 25 y 30°C fue muy similar. A estas temperaturas, el número de UFC por g de suelo de *P. putida* S1B1 disminuyó desde 10^6 a aproximadamente 10^4 - 10^5 UFC por g de suelo durante los 30 días que duró el ensayo, independientemente de la introducción simultánea en el suelo de alguna de las otras tres cepas (**Figuras 5.II, 6.II y 7.II**). A estas mismas temperaturas, e independientemente de la presencia o ausencia de *P. putida* S1B1, las cepas *P. putida* EEZ-201-L (**Figura 5.II**), *P. chlororaphis* EEZ204-L (**Figura 6.II**) y *P. fluorescens* EEZ-205-L (**Figura 7.II**) se establecieron a una densidad ligeramente superior, 10^5 - 10^6 UFC por g de suelo (**Figura 5.II**) y aproximadamente 10^5 UFC por g de suelo (**Figura 6.II y 7.II**), respectivamente.

A 37°C el número de bacterias disminuyó progresivamente en todos los microcosmos hasta localizarse, antes de finalizado el ensayo, por debajo del límite de detección mediante conteo en placas de medio selectivo: *P. putida* S1B1, *P. putida* EEZ-201-L y *P. fluorescens* EEZ-205-L lo hicieron al cabo de 14-21 días (**Figuras 5.II, 6.II y 7.II**) y *P. chlororaphis* EEZ-204-L, al cabo de 21-30 días para (**Figura 6.II**). La disminución del número de UFC por g de suelo fue en todos los casos independiente de la introducción simultánea de dos cepas en el mismo microcosmos. En todos los casos en que el número de UFC por g de suelo se encontró por debajo del límite de detección mediante conteo en placas de medio selectivo, se recurrió al enriquecimiento selectivo de las cepas como se describe en el apartado 15 de *Materiales y Métodos*. En todos los casos se detectó bioluminiscencia en los cultivos enriquecidos, lo que indicó que las cepas sobrevivieron en el suelo durante todo el tiempo que duró el ensayo, aunque el número de células de *P. putida* S1B1 capaces de formar colonias fue muy bajo.

1.2.3. Efectos de la introducción de la cepa *P. putida* S1B1 en suelos no estériles sobre la supervivencia de la microbiota natural del suelo.

Los resultados descritos en los apartados anteriores indicaron que la introducción de la cepa *P. putida* S1B1 en suelos no provoca ningún efecto significativo apreciable sobre la supervivencia de cepas concretas aisladas originariamente de suelo. En este apartado se describe el efecto de la introducción de *P. putida* S1B1 sobre diferentes poblaciones presentes en el suelo cambisol objeto de este estudio. Como poblaciones indicadoras de la microbiota del suelo se utilizaron las siguientes poblaciones: 1) microorganismos que exhiben resistencia al antibiótico tetraciclina. El número de bacterias resistentes a este antibiótico se determinó en placas medio LB con tetraciclina a una concentración de 15 µg/ml. 2) Bacterias capaces de utilizar ácido *p*-hidroxifenilacético como única fuente de carbono. Se determinó el número de estas bacterias en placas con medio mínimo M9 con ácido *p*-hidroxifenilacético a una concentración 10 mM. 3) *Pseudomonadaceae* fluorescentes totales, seleccionadas en medio agar King y 4) los microorganismos capaces de crecer en medio rico LB. Como control se utilizó un microcosmos donde no se inoculó ninguna cepa.

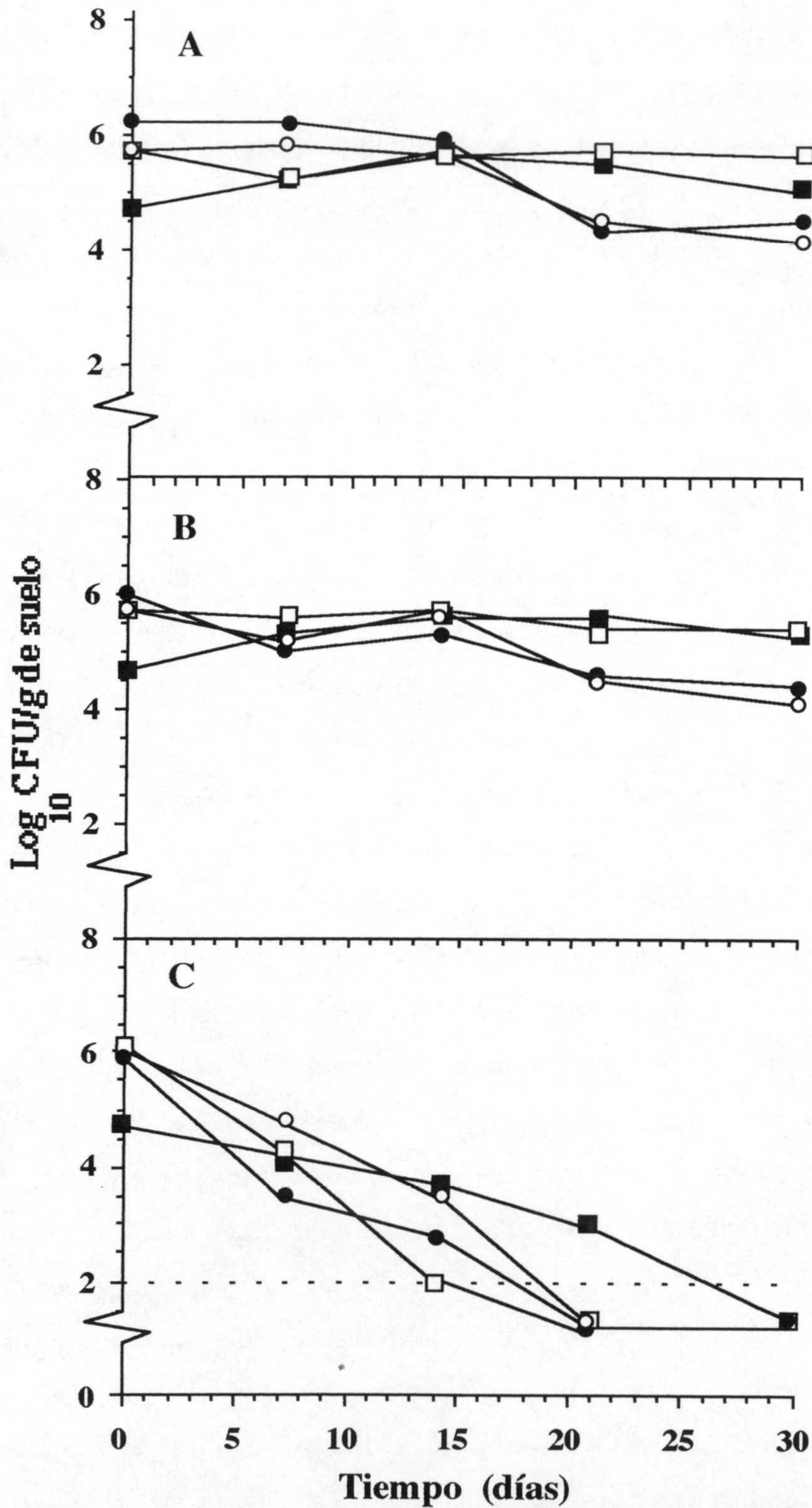


Figura 5.II. Supervivencia de la cepa *P. putida* EEZ-201-L y *P. putida* S1B1 coinoculadas en microcosmos edáficos no estériles incubados a distintas temperaturas. *P. putida* S1B1 (círculos) y *P. putida* EEZ-201-L (cuadrados) se inocularon simultáneamente en microcosmos compuestos por 90 gramos de suelo tipo cambisol no estéril. Los microcosmos se incubaron a 25°C (A), a 30°C (B), ó 37°C (C).

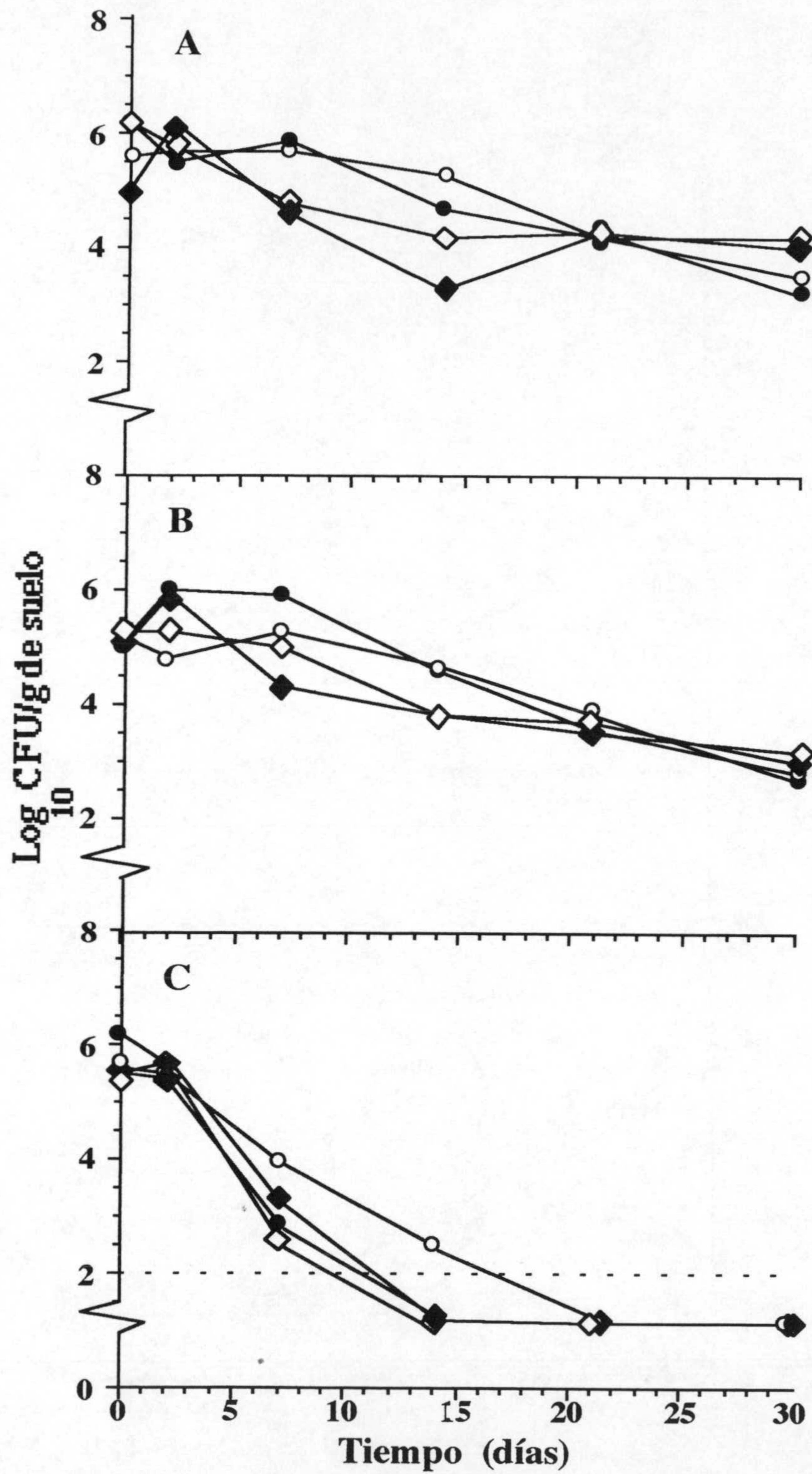


Figura 6.II. Supervivencia de la cepa *P. chlororaphis* EEZ-204-L y *P. putida* S1B1 coinoculadas en microcosmos edáficos no estériles incubados a distintas temperaturas. *P. putida* S1B1 (círculos) y *P. chlororaphis* EEZ-204-L (rombos) se inocularon simultáneamente en microcosmos compuestos por 90 gramos de suelo tipo cambisol no estéril. Los microcosmos se incubaron a 25°C (A), a 30°C (B), ó 37°C (C).

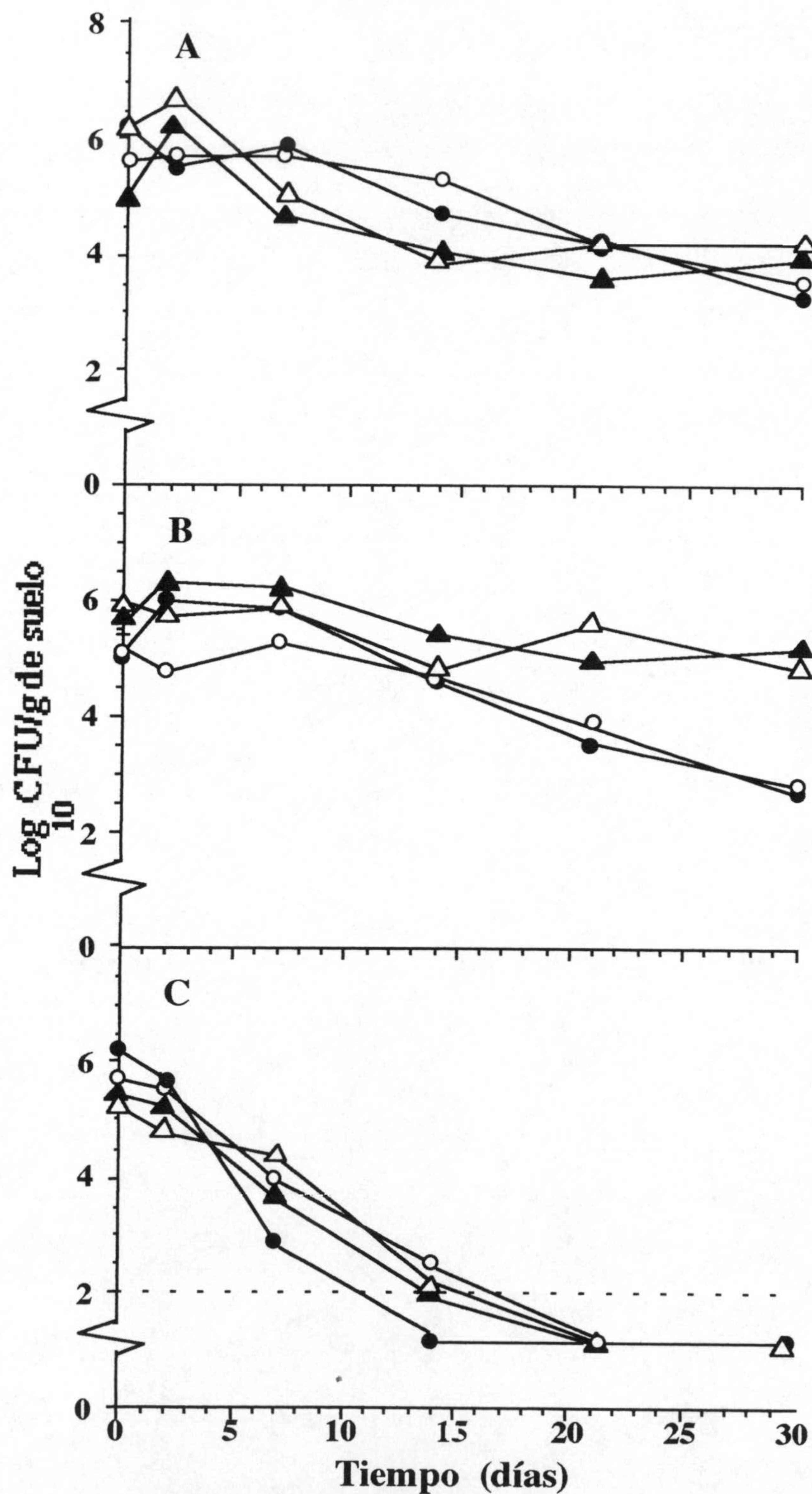


Figura 7.II. Supervivencia de la cepa *P. fluorescens* EEZ-205-L y *P. putida* S1B1 coinoculadas en microcosmos edáficos no estériles incubados a distintas temperaturas. *P. putida* S1B1 (círculos) y *P. fluorescens* EEZ-205-L (rombos) se inocularon simultáneamente en microcosmos compuestos por 90 gramos de suelo tipo cambisol no estéril. Los microcosmos se incubaron a 25°C (A), a 30°C (B), ó 37°C (C).

P. putida S1B1 se introdujo en microcosmos edáficos de suelo cambisol no estéril a una densidad celular de aproximadamente 10^6 UFC por g de suelo. Transcurridos 30 días, y en concordancia con lo descrito en apartados anteriores, el número de UFC por g de disminuyó hasta aproximadamente 10^4 UFC por g de suelo. Por el contrario, las poblaciones indígenas estudiadas se mantuvieron a una densidad celular relativamente estable durante los 30 días que duró el ensayo, independientemente de la presencia en el suelo de la cepa *P. putida* S1B1. La población resistente al antibiótico tetraciclina se mantuvo en una densidad celular de aproximadamente 10^3 UFC por g de suelo, las *Pseudomonadaceae* fluorescentes y las bacterias capaces de utilizar el ácido *p*-hidroxifenilacético como única fuente de carbono se mantuvieron en niveles de aproximadamente 10^7 UFC por g de suelo y la población capaz de crecer en medio LB lo hizo a niveles de aproximadamente 10^7 - 10^8 UFC por g de suelo (**Figura 8.II**).

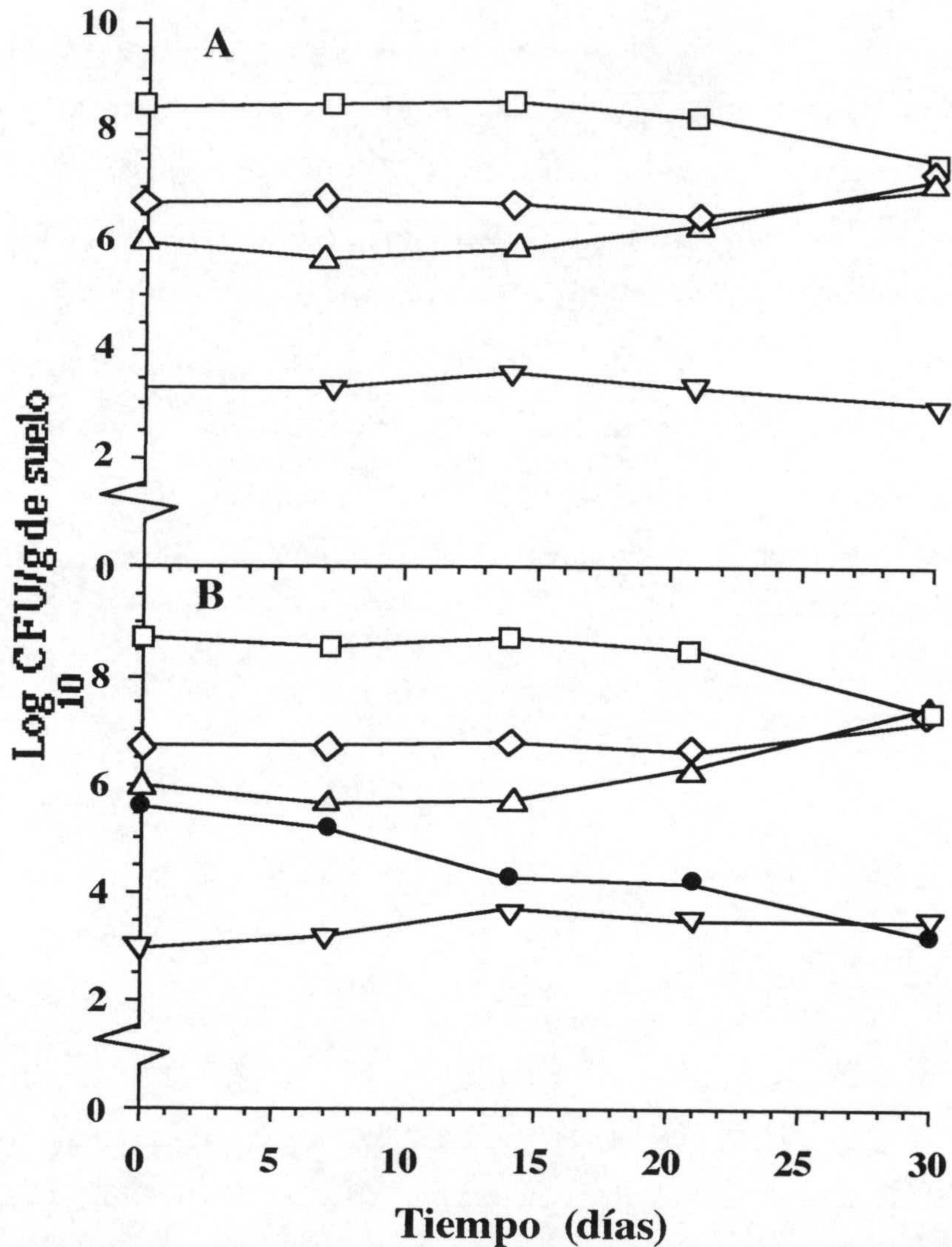


Figura 8 .II. Efecto de la introducción en microcosmos edáficos no estériles de la cepa *P. putida* S1B1 sobre la supervivencia de poblaciones generales del suelo. Noventa gramos de suelo cambisol sin inocular (A) o inoculados con aproximadamente 10^6 UFC/g de suelo de la cepa *P. putida* S1B1 (B) se incubaron a 25°C. A los tiempos indicados se determinó el número de UFC/g de suelo tanto de esta cepa (círculos) como de las siguientes poblaciones bacterianas indicadoras de la microbiota natural de suelo: la población capaz de crecer en medio LB (cuadrados), la población de *Pseudomonadaceae* fluorescentes (triángulos), las bacterias capaces de utilizar el ácido *p*-hidroxifenilacético como única fuente de carbono (rombos) y la población bacteriana resistente a tetraciclina (triángulos invertidos).

2. ESTABLECIMIENTO Y SUPERVIVENCIA DE *P. putida* S1B1 EN LA RIZOSFERA DEL MAÍZ EN PRESENCIA DE CEPAS INDÍGENAS AISLADAS DE ESTE NICHO ECOLÓGICO.

En este apartado se describe el efecto de la introducción de *P. putida* S1B1 en la rizosfera de plantas de maíz cultivadas en condiciones de invernadero sobre la supervivencia de algunos de los aislados naturales descritos anteriormente, así como de algunas poblaciones genéricas en este nicho ecológico. En este caso se seleccionaron las siguientes cepas aisladas de la rizosfera de plantas de maíz: *Bacillus alvei* EEZ-102, *Micrococcus luteus* EEZ-103, como gram positivas; *P. putida* EEZ-201 y *P. chlororaphis* EEZ-204 (**Tabla 1** de *Materiales y Métodos*).

2.1. Estudios de competencia en suelo estéril

Semillas de maíz se inocularon con dos densidades celulares distintas: 10^3 - 10^5 y aproximadamente 10^6 - 10^8 UFC por semilla de las cepas *P. putida* S1B1 o cada uno de los aislados de la rizosfera mencionados anteriormente. Estas semillas se sembraron en suelo tipo cambisol estéril y, tras de 5 y 14 días de cultivo de las plantas de maíz, se determinó el número de células presentes en la rizosfera mediante recuento en placas de medio selectivo.

Tras 5 días, el número de UFC por g de rizosfera de todas las cepas en estudio se estableció a la misma densidad celular, independientemente de la densidad celular inicial del inóculo, los valores obtenidos se mantuvieron relativamente constantes 14 días después de la siembra. Todas las cepas gram-negativas utilizadas se establecieron aproximadamente a la misma densidad celular, 10^7 - 10^8 CFU por g de suelo rizosférico. Sin embargo, las cepas gram-positivas se establecieron a un nivel inferior, de aproximadamente 10^6 UFC por g de suelo. (**Tabla 3.II**).

Tabla 3.II. Colonización de la rizosfera de maíz en suelo estéril por *P. putida* S1B1 en comparación a aislados indígenas de este nicho. Semillas de maíz esterilizadas en superficie se inocularon con *P. putida* S1B1 o con cepas aisladas de la rizosfera de este nicho ecológico a la densidad celular indicada. Estas semillas se sembraron en microcosmos que contenían aproximadamente 200 g de suelo cambisol estéril y, a los tiempos indicados, se determinó el número de UFC por g de suelo rizosférico.

Cepa inoculada	Dosis celular inicial ^a	Conteo celular	
		t = 5 días ^a	t = 14 días ^a
S1B1	4'8	8'2	8'3
	8'5	8'5	7'4
EEZ-102	5'5	7'2	6'2
	8'8	6'6	6'2
EEZ-103	4'7	8'7	5'9
	7'2	8'9	6'2
EEZ-201	4'8	8'3	7'2
	7'6	7'7	8'0
EEZ-204	3'2	7'8	8'3
	6'0	8'3	7'8

^aSe indica el conteo de \log_{10} CFU por g de suelo en los tiempos indicados.

A continuación se estudió el efecto de la coinoculación de las semillas de maíz con algunas cepas aisladas de la rizosfera de maíz y la cepa bioluminiscente *P. putida* S1B1 sobre la supervivencia de las mismas en la rizosfera de esta planta.

Se consideraron tres dosis diferentes de inóculo: 1) Ambas cepas se inocularon a aproximadamente la misma densidad celular, 10^3 - 10^5 UFC por semilla; 2) *P. putida* S1B1 a 10^3 - 10^5 UFC por semilla y la bacteria aislada de la rizosfera a aproximadamente 10^6 - 10^8 UFC por semilla; 3) *P. putida* S1B1 a 10^6 - 10^7 UFC por semilla y la bacteria aislada de la rizosfera a 10^3 - 10^5 UFC por semilla. Como controles se utilizaron semillas donde sólo se inoculó un tipo celular a la dosis celular inicial aproximada de 10^4 ó 10^7 UFC/semilla. Tras 15 días de la siembra, se determinó el nivel de establecimiento de cada una de las cepas mediante recuento de colonias en placas de medio selectivo.

Independientemente de la densidad celular inicial, e independientemente de la cepa utilizada como coinoculante, tanto la cepa *P. putida* S1B1 como el aislado natural se establecieron en el suelo rizosférico a aproximadamente el mismo nivel que cuando las cepas se inocularon solas (Tabla 4.II). Estos resultados indicaron que las cepas probadas en este estudio no compitieron con *P. putida* S1B1 a la hora de colonizar el suelo rizosférico y viceversa.

Tabla 4.II. Competencia entre *P. putida*, S1B1 y algunos de los aislados naturales en la rizosfera de plantas de maíz cultivadas en suelo estéril. Semillas de maíz esterilizadas en superficie se inocularon simultáneamente y a la densidad celular indicada con las cepas *P. putida* S1B1 y uno de los siguientes aislados naturales: *B. alvei* EEZ-102, *M. luteus*-EEZ-203, *P. putida* EEZ-201 y *P. chlororaphis* EEZ.204. Como control se utilizaron semillas inoculadas con un tipo celular a las dosis celulares indicadas. Estas semillas se sembraron en microcosmos que contenían 200 g de suelo cambisol estéril y se incubaron en un invernadero a 25°C.

A) Gram positivas:

Cepas inoculadas	Densidad celular inicial, t = 0 ^a	Cepa a considerar	t = 15 días ^a
S1B1	4'8	S1B1	7'3
S1B1	8'5	S1B1	7'4
EEZ-102	5'3	EEZ-102	6'2
EEZ-102	8'4	EEZ-102	6'3
S1B1:EEZ-102	5'0:4'8	S1B1	8'2
		EEZ-102	6'2
S1B1:EEZ-102	5'6:8'6	S1B1	7'5
		EEZ-102	6'3
S1B1:EEZ-102	7'8:5'7	S1B1	7'8
		EEZ-102	6'4
EEZ-103	4'5	EEZ-103	5'9
EEZ-103	7'1	EEZ-103	6'3
S1B1:EEZ-103	4'3:4'0	S1B1	7'5
		EEZ-103	5'5
S1B1:EEZ-103	4'5:7'2	S1B1	7'3
		EEZ-103	5'9
S1B1:EEZ-103	7'5:5'4	S1B1	7'1
		EEZ-103	6'0

B) Gram negativas:

Cepas inoculadas	Densidad celular inicial, t = 0 ^a	Cepa a considerar	t = 21 días ^a
S1B1	3'3	S1B1	7'6
S1B1	6'1	S1B1	7'5
EEZ-201	3'2	EEZ-201	7'5
EEZ-201	6'3	EEZ-201	7'5
S1B1:EEZ-201	3'2:3'2	S1B1	7'2
		EEZ-201	7'0
S1B1:EEZ201	3'3:6'3	S1B1	6'9
		EEZ-201	7'2
S1B1:EEZ-201	6'3:3'1	S1B1	8'2
		EEZ-201	6'9
EEZ-204	3'3	EEZ-204	8'2
EEZ-204	6'0	EEZ-204	7'6
S1B1:EEZ-204	3'8:3'5	S1B1	7'3
		EEZ-204	8'5
S1B1:EEZ-204	3'7:6'5	S1B1	6'9
		EEZ-204	8'3
S1B1:EEZ-204	6'8:3'2	S1B1	8'2
		EEZ-204	8'5

^aSe indica el conteo de log¹⁰CFU por g de suelo en los tiempos indicados.

2.2. Estudios de competencia en suelos no estériles.

El paso siguiente en esta investigación fue el estudio del comportamiento de algunas de estas rizobacterias en entornos rizosféricos no estériles. Con objeto de facilitar la selección de los aislados naturales a partir de las muestras de suelo rizosférico no estéril, se utilizaron los derivados bioluminiscentes y Km^R *P. putida* EEZ-201-L, *P. chlororaphis* EEZ-204-L y *P. fluorescens* EEZ-205-L descritos en el apartado 1.2.1 de este capítulo.

2.2.1. Competencia entre las cepas *P. putida* S1B1 y algunos de los aislados naturales en la rizosfera de plantas de maíz cultivadas en suelo no estéril.

Semillas de maíz se inocularon simultáneamente con 10⁶ UFC por semilla de la cepa *P. putida* S1B1 y con la misma densidad celular de una de las cepas siguientes: *P. putida* EEZ-201-L, *P. chlororaphis* EEZ-204-L o *P. fluorescens* EEZ-205-L. Las semillas se sembraron en macetas que contenían 1 Kg de una mezcla 3:2 de suelo de tipo cambisol y arena no estéril (*Materiales y Métodos*, apartado 13.5). Como control se utilizaron semillas inoculadas únicamente con la cepa *P. putida* S1B1 o el aislado natural seleccionado a la misma densidad celular. Siete y 30 días después de la siembra, se determinó el número de UFC por g de suelo de cada una de las cepas presentes en el suelo rizosférico (**Tabla 5.II**) y en el suelo no rizosférico (**Tabla 6.II**).

La inoculación simultánea de *P. putida* EEZ-201-L, *P. chlororaphis* EEZ-204-L o *P. fluorescens* EEZ-205-L con la cepa *P. putida* S1B1 en la rizosfera de maíz no ejerció ningún efecto negativo sobre el comportamiento de ninguna de las cepas estudiadas. El número de UFC por g de suelo rizosférico alcanzado después de 7 días por cada una de las cepas en estudio se mantuvo aproximadamente al mismo nivel 30 días después de la siembra. *P. putida* S1B1 alcanzó niveles de colonización de aproximadamente 10⁵-10⁶ UFC por g de suelo rizosférico, independientemente de si se inoculó en las semillas de forma aislada o conjuntamente con una de las otras 3 cepas. La densidad celular alcanzada por las bacterias aisladas de la rizosfera se situó en aproximadamente 10⁶-10⁷ UFC por g de suelo rizosférico, independientemente de la presencia o ausencia de la cepa *P. putida* S1B1 (**Tabla 5.II**).

Tabla 5.II. Competencia entre la cepa *P. putida* S1B1 y algunos de los aislados naturales en la rizosfera de plantas de maíz cultivadas en suelo no estéril. Semillas de maíz esterilizadas en superficie se inocularon con 10^6 UFC/semilla de la cepa *P. putida* S1B1 y la misma densidad celular de alguna de los aislados naturales que se indican. Como control se utilizaron semillas inoculadas a la misma densidad celular con una sólo una de las cepas. A los tiempos indicados se determinó el número de UFC por g de suelo rizosférico de cada una de las cepas en placas de medio selectivo.

Cepas inoculadas	Cepa a considerar	t= 7 días.	t = 30 días ^a
S1B1	S1B1	5'4	5'5
EEZ-201-L	EEZ-201-L	6'5	7'2
S1B1:EEZ-201-L	S1B1	5'2	5'6
	EEZ-201	6'5	7'5
EEZ-204-L	EEZ-204-L	6'7	7'2
S1B1:EEZ-204-L	S1B1	5'7	5'6
	EEZ-204-L	6'5	7'5
EEZ-205-L	EEZ-205-L	6'7	7'3
S1B1:EEZ-205-L	S1B1	5'8	5'3
	EEZ-205-L	6'9	7'2

^aSe indica el conteo de \log^{10} CFU por g de suelo en los tiempos indicados.

La inoculación simultánea de *P. putida* EEZ-201-L, *P. chlororaphis* EEZ-204-L o *P. fluorescens* EEZ-205-L con la cepa *P. putida* S1B1 no ejerció ningún efecto negativo sobre el comportamiento de ninguna de las cepas estudiadas en el suelo no rizosférico de plantas de maíz. *P. putida* S1B1 alcanzó niveles de colonización de aproximadamente 10^2 - 10^3 UFC por g de suelo, independientemente de si se inoculó en las semillas de forma aislada o conjuntamente con una de las otras 3 cepas. La densidad celular alcanzada por las bacterias aisladas de la rizosfera se situó en aproximadamente 10^4 - 10^5 UFC por g de suelo rizosférico, independientemente de la presencia o ausencia de la cepa *P. putida* S1B1 (Tabla 6.II). Todos estos resultados indicaron que todas estas cepas se establecieron en el suelo no rizosférico en un nivel de 2 a 3 órdenes de magnitud por debajo de lo que lo hicieron en suelo rizosférico.

Tabla 6.II. Competencia entre la cepa *P. putida* S1B1 y algunos de los aislados naturales en el suelo no rizosférico de plantas de maíz cultivadas en suelo no estéril. Semillas de maíz esterilizadas en superficie se inocularon con 10^6 UFC/semilla de la cepa *P. putida* S1B1 y la misma densidad celular de alguna de los aislados naturales que se indican. Como control se utilizaron semillas inoculadas a la misma densidad celular con una sólo una de las cepas. A los tiempos indicados se determinó el número de UFC por g de suelo no rizosférico de cada una de las cepas en placas de medio selectivo.

Cepas inoculadas	Cepas a considerar	t= 7 días.	t = 30 días ^a
S1B1	S1B1	3'5	2'5
EEZ-201-L	EEZ-201-L	3.7	4'7
S1B1:EEZ-201-L	S1B1	4,2	2'8
	EEZ-201	3'8	4'5
EEZ-204-L	EEZ-204-L	5'3	4'8
S1B1:EEZ-204-L	S1B1	4'3	2'4
	EEZ-204-L	5'3	4'9
EEZ-205-L	EEZ-205-L	5'5	4'2
S1B1:EEZ-205-L	S1B1	3'3	2'6
	EEZ-205-L	5'0	4'2

^aSe indica el conteo de \log^{10} CFU por g de suelo en los tiempos indicados.

2.2.2. Efecto de la colonización de la rizosfera de plantas de maíz por la cepa bioluminiscente *P. putida* S1B1 sobre la supervivencia de poblaciones bacterianas indígenas de este nicho ecológico.

Semillas de maíz inoculadas con aproximadamente de 10^6 UCF por semilla de *P. putida* S1B1 se sembraron en macetas que contenían suelo cambisol no estéril. Como control se utilizaron macetas donde se sembraron semillas sin inocular. A diferentes tiempos se determinó la densidad celular de las siguientes poblaciones bacterianas indicadoras de la microbiota natural de suelo (**Figura 9.II**): 1) bacterias resistentes al antibiótico tetraciclina; 2) bacterias capaces de utilizar ácido *p*-hidroxifenilacético como única fuente de carbono; 3) *Pseudomonadaceae* fluorescentes totales en un medio agar King's y 4) las bacterias capaces de crecer en medio rico LB.

La densidad celular de las diferentes poblaciones bacterianas indígenas en la rizosfera de plantas de maíz se mantuvo estable a lo largo de todo el experimento, independientemente de la introducción en la rizosfera de la cepa *P. putida* S1B1 (**Figura 9.II**). El número de bacterias capaces de crecer en LB fue de aproximadamente 10^8 UFC por g de suelo rizosférico, el número de *Pseudomonadaceae* fluorescentes y de

bacterias capaces de utilizar el ácido *p*-hidroxifenilacético como única fuente de carbono se calculó en 10^7 UFC por g de suelo rizosférico y el de la población de microorganismos resistentes a tetraciclina fue de 10^4 UCF por g de suelo rizosférico. En concordancia con los resultados obtenidos anteriormente, la cepa *P. putida* S1B1 se estableció a niveles de 10^5 - 10^6 UFC por g de suelo rizosférico.

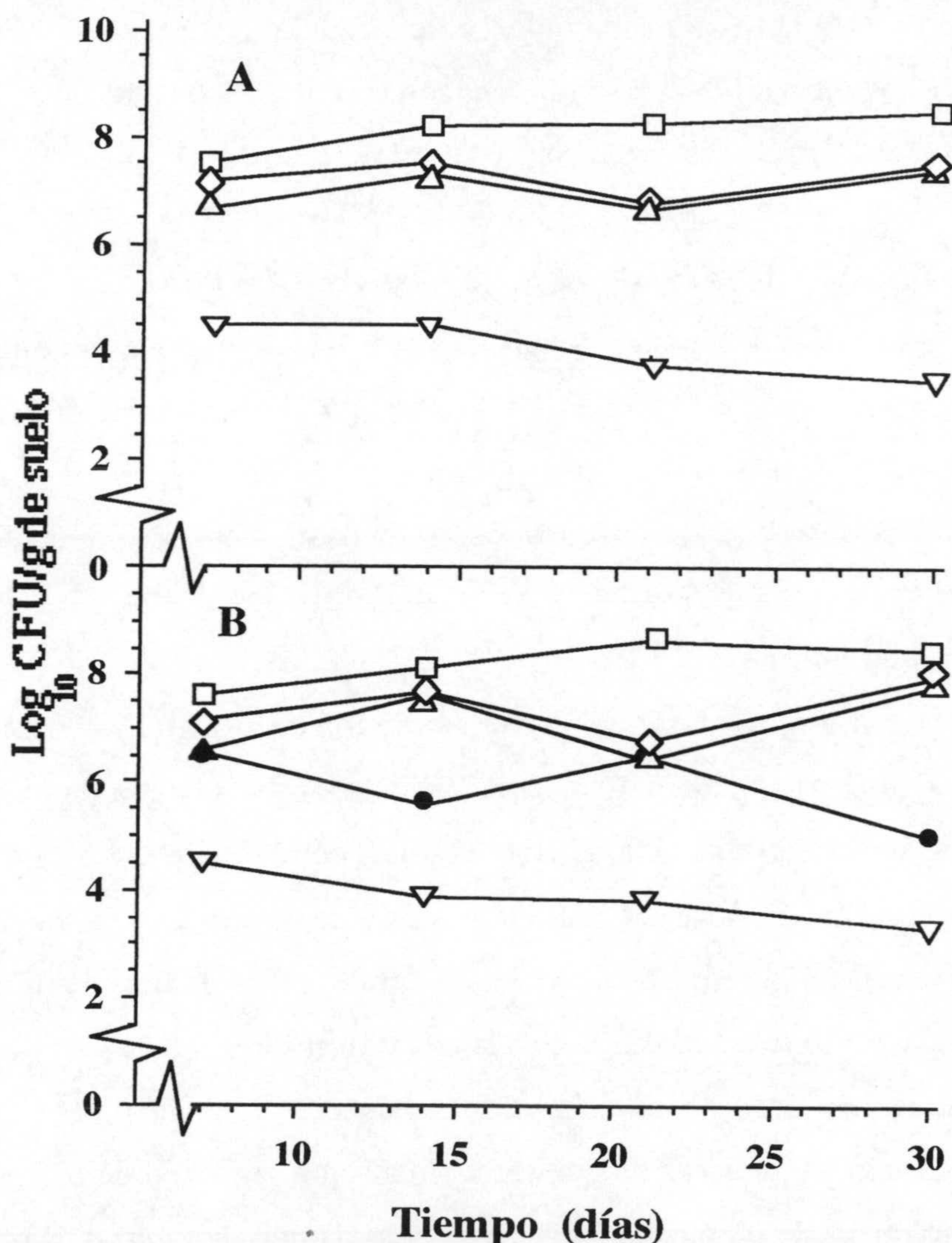


Figura 9.II. Efecto de la colonización de la rizosfera de plantas de maíz por la cepa *P. putida* S1B1 sobre la supervivencia de poblaciones bacterianas indígenas generales de este nicho ecológico. Semillas de maíz esterilizadas en superficie se inocularon (B) o no (A) con 10^6 UFC/semilla de la cepa *P. putida* S1B1. Las semillas se sembraron en macetas que contenían 1 Kg de suelo cambisol no estéril. A los tiempos indicados se determinó el número de UFC/g de suelo rizosférico de la cepa *P. putida* S1B1 (círculos cerrados) así como de las siguientes poblaciones indicadoras de la microbiota indígena de la rizosfera de maíz: la población bacteriana capaz de formar colonias en medio LB (cuadrados), las *Pseudomonadaceae* fluorescentes de este entorno (triángulos), la población capaz de utilizar el ácido *p*-hidroxifenilacético (rombos) y la población resistente al antibiótico tetraciclina (triángulos invertidos).

3. ESTUDIO COMPARATIVO DE LA COLONIZACIÓN DE LA RIZOSFERA DE PLANTAS DE INTERÉS COMERCIAL *IN SITU* POR LAS CEPAS *P. putida* EEZ-201-L, *P. chlororaphis* EEZ-204-L y *P. fluorescens* EEZ-205-L.

El fenotipo bioluminiscente de las cepas *P. putida* EEZ-201-L, *P. chlororaphis* EEZ-204-L y *P. fluorescens* EEZ-205-L se utilizó para estudiar el patrón de colonización de la rizosfera *in situ* por estas cepas mediante autorradiografiado y detección de fotones utilizando la cámara CCD (apartado 16 de *Materiales y Métodos*). Para ello se inocularon semillas de plantas de interés comercial con una densidad de 10^6 UFC/semilla, las cuales se sembraron en vermiculita o en suelo fluvisol no estéril.

3.1. Colonización de la rizosfera de plantas crecidas en vermiculita.

Semillas de maíz, haba, espinaca y acelga se inocularon con las cepas bioluminiscentes: *P. putida* EEZ-201-L, *P. chlororaphis* EEZ-204-L o *P. fluorescens* EEZ-205-L. Estas semillas se sembraron en tubos con vermiculita (apartado 16 de *Materiales y Métodos*) y, transcurridos 7 y/o 14 días después de la siembra, se extrajeron las plantas y se analizó el patrón de emisión de luz en las raíces mediante autorradiografiado

En la **Figura 10.II** se muestra el patrón de emisión de bioluminiscencia obtenido a partir de raíces de plantas de maíz colonizadas por cada una de las cepas en estudio. En las raíces de plantas de 7 días colonizadas por las cepas *P. putida* EEZ-201-L y *P. chlororaphis* EEZ-204-L se detectó la emisión de luminiscencia únicamente en la parte de la raíz próxima a la semilla. Sin embargo, raíces extraídas al mismo tiempo y colonizadas por la cepa *P. fluorescens* EEZ-205-L mostraron bioluminiscencia detectable tanto a lo largo de toda la raíz como en el ápice de la misma.

En la **Figura 11.II** se muestra el patrón de emisión de bioluminiscencia obtenido a partir de raíces de plantas de habas colonizadas por cada una de las cepas en estudio. En las raíces de 7 ó 14 días colonizadas por *P. putida* EEZ-201-L y *P. chlororaphis* EEZ-204 se detectó la emisión de luminiscencia fundamentalmente en la parte de la raíz cercana a la semilla. Plantas de haba de 14 días cultivadas a partir de semillas inoculadas con *P. putida* EEZ-201-L mostraron también bioluminiscencia en los ápices de las raíces secundarias. Las raíces de 7 días colonizadas por la cepa *P. fluorescens* EEZ-205-L mostraron bioluminiscencia fundamentalmente en la parte superior de la raíz. Raíces de plantas de 14 días colonizadas por esta cepa mostraron bioluminiscencia a lo largo de toda

la raíz principal, aunque el patrón de emisión de luz obtenido fue heterogéneo, localizándose en puntos concretos y llevando hasta el ápice. En este mismo caso también se pudo detectar bioluminiscencia en las raíces secundarias de estas plantas.

En la **Figura 12.II** se muestra el patrón de emisión de bioluminiscencia obtenido a partir de raíces de plantas de acelga colonizadas por cada una de las cepas en estudio. En las raíces de plantas de 14 días colonizadas por las cepas *P. putida* EEZ-201-L y *P. chlororaphis* EEZ-204 se detectó la emisión de luminiscencia únicamente en la parte de la raíz próxima a la semilla. Sin embargo, raíces extraídas al mismo tiempo y colonizadas por la cepa *P. fluorescens* EEZ-205-L mostraron bioluminiscencia detectable tanto a lo largo de toda la raíz como en el ápice de la misma.

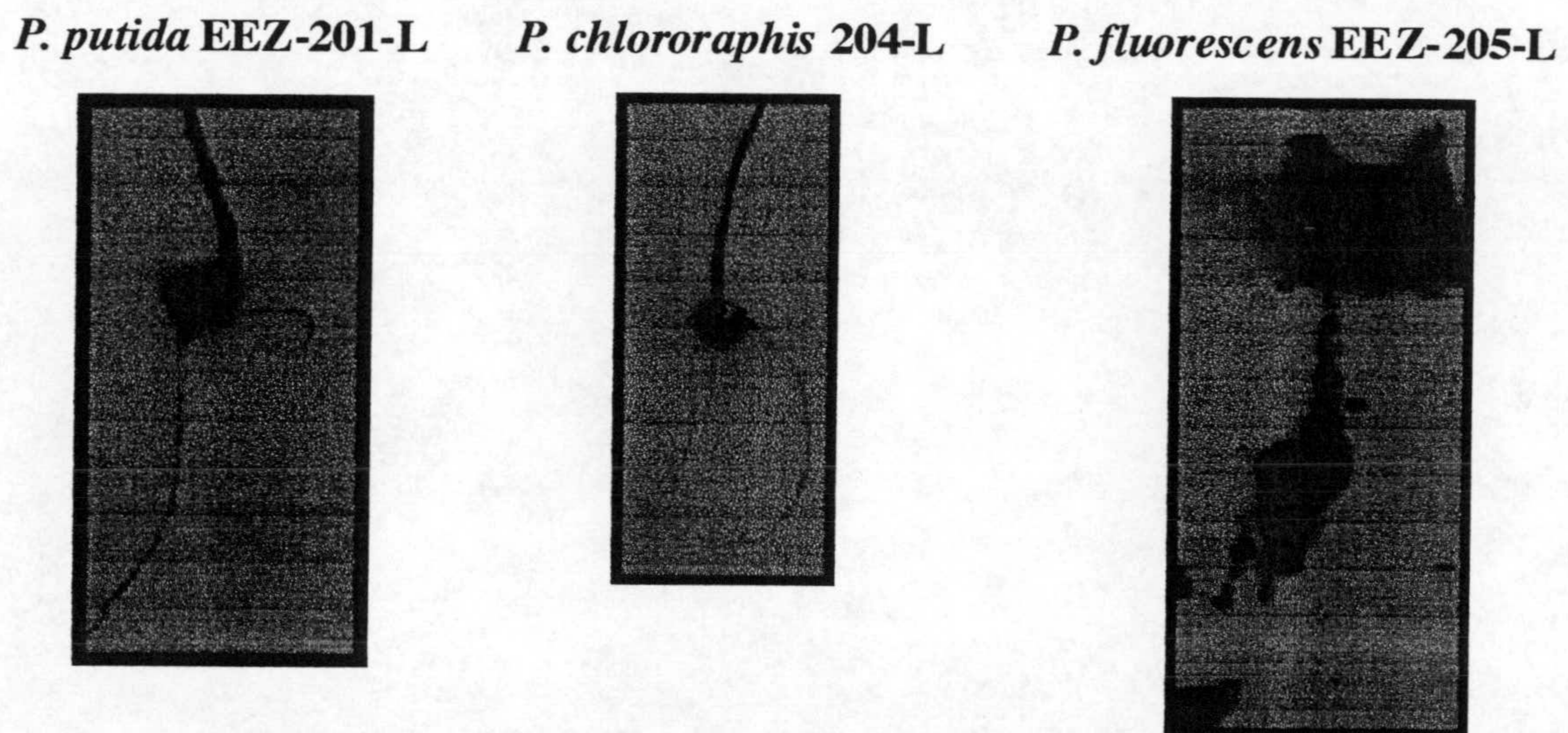
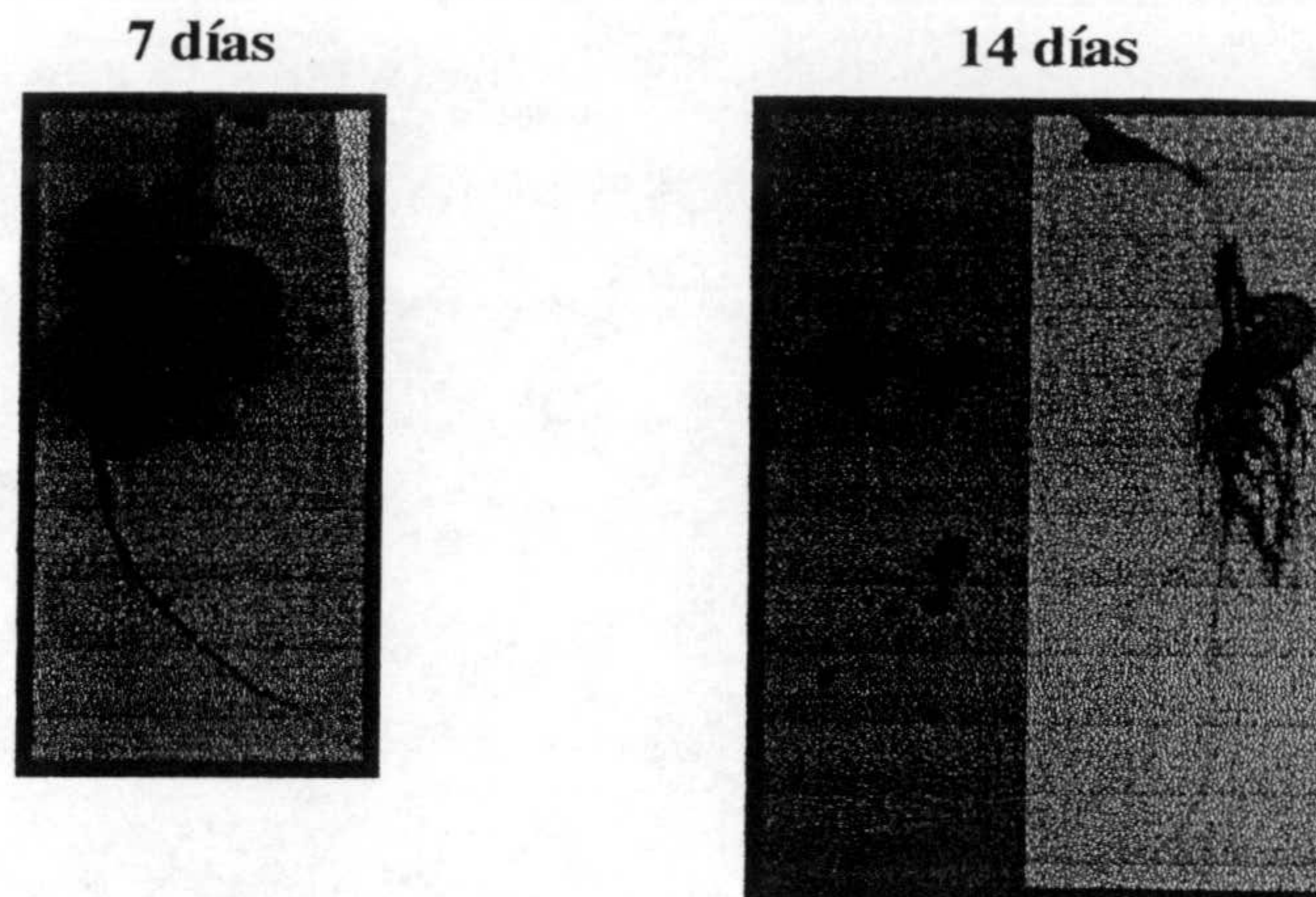
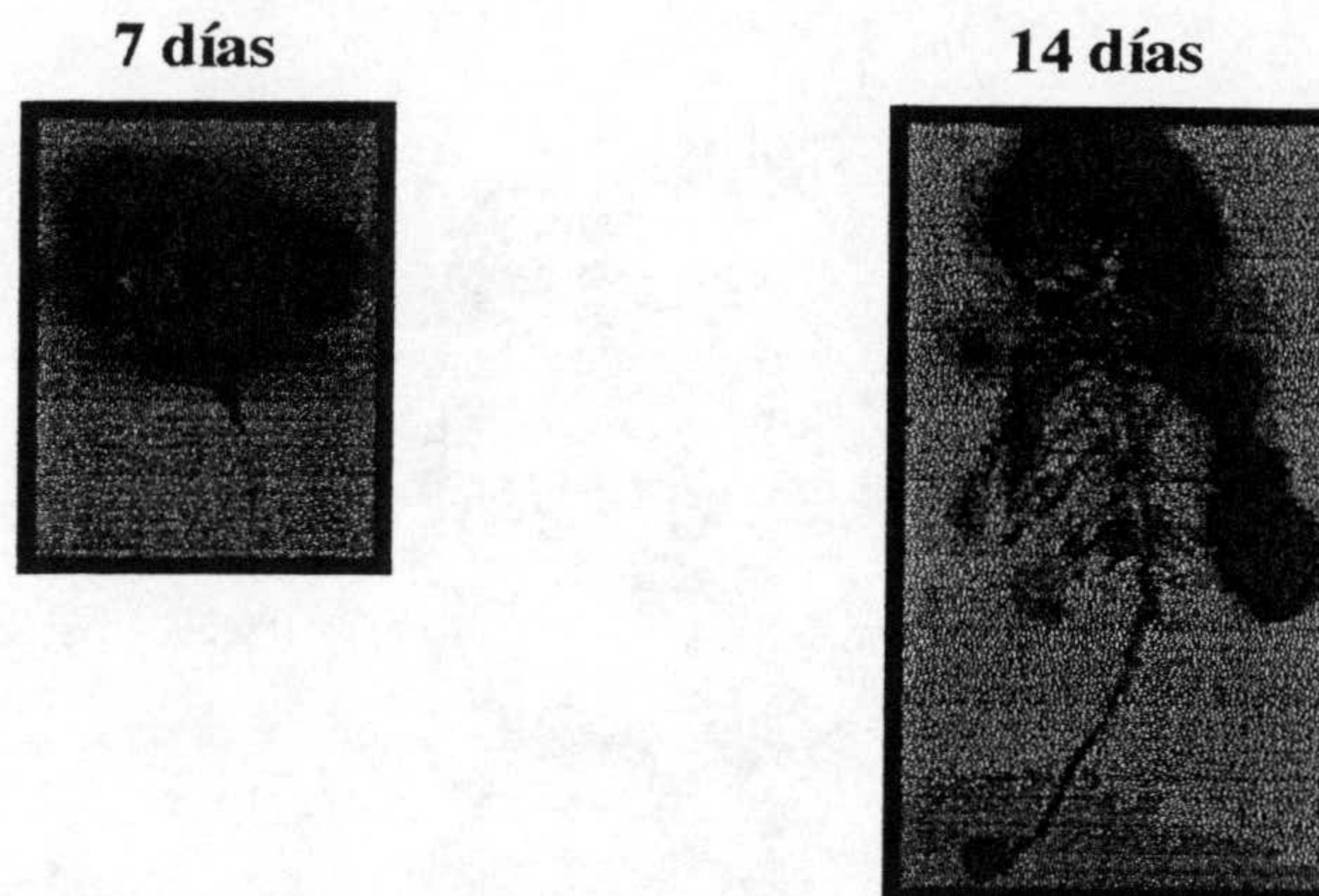


Figura 10.II. Visualización del patrón de colonización de la raíz de maíz por parte las cepas *P. putida* EEZ-201-L, *P. chlororaphis* EEZ-204-L y *P. fluorescens* EEZ-205-L. Semillas de maíz esterilizadas en superficie e inoculadas con aproximadamente 10^6 UFC por semilla de la cepa indicada se sembraron y se cultivaron en un invernadero a 25°C. Tras 7 días, se extrajeron las raíces y se obtuvo el patrón de emisión de luz mediante autorradiografiado. Las figuras muestran la superposición de una fotografía de la raíz de la planta de con la placa de autorradiografía expuesta a la raíz correspondiente durante al menos 4 horas.

P. putida EEZ 201-L



P. chlororaphis EEZ 204-L



P. fluorescens EEZ 205-L

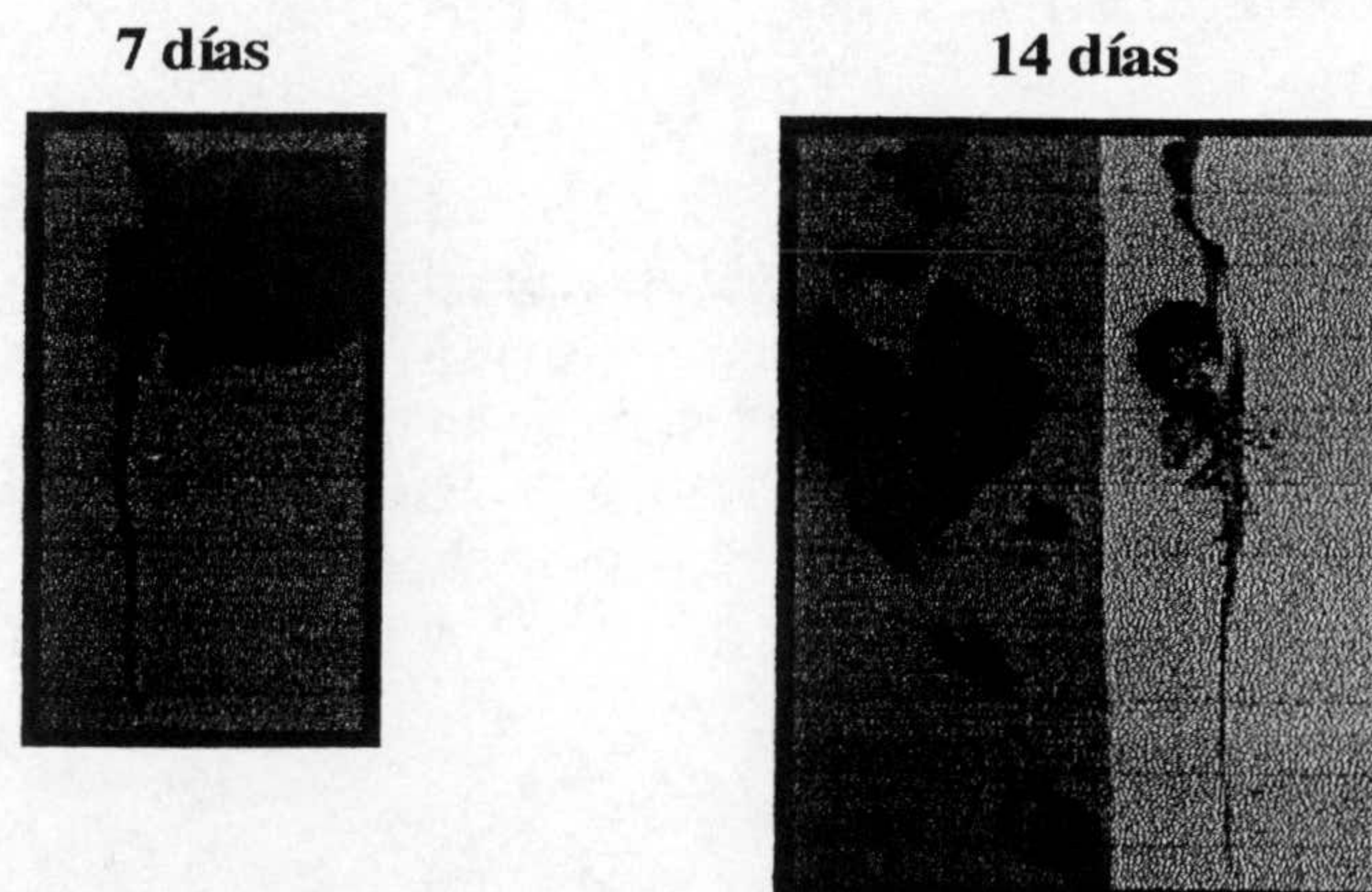


Figura 11.II. Visualización del patrón de colonización de la raíz de haba por parte las cepas *P. putida* EEZ-201-L, *P. chlororaphis* EEZ-204-L y *P. fluorescens* EEZ-205-L. Semillas de maíz esterilizadas en superficie e inoculadas con aproximadamente 10^6 UFC por semilla de la cepa indicada se sembraron y se cultivaron en un invernadero a 25°C . Tras 7 ó 14 días, se extrajeron las raíces y se obtuvo el patrón de emisión de luz mediante autorradiografiado. Las figuras muestran la superposición de una fotografía de la raíz de la planta de con la placa de autorradiografía expuesta a la raíz correspondiente durante al menos 4 horas.

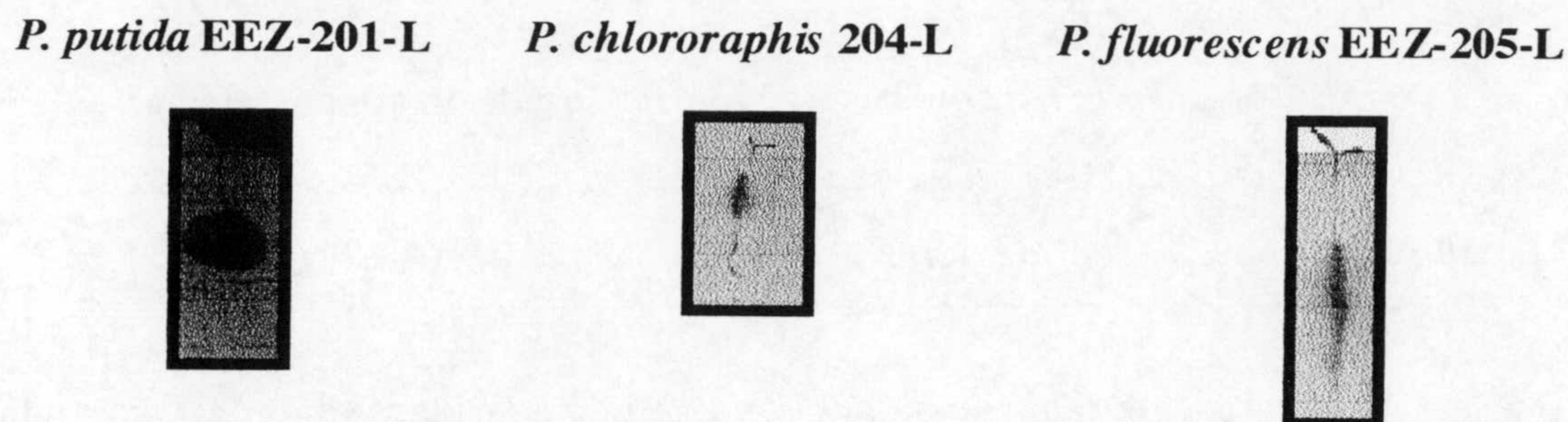


Figura 12.II. Visualización del patrón de colonización de la raíz de acelga por parte las cepas *P. putida* EEZ-201-L, *P. chlororaphis* EEZ-204-L y *P. fluorescens* EEZ-205-L. Semillas de maíz esterilizadas en superficie e inoculadas con aproximadamente 10^6 UFC por semilla de la cepa indicada se sembraron y se cultivaron en un invernadero a 25°C. Tras 14 días, se extrajeron las raíces y se obtuvo el patrón de emisión de luz mediante autorradiografiado. Las figuras muestran la superposición de una fotografía de la raíz de la planta de con la placa de autorradiografía expuesta a la raíz correspondiente durante al menos 4 horas.

En la **Figura 13.II** se muestra el patrón de emisión de bioluminiscencia obtenido a partir de raíces de plantas de espinacas colonizadas por cada una de las cepas en estudio. En las raíces de plantas de 14 días colonizadas por las cepas *P. putida* EEZ-201-L, *P. chlororaphis* EEZ-204-L y *P. fluorescens* EEZ-205-L se detectó la emisión de luminiscencia en la zona radical adyacente a la semilla.

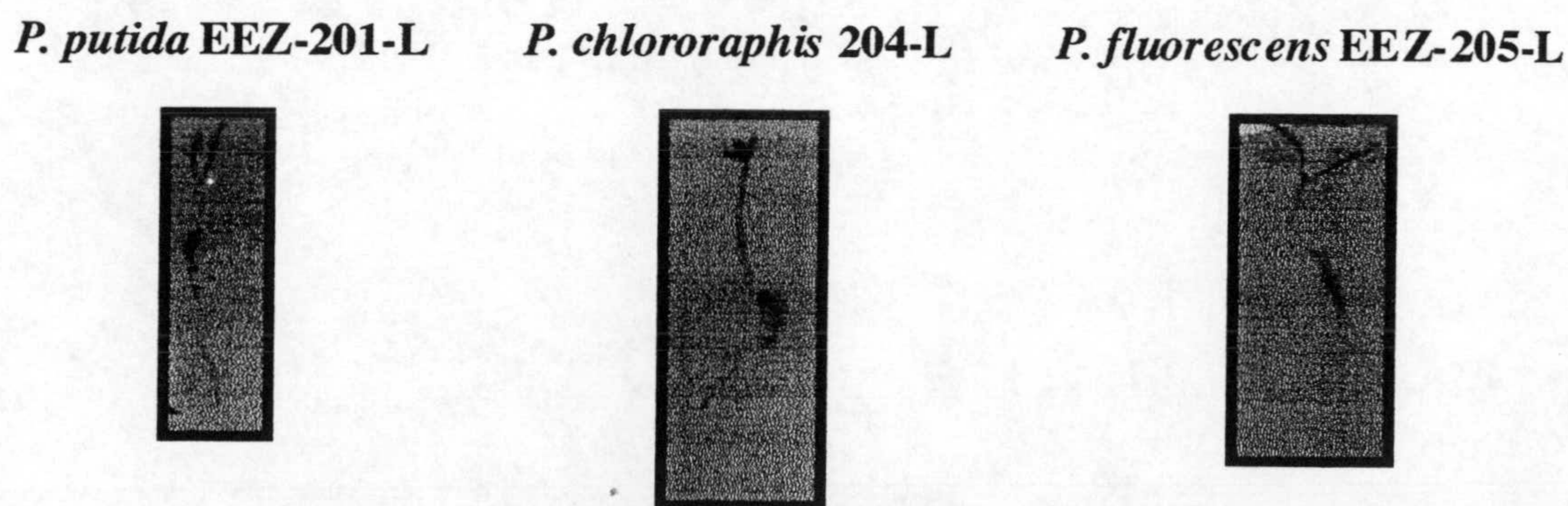


Figura 13.II. Visualización del patrón de colonización de la raíz de espinaca por parte las cepas *P. putida* EEZ-201-L, *P. chlororaphis* EEZ-204-L y *P. fluorescens* EEZ-205-L. Semillas de maíz esterilizadas en superficie e inoculadas con aproximadamente 10^6 UFC por semilla de la cepa indicada se sembraron y se cultivaron en un invernadero a 25°C. Tras 14 días, se extrajeron las raíces y se obtuvo el patrón de emisión de luz mediante autorradiografiado. Las figuras muestran la superposición de una fotografía de la raíz de la planta de con la placa de autorradiografía expuesta a la raíz correspondiente durante al menos 4 horas.

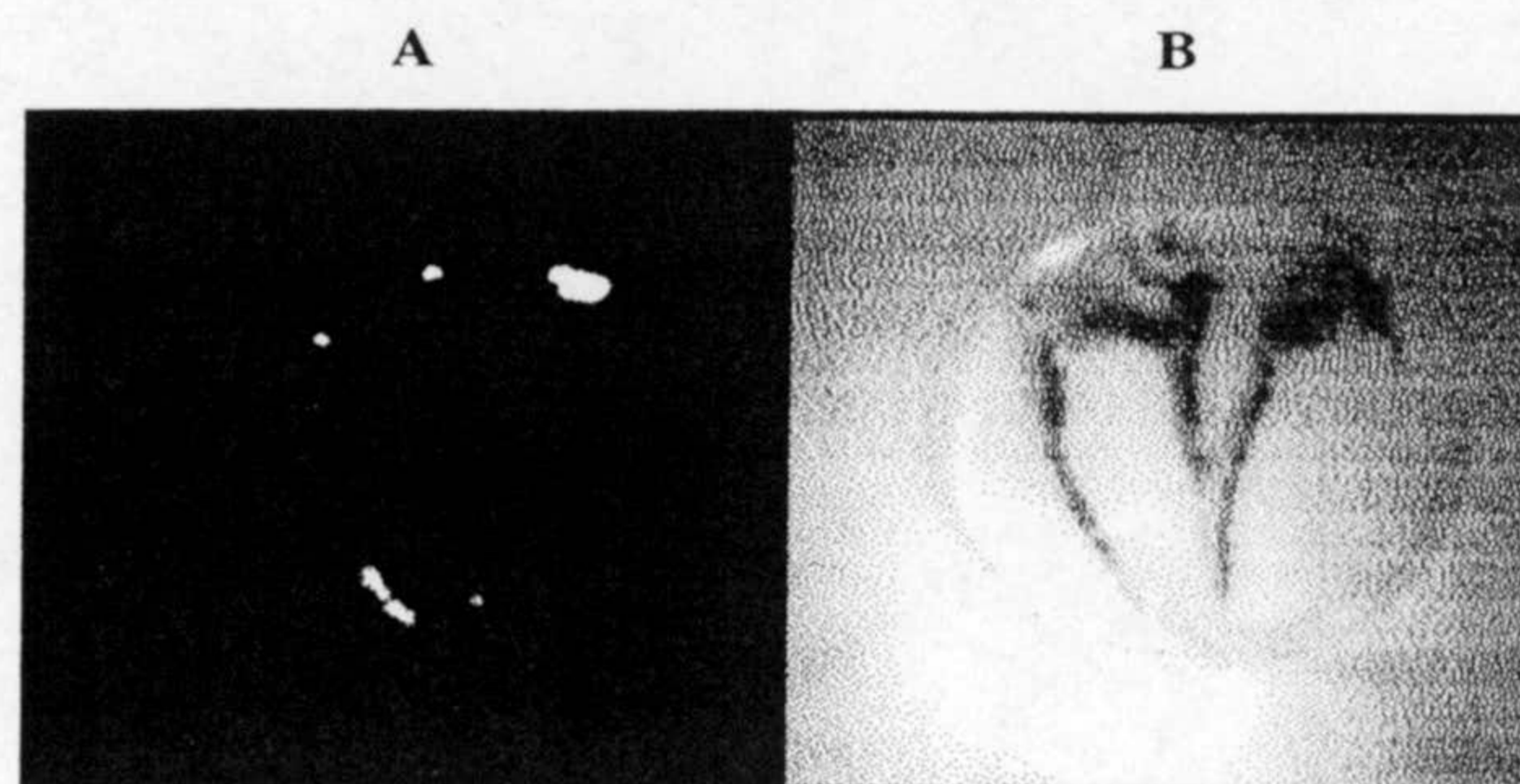
3.2. Colonización de la rizosfera de plantas de maíz cultivadas en suelo fluvisol no estéril.

Se estudió el patrón de emisión de luz de las cepas *P. putida* EEZ-201-L, *P. chlororaphis* EEZ-204-L y el de *P. fluorescens* EEZ-205-L mediante la visualización *in situ* de la emisión de luz por el empleo de una cámara CCD (apartado 16 de *Materiales y Métodos*).

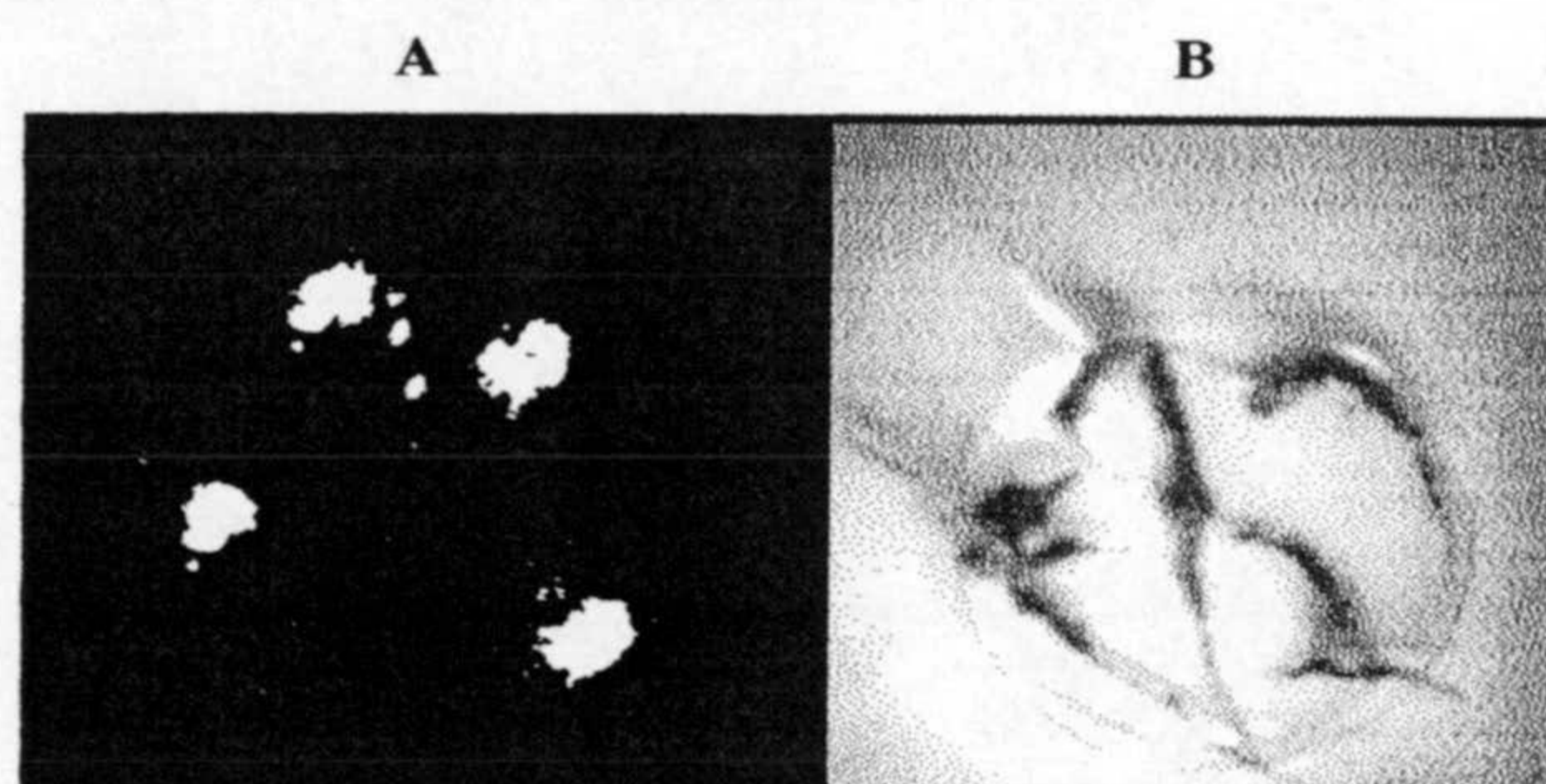
Semillas de maíz se inocularon con una densidad celular aproximada de 10^6 UFC por semilla de cada una de las cepas en estudio. Estas semillas se sembraron en suelo fluvisol no estéril y se incubaron a 25°C en una cámara de cultivo con un fotoperíodo de 12 horas en oscuridad y 12 horas de iluminación. Transcurridos 6 días después de la siembra de la semilla, las plantas se extrajeron del suelo y se analizó el patrón de emisión de luz en las raíces de plantas de maíz colonizadas por cada una de las cepas mencionadas anteriormente.

Las raíces colonizadas por la cepa *P. putida* EEZ-201-L emitieron bioluminiscencia tanto en la zona de la raíz próxima a la semilla como en las zonas radiculares próximas al apice de la misma (**Figura 13.II**). Las raíces colonizadas por las otras dos cepas estudiadas, *P. chlororaphis* EEZ-204-L y *P. fluorescens* EEZ-205-L emitieron bioluminiscencia a nivel de la semilla y en puntos aislados de la raíz próximos a la misma (**Figura 13.II**).

P. putida EEZ201-L



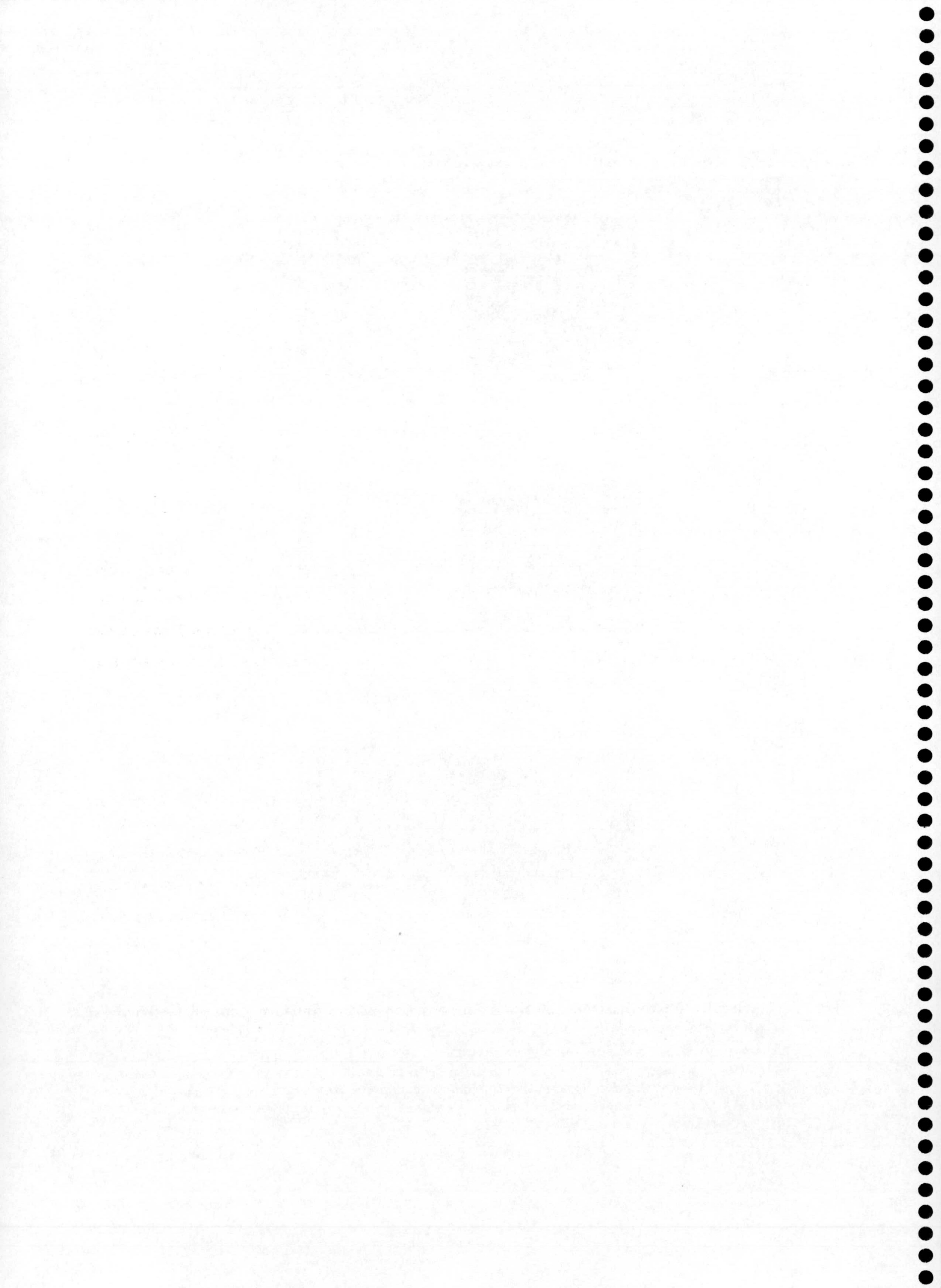
P. chlororaphis EEZ204-L



P. fluorescens EEZ205-L



Figura 13.I. Visualización del patrón de emisión de bioluminiscencia en la rizosfera de plantas de maíz de las cepas *P. putida* EEZ-201-L, *P. chlororaphis* EEZ-204-L y *P. fluorescens* EEZ-205-L mediante el uso de la cámara CCD. Semillas de maíz esterilizadas en superficie se inocularon con 10^6 UFC/ semilla de las cepas en estudio. Estas semillas se sembraron en suelo tipo fluvisol y transcurridos 6 días desde la siembra se determinó el patrón de colonización por el uso de la cámara CCD. En la figura se muestran tanto una fotografía de la raíz (imagen de transmisión, B), como la imagen obtenida por la cámara CCD (A).



III. SUPERVIVENCIA EN CONDICIONES MEDIOAMBIENTALES DE CEPAS DERIVADAS DE *Pseudomonas putida* mt-2 PORTADORAS O NO DE UN SISTEMA ACTIVO DE CONTENCIÓN BIOLÓGICA.

Como se describió en la sección de *Introducción* de esta Tesis Doctoral, las cepas derivadas de *P. putida* mt-2, como por ejemplo *P. putida* KT2440 y *P. putida* KT2442, sobreviven bien en suelos desnudos en condiciones controladas de humedad y temperatura (Ramos, 1991; Ramos-González, 1991; Duque et al, 1993). Los ensayos descritos en el capítulo anterior, por un lado corroboraron estos resultados y, por otro lado, revelaron que, en condiciones de humedad y temperatura controladas en un invernadero, la cepa bioluminiscente *P. putida* S1B1, derivada de *P. putida* KT2442, coloniza la rizosfera de diversas plantas de interés comercial. Además, se comprobó que, en estas condiciones, la introducción de esta cepa en suelo o en la rizosfera de diversas plantas no afectó negativamente a la supervivencia de poblaciones bacterianas indicadoras de la microbiota natural del suelo, como por ejemplo: la población resistente al antibiótico tetraciclina, la población de *Pseudomonadaceae* fluorescentes y la población de microorganismos capaz de utilizar el ácido *p*-hidroxifenilacético como única fuente de carbono. Estos resultados abrieron un cauce natural a nuestra investigación: el estudio del comportamiento de esta misma cepa, o cepas relacionadas, en las condiciones medioambientales.

En este capítulo se describe la supervivencia en condiciones medioambientales de la cepa bioluminiscente *P. putida* S1B1 y su cepa parental *P. putida* KT2442 tanto en suelos desnudos como en la rizosfera de plantas de haba y maíz. Por otro lado, se estudió la supervivencia en condiciones medioambientales de la cepa contenida biológicamente *P. putida* CMC4 y, su control, *P. putida* EEZ32 tanto en suelos desnudos como en suelos rizosféricos. Además, en todos los casos se analizó el efecto de la introducción de estas cepas sobre la supervivencia de poblaciones bacterianas indicadoras de la microbiota natural del suelo.

Los ensayos descritos en este capítulo han constituido la primera liberación controlada al medio ambiente de cepas bacterianas manipuladas genéticamente realizada en

España, y la primera liberación mundial de cepas portadoras de un sistema de contención biológica.

1. SUPERVIVENCIA DE CEPAS DERIVADAS DE *P. putida* mt-2 NO CONTENIDAS BIOLÓGICAMENTE EN CONDICIONES MEDIOAMBIENTALES.

1.1. Supervivencia de la cepa *P. putida* S1B1 en suelos sin planta.

Se partió de una maceta que contenía 40 Kg de suelo inoculado con aproximadamente 10^6 UFC por g de suelo de la cepa *P. putida* S1B1. Como control se utilizó una maceta similar sin inocular. Las macetas se colocaron en la parcela experimental, descrita en el apartado 14.1 de *Materiales y Métodos*, durante un periodo de 200 días que abarcó el periodo comprendido entre los meses de enero hasta julio de 1997. A distintos intervalos de tiempo se determinó, mediante siembra en medio selectivo, el número de UFC/g de suelo de la cepa *P. putida* S1B1, así como de dos poblaciones bacterianas indicadoras de la microbiota natural del suelo, a saber, la población de microorganismos capaz de utilizar ácido *p*-hidroxifenilacético como única fuente de carbono, y el número de *Pseudomonas* fluorescentes totales, calculado mediante recuento de colonias en placas de agar King.

El número de UFC de *P. putida* S1B1 por g de suelo disminuyó hasta niveles de 10^2 durante los 10 primeros días y se mantuvo a estos niveles durante los siguientes 40 días. Posteriormente, el número de UFC se encontró por debajo del límite de detección mediante siembra en placas de medio selectivo (10^2 UFC/g de suelo), excepto en la muestra tomada el día 120, cuando se detectaron aproximadamente 5×10^2 UFC/g de suelo (**Figura 1.III.B**). No se volvió a detectar la presencia de la cepa *P. putida* S1B1 mediante siembra en placa. En todos los casos en que el número de UFC/g de suelo se encontraba por debajo del límite de detección mediante recuento en medio selectivo, se recurrió a enriquecimiento selectivo de esta cepa como se describe en el apartado 15 de *Materiales y Métodos*. En todos los casos se detectó bioluminiscencia en el cultivo enriquecido, lo que indicó que *P. putida*

S1B1 sobrevivió en el suelo durante todo el tiempo que duró el ensayo aunque el número de células capaces de formar colonias era muy bajo.

La introducción de la cepa modificada genéticamente en el suelo no afectó de manera significativa al comportamiento de las poblaciones indígenas estudiadas. Durante el tiempo que duró el ensayo, el número de microorganismos que degradaron ácido *p*-hidroxifenilacético y el número de *Pseudomonadaceae* fluorescentes totales se mantuvo a niveles de 10^6 - 10^7 y 10^4 - 10^5 UFC por g de suelo respectivamente, tanto en las macetas inoculadas como en las no inoculadas con la cepa bioluminiscente. A finales de febrero-principios de marzo, las poblaciones indicadoras alcanzaron densidades de hasta 10^8 UFC por g de suelo, lo que podría deberse a la existencia de condiciones climáticas más apropiadas para la supervivencia de estas cepas en el suelo (**Figura 1.III.A y B**). La temperatura osciló en este periodo entre 2 y 35°C.

1.2. Supervivencia de la cepa *P. putida* KT2442 en la rizosfera.

Se llevaron a cabo dos liberaciones en el campo: una en el período invernal de los años 1996-1997, en la que se utilizaron plantas de *Vicia faba*, y otra en el verano del año 1997, en la que se sembraron plantas de maíz. Las semillas de estas plantas se inocularon con la cepa de *P. putida* KT2442 a una densidad celular inicial de aproximadamente 10^6 UFC por semilla en el caso de la utilización de maíz y 10^7 UFC por semilla en el caso de la utilización de semillas de haba. Éstas se sembraron en la parcela experimental descrita en el apartado 14.1 de *Materiales y Métodos*. A partir de la aparición de la primera hoja, y durante un periodo de 3 meses, se determinó el número de bacterias de la cepa inoculada presentes tanto en la rizosfera como en el suelo que no quedaba en contacto directo con la raíz (suelo no rizosférico). La cepa bajo estudio se seleccionó en placas de medio mínimo con benzoato sódico (10 mM) como única fuente de carbono y rifampicina (30 µl/ml) como antibiótico de selección. Se comprobó previamente que las bacterias indígenas del suelo no crecían en este medio. Con objeto de determinar si la supervivencia de la población indígena del suelo se veía afectada por la introducción de *P. putida* KT2442 en la rizosfera, se determinó al mismo tiempo el número de UFC de la población indicadora capaz de utilizar el ácido *p*-hidroxifenilacético como única fuente de carbono.

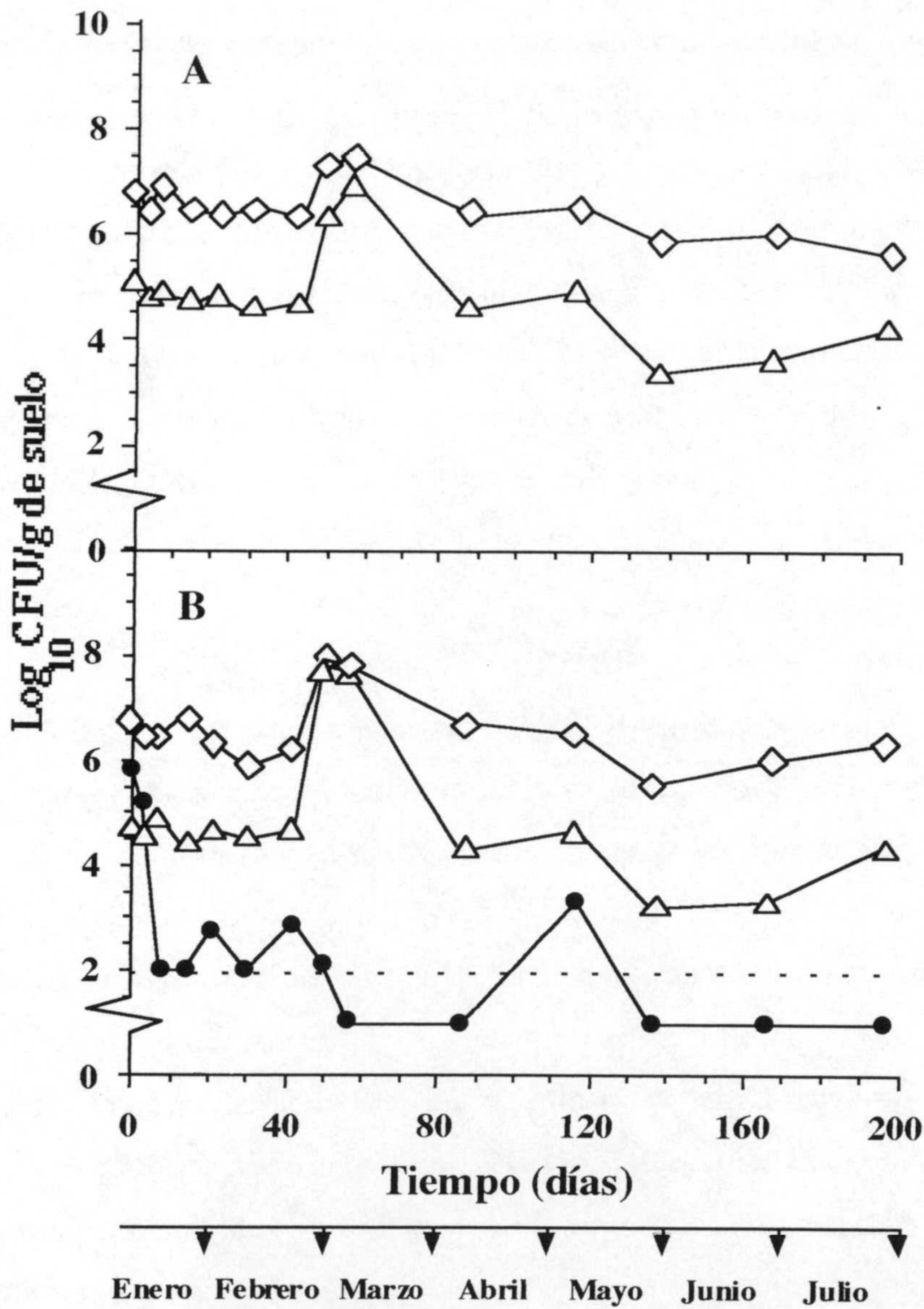


Figura 1.III. Supervivencia de la cepa *P. putida* S1B1 en suelo desnudo en condiciones medioambientales. Recipientes que contenían 40 Kg de suelo no inoculado (A) o inoculado con la cepa bioluminiscente *P. putida* S1B1 (B) se colocaron en una de las parcelas experimentales de la Estación Experimental del Zaidín durante un periodo de 200 días. A los tiempos indicados se determinó el número de UFC/g de suelo en medio selectivo de la cepa *P. putida* S1B1 (círculos), así como de las poblaciones de microorganismos capaces de utilizar el ácido *p*-hidroxifenilacético como única fuente de carbono (rombos) y el número de *Pseudomonadaceae* fluorescentes totales (triángulos).

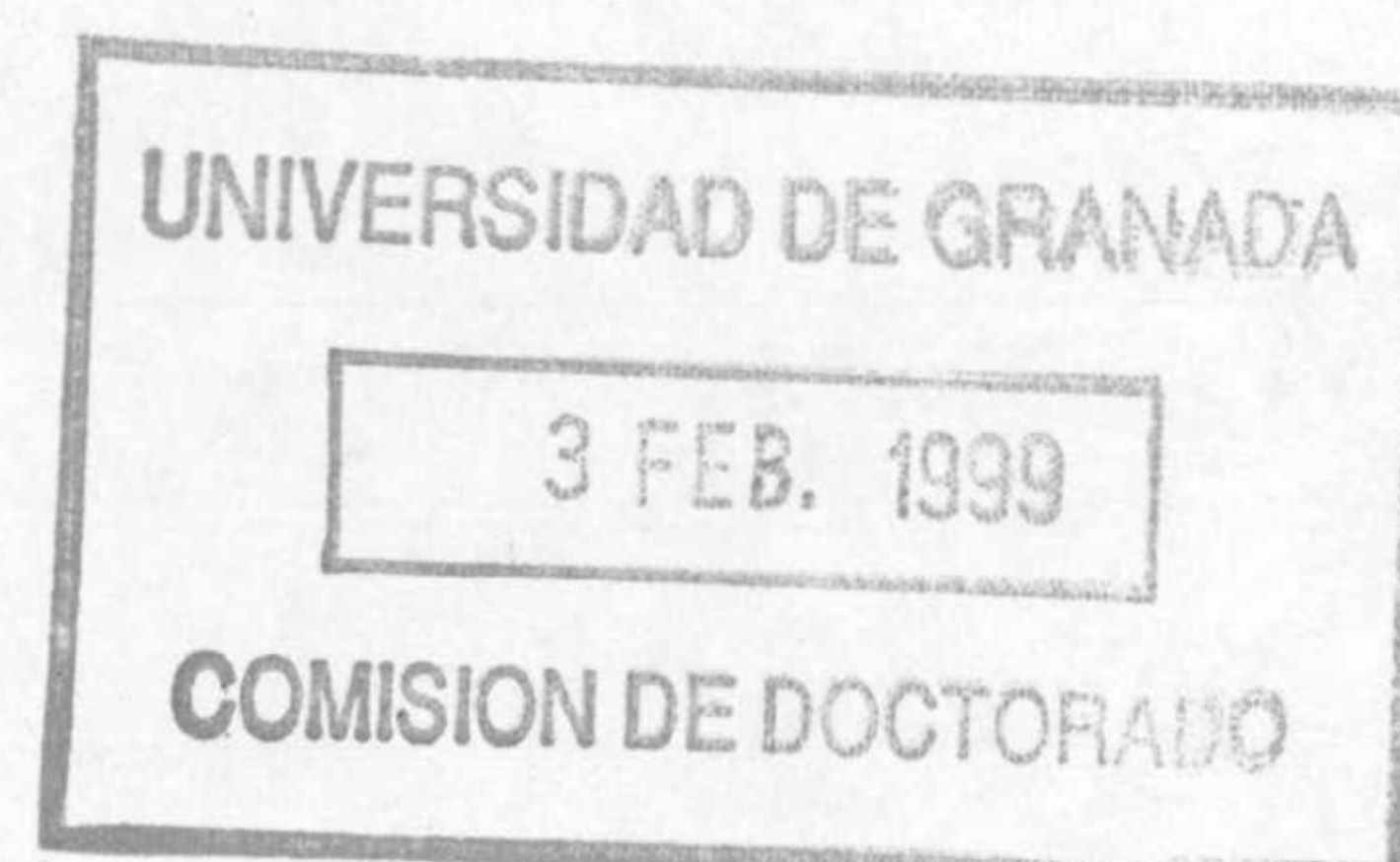
1.2.1. Supervivencia en la rizosfera de haba, ensayo de otoño-invierno.

Este ensayo se realizó durante el periodo otoño-invierno comprendido entre noviembre del año 1996 y febrero del 1997, con una duración total de 80 días. A lo largo de este periodo de tiempo el número de UFC de *P. putida* KT2442 por g de suelo rizosférico se mantuvo a niveles estables, oscilando desde valores de 2×10^6 a 5×10^6 (**Figura 2.III.B**). El nivel de establecimiento de esta cepa en el suelo no rizosférico fue de 1 a 2 órdenes de magnitud inferior, situándose al final del ensayo a niveles de aproximadamente 10^5 UFC por g de suelo (**Figura 2.III.B**).

La introducción de la cepa modificada genéticamente, tanto en el suelo rizosférico como en el suelo no rizosférico, no afectó de manera significativa al comportamiento de la población de microorganismos capaces de utilizar el ácido *p*-hidroxifenilacético como única fuente de carbono. Durante el tiempo que duró el ensayo, el número de estos microorganismos se situó a niveles estables y del orden de 10^7 - 10^8 UFC/g de suelo en el caso de la rizosfera de plantas de haba y de 10^6 - 10^7 UFC por g de suelo no rizosférico tanto en las plantas inoculadas (**Figura 2.IIIB**) como en las no inoculadas con la cepa *P. putida* KT2442 (**Figura 2.III.A**).

2.2.2. Supervivencia en la rizosfera de maíz, ensayo de primavera-verano.

Este ensayo se realizó durante el periodo primavera-verano comprendido entre el mes de mayo del año 1997 y el de julio de este mismo año, con una duración total de 80 días. Durante los primeros 35 primeros días, la cepa *P. putida* KT2442 se detectó en el entorno rizosférico a densidades celulares de 10^5 - 10^6 UFC por g de suelo, posteriormente, y coincidiendo con la subida de temperaturas típica de las últimas semanas de junio y primeras semanas de julio (se llegaron a registrar temperaturas máximas de 42°C), la densidad celular de esta bacteria descendió hasta niveles de 10^4 UFC por g de suelo; nivel que mantuvo hasta el final del ensayo (**Figura 3.III.B**). En el suelo no rizosférico, esta cepa comenzó a establecerse a niveles de 10^4 UFC (día 20). Posteriormente se observó un descenso paulatino en el número de UFC por g de suelo hasta alcanzar una densidad de 10^3 UFC por g de suelo (**Figura 3.III.B**).



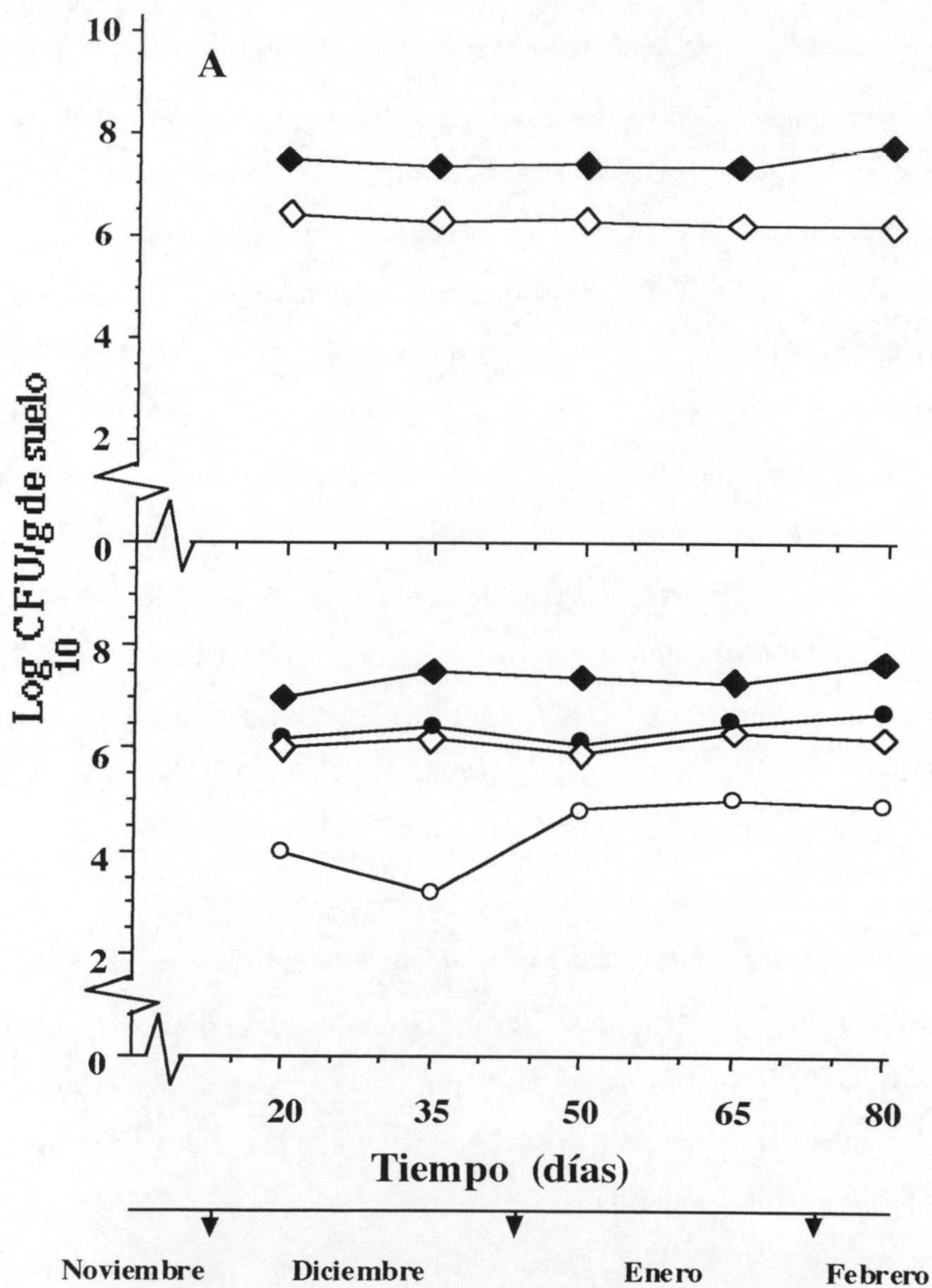


Figura 2.III. Supervivencia de la cepa *P. putida* KT2442 en la rizosfera de plantas de haba como en el suelo no rizosférico en condiciones medioambientales durante el otoño de 1996 e invierno de 1997. Semillas de haba, no inoculadas (A) o inoculadas con la cepa *P. putida* KT2442 (B) se sembraron en una parcela experimental en condiciones medioambientales, y las plantas se mantuvieron durante un periodo de 80 días. A los tiempos indicados se determinó el número de UFC/g de suelo rizosférico (símbolos cerrados) y el de UFC/g de suelo no rizosférico (símbolos abiertos). La selección de la cepa *P. putida* KT2442 (círculos) se hizo en medio selectivo. Además se determinó el número de UFC/g de suelo de las poblaciones de microorganismos capaces de utilizar el ácido *p*-hidroxifenilacético como única fuente de carbono (rombos).

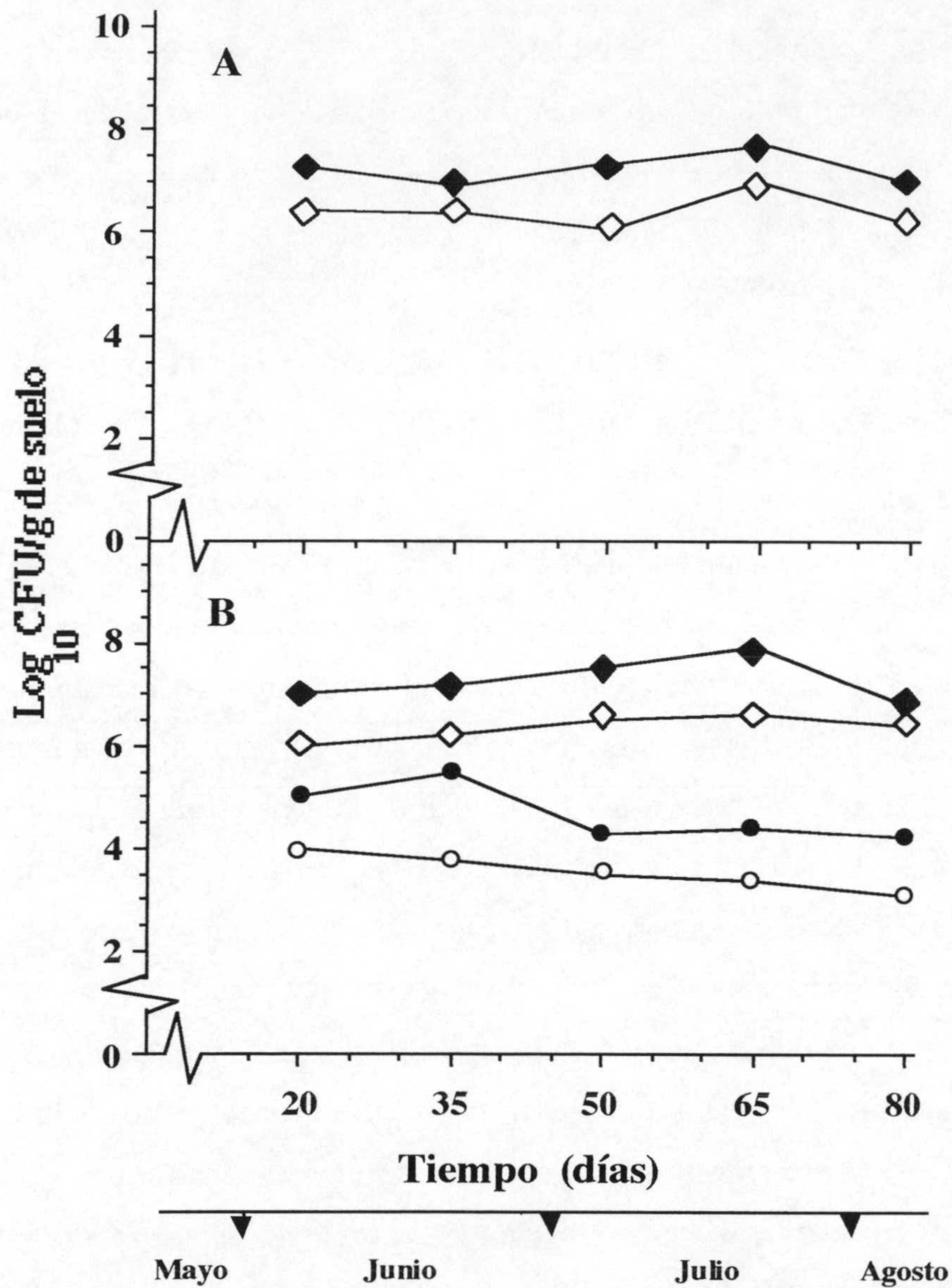


Figura 3.III. Supervivencia de la cepa *P. putida* KT2442 en la rizosfera de plantas de maíz y en el suelo no rizosférico en condiciones medioambientales durante la primavera-verano de 1997. Semillas de maíz, no inoculadas (A) o inoculadas con la cepa *P. putida* KT2442 (B) se sembraron en una parcela experimental en condiciones medioambientales y las plantas se mantuvieron durante un periodo de 80 días. A los tiempos indicados se determinó el número de UFC/g de suelo rizosférico (símbolos cerrados) y el de UFC/g de suelo no rizosférico (símbolos abiertos). La selección de la cepa *P. putida* KT2442 (círculos) se hizo en medio selectivo. Además se determinó el número de UFC/g de suelo de las poblaciones de microorganismos capaces de utilizar el ácido *p*-hidroxifenilacético como única fuente de carbono (rombos).

En este ensayo tanto a nivel de la rizosfera de las plantas no inoculadas (**Figura 3.III.A**) como de las inoculadas con *P. putida* KT2442 (**Figura 3.III.B**), también se determinó el número de microorganismos capaces de utilizar el ácido *p*-hidroxifenilacético como única fuente de carbono; se situó en torno a 10^7 UFC por g de suelo rizosférico y fue éste de un orden de magnitud inferior en el suelo no rizosférico. Estos resultados indicaron que la introducción de la cepa *P. putida* KT2442 no alteró el comportamiento de las poblaciones indígenas del suelo estudiadas.

2. SUPERVIVENCIA EN CONDICIONES MEDIOAMBIENTALES DE LA CEPA *P. putida* CMC4 PORTADORA DE UN SISTEMA ACTIVO DE CONTENCIÓN BIOLÓGICA.

Los resultados expuestos en el apartado 1 de este capítulo revelaron que las cepas derivadas de *P. putida* mt-2 se establecen y sobreviven a alta densidad celular en la rizosfera de plantas de haba y maíz cultivadas en condiciones medioambientales durante periodos de al menos 80 días; y que su introducción en el medioambiente no afecta significativamente al comportamiento de la población indígena estudiada.

Como ya se mencionó en la *Introducción*, las bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* son buenas candidatas para su uso como biodegradadores de compuestos xenobióticos en entornos naturales debido a su gran potencialidad metabólica y a la facilidad que muestran a la hora de su manipulación genética (Ramos *et al.*, 1994). Una vez demostrada la supervivencia de este tipo de microorganismos en condiciones medioambientales, y para predecir su comportamiento en dichos entornos, se precisaría de un sistema capaz de controlar la supervivencia y la muerte microbiana en situaciones donde los agentes selectivos exógenos no puedan aplicarse. La solución sería manipular genéticamente los microorganismos que se desean liberar de forma que una vez realizada la función para la que han sido diseñados produzcan la expresión de genes, denominados genes matadores o suicidas, que conduzcan a la muerte celular. Estos sistemas de control son conocidos con el nombre de Sistemas Activos de Contención Biológica (Sistemas ABC).

En nuestro laboratorio se disponía de una cepa, *P. putida* CMC4 (**Tabla 1**, *Materiales y Métodos*) portadora de un sistema de contención situado a nivel cromosómico. Esta cepa fue construida y caracterizada en estudios anteriores (Ronchel, 1997; Ronchel *et al.*, 1998). En esos estudios se determinó su supervivencia a nivel de medios de laboratorio y en entornos edáficos tipo microcosmos. Los resultados obtenidos mostraron la eficacia del sistema de contención en estos entornos controlados.

El paso siguiente en la investigación fue comprobar la funcionalidad de este sistema de contención en entornos medioambientales, caracterizados por la variabilidad de sus condiciones.

Como control a esta cepa se utilizó otra generada anteriormente en el grupo, denominada *Pseudomonas putida* EEZ32 (Ronchel *et al.*, 1995) (**Tabla 1** de *Materiales y Métodos*). Esta cepa, derivada también de *Pseudomonas putida* KT2440, porta el elemento control del sistema activo de contención en un plásmido de bajo número de copias, pCC102 (**Tabla 2** de *Materiales y Métodos*), pero carece del elemento matador.

Se procedió a la realización de liberaciones en la parcela experimental descrita anteriormente (*Materiales y Métodos*, apartado 14.1), una en el periodo otoño-invierno de los años 1995-1996 y, otra, en el periodo primavera-verano del año 1996. En ambos casos se utilizaron macetas distribuidas en subzonas. En una tanda de macetas, que contenían suelo suplementado o no con 3 metilbenzoato, se plantaron semillas inoculadas o no con la cepa portadora del sistema de contención biológica, o con la cepa control carente del mismo. Otra tanda de macetas, en las cuales no se introdujeron semillas, contenían suelo inoculado con la cepa contenida o con la cepa control. En la liberación de otoño-invierno se plantaron semillas de haba y en la de primavera-verano semillas de maíz. A distintos intervalos de tiempo se determinó la supervivencia de las cepas inoculadas mediante siembra en placa de medio selectivo.

2.1. Liberación otoño-invierno.

El ensayo comenzó en noviembre del año 1995 y se prolongó hasta marzo del 1996. Las temperaturas mínimas oscilaron entre -3 y 13°C durante la noche y las máximas entre los 5 y 27 °C.

2.1.1. Supervivencia en suelos sin planta.

Tanto la cepa contenida como la control se introdujeron en macetas con 1 kg de suelo inoculado con la cepa contenida o la cepa control a una densidad celular inicial de 10^6 UFC por g de suelo. En general, el número de UFC por g de suelo tendió a disminuir con el tiempo para ambas cepas. La disminución en el número de UFC por g de suelo de la cepa control fue similar en suelos con o sin 3-metilbenzoato, estableciéndose en ambos casos a niveles por debajo de nuestros límites de detección (10^2 UFC/g de suelo) 40 días después del inicio del experimento.

En ausencia de 3-metilbenzoato el número de UFC por g de la cepa contenida *P. putida* CMC4 descendió progresivamente, encontrándose por debajo del límite de detección 15 días después de la inoculación. En presencia de 3-metilbenzoato el número de UFC por g de suelo de la cepa contenida también disminuyó con el tiempo, aunque de manera menos drástica que en el caso anterior; no encontrándose por debajo del nivel de detección hasta los 35 días después del inicio del ensayo (Tabla 1.III).

Tabla 1.III. Supervivencia de las cepas de *P. putida* CMC4 y *P. putida* EEZ32 en el suelo sin planta en el ensayo de otoño-invierno. Alrededor de 10^6 UFC/g de suelo de *P. putida* CMC4 o *P. putida* EEZ32 se introdujeron en macetas de 1 Kg de suelo cambisol suplementado o no con 0,01% (p/p) de 3-metilbenzoato. A los tiempos indicados se calculó el número de UFC/g de suelo de la cepa correspondiente mediante siembra en placas de medio selectivo.

	Presencia de 3-metilbenzoato	UFC por g de suelo ^a después de:		
		7 días	25 días	40 días
Cepa control EEZ32	+	$1,2 \times 10^4$	6×10^3	10^2
	-	$1,1 \times 10^4$	2×10^3	$<10^2$
Cepa contenida CMC4	+	$1,3 \times 10^4$	2×10^3	$<10^2$
	-	10^2	$<10^2$	$<10^2$

^aLos resultados son la media de dos muestras tomadas por triplicado. Las desviaciones típicas se encontraron en el orden del 10%.

2.1.2. Supervivencia en la rizosfera.

Se examinó también el comportamiento de las dos cepas en macetas en las que se sembraron semillas de haba inoculadas con aproximadamente 10^6 UFC de la cepa contenida o la cepa control. Tras la aparición de la primera hoja, 21 días después de la

siembra, se tomó la primera muestra. En general, el número de UFC por g de suelo rizosférico de la cepa control EEZ32 se mantuvo entre 10^3 y 10^6 , estableciéndose en las macetas con 3-metilbenzoato más rápidamente que cuando se encontraba inoculada en macetas sin este compuesto aromático, pero al final de este estudio el número total de UFC por g de rizosfera fue similar en ambos casos (**Figura 4.III.A**).

El número de UFC por g de suelo rizosférico de la cepa contenida *P. putida* CMC4 tendió a disminuir con el tiempo, este fenómeno fue más pronunciado en ausencia de 3-metilbenzoato que en presencia del mismo. Cien días después del inicio de este ensayo, el número de UFC de esta cepa en suelos sin 3-metilbenzoato se encontró por debajo de nuestros límites de detección. En presencia de 3-metilbenzoato, el número de UFC por g de suelo rizosférico fue de 1 a 2 órdenes de magnitud superior que en cualquier muestra tomada en ausencia de este compuesto. Al final de este experimento, se encontraron al menos 10^3 UFC por g de suelo rizosférico (**Figura 4.III.B**).

2.1.3. Supervivencia en el suelo no rizosférico.

Durante el ensayo de otoño-invierno se determinó también la supervivencia de las cepas contenida y su control en el suelo no rizosférico, no adherido a la raíz ni influenciado por el sistema radicular de la planta. A lo largo del ensayo, e independientemente de la presencia o ausencia de 3-metilbenzoato, el número de UFC por g de suelo de la cepa control osciló entre 10^3 a 3×10^4 (**Tabla 2.III**). Sin embargo, en ausencia de 3-metilbenzoato, la cepa contenida *P. putida* CMC4 se encontró a niveles detectables únicamente durante los primeros cuarenta días del ensayo, posteriormente se mantuvo por debajo de nuestros límites de detección. Por otro lado, la presencia del alquilaromático prolongó la supervivencia de la cepa contenida en el suelo, manteniéndose entre 10^2 y 5×10^3 UFC por g de suelo a lo largo de todo el experimento (**Tabla 2.III**).

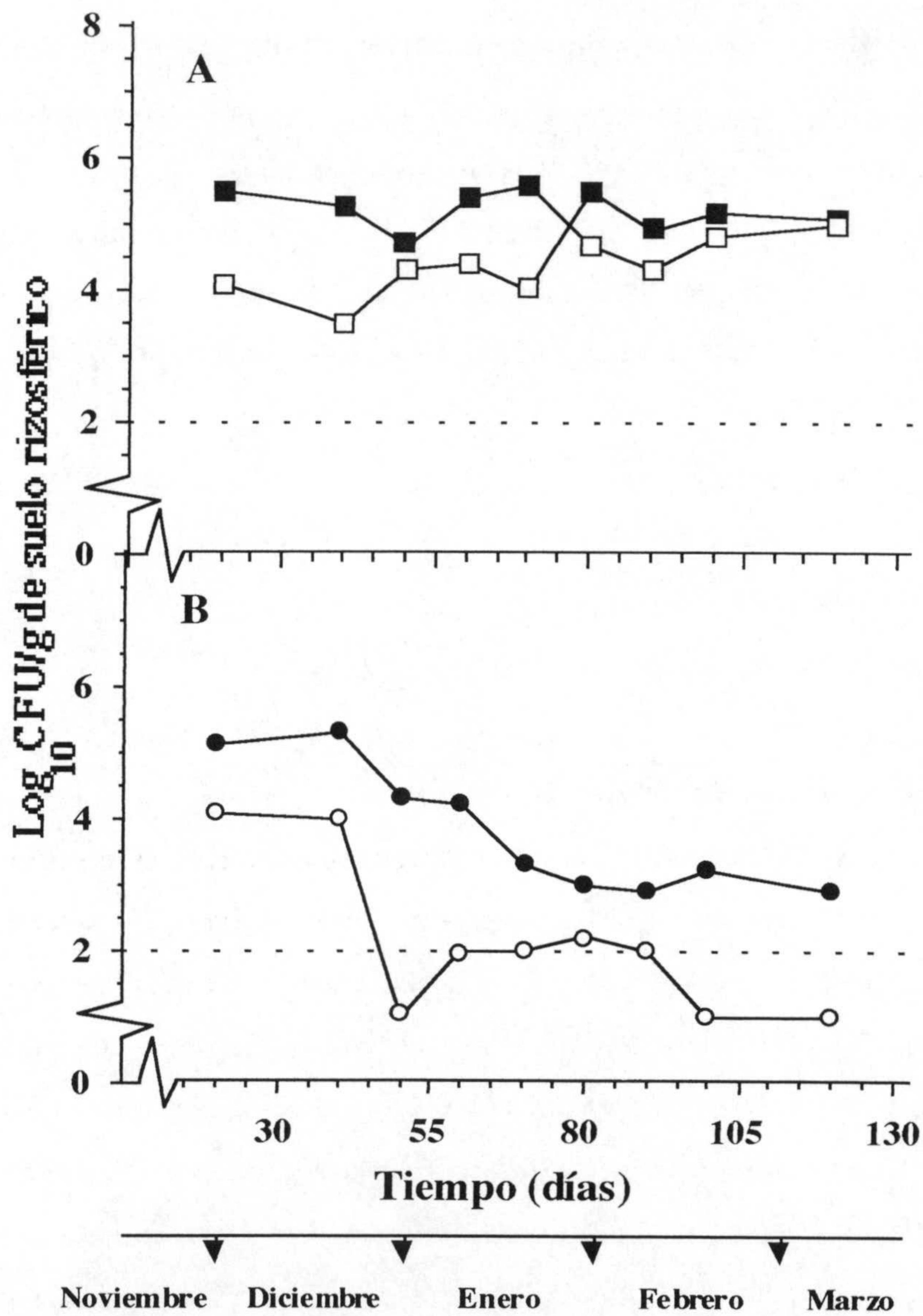


Figura 4.III. Supervivencia la cepa contenida biológicamente *P. putida* CMC4 y su control *P. putida* EEZ32 en la rizosfera de haba durante el ensayo de otoño-invierno. Se inocularon semillas de haba con *P. putida* EEZ32 (A, cuadrados) o con *P. putida* CMC4 (B, círculos) y se sembraron en macetas con suelo cambisol que contenía (símbolos cerrados) o no (símbolos abiertos) el 0,01% (p/p) de 3-metilbenzoato. A los tiempos indicados se determinó el número de UFC por g de suelo rizosférico. Los datos presentados son la media de los valores obtenidos en tres recuentos, las desviaciones típicas calculadas estuvieron por debajo del 10% de la media.

Tabla 2.III. Supervivencia de *P. putida* CMC4 y EEZ32 en el suelo no rizosférico durante el ensayo otoño-invierno. Se inocularon semillas de haba con *P. putida* EEZ32 o con *P. putida* CMC4 y se sembraron en macetas que contenían suelo con o sin 3-metilbenzoato. A los tiempos indicados se determinó el número de UFC por g de suelo no rizosférico.

Cepa	Presencia de 3-metilbenzoato	UFC por g de suelo ^a después de:		
		40 días	60 días	100 días
Cepa control EEZ32	+	10 ⁴	3x10 ⁴	10 ³
	-	10 ³	10 ³	3x10 ³
Cepa contenida CMC4	+	5x10 ³	10 ²	6x10 ²
	-	10 ³	<10 ²	<10 ²

^aLos resultados son la media de dos muestras tomadas por triplicado. Las desviaciones típicas se encontraron en el orden del 10%.

2.1.4. Evaluación del efecto de la introducción de cepas modificadas genéticamente sobre la supervivencia de la microbiota del suelo.

Durante la liberación de otoño-invierno se evaluó también el efecto de la adición de 3-metilbenzoato y de la introducción de las cepas contenidas o control sobre la supervivencia de microorganismos capaces de crecer en placas de medio mínimo con ácido *p*-hidroxifeniacético como única fuente de carbono. En experimentos anteriores se había determinado que estos microorganismos constituían uno de los grupos predominantes en el suelo utilizado (Ramos *et al.*, 1991). En el suelo sin planta el número de bacterias de esta población se mantuvo en valores de aproximadamente 10⁶ UFC por g de suelo durante los 120 días que duró el ensayo, tanto en presencia como en ausencia de 3-metilbenzoato e independientemente de la cepa introducida (**Tabla 3.III**). Este valor fue un orden de magnitud superior en las muestras obtenidas de la rizosfera (**Tabla 4.III**) y que en las muestras de suelo no rizosférico (**Tabla 5.III**).

Tabla 3.III. Supervivencia en el suelo sin planta de la población bacteriana indígena capaz de utilizar el ácido *p*-hidroxifenilacético como única fuente de carbono durante el ensayo de otoño-invierno. Las condiciones fueron las mismas que las descritas en la **Tabla 1.II.**, salvo que en este caso se determinó el número de microorganismos capaces de crecer en medio mínimo sólido con ácido *p*-hidroxifenilacético como única fuente de carbono.

Tipo de maceta	Presencia de 3-metilbenzoato	UFC ^a por g de suelo ^b después de:		
		30 días	60 días	120 días
Suelo	+	4x10 ⁶	5x10 ⁵	3x10 ⁶
	-	5x10 ⁶	4x10 ⁵	2x10 ⁶
Suelo+EEZ32	+	5x10 ⁶	5x10 ⁵	2x10 ⁶
	-	6x10 ⁶	7x10 ⁵	5x10 ⁶
Suelo+CMC4	+	5x10 ⁶	5x10 ⁵	4x10 ⁶
	-	6x10 ⁶	7x10 ⁵	4x10 ⁶

^aUnidades Formadoras de colonias de la población de microorganismos que utilizan *p*-hidroxifenilacético como fuente de carbono.

^bLos resultados son la media de dos muestras tomadas por triplicado. Las desviaciones típicas se encontraron en el orden del 10%.

Tabla 4.III. Supervivencia en el suelo rizosférico de la población bacteriana indígena capaz de utilizar el ácido *p*-hidroxifenilacético como única fuente de carbono durante el ensayo de otoño-invierno. Las condiciones fueron las mismas que las descritas en la **Figura 4.III.**, salvo que en se determinó el número de microorganismos capaces de crecer en placas de medio mínimo sólido con ácido *p*-hidroxifenilacético como única fuente de carbono.

Tipo de maceta	Presencia de 3-metilbenzoato	UFC por g de suelo después de:		
		30 días	60 días	120 días
Planta	+	4x10 ⁷	3x10 ⁷	2x10 ⁷
	-	3x10 ⁷	4x10 ⁷	3x10 ⁷
Planta+EEZ32	+	3x10 ⁷	4x10 ⁷	4x10 ⁷
	-	6x10 ⁷	6x10 ⁷	3x10 ⁷
Planta+CMC4	+	4x10 ⁷	2x10 ⁷	2x10 ⁷
	-	2x10 ⁷	4x10 ⁷	1x10 ⁷

Conteo de microorganismos y análisis de los resultados como en el pie de la **Tabla 3.III.**

Tabla 5.III. Supervivencia en el suelo no rizosférico de la población bacteriana indígena capaz de utilizar el ácido *p*-hidroxifenilacético como única fuente de carbono en el ensayo de otoño-invierno. Las condiciones fueron las mismas que las descritas en la **Tabla 2.II.**, salvo que en este caso se determinó el número de microorganismos capaces de crecer con ácido *p*-hidroxifenilacético como única fuente de carbono.

Tipo de maceta	Presencia de 3-metilbenzoato	UFC por g de suelo después de:		
		30 días	60 días	120 días
Planta	+	2×10^6	3×10^5	3×10^6
	-	3×10^6	3×10^5	4×10^6
Planta+EEZ32	+	2×10^6	4×10^5	5×10^6
	-	3×10^6	2×10^5	6×10^6
Planta+CMC4	+	3×10^6	5×10^5	5×10^6
	-	3×10^6	3×10^5	4×10^6

Conteo de microorganismos y análisis de los resultados como en el pie de la **Tabla 3.III.**

2.2. Liberación de primavera-verano.

La duración del ensayo fue de 112 días, desde mayo hasta septiembre de 1996. Durante este periodo las temperaturas diurnas variaron entre 25 y 45°C, mientras que las nocturnas oscilaron entre 10 y 20°C.

2.2.1. Supervivencia en suelos sin planta.

Tanto la cepa contenida como la control se introdujeron en macetas que contenían 1 kg de suelo inoculado con la cepa contenida o la cepa a una densidad celular inicial de 10^6 UFC por g de suelo. En suelos sin planta, el número de UFC tanto de la cepa contenida *P. putida* CMC4 como de la cepa control *P. putida* EEZ32 disminuyó rápidamente independientemente de la presencia o ausencia de 3-metilbenzoato, aunque el descenso fue más rápido en ausencia de este compuesto que en su presencia. En ausencia de 3-metilbenzoato la cepa control se detectó en el suelo durante 1 semana, la cepa contenida quedó fuera del límite de detección 3 días después de iniciado el ensayo (**Tabla 6.III**). En el caso del suelo con 3-metilbenzoato, la densidad celular descendió de una manera más lenta; detectándose la presencia de ambas cepas hasta el día 28 después del inicio del ensayo (**Tabla 6.III**).

Tabla 6.III. Supervivencia de las cepas *P. putida* CMC4 y *P. putida* EEZ32 en suelos sin planta durante el ensayo de primavera-verano. Las condiciones del ensayo son idénticas a las descritas la Tabla 1.III.

Cepa	Presencia de 3-metilbenzoato	UFC por g de suelo después de:			
		7 días	19 días	28 días	40 días
Cepa control EEZ32	+	1×10^4	7×10^3	10^3	$< 10^2$
	-	10^2	$< 10^2$	$< 10^2$	$< 10^2$
Cepa contenida CMC4	+	8×10^3	6×10^2	2×10^2	$< 10^2$
	-	$< 10^2$	$< 10^2$	$< 10^2$	$< 10^2$

^aLos resultados son la media de dos muestras tomadas por triplicado. Las desviaciones típicas se encontraron en el orden del 10%.

2.2.2. Supervivencia en la rizosfera.

En este ensayo se utilizaron semillas de maíz inoculadas con la cepa control *P. putida* EEZ32 o con la cepa contenida *P. putida* CMC4. La densidad celular alcanzada por estas cepas en entornos con planta fue superior en la rizosfera que en suelos no rizosféricos. Además, la presencia o ausencia de 3-metilbenzoato en el suelo rizosférico fue determinante para la supervivencia de las cepas utilizadas. Tras 20 días de iniciado el ensayo la cepa contenida *P. putida* CMC4 no se detectó en suelos sin 3-metilbenzoato (**Figura 5.III.B**). Sin embargo, en este tipo de suelo la cepa control sobrevivió por encima del límite de detección directa durante 28 días, en este momento esta cepa se encontraba a niveles de 10^3 UFC por g de suelo rizosférico (**Figura 5.III.B**). En suelos con 3-metilbenzoato, el número de UFC tanto para la cepa control como para la contenida se encontró a un nivel de 10^3 - 10^5 UFC por g de suelo rizosférico durante períodos más prolongados de tiempo; así la cepa contenida se detectó durante los primeros 50 días (**Figura 5.III.B**); mientras que la cepa control se detectó durante los 70 primeros días del ensayo (**Figura 5.III.A**).

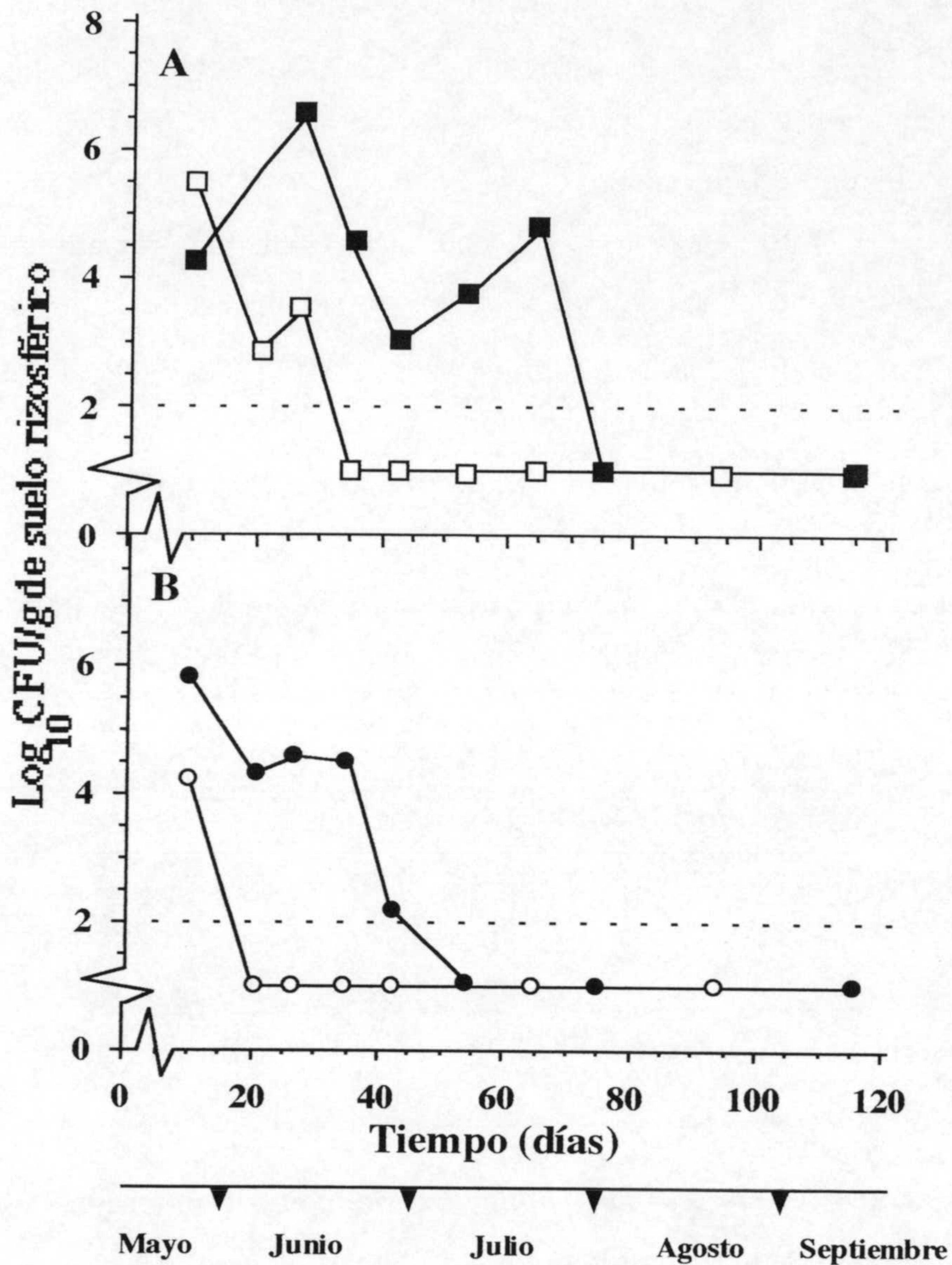


Figura 5.III. Supervivencia de la contenida biológicamente *P. putida* CMC4 y su control *P. putida* EEZ32 en la rizosfera de maíz durante el ensayo de primavera-verano. Semillas de maíz se inocularon con *P. putida* EEZ32 (A, cuadrados) o con *P. putida* CMC4 (B, círculos) y se sembraron en macetas con (símbolos cerrados) o sin (símbolos abiertos) el 0,01% (p/p) de 3-metilbenzoato. A los tiempos indicados se determinó el número de UFC por g de suelo rizosférico. Los datos presentados son la media de los valores obtenidos de tres recuentos individuales, las desviaciones típicas calculadas estuvieron por debajo del 10%.

2.2.3. Supervivencia en el suelo no rizosférico.

Durante el ensayo de primavera-verano se determinó también la supervivencia de la cepa contenida y su control en el suelo no adherido a la raíz de las plantas de maíz. Ambas cepas se establecieron a bajos niveles en este entorno; los niveles alcanzados por las mismas nunca fueron superiores a 10^4 UFC por g de suelo. Sólo se pudo detectar la presencia de la cepa control en suelo con 3-metilbenzoato durante los primeros 28 días del ensayo, sin embargo la cepa contenida, en presencia de este compuesto, sólo pudo detectarse durante los primeros 11 días (**Tabla 7.III**). En el caso de suelos sin 3-metilbenzoato, se observó que el establecimiento de ambas cepas fue inferior que en el caso anterior; sólo se detectaron durante los 11 primeros días del ensayo (**Tabla 7.III**).

Tabla 7.III. Supervivencia de las cepas de *P. putida* CMC4 y EEZ32 en el no rizosférico durante el ensayo de primavera-verano. Las condiciones fueron las descritas en la **Tabla 2.III**, salvo que se utilizaron de semillas de maíz en lugar de las de haba.

Cepa	Presencia de 3-metilbenzoato	UFC por g de suelo ^a después de:			
		11 días	19 días	28 días	40 días
Cepa control EEZ32	+	2×10^4	2×10^3	10^3	$< 10^2$
	-	6×10^2	$< 10^2$	$< 10^2$	$< 10^2$
Cepa contenida CMC4	+	5×10^2	$< 10^2$	$< 10^2$	$< 10^2$
	-	2×10^2	$< 10^2$	$< 10^2$	$< 10^2$

^aLos resultados son la media de dos muestras tomadas por triplicado. Las desviaciones típicas se encontraron en el orden del 10%.

2.2.4. Evaluación del efecto de la introducción de la cepa contenida biológicamente sobre la supervivencia de la microbiota natural del suelo.

Tal como se describió anteriormente en la liberación de otoño-invierno, durante la liberación de primavera-verano también se determinó el número de bacterias indígenas capaces de utilizar el *p*-hidroxibenzoato como única fuente de carbono. Independientemente de la ausencia o presencia de 3-metilbenzoato, y de la introducción o no de las cepas inoculadas en este ensayo, el tamaño de esta población se mantuvo a niveles de aproximadamente 10^5 - 10^6 UFC por g de suelo rizosférico (**Tabla 9.III**) y un orden de

magnitud menor en el caso del suelo no rizosférico (Tabla 10.III) y del suelo sin planta (Tabla 8.III).

Tabla 8.III. Supervivencia de las cepas indígenas del suelo sin planta capaces de utilizar el ácido *p*-hidroxifenilacético como única fuente de carbono en el ensayo de primavera-verano. Las condiciones fueron las descritas en la Tabla 1.III salvo que en este caso se determinó el número de microorganismos capaces de crecer en placas de medio mínimo con ácido *p*-hidroxifenilacético como única fuente de carbono.

Tipo de maceta	Presencia de 3-metilbenzoato	UFC por g de suelo ^a después de:		
		30 días	60 días	120 días
Suelo	+	2x10 ⁶	3x10 ⁶	3x10 ⁶
	-	3x10 ⁶	3x10 ⁶	2x10 ⁶
Suelo+EEZ32	+	3x10 ⁶	2x10 ⁶	2x10 ⁶
	-	1x10 ⁶	4x10 ⁶	1x10 ⁶
Suelo+CMC4	+	2x10 ⁶	5x10 ⁶	3x10 ⁶
	-	2x10 ⁶	3x10 ⁶	2x10 ⁶

^aLos resultados son la media de dos muestras tomadas por triplicado. Las desviaciones típicas se encontraron en el orden del 10% de los valores tomados.

Tabla 9.III. Supervivencia en el suelo rizosférico de la población indígena capaz de utilizar el ácido *p*-hidroxifenilacético como única fuente de carbono durante el ensayo de primavera-verano. Las condiciones fueron las descritas en la Figura 5.III salvo que en este caso se determinó el número de microorganismos capaces de crecer en placas de medio mínimo con ácido *p*-hidroxifenilacético como única fuente de carbono.

Tipo de maceta	Presencia de 3-metilbenzoato	UFC por g de suelo ^a después de:		
		30 días	60 días	120 días
Planta	+	2x10 ⁷	2x10 ⁷	3x10 ⁷
	-	5x10 ⁷	2x10 ⁷	1x10 ⁷
Planta+EEZ32	+	3x10 ⁷	2x10 ⁷	2x10 ⁷
	-	4x10 ⁷	1x10 ⁷	1x10 ⁷
Planta+CMC4	+	1x10 ⁷	5x10 ⁷	3x10 ⁷
	-	3x10 ⁷	2x10 ⁷	3x10 ⁷

^aLos resultados son la media de dos muestras tomadas por triplicado. Las desviaciones típicas estuvieron en el orden del 10% de los valores tomados.

Tabla 10.III. Supervivencia en el suelo no rizosférico de la población indígena capaz de utilizar el ácido *p*-hidroxifenilacético como única fuente de carbono durante el ensayo de primavera-verano. Las condiciones fueron las descritas en la Tabla 5.III.

Tipo de maceta	Presencia de 3-metilbenzoato	UFC por g de suelo ^a después de:		
		30 días	60 días	120 días
Planta	+	5x10 ⁶	4x10 ⁶	4x10 ⁶
	-	2x10 ⁶	5x10 ⁶	6x10 ⁶
Planta+EEZ32	+	1x10 ⁶	3x10 ⁶	3x10 ⁶
	-	2x10 ⁶	2x10 ⁶	4x10 ⁶
Planta+CMC4	+	2x10 ⁶	3x10 ⁶	2x10 ⁶
	-	4x10 ⁶	4x10 ⁶	3x10 ⁶

^aLos resultados son la media de dos muestras tomadas por triplicado. Las desviaciones típicas estuvieron en el orden del 10% de los valores tomados.

2.3. Aparición de mutantes resistentes a la lisis celular.

La estabilidad de la cepa contenida y la posible aparición de mutantes resistentes a la lisis celular, tras su introducción tanto en la rizosfera, como en el suelo no rizosférico y en el suelo desnudo, se comprobaron replicando las colonias que crecieron en el medio selectivo (medio mínimo M9 con 3-metilbenzoato como única fuente de carbono y con 50 µg/ml de Km) en medio mínimo que contenía glucosa como única fuente de carbono. Ninguna de las colonias recuperadas en las placas con 3-metilbenzoato, provenientes de las muestras inoculadas con la cepa contenida, creció en medio mínimo con glucosa. Por el contrario, las colonias obtenidas a partir de muestras inoculadas con la cepa control sí fueron capaces de crecer en este último medio. Estos resultados sugirieron que a lo largo de los ensayos de campo no aparecieron mutantes en el sistema de contención.

2.4. Detección de la presencia de 3-metilbenzoato en la rizosfera.

Para relacionar de forma más directa las diferencias observadas en la supervivencia de la cepa contenida con la presencia de 3-metilbenzoato en el suelo, se hacía necesario la utilización de un método de detección de este aromático en muestras de suelos. Debido a que no se disponía de un método directo y eficaz para la extracción repetitiva y cuantificación real de la cantidad de 3-metilbenzoato en muestras de suelo y rizosfera, se utilizó un método cualitativo, que se basa en la detección de bioluminiscencia en extractos

de suelo inoculados con la cepa *P. putida* CMC5 (**Tabla 1** de *Materiales y Métodos*), tal como se describe en el apartado 15 de *Materiales y Métodos*. Esta cepa porta el gen *xyIS* y una fusión $P_m::luxAB$ (**Tabla 1**, *Materiales y Métodos*). Esta construcción emitió luz cuando las células se expusieron a concentraciones de 3-metilbenzoato superiores a $10 \mu\text{M}$ (M.C. Ronchel, resultados no publicados).

Semillas de maíz inoculadas o no con aproximadamente 10^6 UFC por semilla de *P. putida* CMC4 se sembraron en macetas de 1 kg de suelo cambisol suplementado o no con un 0,01% (p/p) de 3-metilbenzoato. Estas macetas se colocaron dentro de la parcela experimental descrita en el apartado 14.1 de *Materiales y Métodos* y, a diferentes tiempos, se determinó la presencia de 3-metilbenzoato en las muestras de suelo utilizando la cepa *P. putida* CMC5 como indicador. Los extractos obtenidos de suelo al que se le había añadido 3-metilbenzoato indujeron la producción de bioluminiscencia por esta cepa (entre 75-158 unidades relativas de luz), independientemente de la presencia o ausencia de la cepa contenida *P. putida* CMC4. Sin embargo, los extractos de suelo carentes del aromático casi no indujeron la producción de luz (entre 1 y 11 unidades relativas de luz). (**Tabla 11.III**).

Tabla 11.III. Detección de 3-metilbenzoato en muestras aisladas de la rizosfera de maíz. Semillas de maíz inoculadas o no con alrededor de 10^6 UFC/semilla de *P. putida* CMC4 se sembraron en macetas de 1 kg de suelo cambisol suplementado o no con 0,01% (p/p) de 3-metilbenzoato (ver texto para otros detalles). A los tiempo indicados, suelo rizosférico se diluyó en 90 ml de tampón fosfato y a 1 ml de esta solución se le añadió 0,1 ml de un cultivo de *P. putida* CMC5 con una turbidez de 0,1 (DO_{660}). Tras 3 horas de incubación a 30°C , se determinó la emisión de luz.

Tiempo	Planta	Emisión de luz ^a	
		Planta+3MB	Planta+3MB+ <i>P. putida</i> CMC4
0	1	88	89
7	11	142	114
14	5	132	75
21	6	158	98
30	2	145	79

^aLa emisión de luz se midió en unidades relativas de luz/g de suelo rizosférico.

2.5. Dispersión de los microorganismos introducidos dentro del área experimental.

Durante los ensayos de campo llevados a cabo en este estudio, se eligieron 5 sitios al azar en la parcela experimental, en las que no se habían introducido las cepas estudiadas en los apartados anteriores, para determinar la dispersión de los microorganismos recombinantes fuera de la zona de aplicación. Las muestras se tomaron cada 14 días durante la realización de los ensayos, no detectándose la presencia de la cepa control ni de la contenida fuera de las macetas. Después de finalizar los ensayos, la parcela se estudió en este mismo sentido durante seis meses más, pero en ningún caso se detectó la presencia de ninguna de las cepas recombinantes utilizadas en los ensayos de campo.

IV. CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL OPERÓN DEL CATABOLISMO DE LA PROLINA DE *Pseudomonas putida* KT2442.

En el capítulo anterior se estudió la supervivencia en condiciones medioambientales de cepas derivadas de *P. putida* mt-2 portadoras o no de un sistema de contención biológica condicional. La inducción de este sistema se basaba en la existencia de una señal química en el entorno edáfico estudiado; la presencia de compuestos aromáticos, como por ejemplo el 3-metilbenzoato. Los experimentos descritos demostraron la operatividad de este tipo de sistemas de contención biológica en el medio ambiente. Además, se observó que la presencia de plantas en los suelos bajo estudio favorecía la supervivencia de los microorganismos, frente a su desaparición en entornos desprovistos de este efecto radicular. De estos resultados surgió la idea de la construcción de nuevos sistemas condicionales de contención biológica dependientes de señales químicas presentes en exudados radiculares. Este tipo de sistemas permitiría el confinamiento de microorganismos en la rizosfera de plantas así como la eliminación de aquellos que migrasen a entornos no influenciados directamente por las mismas. Resultan evidentes las aplicaciones diversas que estos sistemas de contención biológica podrían tener en el desarrollo y utilización de bacterias como pesticidas biológicos.

El primer paso para el desarrollo de este tipo de sistemas de contención biológica sería la búsqueda y caracterización de promotores inducibles por exudado radicular. El paso siguiente sería la incorporación de estos promotores en el elemento control de un sistema de contención biológica de forma que la muerte celular se indujese en ausencia del exudado de la raíz. Varios autores han descrito la existencia en este exudado de aminoácidos y azúcares entre otros compuestos (Bowen, 1980; Chaboud, 1983; Lynch, 1982; Newman, 1985; Rovira, 1959; Rovira *et al*, 1979; Vancura, 1988). *P. putida* KT2442 no es capaz de utilizar como fuente de carbono los azúcares presentes a mayor concentración en el exudado radicular (por ejemplo fucosa, manosa y arabinosa), sin embargo, esta cepa utiliza como fuente de carbono y/o nitrógeno la mayoría de los aminoácidos tales como prolina, histidina y serina (C.Ramos, datos no publicados). Esta observación, unida al hecho de que los operones bacterianos codificadores de los genes necesarios para el catabolismo de estos compuestos son, en general inducibles por la presencia del aminoácido correspondiente, nos llevó a la decisión de comenzar la búsqueda de promotores bacterianos inducibles por exudado radicular con el aislamiento y caracterización de promotores involucrados en el catabolismo de aminoácidos. Se seleccionó el promotor del catabolismo de la prolina debido a que este aminoácido es uno de los más abundantes en el exudado radicular y, además, es utilizado como fuente de carbono y/o nitrógeno por *P. putida*

KT2442 (C. Ramos, trabajo no publicado, Vílchez *et al.*, en preparación). Por otro lado, otros autores han descrito la existencia de promotores inducibles por el exudado de raíz de plantas que responden específicamente a este aminoácido (Van Overbeek y Van Elsas, 1995)

En este capítulo se describe el aislamiento, secuenciación y caracterización preliminar de la expresión de los genes que configuran el operón del catabolismo de la prolina de *P. putida* KT2442. Los experimentos descritos se realizaron en colaboración con la Licenciada Susana Vílchez Tornero, cuya futura tesis doctoral consistirá en el estudio de la regulación del catabolismo de la prolina en *P. putida* y en la construcción de un sistema de contención biológica condicional inducible por este aminoácido.

1. AISLAMIENTO Y SECUENCIACIÓN DEL OPERÓN DEL CATABOLISMO DE LA PROLINA DE *P. putida* KT2442.

La cepa *E. coli* RM2 no utiliza prolina como fuente de carbono o nitrógeno debido a que contiene una delección de los dos genes necesarios para el catabolismo de este aminoácido, *putA* y *putP* (Wood, 1981). La transferencia a esta cepa de una genoteca de *P. putida* KT2440, construida mediante la clonación de los fragmentos resultantes de la digestión parcial del cromosoma de la misma con el enzima de restricción *Pst*I en el vector pLAFR3 (Ramos-González *et al.*, 1992), permitió rescatar el cósmido pCRR831 como aquel que restauraba la capacidad de utilizar prolina como única fuente de nitrógeno a la cepa *E. coli* RM2 (C. Ramos, datos no publicados) (**Figura 1.IV**). Este plásmido constituye la base sobre la que se sientan los experimentos que se detallan a continuación, y que constituyen los pasos iniciales de la búsqueda de un sistema de control para la aplicación de la contención biológica al desarrollo de biopesticidas.

El plásmido pCRR831 se digirió con la restrictasa *Pst*I. Los fragmentos resultantes de esta restricción se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa y, posteriormente, se transfirieron a una membrana de nilón cargada positivamente. A continuación, se realizó una hibridación con un fragmento del operón del catabolismo de la prolina de *Salmonella typhimurium* presente en el plásmido pPC6 (Hann *et al.*, 1988, cedido por el Dr. Maloy ([Departamento de Microbiología, Universidad de Illinois, USA])). Para preparar la sonda, este plásmido se digirió con la restrictasa *Mlu*I que rindió 3 fragmentos. Uno de éstos, de 4,13 kb, que contenía parte de los genes *putA* y *putP*, se marcó con digoxigenina y se utilizó como sonda para la hibridación. Dos de las bandas resultantes de la digestión con *Pst*I del plásmido pCRR831, cuyos tamaños fueron 4,3 y 2 kb, hibridaron con la sonda utilizada (**Figura 2.IV**).

A continuación, se procedió al aislamiento y subclonación de las bandas de 4,3 y 2 kb en el vector pUC19. Los plásmidos recombinantes se seleccionaron en *E. coli* JM109 y se denominaron pLCR4 y pLCR12. El plásmido pCLR4 (Figura 3.IV) contenía la banda de 2 kb procedente del plásmido pCRR831, mientras que el plásmido pLCR12 (Figura 4.IV) contenía la banda de 4,3 kb.

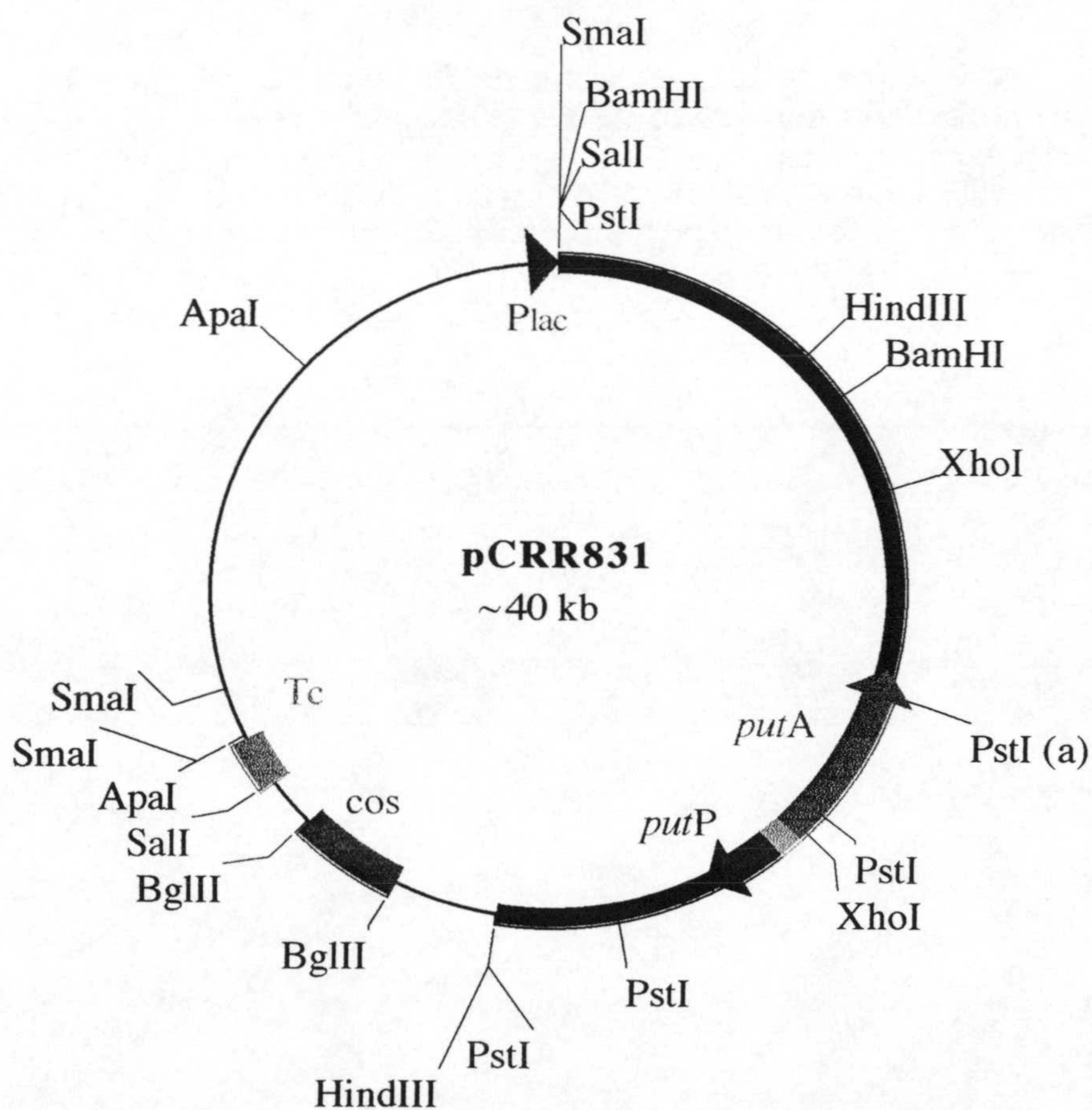


Figura 1.IV. Esquema del plásmido pCRR831. Se muestra la posición del promotor del operón de la lactosa *Plac*, del gen de resistencia a tetraciclina (Tc) y la región *cos* del cósmido. Además, se muestran las dianas para *Apal*, *BglII*, *BamHI*, *HindIII*, *Sall*, y *SmaI* y algunas de las dianas *PstI*. Este plásmido porta un inserto de ~20 kb, resultado de una digestión parcial con el enzima de restricción *PstI* del cromosoma de *P. putida*, en el que están presentes los genes *put* (put, "proline utilization") para el catabolismo de la prolina.

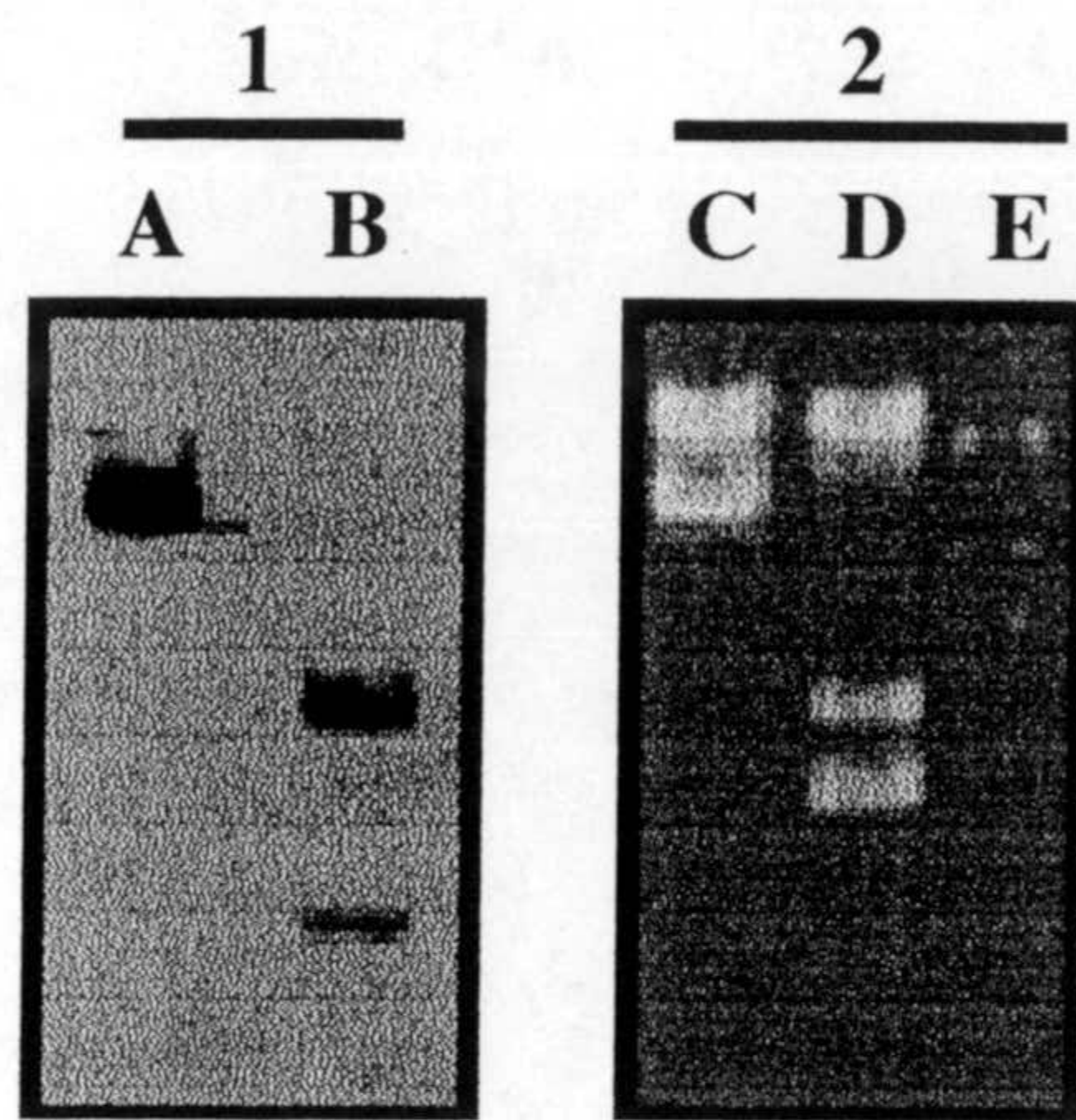


Figura 2.IV. Localización de los genes *put* de *P. putida* en el plásmido pCRR831 mediante hibridación con una sonda de *S. typhimurium*. (Panel 1) Se muestra el resultado de la hibridación de los fragmentos resultantes de las digestiones del plásmido pCRR831 con *Hind*III (carril A) o *Pst*I (carril B) con una sonda que contenía parte de los genes *putA* y *putP* de *S. typhimurium* (fragmento *Mlu*I de 4.13 kb del plásmido pPC6). (Panel 2) Separación de los fragmentos resultantes de las digestiones del plásmido pCRR831 mediante electroforesis en gel de agarosa. Digestión con *Hind*III y *Pst*I (carriles C y D, respectivamente). En el carril E se muestra el marcador de tamaño (ADN del fago λ digerido con *Hind*III)

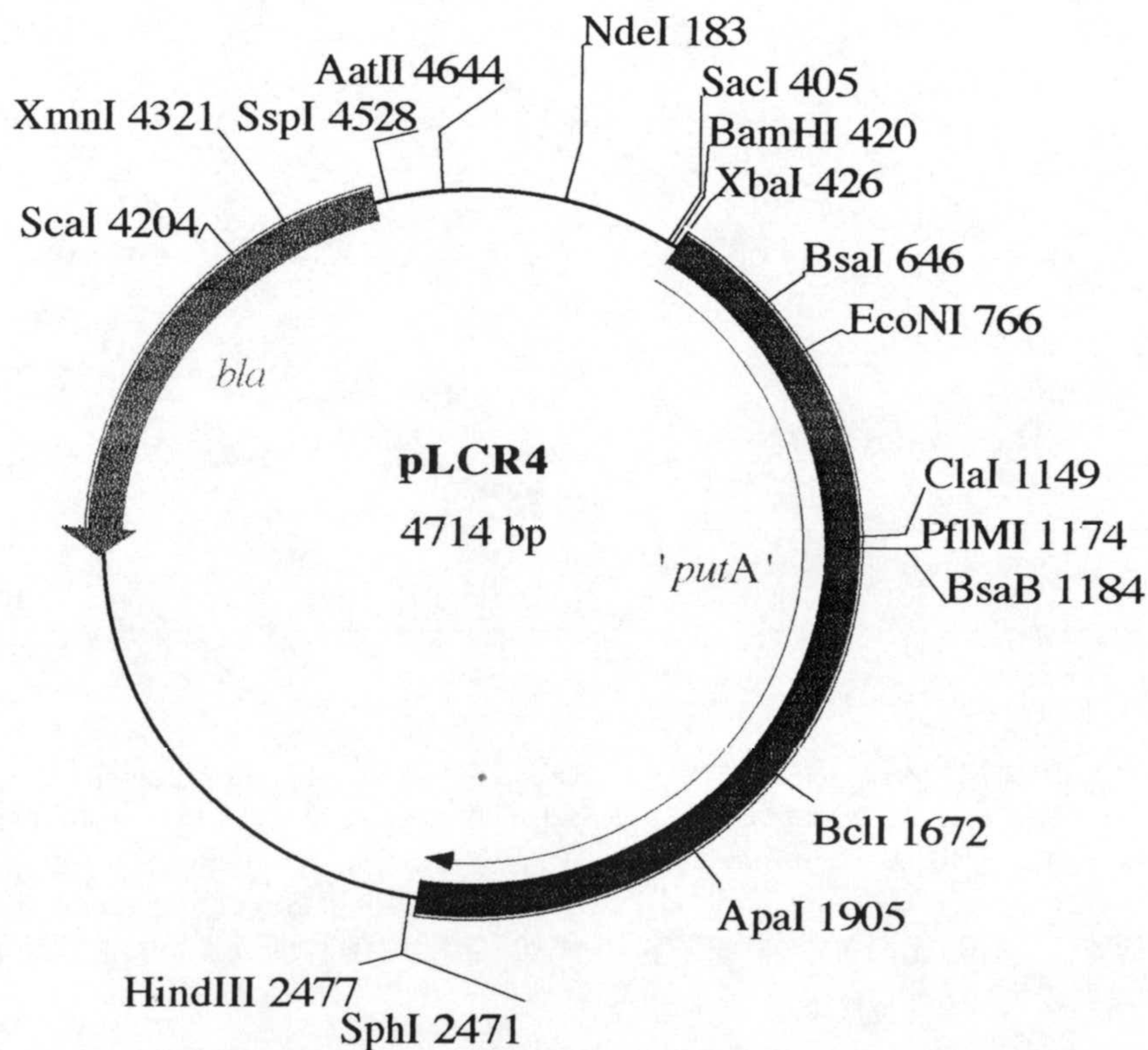


Figura 3.IV. Esquema del plásmido pCRL4. Se muestran los sitios únicos de restricción; así como la localización del gen *bla*, que codifica resistencia para ampicilina, y un fragmento de 2 kb del gen '*putA*'.

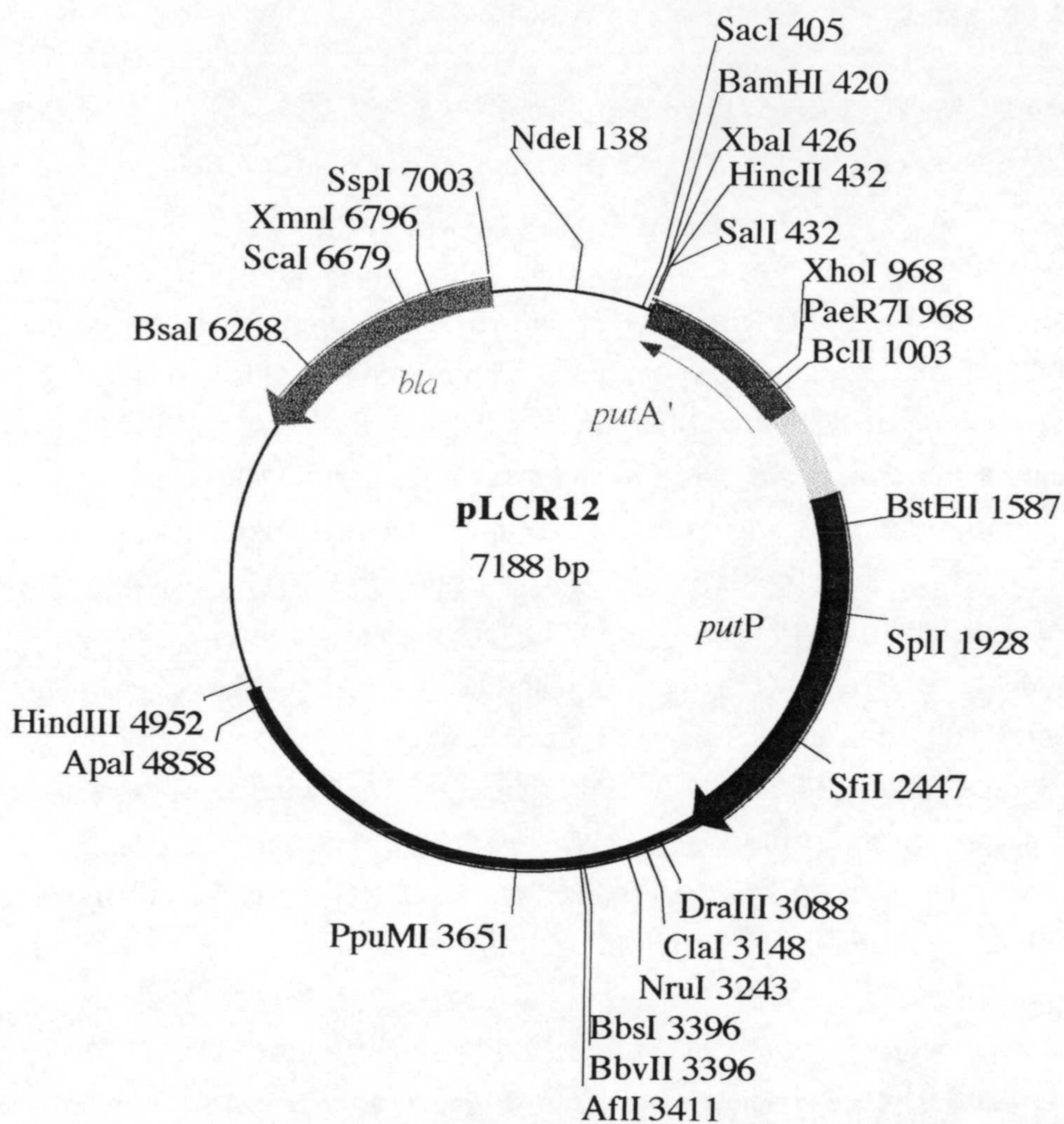


Figura 4.IV. Esquema del plásmido pCRL12. Se muestran los sitios únicos de restricción de este plásmido; así como la localización del gen *bla*, que codifica resistencia para ampicilina, un fragmento del gen *putA'* de 0.54 kb, el gen *putP* y la región intergénica entre ambos genes *put*.

2. SECUENCIACIÓN DE LOS GENES QUE CONSTITUYEN EL OPERÓN DEL CATABOLISMO DE LA PROLINA DE *P. putida* KT2442.

Para establecer la localización del ADN de *P. putida* que hibridaba con la sonda de los genes *put* de *S. typhimurium* se procedió a la secuenciación de los insertos de los plásmidos pLCR4 y pLCR12 siguiendo el procedimiento y utilizando de los cebadores indicados en la sección 10 de *Materiales y Métodos*.

2.1 Secuenciación del inserto del plásmido pLCR12.

La secuencia obtenida a partir del fragmento de 4,5 kb del cromosoma de *P. putida* KT2442 insertado en el plásmido pCLR12 (**Figura 4.I.V y 5.I.V**) se comparó con las existentes en la base de datos GenBank. Como resultado de esta comparación se pudo determinar que este fragmento contiene un ORF completo de aproximadamente 1,5 kb (493 aminoácidos), que presentaba una homología de aproximadamente un 70% con la secuencia de ADN a los genes *putP* de diversos microorganismos (*P. fluorescens*, *S. typhimurium*, *Rickettsia typhi* y *E. coli*). Además, esta secuencia presenta homología con transportadores de nutrientes cuya función va asociada al transporte de sodio (simporte de pantotenato, cotransporte de glucosa, de mio-inositol, de aminoácidos neutros y nucleósidos). La comparación de la secuencia proteica correspondiente mediante el programa "Clustal Multiple Sequence Alignment" reiteró los resultados expuestos anteriormente (**Figura 6.IV**).

Estudios de hidrofobicidad de la proteína PutP mediante el programa de análisis funcional de secuencias proteicas SCANPROSITE predijeron la existencia de 10-11 dominios transmembrana. Estos resultados añadidos a los anteriores nos dan la certeza de haber clonado el gen que codifica la proteína transportadora de prolina PutP en el plásmido pCRL12 (**Figura 7.IV**).

Además del gen *put P* de *P. putida* KT2442, el inserto del plásmido pLCR12 contenía un ORF incompleto de 450 pb (**Figura 4.IV y 5.IV**) que mostró una homología del 70% con secuencias existentes en la base de datos GenBank correspondientes a los genes *putA* de los microorganismos mencionados en el apartado anterior. Esta región completaba la secuencia de la proteína PutA en su extremo amino terminal.

1
TTAGCCAATGGTCATCAGGCTGGCGTTACCACCCGCCGCTGCAGTGTTACGCTCACCGCGCGCTCGATGACCAGGCGCTCCAGCGCAATCTGGTGATCC
101
CCGCTGGACAGCCCGTGCACCCCAACGATCGCCCCGGCACGCTTGCCACCTGCTGGCATAACGCCGCGCAGCTGGTCCCAGTCGCCATGGTGGATCACGG
201
CGTCGAACGCCACTTCATCCTTGTTCCAGTCCGCGACCAGCTTCACCTTGGCCTGCAGCTCACGCGGCAGGCGGGCGCGCAGGGCCTTGCCCGGTTACC
301
GTCAACCCACACCGCCGAGCTGCCAACGGCCAGTACCGCGGCGAACTGCGCCAGCAGGTCGGTTTCGTTGTCGGCCAGGCACAGCACGTGCTCACGCGGC
401
GCGGCAGAATGGTGTAGCTGTTGCGCTCGCCGGTCGGGCTGGCAGCAGGCGGGCGATGCCGCTCTGCGACTGGCTGGCGAACTGGCTGCACAGCGCGGC
501
CCAGGTCGGCCAGCTGGTTGTTCTCGGCCAGGCCTTCAGGCCGTGCAGCGGCTTTACCAGCTGTTTCGTGCAGGGTGCAGGTCGGCCTTCGCCGTC
601
CTGCTGCTGGAAGTGGCGGCCAATGGCGTCGGCCGGGCGGGTCGACAGCAGGCGGTAGAGGTACAGCGGGCCCGGCTTTCGGGCCGGTGCCAGACAGG
701
CCTTCACCACCGAACGGCTGCACGCCACCCTGCACCCACAATGTTGCGGTGACGACATGTTGCCGGCGTTCGGTTCACCACTTTGGCGATGGTCT
801
CGTCGATACGGGTGTGCACGCCGAGGGTCAGGCCGTAGCCGGAGTTGTTGATCTGCTCGATCAGCTGGTCCAGATTGCGGCGGTTGTAGCGCACCCAGTG
901
CAGCACGGGGCCGAAGATTCGCGCTTCAGCTCGTCGAAGCTGTCCAGCTCGATCAGGGTTGGCATGACGAAGGTGCCGCGCTTGATCTCGGCAGCATCG
1001
GCAATGGCGACTTGGTAGACCGGGCGGCCTTCTCGCGCATGCCCTGGATGTGCTTCTCGATGCCGGCTTTGGCTTCGGCATCGATCACCGGGCCGATGT
1101
CCACGGCCAGGCGGTCCGGGCAGCCAGGCGGCTTTCAGCCATGGCGCCCTTGAGCATCTCGATTACGCCGTCGGCGGAGTCTTCTGCAAGCACAGTAC

SU8

SU4

SU5

1201
 GCGCAGGGCCGAGCAACGCTGGCCGGCACTGTCGAAGGCCGAGGACACCACGTCGATCACCACCTGTTCCGGTCAGTGCCGAGGAGTCGACGATCATCGCG
 1301
 TTCTGGCCCGCGGTTTCGGCGATCAGCGGGATCGGGCGGCCCTGGTTGTCCAGACGGCCAGCGACGTTGCGCTGCAGCAGGCGGGCCACTTCAGTGGAGG
 1401
 CCGGTGAACATCAGCCTTTGACGCGCTCGTCTCCGACCAGGCCGGCACCGACAGTTTCACCGCGGCCCGGCAGCAGTGCAGCAGCCTTCTGGGATGC
 1501
 CAGCTTCCAGCAGCAGGCGCACGGCCTGGGCGGGGATCAGTGGGGTTGCTCGGCAGGCTTGGCCAGTACCGGGTTGCCGGCAGCCAGGGCTGCGGCCAC
 1601
 CTGGCCGGTGAAGATCGCCAGCGGGAAGTTCCATGGGCTGATGCACACCACAGGACCCAGTGGGCGGTGGGCGTCGTTGCTGAGTCGTTAAGTGCCTGCA
 1701
 CCGCGTAGTAGCGCAGGAAGTCCACGGCTTACGCAATTCGGCAATGGCGTTGGGGAAGGTTTGGCCGGCCTCGCGGATGAGCAGGCCCATCAGCGGGTG
 1801
 GATTTCCGGCCTCCATCAGGTCGGCGGTGCGCTCCAGAATGGCAGCACGCTCGGCTGGTGGGGTGGCCTGCCAGATCGGCGCGGGGTTTTCAGTGCCTAATGG
 1901
 ATGGCGTTGTCAAATTTGGCAACGGTGGCCTCCTGCACATGGCCGACGACGTTGCGGTGGTTCAGCCGGGTTTCAGCACCGGTGCGGCAGCGCTCTCCCTGG
 2001
 CGGCGCAGGCCAGCAGCGGGGCAGCCTCCCACCTGTTTGTGAGCGGTGGCCACCATGGCGCAGGACAACAACCCAGGCGGTGTTTATTGGCCATTTCAAT
 2101
 ACCGGCCAATTTGGCCCGTTCGGTGCCATACAGGTCGCGCGGCAGGGGAATGCGTGGGTGCGGCAGGCCGATACTGCCTTTCCTGGGTACCCATGCGATC
 2201
 GATGCTGGCCACCGGTCGGCGACCAGTTCCTGGATGGAAATCGAGTGGTTCGGCAATGCGGTTGACGAACGAGGTGTTTCGCGCCGTTTTCCAGCAGGCGGC
 2301
 GCACCAGGTAGGCCAGCAGCGTTTCATGGGTGCCGACCGGTGCATACACGCGGCACGGGCGGTTTCAGCTTGCCATCGGCAATCTTGCCGACCACTTGCTC
 2401
 GTACAGCGGTTTCGCCATGCCGTGCAGGCACTGGAACCTGTAAGTCTGCCCCGGCAATGTGGTAGATGGCCGACAGGGTGTGGGCG
 2501
 TTGTGGGTGGCGAACTGCGGGTAGATGGCTTCTGGCACGGCCAGCAGCTTGCGGGCGCAGGCCAGCTAGGACACGTCGGTGTACACCTTGCGGGTATAGA

Secuencia 1

secuencia2

CGGGCGGCCCTGGTTGTCCAGACGG

ACGCAATTCGGCAATGGCGTT

AGGCCCATCAGCGGGTG

GAT

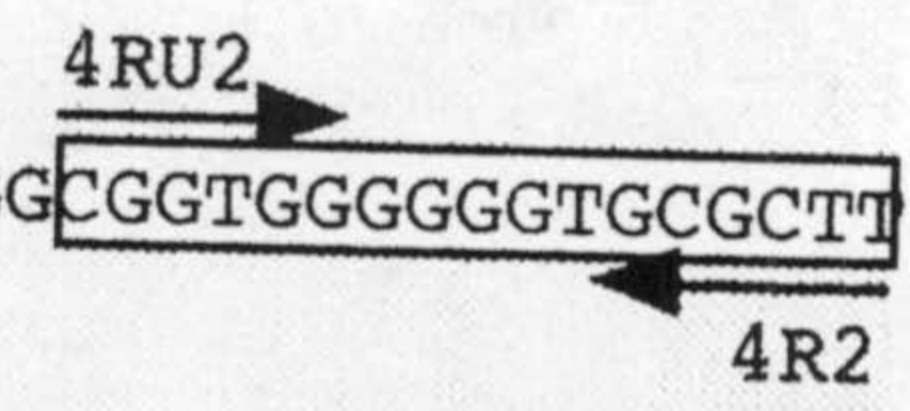
CATTGGCCATTTCAAT

CGACCAGTTCCTGGATGGAA

Resultados

2601

CCGGGTAGCCTTCCAGGCCTTCGACCTGGGCACGCTTGATCTCGCTGTCCCAGTAGGCGCCTTTTAAACAGGCGGATTATCAGGCGGTGGGGGGTGCCTT



2701

GGCAGATCGAAGAAGTAGTTGATCAAGTACGGGCAGCGCTTCTGGTAGGCCTGGATAACGAAGCCGATGCCGTTCCAGCCAGCCAGGGATGGCTCGAAG

2801

CACAGGCGTTCGAGCAGGTCCAGCGAAAGCTCCAGGCGGTTCGGCTTCTTCGGCGTCGATGTTAAGGCCGATGTCGTAAGTCTGCTTGGCCAGCAGGGTCAGCG

2901

ACAGCAGGCGCGGGTACAGCTCTTCCATCACGCGCTCGTACTGGGCCCGCTGTAGCGCGGGTGCAGTGCCGACAGCTTGATCGAGATGCCTGGGCCTTC

3001

ATAGATGCCACGGCCATGCGAGGCCTTGCCGATCGAGTGGATGGCCTGCTCGTAGGACGCCAGGTACTTCTGCGGTCGTCGTCAGTGCAGTGCAGGCTTCG



3101

CCAAGCATGTCGTAGGAGTAACGGAAGCCTTTGGCCTCGAAACGGCTGGCGTTGGCCAGGGCTTCGGCAATGGTCTCGCCGGTGACGAACTGCTCACCCA

3201

TCAGGCGCATGGCCATGTCGACGCCCTTGCGGATCATCGGCTCGCCGCTCTTGCCGATGATGCGGGTGAGCGAGGAGGTGAGGCCGTTTCGTTATGGGT

3301

GCTGACCAGCTTGCCGGTCAGCAGCAGCCCCAGGTGGCGGCGTTGACGAACAGTGACGGGCTGTTGCCAGGTGCGGCTGCCAGTTGCCGGTACTGATC

3401

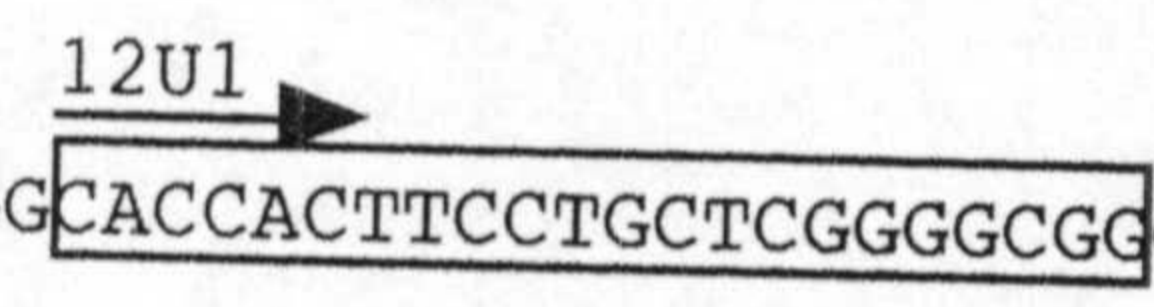
TTGTCGCGGATCAGCGCATCACGGGTACCTTTGTCGGGGATACGCAGCAGGGCTTCGGCCAGGCACACGCCACGCCTTTCCTGAGACGACAGCGAGAATT

3501

CCTGCAGCAGGCCCTGGACGATAACGGCACGGCCGCGACGCTTTTCTGGTTGCGCAGTTTTTCGGCAATGCTTGCCGGCCAGTTGTTGGTGGCGTCCGGCC

3601

AGCGGCGCGCTCAGGCGCGCCTGCTCCAGCAGCATCGGCACCACTTCCTGCTCGGGGCGGCGGTAGGCGGCGGTGATCGCCGAGCGCAGTACCGACTGCG



3701

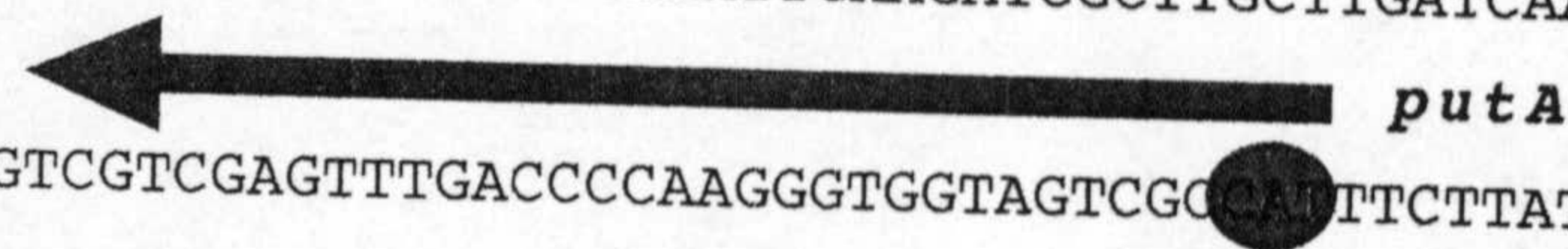
GCAAGATGCTCTCGGCAAATTCGAGGAAGCACTGGTGGCTGTGGTCGGCCTGGACTTCACCGGCATCGTCGGCCGGGTTGTGGCATGACCGTTGAGTTG

3801

GTCAGGGTGGCACCACCCTCGAGCTTCTCCAGGTAATTGAAGATCGCTTGCTTGATCAACCAGTGAGGCGTGCGGTCGATGGACTGCGCAGCTGCTTTGA

3901

GTCGCTCACGGGTCGGGTCGTCGAGTTTGACCCCAAGGGTGGTAGTCGCTTCTTATCCTCGTTATTGCCACGGTTGTGGCCTAAGCTGGCGTCAAGA



4001 GTATCTGTAGGACAATT CGGGTGCAACCAGGTGCAAC CCGATTTTTTCGTGTTGAAAGGTGCAACTCGTCCGACAGCTATTCCCATAACCTGAAAAGGGG
4101 CGCTTTCGGTGCATTTATTCTGAAAAAGCGGTTTTTTGCTCCCGAAAGGAGCAAGAAGTGGGCTTTGTCGGAAAATGCCGGGCAGGTGCAACTTGCAAA
4201 AGAAAAATGGTTGCACCTTCTTTGCGTTGTTGCATAGCATTGCGCCGCTGGGTGCAACCACCAACGGTGTGGTTGCGCATGATAAAAAACAAACGCCAGGG
putP →
CACACGCAAGGGCAATCCACTAACGATCACCTTCGTGATCTACATCGCAGCAATGGTGCTGATCGGCTTCGCCGCTATCGCGCTACCAACAACCTTTCC
4401 GATTACATTC TGGGTGGTCGCAGCCTGGGTA GCGTGGTTACCGCGCTGTCTGCCGGTGCCTCCGACATGAGTGGCTGGCTGCTGATGGGCCTGCCCGGTG
4501 CCATCTACTTCGCGGGCCTGTCCGAGGCCTGGATCGCCATCGGCCTGACAGTGGGTGCCTACCTGAACTGGCTGTTCGTGGCAGGCCGGCTCCGCGTGCA
4601 GACCGAACACAATGGTGACGCGCTGACCCTGCCGGACTACTTCTCCAGCCGTTTCGAAGACAATAGCGGGCTGCTGCGTATCATTTCCGCCATCGTCATC
4701 CTGGTGTTCCTCACCAICTACTGTGCCTCCGGCATCGTGGCCGGTGGCCGTCGTTCGAGAGCACCTTCGGCATGTCTGCGAACCCTTTGTTGGGCTG
4801 GTGCGGGCGCCGACCATCGCCTACACCTTCGTTGGTGGCTTCCTGGCGGTGAGCTGGACCGATACCGTACAGGCTTCGCTGATGATCTTCGCGCTGATCCT
4901 ACCCCGGTAAT CGTGCTGATCTCCACCGGTGG CTTGACCAGACCTTCGCCGCTATCGAGGCGGTGAACCGGC GAAACTTCGACATGCTCAAGGTGCCA
5001 CCTTCATCGGCATCATCTCGCTGATGGGCTGGGGCCTGGGTTACTTCGGCCAGCCGCATATCCTGGCGCGCTTCATGGCCGCTGATTCGGTGAATTCCAT
5101 CGCCAAGGCGCGCCGCATTTCCATGACCTCAATGATCCTGTGCCTGGCCGGTACCTGTGCCGTTGGCTTCTGCGGCATTGCTT CTTCTCGGCCCATCCT
5201 GAGC TGGCAGGCCCGGTTAGCGAGAACCACGAAACGTGTGTTTCATCGAGCTGGCCAAGATCCTGTTCAACCCATGGGTTGCGGGTGTCTGCTGTCGGCC

putP

Secuencia 4

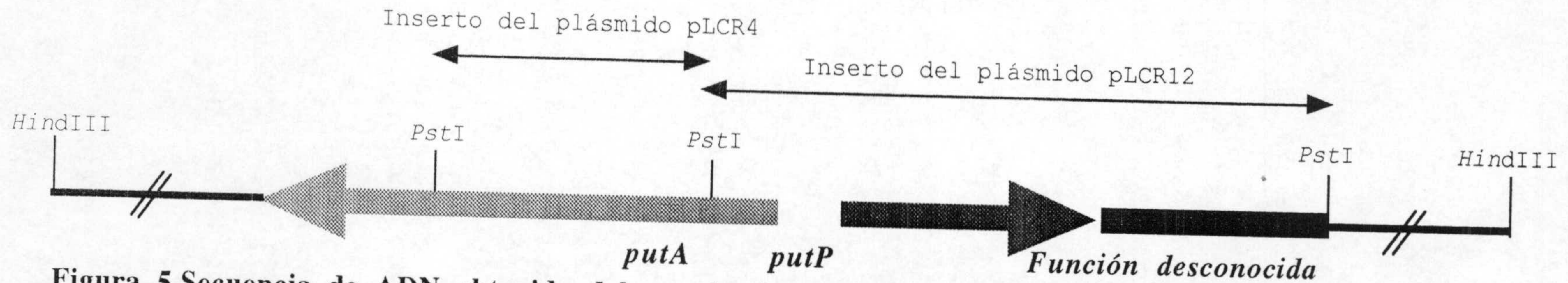
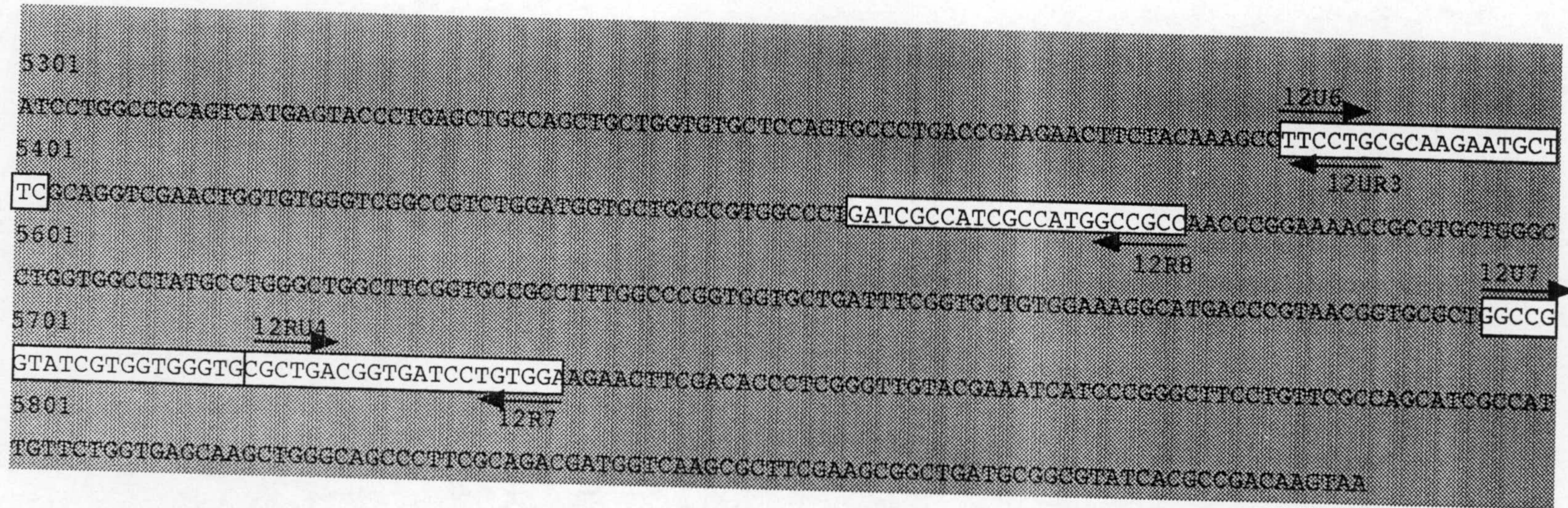


Figura 5. Secuencia de ADN obtenida del operón del catabolismo de *P. putida* KT2442, caracterización y esquematización de la misma. En esta figura se representa la secuencia del operón de la prolina de *P. putida* KT2442. Las bases nitrogenadas marcadas con rojo fueron las secuenciadas a partir del plásmido pLCR4 (Figura 3), las mostradas en negro las pertenecientes al inserto del plásmido pLCR12 (Figura 4) y las mostradas en violeta corresponden al fragmento de *putA* contenido en el inserto del plásmido pSL4 (Figura 8) y no en el resto de los plásmidos mostrados. Dentro de la misma se localizan los cebadores utilizados y el sentido 5'-3' de los mismos (rectángulos abiertos). Además, en la secuencia se marcan los codones ATG que codifican la primera metionina en la traducción de los de los genes *putA* y *putP*, así como el sentido de la transcripción de los mismos. Por otro lado, se muestra las secuencias que poseen homología con los dominios funcionales de este operón. Dentro del gen *putA* se localizaron regiones conservadas con los dominios funcionales de la proteína PutA de otros microorganismos, a saber, pirrolina-5-carbamato deshidrogenasa (secuencia 1, sombreado verde), prolina oxidasa (secuencia 2, sombreado amarillo) y un dominio que codifica para una función funcional (secuencia 4, sombreado azul). Por último, se muestra el esquema de la organización de estos genes, donde se muestra el sentido de la transcripción de los mismos, la localización de los sitios *PstI* y *HindIII* utilizados para clonación de los genes del operón de la prolina y la obtención de los plásmidos pLCR4, pLCR12 y pSL4.

	1	15	16	30	31	45	46	60	61	75	76	90	
1 P.	MGNPL			YRATN	NLSDYILGGRSLGSV	VTALSAGASDMSGWL	LMGLPGAIYFAGLSE						88
2 F.	MSVSNPTLITFVIYI	AAMVLIGLMAYRSTN		NLSDYILGGRSLGSV	VTALSAGASDMSGWL	LMGLPGAIYMSGISE							90
3 S.	MAISTPMLVTFCVYI	LGMLLIGFIAWRSTK		NFDDYILGGRSLGPF	VTALSAGASDMSGWL	LMGLPGAIFLSGISE							90
4 R.	MAISTPMLVTFCVYI	FGMILIGFIAWRSTK		NFDDYILGGRSLGPF	VTALSAGASDMSGWL	LMGLPGAIFLSGISE							90
5 E.	MAISTPMLVTFCVYI	FGMILIGFIAWRSTK		NFDDYILGGRSLGPF	VTALSAGASDMSGWL	LMGLPGAVFLSGISE							90
	91	105	106	120	121	135	136	150	151	165	166	180	
1 P.	LFVAGRLRVQTEHNG	DALTLPDYFSSRFED		NSGLLRISAIIVILV	FFTIYCASGIVAGAR	LFESTFGMSYETALW	AGAAATIAYTFVGGF						178
2 F.	LFVAGRLRVQTEHNG	DALTLPDYFSSRFED		KSGLLRIISAVVILV	FFTIYCASGIVAGAR	LFESTFGMSYETALW	AGAAATIAYTFIGGF						180
3 S.	KLVAGRLRVHTEFNN	NALTLPDYFTGRFED		KSRVLRISALVILL	FFTIYCASGIVAGAR	LFESTFGMSYETALW	AGAAATIIYTFIGGF						180
4 R.	KLVAGRLRVHTEFNN	NALTLPDYFTGRFED		KSRVLRISALVILL	FFTIYCASGIVAGAR	LFESTFGMSYETALW	AGAAATIIYTFIGGF						180
5 E.	KLVAGRLRVHTEYNN	NALTLPDYFTGRFED		KSRILRIISALVILL	FFTIYCASGIVAGAR	LFESTFGMSYETALW	AGAAATILYTFIGGF						180
	181	195	196	210	211	225	226	240	241	255	256	270	
1 P.	LAVSWTDTVQASLMI	FALILTPVIVLISTG		GFDQTFAAIEAVNRR	NFDMLKGATFIGIIS	LMGWGLGYFRPPHIL	ARFMAADSVNSIACA						268
2 F.	LAVSWTDTVQATLMI	FALILTPPIIVLLATG		GVDTTFLAIEAKDPT	SFDMKNTTFIGIIS	LMGWGLGYFGQPHIL	ARFMAADSVKSIACA						270
3 S.	LAVSWTDTVQASLMI	FALILTPVMVIVGVG		GFSESLEVIKQKSIE	NVDMLKGLNFVAIIS	LMGWGLGYFGQPHIL	ARFMAADSHYSIVHA						270
4 R.	LAVSWTDTVQASLMI	FALILTPVMVIVGVG		GFSESLEVIKQKSIE	NVDMLKGLNFVAIIS	LMGWGLGYFGQPHIL	ARFMAADSHHSIVHA						270
5 E.	LAVSWTDTVQASLMI	FALILTPVIVIVISVG		GFGDSLEVIKQKSIE	NVDMLKGLNFVAIIS	LMGWGLGYFGQPHIL	ARFMAADSHHSIVHA						270
	271	285	286	300	301	315	316	330	331	345	346	360	
1 P.	RRISMTWMILCLAGT	CAVGFCGIAYFSAHP		ELAGPVSENHKRVI	ELAKILFNPVWVAGVL	LSAILAAVMITLSCQ	LLVCSSALTENFYKA						358
2 F.	RRISMTWMILCLGGT	VAVGFFGIAYFSAHP		EVAGPVTENPERVFI	ELAKILFNPVWVAGVL	LSAILAAVMSTLSCQ	LLVCSSALTEDFYKA						360
3 S.	RRISMTWMILCLAGA	VAVGFFGIAYFNNNP		ALAGAVNQNSERVFI	ELAQILFNPWIAGIL	LSAILAAVMSTLSCQ	LLVCSSAITEDLYKA						360
4 R.	RRISMTWMILCLAGA	VAVGFFGIAYFNNNP		ALAGAVNQNSERVFI	ELAQILFNPWIAGVL	LSAILAAVMSTLSCQ	LLVCSSAITEDLYKA						360
5 E.	RRISMTWMILCLAGA	VAVGFFGIAYFNEHP		AVAGAVNQNAERVFI	ELAQILFNPWIAGIL	LSAILAAVMSTLSCQ	LLVCSSAITEDLYKA						360
	361	375	376	390	391	405	406	420	421	435	436	450	
1 P.	FLRKNASQVELVWVG	RLMVLVALIAIAMA		ANPENRVLGLVAYAW	AGFGAAFGPVVLLISV	LWKGMRNGALAGIV	VGALTIVLWKNFDTL						448
2 F.	FLRKGASQRELWVVG	RLMVLVVALIAIAMA		ANPENRVLGLVSYAW	AGFGAAFGPVVLLISV	IWKHMTRNGALAGIL	VGAITVIVWKHFELL						450
3 S.	FLRKSASQVELVWVG	RVMVLVVALIAIALA		ANPDNRVLGLVSYAW	AGFGAAFGPVVLFVSV	MWSRMTRNGALAGMI	IGAVTVIVWKQYQWGL						450
4 R.	FLRKSASQVELVWVG	RVMVLVVALIAIALA		ANPDNRVLGLVSYAW	AGFGAAFGPVVLFVSV	MWSRMTRNGALAGMI	IGAVTVIVWKQYQWGL						450
5 E.	FLRKHASQKELVWVG	RVMVLVVALVAIALA		ANPENRVLGLVSYAW	AGFGAAFGPVVLFVSV	MWSRMTRNGALAGMI	IGALTIVIVWKQFGWGL						450
	451	465	466	480	481	495	496						
1 P.	GLYEIIPGFLFASIA	IVLVSKLGSPTSQTMV		K-RFEAADAAYHADK	Z	493							
2 F.	GLYEIIPGFIFASLA	IYFVSKMGAPTLGMV		E-RFDAAEKDYNLTK	Z	495							
3 S.	DLYEIPGFIFGSMG	IVVFSLLGKAPTAAI		QERFAKADA-----		488							
4 R.	DLYEIPGFIFGSLG	IVVFSLLGKAPTATM		QERFAKADA-----		488							
5 E.	GLYEIIPGFIFGSIG	IVVFSLLGKAPSAAM		QKRFAEADA-----		488							

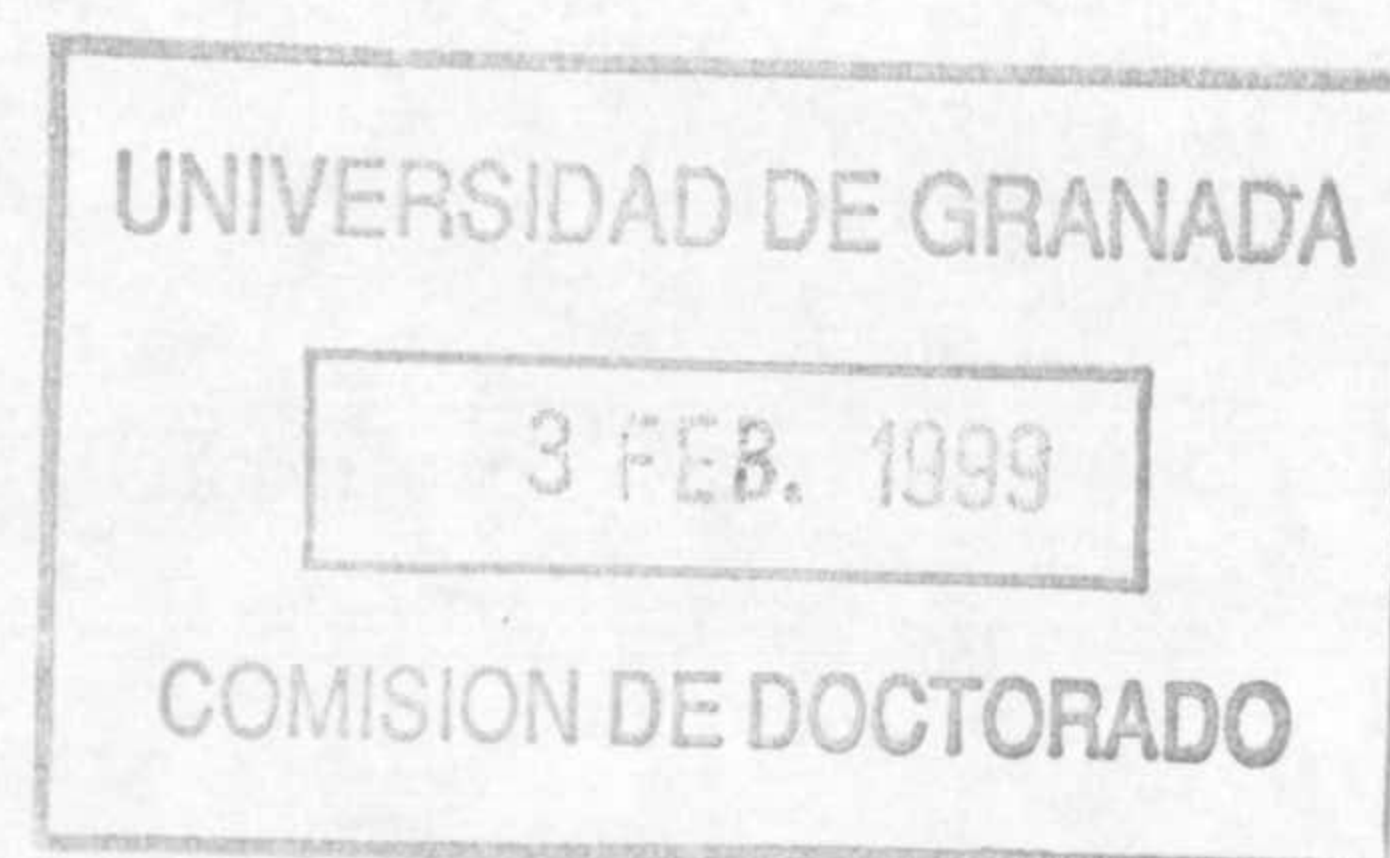
Figura 6.IV. Comparación de la secuencia proteica PutP con las existentes en la base de datos GenBank para este gen de otros microorganismos. Una vez traducida la secuencia de ADN del gen *putP* de *P. putida* KT2442 (P), se comparó con las secuencias proteicas de otros microorganismos (*P. fluorescens* [F], *S. typhimurium* [S], *Rickettsia typhi* [R] y *E. coli* [E]) mediante el programa "ClustalW Multiple Sequence Analysis". En rojo se muestran las posiciones conservadas para estos microorganismos, en verde las que presentan una alta tasa de conservación y en negro aquellas posiciones de *P. putida* que diferían del resto. Además, se muestran las posibles regiones transmembrana (regiones sombreadas). Las regiones transmembrana con orientación interior-exterior se muestran en azul, las regiones con orientación exterior-interior se muestran con un sombreado violeta. La identificación de las zonas transmembrana se realizó mediante el programa de caracterización de secuencias aminoacídicas SCANPROSITE.

Péptido señal

↓

MGNPLTITFV	IYIAAMVLIG	FAAYRATNNL	SDYILGGRSL	GSVVTALSAG	50
oooHHHHHHH	HHHHHHHHHH	HHHHiiiiii	iiiiiiiiiii	iiiiiiiHHH	
ASDMSGWLLM	GLPGAIYFAG	LSEAWIAIGL	TVGAYLNWLF	VAGRRLRVQTE	100
iiiiiiiiiii	iiiiiiiiiii	iiiHHHHHHH	HHHHHHHHHH	HHooooo	
HNGDALTLPD	YFSSRFEDNS	GLLRIISAIV	ILVFFTIYCA	SGIVAGARLF	150
ooooooooo	ooooooooo	oHHHHHHHH	HHHHHHHHH	iiiiiiiiii	
ESTFGMSYET	ALWAGAAATI	AYTFVGGFLA	VSWTDTVQAS	LMIFALILTP	200
iiiiiiiiiii	HHHHHHHHH	HHHHHHHHH	HHHoooHHH	HHHHHHHHH	
VIVLISTGGF	DQTFAAIEAV	NRRNFDMLKG	ATFIGIISLM	GWGLGYFRPP	250
HHHHiiiiii	iiiiiiiiiii	iiiiiiiiiii	HHHHHHHHH	HHHHHHHoo	
HILAREMAAD	SVNSIAKARR	ISMTMILCLA	GTCAVGFCGI	AYFSAHPELA	300
ooooooooo	ooooooooo	ooooHHHHH	HHHHHHHHH	HHiiiiiii	
GPVSENHKRV	FIELAKILFN	PWVAGVLLSA	ILAAVMITLS	CQLLVCSSAL	350
iiiiiiiiiii	iiiiiiiiiii	iiHHHHHHH	HHHHHHHHH	ooooooooo	
TENFYKAFLR	KNASQVELVW	VGRLMVLAVA	LIAIAMAANP	ENRVLGLVAY	400
ooooooooo	ooooooHH	HHHHHHHHH	HHHHHHHHH	iiiHHHHH	
AWAGFGAAG	PVVLISVLWK	GMTRNGALAG	IVVGALTVIL	WKNFDTLGLY	450
HHHHHHHHH	HHHHHHHoo	oooooHHHH	HHHHHHHHH	HHiiiiiii	
EIIPGFLFAS	IAIVLVSKLG	SPSQTMVKRF	EAADAAYHAD	KZ 492	
iiHHHHHHH	HHHHHHHHH	Hiiiiiii	iiiiiiiiii	I	

Figura 7.IV. Perfil de hidrofobicidad, posición de las hélices transmembrana y localización del péptido señal en la secuencia aminoacídica de PutP. En esta figura se muestra la posición más probable por análisis de predicción de hidrofobicidad HMMTOP de las hélices transmembrana de la proteína PutP. Según este programa a cada aminoácido se le designa una posición con respecto a la membrana celular: inmerso en ella, esto es formando parte de las hélices transmembrana (H); en el espacio exterior a la membrana (o); y en contacto con el citoplasma (i). A las posiciones no determinadas se le asignó la nomenclatura I. Además se determinó la secuencia aminoacídica que constituía el péptido señal.



2.2. Secuenciación del inserto del plásmido pLCR4.

Como se ha mencionado anteriormente, el inserto del plásmido pCLR4 tiene un tamaño de 2 kb. La secuencia de ADN obtenida a partir de este fragmento (**Figura 5.IV**) se comparó con las existentes en la base de datos GenBank. Ésta presentó una tasa de homología de entre el 60 y el 75% con los genes *putA* de otros microorganismos (*E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Rhizobium meliloti* y *Rhodobacter capsulatus*).

Al traducirse esta secuencia de ADN en las 6 fases de lectura posibles se concluyó que el fragmento secuenciado contenía los codones correspondientes a 676 aminoácidos del ORF (del inglés, *Open Reading Frame*) del gen *putA* de *P. putida*. El primer aminoácido de la secuencia aminoacídica no se correspondía a una metionina, sugiriendo que el extremo 5' del gen no había sido clonado en pLCR4. Tampoco se encontró en el fragmento secuenciado un codón de terminación de la transcripción, sugiriendo que el extremo 3' del gen *putA* tampoco se encontraba dentro del fragmento de ADN clonado en pLCR4. El conjunto de estos resultados sugirieron que este fragmento contiene una región interna del gen *putA* de *P. putida* KT2442. Los ORFs correspondientes a los genes *putA* conocidos son de aproximadamente 4kb, y su traducción da lugar a péptidos que poseen alrededor de 1300 aminoácidos.

2.3. Secuenciación del resto de la secuencia del gen *putA* de *P. putida* KT2440.

Para establecer la secuencia completa del gen *putA* de *P. putida* KT2442 se necesitaba clonar la región de ADN codificadora del extremo carboxiterminal de esta proteína y que debía localizarse en 3' con respecto al sitio *Pst*I(a) del plásmido pCRR831 (**Figura 3.IV**). En primer lugar, este plásmido se digirió con *Hind*III y los fragmentos resultantes se hibridaron de con la región del gen *putA* contenida en pLCR4. Un fragmento *Hind*III de aproximadamente 15 kb hibridó con la sonda mencionada. A continuación, este fragmento se subclonó en el vector pUC19, para su posterior secuenciación. El plásmido resultante se denominó pSL4 (**Figura 8.IV**).

La secuenciación del resto del gen *putA* se realizó utilizando cebadores que permitían la lectura en 3'. Esta parte se realizó en colaboración con Susana Vílchez.

La unión de los tres segmentos de PutA de *P. putida* KT2442 reveló que esta proteína consta de 1348 aminoácidos, como el caso de las proteínas PutA de otros microorganismos. Esta secuencia proteica se alineó con la correspondiente a la proteína PutA de los microorganismos *E. coli*, *S. typhimurium*, *R. meliloti* y *R. capsulatus* mediante la utilización del programa "ClustalW Multiple Sequence Alignment" (K.C. Worley, "Human Genome Center", Baylor College of Medicine, kworley@bcm.tmc.edu). En este caso la homología no fue uniforme, siendo significativa en determinadas zonas que parecen coincidir con los dominios de función enzimática de la proteína PutA (prolina deshidrogenasa y Δ' pirrolina-5'carbamato

deshidrogenasa), además aparecían zonas interdominio que parecen estar menos conservadas en las secuencias comparadas (**Figura 9.IV**).

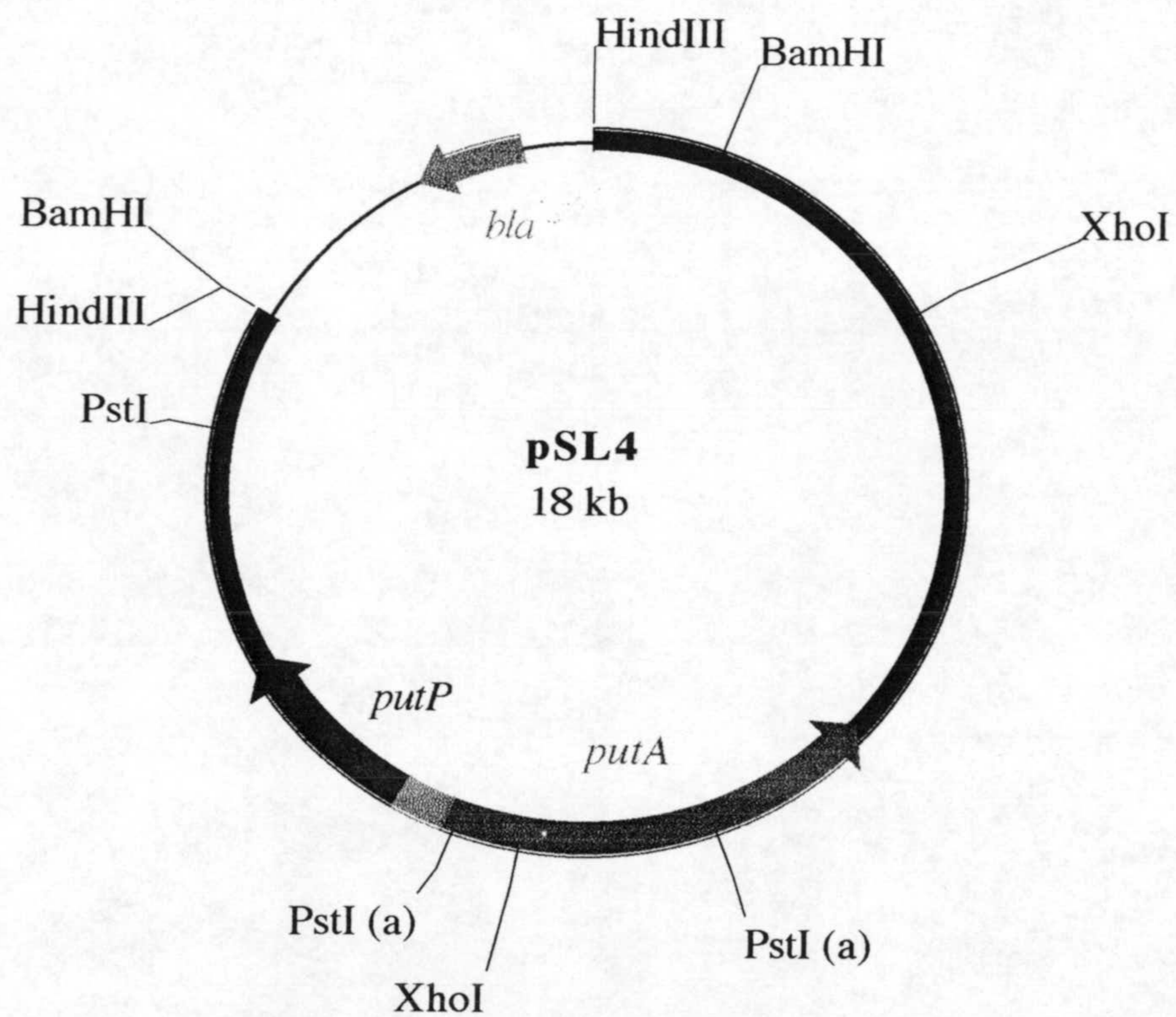


Figura 8.IV. Esquema del plásmido pSL4. Se muestran los sitios de restricción *HindIII*, *BamHI*, *XhoI* y algunos de los sitios de restricción *PstI*. *PstI(a)* indica los sitios de restricción para este enzima que limitan la región de ADN utilizada como sonda para la indentificación del fragmento de ADN insertado en este plásmido. Además, se muestra la localización del gen *bla*, que codifica resistencia para ampicilina, el gen *putA*, el gen *putP* y la región intergénica entre ambos genes *put*.

	1	15	16	30	31	45	46	60	61	75	76	90	
1 P.	MATTTLVKLDLDPTR	ERLKAAAQSIDRTPH	WLIKQAIIFYNLEKLE	GGATLTELNGHASNP	ADDAG--EVQADHSH	QCFLEFAESILPQSV							88
2 K.	MGTTTGMVKLDDATR	ERIKSAASRIDRTPH	WLIKQAIIFYNLEKLE	NDETLPALPALLSGA	ANESDDASEPTEEPY	QPFLEFAEQILPQSV							90
3 S.	MGTTTGMVKLDDATR	ERIKMAASRIDRTPH	WLIKQAIIFYNLEKLE	NSDTLPALPALFVGA	ANESEEPVAPQDEPH	QPFLEFAEQILPQSV							90
4 E.	MGTTTGMVKLDDATP	RTDQMAASRIDRPPH	WLIKQAIIFYNLEKLE	NSDTLPALPALFVGA	ANESEEPVAPQNGA	ASALSGVCRTNSSPI							89
	91	105	106	120	121	135	136	150	151	165	166	180	
1 P.	LRSAITAAYRRPEQE	VVPMLEQARLSAPL	ADATNKLAAASIAEKL	RNQKSVGGRAGIVQG	LLQEFSLSSQE-RRG	VCLAEALLRIPDKGT							177
2 K.	RRAAITAAWRRPETD	AVPMLLEQARLPQPL	GEQAHKLAYQLAEKL	RNQKTASGRAGMVQS	LLQEFSLSSQEGVAL	MCLAEALLRIPDKAT							180
3 S.	SRAAITAAWRRPETD	AVSMLMEQARLSPPV	AEQAHKLAYQLAEKL	RNQKSASGRAGMVQG	LLQEFSLSSQEGVAL	MCLAEALLRIPDKAT							180
4 E.	RLSAAISAWRRPETD	AVSMLMEQARLPPP	AEQAHKLAYQLAEKL	RNQKSASGRAGMVQG	LLQEFSLSSQEGVAL	MSGSSAAAYSRSQSYA							179
	181	195	196	210	211	225	226	240	241	255	256	270	
1 P.	RDALIRDKISTGNWQ	PHLGNSPSPFLVNAAT	WGLLLTGKLVSTHNE	TGLTSSLTRIIGKSG	EPMIRKGVDMAMRLM	GEQFVTGETIAEALA							267
2 K.	RDALIRDKISNGNWQ	SHIGRSPSPFLVNAAT	WGLLFTGKLVSTHNE	TSLRSRLNRIIGKSG	EPLIRKGVDMAMRLM	GEQFVTGETIAEALA							270
3 S.	RDALIRDKISNGNWQ	SHIGRSPSPFLVNAAT	WGLLFTGRLVSTHNE	ANLSRSLNRIIGKSG	EPLIRKGVDMAMRLM	GEQFVTGETIAEALA							270
4 E.	RCVNSRQNQ-YWNWQ	SHIGRSPSPFLVTAAT	WGLLFTGRLVSTHNE	ANLSRSLNRIIGKSG	EPLIRKGVDMAMRLM	GEQFVTGETIAEALA							268
	271	285	286	300	301	315	316	330	331	345	346	360	
1 P.	NASRFEAKGFRYSYD	MLGEAALTEHDAQKY	LASYEQAIHSIGKAS	HGRGIYEGPGISIKL	SALHPRYSRAQYERV	MEELYPRLLSLTLLA							357
2 K.	NARKLEEKGFRYSYD	MLGEAALTAADAQAY	MVSYQQAIHAIGKAS	NGRGIYEGPGISIKL	SALHPRYSRAQYDRV	MEELYPRLKSLLTLLA							360
3 S.	NARKLEEKGFRYSYD	MLGEAALTAADAQAY	MVSYQQAIHAIGKAS	NGRGIYEGPGISIKL	SALHPRYSRAQYDRV	MEELYPRLKSLLTLLA							360
4 E.	NARKLEEKGFRYSYD	MLGERALTAADAQAY	MVSYQQAIHAIGKAS	NGRGIYEGPASRLSC	PPCIHAIAAIRS-G	MEELYPRLKSLLTLLA							357
	361	375	376	390	391	405	406	420	421	435	436	450	
1 P.	KQYDIGLNIDAEAD	RLEISLDLLER-LCF	EPFLAGWNGIGFVIQ	AYQKRCPYLINYFFD	LAKRTPHRLIIRLLK	GAYWDSEIKRAQVEG							446
2 K.	RQYDIGINIDAEAD	RLEISLDLLEK-LCF	EPFLAGWNGIGFVIQ	AYQKRCPFVIDYLID	LATRSRRRLMIRLVK	GAYWDSEIKRAQMEG							449
3 S.	RQYDIGLNIDAEAD	RLEISLDLLEK-LCF	EPFLAGWNGIGFVIQ	AYQKRCPLVIDYLD	LASRSRRRLMIRLVK	GAYWDSEIKRAQMEG							449
4 E.	RQSTLGLNIDVRKRR	IVWRSRSICWKNSAS	NPNWRAGTGIGFVIQ	AYQKRCPLVIVYLD	LASRSRRPVMIRLVK	GAYWDSEINARKWKG							447
	451	465	466	480	481	495	496	510	511	525	526	540	
1 P.	LEGYPVYTRKVTYTDV	SYVACARKLLAVPEA	IYPQFATHNAHTLSA	IYHIAGQNYYPGQYE	FQCLHGMGEPLYEQV	VGKIADGKLNRPCRV							536
2 K.	LEGYPVYTRKVTYTDV	SYLACAKKLLAVPNL	IYPQFATHNAHTLAA	IYQLAGQNYYPGQYE	FQCLHGMGEPLYEQV	VGKVADGKLNRPCRI							539
3 S.	LEGYPVYTRKVTYTDV	SYLACAKKLLAVPNL	IYPQFATHNAHTLAA	IYHLAGQNYYPGQYE	FQCLHGMGEPLYEQV	TGKVADGKLNRPCRI							539
4 E.	WRLSGLYPQSVYR-C	LLSGLREKTARRPNL	IYPQFASHNAHTLAA	IYHLAGQNYYPGQYE	FQCLHGMGEPLYEQV	TGKVADGKLNRPCRI							536
	541	555	556	570	571	585	586	600	601	615	616	630	
1 P.	YAPVGTHTLLAYLV	RRLLENGANTS FVNR	IADHSISIQELVADR	WPASIAWVPRKGSIG	LPHPRIPLPRDLYGT	ERAKLAGIEMANEHR							626
2 K.	YAPVGTHTLLAYLV	RRLLENGANTS FVNR	IADNTLPLDELVADP	VSAVEKLAQQEGQAG	LPHPKIPLPRDLYGS	GRNSAGLDLANEHR							629
3 S.	YAPVGTHTLLAYLV	RRLLENGANTS FVNR	IADATLPLDELVADP	VEAVEKLAQQEGQAG	IPHPKIPLPRDLYGE	GRINSAGLDLANEHR							629
4 E.	YAPVGTHTLLAYLV	RRLLENGANTS FVNR	IADATLPLDELVADP	VEAVEKLAQQEGQAG	IPHPKL-LPRDLYGE	GRINSAGLDLAYERH							625
	631	645	646	660	661	675	676	690	691	705	706	720	
1 P.	LGLLSCAMVATAHKQ	WEAAPLLACAARESA	AAPVLNPAHRNVVG	HVQEATVAKFDNAIH	CALNPAPIWQATPPA	ERAAILERTADLMEA							716
2 K.	LASLSSLLNSALHK	WQALPMLEQPVAEGE	MQPVVNPAEPKDIVG	YVREASDAEVQQALT	SAINNAPIWFATPPQ	ERAAILERAVALMES							719
3 S.	LASLSSALLSNAMQK	WQAKPVLEQPVADGE	MTPVINPAEPKDIVG	WGREATESEVEQALQ	NAVNQAPVWFATPPQ	ERAAILQRAAVLMED							719
4 E.	LASLSSALLSNAMQK	WQAKPVLEQPVADGE	MTPVINPAEPKDIVG	WGPKRQKARLNRHCK	TRSIRRRFGLRRR-R	KNAAILQRAVFNKGT							714
	721	735	736	750	751	765	766	780	781	795	796	810	
1 P.	EIHPLMGLLIREAGK	TFPNAIAELREAVDF	LRYAVQALNDFSND	AHRPLGPVVCISPWN	FPLAIFTGQVAAALA	AGNPVLAKPAEQTSL							806
2 K.	QMPTLMGILVREAGK	TFSNAIAEVREAVDF	LHYAGQVRDDFDNE	THRPLGPVVCISPWN	FPLAIFTGQIAAALA	AGNSVLAKPAEQTSL							809
3 S.	QMQLLIGLLVREAGK	TFSNAIAEVREAVDF	LHYAGQVRDDFDNE	THRPLGPVVCISPWN	FPLAIFTGQIAAALA	AGNSVLAKPAEQTSL							809
4 E.	KMQQVDLACWSVKRE	TFSNAIAEVREAVDF	LHYAGQVRDDFDNE	THRPLGPVVCISPWN	FPLAIFTGQNRALA	AGNSVLAKPAEQTSL							804

1	P.	811	825	826	840	841	855	856	870	871	885	886	900	
2	K.	IAAQVAILLEAGVP	EGVLQLLPGRGETVG	AGLVGDERVKGVMFT	GSTEVARLLQRNIVAG	RLDNOGRPIPLIAET	GGQNAMIVDSSALTE							896
3	S.	IAAQGIAILLEAGVP	PGVIQLLPGRGETVG	AALTSDEVRVGMFT	GSTEVATLLQRNIA	RLDPQGRPTPLIAET	GGMNAMIVDSSALTE							899
4	E.	IAAQGIAILLEART-	AGRRATVAGTGRNRR	RPAYRRCACTRVMT	GSTEVATLLQRNIA	RLDAQGRPIPLIAET	GGMNAMIVDSSALTE							899
		901	915	916	930	931	945	946	960	961	975	976	990	893
1	P.	QVLIDVVSSAFDSAG	QRCSALRVLCLOEDS	ADRVIEMLKGMAS	RLGCPDRLAVDIGPV	IDAEAKAGIEKHIQ	MREKGRPVYQVAIAD							996
2	K.	QVVIDVLASAFDSAG	QRCSALRVLCLOEEV	ADHTLTMLRGAMSEC	RMGNPGRLLTDIGPV	IDAEAKENIERHIO	MRAKGRTVYQAVREN							989
3	S.	QVVVDVLASAFDSAG	QRCSALRVLCLODDI	AEHTLKMLRGAMAE	RMGNPGRLLTDIGPV	IDSEAKANIERHIQ	MRAKGRPVFOAAREN							989
4	E.	QVVVDVLASAFESAG	QRCSALRVLCLODDI	AEHTLKMLRRPHGGV	SVGESGRLTTDIPV	IDSEAKANIERHIQ	MRAKGRPVSOAAREN							983
		991	1005	1006	1020	1021	1035	1036	1050	1051	1065	1066	1080	
1	P.	A--A EIKRGTVMFP	TLIELDSFDELKREI	FGPVLHVRYNRNL	DQIEQINNSGYGLT	LGVHTRIDETIAKVV	ETATPATCRHRNIVG							1093
2	K.	SEDAREWRHGTVMFP	TLIELDSFDELKKEV	FGPVLHVRYNRNEL	DKLVEQINASGYGLT	LGVHTRIDETIAQVT	GSAKVGNYLVNRNMV							1079
3	S.	SDDAQEWQGTVMFP	TLIELENFAELEKEV	FGPVLHVRYNRNQL	AELIEQINASGYGLT	LGVHTRIDETIAQVT	GSAHVGNYLVNRNMV							1079
4	E.	SDDAQEWQGTVMFP	TLIELENFAELEKEV	FGPVLHVRYNRNQL	AELIEQINASGYGVT	LGVHTRIDETIAQVT	GSPMSATCTLTVIWR							1073
		1081	1095	1096	1110	1111	1125	1126	1140	1141	1155	1156	1170	
1	P.	A VVGVPFGEGLS	GTGPKAGGPLYLYRL	LSTRPADAIGRHFQQ	QDGEPTDRTLHEQL	VKPLHGLKAWAENQ	LADLAALCSQFASQ-							1183
2	K.	GAVVGVPFGEGLS	GTGPKAGGPLYLYRL	LSSRPQDAVGVTFR	QDAERPLDAQKTL	EKPLQALQQAAGRP	ELQALCQQ---YSEQ							1166
3	S.	GAVVGVPFGEGLS	GTGPKAGGPLYLYRL	LAHRPPNALNTTLTR	QDARYPVDAQKTL	LAPLTALTQWAADRP	ALQTLCRQ---FADL							1166
4	E.	ARSSASKPFKACAP	APGQKREDPLYLYRL	LAHRPPNALNTTLTR	QDARYPVDAQKTL	LAPLTALTQWARIAR	RYRRSADNSPIWPRP							1163
		1171	1185	1186	1200	1201	1215	1216	1230	1231	1245	1246	1260	
1	P.	SQSGIARLLPGPTGE	RNSYTIIPREHVLC	ADNETDLAQFAAVL	AVGSSAVVWDGEPGK	ALRARLPRELQAKVK	LVADWNKDEVAFDAV							1283
2	K.	AQSGTQRLPGPTGE	RNTLTLMRPRVLCV	ADNEQDALIQLAAVL	AVGCEVLWPDSALQR	DLAKKLPREVSEIR	FAKAEQLPVQAFDAV							1256
3	S.	AQAGTQRLPGPTGE	RNTWTLLPRVLCV	ADDEQDALQLAAVL	AVGSQALWSDDAFHR	DLAKRLPAVAARVQ	FAKAETLMAQPFDAV							1256
4	E.	ARSACYRGRPASAI	GRCCRVNGYYAWLMM	NRTRSQCARRSRRRV	RPMVRRRLPPRSGET	SPRRRP-----RVQ	FAKRK-RCCARFADAV							1246
		1261	1275	1276	1290	1291	1305	1306	1320	1321				
1	P.	IHHGSDQLRGVCQQ	VAKRAGAIVGVHGLS	S-GDHQIALERLVIER	AVSVNTAAAGGNASL	MTIGZ	1316							
2	K.	IYHGSDQLRELCEQ	VAARDGAIVSVQGFA	-RGETNLLERLYIER	SLSVNTAAAGA----	----	1312							
3	S.	IFHGSDKLRTVCEA	VAAREGAIVSVQGFA	-RGESNILLERLYIER	SLSVNTAAAGGNASL	MTIG	1320							
4	E.	IFHGQSEQAANRVEA	VAAREGAIVSVQGFA	-RGESNILLERLYIER	SLSVNTAAAGGNASL	MTIG	1310							

Figura 9.IV. Comparación de la secuencia aminoacídica de la proteína PutA de *P. putida* KT2442 con las secuencias aminoacídicas para esta proteína presentes en la base de datos GenBank. Se comparó la secuencia proteica PutA caracterizada en este estudio con las de otros microorganismos: *K. aerogenes* (K), *S. typhimurium* (S) y *E. coli* (E). Los aminoácidos marcados con color rojo representan las posiciones conservadas en la secuencia de PutA correspondiente a estos microorganismos. Los marcados con color verde representan las posiciones de alto porcentaje de conservación. La zona de la secuencia aminoacídica sombreada con el color azul coincide con una un dominio de la proteína PutA de función desconocida, la sombreada con el color amarillo coincide con el dominio proteico con función prolina oxidasa y la región sombreada con el color verde con un fragmento del dominio proteico con función pirrolina-5' carbamato deshidrogenasa. Estos dominios fueron caracterizados anteriormente en las proteínas PutA de microorganismos tales como *E. coli* y *S. typhimurium*

3. ANÁLISIS DE LA REGIÓN INTERGÉNICA ENTRE *putA* y *putP* Y DE LA EXPRESIÓN DE ESTOS GENES UTILIZANDO FUSIONES TRANSCRIPCIONALES.

Los genes *putA* y *putP* se transcriben divergentemente (**Figura 10.IV**), de manera que la región intergénica debe ser la zona en la que se localicen los promotores correspondientes a ambos genes. Como se deduce de la comparación de las secuencias mostradas anteriormente, esta zona se localiza dentro del inserto del plásmido pLCR12 (**Figura 4.IV**), entre las bases 450-809.

La naturaleza de los promotores y los puntos de iniciación han sido establecidos por S. Vílchez en nuestro grupo de investigación. Ambos genes presentan promotores que son reconocidos por la ARN-polimerasa con el factor sigma-70. Las regiones -10/-35 de cada promotor se muestran en la **Figura 10.IV**.

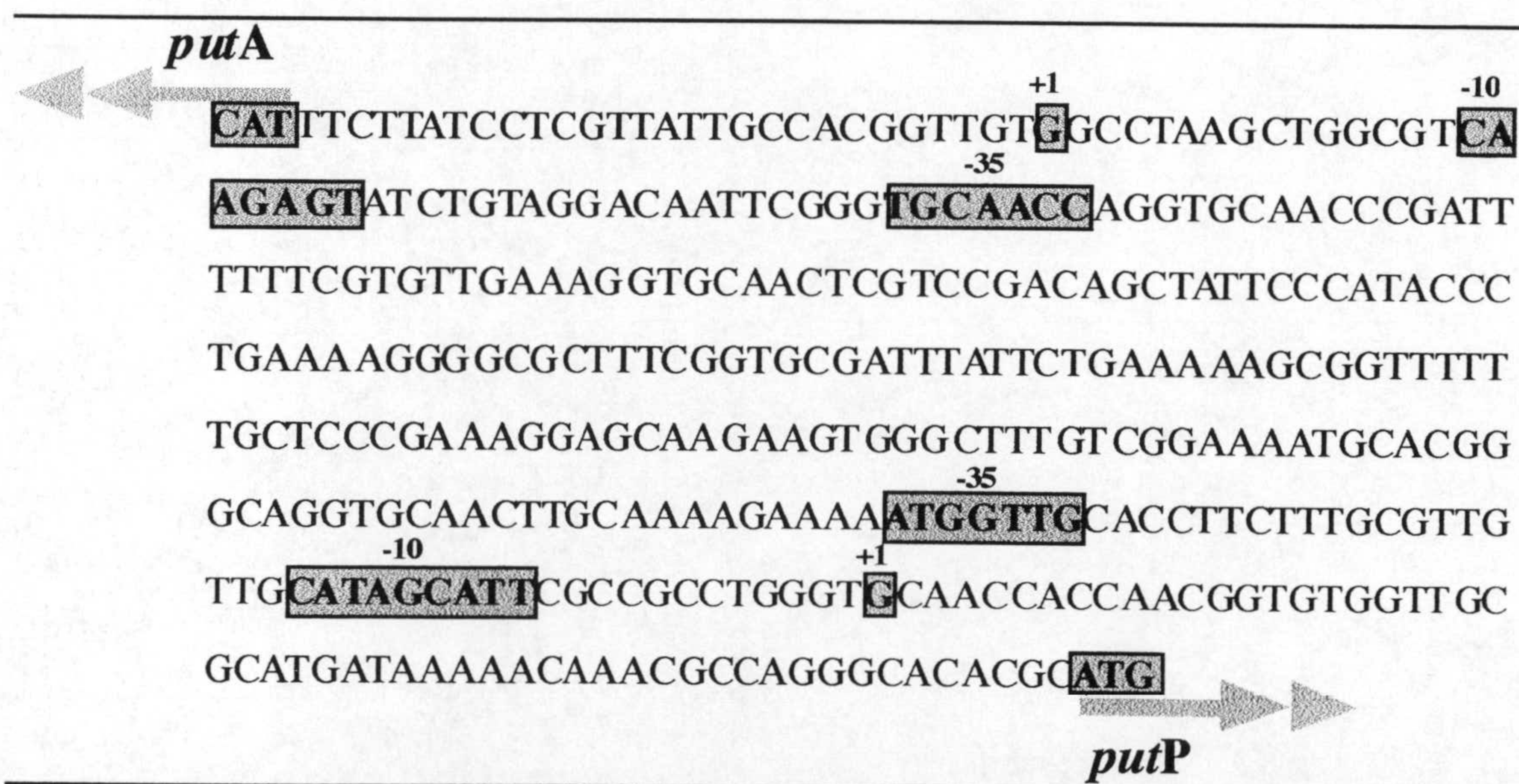


Figura 10.IV. Esquema de la región reguladora del operón del catabolismo de la prolina de *P. putida* KT2442. Se muestra la secuencia de la región intergénica situada entre los genes *putA* y *putP* de este microorganismo, así como las posibles regiones -10 y -35, los sitios de inicio de la transcripción (+1), y los ATG iniciales de los genes *putA* y *putP* (Vílchez *et al*, en preparación).

3.1. Estudios preliminares de la expresión del gen *putP*.

Para el estudio de la expresión del gen *putP* de *P. putida* se procedió a la fusión de la región intergénica descrita con los genes '*luxAB*' de *Vibrio harveyi* contenidos en un miniTn5-*luxAB*-Km del plásmido pCK220.

En primer lugar se diseñaron cebadores (PUTC1 y PUTC2, **Tabla 3** de *Materiales y Métodos*) que permitieron la amplificación mediante PCR de la zona reguladora flanqueada por los sitios de restricción *SphI* y *HindIII*. De esta forma se

facilitaba su clonación en pUC19 y la posterior fusión a los genes *luxAB*. El amplificado, de unas 350 pb, se digirió con los enzimas de restricción mencionados y se clonó en el vector pUC19 digerido con *SphI-HindIII* obteniéndose el plásmido pUTC2 (**Figura 11.IV**).

Posteriormente, se procedió a la clonación en pUTC2 de un fragmento *SphI-BamHI* de 3,3Kb, procedente del plásmido pCK220 (**Tabla 2** de *Materiales y Métodos*), que contenía los genes *luxAB* y una porción del gen *luxE*. Esta construcción permite el estudio de la expresión *putP* mediante la medida de la emisión de bioluminiscencia debido a que los genes necesarios para esta actividad fueron fusionados transcripcionalmente aguas abajo de la región promotora de dicho gen.

La cepa obtenida, *E. coli* DH5 α (pUTCLUX), se cultivó en medio mínimo M9 (con amonio como fuente de nitrógeno) con glucosa o prolina como fuente de carbono. Además, esta cepa se cultivó en medio mínimo M8 (sin fuente de nitrógeno) con glucosa como única fuente de carbono y prolina como fuente de nitrógeno o prolina como fuente de carbono y nitrógeno. Se determinó la expresión del gen *putP* a partir de la región intergénica del operón del catabolismo de la prolina al inicio y al final de la fase exponencial de crecimiento. La actividad luciferasa se determinó en un luminómetro como se ha descrito en el apartado 15 de *Materiales y Métodos*. En la **Tabla 1.IV** se muestra la emisión de luz relativa/unidad de turbidez (D.O₆₆₀) para esta cepa. Se observó que a lo largo de la fase exponencial de crecimiento se produjo activación de la expresión del gen *putP* en aquellos medios donde la prolina constituía la fuente de carbono y/o nitrógeno. En estos casos, la actividad luciferasa fue al menos 20 veces mayor que en los medios donde la glucosa era la fuente de carbono. En los medios donde la prolina constituyó la fuente de carbono y nitrógeno (M8-prolina) la emisión de luz fue al menos dos veces mayor al inicio de la fase exponencial que en el medio donde la prolina se utilizaba como fuente de carbono (M9-prolina).

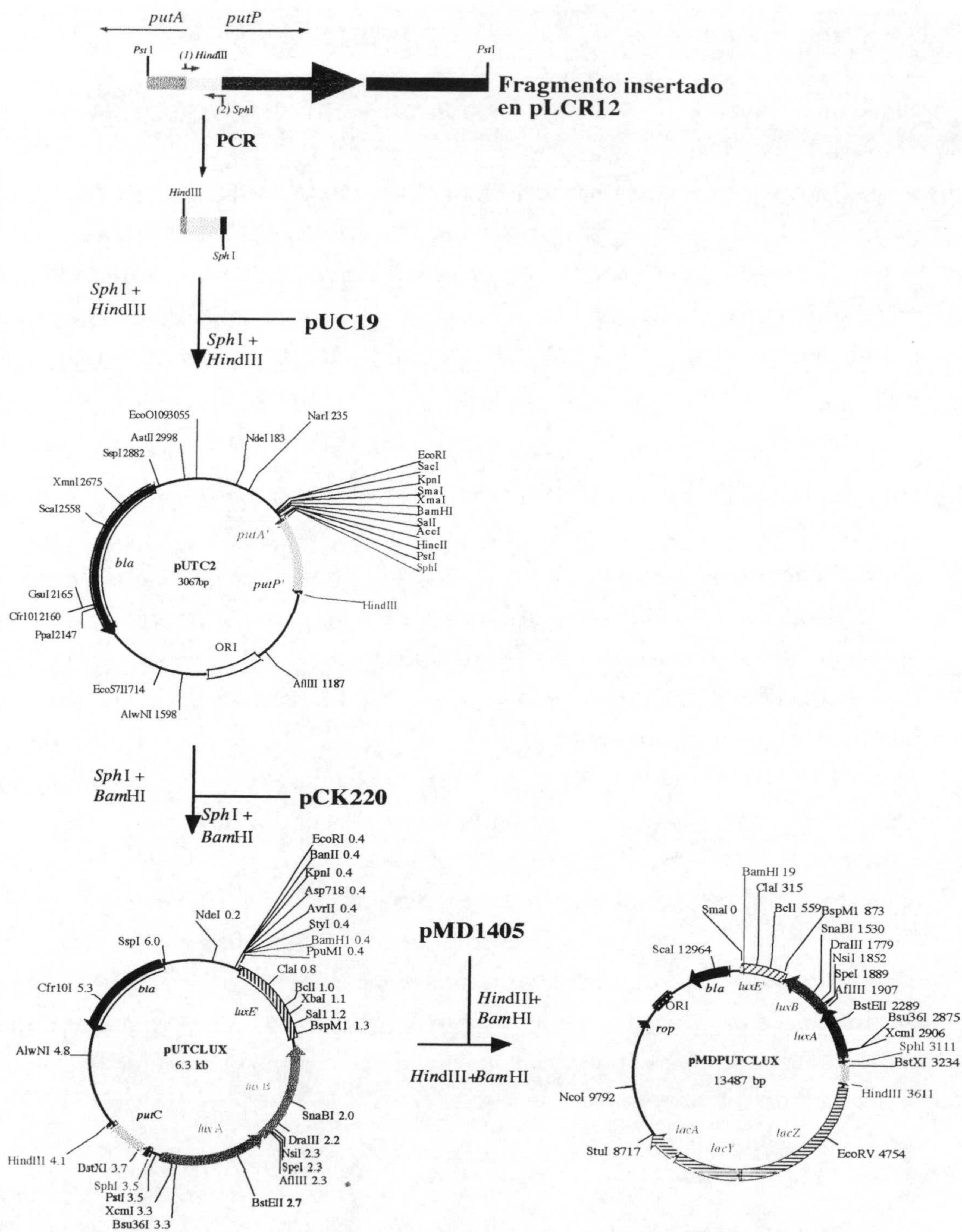


Figura 11.IV. Construcción de los plásmidos pUTCLUX y pMDPUTCLUX. La construcción de estos plásmidos se detalla en el texto. En la parte superior se muestra el fragmento del operón del catabolismo de la prolina insertado en el plásmido pLCR12, así como la dirección de la transcripción de los genes *putA* y *putP* y la posición de los cebadores PUTC1 (1) y PUTC2 (2). Además, se indican los genes que confieren resistencia a ampicilina (*bla*), la región intergénica del operón del catabolismo de la prolina (en amarillo) amplificada mediante PCR conjuntamente con fragmentos '*putA*' y '*putP*', los genes '*luxAB*' y el fragmento '*luxE*'. También aparecen descritos los sitios únicos de restricción.

Tabla 1.IV. Emisión de luz por la cepa *E. coli* DH5 α (pUTCLUX) en distintos medios.

Medio utilizado	t ^a = 2 horas		t ^a = 6 horas	
	DO ₆₆₀	Luminiscencia ^b	DO ₆₆₀	Luminiscencia ^b
M9-glucosa	0,39	130	1,490	83
M8-glucosa-prolina	0,29	133	0,682	44
M9-prolina	0,27	2596	0,480	1440
M8-prolina	0,15	6286	0,630	1821

^aTiempo transcurrido desde que la cepa DH5 α (pUTCLUX) se inoculó en los medios mencionados a una densidad óptica a 660 nm de 0,1.

^bLa actividad luciferasa se midió como la altura del pico de emisión de luz, en unidades de luz relativa, por unidad de turbidez (D.O₆₆₀).

3.2. Estudios preliminares de la expresión del gen *putA*

Para estudiar la expresión del gen *putA* se construyó una fusión transcripcional de la región promotora de este gen al gen *'lacZ'* de *E. coli* en el plásmido pMD1405 (apartado 3 de la sección *Materiales y Métodos*) como se describe a continuación. En primer lugar se subclonó un fragmento *HindIII-BamHI* de 3,6 kb del plásmido pUTCLUX, que contenía la región intergénica del operón del catabolismo de la prolina fusionada transcripcionalmente en *putP* a los genes *'luxAB'* y *'luxE'* de *Vibrio harveyi*, en el vector pMD1405 digerido con estos mismos enzimas de restricción. Este plásmido contiene el gen *'lacZ'* desprovisto de su promotor natural. La construcción resultante, el plásmido pMDPUTCLUX (**Figura 11.IV**), permite el estudio de la expresión *putA* mediante la medida de la actividad β -galactosidasa debido a que los genes necesarios para esta actividad fueron fusionados transcripcionalmente aguas abajo de la región promotora de dicho gen.

La cepa obtenida, *E. coli* DH5 α (pMDUTCLUX) se cultivó en medio mínimo M9 (con amonio como fuente de nitrógeno) con glucosa o prolina como fuente de carbono. También se inoculó en medio mínimo M8 (sin fuente de nitrógeno) con glucosa como única fuente de carbono y prolina como fuente de nitrógeno o prolina como fuente de carbono y nitrógeno. Se determinó la expresión del gen *putA* a partir de la región intergénica del operón del catabolismo de la prolina a lo largo de la fase exponencial de crecimiento. La actividad β -galactosidasa se determinó como se ha descrito en el apartado 17 de *Materiales y Métodos*. En la **Tabla 2.IV** se muestra la medida de esta actividad expresada en unidades de Miller para esta cepa. Se observó que se produjo activación de la expresión del gen *putA* en medio en donde la prolina constituía la fuente de carbono (M9-prolina) o la fuente de carbono y nitrógeno (M8-prolina). En este último medio la actividad β -galactosidasa detectada fue al menos 3,3 veces mayor al inicio de la fase exponencial y 4,8 veces al final de la misma que en medio M9-prolina. Esta actividad medida en medio donde la prolina era la fuente de

nitrógeno (M8-glucosa-prolina) fue al menos 13 veces mayor que en los medios donde la glucosa era la fuente de carbono y el amonio la fuente de nitrógeno (M9-glucosa).

Tabla 2.IV. Emisión de luz por la cepa *E. coli* DH5 α (pMDPUTCLUX) en distintos medios.

Medio utilizado	t ^a = 2 horas		t ^a = 6 horas	
	DO ₆₆₀	Actividad β -gal ^b	DO ₆₆₀	Actividad β -gal ^b
M9-glucosa	0,39	0	1,490	1
M8-glucosa-prolina	0,29	18	0,682	13
M9-prolina	0,27	60	0,480	62
M8-prolina	0,15	63	0,630	70

^aTiempo transcurrido desde que la cepa DH5 α (pMDPUTCLUX) se inoculó en los medios mencionados a una densidad óptica a 660 nm de 0,1.

^bLa actividad β -galactosidasa se expresa en unidades de Miller).

4. COMPLEMENTACIÓN DE CEPAS DE MUTANTES DE *S. typhimurium* Y *E. coli* INCAPACES DE UTILIZAR PROLINA CON LOS GENES *putA* Y/O *putP* DE *P. putida*.

El objeto de estos ensayos fue comprobar la expresión heteróloga de las actividades codificadas por el operón del catabolismo de la prolina contenidas en los fragmentos de ADN clonados en los plásmidos pSL4 (*putA* y *putP*) y pLCR12(*putP*).

Se realizaron pruebas de complementación en cepas de *S. typhimurium* y *E. coli* incapaces de utilizar prolina como única fuente de carbono y/o nitrógeno con los plásmidos portadores de los insertos del operón de la prolina de *P. putida* KT2442. Se utilizaron las siguientes cepas: *S. typhimurium* MTS1139 (PutA⁻, contiene una inserción de un Tn10::Tc en *putA*), *S. typhimurium* MTS916 (PutP⁻, una inserción de un Tn10::Tc en *putP*) y *E. coli* RM2 (PutA⁻ PutP⁻, contiene una delección del operón del catabolismo de la prolina). Las cepas mencionadas se transformaron con los plásmidos pLCR12 y pSL4. En todos los casos, la frecuencia de transformación obtenida fue de aproximadamente de 10⁴ transformantes/ μ g de ADN. Los transformantes obtenidos se inocularon en medio NCN (Ratzkin *et al.*, 1978) que contenía succinato 5 mM como fuente de carbono y prolina 20 mM o sulfato amónico (0,12 g/L) como fuente de nitrógeno.

El crecimiento mostrado por los transformantes y sus cepas parentales en estos medios fue el esperado: todas las cepas estudiadas crecieron en medio con amonio como fuente de nitrógeno hasta alcanzar una turbidez de aproximadamente 1 a 660 nm. Se observó el mismo comportamiento en medio donde el aminoácido prolina constituía la fuente de nitrógeno con la cepa parental *S. typhimurium* LT, los mutantes de *E. coli* y *S. typhimurium* PutA⁻, PutP⁻ y PutA⁻PutP⁻ portadores del plásmido pSL4 (*putA* y *putP*) y

las cepas mutantes *PutP* portadoras del plásmido pLCR12. En los demás casos no se observó crecimiento (**Tabla 3.IV**).

Estos resultados confirman la expresión en Enterobacterias de los genes *putA* y *putP* de *P. putida* KT2442 y la funcionalidad de sus productos génicos.

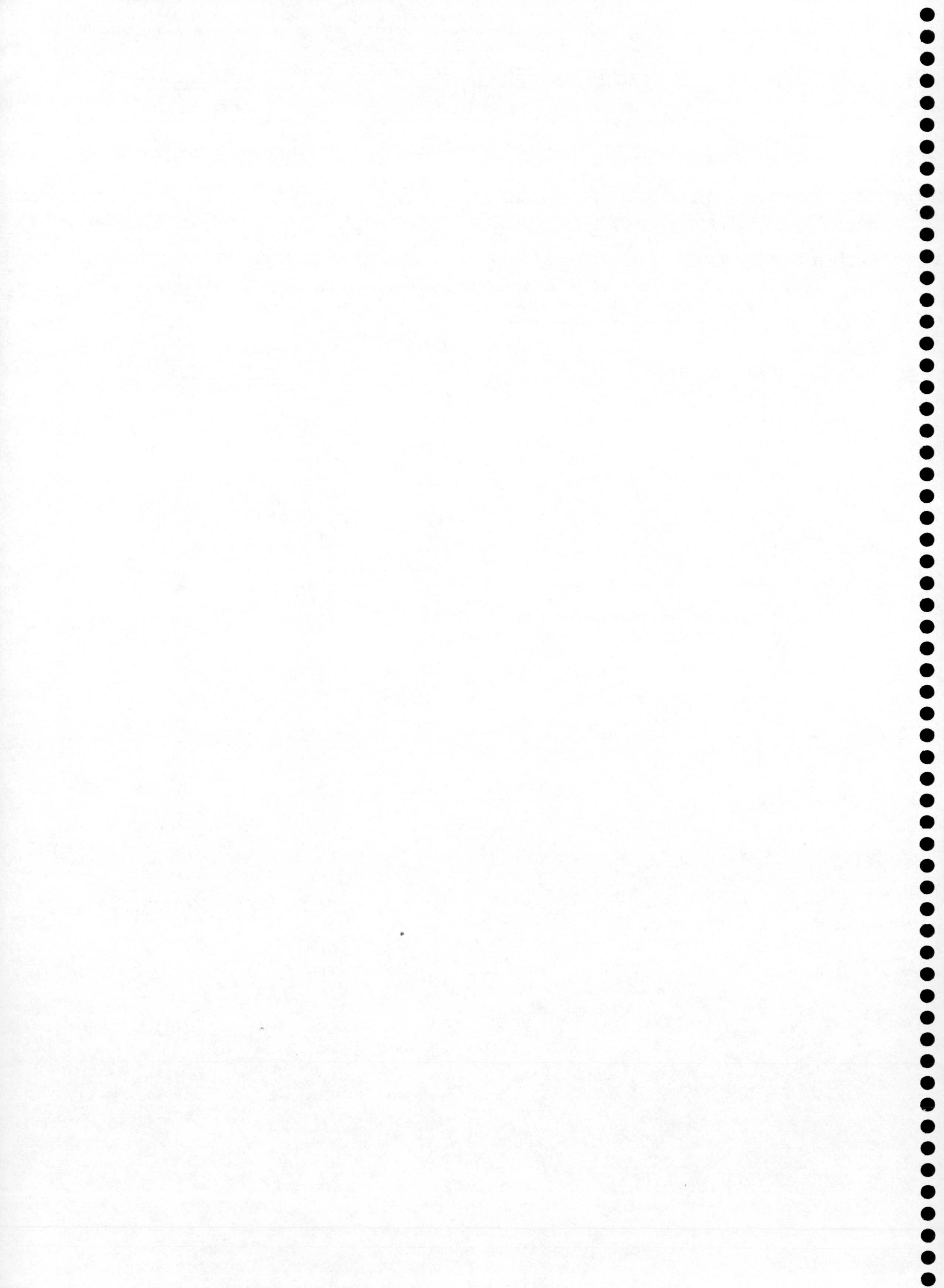
Tabla 3.IV. Crecimiento de las cepas transformantes obtenidas a partir de cepas incapaces en crecer en prolina como fuente de carbono y/o nitrógeno.

Cepas ^a	Crecimiento a 660 nm			
	NCN-Succinato+NH ₄ ⁺		NCN-Succinato+prolina	
	t=0	t=24 h	t=0	t=24 h
LT (cepa silvestre)	0,05	1,2	0,04	1,0
MTS1139 (<i>putA</i>)	0,04	1,3	0,05	0,09
MTS916 (<i>putP</i>)	0,06	1,2	0,05	0,07
RM2 (Δ <i>putA,P</i>)	0,04	1,5	0,03	0,08
MTS1139 (pSL4) ^b	0,07	1,1	0,06	1,1
MTS916 (pSL4) ^b	0,05	1,3	0,03	0,9
RM2 (pSL4) ^b	0,05	1,3	0,04	0,8
MTS1139 (pLCR12) ^c	0,04	1,2	0,05	0,06
MTS916 (pCRL12) ^c	0,05	1,0	0,04	0,5
RM2 (pCRL12) ^c	0,06	1,1	0,07	0,04

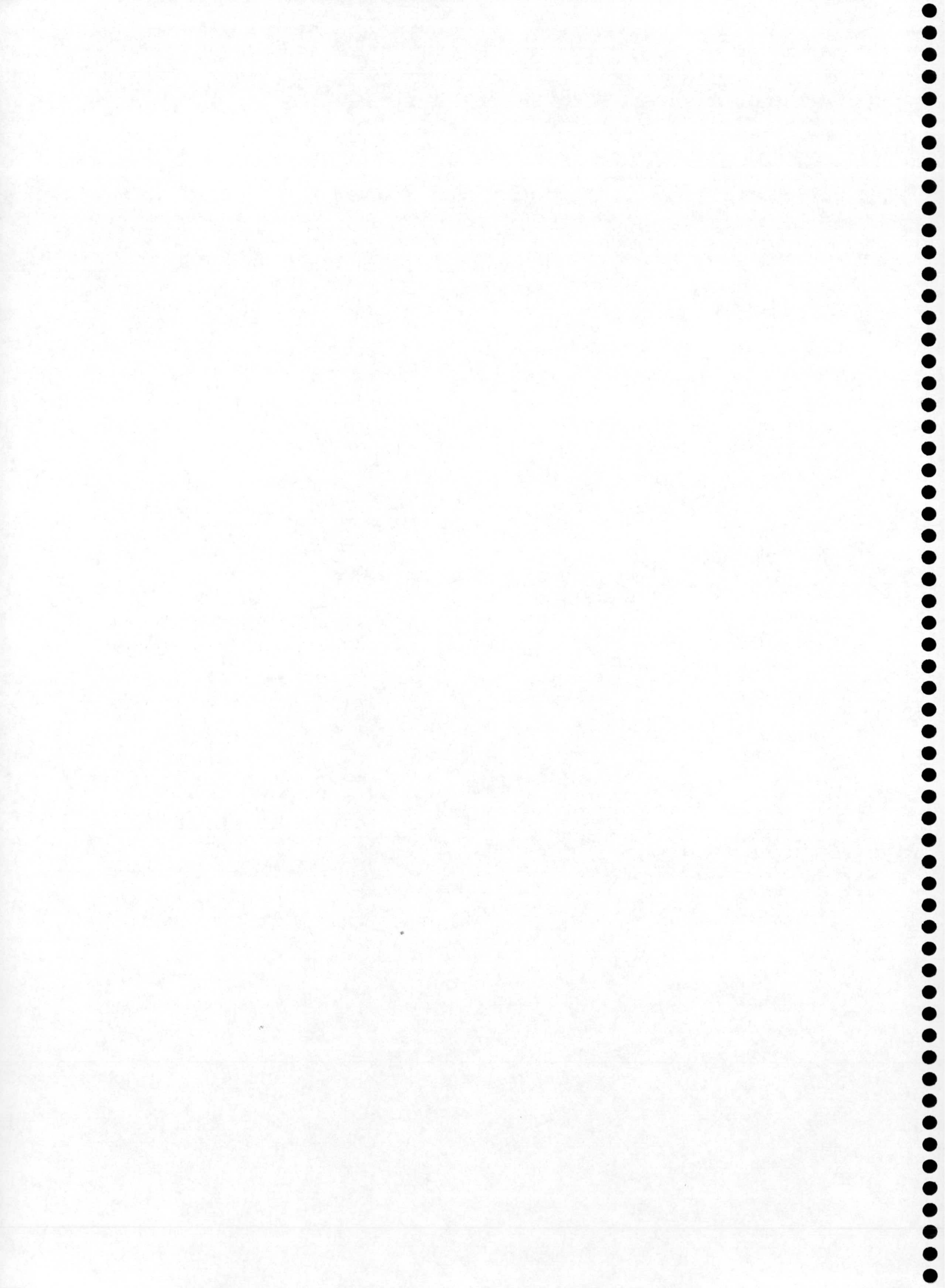
^aLas distintas cepas se cultivaron durante un periodo de 10-12 horas en LB con los antibióticos correspondientes. Estas células se recogieron por centrifugación y se lavaron dos veces en tampón fosfato. Finalmente se resuspendieron en el medio indicado para alcanzar una turbidez inicial de aproximadamente de 0,05 a 660 nm.

^bpSL4, contiene los genes *putA* y *putP* de *P. putida* KT2442.

^cpLCR4, contiene el gen *putP* de *P. putida* KT2442.



DISCUSIÓN



El desarrollo tecnológico de las actividades industriales y agrícolas ha provocado la acumulación de compuestos tóxicos en el medioambiente de difícil degradación. Frente a los métodos de decontaminación tradicionales, de carácter físico-químico, en los últimos tiempos se están desarrollando nuevas estrategias basadas en el empleo de microorganismos con capacidades metabólicas versátiles. En este sentido, las bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas*, cuyo hábitat natural es el suelo o la rizosfera de plantas, ha recibido especial interés.

La degradación biológica de contaminantes presenta una serie de ventajas frente a los métodos físicos-químicos: 1) no suele generar compuestos secundarios de carácter tóxico o recalcitrante; 2) bajo coste económico; 3) posibilidad de empleo en tratamientos localizados *in situ*, en el entorno contaminado, o de manera controlada fuera del emplazamiento original (*ex situ*) y; 4) la versatilidad tanto en la variedad como en la naturaleza y estructura química de los compuestos a tratar.

Puesto que la recalcitrancia de algunos compuestos tóxicos hace imposible su degradación mediante el empleo de microorganismos naturales, en algunos casos se hace necesario manipular las rutas degradativas existentes de manera que, la alteración o combinación razonada de las mismas podría favorecer la degradación de estos compuestos recalcitrantes en hábitats naturales. La utilización de organismos manipulados genéticamente (OMGs) en el medioambiente requiere inicialmente estudiar en detalle su comportamiento y funcionalidad en entornos naturales, así como analizar el efecto de la introducción de los mismos sobre las poblaciones microbianas naturales del entornos en cuestión. El empleo de microcosmos puede simplificar este estudio; de manera que, gracias a esta metodología, se puede interpolar el comportamiento y la funcionalidad de estos microorganismos en ecosistemas naturales. Sin embargo, la evaluación final de esta tecnología requiere el seguimiento de estos OMGs en condiciones naturales mediante la realización de ensayos de campo controlados.

La liberación de microorganismos al medio ambiente ha generado serias preocupaciones debido a los limitados conocimientos que se poseen sobre el comportamiento de los OMGs en hábitats naturales (Ramos *et al.*, 1995), y a la incapacidad de predecir los posibles efectos que dichas liberaciones podrían tener sobre las poblaciones bacterianas indígenas. El empleo de sistemas activos de contención biológica se ha propuesto como solución para controlar la vida y la muerte microbiana en situaciones donde los agentes selectivos exógenos no pueden utilizarse, como ocurre en el caso de microroganimos introducidos en el medioambiente. Esta estrategia consiste en proveer a los microorganismos a liberar con un sistema genético que desencadene la muerte celular una vez terminada la función para la que han sido diseñados.

En general, los entornos edáficos se caracterizan por ser muy pobres en nutrientes (Bowen *et al.*, 1976). Debido a ello, en principio no se esperaría que los OGMs

introducidos deliberadamente en el suelo sobreviviesen durante períodos prolongados de tiempo, además, se ponía en duda la funcionalidad de los OMGs introducidos en suelos con fines biotecnológicos. Sin embargo, y a diferencia del suelo desnudo, los entornos rizosféricos se encuentran enriquecidos con los denominados exudados radiculares de plantas, los cuales contienen compuestos que los microorganismos utilizan como fuentes de carbono y nitrógeno. La existencia de este aporte de nutrientes en la rizosfera favorece la supervivencia a densidades celulares relativamente altas tanto de OMGs como de otras comunidades bacterianas (Curl *et al.*, 1986). Parecía interesante, por tanto, analizar las diferencias entre la supervivencia de microorganismos, portadores o no de un sistema de contención biológica, en estos dos entornos edáficos, el suelo desnudo y rizosfera.

En este trabajo se ha estudiado el comportamiento de cepas derivadas de *Pseudomonas putida* mt-2, en suelos desnudos y en la rizosfera de plantas de interés agrícola, tanto en condiciones controladas de laboratorio como en condiciones medioambientales. Además, se ha evaluado en ensayos de campo la funcionalidad de un sistema modelo de contención biológica para la degradación de alquilbenzoatos, y se han realizado los estudios preliminares para la construcción de un sistema activo de contención biológica basado en promotores inducibles por exudado de raíz, en concreto, los promotores del operón del catabolismo de la prolina.

1. Supervivencia en suelo y rizosfera de un derivado bioluminiscente de *P. putida* mt-2 en condiciones controladas.

El comportamiento en la rizosfera de microorganismos aislados originariamente de este entorno varía considerablemente con la naturaleza del microorganismo, el tipo de suelo y las semillas utilizadas. En consecuencia, se hace necesario estudiar en cada caso concreto la capacidad de colonización y de competencia en la rizosfera de los inoculantes bacterianos antes de su empleo en entornos naturales.

Las características bioquímicas, fisiológicas y genéticas de los derivados de *P. putida* mt-2, una cepa capaz de degradar una gran variedad de alquilbenzoatos, se conocen en profundidad, particularmente las de los derivados recombinantes con gran potencial para su uso en biodegradación (Abril *et al.*, 1989; Ramos *et al.*, 1995; Ramos *et al.*, 1986). Además, la capacidad de estas cepas de sobrevivir relativamente bien en microcosmos edáficos (Duque *et al.*, 1993; Ramos *et al.*, 1991; Ronchel *et al.*, 1995), y la disponibilidad de sistemas activos de contención biológica para este grupo de bacterias (Contreras *et al.*, 1991; Ronchel *et al.*, 1995; Ronchel *et al.*, 1998) las hacen especialmente interesantes para el desarrollo de inoculantes microbianos que podrían ser utilizadas en ensayos de campo tanto para biodegradación de compuestos tóxicos en entornos contaminados, como promotores del crecimiento vegetal o para su utilización como biopesticidas.

Tradicionalmente, la detección de microorganismos introducidos en microcosmos edáficos se ha venido realizando mediante el uso de marcadores de resistencia a antibióticos. Sin embargo, y aunque esta técnica se ha utilizado con éxito para analizar de supervivencia en suelos de la cepa de *P. putida* KT2442 y sus derivados (Rodríguez-Herva *et al.*, 1999), la mayoría de estos estudios se han centrado en el análisis del comportamiento de estos microorganismos durante el periodo inicial después de la inoculación en el suelo, normalmente de 4 a 8 semanas (Duque *et al.*, 1993). En este trabajo, y con objeto de estudiar más en detalle y durante períodos de tiempo prolongados la supervivencia y colonización de entornos edáficos por los derivados de *P. putida* KT2442, esta cepa se marcó en el cromosoma con un mini-Tn5 portador de los genes *luxAB* de *Vibrio fischeri*.

La inserción del mini-Tn5/*luxAB* en el cromosoma de esta cepa, *P. putida* S1B1, no afectó a la supervivencia de la misma en suelos (**Figuras 1.I, 2.I, 3.I y 4.I**) o en la rizosfera de maíz (**Figuras 5.I y 6.I**). Además, la detección bioluminiscente de células de *P. putida* S1B1 mediante la técnica de enriquecimiento en LB permitió determinar que esta cepa sobrevive en suelos no estériles durante al menos 12 meses (**Figura 2.I**). En general, en la rizosfera de plantas esta cepa sobrevivió a densidades celulares más altas y durante períodos de tiempo más prolongados que en suelo no rizosférico (**Figuras 5.I, 6.I y 7.I**) o en los suelos desnudos. Estos resultados coinciden con los publicados por otros autores para otras cepas pertenecientes al género *Pseudomonas*, como por ejemplo cepas de *Pseudomonas syringae* (Lindow y Panopoulos, 1988) y *Pseudomonadaceae* fluorescentes (Benizri *et al.*, 1997 de Weger *et al.*, 1987; Young *et al.*, 1989).

La adición del marcador de producción de bioluminiscencia en esta cepa facilitó los estudios de colonización en la raíz de distintas plantas. Mediante la utilización de autorradiografías o de la cámara detectora o contadora de fotones (CCD), se observó que *P. putida* S1B1 coloniza la raíz de maíz en toda su longitud durante al menos los primeros 6 días después de la siembra de semillas inoculadas con esta cepa. Sin embargo, la colonización de esta raíz no se realiza de una forma homogénea en plantas de maíz (**Figuras 8.I y 10.I**) y de haba (**Figura 9.I**); en estos casos, algunos segmentos de la raíz, por ejemplo los segmentos superiores de la misma, mostraron un nivel superior de bioluminiscencia. Estos resultados coinciden con los publicados anteriormente por otros autores sobre la colonización de la raíz de diversas plantas por otras bacterias bioluminiscentes pertenecientes al género *Pseudomonas* (de Weger *et al.*, 1991) o portadoras del marcador *lacZ* (Barry, 1986; Barry, 1988; Barry, 1988; Grinter, 1983). En plantas de acelga, espinaca y tomate la distribución de la bioluminiscencia observada fue homogénea; incluso esta cepa pudo detectarse en la parte aérea

2. Efecto de la introducción en suelos de la cepa bioluminiscente *P. putida* S1B1 sobre la supervivencia de cepas bacterianas aisladas de la rizosfera.

Con objeto de estudiar las relaciones competitivas de la cepa *P. putida* S1B1 con microorganismos indígenas del suelo, en primer lugar se aisló un grupo diverso de bacterias de la rizosfera de plantas de maíz crecidas en suelos con un largo historial en este cultivo (**Tabla 1** de la sección *Introducción*). Como era de esperar, el análisis de los fosfolípidos de la membrana de algunos de estos aislados reveló la existencia tanto de bacterias gram-positivas, tales como *Bacillus* spp. y *Micrococcus luteus*, y gram-negativas, siendo el género *Pseudomonas* el mayoritario, en consonancia con los resultados publicados por otros autores para el aislamiento de cepas bacterianas de la rizosfera de maíz y otras plantas en medios de cultivo similares a los utilizados en este trabajo (Vancura, 1980).

Se realizaron estudios de competencia entre la cepa *P. putida* S1B1 y algunos de los aislados naturales tanto en suelos desnudos estériles coinoculados a igual o diferente dosis celular inicial (**Tabla 2.II**), o inoculados a tiempos distintos (**Figuras 1.II a 4.II**); como en suelos desnudos no estériles incubados a distintas temperaturas (**Figuras 5.II, 6.II y 7.II**). Estos estudios se realizaron, además, en la rizosfera estéril (**Tabla 4.II**) o no estéril de plantas de maíz (**Tabla 5.II**) y en suelo no rizosférico no estéril (**Tabla 6.II**). En general, podría decirse que en ninguna de las condiciones analizadas las cepas indígenas mostraron ventajas competitivas significativas sobre *P. putida* S1B1, y viceversa. En algunos casos en los que las rizobacterias indígenas se inocularon en suelos desnudos después del establecimiento de la cepa bioluminiscente se observó un descenso en la densidad celular de esta última cepa (**Figura 4.II**). Hemos de decir que el hecho de la presencia de la cepa modificada genéticamente en entornos naturales antes de la de cualquier cepa de la población indígena no es una situación natural, sino que se trata de una situación provocada en el laboratorio. En condiciones de no esterilidad, las cepas *P. putida* S1B1 y otras tres rizobacterias del sistema radicular del maíz, *P. putida* EEZ-201-L, *P. chlororaphis* EEZ-204-L y *P. fluorescens* EEZ-205-L colonizaron la raíz de esta planta a densidades celulares más elevadas (**Tabla.5.II**). Las densidades celulares calculadas fueron similares, e incluso en algunos casos superiores, a las publicadas por otros autores para otras cepas pertenecientes al grupo de las *Pseudomonadaceae* fluorescentes (Benizri, *et al.*, 1997; Curl y Truelove, 1986).

Se analizó también, en condiciones controladas en un invernadero, el efecto de la introducción de la cepa bioluminiscente en suelos desnudos o en presencia de plantas sobre la supervivencia de algunas poblaciones bacterianas indicadoras de la microbiota natural del suelo, como son la población de bacterias capaces de crecer en medio LB, las bacterias que utilizan el ácido *p*-hidroxibenzoico como fuente de carbono, la población de *Pseudomonadaceae* fluorescentes y las bacterias resistentes a tetraciclina. En ninguno de

los casos analizados se detectaron efectos negativos significativos (**Figuras 8.II y 9.II**), lo que sugiere, que en las condiciones analizadas, la cepa *P. putida* S1B1 encuentra su nicho ecológico propio en estos dos entornos edáficos no colonizándolos de forma agresiva.

Estos resultados, en conjunto, muestran por primera vez que los derivados de *P. putida* mt-2 no son solo capaces de colonizar las raíces de plantas diferentes y de establecerse a niveles altos en el suelo rizosférico, sino que, además, son tan competitivas como las cepas indígenas aisladas de la rizosfera de plantas de maíz crecidas en condiciones naturales. Estas características, unidas a las expuestas anteriormente, convierten a los derivados de la cepa *P. putida* KT2440 en candidatos idóneos para la recuperación de ambientes contaminados gracias a la acción combinada de bacterias y plantas, como agentes promotores del crecimiento vegetal y para la eliminación de patógenos de suelo y de la raíz.

La evaluación de cepas bacterianas naturales y modificadas genéticamente en entornos simulados, como son los microcosmos, aporta datos preliminares muy valiosos. Sin embargo, y puesto que en este tipo de estudios no se consideran los cambios ambientales y el trasiego de materiales que tipifica cada combinación específica de planta y suelo, no queda garantizado que los microorganismos estudiados se comporten de manera similar en condiciones medioambientales. Por todo lo expuesto, el paso lógico siguiente de esta investigación fue la evaluación del comportamiento de los derivados de *P. putida* mt-2 en condiciones ambientales.

3. Supervivencia de la cepa *P. putida* KT2442 y su derivado bioluminiscente *P. putida* S1B1 bajo condiciones medioambientales.

En condiciones medioambientales, la cepa *P. putida* KT2442 también se estableció a niveles más altos y sobrevivió durante más tiempo en la rizosfera de maíz (**Figura. 3.III**) y haba (**Figura. 2.III**) que en suelo no rizosférico (**Figura. 2.III y 3.III**) y suelo desnudo (**Figura 1.III**). La densidad celular alcanzada por esta cepa en la rizosfera de plantas fue superior en la raíz de haba (ensayo de otoño-invierno, **Figura 2.III**) que en la de maíz (ensayo de primavera-verano, **Figura 3.III**). Este hecho probablemente se deba tanto a factores bióticos como abióticos. En primer lugar, y debido a la diferencia de tamaño entre las semillas de haba y maíz, la utilización de un inóculo bacteriano de tamaño similar para ambos tipos de semillas resultó en un número de UFC por semilla superior para las semillas de haba que para las de maíz. En condiciones de cultivo controladas en un invernadero, se había comprobado que la densidad de inoculación de las semillas de maíz no afectaba al nivel de colonización de las raíces (**Figura 1.I**). Sin embargo, en condiciones medioambientales, la situación podría ser muy diferente; esta posibilidad no se estudió durante el desarrollo de este trabajo. Por otro

lado, los exudados de las plantas de haba podrían permitir un crecimiento ligeramente superior de esta cepa en comparación al exudado de raíz de maíz. Estos dos factores bióticos podrían explicar por sí mismos la mejor colonización de la rizosfera de plantas de haba por parte de la cepa *P. putida* KT2442. Sin embargo, ciertos factores abióticos podrían influenciar también la colonización del suelo rizosférico como se explica a continuación. La temperatura del suelo es un factor crítico que ejerce una influencia notable en la supervivencia de las cepas derivadas de *P. putida* mt-2. Como ya se había comprobado en condiciones controladas en el laboratorio, a temperaturas iguales o superiores a 37°C el número de CFU por g de suelo descendió a niveles inferiores a nuestros límites de detección (10^2 CFU/g de suelo desnudo) en un período de tiempo inferior a 20 días (**Figuras 5.II a 7.II**). Por el contrario, temperaturas inferiores permitieron una buena supervivencia de estas cepas (**Figuras 5.II a 7.II**). Durante el ensayo de primavera-verano se alcanzaron temperaturas ambientales de hasta 42°C en la parcela experimental, mientras que durante el de otoño-invierno las temperaturas alcanzadas fueron bastante más suaves (entre 3 y 18°C). Estas diferencias podrían explicar también en sí mismas las diferencias observadas en la supervivencia de las cepas durante los dos ensayos realizados.

La colonización de la rizosfera y del suelo que rodea a la misma sin entrar en contacto directo con ella requiere tanto multiplicación como movilización de las bacterias para así poder alcanzar las zonas profundas de la raíz (Benizri *et al.*, 1997; de Weger *et al.*, 1987; Rodríguez-Herva *et al.*, 1999). La existencia de división celular en la rizosfera de plantas se ha demostrado para cepas de *Pseudomonas aureofaciens* marcadas con los genes *lacYZ* de *E. coli* (Drahos *et al.*, 1988); la cepa modificada se estableció a los mismos niveles que la cepa silvestre. Éstos y otros autores han aportado datos similares utilizando otras cepas pertenecientes al género *Pseudomonas* en las raíces de patata y de remolacha (Benizri *et al.*, 1997; de Weger *et al.*, 1987; Geels *et al.*, 1986). En todos los casos el número de UFC de las cepas introducidas en la rizosfera fue del orden de 10^5 - 10^6 CFU por g de suelo, un número similar al que alcanzó *P. putida* KT2442. Por todo lo expuesto, se puede considerar que a temperaturas ambientales moderadas los derivados de *P. putida* mt-2 son buenos colonizadores de la rizosfera, lo que apoya su utilización en la recuperación de suelos contaminados con la utilización conjunta de plantas (en inglés, "fitoremediation") y en la construcción de cepas para control biológico de patógenos de plantas.

Para el estudio de los efectos posibles de la liberación de los derivados de *P. putida* mt-2 sobre la supervivencia de poblaciones bacterianas indígenas en condiciones medioambientales, se consideraron poblaciones indicadoras de microorganismos tales como los que utilizaron el ácido *p*-hidroxifenilacético como la única fuente de carbono y el total de *Pseudomonadaceae* fluorescentes. En consonancia con los resultados obtenidos

en condiciones controladas en un invernadero, estas dos poblaciones naturales se mantuvieron relativamente estables en el suelo a lo largo de todo el año, tanto en presencia como en ausencia *P. putida* KT2442 o su derivado bioluminiscente *P. putida* S1B1 (**Figuras 1.III, 2.III y 3.III**). Puesto que en condiciones ambientales los derivados de *P. putida* mt-2 analizados se establecen en el suelo sin excluir a otros microorganismos presentes en este entorno, se puede concluir que estas cepas son colonizadores de raíz no agresivos.

La utilización de bacterias para aumentar o iniciar la mineralización *in situ* o como agentes de control biológico no depende solamente de la supervivencia de las mismas en el entorno adecuado, además, hay que tener en cuenta la estabilidad y la expresión de la función correspondiente introducida en la cepa manipulada. Aunque este aspecto no ha sido estudiado en este trabajo, anteriormente se ha demostrado que las rutas catabólicas del plásmido TOL se expresaron en esta cepa tras la introducción de la misma en suelos (Duque *et al.*, 1993). En este estudio se comprobó que las células de la cepa S1B1 extraídas del suelo y seleccionadas en benzoato como única fuente de carbono mantuvieron el carácter bioluminiscente. Esto puede considerarse como una evidencia de la estabilidad de la información genética portada por estas cepas en el suelo.

4. Validación en condiciones ambientales de un sistema activo de contención biológica para la eliminación de contaminantes ambientales.

Al comienzo de este estudio, el grupo de Degradación de Tóxicos Orgánicos de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC, Granada) disponía de varias cepas de *P. putida* contenidas biológicamente y capaces de degradar alquilbenzoatos (Contreras *et al.*, 1991; Jensen *et al.*, 1993; Ramos *et al.*, 1995; Ronchel *et al.*, 1995; Ronchel *et al.*, 1998). Se disponía de cepas cuyo elemento *matador* se basa en el gen *gef* de *E. coli* (Ronchel *et al.*, 1995; Ronchel *et al.*, 1997; Ronchel *et al.*, 1998) o en el gen *E* del fago Φ X174 (Ronchel *et al.*, 1998). En ambos casos, el elemento regulador del sistema está basado en el regulador XylS y en la fusión del gen *lacI* de *E. coli* al promotor P_m de la ruta *meta* del plásmido TOLpWWO de *P. putida* (**Figura 4 de la Introducción**).

Ronchel y colaboradores (1995) demostraron que el sistema de contención biológica basado en el gen *gef* era funcional cuando el elemento regulador del sistema se encontraba en un plásmido y el elemento *matador* integrado en el cromosoma, tanto en condiciones controladas de cultivo en el laboratorio, como en microcosmos edáficos. Sin embargo, y como ocurre en todos los sistemas genéticos, se detectó la aparición de mutantes resistentes a la lisis celular provocada por el gen *gef*. La integración de los elementos *matador* y regulador de este sistema de contención en el cromosoma de *P. putida* CMC4 disminuyó la frecuencia de aparición de mutantes resistentes a

aproximadamente 10^{-8} mutantes por célula y generación (Ronchel, 1997). Por este motivo, se decidió utilizar la cepa *P. putida* CMC4 para la validación del sistema de contención en condiciones medioambientales.

Tras la obtención de los permisos pertinentes, se procedió a primera liberación intencionada de OGMs de España y de microorganismos portadores de un sistema de contención biológica del mundo. La cepa contenida *P. putida* CMC4 y su cepa control, *P. putida* EEZ32, se liberaron bajo condiciones controladas en una parcela experimental localizada en la Estación Experimental del Zaidín (CSIC-Granada) (**Figura 3** de la sección *Materiales y Métodos*). En general, ambas cepas sobrevivieron a densidades celulares superiores y durante períodos de tiempo más prolongados en la rizosfera de plantas que en el suelo no rizosférico y que en el suelo desnudo. Se realizaron dos ensayos diferentes, uno durante el período de primavera-verano (en el cual se sembraron semillas de maíz), y otro durante el período de otoño-invierno (en el que se utilizaron semillas de habas).

El comportamiento de la cepa control en la rizosfera fue similar, a grandes rasgos, al observado para *P. putida* KT2442 en estos entornos y en las mismas condiciones. Esta cepa se estableció a niveles superiores en la rizosfera plantas de haba (**Figura 4.III**) que en las de maíz (**Figura 5.III**). En este último caso, la densidad celular alcanzada se encuentra por debajo de los límites de detección por siembra en placa de medio selectivo al cabo de 70 días en el caso de suelos adicionados con 3-metilbenzoato y de 20 días en ausencia de este compuesto; las razones de este brusco descenso podrían deberse a que, en este periodo de tiempo, se alcanzaron temperaturas superiores al caso de la liberación de *P. putida* KT2442 (45° C). Estas temperaturas parecen afectar más al caso de la cepa control en ausencia de 3-metilbenzoato que en el de la presencia de este compuesto. Aunque la cepa contenida (**Figuras 4.III y 5.III**) sobrevive a niveles inferiores que la cepa control, el comportamiento de ésta se ve claramente afectado por la presencia o ausencia del compuesto aromático; siendo siempre los niveles alcanzados superiores en los suelos adicionados con 3-metilbenzoato a los no adicionados. Estos resultados mostraron que, incluso en presencia de 3-metilbenzoato, la cepa contenida sobrevivió a densidades inferiores que el nivel de establecimiento de la cepa control. Esto pudo deberse a la reducida disponibilidad del 3-metilbenzoato anteriormente añadido al suelo.

Como se describió anteriormente *P. putida* KT2440 y sus derivados colonizan eficientemente la rizosfera de plantas de interés agrícola como el haba y el maíz. El descenso tan marcado en el número de UFC por g de suelo rizosférico de la cepa contenida en ausencia de 3-metilbenzoato puede ser atribuido inequívocamente al sistema de contención que porta. Bajo condiciones medioambientales el descenso en UFC por g de suelo de la cepa contenida se da de una manera menos acentuada que en medios de

laboratorio; mientras que en condiciones medioambientales este fenómeno requiere de periodos de semanas, en el laboratorio la cepa contenida deja de detectarse en períodos de horas (Ronchel, 1997). Esta diferencia puede reflejar tres hechos: 1) cuando se introducen en el suelo, las cepas contenidas contienen gran cantidad de proteína LacI, lo que podría producir que el gen matador no se exprese hasta que se de la completa degradación de la proteína LacI; 2) la actividad de la proteína Gef requiere que la célula esté metabólicamente activa (Ronchel, 1997), lo cual se ha demostrado por autores para la lisis celular mediada por otras porinas (Eko et al., 1994). Tras la introducción de las cepas en el suelo, las células podrían entrar en un estado metabólico menos activo que no permitiese la actuación del gen *gef* de manera eficiente y; 3) sería posible pensar que en la rizosfera existiesen compuestos capaces de inducir el elemento control del sistema de contención biológica evitando la expresión del gen matador. Este último hecho pudo comprobarse al exponer la cepa CMC5 (ver **Tabla 1** de *Materiales y Métodos*) a extractos de suelo carentes de 3-metilbenzoato; éstos fueron capaces de inducir en esta la expresión de los genes *lux* a partir del promotor P_m (**Tabla 11.III**).

La cepa contenida y su control colonizaron el suelo desnudo (**Tablas 1.III y 6.III**) y el suelo no rizosférico (**Tablas 2.III y 7.III**) de una manera menos eficiente que la rizosfera. Se pudo observar, que en estos entornos la supervivencia de ambas cepas estuvo muy limitada; sobre todo en condiciones estivales donde la cepa control dejó de ser detectada por siembra en placa al cabo de 28 días en presencia o ausencia de 3-metilbenzoato. La cepa contenida, a estas temperaturas tan altas, no lo hizo más de 11 días, pero siempre la densidad celular alcanzada por ésta fue inferior en ausencia del aromático en cuestión. Esto refleja la situación descrita anteriormente en la colonización de suelos sin la influencia del exudado radicular por parte de las cepas derivadas de *P. putida* mt-2; por consiguiente podemos determinar que la dispersión de la cepa contenida podría estar severamente limitada fuera de la rizosfera de plantas

Para el seguimiento de los posibles efectos de la liberación de *P. putida* CMC4 y *P. putida* EEZ32 sobre las poblaciones bacterianas naturales, se seleccionaron los microorganismos capaces de utilizar el ácido *p*-hidroxifenilacético como población indicadora de la población bacteriana indígena de estos suelos. En consonancia con los resultados descritos anteriormente, la presencia de la cepa control o de la cepa contenida no tuvo un efecto significativo en la supervivencia de esta población natural (**Tablas 3-5.III y 8-10.III**).

Los resultados descritos anteriormente muestran que un sistema ABC basado en genes matadores puede ser desarrollado en el laboratorio, y que el sistema funciona bajo condiciones medioambientales caracterizados por temperaturas moderadas, no superando los 40°C.

5. Sistemas de contención biológica dependientes del exudado de raíz: caracterización del operón del catabolismo de la prolina de *P. putida* KT2440

Como se ha mencionado anteriormente, la supervivencia de las cepas modificadas genéticamente derivadas de *P. putida* mt-2 a altas densidades celulares bajo condiciones medioambientales quedó restringida a suelos donde existía un aporte de nutrientes, como es el caso de la rizosfera de plantas. Por el contrario, en suelos más pobre en nutrientes, como son los suelos no rizosféricos y los suelos desnudos, la supervivencia de estas cepas quedó por debajo de los límites de detección directa mediante conteo en placas de medio selectivo en períodos de tiempo relativamente cortos. Este comportamiento revela la existencia de un efecto protector de la rizosfera en la supervivencia de las cepas utilizadas en condiciones medioambientales; en otras palabras, podría hablarse de la existencia de "contención físico-química" en suelos no influenciados por la rizosfera de plantas. Cabría esperar que ciertos componentes del exudado radicular actuaran como "señales" capaces de activar una serie de mecanismos genéticos en los microorganismos residentes en la rizosfera, y que la incorporación de estos elementos genéticos dentro de un sistema de contención biológica pudiese restringir aún más la supervivencia de estos microorganismos en otros entornos distintos a los rizosféricos.

Como ya se mencionó en la *Introducción* de esta Tesis Doctoral, de entre los compuestos presentes en el exudado radicular, la prolina constituye uno de los aminoácidos más abundantes y mejor utilizados por cepas de *P. putida* como fuente de carbono y/o nitrógeno (C. Ramos, datos no publicados). La genética y bioquímica de la utilización de este aminoácido está caracterizada en detalle en Enterobacterias (Allen *et al.*, 1993; Ling *et al.*, 1994; Xia *et al.*, 1995;), *Rhodobacter capsulatus* (Keuntje *et al.*, 1995), *Bradyrhizobium japonicum* (Straub *et al.*, 1996) y *Rhizobium meliloti* (Jiménez-Zurdo *et al.*, 1997). En todos los casos descritos, los promotores del catabolismo de la prolina son inducibles por la presencia de este aminoácido (Maloy, 1987; Maloy y Stewart, 1993).. Además, se han identificado ciertos genes que responden a los exudados de la raíz y se han descubierto algunos de los compuestos específicos que son responsables de la regulación de la expresión genética de los mismos, entre ellos la prolina (Clarke *et al.*, 1992). Por todo lo expuesto, se decidió comenzar con la clonación y caracterización del operón del catabolismo de la prolina de *P. putida* KT2440 como primer paso en la construcción de sistemas de contención biológica dependientes de señales químicas presentes en el exudado de raíz.

El operón del catabolismo de la prolina de *P. putida* KT2440 se clonó por complementación en una cepa de *E. coli* que contiene una delección de los genes *putAP*, y por tanto es incapaz de crecer en prolina como fuente de nitrógeno. De entre los plásmidos

aislados por complementación a partir de una genoteca de *P. putida* KT2440, se seleccionó el plásmido pCRR831, por contener el inserto cromosómico de menor tamaño (C. Ramos, datos no publicados) (**Figura 1.IV**). La localización de los genes del catabolismo de la prolina (genes *put*) de *P. putida* en este plásmido se comprobó mediante hibridación con los genes correspondientes de *S. typhimurium* (**Figura 2.IV**). Se obtuvieron una serie de plásmidos que contenían el operón de la utilización de la prolina completo (pSL4, **Figura 8.IV**), parte del gen *putA*, la región intergénica y el gen *putP* completo (pLCR12, **Figura 4.IV**) y parte del gen *putA* (**Figura 4.IV**). El primero de ellos fue capaz de restaurar la capacidad de utilizar prolina a una cepa de *E. coli* en la que se había delecionado los genes codificadores de esta actividad y el segundo a una cepa de *S. typhimurium* incapaz de utilizar prolina por tener mutado el gen *putP* (**Tabla 3.IV**). Todos estos resultados mostraron que los genes del catabolismo de la prolina de *P. putida* KT2440 son heterólogos ya que son capaces de expresarse y sus productos son funcionales en otro tipo de microorganismos.

La secuenciación de los genes *putA* y *putP* de *P. putida* (**Figura 5.IV**), y el análisis posterior de estas secuencias reveló que la estructura, disposición y tamaño de los genes que intervienen en el catabolismo de la prolina de *P. putida* es muy similar a la encontrada en otros microorganismos como *E. coli* y *S. typhimurium*. El gen *putA* de Enterobacterias (Allen *et al.*, 1993; Ling *et al.*, 1994; Xia *et al.*, 1995), *Rhodobacter capsulatus* (Keuntje *et al.*, 1995), *Bradyrhizobium japonicum* (Straub *et al.*, 1996) y *Rhizobium meliloti* (Jiménez-Zurdo *et al.*, 1997) tiene un tamaño aproximado de 4 kb, y codifica las dos actividades enzimáticas que intervienen en la conversión de la prolina en glutamato: prolina deshidrogenasa y pirrolina-5-carbamato deshidrogenasa (Chen y Maloy, 1991; Graham *et al.*, 1984; Hanada *et al.*, 1985; Hahn y Maloy, 1988; Menzel y Roth, 1981). En la secuencia de nucleótidos del gen *putA* de *P. putida* se encontró un grado de homología elevado con las regiones codificadoras de estas dos actividades en el gen correspondiente de los microorganismos mencionados anteriormente, por el contrario, la homología en el resto de la secuencia de este gen no fue tan elevada (**Figura 9.IV**). Todo lo mencionado anteriormente y el hecho que un mutante de *P. putida* KT2442 en esta secuencia nucleotídica por inserción de un miniTn5::*luxAB*-Km (*P. putida* S14D2) es incapaz de utilizar prolina (Vilchez *et al.*, en preparación) mostró que, en *P. putida*, probablemente este gen codificará una proteína capaz de realizar las mismas actividades enzimáticas de transformación de la prolina hasta glutamato. En los microorganismos estudiados, la proteína codificada por el gen *putA* ejerce, además, funciones reguladoras (Brown y Wood, 1993; de Ostrovsky *et al.*, 1991). En ausencia de prolina, esta proteína permanece en el citoplasma, donde se une a los operadores, evitando la expresión de los genes *put*. Cuando se dispone de una cantidad suficiente de prolina, la proteína PutA se une a este aminoácido y se asocia funcionalmente con la

cadena de transporte de electrones en la membrana citoplasmática, donde es activa enzimáticamente (Ekena *et al.*, 1990). La disminución resultante en los niveles de PutA libera la expresión de los operadores, conllevando a la expresión de los genes *put* (Maloy, 1987; Maloy y Stewart, 1993). El papel desempeñado por esta proteína en *P. putida* KT2440 esta siendo analizado por la Licenciada Susana Vílchez Tornero.

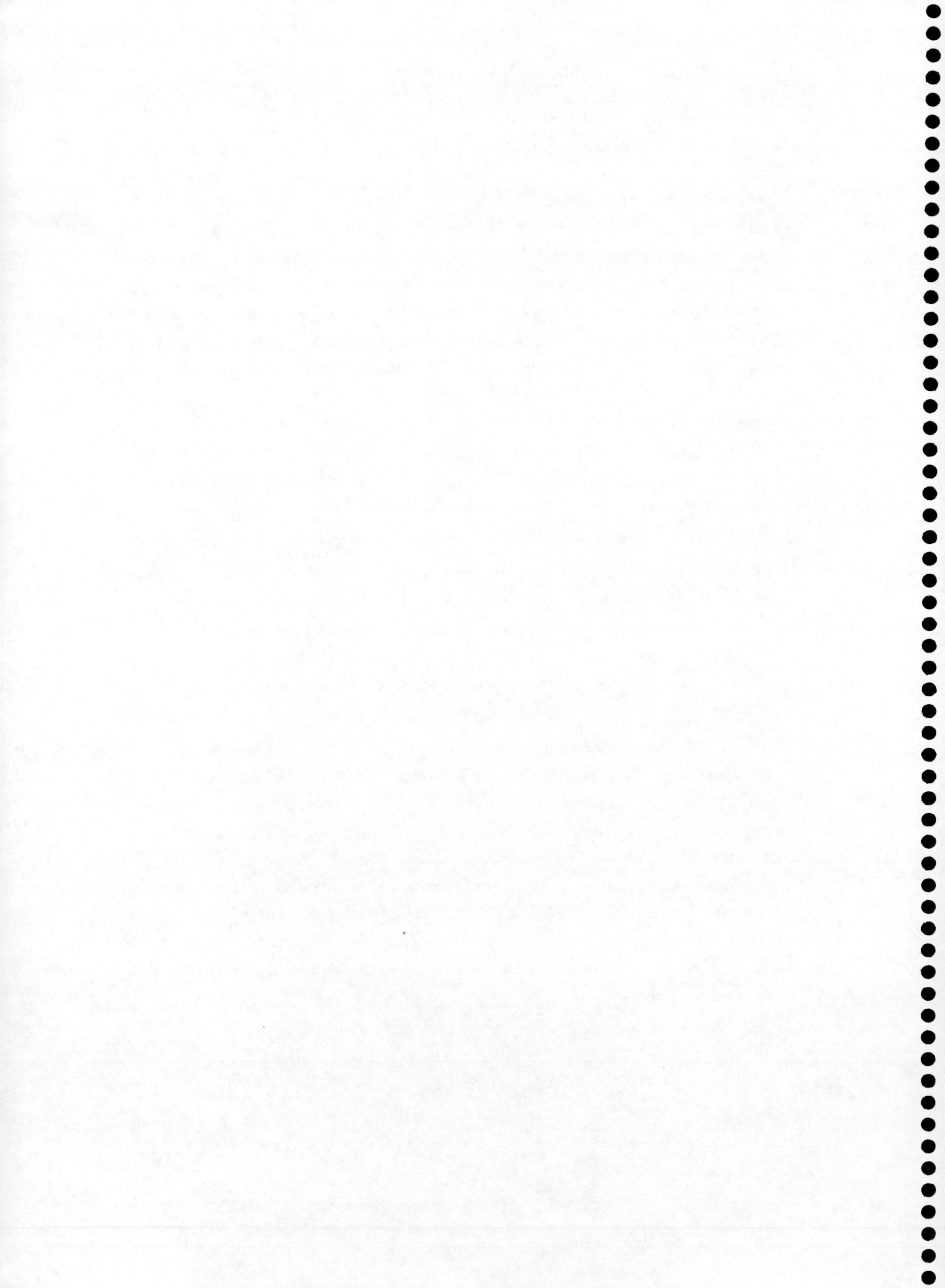
El gen *putP* de *P. fluorescens*, *S. typhimurium*, *Rickettsia typhi* y *E. coli* presenta un tamaño de aproximadamente 1.5 kb (Chen y Maloy, 1991; Graham *et al.*, 1984; Hanada *et al.*, 1985; Hahn y Maloy, 1988; Menzel y Roth, 1981) codifica una permeasa para la prolina, que acopla la incorporación de este aminoácido al citoplasma celular con la incorporación de iones sodio citoplasmática (Cairney *et al.*, 1984; Chen *et al.*, 1985 y Ratzkin y Roth, 1978). La secuencia nucleotídica de este gen en *P. putida* presentó un tamaño (**Figura 5.IV**) y un alto nivel de homología a lo largo de toda su longitud con los genes *putP* de los microorganismos descritos anteriormente (**Figura 6.IV**) y, además, con la secuencia de otros genes que codifican sistemas de transporte acoplados a sodio (simporte de pantotenato, cotransporte de glucosa, de mio-inositol, de aminoácidos neutros y nucleósidos) Dentro de la secuencia aminoacídica de la proteína PutP de *P. putida* se localizaron posibles dominios transmembrana (**Figura 7.IV**), lo que tambien apoya la actuación de esta proteína en el transporte de la prolina al interior de la célula.

La disposición de los genes *putA* y *putP* en el operón de *P. putida* (**Figura 5.IV**) sugiere que, al igual que en los microorganismos estudiados anteriormente, estos genes se transcriben divergentemente a partir de la región intergénica (Maloy y Roth, 1983), que ejercería funciones reguladoras (Hahn y Maloy; 1986; Maloy y Roth, 1983; Nakao *et al.*, 1987). Esta región no presenta demasiada homología en su secuencia nucleotídica con la de *E. coli* y *S. typhimurium*, pero presenta una estructura similar a la de éste último microorganismo; presenta dos regiones promotoras (*putPp* y *putAp*) a diferencia de *E. coli*, donde parecen existir un promotor para *putA* y 5 para *putP* (Nakao *et al.*, 1987). A pesar de estas diferencias, los genes del operón del catabolismo de la prolina complementan en *E. coli*. La intervención de esta región en la regulación del operón del catabolismo de la prolina de *P. putida* quedó confirmada mediante experimentos de análisis de extensión a partir de cebadores (Vílchez *et al.*, en preparación). Se localizaron tanto las dos regiones promotoras *putAp* y *putPp*, regiones +1, -10, -35, así como posibles zonas IHF (Vilches *et al.*, en preparación)

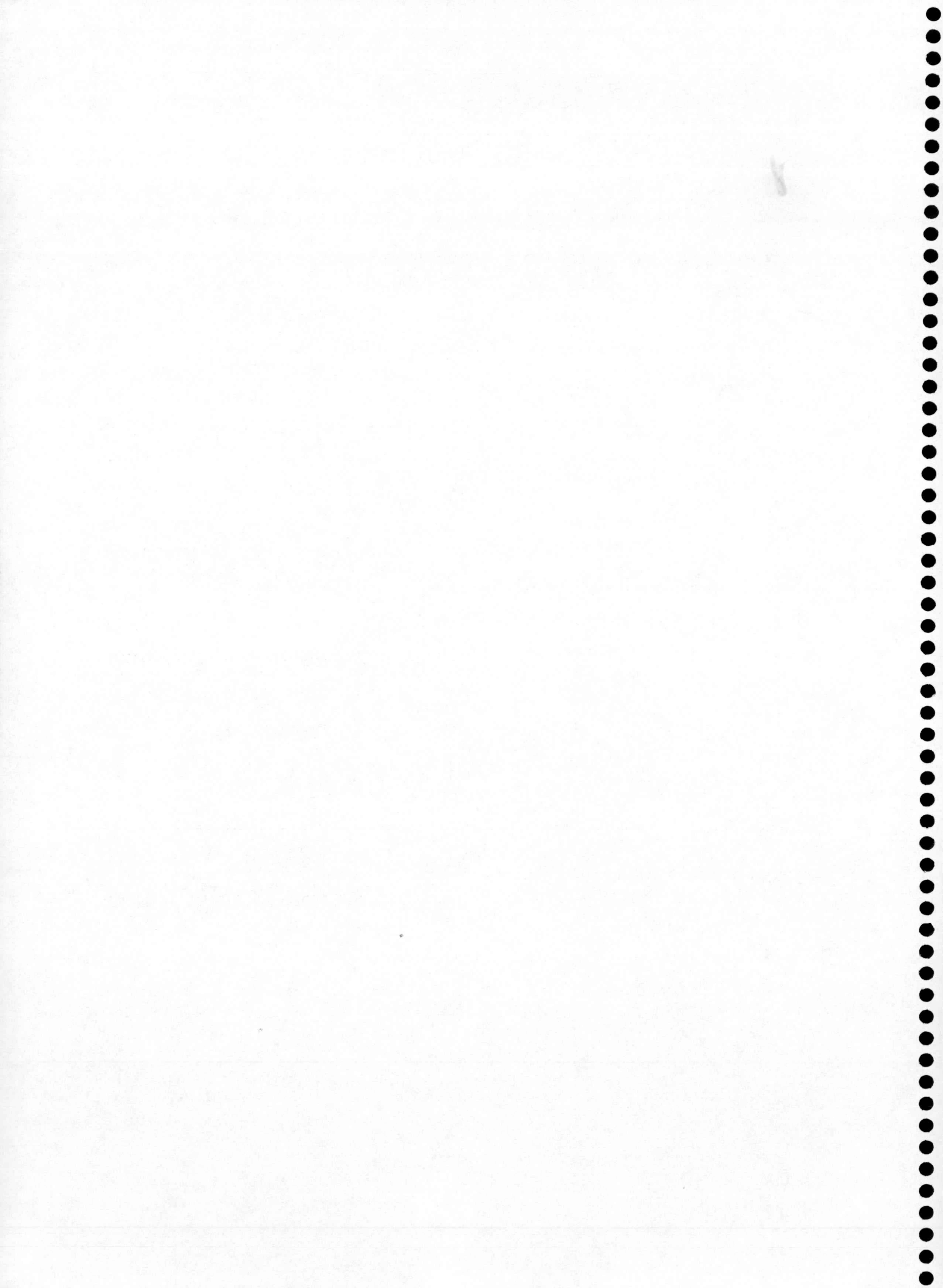
Para hacer un estudio preeliminar de la regulación de los genes del operón del catabolismo de la prolina de *P. putida*, se procedió en primer lugar a la fusión transcripcional del la región intergénica en posición *putP* a los genes codificadores de la luciferasa bacteriana (genes *luxAB* de *Vibrio harveyi*) (plásmido pUTCLUX, **Figura 11.IV**). Esta región, además, se fusionó transcripcionalmente en posición a los genes

lacZ de *E. coli* (plásmido pMDPUTC, **Figura 11.IV**). Tras la exposición de las cepas de *E. coli* portadoras de estos plásmidos a medios con y sin prolina como fuente de carbono y/o nitrógeno (**Tablas 1.IV y 2.IV**) se observó que en medios con donde la prolina constituía la única fuente de carbono y nitrógeno la inducción de ambos promotores fue superior que en medios donde este aminoácido constituía la única fuente de nitrógeno. Estos resultados coinciden con los obtenidos para la regulación de los genes correspondientes de *E. coli*. En este microorganismo, las condiciones de hambre de nitrógeno producen una inducción de este operón hasta niveles intermedios (Prival y Magasanik, 1971). Por el contrario, en el caso de cepas de *Klebsiella* esta inducción se produce hasta niveles altos (Pahal *et al.*, 1978), y en *S. typhimurium* la inducción por prolina en condiciones de hambre de nitrógeno es nula, siendo estas bacterias incapaces de crecer en medios donde la prolina constituía la única fuente de nitrógeno (Chen y Maloy, 1991; Prival y Magasanik, 1971). Se observó también que en medios de cultivo carentes de este aminoácido no se produjo expresión significativa de las actividades luciferasa o β -galactosidasa a partir de los promotores correspondientes (**Tablas 1.IV y 2.IV**). Los estudios sobre regulación del operón de la prolina de *P. putida* mencionados anteriormente se realizaron en cepas de *E. coli* poseedoras del operón del catabolismo de la prolina; puesto que existe complementación entre ambos tipos de genes, existe la posibilidad de haber medido la acción conjunta tanto de los genes de *P. putida* y *E. coli*. Aunque los resultados mencionados anteriormente están apoyados por los obtenidos mediante análisis de extensión por cebadores en *P. putida* (Vílchez *et al.*, en preparación)

Una vez comprobado que los promotores del operón del catabolismo de la prolina en *P. putida* son inducibles por la presencia de este aminoácido, se han plantado nuevas líneas de trabajo en los temas abordados durante la realización de esta Tesis Doctoral, desarrollada en el grupo de Degradación de Tóxicos Orgánicos de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC-Granada) en colaboración con GX-Biosystems-España: 1) profundizar en la caracterización de la regulación de este operón en *P. putida* (trabajo que lleva a cabo la Lcda. Susana Vílchez); 2) búsqueda de otros promotores inducibles por exudado radicular (responsable: Dr. Manolo Espinosa) y; 3) diseño de sistemas de contención biológica basados en estos promotores (Dra. María del Carmen Ronchel y Lcda. Susana Vílchez).



CONCLUSIONES

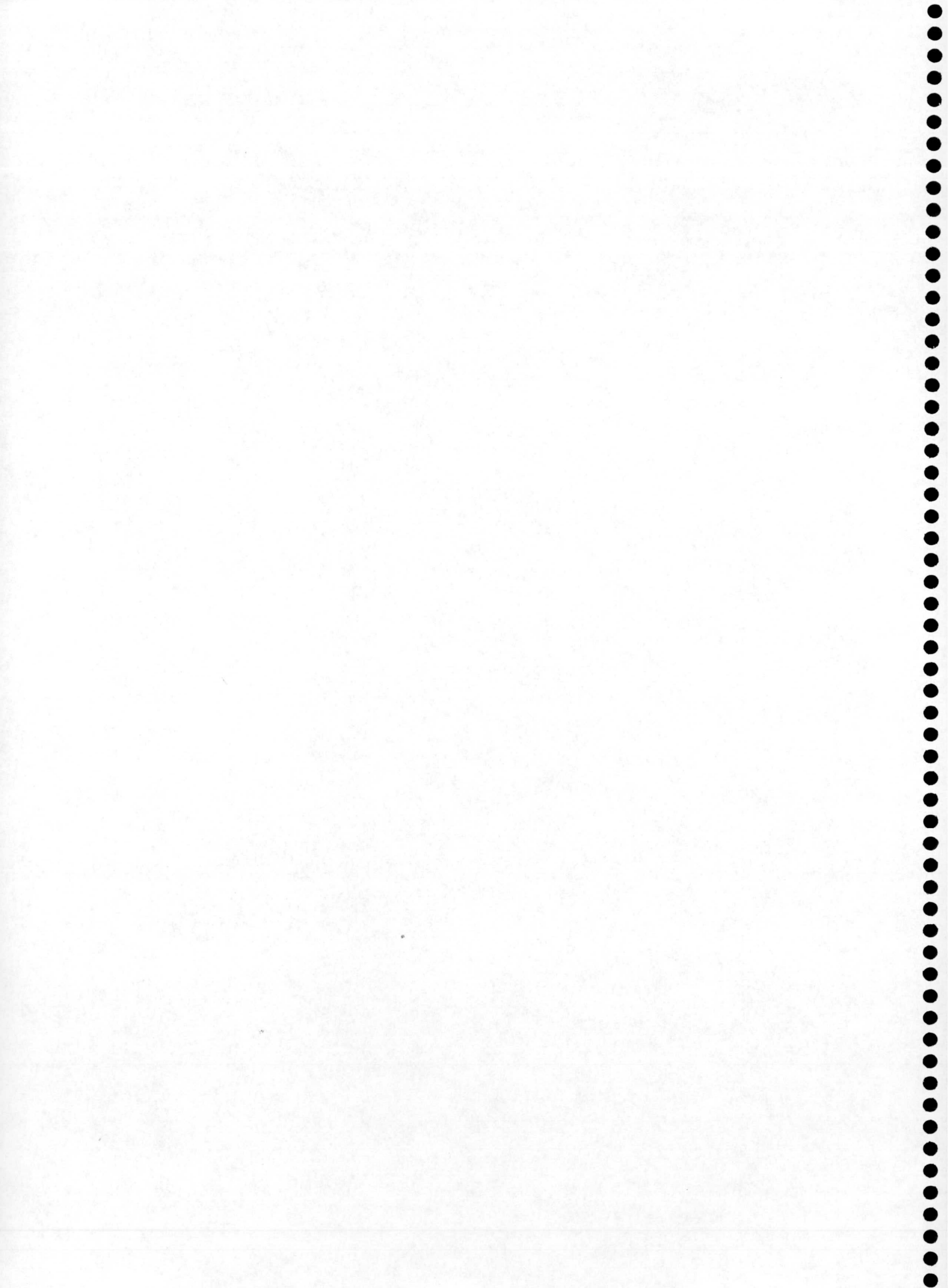


Los resultados obtenidos en este trabajo permieron extraer las conclusiones que se exponen a continuación:

1. Los genes codificadores de la bioluminiscencia bacteriana integrados en el cromosoma de *P. putida* S1B1 se mantienen de una manera estable en ausencia de presión selectiva en medios de laboratorio. La integración no afecta al crecimiento de esta cepa en medios de cultivo ni a la supervivencia de la misma en la rizosfera o en suelos sin plantas bajo condiciones controladas en un invernadero.
2. *P. putida* S1B1 sobrevive a mayor densidad celular y durante períodos de tiempo más largos en la rizosfera de plantas que en suelos no influenciados por los exudados radiculares, tanto en condiciones controladas en un invernadero como en condiciones medioambientales. La densidad celular alcanzada por esta cepa en la rizosfera es superior en suelos estériles o ricos en materia orgánica que en suelos no estériles o pobres en materia orgánica.
3. La supervivencia en condiciones controladas o medioambientales de los derivados de *P. putida* mt-2 disminuye considerablemente a temperaturas mayores o iguales a 37°C, tanto en suelos sin plantas como en la rizosfera.
4. *P. putida* S1B1 coloniza las raíces de plantas de espinacas, haba y de maíz de forma no homogénea, siendo las raíces secundarias próximas a la semilla inoculada las zonas colonizadas preferentemente por esta cepa. Por el contrario, y durante al menos 14 días después de la siembra, las raíces de acelga y tomate son colonizadas de una forma más homogénea por esta cepa.
5. Los microorganismos aislados con mayor frecuencia de la rizosfera de plantas de maíz en medios de cultivo de laboratorio pertenecen a los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*., de entre las bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, respectivamente.
6. La supervivencia de la cepa *P. putida* S1B1 en suelos con o sin plantas no se ve afectada significativamente por la introducción simultánea o posterior de cepas indígenas aisladas de la rizosfera del maíz, y viceversa, tanto si la cepa

- bioluminiscente se inocula a densidades celulares superiores que las cepas indígenas como cuando la inoculación se realiza a densidad celular inferior.
7. Los elementos del sistema de contención biológica para la degradación de alquilbenzoatos integrados en el cromosoma de *P. putida* CMC4 se mantienen establemente en el hospedador tras la introducción de la cepa en condiciones medioambientales, tanto en suelos con o sin plantas.
 8. El sistema de contención biológica descrito es, efectivamente, funcional en condiciones medioambientales de temperaturas moderadas, siendo más efectivo en entornos que garanticen un aporte de nutrientes, la rizosfera.
 9. Tras la introducción en condiciones medioambientales de cepas derivadas de *P. putida* mt-2 contenidas biológicamente o no, no se detectó la dispersión de las mismas fuera de los entornos edáficos, con o sin plantas, donde fueron inoculadas.
 10. La introducción de cepas derivadas de *P. putida* mt-2, contenidas biológicamente o no, en suelos con o sin plantas no se traduce en una alteración de la supervivencia de poblaciones indígenas indicadoras capaces de crecer en distintos medios de cultivo, tanto en condiciones controladas en un invernadero como en condiciones medioambientales.
 11. El fragmento del cromosoma de *P. putida*, aislado por complementación en una cepa de *E. coli* putAP, contenido en el plásmido pCRR831, posee dos marcos abiertos de lectura; uno de los cuales presenta una homología de aproximadamente un 70% con la secuencia de ADN a los genes *putP* de *P. fluorescens*, *S. typhimurium*, *Rickettsia typhi* y *E. coli*, mientras que el otro ORF muestra una tasa de homología de entre el 60 y el 75% con los genes *putA* de *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Rhizobium meliloti* y *Rhodobacter capsulatus*.
 12. Los promotores incluidos en la región intergénica del operón del catabolismo de la prolina de *P. putida* fueron inducidos por la presencia de prolina. La ausencia de este aminoácido provocó un cese de la expresión a partir de dicha zona reguladora.

BIBLIOGRAFÍA



- Abril, M. A., Michán, C., Timmis, N. N., y Ramos, J. L.** 1989. Regulator and enzyme specificities of the TOL plasmid-encoded upper pathway for degradation of aromatics hydrocarbons and expansion of the substrate range of the pathway. *J. Bacteriol.* **171**:6782-6790.
- Allen, S. W., Sentis Willis, A., y Maloy, S. R.** 1993. DNA sequence of the *putA* gene from *Salmonella typhimurium*: a bifunctional membrane-associated dehydrogenase that binds DNA. *Nucl. Acids Res.* **21**:1676.
- Anderson, T. A., Coats, J. R.** 1995. *J. Environ. Sci. and Health* **30**:473-484.
- Aprill, W., y Sims, R. C.** 1990. *Chemosphere* **20**:253-266.
- Bachman, B. J.** 1981. Linkage map of *E. coli* K12, edition 7. *Microbiol.Rev.* **47**:180-230.
- Bagdasarian, M., Lurz, B., Ruchert, B., Franklin, F. C. H., Bagdasarian, M. M., Frey, J., y Timmis, K N.** 1981. Specific purpose plasmid cloning vectors. II Broad host range high copy number, RSF-1010-derived vectors, and host vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. *Gene* **16**:237-247.
- Barber, D. A., y Lynch, J. M.** 1977. Microbial growth in the rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* **9**:305-308.
- Barber, D. A., Martin, J. K.** 1976. The release of organic substances by cereal roots into the soil. *New Phytol.* **76**:68-80.
- Barry, G. F.** 1986. Permanent insertion of foreign genes into the chromosomes of soil bacteria. *Bio/Technology* **4**:446-449.
- Barry, G. F.** 1988. A broad-host range shuttle system for gene insertion into the chromosomes of Gram-negative bacteria. *Gene* **71**:75-84.
- Barry, G. F.** 1992. Construction of reporter strains, p.211-219. In C. H. Collins, M. Sussman, F. A. Skinner, D. E. Stewart-Tull (ed.), *Proc. Int. Conf. Release Genet. Eng. Micro-Org. (REGEM 1)*, 1st, Cardiff, South Wales, Academic, San Diego.
- Bej, A. K., Perlin, M., y Atlas, R. M.** 1991. Effect of introducing genetically engineered microorganisms on soil microbial community diversity. *FEMS Microbiol. Ecol.* **86**:169-176.
- Benizri, R., Schoeny, A., Picard, C., Courtade, A., y Gukert, A.** 1997. External and internal root colonization of maize by two *Pseudomonas* strains; enumeration by enzyme-linked inmunoabsorbent assay. *Curr. Microbiol.* **34**:297-302.
- Benson, S., y J.Shapiro** 1978. TOL is a broad-host-range plasmid. *J.Bacteriol.* **135**:278-280.

- Beringer, J. E., y Barth, M. J.** 1988. The survival and persistence of genetically-engineered microorganisms, p. 29-46. In C. H. Collins, M. Sussman, F. A. Skinner y D. E. Stewart-Tull. (ed.), The release of genetically-engineered microorganisms, Academic Press, Inc., London.
- Bertani, G.** 1951. Studies on lysogenesis I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. J.Bacteriol. **62**:293-300.
- Bowen, G.D.** 1980. Misconceptions, concepts and approaches in rhizosphere biology, p.438. In J. N. Hedger D. C. Ellwood, M. J. Lantman, J. M. Lynch, J. H. Slater. (ed.), Contemporary Microbial Ecology, Academic, London.
- Bowen, G. D., y Rovira, A. D.** 1976. Microbial colonization of plant roots . Annu. Rev. Phytopathol. **14**:121-144.
- Boyer, H. B., y Roulland-Dussoix, D.** 1969. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli* . J.Mol.Biol. **41**:459-472.
- Bradley, D. E., y P. A. Williams** 1982. The TOL plasmid is naturally derepressed for transfer. J. Gen. Microbiol. **128**:3019-3024.
- Brazil, G. M., Kenefick, L., Callanan, M., Haro, A., Lorenzo, V., Dowling, D., y O'Gara, F.** 1994. Appl. Environ. Microbiol. **61**:1946-1952.
- Brockwell, J., Schiwngamer, E. A., y Gault, R. R.** 1977. Ecological studies of root-nodule bacteria introduced into field environments. V. A critical examination of the stability and streptomycin-resistance markers for identification of strains of *Rhizobium trifolii*. Soil Biol. Biochem. **9**:19-24.
- Brown, E. D., y Wood, J. M.** 1993. Conformational change and membrane association of the PutA protein are coincident with reduction of its FAD cofactor by proline. J. Biol. Chem. **268**:8972-8979.
- Brunel, B., Cleyet-Marel, J. C., Normand, P., y Bardin, R.** 1988. Stability of *Bradyrhizobium japonicum* inoculants after introduction into soil. Appl. Environ. Microbiol. **54**:2636-2642.
- Byrd, J. J., Xu, H.S., y Colwell, R. R.** 1991. Viable but nonculturable bacteria in drinking water. Appl. Environ. Microbiol. **57**:875-878.
- Cairney, J., Booth, I. R. y Higgins** 1985. Osmoregulation of gene expression in *Salmonella typhimurium*: *proU* encodes an osmotically induced betaine transport system. J.Bacteriol. **164**:1224-1232.
- Cairney, J., Booth, I.R., y Higgins** 1985. *Salmonella typhimurium proP* gene encodes a transport system for the osmoprotectant betaine. J.Bacteriol. **164**:1218-1223.

- Cairney, J., Higgins, F.C., y Booth, I. R. 1984. Proline uptake through the major transport system of *Salmonella typhimurium* is coupled to sodium ions. J.Bacteriol. **160**:22-27.
- Chabot, R., Antoun, H., Kloepper, J. W., y Beauchamp, C. J. 1996. Root colonization of maize and lettuce by bioluminescent *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. Appl.Environ.Microbiol. **62**:2767-2772.
- Chaboud, A. 1983. Isolation, purification and chemical composition of maize root cap slime. Plant Soil **73**:395-402.
- Chalfie, M., Tu, Y., Eukirchen, G., Ward, W. W., y Prasher, D. C. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. Science **263**:802-805.
- Chaudhry, G. B., y Chapalamadugu, S. 1991. Biodegradation of halogenated organic compounds. Microbiol. Rev. **55**:45-48.
- Chen, C. C., Tsuchiya, T., Yamane, Y., Wood, J. M., y Wilson, T. H. 1985. J. Membr. Biol. **84**:157-164.
- Chen, L., y Maloy, S. 1991. Regulation of Proline Utilization in Enteric Bacteria: Cloning and Characterization of the *Klebsiella put* Control Region. J.Bacteriol. **173**:783-790.
- Cody, C. W., Prasher, D. C., Westler., W. M., Prendergast, F. G., y Ward, W. W. 1993. Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequorea* green fluorescent protein. Biochemistry **32**:1212-1218.
- Colwell, R. R., Brayton, P. R., Grimes, D. J., Roszak, D. B., y Huq, S. A. 1985. Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: implications for release of genetically engineered microorganisms. Bio/Technology **3**:817-820.
- Compeau, G., Al-Achi, B. J., Platsouka, E., y Levy, S. B. 1988. Survival of rifampicine-resistant mutants of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida* in soil systems. Appl.Environ.Microbiol. **54**:2342-2348.
- Contag, C. H., Contag, P. R., Mullins, J. I., Spilman, S. D., Stevenson, D. K., y Benaron, D. A. 1995. Photonic detection of bacterial pathogens in living hosts. Mol.Microbiol. **18**:593-603.
- Contreras, A., Molin. S., y J. L.Ramos. 1991. Conditional-suicide containment system for bacteria which mineralize aromatics. Appl.Environ.Microbiol. **57**:1504-1508.
- Csonka, L. N. 1982. A third proline permease in *Salmonella typhimurium* which functions in media of elevated osmotic strength. J.Bacteriol. **151**:1433-1433.

- Curl, E. A., y Truelove, B.** 1986. The Rhizosphere, p.288. Spring-Verlag., Berlin.
- Dawson, T.D., y Chang, F. B.** 1992. Screening test of the biodegradative capability of a new strain of *Pseudomonas gladioli* (BSU 45124) on some xenobiotic organics. Bull. Environ. Contam. Toxicol. **49**:10-17.
- de Lorenzo, V., y Timmis, K. N.** 1994. Analysis and construction of stable phenotypes in Gram-negative bacteria with Tn5 and Tn10-derived mini-transposons. Methods Enzymol. **235**:386-405.
- de Weger, L.A., Dunbar, P., Mahafee, W. F., Lugtenberg, B. J. J., y Sayler, G.S.** 1991. Use of bioluminescence markers to detect *Pseudomonas* spp. in the rhizosphere. Appl. Environ. Microbiol. **57**:3641-3644.
- de Weger, L. A., Van der Vlugt, C. I., Wijfjes, A. H., Bakker, P. A., Schippers, D., y Lugtenberg, B. B. J.** 1987. Flagella of a plant-growth-stimulating *Pseudomonas fluorescens* strain are required for colonization of potato roots. J. Bacteriol. **169**:2769-2773.
- Delgado, A., Duque, E., y Ramos, J. L.** 1992. Behavior in agricultural soils of a recombinant *Pseudomonas bacterium* that simultaneously degrades alkyl- and haloaromatics. Microb. Releases **1**:23-28.
- Diatloff, A.** 1977. Ecological studies of root-nodule bacteria introduced into field environments-6. Antigenic and symbiotic stability in *Lotononis* rhizobia over a 12-year period. Soil Biol. Biochem. **9**:35-88.
- Dowling, D. N., y O'gara, F.** 1994. Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. TIBTECH. **12**:133-141.
- Doyle, J. D., Short, K. A., Stotzky, G., King, R. J., y Seidler, R. J.** 1991. Ecological significant effects of *Pseudomonas putida* PPO301 (12RO103) genetically engineered to degrade 2,4-dichlorophenoxyacetate, on microbial populations and processes in the soil. Can. J. Microbiol. **37**:682-691.
- Drahos, D. J.** 1991. Current practices for monitoring genetically engineered microorganisms in the environment. AgBiotech News Inf. **3**:39-48.
- Drahos, D. J.** 1991. Field testing of genetically engineered microorganisms. Biotechnol. Adv. **9**:157-171.
- Drahos, D. J., Barry, B. C., Hemming, B. C., Brandt, E. J., y Skipper, H. D.** 1988. Prerelease testing procedures: US field test of a *lacZY*-engineered soil bacterium, p.181-191. In C.H.Collins F.A.Skinner M.Sussman, D.E.Stewart-Tull (ed.), Proc. Int. Conf. Release Genet. Eng. Micro-Org. (REGEM 1), 1st, Cardiff, South Wales, Academic, San Diego.

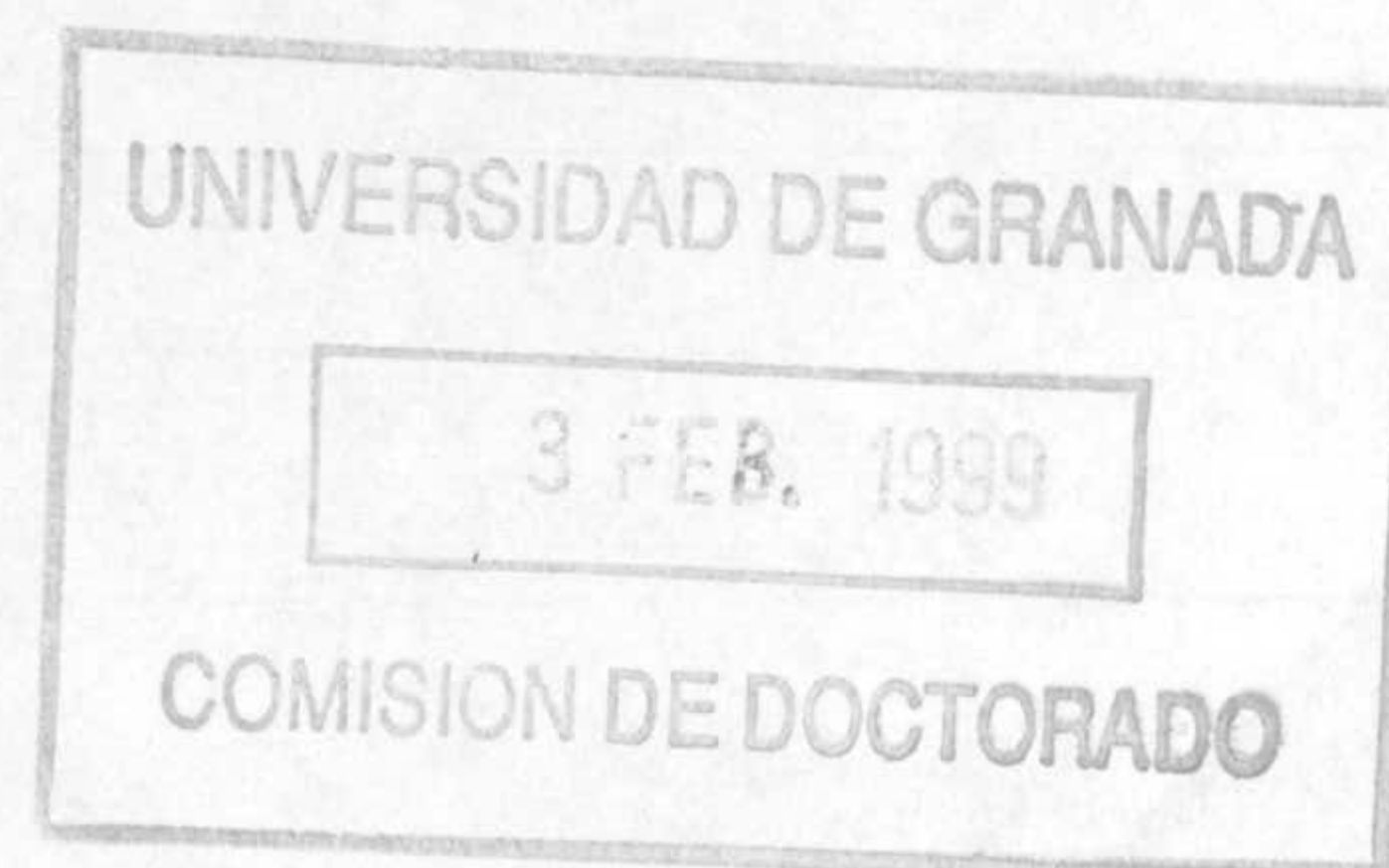
- Drahos, D. J., Barry, G. F., Hemming, B. C., Brandt, E. J., Skipper, H. D., Kline, E. L., y Kluepfel, D. A. H.** 1988. Pre-release testing procedures: U.S. field test of a lacZ-engineering soil bacterium, p.181-191. In C.H.Collins M.Sussman,F.A.Skinner,y D.E.Stewart-Tull. (ed.), The release of a genetically-engineered microorganisms, Academic.Press, London.
- Drahos, D. J., Hemming, B. C., y McPherson, S.** 1986. Tracking recombinant organisms in the environment: 9-galactosidase as a selectable non-antibiotic marker for fluorescent pseudomonads. *Bio/Technology* **4**:439-444.
- Duque, E., Marqués, S., y Ramos, J. L.** 1993. Mineralization of *p*-methyl-¹⁴C-benzoate in soils by *Pseudomonas putida* (pWW0). *Microb. Releases* **2**:175-177.
- Duque, E., Ramos-González, M. I., Delgado, A., Contreras, A., Molin, S., y Ramos, J. L.** 1992. Genetically engineered *Pseudomonas* strains for mineralization of aromatics: survival, performance, gene transfer, and biological containment, S.Silver y B.Witholt. E.Ga.y (ed.), *Pseudomonas: Molecular Biology and Biotechnology*, American Society for Microbiology., Washington D.C..
- Dwyer, D. F., Rojo, F., y Timmis, K. N.** 1988. Fate and behavior in an activated sludge microcosm of a genetically-engineered microorganism designed to degrade substituted aromatic compounds, p.77-88. In C.H M.Sussman, Collins, F.A.Skinner y D.E.Stewart-Tull. (ed.), The release of Genetically-Engineered Microorganisms, Academic Press, London.
- Ekena, K., Liao, M.-K., y Maloy, S.R.** 1990. Activation of a cryptic proline transport system in *Salmonella typhimurium* . *J.Bacteriol.* **172**:2940-2945.
- Ferro, A. M. , Sims, R. C., y Bugbee, B.** 1994. . *J.Environ.Qual.* **23**:272-279.
- *Flamm, E. L., y Leisberg,R.A.** 1985. Primary structure of the *hip* gene of *E. coli* and its product, the beta subunit of integration host factor. *J.Mol.Biol.* **183**:117-128.
- Ford, S., y Olson,B .H.** 1988. Methods for detecting genetically engineered microorganisms in the environment. *Adv.Microbial Ecol.* **10**:45-79.
- Fournier, J.C.** 1980. . *Chemosphere* **9**:169-174.
- Franklin, F. C. H., Bagdasarian, M. M., Bagdasarian, M., y Timmis, K. N.** 1981. Molecular and functional analysis of the TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida* and cloning of the genes for the entire regulated aromatic ring *meta* cleavage pathway. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* **78**:7458-7462.
- Fravel, D. R., Lumsdem, R. D., y Robert, D. P.** 1990. *In situ* visualization of the biocontrol rhizobacterium *Enterobacter cloacae* with bioluminescence. *Plant Soil* **125**:233-238.

- Friedman, D.** 1988. IHF: a protein for all reasons. *Cell* **55**:545-552.
- Galli, E., Silver, S., y Wiltholt, B.** 1992. *Pseudomonas: Molecular Biology and Biotechnology*, American Society for Microbiology., Washington, DC..
- Garland, J. L., y Mills, A. L.** 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:2351-2359.
- Geels, F. P., Lamers, J. G., Hoekstra, O., y Schippers, B.** 1986. Potato plant response to seed tuber bacterization in the field in various rotations. *Neth. J. Pl. Path.* **92**:257-272.
- Glandorf, B.** 1992. Root colonization by fluorescent pseudomonads. Ph.D. thesis. , p.127 pp. Utrecht Univ., Baarn, The Netherlands.
- Goldstein, M. I., Mallory, M., y Alexander, M.** 1985. Reasons for possible failure of inoculation to enhance biodegradation. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**:977-983.
- Goodrich, J., Schwartz, M., y McClure, W** 1990. Searching for and predicting the activity for DNA binding proteins; compilation and analysis of the binding sites for *Escherichia coli* integration host factor (IHF). *Nucleic Acids Res.* **18**:4993-5000.
- Graham, S., Stepheson, J., y Wood, J.** 1984. Proline dehydrogenase from *Escherichia coli* K12. Reconstitution of a functional membrane association. *J. Biol. Chem.* **259**:2656-2661.
- Grinter, N. J.** 1983. A broad-host-range cloning vector transposable to various replicons. *Gene* **21**:133-143.
- Haas, C. N.** 1989. Estimation of microbial densities from dilution count experiments. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:1934-1942.
- Haby, P. A., y Crowley, D. E.** 1996. Biodegradation of 3-chlorobenzoate as affected by rhizodeposition and selected carbon substrates. *J. Environ. Qual.* **25**:304-310.
- Hagblom, M. M.** 1992. Microbial breakdown of halogenated aromatic pesticides and related compounds. . *FEMS Microbiol. Rev.* **9**:29-71.
- Hahn, D., y Maloy, S. R.** 1986. Regulation of the *put* operon in *Salmonella typhimurium*: characterization of promoter and operator mutations. *Genetics* **114**:687-703.
- Hamlen, R. A., Lukezic, F. L., y Bloom, J. R.** 1972. Influence of age and stage of development of the neutral carbohydrate components in root exudates from alfalfa plants grown in a gnotobiotic environment. *Can. J. Plant Sci.* **52**:633-642.
- Hanada, K., Yamato, I., y Anraku, Y.** 1985. Identification of a proline carrier in *Escherichia coli* K12. *FEBS Lett.* 282f.

- Hasting, J. W., Potrikus, C. J., Gupta, C. J., Kurfust, M., y Makemson, J. C. 1985. Biochemistry y physiology of bioluminescent bacteria. *Adv.Microb.Physiol.* **26**:235-291.
- Hawes, M. C., y Pueppke, S. G. 1986. Isolated peripheral root cap cells: yield from different plants, and callus formation from single cells. *Am.J.Bot.* **73**:1466-1473.
- Hayward, D. C., Lecoem, L., Message, B., Delarue, M., Benzer, S., Kasprzak, A. B., Cotsell, J. N., y Young, K. H. 1993. The sluggish-A gene of *Drosophila melanogaster* is expressed in the nervous system and encodes proline oxidase, a mitochondrial enzyme involved in glutamate biosynthesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.Usa* **90**:2979-2983.
- Hebbar, K. P., Davey, A. G., Merrin, J., y Dart, P. J. 1992. Rhizobacteria of maize antagonistic to *Fusarium moliniforme*, a soil-borne fungal pathogen; colonization of rhizosphere and roots. *Soil.Biol.Biochem.* **24**:989-997.
- Heim, R., Prasher, D.C., y Tsien, S.H. 1994. Wavelength mutations and postranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.Usa* **91**:12501-12504.
- Hemming, B.C. , y Drahos, D. J. 1984. β -Galactosidase, a selectable non-antibiotic marker for fluorescent pseudomonads. *J.Cell.Biochem,Suppl.* **8**:252.
- Herrero, M., de Lorenzo, V., y Timmis, K.N. 1990. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in Gram-negative bacteria. *J.Bacteriol.* **172**:6557-6567.
- Hiltner, L. 1904. Über neue Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie und unter besonderes Berücksichtigung der Gründungen und Brache. *Arb.Dtsch-Landwirtk Ges.Berlin.* **98**:59-78.
- Hsu T. S., y Bartha, R. 1979. . *Appl.Environ.Microbiol.* **37**:36-41.
- Hugh, R., y Gilardi, G. L. 1980. Pseudomonads, p.288-317. In E.H.Lennette (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*, 3rd ed. Am. Soc. Microbiol., Washington.
- Höfte, M., Mergeay, M., y Verstraete, W. 1990. Marking the rhizopseudomonas strain 7NSK₂ with a Mu d(*lac*) element for ecological studies. *Appl.Environ.Microbiol.* **56**:1046-1052.
- Jiménez-Zurdo, J. I., García-Rodríguez, F. M. y Toro, N. 1997. The *Rizhobium meliloti putA* gene; its role in the establishment of the symbiotic interaction with alfalfa. *Mol.Microbiol.* **23** (1):85-93.
- Kado, C. I., y S. T. Liu 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J.Bacteriol.* **145**:1365-1373.

- Kasahara, Y., y Hattori, T.** 1991. Analysis of bacterial populations in a grass-land soil according to rates of development on solid media. *FEMS Microbiol.Ecol.* **86**:95-102.
- Kessler, B., de Lorenzo, V., y Timmis K.N.**1992. A general system to integrate *lacZ* fusions into the chromosomes of gram-negatives eubacteria: regulation of de Pm promoter of the TOL plasmid studied with all controlling elements in monocopy. *Mol.Gen.Genet.* **233**:293-301.
- Keunje, B., Masepohl,B., y Klipp, W.** 1995. Expression of the *putA* gene encoding proline dehydrogenase from *Rhodobacter capsulatus* is independent of NtrC regulation but requires an Lrp-like activator protein. *J.Bacteriol.* **177**:6432-6439.
- King, J. M. H., Digrazia, P. M., Applegate, B., Burlage, R., Sanseverino, J., Dunbar, P., Larimer, F.** 1990. Rapid, sensitive bioluminescent reporter technology for naphthalene exposure and biodegradation. *Science* **249**:778-781.
- King, R. J., Short, K. A., y Seidler, R. J.** 1991. Assay for detection and enumeration of genetically engineered microorganisms which is based on the activity of a deregulated 2,4-dichlororphenoxyacetate monooxygenase. *Appl.Environ.Microbiol.* **57**:1790-1792.
- Klein, D. A., Frederick, B. A., Biondini, M., y Trlica, M. J.** 1988. Rhizosphere microorganism effects on soluble amino adds, sugars and organic acids in the root zone of *Agropyron cristatum*, *A. smithii* and *Bouteloua gracilis*. *Plant Soil* **110**:19-25.
- Kloepper, J. W., Liffshitz, R., y Zablutowicz, R. M** 1989. Free living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol.* **7**:39-44.
- Kloepper, J. W., y Schroth, M.** 1981. Relationship of in-vitro antibiosis of plant growth-promoting rhizobacteria to plant growth and the displacement of root microflora. *Phytopathology* **71**:1020-1024.
- Kragelund, L., y Nybroe, O.** 1992. Competition between *Pseudomonas fluorescens* Ag1 and *Alcaligenes eutrophus* JMP134 (pJP4) during colonization of barley roots. *FEMS Microbiol.Ecol.* **20**:41-51.
- Krueger, J. P., Butz, R. G., y Cork, D. J.** 1991. *J.Agric.Food Chem.* **39**:1000-1003.
- Krywicki, K. A., y Brandiss, M.C.** 1984. Primary structure of the nuclear *PUT2* gene involved in the mitochondrial pathway for proline utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol.* **4**:2837-2842.
- Kunc, F.** 1989. p.329-334. In *Interrelationships between Microorganisms and Plants in Soil*, Elsevier, New York.

- Kur, J., Hasan, N., y Szybalski, W.** 1989. Physical and biological consequences of interactions between integration host factor (IHF) and coliphage lambda late *P_R* promoter and its mutants. *Gene* **81**:1-15.
- Laguerre, G., Allard, F., y Lemanceau, P.** 1996. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:2449-2456.
- Legocki, R. P., Legocki, M., Baldwin, T.O., y Szalay, A. A.** 1986. Bioluminescence in soy bean root nodules; demonstration of a general approach to assay gene expression *in vivo* by using bacterial luciferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**:9080-9084.
- Leisinger, T.** 1983. Microorganisms and xenobiotic compounds. *Experientia* **39**:1183-1191.
- Levin, S. A., y Harwell, M. A.** 1986. Potential ecological consequences of genetically engineered organisms. *Environ. Manage.* **10**:495-513.
- Lindow, S. E., Amy, D. C., y Upper, C. D.** 1978. *Erwinia herbicola*: an active ice nucleus incites frost damage to maize. *Phytopathology* **68**:523-527.
- Lindow, S. E., y Panopoulos, N. J.** 1988. Field test of recombinant *Ice⁻Pseudomonas syringae* for biological frost control in potato, p.121-138. In C.H.Colling M.Sussman, F.A.Skinner, y D.E.Stewart.Tull (ed.), *The release of genetically-engineered microorganisms*, Academic Press, London.
- Ling, M., Allen, S. W., y Wood, J. M.** 1994. Sequence analysis identifies the proline dehydrogenase and d-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase domains of the multifunctional *Escherichia coli* PutA protein. *J. Mol. Biol.* **243**:950-956.
- Loper, J. E., Henkels, M. D.** 1992. Ice-nucleation activity as a reporter or *in situ* gene expression by rhizosphere pseudomonads, p. Abstr. A110. In , *Ann. Meet. Am. Phytopathol. Soc.*, Portland, OR.
- Loper, J. L., Suslow, T. V., y Schroth, M. N.** 1984. Lognormal distribution of bacterial populations in the rhizosphere. *Phytopathology* **74**:1454-60.
- Lugtenberg, B. J. J., de Weger, L. A., y Bennett, J. W.** 1991. Microbial stimulation of plant growth and protection from disease. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2**:457-464.
- Lugtenberg, B. J. J., y de Weger, L. A.** 1998. Plant root colonization by *Pseudomonas* spp. , p.13-19. In Silver Gally.E., S. y Wittholt, B. (ed.), *Biotransformation, Pathogenesis and Evolving Biotechnology*, American Society for Microbiology, Washington, D.C.



- Lussenhop, J., Fogel, R. y Pregitzer, K.** 1991. A new dawn for soil biology: video analysis of root soil microbial faunal interactions. *Agric.Ecosyst.Environ.* **34**:235-249.
- Lynch, J. M.** 1982. Interaction between bacteria and plants in the root environment, p.264pp. In F.A. M.E.Skinner (ed.), *Bacteria and Plants*, Academic, London.
- Lynch, J. M.** 1991. Microbial metabolites, p.177-206. In J.M.Lynch (ed.), *The Rhizosphere*, Wiley, Chichester.
- Lynch, J. M., y Wipps, J. M.** 1956. Substrate flows in the rhizosphere, p.386pp. In P.B.Cregan D.L.Keister (ed.), *The Rhizosphere and Plant Growth*, Kluwer, Dordrecht, The Netherlands.
- Maki, R. L., Galyon, E. L., Chang-Chein, M., y Caldwell, D. R.** 1974. Ice nucleation induced by *Pseudomonas syringae*. *Appl.Environ.Microbiol.* **28**:456-460.
- Maloy, S., y Stewart, V.** 1993. Autogenous regulation of gene expression. *J.Bacteriol.* **175**:307-316.
- Maloy, S. R.** 1987. The proline utilization operon, p.1513-1519. In JL Ingraham FC Neidhards,KB Low,B Magasanik,M Schaechter,HE Umbrager (ed.), *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology*, Am Soc Microbiol, Washington DC.
- Maloy, S. R., y Roth,J. R.** 1983. Regulation of proline utilization in *Salmonella typhimurium*, characterization of *put::Mu d(Ap,lac)* operon fusions. *J.Bacteriol.* **154**:561-568.
- Mandelbaum, R. T., Wackett, L.P., y Allan, D.L.** 1993. *Appl.Environ.Microbiol.* **59**:1695-1701.
- Maniatis, T., Fritsch E. F., y Sambrook, J.** 1982. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- McLennan, K., Glover, L. A., Kilham, K., y Prosser, J. I.** 1992. Luminescence-based detection of *Erwinia cartovora* associated with rotting potato tubers. *Lett.Appl.Microbiol.* **15**:121-124.
- Meighen, E. A.** 1988. Enzymes and genes from the *lux* operons of bioluminescent bacteria. *Ann.Rev.Microbiol.* **42**:151-176.
- Meighen, E. A.** 1991. Molecular biology of bacterial bioluminescence. *Microbiol.Rev.* **55**:123-142.
- Menzel, R., y Roth, J.R.** 1981. Purification of *putP* product. *J.Biol.Chem.* **256**:9755-9761.

- Miller, H. I.** 1984. Primary structure of the *himA* gene of *E. coli*; homology with DNA binding protein HU and association with the phenylalanyl-tRNA synthetase operon. Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol. **49**:691-698.
- Miller, V. L., y Mekalanos, J.J.** 1988. A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae*. Journal Bacteriol. **170**:2575-2583.
- Mittelman, M. W., King, M. H., Sayler, G. S., y White, D. C.** 1992. On-line detection of bacterial adhesion in a shear gradient with bioluminescence by a *Pseudomonas fluorescens (lux)* strain. J.Microbiol.Methods **15**:53-60.
- Morgan, J. A. W., Winstanley, C., Pickup, R. W., Jones, J. G., y Saundersm J.R.** 1989. Direct phenotypic and genotypic detection of a recombinant pseudomonad population released into lake water. Appl.Environ.Microbiol. **55**:2537-2544.
- Moënné-Loccoz, Y., McHugh, B., Stephens, P. M., McConnell, F. I., Glennon, J.D., Dowling, D.N., y O'Gara, F.** 1996. Rhizosphere competence of fluorescent *Pseudomonas* spp. B24 genetically modified to utilize additional ferric siderophores. FEMS Microbiol.Ecol. **19**:215-225.
- Murooka, Y., y Imanaka, T.** 1998. Recombinant microbes for industrial and agricultural applications, p.723-831. New York. Basel. Hong Kong.
- Nakao, T., Yamamoto, I., y Anraku, Y.** 1987. Nucleotide sequence of *putC*, the regulatory region for the *put* regulon of *Escherichia coli* K12. Mol.Gen.Genet. **210**:364-368.
- Nakazawa, T., y Yokota, T.** 1973. Benzoate metabolism in *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: demonstration of two benzoate pathways. J.Bacteriol. **115**:262-267.
- Nautiyal, C. S.** 1997. A method for selection and characterization of rhizosphere-competent bacteria of chickpea. Curr.Microbiol. **34**:12-17.
- Newman, E. I.** 1985. The rhizosphere; carbon sources and microbial populations, p.107-121. In A.R.Fritter (ed.), Ecological Interactions in Soil, Blackwell Sci., Boston.
- Nishimura, A., Morita, M., Nishimura, Y., y Sugino, Y.** 1990. A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. Nucl.Acids.Res. **18**:6169.
- Nusslein, K., Maris, D., Timmis, K. N., y Dwyer, D. F.** 1992. Expression and transfer of engineered catabolic pathways harbored by *Pseudomonas* ssp. introduced into activated sludge microcosms. Appl.Environ.Microbiol. **58**:3380-3386.

- O'Brien, K., Deno, G., Ostrovsky de Spicer, P., Gardner, J. F., y Maloy, S. R.** 1992. Integration host factor facilitates repression of the *put* operon in *Salmonella typhimurium*. *Gene* **118**:13-19.
- O'Sullivan, D.J. y O'gara, F.** 1992. Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiol.Rev.* **56**:662-676.
- O'Kane, D.J., Lingle, W. L., Wamper, J. E., Legocki, M., Legocki, R.P., y Szalay, A.A.** 1988. Visualization of bioluminescence as a marker of gene expression in rhizobium-infected soybean root nodules. *Plant Mol.Biol.* **10**:387-399.
- Ostrovsky de Spicer, P., y Maloy, S.** 1991. Regulation of proline utilization in *Salmonella typhimurium*; a membrane associated dehydrogenase binds DNA in vitro. *J.Bacteriol.* **173**:211-219.
- Palomares, A. J., de Luca, M. A., y Heliski, D. R.** 1989. Firefly luciferase as a reporter enzyme for measuring gene expression in vegetative and symbiotic *Rhizobium meliloti* and other Gram-negative bacteria. *Gene* **81**:55-64.
- Parkinson, D., Gray, T. R. G., y Williams, S. T.** 1971. Methods for studying the ecology of soil micro-organisms. *IBP Handb.* **19**:64-66.
- Pemperton, J. M., y Fischer, P. R.** 1977. 2,4-D plasmids and persistence. *Nature* **268**:732-733.
- Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergrast, F. G., y Cormier, M. J.** 1992. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* **111**:229-233.
- Prikryl, Z., y Vancura, V.** 1980. Root exudates of plants VI. Wheat root exudation as dependent on growth, concentration gradient of exudates and the presence of bacteria. *Plant Soil* **57**:69-83.
- Prosser, J. L., Killham, K., Glover, L. A., y Rattray, E. A.** 1996. Luminescence-based systems for detection of bacteria in the environment. *Crit.Rev.Biotechol.* **16**:157-183.
- Ramos, J. L., Marqués, S., y Timmis, K.N.** 1997. Transcriptional control of the *Pseudomonas* TOL plasmid catabolic operons is achieved through an interplay of host factors and plasmid-encoded regulators. *Ann.Rev.Microbiol.* **51**:341-373.
- Ramos, J. L., Andersson, P., Jensen, L. B., Ramos, C., Ronchel, M. C., Díaz, E., Timmis, K. N y Molin, S.** 1995. Suicide microbes on the loose. *Bio/Technology* **13**:35-37.

- Ramos, J.L., Díaz, E., Dowling, D., de Lorenzo, V., Molin, S., O'Gara, F., Ramos, C., y Timmis, K. N. 1994. The behavior of bacteria designed for biodegradation. *Bio/Technology* **12**:1349-1356.
- Ramos, J. L., Duque, E., y Ramos-González, M.I. 1991. Survival in agricultural soils of an herbicide-resistant *Pseudomonas putida* bearing a recombinant TOL plasmid (pWWO). *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:260-266.
- Ramos, J. L., y Timmis, K. N. 1987. Experimental evolution of catabolic pathways of bacteria. *Microbiol. Sci.* **4**:228-237.
- Ramos-González, M. I., Duque, E., y Ramos, J.L. 1991. Conjugational transfer of recombinant DNA in cultures and in soils: host range of *Pseudomonas putida* TOL plasmid. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:3020-3027.
- Ramos-González, M.I., Ramos Díaz, M.A., y Ramos, J.L. 1994. Chromosomal gene capture mediated by the *Pseudomonas putida* TOL catabolic plasmid. *J. Bacteriol.* **176**:4635-4641.
- Rattray, E. A., Prosser, J. L., Glover, L. A., y Kilham, K. 1995. Characterization of rhizosphere colonization by luminescent *Enterobacter cloacae* at the population and single-cell levels. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:2950-2957.
- Rattray, E. A. S., Prosser, J. L., Killham, K., y Glover, L. A. 1990. Luminescence-based nonextractive technique for *in situ* detection of *Escherichia coli* in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:3368-3374.
- Ratzkin, B., y Roth, R. 1978. Cluster of genes controlling proline degradation in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **133**:744-754.
- Reddy, B. R., y Sethunathan, N. 1983. . *Appl. Environ. Microbiol.* **45**:473-484.
- Renwick, A., y Jones, D. 1985. A comparison of the fluorescent ELISA and antibiotic resistance identification techniques for use in ecological experiments with *Rhizobium trifolii*. *J. Appl. Bacteriol.* **58**:199-206.
- Rojo, F., Pieper, D., Engesser, K. H. Knackmuss, H. J. y Timmis, K. N. 1987. Assemblage of ortho cleavage routes for degradation of chloro- and methylaromatics. *Science* **238**:1395-1398.
- Ronchel, M.C., Ramos, C., Jensen, L. B., Molin, S., y Ramos, J. L. 1995. Construction and behavior of biologically contained bacteria for environmental applications in bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:2990-2994.
- Roszak, D. B., y Colwell, R. R. 1987. Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol. Rev.* **51**:365-379.
- Rovira, A.D. 1969. Plant root exudates. *Bot. Rev.* **35**:35-57.

- Rovira, A.D.** 1959. Root excretions in relation to the rhizosphere effect IV. Influence of plant species, age of plant, light, temperature, and calcium nutrition on exudation. *Plant Soil* **11**:53-64.
- Rovira, A. D., Foster, R. C., y Martin, J. K.** 1979. Note on terminology: Origin, nature and nomenclature of the organic materials in the rhizosphere, p.448 pp. In R.S.Russell J.L.Harley (ed.), *The Soil-Root Interface*, Academic, London.
- Russell, R. S.** 1977. *Plant Root Systems: Their Function and Interaction with the Soil*, p.298pp. McGraw-Hill, London.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., y Maniatis, T.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cod Spring Harbor, New York.
- Sanderson, K.E., y Roth, J.R.** 1983. Linkage map of *Salmonella typhimurium*, edition 6. *Microbiol.Rev.* **47**:410-453.
- Sandman, E. R., y Loos, M. A.** 1984. . *Chemosphere* **13**:1073-1084.
- Schippers, B., Bakker, A. W., y Bakker, P. A. H. M** 1987. Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. *Annu.Rev.Phytopathol.* **25**:339-358.
- Schmidt, T. M., Kopecky, K., y Nealson, K. H.** 1989. Bioluminescence of the insect pathogen *Xanthorhabdus luminescens* . *Appl.Environ.Microbiol.* **55**:2607-2612.
- Shaw, J. J., Dane, F., Geiger, D., y Kloepper, J. W.** 1992. Use of bioluminescence for detection of genetically engineered microorganisms released into the environment. *Appl.Environ.Microbiol.* **58**:267-273.
- Shaw, J. J., y Kado, C. I.** 1986. Development of a *Vibrio* bioluminescence gene-set to monitor phytopathogenic bacteria during de ongoing disease process in a non-disruptive manner. *Biotechnology* **4**:560-564.
- Shimomura, O.** 1979. Structure of the chromophore of *Aequorea* green fluorescent protein. *FEBS Lett.* **104**:220-222.
- Shimp, J. F., Tracy, J. C., Davis, L. C., y Lee, E.** 1993. *Rev.Environ.Sci.Technol.* **23**:41-77.
- Siebert, K., Fuehr, F., y Cheng, H. H.** 1981. , p.137-146. In *Theory and Practical Use of Soil Herbicides Symposium*, European Weed Resource Society, Paris.
- Sigh, G., Kathpal, T. S., Spencer, W. F., y Dhankar, J. V.** 1991. . *Environ.Pollution.* **66**:253-262.
- Silverman, M., Martin ,M., y Engebrecht, J.** 1989. Regulation of luminescence in marine bacteria, p.71-86. In D.A.Hopwood y F.Chater. (ed.), *Genetics of Bacterial Diversity*, Academic Press, London.

- Simon, R., O'Connell, M., y Labes, M.** 1986. Plasmid vectors for genetic analysis and manipulation of *Rhizobia* and other gram-negative bacteria. *Methods Enzymol.* **118**:640-659.
- Simons, M., Van der Bij, A. J., Brand, I., de Weger, L. A., Wijffelman, C. A., y Lugtenberg, B. J. J.** 1996. Gnotobiotic system for studying rhizosphere colonization by plant growth-promoting *Pseudomonas* bacteria. *Mol.Plant Microbe Interact.* **9**:600-607.
- Smibert, R. M., y Krieg, N.R.** 1994. Phenotypic characterization, p.611-651. In R.G.F.Murray P.Gerhardt,W.A.Woods y N.R.Krieg (ed.), *Methods for general molecular bacteriology*, ASM, Washington D.C..
- Stacey, G.** 1985. The *Rhizobium* experience, p.109-121. In D.Pramer H.Halvorson,M.Rogul (ed.), *Engineered Organisms in the Environment: Scientific Issues*, Am. Soc. Microbiol., Washington.
- Stewart, G. S. A. B., y Williams, P.** 1992. *lux* genes and the applications of bacterial bioluminescence. *J.Gen.Microbiol.* **138**:1289-1300.
- Straub, P. F., Reynolds, P. H. S., Althomsons, S., Mett, V., Zhu, Y., Sheharer, G., y Kohl, D.H.** 1996. Isolation, DNA sequence analysis y mutagenesis of a proline dehydrogenase gene (*putA*) from *Bradyrhizobium japonicum*. *Appl.Environ.Microbiol.* **62**:221-229.
- Subba-Rao, R. V., y Alexander, M.** 1985. Bacterial and fungal cometabolism of 1,1,1-trichloro-2,2-bis (4-chlorophenyl) ethano (DDT) and its breakdown products. *Appl.Environ.Microbiol.* **49**:509-516.
- Sukupolvi, S., Vaara, M., Helander, I.M., Viljanen, P., y Mäkelä, P. H.** 1984. New *Salmonella typhimurium* mutants with altered outer membrane permeability. *J.Bacteriol.* **159**:704-712.
- Thies, J. E., Singleton, P. W., y Bohlool, B. B.** 1991. Influence of the size of indigenous rhizobial populations on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia on field-grown legumes. *Environ.Microbiol.* **57**:19-28.
- Thomson, I. P., Ellis, R. J., y Bailey, M. J.** 1995. Autoecology of a genetically modified fluorescent pseudomonad on sugar beet. *FEMS Microbiol.Ecol.* **17**:1-14.
- Tiedje, J. M., Colwell, R. K., Grossman, Y.L., y Hodson, R. E.** 1989. The planned introduction of genetically engineered organisms: Ecological considerations and recommendations. *Ecology* **70**:298-315.
- Vancura, V.** 1980. Fluorescent pseudomonads in the rhizosphere of plants and their relation to root exudates. *Folia Microbiol.* **25**:168-73.

- Vancura, V.** 1988. Plant metabolites in soil, p.498pp. In F.Kunc V.Vancura (ed.), Soil Microbial Associations:Control of Structures and Functions, Elsevier, Amsterdam/New York.
- Walton, B. T., y Anderson, T. A.** 1992. . Curr.Opin.Biotechol. **3**:267-270.
- Walton, B. T., y Anderson, T. A.** 1990. Microbial degradation of trichloroethylene in the rhizosphere; potential application to biological remedation of waste sites. Appl.Environ.Microbiol. **56**:1012-1016.
- Wang, S., Hazelrigg, T.** 1994. Implications for bcd mRNA localization from spatial distribution of exu protein in *Drosophila* oogenesis. Nature **369 (6479)**:400-403.
- Wang, S.-S., y Brandiss, M.C.** 1987. Proline utilization in *Saccharomyces cerevisiae*: sequence, regulation, y mitochondrial localization of the *PUT1* gene product. Mol.Cell Biol. **7**:4431-4440.
- Whipps, J. M** 1987. Carbon loss from the roots of tomato and pea seedling grown in soil. Plant Soil **102**:95-100.
- White, D. C.** 1988. Validation of quantitative analysis for microbial biomass, community structure, and metabolic activity. Arch.Hydrobiol.Beih.Ergebn.Limnol. **31**:1-18.
- Williams, P. A., y Murray, K.** 1974. Metabolism of benzoate and the methylbenzoates by *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2 for the existence of a TOL plasmid. J.Bacteriol. **120**:416-423.
- Wood, J. M., y Zadworny, D.** 1979. Characterization of an inducible porter required for L-proline catabolism by *Escherichia coli* K12 . Can.J.Biochem. **57**:1191-1199.
- Worsey, M. J, y Williams, P. A.** 1974. Metabolism of toluene and xylenes by *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2; evidence for anew function of the TOL plasmid. J.Bacteriol. **124**:7-13.
- Xhia, M., Zhu, Y., Cao, X., You, L., y Chen, Z.** 1995. Cloning, sequencing and analysis of a gene encoding *Escherichia coli* proline dehydrogenase. FEMS Microbiol.Lett. **127**:235-242.
- Young, K. H., Schell, M. A., y Hartel, P. G.** 1989. Growth of genetically engineered *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* in soil and rhizosphere. Appl.Environ.Microbiol. **55**:3243-3246.

