

T. Proo. 23/59

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha ... 8/3/99 ...
ENTRADA NUM. ... 828 ...

UNIVERSIDAD DE GRANADA
25 FEB. 1999
COMISION DE DOCTORADO

**SUPERVIVENCIA EN SUELOS DE BACTERIAS DEL
GÉNERO *Pseudomonas* QUE DEGRADAN Y
METABOLIZAN DISOLVENTES ORGÁNICOS**

T 4/116

Facultad de Ciencias
UNIVERSIDAD DE GRANADA

**SUPERVIVENCIA EN SUELOS DE BACTERIAS DEL GÉNERO
Pseudomonas QUE DEGRADAN Y METABOLIZAN DISOLVENTES
ORGÁNICOS**

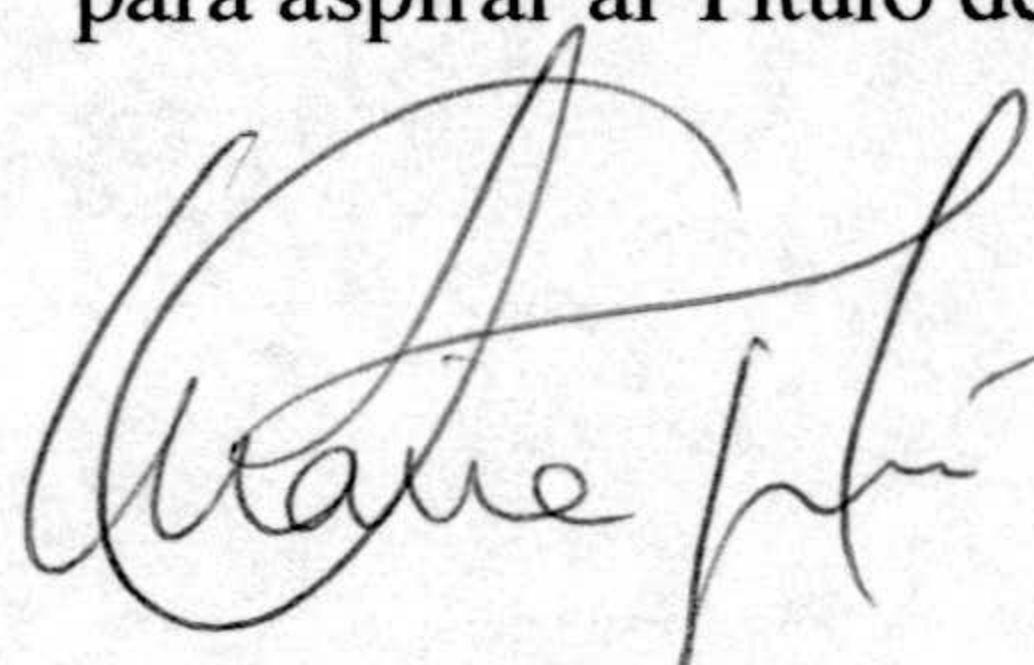
BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
N.º Documento <u>61337907</u>
N.º Copia <u>15496375</u>

Mª José Huertas Romera

1999

**SUPERVIVENCIA EN SUELOS DE BACTERIAS DEL GÉNERO
Pseudomonas QUE DEGRADAN Y METABOLIZAN DISOLVENTES
ORGÁNICOS**

Memoria que presenta la Licenciada en
Biología M^a José Huertas Romera
para aspirar al Título de Doctor



Fdo.: M^a José Huertas Romera

V^oB^o
El Director



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

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.

Al final de la escritura de esta Tesis Doctoral quiero expresar mi agradecimiento a las personas que de algún modo han contribuido a su realización:

Al Dr. Juan Luis Ramos, director de este trabajo, por brindarme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación. Por la confianza que ha depositado en mí durante estos años, por su cercanía y por su capacidad de trabajo, cualidades que me han ayudado a la realización de esta Tesis Doctoral.

A la Red de Microorganismos de Interés Medioambiental que me proporciono la ocasión de disfrutar una breve estancia en Palma de Mallorca. Al Dr. Jorge Lalucat por abrirme las puertas de su laboratorio y por su cordial acogida. A Marga Amat por hacerme sentir como en casa. Al Dr. Ramón Rosselló por su acogida (aunque no fuese el mejor momento), por su disponibilidad para todo lo que necesité y por la realización de los árboles filogenéticos.

A todos los que integran el Grupo de Degradación de Tóxicos Orgánicos por permitirme trabajar con alegría y por el apoyo que he recibido, en todos los aspectos, durante todos estos años. A M^a Angustias por su cercanía y cariño y por permitir que podamos trabajar comodamente en el laboratorio. A May y Carmen por su disponibilidad para todo lo que he necesitado en estos años. A Estrella por ayudarme en mis primeros contactos con las “amadas” curvas de crecimiento y con los microcosmos, por su paciencia y su disponibilidad.

A los “grandes” doctores que encontré al inicio de este trabajo: A Carmina, por sus sabios consejos, por rescatarme cuando estaba pérdida y por su amistad; a Asun por su cercanía aunque estemos a muchos kilómetros de distancia; a Silvia, Mari Trini y Cayo por la disponibilidad y por su ayuda en mis primeros pasos en el laboratorio. También a los “grandes” pero más recientes: A Ana, Maribel, Frank y Manolo por hacerme más llevadera la última etapa de esta Tesis.

A Raquel y M^a del Mar por hacerme tan “dulce” y grata el inicio de la escritura de esta Tesis, por apoyarme y darme ánimos en los momentos más duros de la misma...gracias por todo, todavía os debo una bolsita de golosinas!!!. A Gilberto por hacerme reír en tantas ocasiones y por estar disponible en todos los momentos en los que lo he necesitado. A Maxi, mi compañero desde pequeño, por darme a conocer este grupo y por los momentos que hemos compartido. A Abraham y Susana por compartir conmigo los mejores años en el Salon-Comedor...Suerte en vuestras Tesis!! A Chechu por estar disponible en todo momento y a M^a Carmen por su alegría. A Patricia por estar siempre disponible cuando la he necesitado. A Mati por su alegría inocente y a Mariam por esos ratitos de charla. A Miguel por hacerme más llevaderos los experimentos por las tardes y por cederme a “Sanpa” en alguna que otra ocasión. A Vitor por su colaboración en la realización de los experimentos en columnas de suelo, que nos han traído algún que otro quebradero de cabeza, y por alguna que otra cena fuera del trabajo.

A Lázaro, por ser mi mejor amigo y aguantar estoicamente mis ataques de genio. A Coral por ser mi pareja de hecho, por todo lo que hemos compartido en estos últimos años, por su apoyo incondicional en estos últimos meses y que permiten que la considere como mi una de mis mejores amigas. A María José, mi tocaya, por su toque de sensibilidad, su espíritu crítico y por todo el apoyo que he recibido de ella durante todos estos años. A Upe una mezcla de alegría desbordada y sensibilidad con la que he pasado mis mejores momentos en este grupo, considero que tengo una amiga para toda la vida. A M^a Angeles por su apoyo, su cariño y por su personalidad, cualidades que me han servido en todos los aspectos de mi vida.

A Luis Collados por su amabilidad y simpatía y por poner a mi disposición la oportunidad de empezar a escribir la Tesis con un PC.....y a Jose por acelerar la reparación de mi MAC.

Al Piso 7^oD por permitirme pasar los años más divertidos de mi Tesis: a Sergio por el optimismo que desprende y por su cariño, a Tara por ser un “guiri inusual” y a Juan por ser como es.

Al Colegio Mayor Jesús-María, mi casa en los últimos años de mi carrera. Por los aires que respiré, por las amistades que hice y por el apoyo que recibí en aquellos años especialmente duros para mi y para mi casa.

A Maribel, Encarni, Inma, Belén y Celia por enseñarme que existen muchas cosas importantes en la vida aparte del trabajo. A Nancy por haber estado tan cerca de mi en estos últimos meses.

A mis amigas Reme y Quite con las que se puede contar en todo momento aunque nos veamos poco.

A M° Angeles, Manolo y Pablo (y uno que viene....) por su generosidad y por enseñarme que existen muchos valores importantes en la vida.

A mis amigos de la Tuna del Loyola, especialmente a Juan Antonio, el cuñado mejor que uno pude tener y a Miguel, por compartir conmigo una de mis mayores aficiones. Por hacerme más fácil en muchos momentos la realización del trabajo experimental de esta Tesis.

A la Peña de la Plateria: David, Tanas, Estefi, Shica, Lasa y Tute y a los que en algunas ocasiones se han unido a ella (Dori, Miguel, Raúl y Raqueel). Por los buenos ratos que hemos pasado y por todo el apoyo en momentos buenos y malos que he recibido de todos.

A mi familia especialmente a mi madre y a mis hermanas, Lourdes y Silvia, que son una de las cosas más importantes en mi vida. Gracias por vuestro apoyo sin el cual no hubiese sido capaz de llegar hasta aquí. A mis sobrinas Isabel y Raquel por hacerme tan gratos los fines de semana y evadirme del trabajo en casi todas las ocasiones.

A Alfonso por su apoyo en los buenos y malos momentos, por su cercanía constante a pesar de la distancia. Al fin....lo hemos conseguido.

A P.D.A y a Granada (Morris, 1997).

Y como en esta vida es ser bien nacidos ser agradecidos... a todos los que han colaborado de algún modo a la realización de este trabajo.

A TODOS GRACIAS

Esta Tesis está dedicada especialmente a mi padre, quien siempre pensó que yo era capaz de conseguirlo todo. Su recuerdo ha sido uno de los impulsores para la finalización de este trabajo.

A mi madre.

A Alfonso.

INDICE

INDICE	i
INTRODUCCIÓN	1
I. OXIDACIÓN BACTERIANA DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS	5
1. PRINCIPIOS GENERALES DE LAS RUTAS DE DEGRADACIÓN AEROBIAS PARA EL METABOLISMO DE AROMÁTICOS	6
1.1. Formación de derivados hidroxilados	6
1.2. Rotura del anillo aromático	7
1.3. Degradación de los productos resultantes de la fisión del anillo aromático hasta intermediarios del ciclo de Krebs	9
2. RUTAS DESCRITAS PARA BIODEGRADACIÓN AEROBIA DE TOLUENO POR PARTE DE CEPAS PERTENECIENTES AL GÉNERO <i>Pseudomonas</i>	10
2.1. Ruta TOL	10
2.2. Ruta TOD	13
2.3. Ruta de la tolueno 4-monooxigenasa.	15
2.4. Ruta de la tolueno 3-monooxigenasa.	17
2.5. Ruta de la tolueno 2-monooxigenasa.	19
II. TOLUENO: TOXICIDAD Y MECANISMOS DE ADAPTACIÓN	21
1. EFECTOS TÓXICOS DE LOS DISOLVENTES ORGÁNICOS SOBRE LOS MICROORGANISMOS	21
1.1. Efectos de los disolventes orgánicos sobre las funciones de la membrana celular	22
1.1.1. Efectos sobre la función de barrera.	22
1.1.2. Efectos sobre la función de matriz	23
2. ADAPTACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS A CONCENTRACIONES ELEVADAS DE DISOLVENTES ORGÁNICOS	23
2.1. Adaptaciones a nivel de membrana.	24
2.1.1. Membrana citoplásmica.: cambios en la composición de ácidos grasos y fosfolípidos y sus grupos de cabeza	24
2.1.2. Membrana externa.	26

3. ESTRATEGIAS BACTERIANAS PARA PREVENIR LA ACUMULACIÓN DE DISOLVENTES ORGÁNICOS EN LAS MEMBRANAS CELULARES	27
3.1. Degradación o modificación del disolvente	27
3.2. Mecanismos de exclusión activa	27
OBJETIVOS	29
MATERIALES Y MÉTODOS	33
1. CEPAS BACTERIANAS	35
2. MEDIOS DE CULTIVO	35
2.1. Medios ricos	35
2.2. Medios mínimos	35
2.3. Antibióticos	37
2.4. Sales Metálicas	38
3. CONSERVACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS	38
4. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS DE SUELO	38
4.1. Aislamiento de bacterias del suelo	38
4.2. Identificación de las bacterias aisladas de suelo	38
5. PLÁSMIDOS	39
6. AISLAMIENTO DE ADN PLASMÍDICO	42
6.1. Método "Qiapreps"	42
6.2. Método de la lisis alcalina.	42
6.3. Aislamiento de plásmidos a gran escala.	43
6.4. Aislamiento de plásmidos TOL	44
7. AISLAMIENTO DE ADN TOTAL	45
8. TRANSFERENCIA DE PLASMIDOS POR CONJUGACIÓN	45
9. MANIPULACIÓN DE ADN	46
9.1. Determinación de la concentración de ADN	46
9.2. Restricción 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. Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa termorresistente (PCR)	47
9.6. Secuenciación de ADN	48
10. TRANSFERENCIA DE ADN A MEMBRANA POR EL MÉTODO DE "SOUTHERN BLOT" E HIBRIDACIÓN	48
10.1. Transferencia del ADN	48
10.1.1. Por capilaridad	48
10.1.2. Por vacío	50
10.2. Marcaje de ADN lineal	50
10.3. Prehibridación e hibridación	51
10.4. Reacción inmunológica.	51
11. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS LIBRES DE CÉLULAS	52
12. MEDIDA DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS	52
12.1. Medida de actividad catecol 2,3-dioxigenasa.	52
12.2. Medida de actividad catecol 1,2-dioxigenasa.	53
12.3. Ensayo de actividad β -galactosidasa.	53
13. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS	54
14. ANÁLISIS DE LÍPIDOS	55
14.1. Extracción y purificación de lípidos	55
14.2. Preparación de ésteres metílicos de ácidos grasos de lípidos	55
14.3. Análisis de los ésteres metílicos por cromatografía de gases (CG)	55
15. ELECTRODO DE OXÍGENO	56
15.1. Calibración	56
15.2. Medida del consumo de oxígeno en suspensiones bacterianas	56
16. EXPERIMENTOS EN SUELO	57
16.1. Ensayos con microcosmos	58

17. COLUMNAS DE SUELO	59
17.1. Diseño de la columna.	59
17.2. Inoculación y toma de muestras	59
17.3. Seguimiento de O ₂ , CO ₂ y tolueno por cromatografía de gases	60
18. MINERALIZACIÓN DE ¹⁴C-TOLUENO EN MICROCOSMOS EDÁFICOS	61
RESULTADOS	63
I. CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DE UNA CEPA <i>Pseudomonas putida</i> CAPAZ DE TOLERAR ALTAS CONCENTRACIONES DE DISOLVENTES ORGÁNICOS	65
1. AISLAMIENTO DE UNA CEPA DEL GÉNERO <i>Pseudomonas</i> TOLERANTE A ALTAS CONCENTRACIONES DE TOLUENO Y CAPAZ DE UTILIZARLO COMO FUENTE DE CARBONO	66
2. CARACTERIZACIÓN DE LA CEPA DOT-T1	66
2.1. Identificación de la cepa DOT-T1	66
2.2. Utilización de tolueno como fuente de carbono por la cepa <i>Pseudomonas putida</i> DOT-T1	67
2.3. Ultraestructura de <i>P. putida</i> DOT-T1	68
3. <i>Pseudomonas putida</i> DOT-T1 TOLERA CONCENTRACIONES ELEVADAS DE TOLUENO	71
3.1. Tolerancia a tolueno por <i>P. putida</i> DOT-T1	71
3.2. Tolerancia a tolueno por parte de otras cepas del género <i>Pseudomonas</i>	73
4. PAPEL PROTECTOR DE LOS IONES Mg²⁺ EN LA TOLERANCIA A TOLUENO	75
4.1. Efecto de distintos cationes en la tolerancia a tolueno de <i>P. putida</i> DOT-T1	75
4.2. Efecto de distintos cationes en la tolerancia a tolueno de otras cepas del género <i>Pseudomonas</i>	76
5. <i>Pseudomonas putida</i> DOT-T1 TOLERA DISOLVENTES ORGÁNICOS CUYO LogP_{ow} ES MAYOR DE 2.3	77
5.1. Crecimiento de <i>P. putida</i> DOT-T1 en la presencia de disolventes orgánicos	78
5.2. Tolerancia de otras cepas del género <i>Pseudomonas</i> a concentraciones elevadas de otros disolventes orgánicos	78

II. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEGRADADORAS DE TOLUENO DE SUELOS CONTAMINADOS	81
1. AISLAMIENTO DE CEPAS DEGRADADORAS DE TOLUENO	82
1.1. Supervivencia de la microbiota indígena en presencia de concentraciones elevadas de tolueno	82
1.1.1. Tolerancia a tolueno por la microbiota en otros tipos de suelo	83
1.2. Aislamiento de cepas degradadoras de tolueno	84
2. CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS MTB5 Y MTB6	85
2.1. Identificación de las cepas MTB5 y MTB6	85
2.2. Encuadre filogenético de las cepas MTB5 y MTB6	86
3. TOLERANCIA A TOLUENO Y OTROS DISOLVENTES ORGÁNICOS POR PARTE DE LAS CEPAS <i>P. putida</i> MTB5, MTB6 Y SMO116	88
3.1. Tolerancia a tolueno.	88
3.2. Tolerancia a otros disolventes orgánicos	89
4. RESPUESTA FISIOLÓGICA DE LAS CEPAS DE <i>P. putida</i> MTB5, MTB6 Y SMO116 A CONCENTRACIONES ELEVADAS DE TOLUENO EN EL MEDIO DE CULTIVO	89
4.1. Determinación cuantitativa de lípidos en células de <i>P. putida</i> MTB5, MTB6 y SMO116 cultivadas en medio LB en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de tolueno	90
4.2. Análisis de la acumulación de ¹⁴ C-tolueno en las membranas celulares de las cepas MTB5, MTB6 y SMO116	95
4.3. Análisis molecular mediante amplificación de la presencia de genes que codifican para los sistemas activos de eliminación de disolventes	96
5. DEGRADACIÓN DE TOLUENO POR PARTE DE LAS CEPAS <i>P. putida</i> MTB5, MTB6 Y SMO116	97
5.1. Oxidación de posibles intermediarios de distintas rutas de degradación de tolueno por las cepas MTB5, MTB6 y SMO116	97
5.1.1. Medida del consumo de oxígeno en células de la cepa MTB5	97
5.1.2. Medida del consumo de oxígeno en células de la cepa MTB6	100
5.1.3. Medida del consumo de oxígeno en células de la cepa SMO116	101
5.2. Medida de actividades enzimáticas: catecol 2,3-dioxigenasa y catecol 1,2-dioxigenasa en extractos de células de MTB5, MTB6 y SMO116	102

5.3. Análisis de la presencia o ausencia de genes implicados en la degradación de tolueno mediante amplificación con oligonucleótidos derivados de distintas rutas degradativas en las cepas MTB5, MTB6 y SMO116.	105
III. SUPERVIVENCIA EN SUELOS DE CEPAS DEL GÉNERO <i>Pseudomonas</i> DEGRADADORAS DE TOLUENO	111
1. SUPERVIVENCIA DE CEPAS DEGRADADORAS DE TOLUENO EN MICROCOSMOS EDÁFICOS	112
1.1. Elección de marcadores para las cepas a inocular en suelo. Estudio de las resistencias naturales a antibióticos que presenta la microbiota del suelo	112
1.2. Supervivencia en microcosmos edáficos de <i>P. putida</i> DOT-T1E, EEZ15R, F1R, MTB6R, MTB5R, SMO116R y <i>P. mendocina</i> KR1R	113
1.2.1. Supervivencia en microcosmos edáficos en ausencia de disolventes orgánicos	113
1.2.2. Supervivencia de cepas de <i>P. putida</i> en microcosmos edáficos en presencia de concentraciones crecientes de tolueno	114
1.2.2.1. Supervivencia en el tiempo de DOT-T1E tras choque con tolueno	116
1.2.3. Supervivencia de <i>P. putida</i> DOT-T1E y F1R en presencia de otros disolventes orgánicos	118
2. ESTUDIO DE LOS FACTORES QUE AFECTAN A LA SUPERVIVENCIA DE LAS CEPAS EN MICROCOSMOS EDÁFICOS	119
2.1. Efecto de la humedad del suelo sobre la supervivencia de <i>P. putida</i> DOT-T1Ey F1R	119
2.2. Efecto de la temperatura sobre la supervivencia de <i>P. putida</i> DOT-T1E y F1R en suelo	122
2.3. Supervivencia de <i>P. putida</i> DOT-T1E y F1R en suelo inoculado a diferentes densidades celulares iniciales	123
2.4. Efecto del preestablecimiento en suelo sobre la supervivencia de <i>P. putida</i> DOT-T1E y F1R	125
3. ESTUDIO DE LA COMPETENCIA ENTRE CEPAS DEL GÉNERO <i>Pseudomonas</i> DEGRADADORAS DE TOLUENO EN SUELOS CONTAMINADOS	126
3.1. Marcaje de las cepas a introducir en suelo para ensayos de competencia.	127
3.2. Inoculación conjunta de <i>P. putida</i> DOT-T1-Km y F1-Tel	128
3.3. Inoculación conjunta de <i>P. putida</i> DOT-T1-Km y MTB6R	130
4. MINERALIZACIÓN DE ¹⁴C-TOLUENO EN SUELO	131

5. SUPERVIVENCIA DE LAS CEPAS DE <i>P. putida</i> DOT-T1E, F1, MTB5, MTB6 Y SMO116 EN PRESENCIA DE MEZCLAS COMPLEJAS DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS	133
6. SUPERVIVENCIA Y DISTRIBUCIÓN DE <i>P. putida</i> DOT-T1E EN MICROCOSMOS COMPLEJOS CONTAMINADOS CON TOLUENO	134
6.1. Establecimiento y multiplicación de DOT-T1E a lo largo de una columna de suelo en presencia de tolueno	134
6.1.1. Influencia de la concentración de oxígeno en la supervivencia de DOT-T1E en columnas de suelo	136
6.1.2. Medida de la concentración de tolueno y CO ₂ en columnas de suelo inoculadas con DOT-T1E y en presencia de tolueno	139
6. 2. Distribución de la cepa DOT-T1E a lo largo de la columna de suelo	140
6.2.1. Distribución en columnas con tolueno	140
6.2.2. Distribución vertical en columnas en presencia de mezclas de hidrocarburos	141
DISCUSIÓN.....	143
1. CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DE UNA CEPA DE <i>Pseudomonas</i> CAPAZ DE TOLERAR ALTAS CONCENTRACIONES DE DISOLVENTES ORGÁNICOS	146
2. AISLAMIENTO DE CEPAS DEGRADADORAS DE TOLUENO EN SUELOS CONTAMINADOS	148
2.1. Respuesta fisiológica a concentraciones elevadas de disolventes	149
2.2. Degradación de tolueno	152
3. SUPERVIVENCIA EN SUELO DE CEPAS DEGRADADORAS DE TOLUENO	154
3.1. Supervivencia en columnas de suelo	159
CONCLUSIONES	163
BIBLIOGRAFÍA	169

INTRODUCCIÓN



La liberación a la biosfera de productos aromáticos ha aumentado en los últimos años como consecuencia de las actividades agrícola e industrial del hombre. Muchos de estos compuestos son mineralizados por organismos vivos, es decir son transformados en CO₂, H₂O y en compuestos inorgánicos. Sin embargo otros, los xenobióticos, persisten en el medio ambiente, bien porque son tóxicos en algún grado para los microorganismos, o bien porque sus estructuras o sustituyentes son inusuales; razón por la cual éstos permanecen inalterados o son sólo parcialmente transformados a compuestos que siguen siendo recalcitrantes. De esta forma, los compuestos xenobióticos constituyen el punto y final de un flujo unidireccional que, partiendo de los recursos naturales, conduce a productos que no son degradados o lo son muy lentamente.

Entre los contaminantes detectados frecuentemente en el medio ambiente se encuentran tolueno y otros disolventes orgánicos tales como xilenos, benceno y etilbenceno. La producción mundial de tolueno se estima en más de 8×10^4 toneladas métricas por año y en más de 5×10^6 toneladas métricas para el conjunto de los hidrocarburos aromáticos citados (Gibson y Subramanian, 1984). Estos hidrocarburos aromáticos son extremadamente tóxicos para los seres vivos. La razón estriba en que se disuelven en las membranas celulares y las desorganizan, dando lugar no sólo a la disipación del potencial de membrana celular, sino también a la pérdida de iones, proteínas y lípidos (Sikkema *et al.*, 1995); daños generalizados que conducen a la muerte celular.

A pesar de la toxicidad del tolueno y otros hidrocarburos aromáticos, se han descrito microorganismos capaces de utilizar tolueno como fuente de carbono y se han establecido las rutas para su degradación, particularmente, en cepas pertenecientes al género *Pseudomonas* (Gibson *et al.*, 1970, Olsen *et al.*, 1994, Ramos *et al.*, 1995, Shields *et al.*, 1989, Whited y Gibson, 1991, Worsey y Williams, 1975, Yen *et al.*, 1991). La amplia distribución de microorganismos capaces de degradar compuestos aromáticos es debido a que durante millones de años, los microorganismos han estado expuestos a bajas concentraciones de estos compuestos, formados durante procesos naturales tales como la combustión de maderas (Gibson y Subramanian, 1984; Ramos y Rojo, 1990). No obstante, como consecuencia del uso industrial masivo de disolventes orgánicos, se han generado vertederos que contienen cantidades de compuestos aromáticos por encima de los niveles de toxicidad, lo que impide la colonización de estos lugares por parte de microorganismos biodegradadores. Además, a causa de accidentes se han localizado lugares que contienen concentraciones extremadamente altas de estos disolventes llegando los mismos a convertirse en "desiertos".

Como hemos referido anteriormente, los compuestos aromáticos son extremadamente tóxicos para los microorganismos y un factor crítico en la degradación de éstos, en zonas contaminadas, es la tolerancia a estos compuestos. Recientemente se han descrito cepas del género *Pseudomonas* que toleran altas concentraciones de disolventes orgánicos, tales como tolueno, xileno, estireno y otros (Cruden *et al.*, 1992, Inoue y Horikoshi, 1989, Ramos *et al.*, 1995, Weber *et al.*, 1994). Además diferentes grupos de investigación están estudiando las bases fisiológicas y moleculares que permiten a estos microorganismos ser resistentes a altas concentraciones de disolventes orgánicos (Isken y de Bont, 1996, Ramos *et al.*, 1997a y 1998, Segura *et al.*, 1999).

El objeto de este trabajo ha sido la caracterización de microorganismos capaces de mineralizar y de tolerar altas concentraciones de disolventes orgánicos y su aplicación en estudios en suelos que presentan elevadas concentraciones de los mismos. En esta sección de Introducción se describen las rutas generales de degradación oxidativa de compuestos aromáticos sustituidos con grupos alquílicos, y las bases fisiológicas y moleculares que permiten a los microorganismos tolerar altas concentraciones de los mismos.

I. OXIDACIÓN BACTERIANA DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS

El anillo bencénico es una de las estructuras químicas más abundante en la naturaleza. Éste está fuertemente estabilizado por resonancia y su degradación, es crucial para el mantenimiento del ciclo del carbono en la biosfera (Dagley 1978). Así la biodegradación de compuestos aromáticos ha de ser considerada, por una parte como parte normal del ciclo del carbono en la naturaleza, y por otra, como una de las vías más importantes de eliminación de contaminantes producidos por el hombre al medio ambiente.

En 1908 Stormer describió por primera vez la utilización, por parte de una cepa de *Bacillus*, de tolueno y xileno como fuente de carbono y energía. En 1913 Söhngen publicó un estudio donde describía la utilización de benceno por parte de microorganismos y un año más tarde Wagner aisló dos microorganismos capaces de crecer en una mezcla de benceno, tolueno y xileno. En 1928 Gray y Thornton realizaron una serie de estudios utilizando diferentes tipos de suelos y encontraron que en más de la mitad de los suelos analizados existían bacterias capaces de oxidar naftaleno, fenol y cresol. Éste fue uno de los primeros estudios en los que se puso de manifiesto la ubiquidad en suelos de microorganismos degradadores de hidrocarburos aromáticos. Estas observaciones prepararon el terreno para el inicio de estudios detallados sobre la degradación de compuestos aromáticos que comenzó pasada la Segunda Guerra Mundial. Desde aquí y hasta ahora se ha avanzado mucho en la comprensión de los mecanismos que utilizan los microorganismos para salvar la energía de activación necesaria para romper el anillo aromático y generar estructuras carbonadas lineales que son las únicas asimilables por los seres vivos. Se han descrito numerosas rutas de degradación de hidrocarburos aromáticos por microorganismos pertenecientes a diferentes géneros de bacterias gram-negativas y gram-positivas, y entre éstas en particular en cepas del género *Pseudomonas*. Los microorganismos pertenecientes a este género se caracterizan por poseer gran versatilidad metabólica y una amplia distribución en habitats naturales, incluyendo suelos, aguas dulces y marinas, rizosfera de plantas, etc.

1. PRINCIPIOS GENERALES DE LAS RUTAS DE DEGRADACIÓN AEROBIAS PARA EL METABOLISMO DE AROMÁTICOS

En general para la desestabilización del anillo aromático los microorganismos han desarrollado una estrategia común que es la activación del anillo mediante la introducción de dos grupos hidroxilo (Dagley, 1986). Una característica común de los mecanismos de degradación de compuestos aromáticos por bacterias es la canalización de sustratos hasta un número limitado de productos que posteriormente son catabolizados por las rutas centrales del metabolismo celular. Existe un gran número de enzimas que catalizan las reacciones iniciales de las rutas catabólicas en los distintos microorganismos. El perfil de sustratos de estas enzimas es amplio, y los tipos de reacciones que llevan a cabo están encaminados a la activación del anillo aromático.

Las rutas descritas en bacterias para la asimilación aeróbica de sustratos aromáticos se puede considerar dividida en tres partes (Dagley, 1986, Harayama y Timmis, 1992): La formación de derivados hidroxilados, la rotura de éstos por dioxigenasas y la conversión del producto de ruptura en compuestos que pueden entrar directamente al metabolismo central de la célula.

1.1 Formación de derivados hidroxilados.

Uno de los primeros pasos en la degradación de compuestos aromáticos implica la introducción de uno o dos grupos hidroxilos en el anillo aromático (Harayama y Timmis, 1989). Un mismo compuesto puede sufrir distintos tipos de ataque que conduzcan a la forma activada con los dos grupos hidroxilo. La introducción de uno o dos grupos hidroxilo, mono o dihidroxilación, es llevada a cabo por enzimas denominadas oxigenasas que catalizan la incorporación del oxígeno a sustratos orgánicos como grupos hidroxilo. Las oxigenasas que catalizan la incorporación de un solo átomo de oxígeno en su sustrato se denominan monooxigenasas. El segundo átomo de oxígeno es reducido a H₂O. Las oxigenasas, que catalizan la incorporación de los dos átomos de oxígeno se denominan dioxigenasas. Estas incorporan dos grupos hidroxilo en el anillo aromático a expensas de oxígeno y NAD(P)H (Harayama, Kok y Neidle, 1992).

En las reacciones aeróbicas descritas para la formación de derivados dihidroxilados a partir de tolueno existen monooxigenasas capaces de hidroxilar inicialmente las posiciones *orto*, *meta* o *para* del anillo aromático (Shields *et al.*, 1989, Olsen *et al.*, 1994 y Whited y Gibson, 1991a). Mientras que el *o*- y *m*-cresol formados son de nuevo hidroxilados para rendir 3-metilcatecol, la oxidación del *p*-cresol sigue un mecanismo distinto, primero este se oxida secuencialmente hasta *p*-hidroxibenzoato y éste es

hidroxilado a 3,4-dihidroxibenzoato. Alternativamente la cadena alquílica lateral del tolueno puede ser atacada por una monooxigenasa que la oxida hasta un grupo alcohol; el alcohol bencílico formado es sustrato de deshidrogenasas que lo oxidan secuencialmente hasta ácido benzoico. Posteriormente este es descarboxilado y oxigenado para producir catecol (Worsey y Williams, 1975). Cuando el anillo es sustrato de una dioxigenasa se forma primero un *cis*-diol que es posteriormente oxidado hasta 3-metilcatecol (Gibson *et al.*, 1970). En la sección 2 se describen en detalle la bioquímica de las rutas de degradación aerobia de tolueno.

1.2 Rotura del anillo aromático

Tras la formación de los derivados dihidroxilados actúan distintas dioxigenasas encargadas de la ruptura del anillo aromático (Harayama y Reik, 1989). Se han descrito dos tipos de fisión. En la Figura 1 se muestra los dos tipos de rotura del catecol cuando es sustrato de rotura *orto* o *meta*. Cuando la fisión o ruptura ocurre entre un átomo de carbono con un grupo hidroxilo y el adyacente sin hidroxilo (extradiólica) se produce un semialdehído y a este tipo de ruptura se conoce como fisión *meta* (Dagley y Gibson, 1965). La dioxigenasa para la que primero se determinó la estructura primaria fue la denominada catecol 2,3-dioxigenasa codificada por el gen *xylE* del plásmido catabólico TOL (Nakai *et al.*, 1983). Esta enzima está formada por cuatro subunidades idénticas de 32 kD que contienen un ion Fe^{2+} como grupo prostético por cada subunidad, el cual es esencial para la catálisis enzimática. El producto derivado de la acción de esta dioxigenasa es el semialdehído del ácido 2-hidroximucónico (o el derivado sustituido) que es de color amarillo. Debido a la producción de color, el gen estructural para esta enzima, se ha utilizado como gen "chivato" en biología molecular (Hanh *et al.*, 1991). El perfil de sustratos de esta enzima es muy amplio y se ha descrito que oxida: catecol y 3-metil-, 3-etil- y 4-metilcatecol. El 3-clorocatecol inhibe irreversiblemente la actividad de esta enzima (Bartels *et al.*, 1984).

Cuando la ruptura se lleva a cabo entre los dos grupos hidroxilos (intradiólica), se produce un derivado del ácido *cis*, *cis*-mucónico y a este tipo de reacción se conoce como fisión *orto* (Ornston, 1966). Las enzimas típicas que llevan a cabo fisiones *orto* son la catecol 1,2-dioxigenasa y la protocatecuato 3,4-dioxigenasa. Estas enzimas se diferencian de las de rotura *meta* en que contienen Fe^{3+} como grupo prostético. En contraste a las dioxigenasas de fisión *meta*, estas enzimas están generalmente compuestas por una subunidad o dos subunidades diferentes (Ludwig *et al.*, 1984).

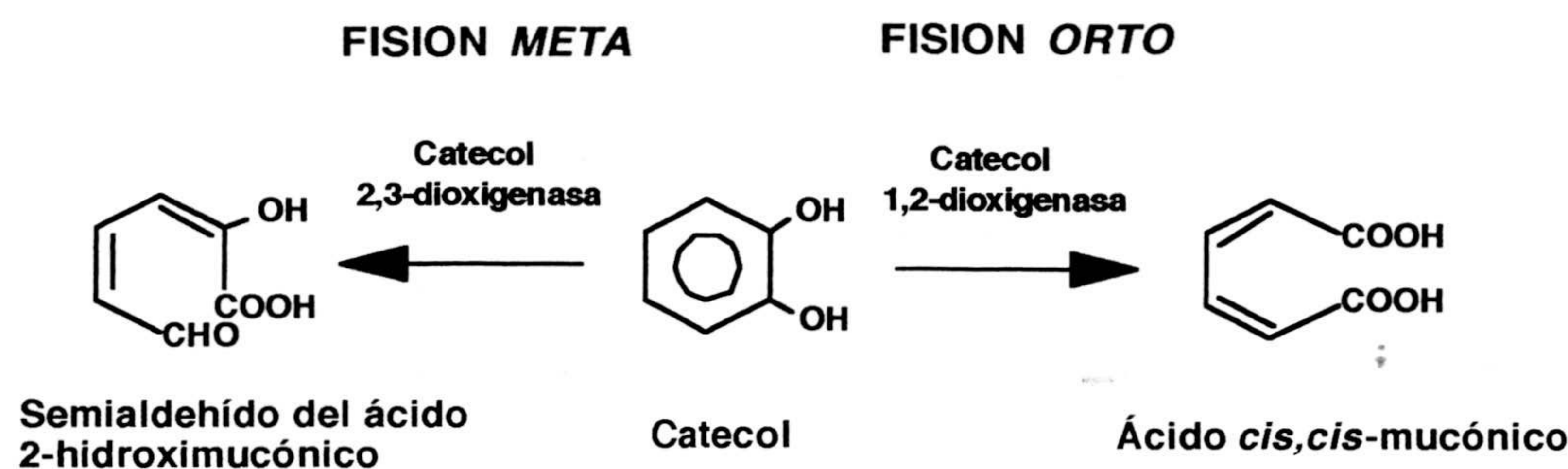


Figura 1. Fisiones *orto* y *meta* del catecol.

Aunque en la mayoría de las rutas de degradación de hidrocarburos aromáticos se produce la introducción de dos grupos hidroxilo, y posteriormente el ataque por disoxigenasas. Una excepción a esta regla ocurre en una cepa de *Pseudomonas* que crece a expensas de nitrobenzeno. Este es transformado en 2-aminofenol, el cual es atacado por la enzima 2-aminofenol 1,6-dioxigenasa que rinde semialdehído del ácido 2-aminomucónico (Lendenmann y Spain, 1996).

El que ocurra una fisión *orto* o *meta* está directamente relacionado con dos factores fundamentales: en primer lugar depende de las sustituciones del anillo. A pesar de que las enzimas iniciales de estas rutas con frecuencia muestran una especificidad de sustratos relajada, y son capaces de transformar sustratos con diferentes sustituyentes, las rutas *meta* se utilizan generalmente en el metabolismo de aromáticos con sustituyentes alquílicos, mientras que las rutas *orto* utilizan normalmente como sustratos anillos no sustituidos o con sustituciones del tipo de átomos de halógenos. Esto es debido a que, como hemos referido anteriormente, las enzimas de la ruta *meta* pierden su actividad catalítica en presencia de sustratos clorados. Sin embargo recientemente se han descrito dos cepa de *Pseudomonas putida* que crece a expensas de clorobenzeno a través de una ruta *meta* (Mars *et al.*, 1997, Riegert *et al.*, 1998).

Por su parte, enzimas que catalizan fisiones *orto*, como la catecol 1,2-dioxigenasa, tienen muy baja afinidad por alquilaromáticos, e incluso si estos compuestos se rompen por esta vía, por lo general se acumulan posteriormente compuestos no metabolizables del tipo de las alquil-lactonas (Harayama *et al.*, 1987., Reineke *et al.*, 1982 y Rojo *et al.*, 1987).

Por otro lado, el que un compuesto se degrade por una u otra ruta depende de la regulación a la que éstas se encuentran sometidas, que es a su vez consecuencia del precursor del derivado dihidroxilado presente en el medio (Feist y Hegeman, 1969). Muchos organismos del suelo tienen una o más rutas para la degradación de un sustrato

aunque para cada uno de estos se induce una ruta específica. Así el benzoato, es descarboxilado y oxidado hasta catecol, el cual se ha descrito que es degradado en *Pseudomonas putida* a través de la ruta *orto* (Johnson y Stanier, 1971); aunque el catecol no es inductor ni de *orto* ni de *meta*, el producto de ruptura, el ácido *cis,cis*-mucónico acumulado como consecuencia de la acción del nivel basal de la catecol 1,2-dioxigenasa induce la ruta *orto* (Ornston, 1966., Murray y Williams, 1974). Si el sustrato es 3-metilbenzoato o fenol, inductores de la ruta *meta*, estos son transformados en catecol y se degradan a través de esa vía (Feist y Hegeman, 1969, Sala-Trepat *et al.*, 1972).

En los últimos años se ha descrito una cepa de *Pseudomonas* que es capaz de sintetizar diferentes enzimas para la rotura del anillo aromático, siendo capaz de actuar simultáneamente sobre diferentes catecoles sustituidos resultantes de la degradación de mezclas de compuestos aromáticos tales como benceno, tolueno, etilbenceno, anillos bencénicos con grupos halógenos o naftaleno (Johnson y Olsen, 1997).

1.3 Degradación de los productos resultantes de la fisión del anillo aromático hasta intermediarios del ciclo de Krebs

Los productos de la fisión *orto* de anillos aromáticos, el ácido *cis,cis*-mucónico o sus derivados, son transformados hasta un intermediario común, el β -cetoadipato, y éste hasta succinato y acetil-CoA, que se degradan por las rutas centrales del metabolismo celular (Figura 2)

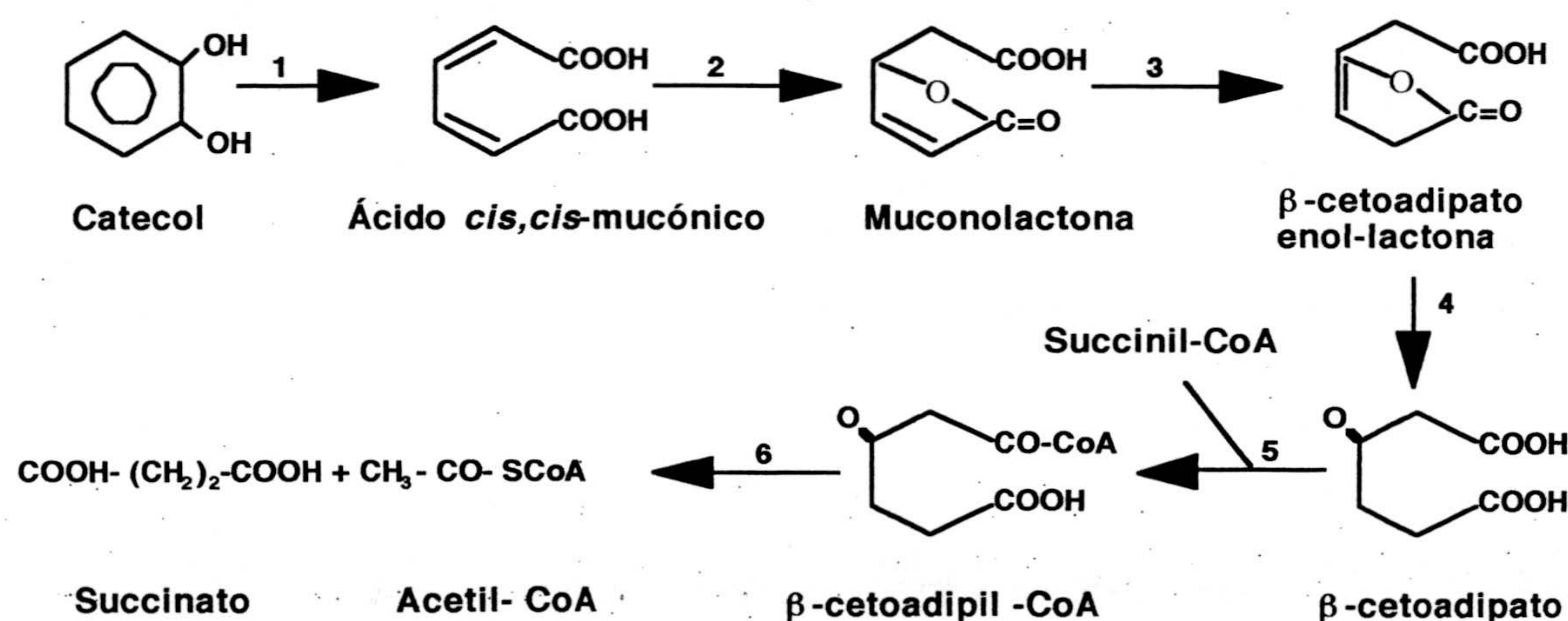


Figura 2. Esquema de la ruta *orto* para la degradación de catecol. Los enzimas son: (1) catecol 1,2-dioxigenasa, (2) enzima lactonizante del *cis,cis*-muconato, (3) muconolactona isomerasa, (4) β -cetoadipato-enol-lactona hidrolasa, (5) succinil CoA: β -cetoadipil-CoA transferasa y (6) β -cetoadipato-CoA tiasa.

Los compuestos derivados del semialdehído del ácido 2-hidroxiácido, productos de la fisión *meta* de anillos aromáticos, se pueden procesar a través de dos vías alternativas, pero que se sintetizan simultáneamente en la célula. Una implica la actuación de una deshidrogenasa que rinde 4-oxalocrotonato, el cual es posteriormente tautomerizado y descarboxilado hasta el 2-oxo-pent-4-enolato (Nishizuka *et al.*, 1962). La segunda se describió posteriormente, e implica una actividad hidrolasa del semialdehído del ácido 2-hidroxiácido que rinde directamente el 2-oxo-pent-4-enolato (Dagley y Gibson, 1965, Bayly y Dagley, 1969). Este compuesto es finalmente degradado hasta intermediarios del ciclo de Krebs. Mientras que el catecol y el 4-metilcatecol son sustratos de la deshidrogenasa, el 3-metilcatecol es atacado por la hidrolasa (Sala-Trepat *et al.*, 1972). Dado que ambas vías se inducen simultáneamente, el que se utilice una u otra es función de la K_m de la deshidrogenasa y de la hidrolasa por el catecol y los metilcatecoles.

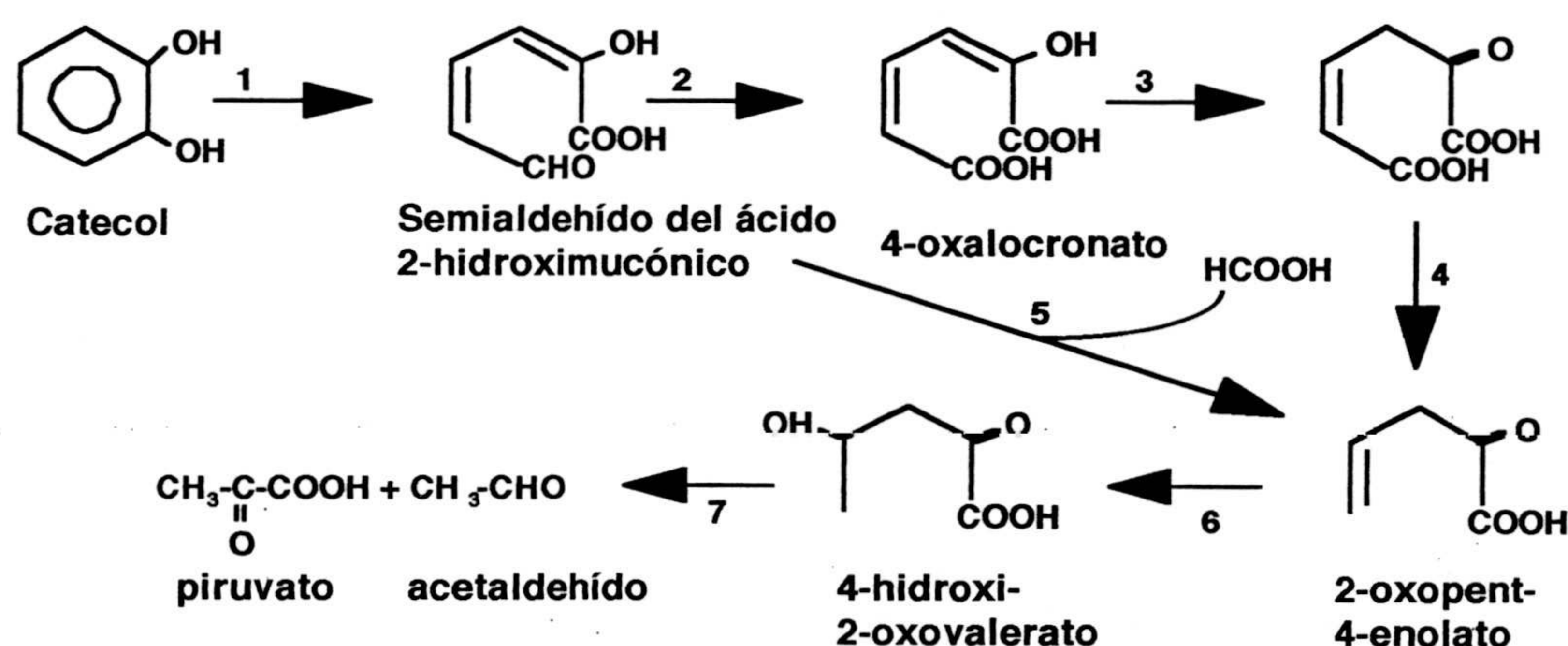


Figura 3. Esquema de la ruta *meta* para la degradación de catecol. Las enzimas son: (1) catecol 2,3-dioxigenasa, (2) 2-hidroxiácido semialdehído deshidrogenasa, (3) 4-oxalocrotonato tautomerasa, (4) 4-oxalocrotonato descarboxilasa, (5) 2-hidroxiácido semialdehído hidrolasa, (6) 2-oxo-pent-4-enolato hidratasa y (7) 4-hidroxi-2-oxovalerato aldolasa.

2. RUTAS DESCRITAS PARA BIODEGRADACIÓN AEROBIA DE TOLUENO POR PARTE DE CEPAS PERTENECIENTES AL GÉNERO *PSEUDOMONAS*.

2.1 Ruta TOL

La mejor ruta caracterizada a nivel bioquímico y molecular es la ruta codificada en el plásmido catabólico pWW0 de *Pseudomonas putida* mt-2 (Worsey y Williams, 1975).

El primer enzima de la ruta es la denominada tolueno/xileno monooxigenasa que oxida tolueno, *m*- y *p*-xileno hasta alcohol (metil)bencílico. Esta enzima consta de dos subunidades codificadas por los genes *xylA* y *xylM* cuyos productos de 35 y 40 kD respectivamente, son necesarios para la actividad enzimática (Harayama *et al.*, 1989). El gen *xylB* codifica la enzima alcohol bencílico deshidrogenasa que cataliza la oxidación de alcohol bencílico a benzaldehído con la reducción concomitante de NAD^+ a NADH (Worsey y Williams, 1975). La oxidación de benzaldehído a benzoato la lleva a cabo la enzima benzaldehído deshidrogenasa que es codificada por el gen *xylC*. Esta serie de reacciones constituyen la denominada ruta "upper".

Una vez formados los ácidos carboxílicos aromáticos correspondientes actúan los enzimas codificados en la ruta *meta* de TOL. Así, el ácido benzoico o los derivados correspondientes de la oxidación de toluenos y xilenos por enzimas de la ruta "upper", son transformados en los sustratos activados dihidroxilados que son sustrato de la enzima catecol 2,3-dioxigenasa codificada por el gen *xylE* que tras su acción los convierte en intermediarios del ciclo de Krebs (Figura 4).

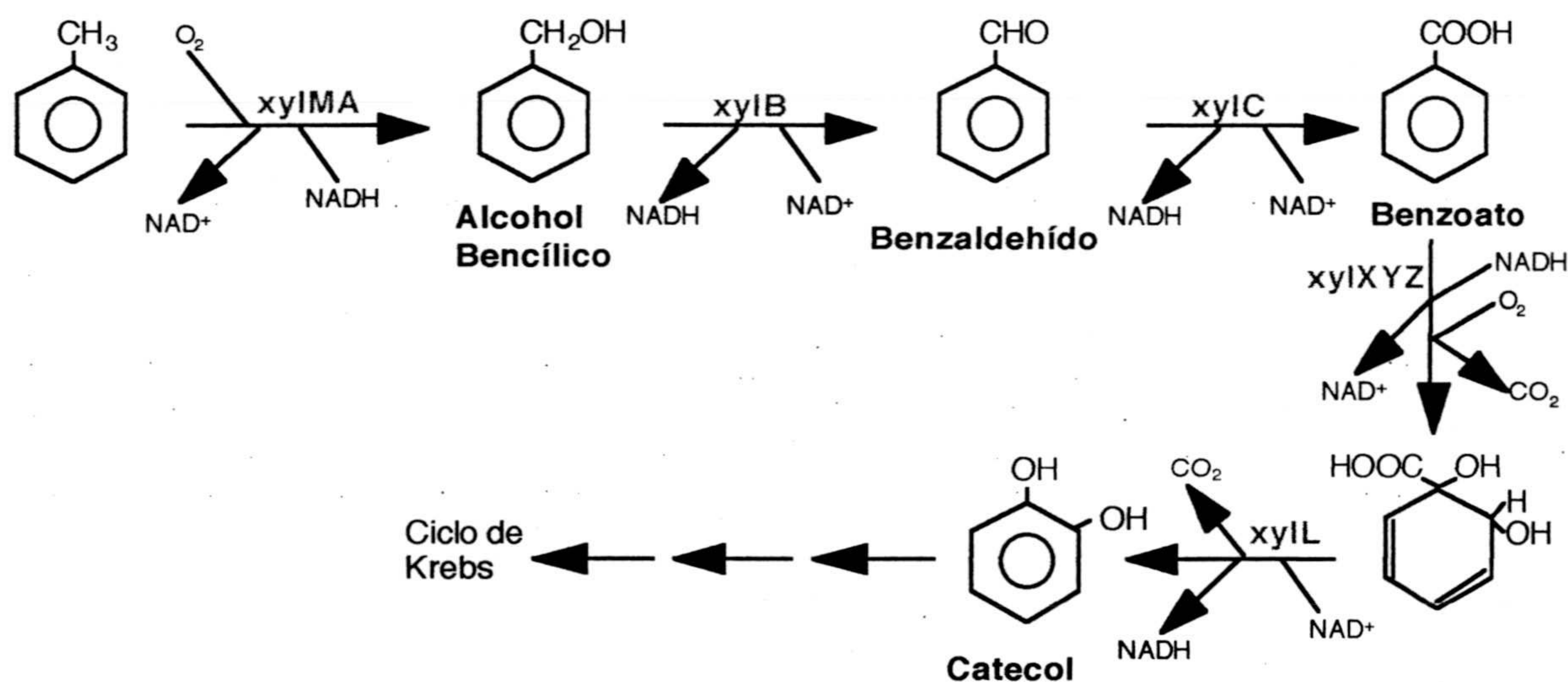


Figura 4. Degradación de tolueno por el plásmido TOL pWW0. Se indican las enzimas que son: XylMA, tolueno monooxigenasa; XylB, alcohol bencílico deshidrogenasa; XylC, benzaldehído deshidrogenasa; XylXYZ, toluato 1,2-dioxigenasa; XylL, 1,2-dihidroxi-3,5-ciclohexadien-1-carboxilato deshidrogenasa;

Los genes catabólicos del plásmido TOL pWW0 se encuentran organizados en dos unidades transcripcionales denominadas "upper" y *meta*. El operon "upper", *xylUWCMABN*, codifica para enzimas implicadas en la conversión de tolueno a benzoato (Harayama, 1989). El producto de los genes *xylU*, *xylW* y *xylN* parecen no ser

necesarios para el crecimiento en tolueno (Harayama *et al.*, 1989, Williams *et al.*, 1991). La información para la transformación de benzoato hasta intermediarios del ciclo de Krebs está codificada en el operon *meta*. Éste tiene un tamaño de 11 kb y lleva la información de 13 genes *xylXYZLTEGFJQKIH* siendo uno de los operones de mayor tamaño entre los descritos en procariotas (Harayama *et al.*, 1990), y codifica la información genética necesaria para la degradación de los benzoatos y metilbenzoatos hasta acetaldehído y piruvato (Harayama *et al.*, 1984). Aguas abajo del operon *meta* existen dos genes reguladores *xylS* y *xylR* que están implicados en el control transcripcional de los genes del operon upper y *meta*. Estos genes reguladores se transcriben desde promotores independientes y divergentes.

En la Figura 5 se muestra la organización genética en el plásmido catabólico, así como la regulación a la que está sometido.

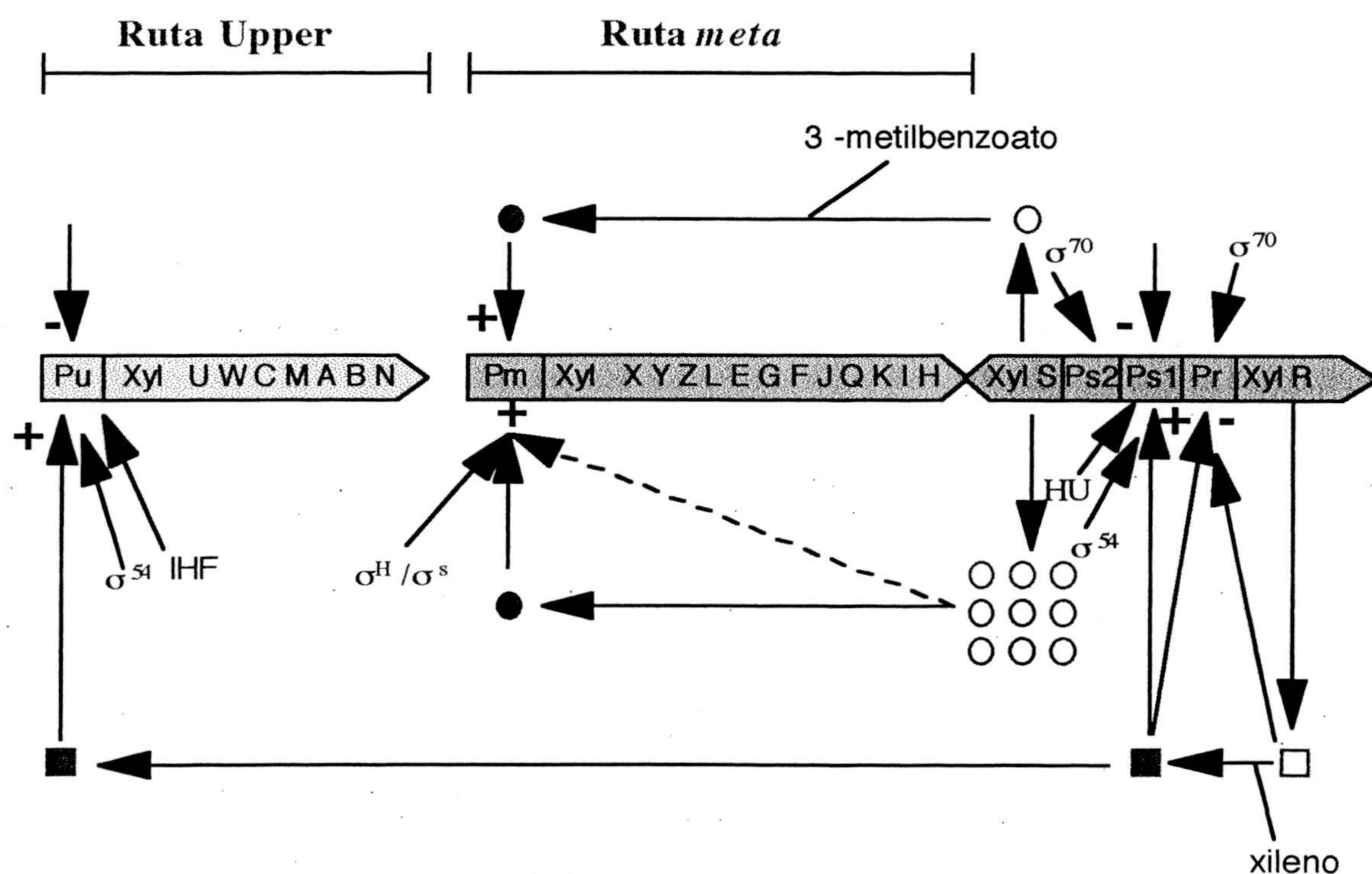


Figura 5. Organización genética y regulación de los genes catabólicos del plásmido TOL pWW0. La activación (+) o represión (-) ejercida por cada proteína sobre los promotores correspondientes se indica mediante flechas. XylR inactivo (cuadrados abiertos) y activo (cuadrados cerrados). XylS inactivo y activo (círculos abiertos y cerrados respectivamente). Se indica asimismo los factores del hospedador necesarios para la activación máxima.

El modelo general de regulación aceptado hoy en día está compuesto por dos circuitos (Ramos *et al.*, 1997): uno, que funciona cuando las células se cultivan con (metil)benzoatos (circuito *meta*) y otra más compleja que funciona cuando las células utilizan tolueno o xilenos como fuente de carbono (sistema en cascada):

- En células cultivadas en ausencia de efectores, glucosa o glicerol, el gen *xyIS* se expresa a bajo nivel desde el promotor Ps2 que es dependiente de σ^{70} y se produce proteína XylS en forma inactiva. En presencia de efectores, ((metil) benzoatos), en el medio éstos interaccionan con la proteína XylS activándola, en estas condiciones ésta estimula la transcripción de la ruta *meta* desde el promotor Pm.

- En células en presencia de xilenos/tolueno el regulador que controla la transcripción es XylR. La proteína XylR controla su propia síntesis. Ésta en presencia de tolueno/xilenos se activa y estimula la transcripción del operon "upper" desde el promotor Pu. La proteína activada también estimula la expresión del gen *xyIS* desde el promotor Ps1 dependiente de σ^{54} , ello da lugar a la hiperproducción de XylS que incluso en ausencia de efectores estimula la transcripción de la ruta *meta*, así se consigue una cascada que permite la inducción simultánea de las rutas "upper" y *meta* (Ramos *et al.*, 1997b).

2.2 Ruta TOD

Otra de las rutas de degradación de tolueno fue la descrita para la cepa *Pseudomonas putida* F1 (Gibson *et al.*, 1970). Esta cepa degrada tolueno a través de una ruta en la que en el primer paso se forma el compuesto *cis*-2,3-dihidro-2,3-dihidroxitolueno (*cis*-tolueno dihidrodiol) a través de una reacción de dioxigenación en la que el oxígeno molecular y dos electrones provenientes del NADH se incorporan en el anillo aromático. Esta reacción es llevada a cabo por una enzima multicomponente denominada tolueno dioxigenasa. Los genes que codifican esta enzima heteromultimérica son los denominados *todC1C2BA*, los cuales han sido caracterizados bioquímicamente. Esta proteína consta de tres elementos funcionales del sistema enzimático que son: una flavoproteína con actividad reductasa, codificada por el gen *todA*, una ferredoxina codificada por el gen *todB* y otro componente que es una proteína con hierro y azufre terminal que posee una subunidad grande (*todC1*) y otra pequeña (*todC2*) (Gibson *et al.*, 1990). Tras la formación del *cis*-tolueno dihidrodiol el enzima *cis*-dihidrodiol deshidrogenasa (codificada por el gen *todD*) reduce NAD^+ a NADH y oxida el *cis*-tolueno dihidrodiol a 3-metilcatecol. La enzima 3-metilcatecol 2,3-dioxigenasa codificada por el gen *todE* transforma al 3-metilcatecol en 2-

hidroxi-6-oxohepta-2,4-dienoato (HOHD). Los genes *todFGHI* codifican para las enzimas necesarias del paso del HOHD hasta piruvato y acetil-CoA (Figura 6)

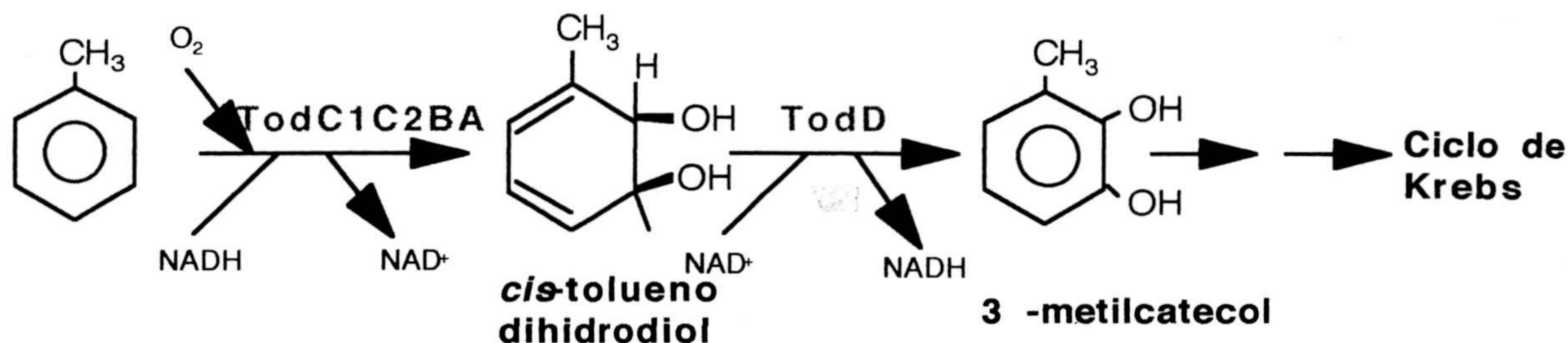


Figura 6. Degradación de tolueno a través de la ruta codificada en el operon TOD. Se indican las enzimas que son: TodC1C2BA, tolueno dioxigenasa; TodD, cis-tolueno dihidrodiool deshidrogenasa.

Todos los genes para el catabolismo de tolueno en esta cepa están en un único operon de 9,3 kb en el orden *todXFC1C2BADEGIH* (ver Figura 7) que no refleja el orden de las reacciones bioquímicas (que están listadas alfabéticamente desde la A hasta la H). Todos los genes han sido clonados y secuenciados (Lau *et al.*, 1994 y 1997, Menn *et al.*, 1991, Wang *et al.*, 1995, Zylstra y Gibson, 1989) y se ha determinado la función que codifican.

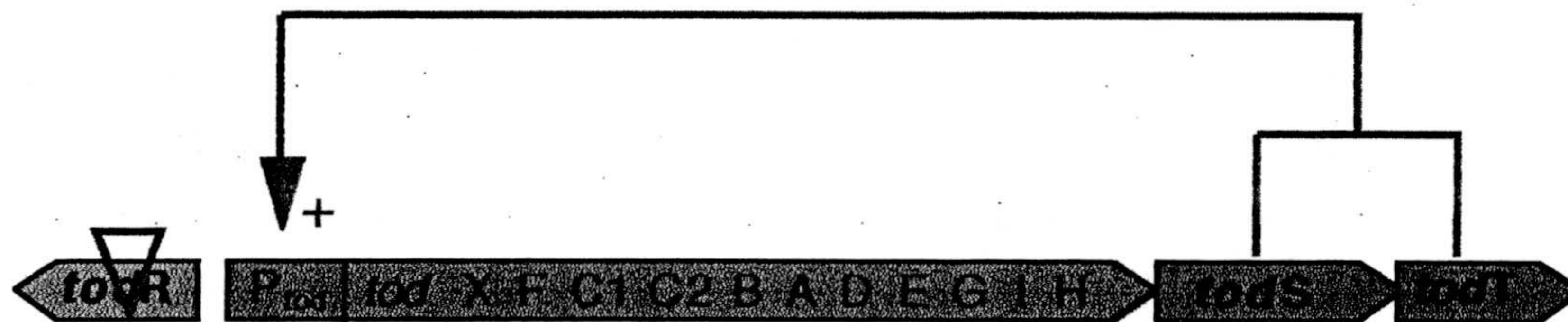


Figura 7. Organización genética del operon TOD y sus genes reguladores.

El gen *todR* que se transcribe divergentemente con respecto a *todX* está truncado debido a la presencia de un elemento de inserción. Presenta homología a nivel regulador con el dominio de unión a ADN de la familia de reguladores transcripcionales de LysR, pero no es necesario para el metabolismo de tolueno en esta cepa. El gen *todX* codifica para proteína de membrana que presenta alta similitud con la proteína FadL de *E. coli* que es una proteína de membrana externa implicada en la unión y en el transporte de ácidos grasos de cadena larga (Wang *et al.*, 1995). Aunque se ha especulado que el producto de

todX podría facilitar la entrada de tolueno se sabe que no es necesario para el crecimiento de la cepa en tolueno

Con respecto a la regulación se ha identificado aguas arriba del gen *todX* el punto de iniciación de la transcripción del operón. Aguas abajo del gen *todH* se ha encontrado un sistema de dos componentes, *todST*, que activa la expresión de la ruta de degradación de tolueno en *P. putida* F1. El gen *todS* codifica para una proteína híbrida histidín-quinasa que tiene dos componentes importantes: uno que presenta un dominio en escalera de leucina en la región amino terminal y otro que presenta un motivo doble histidín-quinasa. La presencia de este motivo duplicado histidín quinasa en la proteína implica el funcionamiento de ésta como un sensor que responde tanto a la presencia de tolueno como a estrés oxidativo, aunque existen otras posibilidades que aún no se han estudiado. Por otro lado, la forma fosforilada de TodT parece que activa la expresión de los genes estructurales del operon TOD (Lau *et al.*, 1997).

Aunque todavía no se ha determinado el mecanismo de acción de este sistema lo que si está claro es que el sistema formado por los genes *todST* interviene en la regulación de la expresión del operón TOD y es un sistema muy similar al descrito en eucariotas para regulación.

2.3 Ruta de la tolueno-4-monooxigenasa

La cepa *Pseudomonas mendocina* KR1 presenta otra ruta de degradación de tolueno (Whited y Gibson, 1991a). En esta ruta el tolueno es atacado inicialmente por un sistema enzimático denominado tolueno-4-monooxigenasa que cataliza la introducción de un átomo de oxígeno en el anillo aromático en posición *para* en una reacción dependiente de la reducción de NADPH produciendo *p*-cresol. El siguiente enzima en la cepa KR1 es el denominado *p*-cresol metilhidrolasa que cataliza la conversión de *p*-cresol en alcohol *p*-hidroxibencílico y *p*-hidroxibenzaldehído. La enzima denominada *p*-hidroxibenzaldehído deshidrogenasa oxida el *p*-hidroxibenzaldehído a *p*-hidroxibenzoato, éste posteriormente es hidroxilado hasta protocatecuato por la *p*-hidroxibenzoato hidroxilasa, que es una flavoproteína con actividad monooxigenasa. El 3,4-dihidroxibenzoato (protocatecuato) es sustrato de la enzima protocatecuato 3,4-dioxigenasa que produce una rotura *orto* en el anillo (Whited y Gibson, 1991b) (Figura 8). Esta ruta al igual que la ruta TOD está codificada en el cromosoma de la bacteria (Wright y Olsen, 1994).

Los genes que codifican para la tolueno-4-monooxigenasa se han clonado y secuenciado y son seis peptidos codificados por los enzimas *tmoABDCEF* que forman los tres componentes necesarios para la actividad oxigenasa (Yen *et al.*, 1991 y 1992). El

producto del gen *tmoF* codifica para una ferredoxina con actividad oxido-reductasa que está relacionada con la actividad tolueno 4-monooxigenasa aunque parece que no es esencial para la actividad del enzima (Yen *et al.*, 1992).

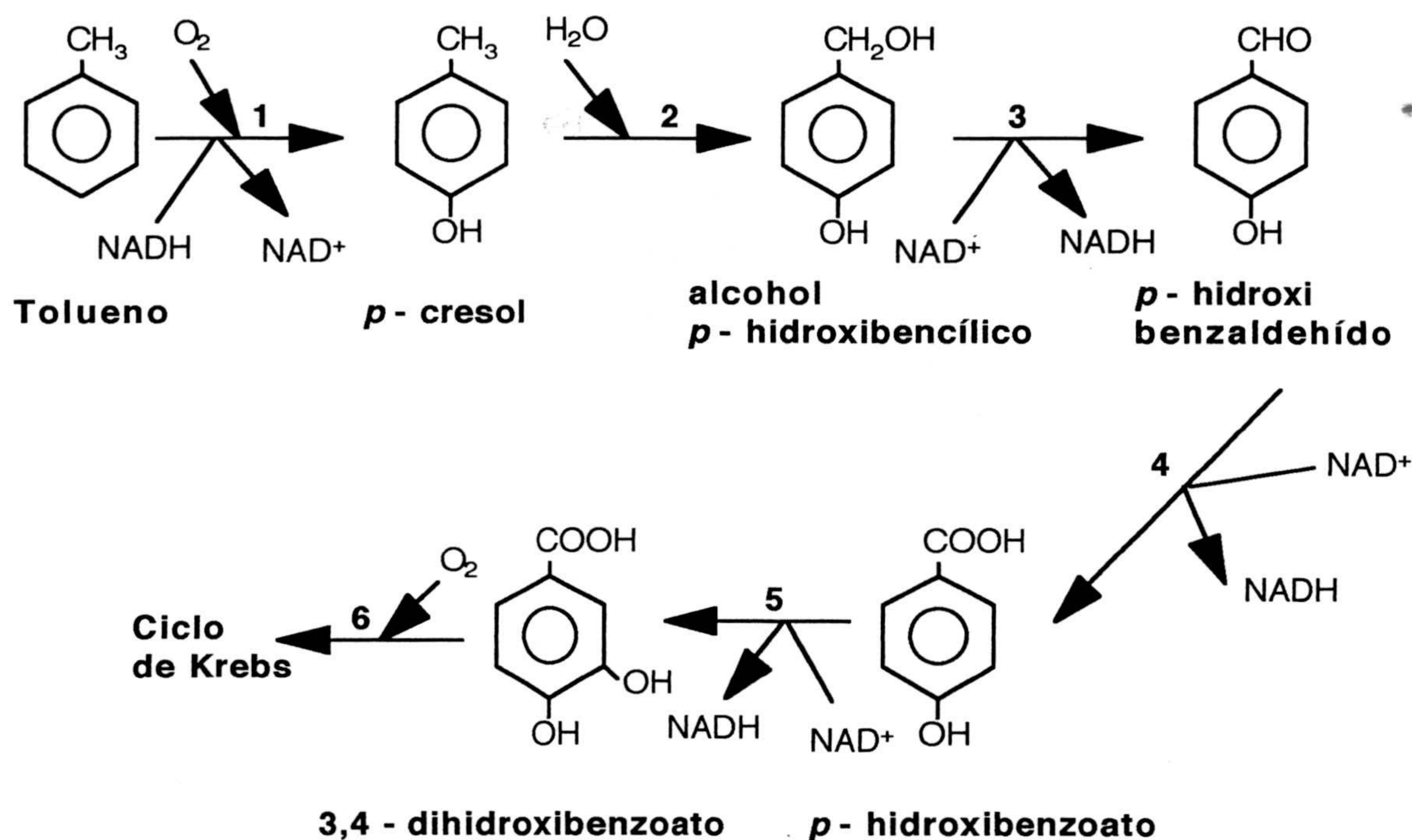


Figura 8. Esquema de la ruta de degradación de tolueno por parte de la cepa *P. mendocina* KR1. Las enzimas que participan en la degradación son las siguientes: (1) Tolueno 4-monooxigenasa, (2 y 3) *p*-cresol metilhidrolasa, (4) *p*-hidroxibenzaldehído deshidrogenasa, (5) *p*-hidroxibenzoato hidroxilasa, (6) Protocatecuato 3,4-dioxigenasa.

Los genes que codifican las enzimas que catalizan las reacciones enzimáticas de la degradación de tolueno hasta protocatecuato están ligados genéticamente ya que se pueden movilizar simultáneamente. Estos genes parece que están organizados en tres unidades transcripcionales que se regulan de forma independiente: una con los genes que codifican la tolueno 4-monooxigenasa (*tmoABCDEF*), otra con los que codifica para las enzimas *p*-cresol metilhidrolasa y *p*-hidroxibenzaldehído deshidrogenasa (*pcuABC*) y otra parte con los que codifica para la enzima *p*-hidroxibenzoato hidroxilasa (*pob*). Parece ser que los genes *pcuABC* están organizados formando un operón, donde el gen *pcuC*, que codifica para la *p*-hidroxibenzaldehído deshidrogenasa se transcribe primero y su transcripción es seguida de la de los genes que codifican la enzima *p*-cresol metilhidroxilasa, esto asegura que no se acumulen derivados del benzaldehído que son tóxicos para la célula o incluso actuar como quimioatrayentes de otras células bacterianas. Este operón está regulado por

el gen *pcuR* que es un activador de la transcripción de éstos genes y se localiza aguas abajo del gen *pcuC*. El gen que codifica para la *p*-hidroxibenzoato hidroxilasa (*pob*) está ligado genéticamente, pero regulado independientemente, de los genes que codifican para la tolueno 4-monooxigenasa, *p*-cresol metilhidrolasa y *p*-hidroxibenzaldehído deshidrogenasa (Wright y Olsen, 1994).

2.4 Ruta de la tolueno-3-monooxigenasa

La cepa *Pseudomonas pickettii* PKO1 se aisló de microcosmos contaminados con benceno, tolueno y *p*-xileno (Gibson *et al.*, 1988). Esta cepa utilizaba fenol como fuente de carbono y energía. La oxidación del fenol hasta catecol por parte de PKO1 se ha estudiado y se sabe que está catalizada por la enzima fenol hidroxilasa (Kukor y Olsen, 1990). Posteriormente en esta cepa se describió la existencia de genes que degradaban tolueno y benceno (Kaphammer, 1990, Olsen *et al.*, 1994). La enzima encargada de la hidroxilación del tolueno y del benceno es un sistema enzimático denominado tolueno 3-monooxigenasa (Olsen *et al.*, 1994). Éste lleva a cabo la hidroxilación de tolueno y benceno hasta *m*-cresol y fenol, respectivamente. Esta actividad enzimática está codificada por los genes *tbuA1UBVA2C* y es un sistema multicomponente similar al descrito anteriormente para la cepa KR1. Tras la formación del *m*-cresol y por acción de la fenol hidroxilasa, codificada por el gen *tbuD*, se produce la segunda hidroxilación del anillo dando lugar a la formación de 3-metilcatecol que es atacado por la catecol 2,3-dioxigenasa codificada por el gen *tbuE* (Olsen *et al.*, 1994) (Figura 9). La enzima tolueno 3-monooxigenasa presenta una gran variedad de sustratos entre los que se encuentra benceno, tolueno, etilbenceno, *o*-, *m*- y *p*-xileno y estireno y los inductores de esta actividad son el benceno, tolueno, etilbenceno y *m*-cresol.

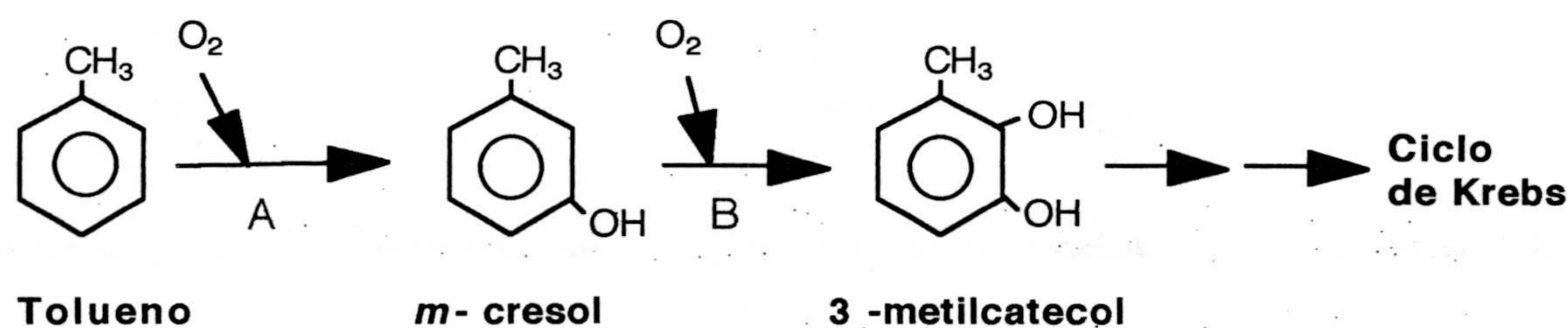


Figura 9. Ruta de degradación de tolueno presente en la cepa *P. putida* PKO1. Los sistemas enzimáticos que participan en la ruta son las siguientes: A, tolueno 3-monooxigenasa y B, fenol hidroxilasa;

Con respecto a la organización genética, ésta incluye tres unidades transcripcionales, una que codifica para el sistema de la enzima tolueno 3-monooxigenasa y que lleva la información de seis genes denominados *tbuA1UBVA2C* (Byrne *et al.*, 1995), otra que porta la información del gen *tbuD* y que codifica para la actividad fenol hidroxilasa (Kukor y Olsen, 1990) y por último la que porta los genes necesarios para la fisión del 3-metilcatecol y catecol hasta el correspondiente semialdehído del ácido 2-hidroxiácido, el cual es canalizado hasta intermediarios del ciclo de Krebs a través de los productos de los genes *tbuJHIKGFE* que forman un operón independiente (Olsen *et al.*, 1994) (Figura 10).

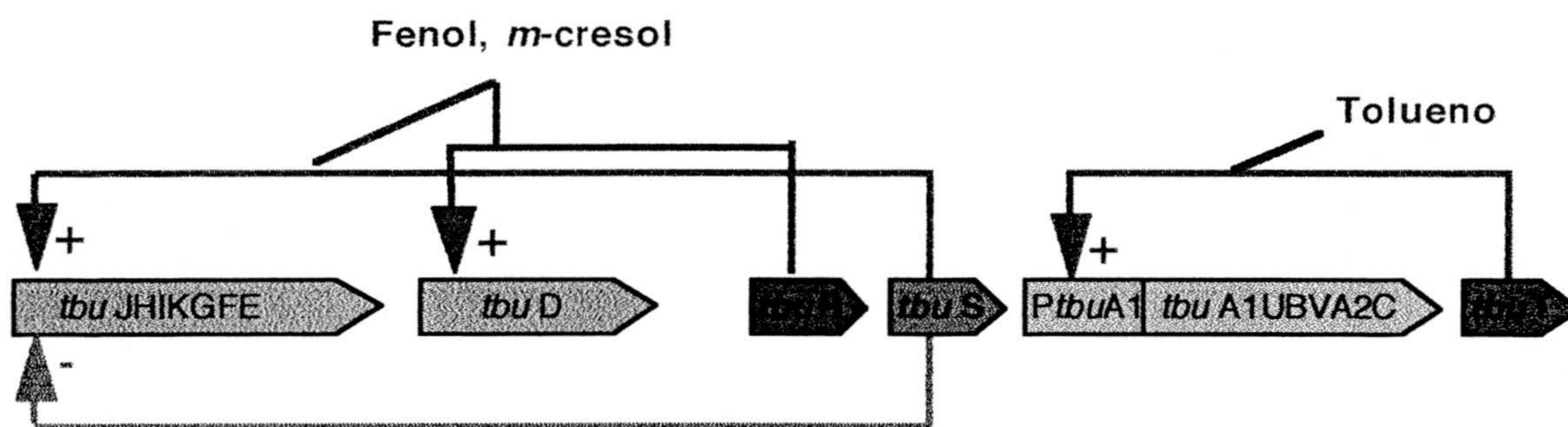


Figura 10. Organización genética de los genes de degradación de tolueno en la cepa *P. pickettii* PKO1 y su esquema de regulación.

Con respecto a la regulación, se sugiere que la expresión del operón de la tolueno 3-monooxigenasa (*tbuA1UBVA2C*) es activada por el producto del gen *tbuT* en presencia de tolueno. TbuT se ha identificado como miembro de los activadores transcripcionales de la familia de NtrC, aunque es significativamente diferente con respecto al dominio asociado con la especificidad de efectores. Existe una región aguas arriba del gen *tbuA1* que se ha identificado como el sitio de unión del producto del gen *tbuT* (*PtbuA1*) que tras la unión activa la transcripción del operón (Byrne y Olsen, 1996., Leahy *et al.*, 1997).

Por otro lado se conoce que TbuR y TbuS son también reguladores que interaccionan con efectores tales como fenol y *m*-cresol pasando a forma activa y promoviendo la transcripción de *tbuD* y *tbuJHIKGFE* respectivamente. TbuS reprime la transcripción de este último operon en ausencia de efectores (Olsen *et al.*, 1994). Los detalles moleculares de este sistema permanecen por explorar.

2.5 Ruta de la tolueno 2-monooxigenasa

La cepa *Pseudomonas cepacia* G4 degrada tolueno a través de un sistema enzimático denominado tolueno 2-monooxigenasa (Shields *et al.*, 1989). Éste cataliza, en presencia de oxígeno y de NADH, la hidroxilación secuencial del anillo aromático del tolueno en posición *orto* y *meta* para producir 3-metilcatecol. El sistema enzimático ha sido purificado y se ha encontrado que está formada por tres componentes de los que se conoce su estructura y propiedades catalíticas (Newman *et al.*, 1995). Aunque no se conoce ni la organización genética ni la regulación. Se sabe que la ruta de degradación está codificada en un plásmido denominado TOM (Shields *et al.*, 1995), donde se localizan los genes que codifican las enzimas que catalizan la hidroxilación del tolueno.

Se ha descrito en los últimos años la existencia en una cepa denominada *Pseudomonas sp.* JS150 que degrada tolueno a través de un sistema enzimático denominado tolueno/benceno 2-monooxigenasa que cataliza la hidroxilación secuencial de tolueno hasta 3-metilcatecol en *orto* y *meta* como en la cepa G4 descrita anteriormente. El sistema enzimático parece similar al anterior ya que presentan el mismo perfil de sustratos y la localización de los genes es plasmídica (Johnson y Olsen, 1995).

La organización genética de la tolueno/benceno 2-monooxigenasa para la cepa JS150, se conoce que está codificada por los genes *tbmABCDE*F que forman un operón.

Con respecto a la regulación de éste operon se ha descrito la existencia de un regulador denominado TbmR que interacciona positivamente con el promotor *PtbmA* que se localiza aguas arriba del gen *tbuA* (Figura 11). Este regulador en presencia de tolueno activa la transcripción desde el promotor *PtbmA* (Leahy *et al.*, 1997). Este regulador presenta similitudes con TbuT, descrito anteriormente para la tolueno 3-monooxigenasa. En conclusión, se sabe que la expresión de la tolueno 3- y 2-monooxigenasas, aunque presentan reacciones distintas, está controlada por reguladores similares y con el mismo perfil de sustratos (Leahy *et al.*, 1997).

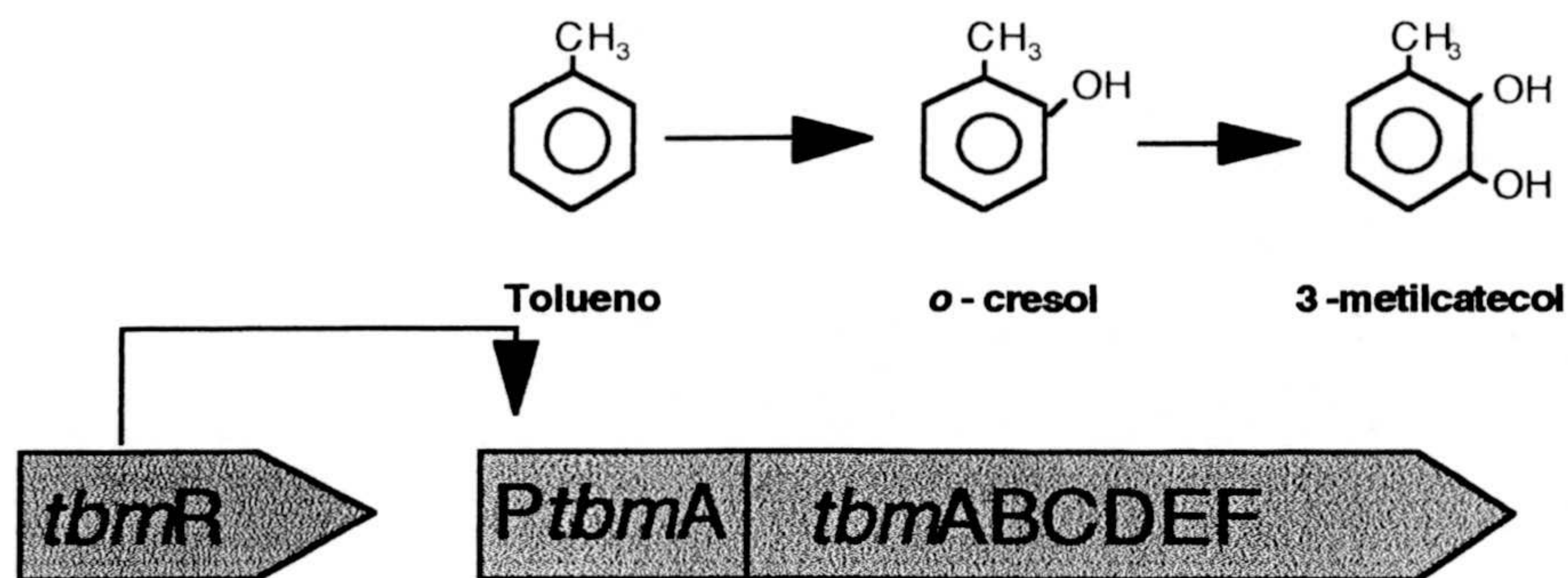


Figura 11. Esquema de las reacciones bioquímicas, la organización genética y regulación de la ruta catalizada por el sistema de la tolueno/benceno 2-monooxigenasa de *Pseudomonas sp.* JS150.

Se ha descrito que *Pseudomonas sp.* JS150 sintetiza las enzimas necesarias para llevar a cabo fisiones *orto*, *orto*-modificada y *meta* en respuesta al crecimiento en una gran variedad de compuestos aromáticos (Haigler *et al.*, 1992). La cepa presenta, al menos, tres enzimas tolueno/benceno monooxigenasas para el ataque inicial del tolueno además de la enzima tolueno dioxigenasa (Johnson y Olsen, 1997). Se ha identificado una región que codifica para una tolueno dioxigenasa como la de la cepa F1 (Haigler *et al.*, 1992), otra para la enzima tolueno/benceno 2-monooxigenasa (Tb2m) y en esta misma región se ha identificado una actividad tolueno 4-monooxigenasa (Tb4m) que está regulada por el producto del gen *tbmR* y otra región que sólo presenta genes para la enzima tolueno 4-monooxigenasa que cataliza la monooxigenación del *p*-cresol hasta 4-metilcatecol. Todavía está por determinar la organización genética y la regulación de todos estos sistemas.

II. TOLUENO: TOXICIDAD Y MECANISMOS DE ADAPTACIÓN

Los hidrocarburos aromáticos son muy abundantes debido a su utilización como disolventes industriales, en síntesis de polímeros y en la industria química. En general aunque se conoce que muchos de estos disolventes orgánicos son degradados por microorganismos, y se conocen las rutas metabólicas para su degradación; uno de los problemas en zonas muy contaminadas con estos disolventes es la toxicidad que éstos representan para los microorganismos. A lo largo de esta sección vamos a hacer una breve reseña a los efectos de los disolventes sobre la viabilidad de los microorganismos, y a los mecanismos de defensa que han desarrollado, principalmente cepas pertenecientes al género *Pseudomonas*, frente a concentraciones elevadas de disolventes orgánicos.

1. EFECTOS TÓXICOS DE LOS DISOLVENTES ORGÁNICOS SOBRE LOS MICROORGANISMOS

Se ha puesto de manifiesto que existe una correlación entre la hidrofobicidad de un compuesto, la localización del mismo dentro de la bicapa lipídica de la membrana y la toxicidad de éstos para los microorganismos (Vighi y Calamari, 1987, Sierra-Alvarez y Lettinga, 1991, Sikkema *et al.*, 1994). La hidrofobicidad de un compuesto se expresa normalmente en términos de $\log P_{ow}$, valor que define el coeficiente de reparto de un compuesto en un sistema bifásico de octanol/agua. Este coeficiente ha sido utilizado en muchos casos para explicar la mayor toxicidad de unos disolventes orgánicos frente a otros. Así los disolventes con un valor de $\log P_{ow} > 4$ no son, generalmente, tóxicos para los microorganismos (Inoue y Horikoshi, 1991, Vermüe *et al.*, 1993), y se utilizan en la actualidad como una segunda fase no tóxica que sirve como depósito de compuestos tóxicos en reacciones de biotransformación (Laane *et al.*, 1987). Además, pese a que tienen una alta afinidad a repartirse dentro de la bicapa lipídica, la baja solubilidad en agua de estos compuestos influye notablemente en que no se alcancen altas concentraciones de los mismos en las membranas (Osborne *et al.*, 1990., Weber y de Bont, 1995). Los compuestos con un valor de $\log P_{ow}$ entre 3,6 y 1,5 son muy tóxicos para los microorganismos, ya que se acumulan en la membrana citoplasmática de la bacteria provocando la desorganización de la estructura de la membrana celular y la pérdida de funciones vitales para la célula (Sikkema *et al.*, 1995). Por otro lado los compuestos con $\log P_{ow} < 1,5$ son, en general, bien tolerados.

Como resultado de la acumulación de compuestos hidrofóbicos en la membrana se producen cambios en la estructura e integridad de la misma. Los cambios que se producen dependen del tipo de disolvente. El efecto que un compuesto lipofílico también depende de la posición en la que se acumule dentro de la membrana (Isomaa *et al.*, 1986). Así un disolvente que se acumule cerca de los grupos de cabeza de los fosfolípidos de la bicapa tendrá un efecto distinto, al de aquel que se acumule cerca de las cadenas acílicas de los mismos (Weber y de Bont, 1995). Se ha determinado la localización en la membrana de moléculas hidrofóbicas tales como los alcanos ($\log P_{ow} > 3$) que tienden a alinearse con las cadenas acílicas de los ácidos grasos de los fosfolípidos (Lohner, 1991, Sikkema *et al.*, 1994). En el caso del tolueno, éste se localiza entre las cadenas acílicas cerca del área del grupo de cabeza (Weber y de Bont, 1995, Weber *et al.*, 1994, Rekker y de Kort, 1979). La acumulación de este disolvente además de incrementar la fluidez de la membrana promueve la formación de una fase lipídica hexagonal, por lo que se incrementa el área superficial de bicapa y por tanto la estabilidad de la membrana.

En general, los disolventes orgánicos al interactuar con la membrana celular de los microorganismos, influyen profundamente en su estructura y estado físico. Las interacciones de tipo Van der Waals existentes entre las cadenas acílicas lipídicas en la membrana, se ven afectadas por el reparto de un soluto en la membrana, lo cual se traduce a su vez en un efecto sobre la fluidez de membrana (Merchior, 1982, Sikkema *et al.*, 1995).

1.1 Efectos de los disolventes orgánicos sobre las funciones de la membrana celular

Los cambios en la integridad de la membrana como resultado de la interacción de los solutos lipofílicos con diferentes componentes de la membrana puede afectar a dos de las principales funciones de la misma: La de barrera de permeabilidad y la de matriz para otros componentes de la misma.

1.1.1 Efectos sobre la función de barrera

Una de las funciones esenciales de la membrana es actuar como barrera de permeabilidad regulando el paso de solutos entre la célula y el medio externo. Los disolventes orgánicos provocan la expansión y fluidificación de las membranas por lo que la función de barrera de permeabilidad de la membrana queda afectada (Heipieper *et al.*, 1991, Szogyi *et al.*, 1993, Sikkema *et al.*, 1994).

El incremento en la permeabilidad de la membrana hacia protones u otros iones conduce al colapso del potencial de membrana, provocando la incapacidad de generar energía

de transducción (Cartwright *et al.*, 1986, Sikkema *et al.*, 1994). Además afecta al control del pH interno de la célula y a la pérdida de metabolitos esenciales para la misma (Sikkema *et al.*, 1995).

1.1.2 Efecto sobre la función de matriz

La membrana celular, además de funcionar como barrera de permeabilidad es matriz de determinadas enzimas tales como las implicadas en el transporte de solutos y en la cadena transportadora de electrones. Muchas de éstas catalizan reacciones y sus polipéptidos se localizan a través de la parte interna o externa de la membrana. Además existen estudios que han demostrado que la actividad de determinadas enzimas, tales como enzimas con actividad ATPasa, o transportadores de azúcares, está influenciada por las características fisico-químicas de la membrana (Yeagle, 1989, Veld *et al.*, 1991). Algunas de estas proteínas dependen para su actividad de determinados fosfolípidos que se unen a ellas y que son necesarios para la correcta configuración y orientación de las mismas (Sandermann, 1978, Carruther y Merchior, 1986). El desplazamiento de estos lípidos como consecuencia de la acumulación de disolventes orgánicos resultaría en la inactivación de estas enzimas (Sandermann, 1983). La interacción de los disolventes con las membranas afectaría pues a la función de matriz y por lo tanto a la funcionalidad de las proteínas embebidas en ella.

2. ADAPTACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS A CONCENTRACIONES ELEVADAS DE DISOLVENTES ORGÁNICOS

La acumulación de disolventes en la membrana influye en la fluidez de la membrana y en la estabilidad de la bicapa. Estos cambios en las propiedades físico-químicas de la membrana afectan a su permeabilidad, así como a la actividad de las enzimas embebidas en ella. Consecuentemente la viabilidad de la célula queda afectada (Weber y de Bont, 1995).

Pero a pesar de la toxicidad de los hidrocarburos aromáticos, se han descrito cepas de microorganismos que toleran altas concentraciones de estos disolventes. Inoue y Horikoshi en 1989 fueron los primeros en describir el aislamiento de una cepa de *Pseudomonas* capaz de tolerar concentraciones de hasta el 50% (v/v) de tolueno en el medio de cultivo. La cepa, sin embargo, no era capaz de metabolizar tolueno. Otros autores han descrito el aislamiento de otras cepas del género *Pseudomonas* capaces de sobrevivir en la presencia de 50% (v/v) de *p*-xileno (Cruden *et al.*, 1992), y 1% (v/v) de estireno en el medio de cultivo (Weber *et al.*, 1993). En el grupo de Degradación de Tóxicos Orgánicos de la Estación Experimental del Zaidín, y anterior al inicio de esta Tesis Doctoral se aisló una cepa del género *Pseudomonas* denominada DOT-T1 que presentó tolerancia a concentraciones de hasta el 90% (v/v) de

tolueno en el medio de cultivo y que era capaz de utilizar este compuesto como fuente de carbono y energía.

Estos microorganismos son capaces de adaptarse a la presencia de concentraciones saturantes de disolventes en el medio de cultivo gracias a algún/os tipo/s de modificación/es realizadas por el microorganismo sobre alguno de los componentes de la membrana.

2.1 Adaptaciones a nivel de la membrana

Se han descrito numerosos cambios adaptativos en la composición de la membrana como consecuencia de la acumulación de determinados disolventes orgánicos, estos cambios están dirigidos a contrarrestar los efectos provocados por la acumulación estos tóxicos. Las modificaciones de la composición de la membrana parecen ser una vía para restaurar la fluidez de la membrana (Sinensky, 1974) y mantener su estructura y funcionalidad. Además estos mecanismos de compensación son similares a los observados en respuesta a cambios físicos y químicos en el medio ambiente (Russell y Fukunaga, 1990).

2.1.1 Membrana citoplásmica: Cambios en la composición de los ácidos grasos y fosfolípidos y sus grupos de cabeza

Los primeros estudios de adaptación a disolventes orgánicos son los referidos a los mecanismos de adaptación de los microorganismos a alcoholes (ver Weber, 1995 para una revisión) observándose un incremento en la incorporación de ácidos grasos insaturados, que contrarrestan los efectos del alcohol sobre la estructura de bicapa. Este aumento en la incorporación de lípidos menos fluidos compensa el incremento en la fluidez de membrana causada por el alcohol (fenómeno que se denomina adaptación homeoviscosa) (Sinensky, 1974).

Ingram en 1977 observó que *E. coli* en presencia de disolventes polares, tales como acetona, compensaba la alteración de la membrana con un aumento en la síntesis de ácidos grasos insaturados de la membrana, mientras que la presencia de disolventes apolares (benceno, cloroformo, anilina) provocaba un incremento en la cantidad de ácidos grasos saturados.

En cepas pertenecientes al género *Pseudomonas* se ha observado que existe un mecanismo de adaptación diferente en respuesta a la presencia de disolventes y consistente en la conversión de determinados ácidos grasos *cis* en sus correspondientes isómeros *trans* (Diefenbach *et al.*, 1992, Heipieper *et al.*, 1992, Weber *et al.*, 1994, Ramos *et al.*, 1997b). La isomerización del doble enlace en algunos de los fosfolípidos de la membrana no es

debido a un mecanismo de síntesis *de novo* de lípidos sino que es una modificación post-sintética catalizada por el enzima Cti (Holtwick *et al.*, 1997, Junker y Ramos, 1999).

Los isómeros *cis* tienen un plegamiento con un ángulo de 30° en la cadena acílica hidrocarbonada, lo que le confiere a la membrana mayor fluidez, los ácidos grasos *trans* tienen una configuración estérica similar a los ácidos grasos saturados por lo que el incremento en la relación *trans/cis* tiene un efecto rigidificante en la membrana compensando la fluidez provocada por el reparto en la misma de los disolventes orgánicos (Figura 12).

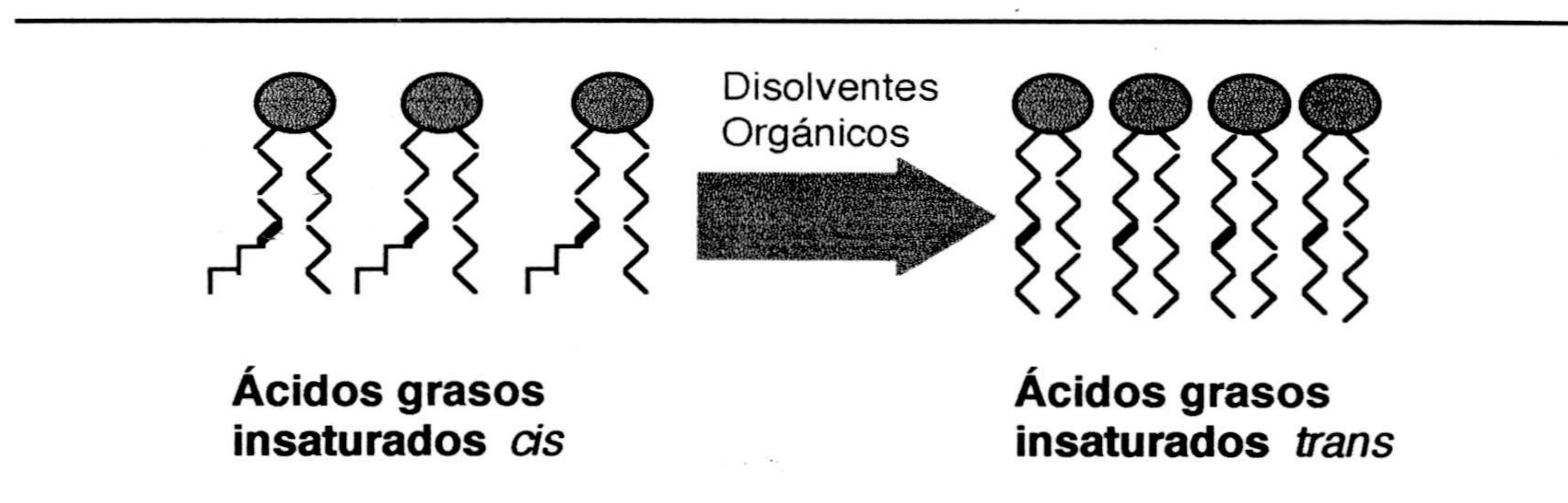


Figura 12. Configuraciones de ácidos grasos insaturados en *cis* y *trans*. El trazo negro más grueso representa la posición del doble enlace.

Otro mecanismo celular para conseguir una reducción de fluidez de la membrana consiste en el cambio de la composición de los grupos de cabeza polares de los fosfolípidos.

En el caso de bacterias Gram-negativas, los tres grupos de cabeza mayoritarios son: fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilglicerol (PG) y difosfatidilglicerol o cardiolipina (CL) (Raetz, 1978). En condiciones de ausencia de disolventes alrededor del 75% de los grupos polares de cabeza están en forma de PE mientras que el resto se reparten a partes iguales entre PG y CL (Ramos *et al.*, 1997). En presencia de disolventes orgánicos se observan cambios en estos porcentajes aumentando el nivel de CL en respuesta al incremento en la concentración de tolueno en el medio (Weber *et al.*, 1995., Ramos *et al.*, 1997).

El PE es un fosfolípido con un área de cabeza relativamente pequeña comparada con PG y CL por lo que el descenso en la incorporación de PE y el aumento en la incorporación de CL hace que incremente el área media del grupo de cabeza de los fosfolípidos, lo cual compensa el incremento del volumen lipídico causado por la acumulación de tolueno y así estabiliza la estructura en bicapa de la membrana. Se han observado cambios similares en la composición de fosfolípidos de *E. coli* en presencia de etanol o temperaturas elevadas, y ello se traduce en un incremento de la rigidez de la membrana (Rock y Cronan, 1982).

En otras cepas de *Pseudomonas* se ha observado que en presencia de disolventes orgánicos existe un aumento del nivel de PE y un descenso en el nivel de PG. PE tiene un punto de fusión más elevado que PG por lo que el aumento del primero tiende a estabilizar la membrana celular (Pinkart y White, 1997). Así, parece que existen diferentes tipos de cambios en la composición de grupos de cabeza, en distintas cepas de *Pseudomonas*, pero en general todos ellos conllevan protección frente a los efectos tóxicos de los disolventes sobre las células.

2.1.2 Membrana externa

A través de estudios comparativos se ha observado que las bacterias gram-negativas son, en general, menos sensibles a disolventes orgánicos que las gram-positivas (Sheu y Freese, 1973, Harrop *et al.*, 1989, Inoue y Horikoshi, 1991). Por otra parte los microorganismos que son capaces de presentar resistencia frente a disolventes orgánicos son todos gram-negativos, por lo que la membrana citoplasmática podría ser crítica con respecto a la toxicidad a disolventes.

Los lipopolisacáridos (LPS) presentes en la membrana externa tienen una inusual baja permeabilidad para compuestos hidrofóbicos (Yoshimura y Nikaido, 1982, Hiruma *et al.*, 1984, Nikaido y Vaara, 1985, Vaara *et al.*, 1990) contribuyendo a la resistencia que adquieren los microorganismos gram-negativos a estos solutos. Los ácidos grasos presentes en los LPS son de tipo saturado, esto determina que el interior de la capa de los LPS sea menos fluida (Seydel *et al.*, 1993). La estructura de los LPS en la cepa *P. putida* Idaho cambia en respuesta a la exposición a xileno (Pinkart *et al.*, 1996). Sin embargo, no existen evidencias que permitan evaluar el papel de los LPS en la resistencia a disolventes.

Por otro lado se ha descrito que las bacterias gram-negativas son más resistentes a la presencia de solutos hidrofóbicos cuando se cultivan en presencia de cationes divalentes como Mg^{2+} y Ca^{2+} (Stan-Lotter *et al.*, 1979, Inoue y Horikoshi, 1989, Ramos *et al.*, 1995), este efecto es debido al papel que juegan estos iones en la unión de moléculas de LPS para formar una red estable sobre la superficie de la membrana externa.

Así, la membrana externa parece que juega un papel importante en los mecanismos de defensa frente a disolventes orgánicos. Esto se ha puesto de manifiesto en la cepa *P. putida* DOT-T1Ppal1, mutante de DOT-T1 que carece de la proteína de membrana OprL ("outer membrane protein L"), proteína necesaria para el mantenimiento de la integridad de la envoltura celular de *P. putida* (Rodríguez-Herva *et al.*, 1996). Éste mutante es hipersensible a tolueno, lo que sugiere que la respuesta a disolventes orgánicos requiere la integridad de la estructura superficial de la membrana (Ramos *et al.*, 1997b).

3. ESTRATEGIAS BACTERIANAS PARA PREVENIR LA ACUMULACIÓN DE DISOLVENTES ORGÁNICOS EN LAS MEMBRANAS CELULARES

La toxicidad de los disolventes orgánicos debido a la acumulación en las membranas puede ser contrarrestada por las células por medio de la modificación de la membrana que la hacen menos susceptible a la presencia de éstos. Como hemos referido anteriormente en esta adaptación están implicados la alteración en el perfil de ácidos grasos y en la composición de los grupos de cabeza. Todo esto lleva a la estabilización de la estructura física de la membrana y juega un papel como barrera en la presencia de disolventes.

Pero existen otros mecanismos más agresivos que permiten a los microorganismos prevenir la acumulación de los disolventes orgánicos en sus membranas celulares.

3.1 Degradación o modificación del disolvente

Un método para prevenir la acumulación de los disolventes en las membranas es la modificación del compuesto haciéndolo menos lipofílico. En el caso de los hidrocarburos aromáticos la modificación de un compuesto es posibles a través de la oxidación parcial del compuesto o haciéndolo más soluble en agua y dando lugar a conjugados del mismo. La completa mineralización de un compuesto puede ser un método efectivo para eliminar el efecto tóxico como ocurre en el caso de microorganismos que crecen en hidrocarburos aromáticos como estireno y tolueno (Weber *et al.*, 1994., Ramos *et al.*, 1995). Pero aunque el metabolismo de tóxicos orgánicos puede ayudar a reducir la toxicidad existen evidencias que sugieren que es de menor importancia, ya que un gran número de microorganismos que son tolerantes a concentraciones elevadas de disolventes orgánicos no pueden metabolizarlos (Inoue y Horikoshi, 1989). Por otro lado, en estudios con la cepa DOT-T1E (que es tolerante a concentraciones muy elevadas de tolueno y lo utiliza como fuente de carbono) se ha demostrado que en mutantes incapaces de crecer en tolueno no hay pérdida de la tolerancia al mismo (Mosqueda *et al.*, 1999). Esto establece una clara diferencia entre la tolerancia a disolventes y el metabolismo de los mismos.

3.2 Mecanismos de exclusión activa

Durante la evolución las bacterias se han expuesto a diferentes compuestos tóxicos, tales como toxinas, antibióticos, etc. Así se ha descrito la existencia en bacterias de sistemas de flujo unidireccional que confieren numerosas resistencias a diferentes tóxicos (MDR de "Multidrug resistance") y que llevan a cabo la expulsión desde el interior de la célula al medio externo de un gran número de compuestos, relacionados funcional y estructuralmente.

Recientemente se ha descrito que la existencia de estos sistemas de expulsión activa es la causa principal de la enorme resistencia a agentes antimicrobianos en bacterias (Levy, 1992, Bolhuis *et al.*, 1997, Lewis *et al.*, 1997).

Estudios preliminares, a través de acumulación de disolventes marcados radioactivamente en las membranas en cepas de *Pseudomonas* tolerantes a disolventes, pusieron de manifiesto la existencia de algún sistema que redujese la acumulación de disolventes en las membranas (Isken y de Bont, 1996, Ramos *et al.*, 1997). Pero la evidencia más clara de que estos sistemas están implicados en el sistema de expulsión de disolventes orgánicos fuera de las membranas como mecanismo de defensa en cepas del género *Pseudomonas* ha sido la identificación y la caracterización molecular de dos sistemas de exclusión similares, pero distintos, implicados en la resistencia a disolventes (Kieboom *et al.*, 1998a, Ramos *et al.*, 1998). En los dos casos la obtención de mutantes sensibles a disolventes ha dado lugar a la caracterización de estos sistemas. Las proteínas codificadas por los genes *srp* (de "solvent resistant pump") en la cepa *Pseudomonas putida* S12 (Kieboom *et al.*, 1998b) y las codificadas por los genes *ttg* (de "toluene tolerance genes") en la cepa DOT-T1 (Ramos *et al.*, 1998b) presenta gran homología con los sistemas de extrusión de numerosas sustancias tóxicas en *P. aeruginosa* y *E. coli*. Se ha comprobado que los genes *srpA* y *ttgA* codifican proteínas periplásmicas que actúan de unión entre proteínas transportadoras, dependientes de energía, de membrana interna codificadas por los genes *srpB* y *ttgB* y proteínas de membrana externa codificadas por los genes *srpC* y *ttgC*. Los mutantes en este tipo de sistemas son significativamente más sensibles a disolventes que la cepa parental, pero se ha encontrado la existencia de diferentes grados de sensibilidad a diferentes disolventes en distintas cepas. Ello sugiere que puede existir un nivel distinto de expresión de los genes en las diferentes cepas, o que existen otros sistemas implicados en la tolerancia a disolventes en estas cepas.

OBJETIVOS



En la Introducción de esta Tesis Doctoral se han descrito las rutas catabólicas para la degradación aeróbica de tolueno y se han desarrollado distintos aspectos de la toxicidad de este hidrocarburo aromático. Asimismo se ha descrito que un número limitado de microorganismos son tolerantes a concentraciones elevadas de tolueno. Anterior al inicio de este trabajo de Tesis Doctoral y en nuestro grupo de investigación de Tóxicos Orgánicos, se aisló una cepa de *Pseudomonas* capaz de sobrevivir en presencia de concentraciones supersaturantes de tolueno. Esto abrió el camino para la caracterización de la cepa con vistas a su aplicación práctica en zonas contaminadas. Los objetivos de este trabajo fueron:

1. La caracterización fisiológica de la cepa *Pseudomonas* DOT-T1 que es tolerante a altas concentraciones de tolueno.
- 2- Aislamiento y caracterización de cepas degradadoras de tolueno aisladas de suelos contaminados con altas concentraciones del mismo. Dentro de este objetivo se estudiaron los mecanismos de adaptación a disolventes orgánicos así como la ruta para la degradación de tolueno que presentaron las cepas aisladas.
- 3- Supervivencia en microcosmos y en columnas de suelo contaminados con hidrocarburos aromáticos de cepas tolerantes a tolueno y degradadoras de este compuesto.



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 Degradación de Tóxicos Orgánicos de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC-Granada), y cepas cedidas por otros grupos de investigación. También se han aislado cepas del suelo con determinadas capacidades metabólicas, cuyas características se describen en el apartado correspondiente de la sección de Resultados.

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

2. 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, o por filtración utilizando filtros de 0,22 μm de diámetro de poro.

Los medios de cultivo líquidos ocuparon un volumen del 25% al 35% del frasco de cultivo.

2.1 Medios ricos

Como medio habitual de crecimiento de las cepas de *E. coli* se utilizó el medio Luria-Bertani (LB) (Maniatis *et al.*, 1982), cuya composición fue la siguiente: Bactotripton, 10 g; extracto de levadura, 5 g; NaCl, 10 g y H₂O hasta 1 L.

Para la preparación de medio sólido se añadió bacto-agar para alcanzar una concentración final del 1,5% (p/v) y se esterilizó en el autoclave.

2.2 Medios mínimos

Para el cultivo de células en medio mínimo se utilizó una modificación del medio M9 (Maniatis *et al.*, 1982) cuya composición fue la siguiente: Solución 10xM9, 100 mL; Solución A9 ("goodies") 2,5 mL; MgSO₄ 1 M, 1 mL; Citrato férrico amónico 6‰ (p/v), 1 mL y H₂O hasta 1 L. Las soluciones empleadas en este medio se prepararon y esterilizaron por separado en el autoclave.

La composición de la solución 10xM9 fue: Na₂HPO₄ x 7H₂O, 70 g; KH₂PO₄, 30 g; NH₄Cl, 10 g; NaCl, 5 g y H₂O hasta 1 L.

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.

Estirpe	Genotipo/fenotipo	Fuente o referencia
<i>Escherichia coli</i>		
CC118 λ pir	Δ (ara-leu)7697, Δ araD139, Δ lacX74 galK, galE, phoA20, thi-1, rpsE, rpoB, argE(Am), recA1, λ pir.	Herrero <i>et al.</i> , 1990
HB101	F ⁻ , supE44, hdsS20(r _B m _B), recA13, Δ ara14, proA2, lacY1, galK2, rpsL20, xyl5, mtl1.	Boyer y Roullan-Dussoix, 1969
<i>Pseudomonas</i>		
<i>P. mendocina</i> KR1	Cm ^R , Tol ⁺	Whited <i>et al.</i> , 1991
<i>P. mendocina</i> KR1R	Rif ^R derivada de KR1	Este trabajo
<i>P. putida</i> EEZ15	FT ^R derivada de KT2440, Tol ⁺	Ramos-González <i>et al.</i> , 1991
<i>P. putida</i> EEZ15R	Rif ^R derivada de EEZ15	Este trabajo
<i>P. putida</i> DOT-T1	Ap ^R , Cm ^R , Tol ⁺ , Tol ^R	Ramos <i>et al.</i> , 1995
<i>P. putida</i> DOT-T1E	Rif ^R derivada de DOT-T1	Ramos <i>et al.</i> , 1995
<i>P. putida</i> DOT-T1-Km	Km ^R , DOT-T1 mini-Tn5-Km	Este trabajo
<i>P. putida</i> F1	Cm ^R , Tol ⁺	Gibson <i>et al.</i> , 1970
<i>P. putida</i> F1-Te	Te ^R , F1 mini-Tn5-Te	Este trabajo
<i>P. putida</i> F1R	Rif ^R derivada de F1	Este trabajo
<i>P. putida</i> KT2440	Ap ^R , Cm ^R , Tol ⁺	Franklin <i>et al.</i> , 1981
<i>P. putida</i> MTB5	Ap ^R , Nal ^R , Tol ⁺	Este trabajo
<i>P. putida</i> MTB5R	Rif ^R derivada de MTB5	Este trabajo
<i>P. putida</i> MTB6	Ap ^R , Rif ^R , Tol ⁺	Este trabajo
<i>P. putida</i> MTB6R	Rif ^R derivada de MTB6	Este trabajo
<i>P. putida</i> SMO116	Ap ^R , Cm ^R , Tol ⁺	Møller <i>et al.</i> , 1996
<i>P. putida</i> SMO116R	Rif ^R derivada de SMO116	Este trabajo

La solución A9 se compuso de: HBO₃, 300 mg; ZnCl₂, 50 mg; MnCl₂ x 4H₂O, 30 mg; CoCl₂, 200 mg; CuCl₂ x 2H₂O, 10 mg; NiCl₂ x 6H₂O, 20 mg; NaMO₄ x 2H₂O, 30 mg y H₂O hasta 1 L.

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

a) Azúcares: Glucosa, fructosa y lactosa se prepararon en soluciones concentradas al 20% (p/v) que se esterilizaron en el autoclave, se almacenaron a 4°C y se añadieron al medio para alcanzar una concentración final del 0,5% (p/v).

b) Compuestos aromáticos: se utilizaron a una concentración final en el medio de 5 mM. Salicilato, benzoato, 3-metilbenzoato, 3,4-dihidroxibenzoato, 4-hidroxifenilacético, 4-hidroxibenzoato, catecol y 3-metilcatecol se prepararon en soluciones concentradas 0,5 M a pH 7, se esterilizaron en el autoclave o por filtración y se almacenaron a 4°C. Los alcoholes 3-metilbencílico, 2-metilbencílico y bencílico se prepararon a concentración 0,5 M en dimetilformamida.

El tolueno y sus derivados líquidos se suministraron en fase gaseosa a través de una atmósfera saturada de los mismos, la cual se generó introduciendo una varilla hueca dentro del matraz de cultivo (cultivos líquidos), o con una varilla rellena de papel de filtro depositada sobre la tapa de una placa de petri invertida (cultivos sólidos) y sellando éstos con parafina. Alternativamente estos compuestos se añadieron disueltos en dimetilformamida para alcanzar una concentración en el medio de cultivo de 1 mM.

c) Mezclas complejas. Se usaron distintos tipos de gasolinas para estudios de tolerancia y supervencia en suelo de las cepas bajo estudio. Las gasolinas usadas presentaron la siguiente composición (cortesía de Miguel Herrero, Madese S.A):

- Gasolina Plomada (97 octanos). Mezcla compleja de hidrocarburos parafínicos, nafténicos, olefínicos y aromáticos con un número de carbonos entre C4 y C12. Como componentes identificados presenta: Tolueno (0-15%); xileno (0-10%); benceno (0-5%); hexano (0-20%); etilbenceno (0-5%); metanol (0-3%) y etanol (0-5%)

- Gasóleo. Combinación compleja de hidrocarburos procedentes de la destilación del petróleo crudo con un número de carbono entre C9 y C20. Presenta cantidades significativas de hidrocarburos aromáticos policíclicos.

- Gasolina sin plomo (95 octanos). Presenta la misma composición que la plomada, la diferencia es la disminución de la presencia de plomo.

Para la preparación de medios sólidos se añadió bacto-agar 2% (p/v) o agar noble 2,25% (p/v).

2.3 Antibióticos

Las soluciones de antibióticos se prepararon 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 $\mu\text{g/mL}$: Ácido nalidíxico (Nal), 10-20; ampicilina (Ap), 50-100; cloranfenicol (Cm), 30; estreptomina (Sm), 25-50; kanamicina (Km) 25-50; rifampicina (Rif), 10-50 y tetraciclina (Tc), 10-20.

2.4 Sales Metálicas

El telurito potásico (Tel) se preparó en solución 1000 veces concentrada en H_2O destilada, se esterilizó por filtración, se almacenó a -20°C y se utilizó a una concentración final de $30 \mu\text{g/mL}$.

3. CONSERVACION DE CEPAS BACTERIANAS

La conservación de cepas a corto plazo se hizo en cultivos en estría en placas de medios mínimos selectivos a 4°C . La conservación a largo plazo se hizo por congelación de cultivos líquidos en 40% (v/v) de glicerol a -20°C y -70°C .

4. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE MICROORGANISMOS DEL SUELO

4.1 Aislamiento de bacterias del suelo

Se tomaron 90 gramos de suelo (características en la sección 16) procedentes del jardín de la Estación Experimental del Zaidín y se depositaron en tarros de cristal a los que se añadieron distintas concentraciones de tolueno (0,1, 1 y 10% v/p), se cubrieron con papel de aluminio, se sellaron con papel de parafina y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 días. Periodicamente, se tomaron 10 g de suelo de cada uno de los microcosmos, y tras realizar diluciones seriadas se sembraron placas en medio mínimo con tolueno que se incubaron a 30°C durante 1-4 días. Las colonias con distinta apariencia morfológica se purificaron mediante sucesivas estrias en el mismo medio sólido hasta que apareció un solo tipo de colonia. La pureza de los cultivos se comprobó mediante observación al microscopio de cultivos teñidos con el método de Gram, ensayos de API y con la amplificación y secuenciación del ADN que codifica el ARNr 16S (ver siguiente sección).

4.2 Identificación de las bacterias aisladas de suelo

Las bacterias aisladas se caracterizaron mediante ensayos fisiológicos y metabólicos.

La tinción de Gram de bacterias aisladas del suelo se realizó utilizando el sistema “Accustain Gram Stain” de la casa comercial Sigma (ref. HT90).

Para la identificación de estas bacterias a nivel de género, se utilizaron los sistemas de identificación de la casa comercial Biomérieux para enterobacterias API-20E (ref. 2010) y para bacterias gram-negativas no enterobacteriaceas API 20NE (ref. 2005). Estos paquetes comerciales permitieron realizar distintas pruebas metabólicas a partir de suspensiones bacterianas.

Para la identificación a nivel de especie se determinó el perfil de fosfolípidos mediante análisis gases-masas realizados por la compañía Microbial Identification Systems (Analytical Services, Williston, VT 05495, USA) y se amplificó y secuenció el ADN que codifica el ARNr 16S (ver apartado 9.5). Las secuencias del ADN que codificaban el ARNr 16S se compararon con las depositadas en bancos de datos disponibles en la red.

5. PLÁSMIDOS

En la Tabla 2 se relacionan los plásmidos utilizados en este trabajo junto con sus características más relevantes. Además se describen sus propiedades brevemente.

Tabla 2. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmido	Características	Fuente o referencia
pAW31	Ap ^R , <i>xyIE</i>	A. Wasserfallen
pERD100	Tc ^R , Pm:: <i>lacZ</i> , IncP1	Ramos <i>et al.</i> , 1990
pGSH2873	Ap ^R , <i>xyIAB</i>	Harayama <i>et al.</i> , 1989
pMT100	Km ^R , Tc ^R , <i>xyIS</i>	M.T. Gallegos 1996
pRK600	Cm ^R , ColE1 <i>oriV</i> , RK2 <i>mob</i> ⁺ <i>tra</i> ⁺	Kessler <i>et al.</i> , 1992
pUT/ mini-Tn5 / Km	Ap ^R , Km ^R , R6K <i>oriV</i> , RP4 <i>oriT</i>	de Lorenzo <i>et al.</i> , 1990
pUT/ mini-Tn5 / Tel	Ap ^R , Tel ^R , R6K <i>oriV</i> , RP4 <i>oriT</i>	Sánchez <i>et al.</i> , 1998
pWW0	IncP9, <i>mob</i> ⁺ <i>tra</i> ⁺ , 3MB ⁺	Worsey and Williams, 1975

pAW31: Plásmido derivado de pEMBL9 que porta el gen *xyIE* del plásmido TOL pWW0 clonado como un fragmento *Sall* de 1,5 kb (A. Wasserfallen, comunicación personal).

pERD100: Plásmido portador de una fusión Pm::*lacZ*, que se construyó clonando un fragmento *Pst* I de 401 pb, que contiene el promotor de la ruta *meta* del plásmido TOL (Pm), proveniente de pJLR101, en el sitio *Pst* I de pMP220 (Ramos *et al.*, 1990).

pGSH2873: Plásmido derivado de pGSH2819 que se construyó clonando un segmento *Bam*HI de 11,4 kb de pWW0-161::Tn5-68 (Harayama *et al.*, 1986) en pLV85. Este plásmido porta los genes *xyl*AB del operon upper del plásmido TOL pWW0 clonado como un fragmento *Sal*I de 6.5 kb (Harayama *et al.*, 1989).

pMT100: Plásmido construido clonando el fragmento *Bam*HI de 1,7 kb procedente del plásmido pJLR156, que contiene el gen *xyl*S, en el sitio *Bam*HI de pBR322 Ω Km. En este plásmido, *xyl*S se expresa desde el promotor del gen de resistencia a la tetraciclina (P_{tet}). El plásmido codifica resistencia a Km. (M.T. Gallegos, 1996).

pRK600: Plásmido auxiliar utilizado para movilizar plásmidos *mob*^{+*tra*⁻. Es portador del sistema de replicación ColE1 cuyo espectro de huésped se restringe a *E. coli* y, por tanto, se comporta como vector suicida en *Pseudomonas*. Por otro lado, lleva la región de transferencia del plásmido pRK2 que permite la movilización de plásmidos *mob*⁺ a un amplio espectro de huéspedes (de Lorenzo *et al.*, 1990).}

pUT: plásmidos suicidas construidos a partir del vector pGP704 (de Lorenzo *et al.*, 1990). Estos plásmidos codifican resistencia a ampicilina, presentan el origen de replicación del plásmido R6K y su replicación es dependiente de la proteína π , lo que los hace suicidas en fondos genéticos carentes del gen que codifica dicha proteína. Los plásmidos pertenecientes a la serie pUT portan las dos repeticiones invertidas de 19 pb del transposón Tn5 y en presencia de la transposasa de Tn5, las secuencias de ADN incluidas entre dichas secuencias invertidas se transponen. Estas secuencias transponibles se denominan mini-Tn5. Los correspondientes a mini-Tn5/Km, y mini-Tn5/Tel codifican resistencia a kanamicina y telurito respectivamente (Figura 13). En estos plásmidos la transposasa se encuentra fuera de la zona transponible, lo que permite su empleo para la obtención de inserciones estables. En este trabajo se utilizaron como fuente de marcaje con Km y Tel en distintas cepas de *P. putida*.

pWW0: Plásmido TOL arquetipo de la degradación de tolueno a través de la oxidación de la cadena alquímica lateral, pertenece al grupo de incompatibilidad IncP9. Este plásmido codifica las rutas catabólicas para el metabolismo de tolueno, *m*-xileno y 3-metilbenzoato. Es movilizable (*mob*⁺) y autotransmisible (*tra*⁺). (Worsey and Williams, 1975).

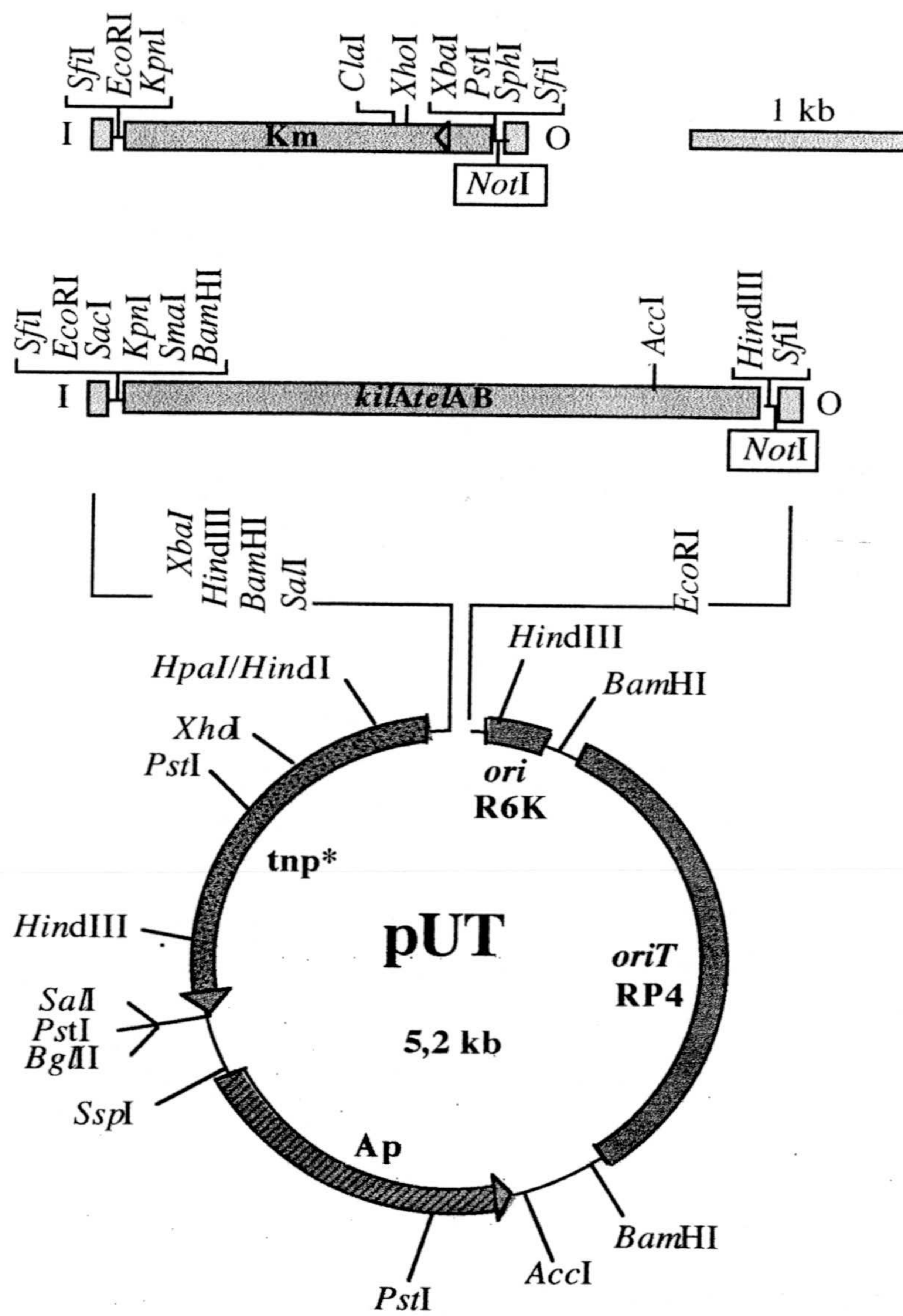


Figura 13. Esquema de la serie de plásmidos pUT. Se indican los genes que confieren resistencia a ampicilina (Ap), kanamicina (Km) y telurito (*kilAtelAB*). Los bordes I (izquierdo) y O (derecho) del mini-Tn5 se indican por recuadros. Se indica además el gen que codifica la transposasa (*tnp**), así como el origen de replicación (*ori* R6K) y el origen de transferencia (*oriT* RP4). El sitio *NotI* recuadrado es único tanto en el minitransposón como en la construcción final y puede utilizarse como sitio de clonación. La figura ha sido adaptada a partir del artículo publicado por de Lorenzo *et al.*, (1990).

6. AISLAMIENTO DE ADN PLASMIDICO

Para el aislamiento de ADN plasmídico se utilizaron los métodos que se describen a continuación, dependiendo del grado de pureza requerida y de la cantidad de ADN que se quisiera obtener, así como del tamaño del plásmido a aislar.

La cepa bacteriana portadora del plásmido de interés se cultivó con agitación durante 6-14 horas a 30°C en medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes.

6.1 Método "Qiapreps"

El sistema "Qiapreps spin plasmid kit" (Qiagen, ref. 27104) se utilizó para la preparación rápida de ADN plasmídico libre de ARN, partiendo de un volumen de cultivo de 3 mL y siguiendo las instrucciones del fabricante. Este ADN plasmídico se empleó para la obtención de sondas génicas.

6.2 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) con algunas modificaciones.

Se partió de un volumen de 1,5 mL de cultivo. Las células se recogieron por centrifugación a 12000 g durante 2 minutos. Tras eliminar el sobrenadante, éstas se resuspendieron en 100 μ L de GTE y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación se añadieron 200 μ L de solución de lisis, se agitó el tubo suavemente por inversión y se incubó durante 5 minutos en hielo. El lisado se neutralizó añadiendo 150 μ L de tampón acetato sódico 3 M pH 4,8 y, tras mezclar el tubo por inversión, se incubó durante 30 min en un congelador a -20°C. Las proteínas, el ADN cromosómico y los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 12000 g durante 15 min y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio. Posteriormente se añadieron 0,6 volúmenes de isopropanol frío, se incubó durante 30 min a -20°C y se centrifugó a 12000 g durante 10 min. Tras descartar el sobrenadante, el precipitado se resuspendió en 200 μ L de acetato sódico 0,3 M pH 4,8.

Finalmente se añadieron 2 volúmenes de etanol frío y la mezcla se incubó a -20°C durante 30 min. Para precipitar el ADN se centrifugó a 12000 g durante 15 min. El precipitado se lavó con etanol 70% (v/v) y se centrifugó a 12000 g durante 5 min. El sedimento de ADN se dejó secar a 37°C y se resuspendió en 50 μ L 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; EDTA-Na₂, 10 mM. La solución se esterilizó en el autoclave y se conservó a 4°C.

Solución de lisis: SDS 1% (p/v) y NaOH 0,2 N. Esta solución fue de preparación extemporánea a partir de soluciones madre de SDS al 10% (p/v) y 2 N de NaOH.

Tampón acetato sódico pH 4,8: A 60 mL de una solución de acetato sódico 5 M se le añadieron 11,5 mL de ácido acético glacial y H₂O hasta 100 mL. Cuando fue necesario, 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 y EDTA-Na₂, 1 mM. Esta solución se esterilizó en el autoclave y se almacenó a 4°C.

6.3 Aislamiento de plásmidos a gran escala y purificación en gradiente de CsCl

Para la preparación de plásmidos a gran escala se utilizó el procedimiento de Jouain *et al.*, (1981).

Se partió de un preinóculo de 10 mL de la cepa portadora del plásmido a aislar cultivada durante 12-16 horas. El cultivo se diluyó 100 veces en 500 mL de LB suplementado con los antibióticos adecuados y se incubó a 30°C con agitación durante 12-16 h. Las células se recogieron por centrifugación a 4000 g durante 10 minutos y se resuspendieron en 30 mL de GTE. A continuación se lisaron mediante la adición de 60 mL de solución SDS/NaOH recién preparada mezclando suavemente por inversión. Esta mezcla se mantuvo en hielo durante 5 min y el lisado obtenido se neutralizó añadiendo 45 mL de KAcF. Después de incubar 15 min en hielo, las proteínas y gran parte del ADN cromosómico precipitados por la neutralización, se retiraron por centrifugación 5000 g durante 15 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se añadieron 80 mL de isopropanol mantenido a -20°C; el ADN se precipitó centrifugando a 12000 g durante 15 min. El sedimento se drenó, se secó al vacío y se resuspendió en 10 mL de TE.

Posteriormente se realizó la purificación del ADN plasmídico mediante centrifugación en gradiente isopícnico de cloruro de cesio. A la solución de ADN en 10 mL de TE se añadieron 11 g de CsCl y 0,5 mL de una solución de bromuro de etidio (10 mg/mL). Los restos de proteína se eliminaron por centrifugación a 4000 g durante 15 min a temperatura ambiente para evitar la precipitación del CsCl. El sobrenadante se transfirió a tubos de ultracentrífuga con ayuda de una pipeta Pasteur y, una vez equilibrados, se sellaron por calor. El gradiente de CsCl se obtuvo por ultracentrifugación a 145000 g en un rotor Beckman 50Ti durante 48 h a 15°C. Las bandas de ADN plasmídico y cromosómico se visualizaron exponiendo los tubos a luz ultravioleta de 360 nm, y la banda inferior correspondiente al ADN plasmídico se extrajo mediante succión con una jeringa.

El bromuro de etidio de la preparación se eliminó por extracción con solventes orgánicos. Se adicionó 1 volumen de butanol, se mezcló y se centrifugó a 12000 g durante 2 min. La fase superior con el bromuro de etidio se descartó, y la operación se repitió hasta que la fase acuosa aparecía incolora. El ADN se precipitó añadiendo 2 volúmenes de H₂O y 6 volúmenes de etanol absoluto, y tras incubarlo a -20°C durante 2 h, se recogió por centrifugación a 12000 g durante 10 min. El ADN precipitado se secó al vacío y se resuspendió en un volumen variable de H₂O o TE, entre 100 y 400 µL, dependiendo del número de copias del plásmido aislado.

6.4 Aislamiento de plásmidos TOL

Para la preparación de ADN del plásmido TOL pWW0 de *P. putida* y de sus derivados, se utilizó el método descrito por Kado y Liu (1981), modificado por Ramos-González *et al.*, (1991). Se partió de un cultivo en LB de la cepa portadora del plásmido. Las células se recogieron por centrifugación a 12000 g durante 2 minutos. Tras eliminar el sobrenadante, las células se resuspendieron en 400 µL de solución A y se incubaron a 4°C durante 5 minutos. A continuación se añadieron 200 µL de solución B, se agitó el tubo por inversión y se incubó durante 30-60 minutos a 55°C. Posteriormente se añadieron 0,1 volúmenes de MgCl₂ 0,1 M y se agitó el tubo por inversión. El ADN se extrajo con 1 volumen de fenol neutro, tras centrifugar la mezcla a 12000 g durante 10 min, seguido de una extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y de otra extracción con cloroformo-alcohol isoamílico. Finalmente, el ADN de la fase acuosa se precipitó por centrifugación a 12000 g durante 15 min tras añadir dos volúmenes de etanol absoluto frío y 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M pH 5,5. El precipitado se lavó con 1 ml de etanol 70% (v/v) y se centrifugó a 12000 g durante 5 min. 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:

Solución A: Tris-HCl (pH 8,0), 25 mM; EDTA-Na₂ pH 8,0, 25 mM; Sacarosa, 20% (p/v)

Solución B: SDS, 2% (p/v) y NaOH, 0,3 N.

Fenol/cloroformo/alcohol isoamílico: Se utilizó una solución de fenol saturado de la marca comercial Amresco (Ref:1-800-448-442), la solución se saturó con Tris-ClH hasta alcanzar un pH de 7,9. Finalmente, se mezclaron el fenol, el cloroformo y el alcohol isoamílico en proporción 25:24:1 (v/v/v). La solución se conservó a 4°C en oscuridad.

Cloroformo/alcohol isoamílico: Se mezclaron el cloroformo y el alcohol isoamílico en proporción 24:1 (v/v). La solución se conservó a 4°C en oscuridad.

7. AISLAMIENTO DE ADN TOTAL

Se siguió el método utilizado para el aislamiento de plásmidos TOL (apartado 5.4 de esta sección), eliminando la incubación durante 30 minutos a 55°C.

8. TRANSFERENCIA DE PLÁSMIDOS POR CONJUGACIÓN

La conjugación bacteriana se utilizó para la transferencia de ADN plasmídico desde *E. coli* a cepas de *Pseudomonas*. El sistema utilizado fue el denominado "triparental". En este sistema de cruce, las funciones de transferencia (*tra*) son aportadas en *trans* por un plásmido auxiliar autotransferible (pRK600), el cual moviliza el plásmido en cuestión; de esta forma, la bacteria portadora del plásmido auxiliar también forma parte del cruce (de Lorenzo *et al.*, 1990). Este sistema implica que las cepas donadora y receptora, así como la cepa auxiliar, deben estar marcadas adecuadamente con resistencias a antibióticos o con capacidades metabólicas específicas que permitan la selección de los transconjugantes y la contraselección de donadores, receptores y cepa auxiliar.

Se partió de cultivos de las cepas donadora y receptora del plásmido en cuestión, así como de la cepa portadora del plásmido auxiliar, que habían sido cultivadas a 30°C con agitación durante 12-16 horas. Aproximadamente 10^8 células de cada cultivo se recogieron por centrifugación a 12000 g durante 5 minutos, y las células sedimentadas se lavaron 2 veces con 1 mL de medio 1xM9. Posteriormente las células se mezclaron y se recogieron por centrifugación a 12000 g durante 2 minutos. A continuación se suspendieron en 100 μ L de 1xM9 y la suspensión bacteriana se depositó sobre un filtro de nitrocelulosa estéril de 0,22 μ m de diámetro de poro colocado sobre la superficie de una placa de LB sólido, incubándose a 30°C durante 16-20 horas. Transcurrido este tiempo, el filtro con las células se colocó en un tubo con 5 mL de medio 1xM9, y las células se resuspendieron por agitación. A partir de esta suspensión se hicieron diluciones seriadas en el mismo medio y se sembraron placas de medio selectivo para los transconjugantes. Las placas se incubaron a 30°C hasta la aparición de los transconjugantes. Las cepas donadora, receptora, y auxiliar, se sometieron al mismo tratamiento y se sembraron en placas del mismo medio selectivo, sirviendo de esta manera como controles negativos de la conjugación.

Simultáneamente se hicieron siembras en los medios correspondientes para el crecimiento de las cepas donadora, receptora, y auxiliar, con objeto de realizar el conteo del número de bacterias totales iniciales presentes en el cruce. La frecuencia de transferencia del plásmido se expresó como el número de transconjugantes por receptor.

9. MANIPULACION DE ADN

9.1 Determinación de la concentración de ADN

Para estimar la concentración de ADN de una solución se utilizó el método espectrofotométrico descrito por Maniatis *et al.*, (1982).

Se determinó la absorbancia de la solución de ADN a 260 nm y 280 nm, frente a un blanco de H₂O o TE dependiendo del disolvente utilizado en la disolución del ADN. La concentración de ADN de la muestra se calculó respecto al valor estándar de $A_{260}=1$ para soluciones con 50 $\mu\text{g/mL}$ de ADN de cadena doble. La relación A_{260}/A_{280} se utilizó para estimar el grado de pureza de la preparación, de forma que valores de esta relación por debajo de 1,8 se consideraron indicadores de contaminación por proteínas y/o fenol.

9.2 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 suministrado por la casa comercial (10 veces concentrado), y 0,5-5 unidades del enzima de restricción, en volúmenes finales de 10-30 μL completados con H₂O bidestilada estéril. Las digestiones de plásmidos se llevaron a cabo incubando las mezclas de reacción durante 2 horas a la temperatura indicada por el fabricante, mientras que las restricciones de ADN total se incubaron durante 12-16 h.

9.3 Electroforesis de ADN en geles de agarosa

La separación y visualización tanto de plásmidos completos como de fragmentos de ADN originados por la digestión con enzimas de restricción se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa. Por cada 5 μL de muestra a analizar se añadió 1 μL de tampón de carga, y la mezcla se depositó en un pocillo del gel de agarosa al 0,8% (p/v) en TAE, sumergido en una cubeta con el mismo tampón. La separación se realizó por electroforesis horizontal sumergida a un voltaje de 5-10 V/cm.

Las moléculas de ADN se tiñeron por inmersión en una solución con bromuro de etidio ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) durante 10 minutos y, tras lavar en agua para eliminar el exceso de bromuro de etidio, el ADN se visualizó mediante exposición del gel a luz ultravioleta (254 nm).

El tamaño de los fragmentos se estimó por interpolación en curvas logarítmicas del tamaño de cada fragmento frente a su movilidad relativa, utilizando como patrón los

fragmentos del ADN del fago λ cortado con los enzimas de restricción *HindIII*, *HindIII/EcoRI* o *BstEII*. Las imágenes se recogieron con una video-cámara acoplada a una impresora térmica, empleando el equipo "gelprinter" de la casa comercial TDI (Madrid).

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

Tampón TAE: Tris-base, 4,84 g; ácido acético glacial, 1,14 mL; EDTA- Na_2 0,5 M pH 8, 2 mL y H_2O hasta 1 L. Este tampón se preparó a partir de una solución 50 veces concentrada y esterilizada en el autoclave.

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

Los marcadores de peso molecular se prepararon de la siguiente forma: se cortaron 80 μL de ADN del fago λ (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) con 1,5 unidades de los enzimas *HindIII* y/o *EcoRI* por μg de ADN. Una vez digerido, se calentó a 80°C para separar las regiones *cos* de λ , y a la reacción se añadieron finalmente 80 μL de tampón de carga, completándose el volumen hasta 400 μL con TE, de forma que la concentración final de ADN en la solución fue de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

9.4 Recuperación de fragmentos de ADN de geles de agarosa

Una vez identificado el fragmento de ADN que se quería recuperar, se cortó el trozo de agarosa del gel que contenía el fragmento con ayuda de un bisturí, y se extrajo del mismo utilizando el sistema comercial Quiaex II (Qiagen ref. 20021) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

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

Este método se utilizó para la amplificación de genes cromosómicos de las rutas descritas para la degradación de tolueno, con el fin de emplearlos como sondas génicas en la caracterización de las rutas degradativas de las cepas objeto de estudio. También se usó para la amplificación de fragmentos cromosómicos de éstas en estudios de filogenia basados en el análisis de las secuencias del gen que codifica el ARNr 16S. Las secuencias de genes de las distintas rutas degradativas para el diseño de cebadores se obtuvieron de la base de datos GenEMBL (Tabla 3). El diseño de los cebadores se hizo en colaboración con Gilberto Mosqueda Cano.

La reacción de amplificación contenía: ADN molde, 0,05-1 μg ; cebador, 50-100 pmoles; tampón Taq ADN-polimerasa (10 x), 10 μl ; dNTPs, 0,1-0,2 mM de cada uno; Taq ADN-polimerasa, 5 U; H_2O hasta 100 μL .

Para la amplificación de fragmentos de ADN a partir del cromosoma de *P. putida* el programa de amplificación consistió en 35 ciclos de 1 minuto a 92°C, 1 minuto a 60°C y 1 minuto a 72°C, seguido de un ciclo de 10 minutos a 72°C.

Para amplificación del ADN que codifica el ARNr 16S el programa de amplificación consistió en 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, un minuto y medio a 50°C y dos minutos a 72°C, inicialmente se hizo un ciclo de desnaturalización a 94°C durante dos minutos y un ciclo final de extensión a 72°C durante cinco minutos. En algunos casos el ADN molde en lugar de ser ADN purificado fue ADN sin purificar extraído de una colonia de la cepa a usar, que se resuspendió en agua destilada. Los cebadores usados para amplificación y secuenciación fueron cedidos por el Dr. Ramón A. Rosselló-Mora del Departamento de Biología Ambiental de la Universidad de las Islas Baleares en Palma de Mallorca.

9.6 Secuenciación de ADN

La secuenciación se llevó a cabo en el servicio de secuenciación automática del Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra utilizando un aparato Applied Biosystems (modelo 373 STRECHT). El método de secuenciación fue el comercializado por Perkin Elmer, ABI PRISM™ Dye Terminator que utiliza en la reacción de extensión el enzima comercializado como "AmpliTaq ADN Polymerase" (ref. 402122), y emplea dideoxinucleótidos marcados diferencialmente con cromóforos fluorescentes.

10. TRANSFERENCIA DE ADN A MEMBRANA POR EL MÉTODO DE "SOUTHERN BLOT" E HIBRIDACIÓN

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

10.1 Transferencia de ADN.

10.1.1 Por capilaridad.

Las muestras de ADN, cromosómico o plasmídico, digeridas con enzimas de restricción 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).

Tabla 3. Cebadores usados para la amplificación de genes cromosómicos en el estudio de las rutas degradativas de las cepas de estudio.

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Producto
Cebador	Ruta TOD	
C1A	CAATGAATCAGACCGACAC	<i>todC1</i>
C1B	CAGCGTGTGCGCCTTCAG	
C2A	CCCATGATTGATTTCAGCC	<i>todC2</i>
C2B	CCTAGAACAAGAACTGAGG	
B1	CATGACTTGGACATACAT	<i>todB</i>
B2	CATCACTTCAACTCCCCGT	
D1	CACGTGAGACTTGAAGGCGA	<i>todD</i>
D2	CTCAACCGAAGTGCTTGTCCA	
DE1	CTCATGAGCATTCAAAGATTGGGCT	<i>todE</i>
DE2	CAGGCGGGCGCCTGGA ACTT	
DS1	CAAGATGAGCTCCTTGGATAGA	<i>todS</i>
DS2	CACTCATGTGCCGGAGCCCTGTCT	
T1	CGTATGGGATTGGCAATCTGTCT	<i>todT</i>
T2	CTATTCCAGGCTATCCT	
A1	CATGGCTACCCATGTGGCGAT	<i>todA</i>
A2	CTCACGTTAGGTCTCCTTCA	
T3	CGAGTAACTGAGCGGCTCAAGGATAGCCT	<i>ttgD</i>
125R	CGGCGCAAGTGCAGGCAGTCAGCACTCCATT	
Cebador	Otras rutas	
XM1	AGAATTCGACACGCTTCGTTATTACCTGA	<i>xyIM</i>
XM2	TCTTAAGTCAAATGCTAGCCACCCGACCC	
XE1	CATGAAAAAAGGAGTTATGCGCCCGGGCCA	<i>xyIE</i>
XE2	CAGGTCAGCACGGTCATG	
XC1	CTATGCGGGAAACAAAAGAGCAGC	<i>xyIC</i>
XC2	AAGTCAAATGGGTAATTAGCT	
TMOA1	CAGAATATGGCGATGCACCCAGTAAAGA	<i>tmoA</i>
TMOA2	CATCAGGCCGATTTCTTCATAGCA	
TBUA1	CACCATGGCGTTACTGGAACGC	<i>tbuA1</i>
TBUA1R	CTGGTAGCGCTGATTGCGGTACG	
TBMB	GGACAACCCGCATGAATATCGACCTGCA	<i>tbmB</i>
TBMBR	GTTCAGAGCGACAGGCCGAGCTT	

El gel se sumergió en una solución 0,25 N de HCl hasta que se produjo el viraje del azul de bromofenol, de azul a amarillo, aproximadamente 15 min, este tratamiento ácido permite introducir mellas en el ADN y depurarlo, lo que facilitó la transferencia. El ADN se desnaturalizó introduciendo el gel en una solución de NaOH 0,5 M, hasta que se observó de nuevo el viraje del indicador 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 ascendió por capilaridad a través del gel arrastrando el ADN hasta la membrana, donde quedó 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. Una vez seca y para asegurar la fijación del ADN a la membrana, ésta se expuso 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.

10.1.2 Por vacío.

Tiene el mismo fundamento que la técnica descrita en el apartado 10.1.1, pero la transferencia de ADN del gel de agarosa a la membrana de nylon se realizó por aplicación de vacío, utilizando el aparato "VacuGene XL Vacuum blotting System" (Pharmacia, ref. 56-1130-80) según las indicaciones recomendadas por el fabricante.

10.2 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.

En algunos casos el marcaje de la sonda se hizo por PCR utilizando el paquete comercial de Boehringer Mannheim "digoxigenina-11-dUTP" (ref. 1093088) que provoca una incorporación múltiple de dUTP marcado, ya que puede ser usado como sustrato por la ADN polimerasa, reemplazando al dTTP durante la reacción en cadena de la polimerasa. La

mezcla de reacción contenía: ADN molde, 0,05-1 μg ; cebador 25 pmoles; tampón Taq ADN-polimerasa (10X) 5 μL ; dNTPs: 0,2 mM de dATP, dCTP y dGTP; 0,18 mM de dTTP y 0,02 mM de dig-dUTP; Taq ADN-polimerasa 1,2 U y H_2O hasta 50 μL . Para la amplificación se usó el programa descrito en la sección 9.5 para la amplificación de genes cromosómicos.

10.3 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 10 min cada uno a temperatura ambiente en 2xSSC + 0,1% (p/v) de SDS y dos lavados de 15 min a 68°C en 0,1xSSC + 0,1% (p/v) de SDS. Cuando se emplearon sondas heterólogas se omitieron los dos últimos lavados a 68°C, sustituyéndolos por dos lavados de 10 minutos con 1xSSC + 0,1% (p/v) de SDS a temperatura ambiente.

La composición de las soluciones de hibridación fue la siguiente: 5xSSC; formamida, 50% (v/v); 0,02% (p/v) SDS; 5% (p/v) agente bloqueante; H_2O hasta 20 mL/100 cm² de membrana.

Para las hibridaciones con sondas heterólogas se emplearon condiciones de hibridación relajadas, disminuyendo alternativamente la concentración de formamida en la solución al 30% (v/v) o la temperatura de hibridación a 28°C, o ambas simultáneamente. En algunos casos no se usó formamida en la solución de hibridación por lo que la temperatura de hibridación fue de 68°C.

10.4 Reacción inmunológica

Tras lavar la membrana con solución tampón-1, ésta 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, pH 7: Tris-HCl (pH 8,0), 100 mM y NaCl, 150 mM.

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

Tampón-3, pH 9,5: Tris-HCl (pH 8,0), 100 mM; NaCl, 100 mM y MgCl₂, 50 mM.

Solución de anticuerpo: Anticuerpo anti-dioxigenina-fosfatasa alcalina conjugado, preparado en 20 mL de tampón-1 a concentración final de 150 mU/mL.

Solución colorante: Solución de azul de nitrotetrazolio (NBT); solución de 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato 45 μ L (BCIP), 35 μ L y tampón-3 hasta 10 mL.

Las soluciones de bloqueante como de NBT y BCIP fueron suministradas en el paquete comercial de Boehringer Mannheim (ref. 1093657).

11. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS LIBRES DE CÉLULAS

Se partió de 50 mL de cultivo de las cepas en medio mínimo con tolueno, alcohol bencílico, benzoato o glucosa como fuentes de carbono, incubados a 30°C con agitación. Una vez alcanzada la fase exponencial de crecimiento, las células se recogieron por centrifugación a 12000 g durante 10 minutos a 4°C, se lavaron con tampón fosfato 100 mM, pH 7,2, y se resuspendieron en 5 mL del mismo tampón. La suspensión bacteriana se lisó por ultrasonidos utilizando un sonicador Braun Biotech modelo Labsonic 2000 con una sonda de tipo aguja, manteniendo la muestra en un baño de agua y hielo. Se dieron pulsos de 30 segundos a 75W, con intervalos de 1 minuto para evitar el calentamiento de la muestra, hasta que se obtuvo un extracto transparente. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 10000 g durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante constituyó el extracto libre de células utilizado para los ensayos enzimáticos y para la determinación de proteínas.

12. MEDIDA DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS

12.1 Medida de actividad catecol 2,3-dioxigenasa

Dada la ubiquidad de la enzima catecol 2,3-dioxigenasa (EC 1.13.11.2) en el catabolismo de tolueno, se utilizó la medida de esta actividad enzimática como modelo de enzima clave presente en la mayoría de las rutas degradativas descritas para la degradación de tolueno.

La estimación de la actividad catecol 2,3-dioxigenasa se realizó espectrofotométricamente (Mars *et al.*, 1997) siguiendo la formación del semialdehído del

ácido 2-hidroxiácido a 375 nm ($\epsilon = 36.000 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) a partir de catecol. La mezcla de reacción contenía en un mL, 45 μL de tampon fosfato pH 7,2 y 5 μmoles de catecol. La reacción comenzó al añadir el extracto crudo y se siguió durante un período de dos minutos.

También se determinó espectrofotométricamente la aparición del producto de fisión del 3-metilcatecol ($\epsilon = 13.400 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 388 nm) de la misma forma que antes.

La actividad específica se definió como la cantidad de enzima necesaria para convertir 1 nmol de sustrato por minuto por miligramo de proteína. Todos estos ensayos se hicieron a temperatura ambiente en un espectrofotometro Perkin Elmer modelo Lambda 20.

12.2 Medida de actividad catecol 1,2-dioxigenasa

La actividad catecol 1,2-dioxigenasa (EC 1.13.11.1) se determinó midiendo la acumulación de ácido *cis,cis*-muconico a 260 nm ($\epsilon = 16.800 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) tras la oxidación del catecol por el enzima (Dorn y Knackmuss, 1978).

Debido a que el *cis,cis*-muconato absorbe a 260 nm se consideró la medida de esta actividad enzimática, como el incremento de la absorbancia a 260 nm en presencia de catecol. El enzima que actúa sobre el muconato (muconato cicloisomerasa) se inhibe en la presencia de EDTA por lo que añadiendo éste a la reacción se aseguró la acumulación de muconato.

La mezcla de reacción contenía en un mL 33 μmoles de Tris-ClH pH 8; 1,3 μmoles de Na_2EDTA y extracto crudo. La reacción se inició al añadir 5 μmoles de catecol y se siguió durante dos minutos.

12.3 Ensayo de 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 -D-galactopiranosido (ONPG), sustrato incoloro de la β -galactosidasa, es hidrolizado por el enzima rindiendo galactosa y *o*-nitrofenol, un compuesto de color amarillo cuya concentración se determinó espectrofotométricamente. La composición de las soluciones utilizadas en este procedimiento aparece al final de este apartado.

Se partió de cultivos de las células correspondientes en medio mínimo M9 con glucosa como fuente de carbono, que habían sido incubadas a 30°C con agitación durante 12-16 horas. Las células se diluyeron 100 veces en 3 mL del mismo medio y se incubaron a 30°C en agitación durante 3 horas. A continuación los cultivos se indujeron con los compuestos aromáticos de interés disueltos en N,N-dimetilformamida para que la concentración final del aromático fuera de 1-5 mM. Tras 5 horas de incubación se tomaron alícuotas de 100 μL del

cultivo y se añadieron 100 μL de una solución de bromuro de alquil-trimetil-amonio (MATAB) con objeto de permeabilizar las células. Esta mezcla se incubó en un baño de hielo durante 30 minutos.

La determinación de la actividad β -galactosidasa se realizó a 30°C en tampón Z. A la mezcla con las células permeabilizadas se añadieron 0,8 mL de tampón Z y 0,2 mL de solución de ONPG. Los tubos de reacción se incubaron a 30°C hasta la aparición de color (2-15 minutos). La reacción se detuvo añadiendo 2 mL de una solución de Na_2CO_3 0,5 M. La concentración de *o*-nitrofenol se estimó espectrofotométricamente determinando su absorbancia a 420 nm. Para cada muestra se realizó además una medida a 550 nm para corrección de 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:

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

donde t representa el tiempo de reacción en minutos, y v el volumen de células permeabilizadas utilizadas en la reacción en mL.

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

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

Tampón Z: Na_2HPO_4 , 60 mM; NaH_2PO_4 40 mM; KCl, 10 mM; MgSO_4 , 1 mM y β -mercaptoetanol, 50 mM. Esta solución es estable a 4°C.

Solución de 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 oscuridad.

13. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACION DE PROTEINAS.

Se utilizó una alícuota del extracto libre de células para determinar la concentración de proteína por el método de Bradford, con reactivos suministrados por la casa comercial Bio-Rad (Bio-Rad Dye reagent concentrate, ref. 500-0006), utilizando albúmina bovina como patrón.

14. ANÁLISIS DE LÍPIDOS

14.1 Extracción y purificación de lípidos

El procedimiento seguido fue una variación realizada por Patricia Godoy (comunicación personal) del método propuesto por Bligh y Dyer (1959).

Se partió de 10 mL de cultivo de las cepas a analizar cultivadas en LB y en LB con tolueno a distintas concentraciones (dependiendo de la tolerancia de la cepa al mismo) incubados a 30°C durante 12-16. El volumen total de cultivo se centrifugó a 12000 g durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante y el precipitado de células se congeló. A las células se les añadió una mezcla de un mL de cloroformo y 2 mL de metanol absoluto y se homogenizó por agitación durante 2 minutos. Posteriormente se añadió un mL de cloroformo y se continuó la agitación durante 30 segundos, tras los cuales se añadió un mL de agua destilada y se agitó durante otros 30 segundos. El homogenado se dejó reposar hasta obtener una separación de las fases completa, en algunos casos en los que la separación fue más costosa, la muestra se centrifugó a 3000 g durante 10 minutos. Una vez separadas las fases se recogió la fase clorofórmica. Se realizó una segunda extracción con un volumen de cloroformo para asegurar la extracción total de lípidos. Por último el disolvente se evaporó en un rotavapor a 50°C, obteniéndose así el contenido total de lípidos de las células.

14.2 Preparación de ésteres metílicos de ácidos grasos de lípidos

Se utilizó el método utilizado en análisis de ácidos grasos en la industria del aceite de oliva descrito por Bannon *et al.*, (1982) para la metanolisis de lípidos utilizando metóxido potásico como catalizador. Tanto la preparación de los ésteres metílicos como el análisis en cromatografía de gases fueron realizados por Patricia Godoy.

Una vez pesadas las cantidades de lípidos extraídas, se añadió 2 mL de hexano y 400 μ L de metóxido potásico (KOH/metanol) 2 N por cada 5-10 mg de lípidos extraído. Se agitó la mezcla y la fase hexánica que se recogió contenía los ésteres de los ácidos grasos.

14.3 Análisis de los ésteres metílicos por cromatografía de gases (CG)

Para estos análisis se utilizó un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard modelo 6890 conectado a un detector de masas HP modelo 6890 y equipado con una columna capilar HP-SMS (fase estacionaria ligada: 5% Fenil metil silosano) de 30 m x 250 μ m x 0,25 μ m de espesor de película. Se utilizó una presión en cabeza de columna de 4,8 PSI, usando He como gas portador (0,6 ml/min) y siendo las temperaturas del inyector y de la interfase 280 y

260°C respectivamente. El programa de temperatura empleado fue el siguiente: Una rampa inicial de 10°C por minuto para pasar de una temperatura inicial de 100°C a una final de 180°C en 8 minutos, y una rampa final de 3°C por minuto desde una temperatura inicial de 180°C a una final de 222°C en 14 minutos. Los datos se analizaron utilizando la librería de masas NBS75K.

15. ELECTRODO DE OXÍGENO

El electrodo de oxígeno se utilizó para seguir el curso y medir los procesos que implican un cambio en la concentración de este gas en solución, debido al consumo del mismo por la respiración bacteriana. En este trabajo se utilizó, en el estudio de la caracterización de las rutas degradativas implicadas en la degradación de tolueno por parte de las cepas aisladas de suelo.

La medida de la concentración de oxígeno en una solución se basa en técnicas polarográficas que consisten, en aplicar un potencial adecuado a un microelectrodo sumergido en una solución de un elemento electro-reducible y medir la corriente que se origina como consecuencia de su reducción en el electrodo. Para un potencial elegido, la intensidad de la corriente es función directa de la concentración del elemento.

Para la medida del consumo de oxígeno, se utilizó un aparato suministrado por Hansatech instruments LTD (n° de serie: 9466) acoplado a un registrador Perkin Elmer modelo 561 y a un baño termostático.

15.1 Calibración

Se añadió un mL de agua destilada en la cámara de reacción y se puso en marcha el agitador magnético y el sistema de agua del baño termostático (30°C). Después de esperar unos minutos para alcanzar la temperatura, ésta se cerró. Para ajustar el cero, se añadieron unos cristales de ditionito sódico, reductor energético que consume todo el oxígeno disuelto. A continuación, se lavó el compartimento varias veces con agua y se ajustó a la concentración de oxígeno disuelto en agua, que para una temperatura de 30°C es de 0,24 μ moles de oxígeno por mL.

15.2 Medida del consumo de oxígeno en suspensiones bacterianas

Se partió de un preinoculo de 30 mL de las cepas cultivadas durante 12-16 horas con agitación en medio mínimo con tolueno u otra fuente de carbono. El cultivo se diluyó 100 veces en 30 mL de medio mínimo con tolueno, alcohol bencílico o glucosa como fuentes de

carbono. Una vez alcanzada la fase exponencial de crecimiento, se recogió un mL de células por centrifugación a 12000 g durante 1 minuto, se lavó con tampon fosfato dos veces y se resuspendió en un mL del mismo tampón.

En la cámara de reacción del electrodo, previamente calibrado a la temperatura de 30°C, se añadieron las células en 1 mL de tampon fosfato pH 7. Después de cerrar la cámara, se registró el consumo de oxígeno durante 10 minutos para establecer el consumo de oxígeno debido a la respiración endógena. A continuación, y mediante una microjeringa Hamilton, se añadieron los distintos intermediarios de ensayo a una concentración de 1-5 mM y se continuó el registro durante 10 minutos más. La medida del consumo se expresó como nmoles de oxígeno consumido/minuto/mg de peso seco.

Para la medida de peso seco, cinco mL de cultivo bacteriano se filtraron a través de filtros secos y prepesados de 0,45 μ m de tamaño de poro y 47 mm de diámetro, Whatman (ref. 1822 915) o Millipore (Bedford, MA, USA). Cada muestra se filtró por duplicado. Los filtros se secaron a 105°C hasta alcanzar un peso constante.

16. EXPERIMENTOS EN SUELO

Para el estudio de la supervivencia y multiplicación en suelo de las cepas bajo estudio se realizaron ensayos en microcosmos, ensayos de campo y en columnas de suelo. Para todos estos experimentos, excepto que se indique lo contrario se usó suelo no esteril del jardín de la Estación Experimental del Zaidín cuyas características físico-químicas y granulométricas fueron las siguientes:

pH (H₂O): 8,09; Arcilla (%): 21,53; Limo (%): 24,35; Arena (%): 54,13; Materia orgánica (%): 1,81; Nitrógeno total (%): 0,25; Nitrate (mg N/Kg suelo): 1,50; Fósforo disponible (p.p.m): 31,87; Potasio (mgK/Kg suelo): 332,00

Los suelos se tamizaron antes de su utilización a través de una criba metálica de 4 mm y la humedad se ajustó al 30% de la capacidad de campo del suelo o a distintos porcentajes de humedad. La capacidad de campo se define como la cantidad de agua retenida en el suelo una vez drenado el exceso, y en el que la velocidad del movimiento descendente del agua ha desaparecido prácticamente. Para medir la capacidad de campo se utilizó una modificación del método propuesto por Bouyoucos (1949), que se basa en medir la cantidad de agua retenida por una muestra de suelo cuando ésta queda sujeta a la succión en un pequeño embudo de Buchner. El porcentaje de humedad del suelo viene dado por la diferencia entre el peso humedo del suelo, que sería el peso del suelo una vez eliminado el exceso de agua y el

peso seco, que se determinó como el peso del suelo una vez secado a 105°C durante 24 horas.

16.1 Ensayos en microcosmos

Los microcosmos edáficos se utilizaron como método para el estudio de la supervivencia y multiplicación de las cepas introducidas en suelo, ya que permiten reproducir un ambiente natural en el laboratorio y controlar condiciones propias del hábitat de origen (temperatura, humedad, etc)

Para estos ensayos se llenaron recipientes de cristal con 70-90 g de suelo y, en los casos indicados el suelo se suplementó con 0,1-10% (v/p) de tolueno, benceno, propilbenceno, heptano o distintos tipos de gasolinas. El inóculo se preparó como se indica a continuación: células cultivadas durante 10-12 horas a 30°C con agitación en medio mínimo previamente complementado con los antibióticos adecuados, y con tolueno como fuente de carbono, se recogieron por centrifugación a 12000 g durante 15 min. Las células se lavaron una vez con tampón 1xM9 y posteriormente se resuspendieron en el mismo tampón a una concentración de aproximadamente 10^8 células/mL, excepto en los casos en los que se usaron distintas densidades celulares. 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 temperatura ambiente, salvo que se especifique lo contrario. Periódicamente se tomaron alícuotas de 10 g de suelo, se suspendieron en 90 mL de tampón 1xM9 y se mantuvieron en agitación a 200 rpm en un incubador Gallemkamp y 30°C durante 30-60 minutos. A continuación se hicieron diluciones seriadas, que se sembraron en placas de medio selectivo para detectar entre 10^2 y 10^9 UFC (unidades formadoras de colonias) por gramo de suelo. 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 1 mes. En los casos en los que las cepas introducidas se encontraron a una densidad celular de menos de 100 UFC/ gr de suelo, para determinar si había células viables se realizaron enriquecimientos que consistieron en suspender un gramo de suelo en 10 mL de medio LB con los antibióticos usados en la selección. Trás la incubación a 30°C durante 20 horas, se hicieron diluciones seriadas y se sembraron en medio mínimo con tolueno como fuente de carbono. La aparición de colonias indicó la existencia de células viables a una densidad celular menor de 100 UFC por gramo de suelo, un resultado negativo indicó la posible desaparición de las células viables del suelo.

17. COLUMNAS DE SUELO

Las columnas de suelo se utilizaron para evaluar la supervivencia y multiplicación de la cepa *P. putida* DOT-T1 a lo largo de una columna de suelo con el fin de evaluar su utilización en ensayos de bioremediación *in situ*.

17.1 Diseño de la columna

Las columnas fueron fabricadas en el departamento de vidrio de los servicios técnicos de la Universidad de Granada. El diseño de las mismas y la realización de los ensayos se hizo en colaboración con Vitor A. Martins-Dos-Santos. Como se muestra en la Figura 14 las columnas consistieron en un tubo de cristal de 45 mm de diámetro y 34 cm de largo en el que se insertaron, en forma de espiral y a lo largo de toda la columna, unas entradas de vidrio de 5 mm de diámetro con rosca, separadas entre sí por una distancia de 5 cm. Estas se sellaron con tapones provistos de válvulas mininert (casa comercial SGE) que permitieron la toma de muestras gaseosas minimizando las pérdidas. Las columnas se cerraron en ambos extremos con tapones de rosca, siendo el del extremo superior un tapón por el que pasó un tubo de vidrio de 6 cm de largo que se cerró en su extremo con un tapon del mismo tipo del de las entradas para la toma de muestras.

17.2 Inoculación y toma de muestras

La inoculación de las columnas se hizo siguiendo el protocolo utilizado en la inoculación de microcosmos. En unos casos, primero se inoculó el suelo y este se introdujo en la columna. Entonces se añadió tolueno a distintas concentraciones, o gasolina plomada al 10% (v/p). En otros casos se introdujo el suelo con el contaminante primero y después se añadieron las células por la parte superior. Para la toma de muestras y conteo de microorganismos, se tomaron alícuotas periódicamente; para ello se retiró un gramo de suelo de cada una de las entradas, se suspendió en 10 mL de 1xM9 y se incubó a 30°C con agitación constante en un incubador termostatzado durante 30-60 minutos. A continuación se hicieron diluciones seriadas y las bacterias se sembraron en placas de medio selectivo.

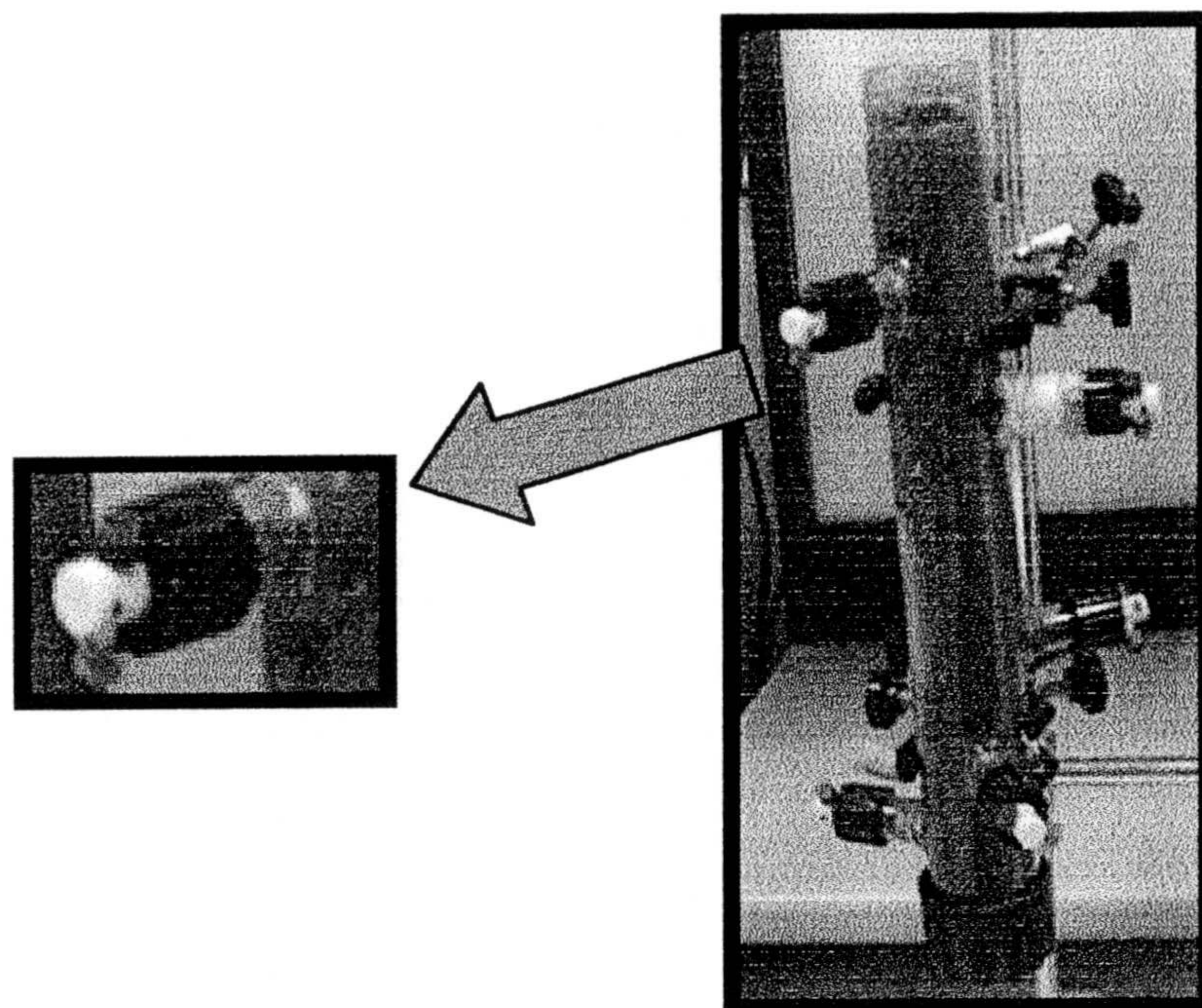


Figura 14. Columna de suelo. Se muestra en la fotografía la columna de suelo provista de los tapones mininert. La columna está sin cerrar en la parte superior y se puede observar la localización de las entradas para la toma de muestras.

17.3 Seguimiento de O_2 , CO_2 y tolueno por cromatografía de gases

Como medida de la actividad metabólica de la cepa introducida en las columnas de suelo, se hicieron medidas de la concentración de O_2 , CO_2 y tolueno mediante cromatografía de gases. Periódicamente, se tomaron muestras por cada entrada de la columna durante un mes, anteriormente a la toma de muestras de microorganismos con el objetivo de minimizar posibles pérdidas de gas al abrir las entradas. La toma de muestras se llevó a cabo a través de los tapones con las válvulas mininert, utilizando una jeringa especial de $100 \mu L$ con una serie de características tales como; un tope de seguridad para cerrar la jeringa una vez tomada la muestra minimizando las pérdidas de gas, unida a una aguja especial de gases (SGE modelo 23G) y con un adaptador para fijar el volumen exacto y realizar una toma de muestras repetitivas (SGE modelo RA8).

Para la medida se utilizó un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard modelo 5890A serie II equipado con un detector de conductividad térmica (TCD) y un detector de ionización de llama (FID). Para medir el oxígeno se usó una columna Molsieve (2 metros de longitud y 45-60 malla) y una columna Porapak Q (2 m de longitud, 80-100 malla) para la medida de dióxido de carbono. Las medidas se realizaron usando el detector de conductividad térmica y

N₂ como gas portador (1ml/min) y auxiliar (24 ml/min). Las temperaturas del inyector, horno y detector fueron 100°C, 70°C (isotérmica) y 130°C respectivamente.

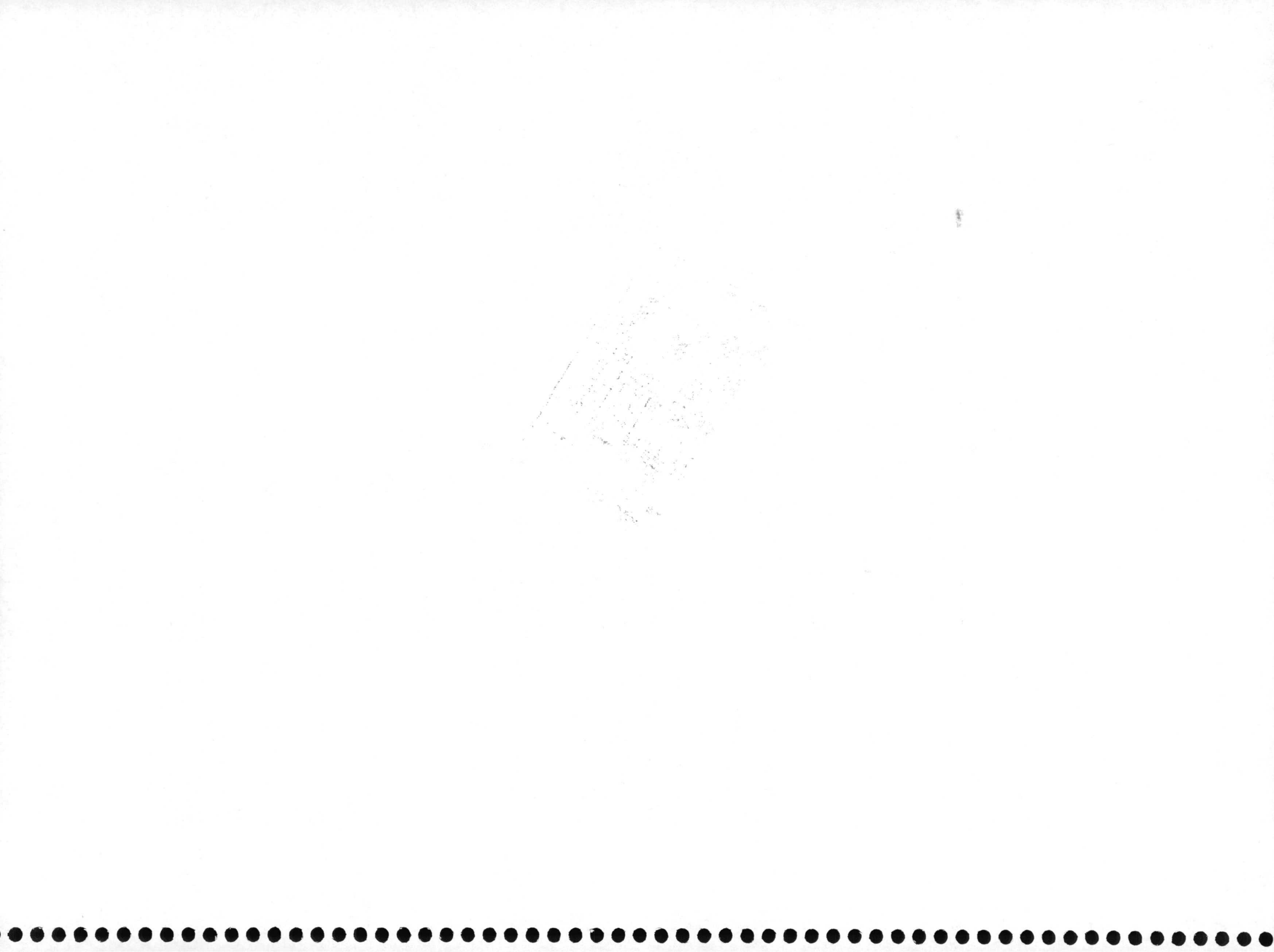
La medida de la concentración en gas de tolueno se utilizó una columna HP-1 (fase estacionaria ligada a metilsilicona) de 25 m x 0,32 mm x 0,52 μ de espesor de película. Las condiciones que se usaron en este caso fueron las siguientes: con el detector de ionización de llama, usando N₂ como gas portador y auxiliar y siendo las temperaturas del inyector, horno y detector de 225°C, 120°C (isotérmica) y 225°C respectivamente.

18. MINERALIZACIÓN DE ¹⁴C-TOLUENO EN MICROCOSMOS EDÁFICOS

Noventa g de suelo fluvisol estéril se colocaron en recipientes herméticos de cristal de 1 L de volumen. La preparación del inóculo y la inoculación del suelo se realizó como se describe en el apartado 16.1 de esta sección. A continuación se añadió ¹⁴C-tolueno (5 μ Ci de actividad total) mezclado con tolueno frío para alcanzar una actividad específica de 0,5 μ Ci/ μ mol. El ¹⁴CO₂ generado se fijó en 20 mL de etanolamina contenidos en un vaso de precipitado introducido en el recipiente antes de cerrarlo herméticamente. Periódicamente se retiró 1 mL de la solución de etanolamina, se le añadieron 5 mL de líquido de centelleo y se determinó el número de cuentas por minuto utilizando un contador de centelleo PACKARD modelo 1.500-TRI-CARB.

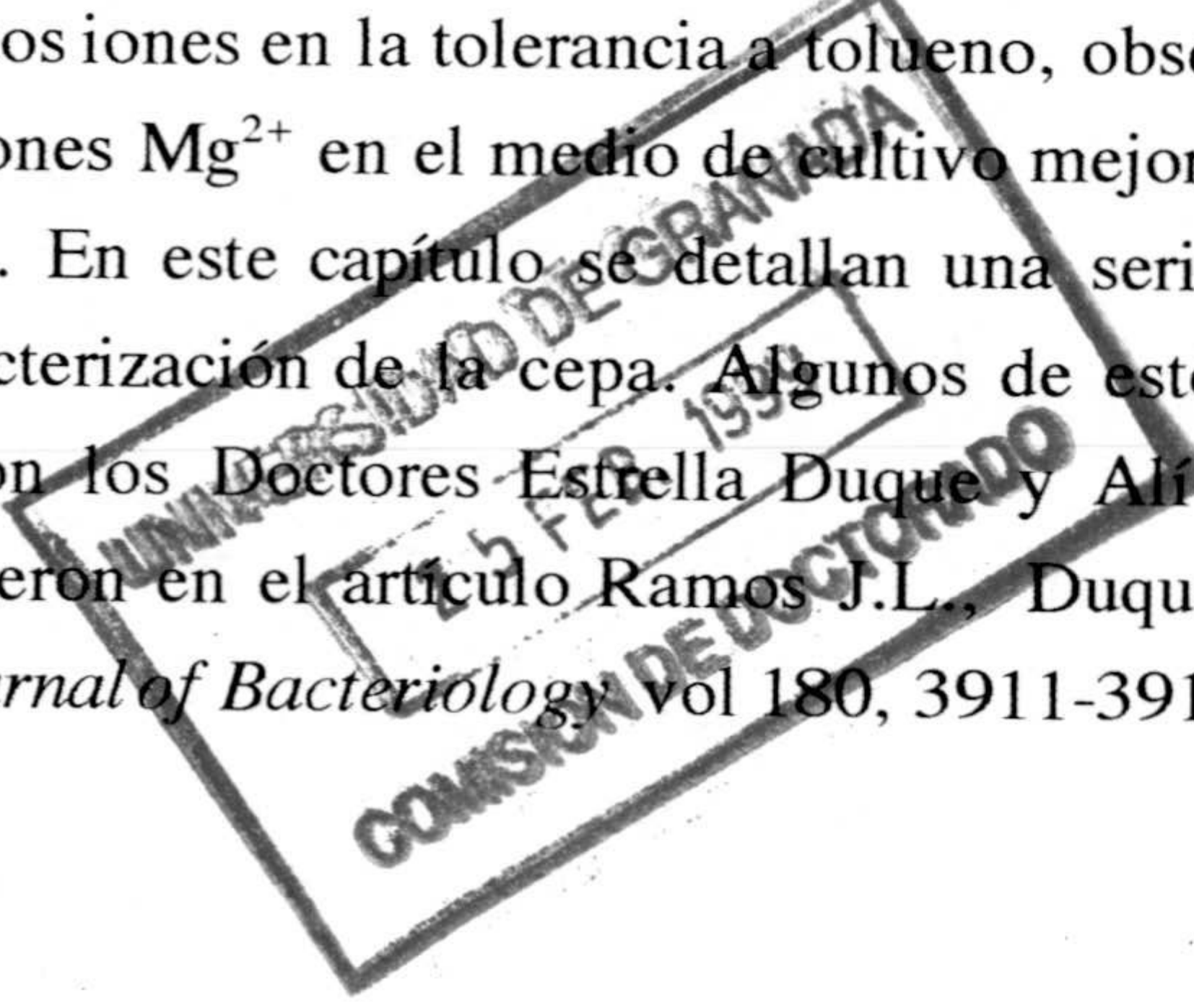


RESULTADOS



I. CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DE UNA CEPA DE
Pseudomonas putida CAPAZ DE TOLERAR ALTAS
CONCENTRACIONES DE DISOLVENTES ORGÁNICOS.

Pseudomonas putida DOT-T1 se aisló, de una planta de tratamiento de aguas residuales de la ciudad de Granada, tras enriquecimiento en medio mínimo con 1% (v/v) de tolueno como única fuente de carbono. La cepa toleró en medio líquido concentraciones supersaturantes de tolueno, así como concentraciones elevadas de otros disolventes orgánicos cuyo log P_{ow} (coeficiente de partición octanol/agua) fue mayor de 2,3. Se estudió la influencia de ciertos iones en la tolerancia a tolueno, observándose que el aumento de la concentración de iones Mg^{2+} en el medio de cultivo mejoró la tolerancia de la cepa a disolventes orgánicos. En este capítulo se detallan una serie de estudios fisiológicos encaminados a la caracterización de la cepa. Algunos de estos ensayos se llevaron a cabo en colaboración con los Doctores Estrella Duque y Ali Haidöur, los resultados más relevantes se recogieron en el artículo Ramos J.L., Duque E., Huertas M.J. y Haidöur A. publicado en *Journal of Bacteriology* vol 180, 3911-3916 (1995).



1. AISLAMIENTO DE UNA CEPA DEL GÉNERO *Pseudomonas* TOLERANTE A ALTAS CONCENTRACIONES DE TOLUENO Y CAPAZ DE UTILIZARLO COMO FUENTE DE CARBONO

En 1989 Inoue y Horikoshi describieron, por primera vez, el aislamiento de cepas de *Pseudomonas* capaces de sobrevivir en presencia del 50% (v/v) de tolueno en el medio de cultivo. La descripción de esta capacidad inusual llevó a la búsqueda, por parte de diferentes grupos de investigación, de microorganismos tolerantes a concentraciones elevadas de hidrocarburos aromáticos tales como estireno y *p*-xileno (Cruden *et al.*, 1992; Weber *et al.*, 1993). Estos estudios revelaron de nuevo, la existencia de cepas del género *Pseudomonas* que presentaron capacidades moderadas de tolerancia a disolventes orgánicos.

Anterior al inicio de esta Tesis Doctoral, se había aislado en el grupo de Degradación de Tóxicos Orgánicos de la Estación Experimental del Zaidín, un microorganismo tolerante a altas concentraciones de tolueno en el medio de cultivo ($\geq 90\%$ (v/v)), y que utilizaba tolueno como fuente de carbono y energía. La cepa, denominada DOT-T1, se aisló de aguas tomadas de una planta de tratamiento de aguas residuales de la ciudad de Granada. El enriquecimiento, previo al aislamiento, se llevó a cabo de la siguiente manera: Se mezclaron, a partes iguales, agua de la planta de tratamiento y medio mínimo M9 y se utilizó como fuente de carbono tolueno en fase gaseosa. Tras 48 horas de crecimiento a 30°C, la suspensión se diluyó 100 veces en medio mínimo con el 1% (v/v) de tolueno como fuente de carbono. El cultivo se mantuvo en agitación durante varios días a 30°C hasta que aumentó la turbidez del mismo. A partir de este momento, se realizaron diluciones seriadas del cultivo que se sembraron en placas de petri de cristal con medio mínimo M9 y con 1% (v/v) de tolueno como fuente de carbono. Las placas se sellaron y se incubaron a 30°C durante 72 horas. El análisis visual de estas placas reveló la existencia de un solo tipo de colonia que se denominó DOT-T1 (Ramos *et al.*, 1995).

2. CARACTERIZACIÓN DE LA CEPA DOT-T1

2.1 Identificación de la cepa DOT-T1

La cepa, previamente seleccionada del enriquecimiento llevado a cabo en tolueno, se sometió a tinción de Gram y a los ensayos metabólicos disponibles en el paquete

comercial API (ver Materiales y Métodos), revelando que la cepa denominada DOT-T1 era una bacteria gram-negativa perteneciente al género *Pseudomonas*. La cepa fue móvil, catalasa-positiva y oxidasa-negativa. La temperatura óptima de crecimiento fue de 30°C. *P. putida* DOT-T1 utilizó una gran variedad de sustratos como fuente de carbono entre los que se incluyeron: tolueno, etilbenceno, alcohol bencílico, glucosa, alcohol 4-hidroxibencílico, 4-hidroxibenzaldehído, 4-hidroxibenzoato, 3,4-dihidroxibenzoato, glicerol, acetato, citrato y succinato. Sin embargo no utilizó como fuente de carbono y energía los siguientes compuestos: xilenos, cresoles, 4-hidroxifenilacético, 3-metilbenzoato, salicilato, fructosa, sacarosa, lactosa, arabinosa o valina.

El análisis del perfil de fosfolípidos identificaron a la cepa DOT-T1 como perteneciente al género *Pseudomonas* y a la especie *P. putida*.

Para determinar la susceptibilidad de esta cepa a antibióticos se realizó un antibiograma en medio LB sólido, suministrándose los antibióticos a la concentración ($\mu\text{g/mL}$) indicada entre paréntesis. La cepa se consideró resistente al antibiótico cuando el número de células viables cultivadas en medio sólido con antibióticos, fue similar al número de éstas en medio LB sin antibióticos. Así, la cepa presentó sensibilidad a rifampicina (10), kanamicina (50), tetraciclina (10) y estreptomina (25); y resistencia natural a ácido nalidíxico (10), cloranfenicol (30) y ampicilina (25).

2.2 Utilización de tolueno como fuente de carbono por la cepa *Pseudomonas putida* DOT-T1

Con objeto de determinar si *P. putida* DOT-T1 utilizaba tolueno como fuente de carbono y energía, y para calcular el tiempo de generación cuando utilizó este aromático como sustrato de crecimiento, se realizaron ensayos encaminados a estudiar la cinética de crecimiento en medio mínimo con tolueno suministrado en fase gaseosa. Las curvas de crecimiento en medio mínimo se compararon con las de crecimiento de la cepa en medio rico LB.

En esta serie de ensayos se partió de un cultivo de la cepa en medio LB, incubado a 30°C en agitación durante 12 horas. A partir de este cultivo se hicieron diluciones 1/100 en medio rico LB y medio mínimo M9 con tolueno (en fase gaseosa) como fuente de carbono. La densidad celular de éstos a lo largo del tiempo se determinó espectrofotométricamente midiendo la turbidez del cultivo a 660 nm. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 15.

El crecimiento de DOT-T1 en ambos medios presentó una curva típica de crecimiento bacteriano con una fase de retardo (fase lag) y una fase de crecimiento

exponencial con un tiempo medio de generación de 50 minutos en LB y 75 minutos en medio mínimo, al final de esta fase de crecimiento, se observó que el número de células viables fue de entre 10^8 y 10^9 .

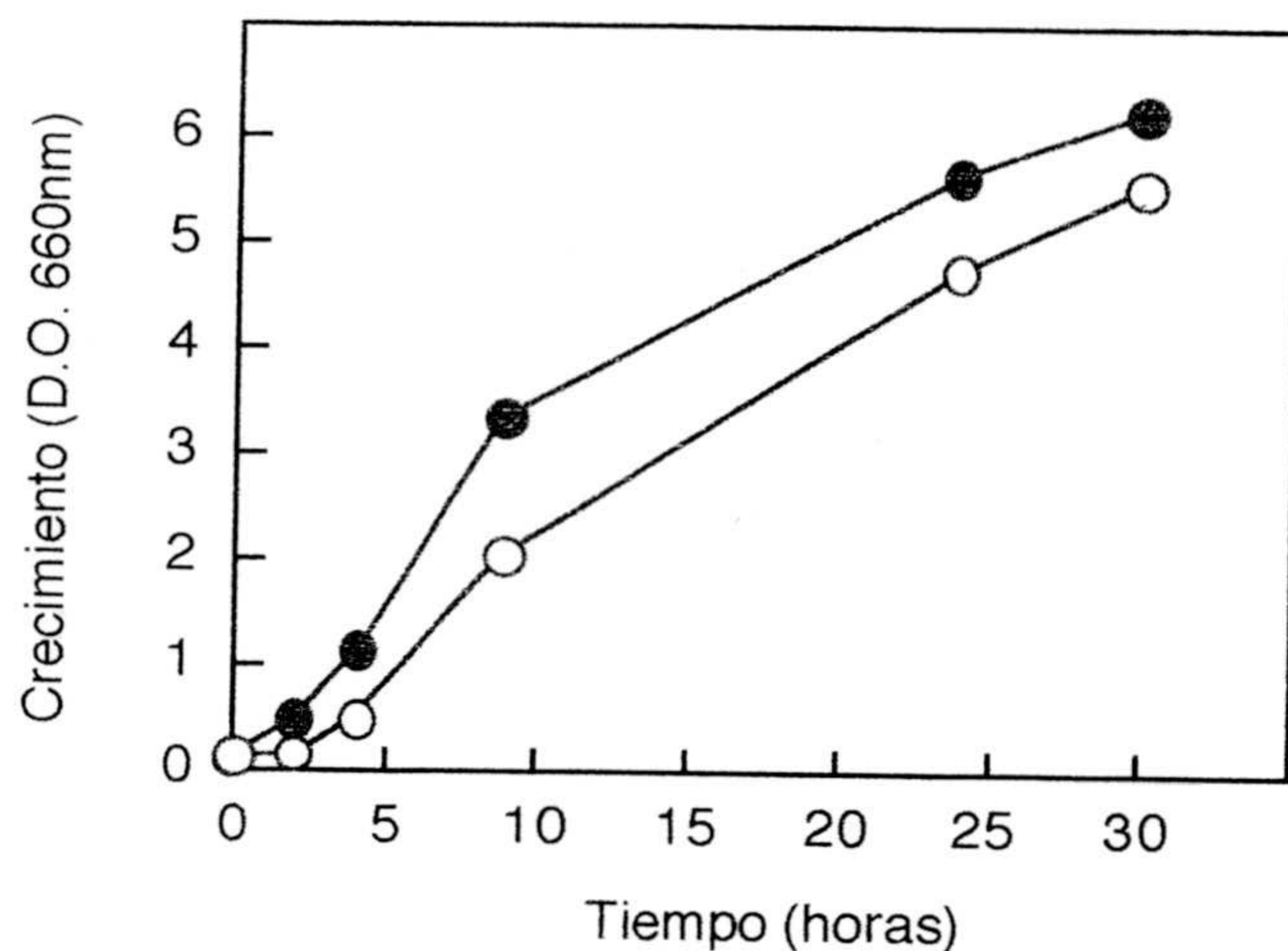


Figura 15. Crecimiento de *Pseudomonas putida* DOT-T1 con tolueno como fuente de carbono. Un cultivo de *Pseudomonas putida* DOT-T1 en medio LB se diluyó 1/100 en medio LB y en medio mínimo M9 con tolueno en fase gaseosa como fuente de carbono. A los tiempos indicados se determinó el crecimiento, en LB (●) y en medio mínimo M9 (○), como el aumento de turbidez del cultivo medido a 660nm.

2.3 Ultraestructura de *P. putida* DOT-T1

La ultraestructura de *P. putida* DOT-T1 se estudió en células cultivadas en medio rico LB en ausencia o presencia de tolueno suministrado en fase gaseosa, o añadido directamente al medio de cultivo a una concentración de 10% (v/v), con objeto de establecer posibles diferencias en cuanto a la morfología celular en las distintas condiciones de cultivo.

La cepa DOT-T1 mostró diferencias significativas en su membrana celular dependiendo de la presencia o ausencia de tolueno en el medio de cultivo (Fig 16). En células cultivadas en ausencia de tolueno la membrana externa y la citoplásmica aparecieron como una estructura uniforme y los ribosomas aparecieron bien definidos (Fig 16A). Cuando las células se incubaron en presencia de 10% (v/v) de tolueno, se observó alterada la estructura de la membrana y el espacio periplásmico (entre la

membrana externa y citoplásmica) apareció más ensanchado que en células cultivadas en ausencia de tolueno o con tolueno en fase gaseosa (Fig 16B).

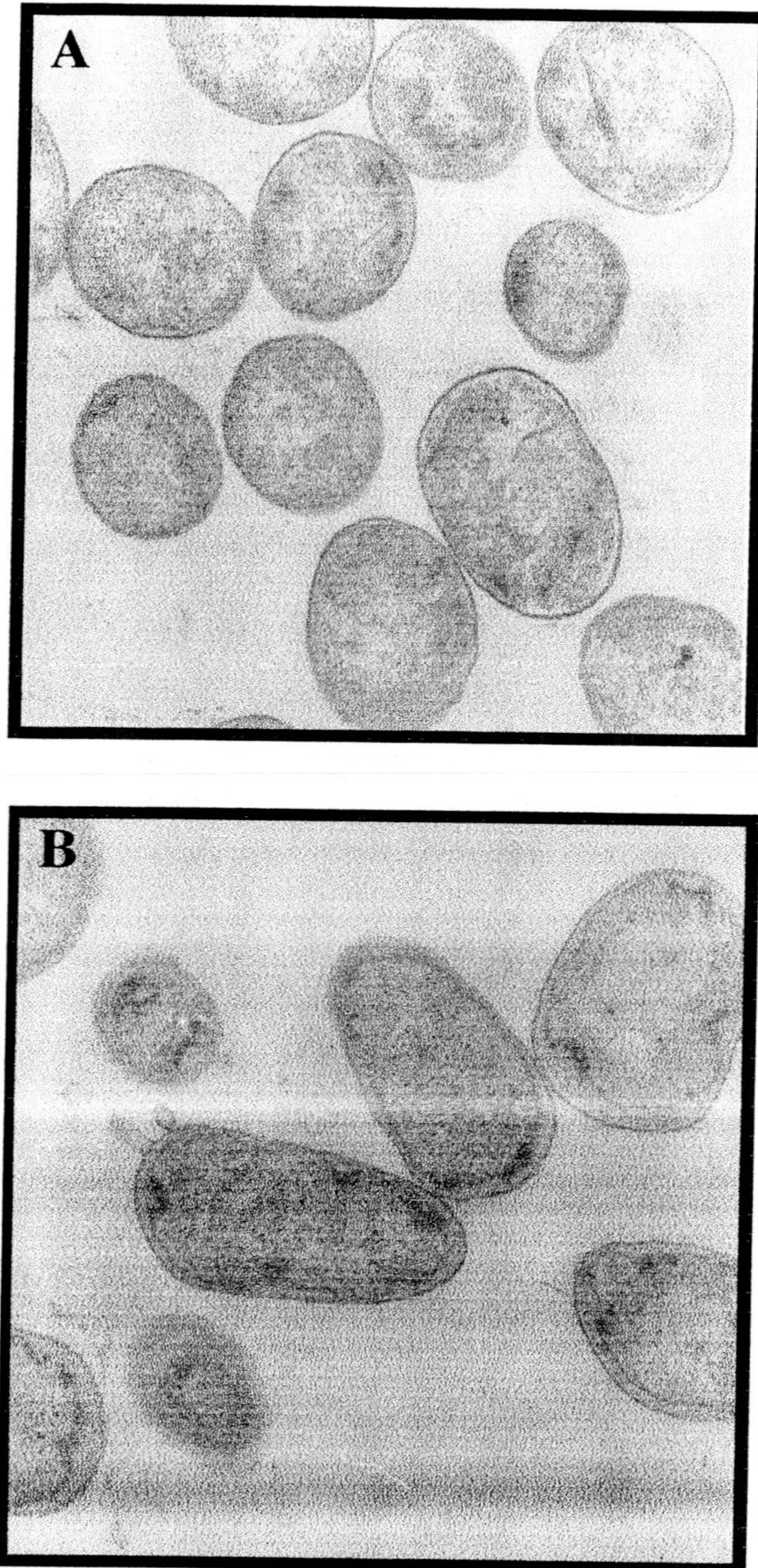


Figura 16. Ultraestructura de *P. putida* DOT-T1. La cepa se cultivó en medio rico LB en ausencia de tolueno (31.500x) (A), o en presencia del 10% (v/v) de tolueno en el medio de cultivo (31.500x) (B).

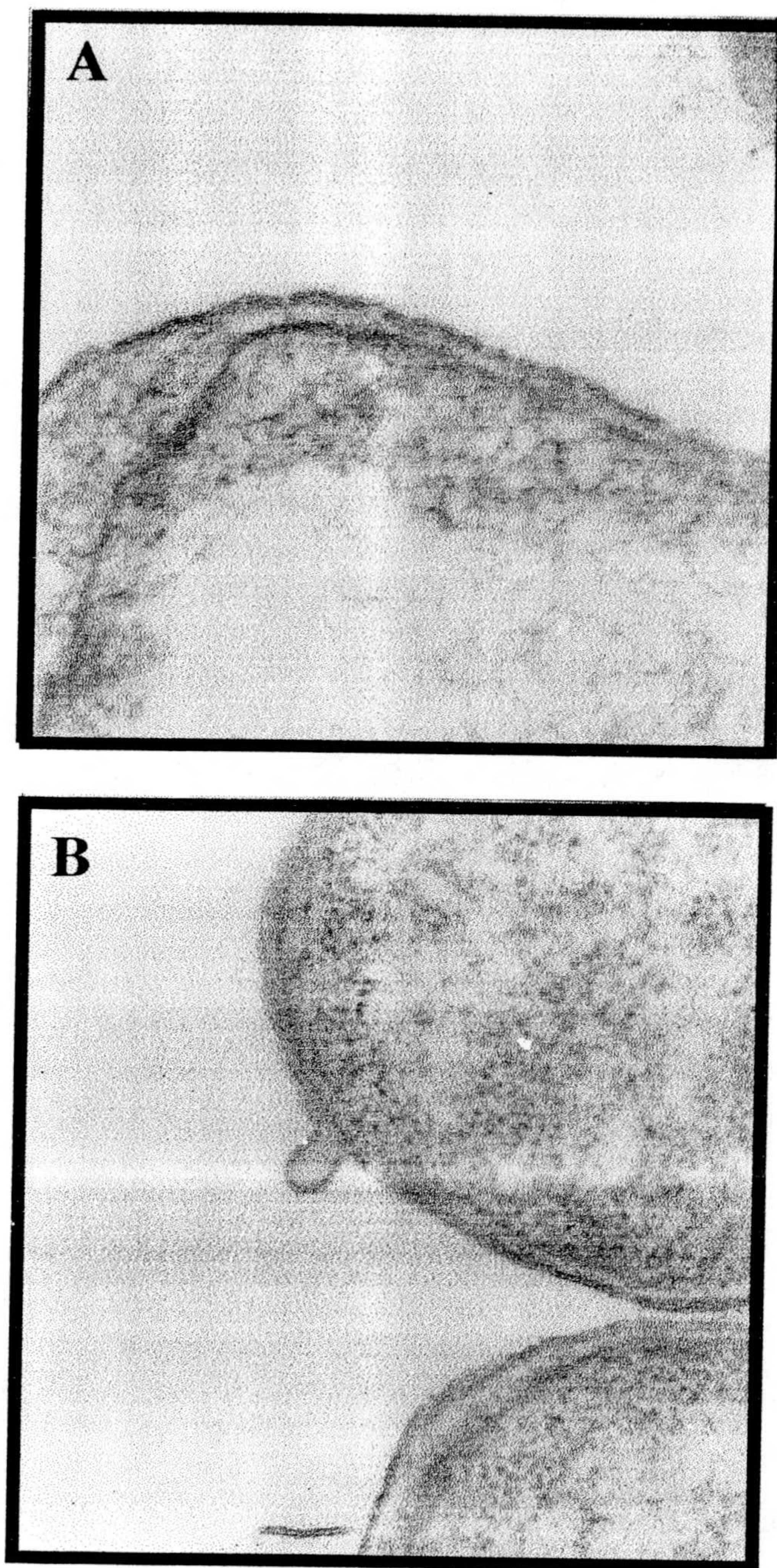


Figura 17. Ultraestructura de *P. putida* DOT-T1 en presencia de 10% (v/v) de tolueno. DOT-T1 se cultivo en medio LB en presencia del 10% (v/v) de tolueno. En la figura A se puede observar un detalle de la membrana externa y del espacio periplásmico (125.000x). En la B se puede observar un detalle de una evaginación en la membrana (100.000x).

Análisis de microscopía electrónica a mayor aumento (125.000x y 100.000x) mostraron claramente las alteraciones de la estructura de la membrana en DOT-T1 (Figura 17A y B), observándose ocasionalmente evaginaciones en la membrana (Figura 17B), cuya naturaleza está por estudiar.

3. *Pseudomonas putida* DOT-T1 TOLERA CONCENTRACIONES ELEVADAS DE TOLUENO

Para determinar el grado de tolerancia a tolueno se evaluó la supervivencia de la cepa tras la exposición, durante cortos períodos de tiempo, a concentraciones crecientes del disolvente y el efecto de éstas sobre el crecimiento celular. Además, se comparó la tolerancia de DOT-T1 con otras cepas del género *Pseudomonas* capaces de utilizar tolueno como fuente de carbono y energía.

3.1 Tolerancia a tolueno por *P. putida* DOT-T1

Se hicieron ensayos para determinar la viabilidad y tolerancia de *P. putida* DOT-T1 en presencia de concentraciones crecientes de tolueno en el medio de cultivo. La cepa se cultivó en medio rico LB en ausencia y en presencia de 10% (v/v) de tolueno, con agitación, a 30°C y durante durante 12 horas. Pasado este tiempo se recogieron las células de los cultivos por centrifugación, se lavaron dos veces en tampón fosfato y se resuspendieron en medio rico LB con distintas concentraciones de tolueno: 0 ; 0,1% ; 1% y 10% (v/v). Pasados cinco minutos se hicieron diluciones seriadas de cada cultivo y se sembraron en placas de medio sólido LB para determinar el número de células viables. Se observó que las células precultivadas en medio LB fueron inicialmente sensibles a concentraciones elevadas de tolueno, ya que la viabilidad decreció de 4 a 5 ordenes de magnitud en 1% (v/v) de tolueno y alrededor de 7 ordenes de magnitud para una concentración del 10% (v/v) del disolvente (Tabla 4). La viabilidad de la cepa no se vió influenciada por la presencia en el medio de cultivo, de 0,1% (v/v) de tolueno (Tabla 4). A diferencia de este comportamiento, se observó que cuando las células se habían precultivado en presencia del 10% (v/v) de tolueno no hubo pérdida de viabilidad al entrar en contacto con concentraciones elevadas del disolvente y a los cinco minutos de inicio del cultivo, la viabilidad fue del 100% respecto de la población inicial en cultivos con concentraciones de hasta el 10% de tolueno (Tabla 4).

Tabla 4. Supervivencia de *P. putida* DOT-T1 tras su exposición a concentraciones crecientes de tolueno

[Tolueno] (%)	LB	LB + Tolueno(10%)
0	10^8	10^8
0,1	10^8	10^8
1	10^4 - 10^5	10^8
10	10^2	10^8

Alrededor de 10^8 UFC/mL precultivadas en LB en ausencia y presencia de tolueno 10%(v/v), se resuspendieron en medio LB con concentraciones crecientes de tolueno. Tras cinco minutos de incubación a 30°C se hicieron diluciones seriadas y siembras en placa para la estimación del número de células viables. El valor que aparece en la tabla está referido al número de UFC/mL tras el choque con diferentes concentraciones de tolueno.

Se hicieron curvas de crecimiento para evaluar el mantenimiento o pérdida de viabilidad de la cepa a lo largo del tiempo, tras su inoculación en medio LB con concentraciones crecientes de tolueno. Así, las células se cultivaron en medio LB en ausencia o en presencia de 10% (v/v) de tolueno, durante 12 horas y a 30°C. Pasado este tiempo se inocularon a una turbidez de 0,1 en medio LB al que se añadieron concentraciones crecientes de tolueno. Periódicamente, se tomaron muestras para medida de crecimiento como el valor obtenido de la medida de turbidez del cultivo a 660 nm, y se hicieron diluciones seriadas que se sembraron en placas de medio rico para estimar el número de células viables. Los resultados, referidos a crecimiento se pueden observar en la Figura 18.

Cuando se partió de células precultivadas en ausencia de tolueno se observó una diferencia en la fase de retardo, previo al inicio del crecimiento, que fue más larga cuanto mayor fue la concentración inicial de disolvente (Fig 18A). A las 30 horas de inicio de la incubación se observó crecimiento en el caso de las células cultivadas en presencia del 1% y del 10% (v/v) de tolueno. Cuando se partió de células precultivadas en presencia del 10% (v/v) de tolueno no se observaron diferencias en el crecimiento a lo largo del tiempo como en el caso anterior y el crecimiento fue similar al obtenido con células cultivadas en ausencia del disolvente.

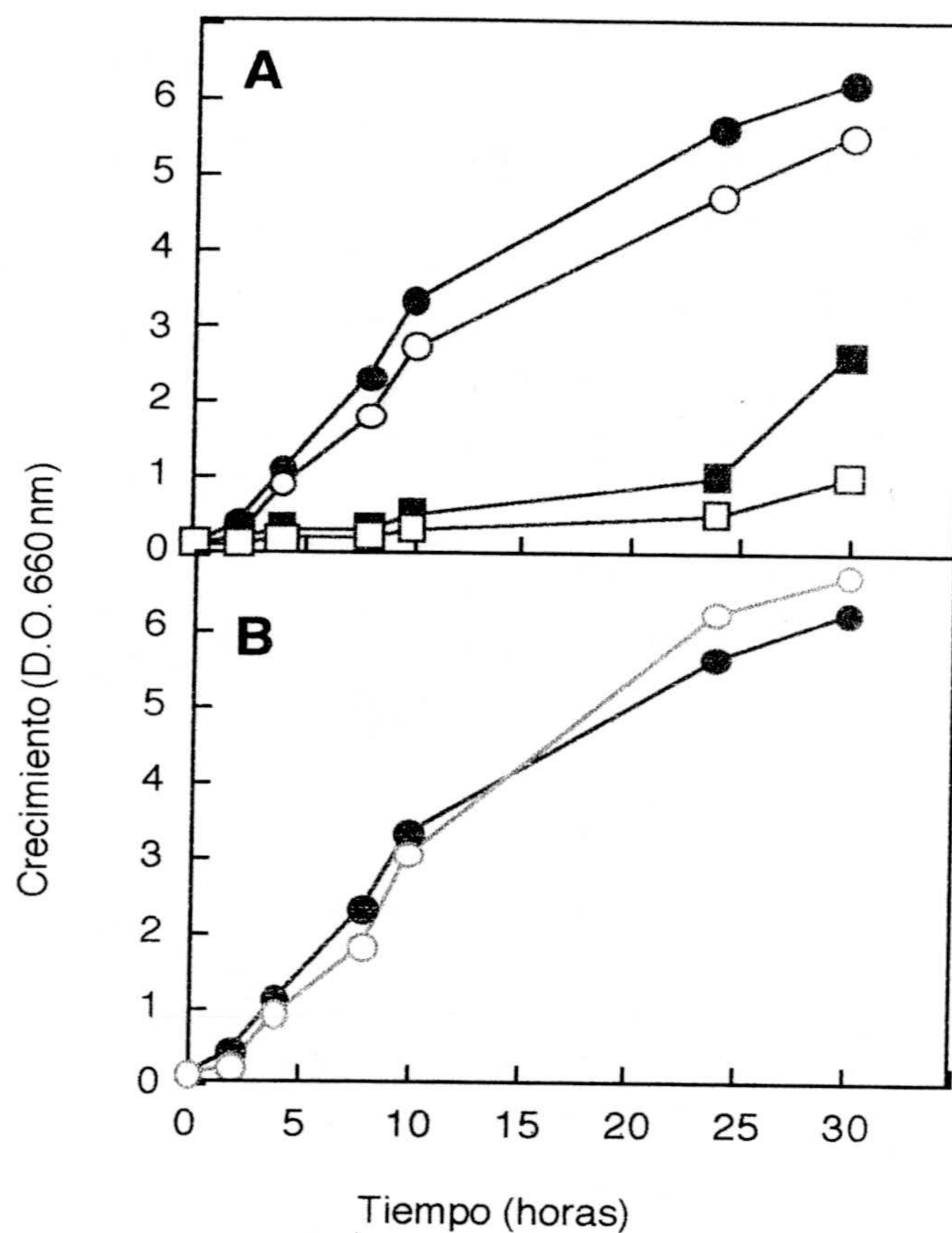


Figura 18. Crecimiento de *Pseudomonas putida* DOT-T1 en medio rico LB en la ausencia y presencia de tolueno. Células cultivadas en LB (A) se recogieron por centrifugación, se lavaron y se resuspendieron en medio rico LB sin tolueno (●) y con concentraciones crecientes de tolueno: 0.1% (○), 1% (■) y 10% (□). Células cultivadas en LB en presencia del 10% (v/v) de tolueno (B) se trataron de la misma forma y se resuspendieron en medio LB en ausencia (●) y en presencia de 10% (○) de tolueno. A los tiempos indicados se determinó el crecimiento midiendo la turbidez del cultivo a 660 nm.

Los resultados anteriores sugieren que DOT-T1 necesita un período de adaptación a disolventes, previo al inicio del crecimiento, cuando se cultivó en ausencia de disolventes orgánicos.

3.2 Tolerancia a tolueno por parte de otras cepas del género *Pseudomonas*

Para comparar el grado de tolerancia a tolueno por *Pseudomonas putida* DOT-T1 se utilizaron como controles cepas pertenecientes al género *Pseudomonas* que se

caracterizaban por utilizar tolueno en fase gaseosa como fuente de carbono y por presentar diferentes rutas degradativas para su mineralización. Las características fenotípicas de las cepas se describen en la sección de Materiales y Métodos y las rutas degradativas que utilizan las diferentes cepas, a modo de resumen, son las siguientes:

P. putida EEZ15. Cepa derivada de *P. putida* 2440 que porta el plásmido pWW0-EB62 (Ramos-González *et al.*, 1991). La ruta de degradación de tolueno se lleva a cabo a través de la oxidación de la cadena alquílica lateral hasta benzoato y la posterior oxidación de éste hasta catecol (Worsey y Williams, 1975).

P. putida F1. La ruta de degradación de tolueno de esta cepa implica la dioxigenación del anillo aromático rindiendo el correspondiente *cis*-glicol que es oxidado hasta 3-metilcatecol (Gibson *et al.*, 1970).

P. mendocina KR1, que metaboliza tolueno via hidroxilación inicial del anillo por acción de la tolueno-4-monooxigenasa que rinde *p*-cresol y la posterior oxidación de la cadena alquílica lateral hasta *p*-hidroxibenzoato (Whited *et al.*, 1991).

Como en la sección anterior, para determinar la viabilidad de las cepas tras su exposición a concentraciones crecientes de tolueno se llevaron a cabo una serie de ensayos. Para esto, todas las cepas se cultivaron en medio rico LB en ausencia de tolueno a 30°C, con agitación durante 12 horas. Pasado este tiempo se recogieron los cultivos por centrifugación, se lavaron dos veces en tampón fosfato y se resuspendieron en LB sin y con concentraciones crecientes de tolueno (v/v): 0,1%; 1% y 10%. A los cinco minutos de la inoculación, se hicieron diluciones seriadas y se sembraron en placas con medio LB. Se observó, la pérdida total de viabilidad en el caso de las tres cepas utilizadas al entrar en contacto con concentraciones del 1% y del 10% (v/v) de tolueno (Tabla 5). Ensayos similares se llevaron a cabo con *P. putida* EEZ15 y *P. mendocina* KR1 precultivadas en LB con tolueno, suministrado a través de la fase gaseosa. Como en el caso anterior, la exposición a concentraciones de tolueno de 1% (v/v) en el medio de cultivo, condujo a la pérdida total de viabilidad celular. Tras incubación hasta 24 horas no se observó crecimiento, de ninguna de las tres cepas a lo largo del tiempo en presencia del 1% y del 10% (v/v) de tolueno (datos no presentados).

Tras la observación de pérdida de viabilidad de las tres cepas al entrar en contacto con altas concentraciones de tolueno en el medio de cultivo y la ausencia de crecimiento a lo largo del tiempo en presencia de éstas concentraciones se consideraron a las tres cepas sensibles a este hidrocarburo aromático.

Tabla 5. Tolerancia de *P. putida* DOT-T1, *P. putida* EEZ15, *P. putida* F1 y *P. mendocina* KR1 a concentraciones crecientes de tolueno en el medio de cultivo.

[Tolueno] (%)	<i>P. putida</i> F1	<i>P. putida</i> EEZ15	<i>P. mendocina</i> KR1
0	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸
0,1	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸
1	<10 ²	<10 ²	<10 ²
10	<10 ²	<10 ²	<10 ²

Alrededor de 10⁸ UFC/mL de cada cepa precultivadas en medio LB se recogieron por centrifugación, se lavaron y se resuspendieron en LB en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de tolueno (v/v). A los 5 minutos se realizaron diluciones seriadas y siembras en placa para determinar el número de UFC/mL. Los valores de la tabla indican el valor referido al número de UFC/mL.

4. PAPEL PROTECTOR DE LOS IONES Mg²⁺ EN LA TOLERANCIA A TOLUENO

Se ha descrito que la presencia de cationes divalentes en el medio de cultivo (Ca²⁺, Mg²⁺, etc) fortalece las interacciones laterales entre moléculas de lipopolisacáridos (LPS) de bacterias gram-negativas e incrementa la tolerancia de las cepas a agentes tóxicos (Inoue *et al.*, 1991; Weber y de Bont, 1995). En esta sección, se describen los ensayos realizados con objeto de determinar si estos cationes ejercían algún efecto en la tolerancia a tolueno en cepas de *Pseudomonas*.

4.1 Efecto de distintos cationes en la tolerancia a tolueno de *P. putida* DOT-T1

Para evaluar el papel de determinados cationes en la tolerancia a disolventes, se hicieron ensayos de crecimiento de la cepa en presencia del 1% (v/v) de tolueno y de los siguientes cationes en forma de sulfatos o cloruros: SO₄Mg, SO₄Mn, ClCa₂, SO₄Cu y SO₄Zn.

Se partió de un cultivo de *P. putida* DOT-T1 en medio rico LB, que se había incubado con agitación a 30°C durante 12 horas. Se recogieron las células por centrifugación a 12000 g, se lavaron en tampón fosfato y se resuspendieron en medio LB en presencia de una concentración 10 mM de los diferentes cationes de estudio y con

1% (v/v) de tolueno. Como controles del ensayo se inoculó la cepa en medio rico LB y en LB sin los cationes de ensayo pero con 1% (v/v) de tolueno. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 6. Se observó que la adición al medio de cultivo de cationes Mg^{2+} ejerció un efecto beneficioso en la tolerancia al 1% (v/v) de tolueno de la cepa, ya que tras dos horas después de la exposición a tolueno no se observó una pérdida significativa de viabilidad, en contraste con el cultivo en LB con el 1% (v/v) de tolueno en el que la pérdida de viabilidad fue de alrededor de 4 ordenes de magnitud. No se observaron efectos beneficiosos en el caso de la adición al medio de cultivo de cationes Ca^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} o Zn^{2+} . De hecho tanto el Cu^{2+} como el Zn^{2+} parecían incidir negativamente sobre la supervivencia de la cepa. Este efecto no se ha analizado en mayor detalle.

Tabla 6. Efecto de distintos cationes en la tolerancia a tolueno de *P. putida* DOT-T1

Tiempo (Horas)	SO ₄ Mg	SO ₄ Mn	ClCa ₂	SO ₄ Cu	SO ₄ Zn	LB + 1% tolueno	LB
0	8	8	8	7	7	8	7,2
2	7,3	4	4	2	<2	4,3	8,3

Alrededor de 10^8 UFC/mL de la cepa se incubaron en medio LB en ausencia y en presencia del 1% (v/v) de tolueno. Cuando se indica las células se cultivaron en presencia de los diferentes cationes de ensayo. A los tiempos indicados se realizaron diluciones seriadas y siembras en placa para determinar el número de UFC/mL. Los valores de la tabla indican el \log_{10} UFC/mL.

4.2 Efecto de distintos cationes en la tolerancia a tolueno de otras cepas del género *Pseudomonas*

Como hemos referido en el apartado 3.2 y como se puede observar en la Tabla 5, las cepas degradadoras de tolueno utilizadas en este estudio se consideraron sensibles a altas concentraciones de tolueno en el medio. Para evaluar si, al igual que en DOT-T1, algún(os) cationes divalentes podían ejercer un efecto protector en la tolerancia a disolventes orgánicos, se llevaron a cabo ensayos en las mismas condiciones descritas en el apartado anterior para la cepa DOT-T1 utilizándo, de nuevo, las cepas descritas en la sección 3.2.

Se observó que a las dos horas de la inoculación, ninguno de los cationes utilizados ejerció un papel positivo en la tolerancia a disolventes en éstas cepas y hubo una pérdida

de viabilidad total, como sucedía en el caso de la incubación de las cepas en LB con el 1% (v/v) de tolueno (Tabla 4). Como excepción, cabe destacar el papel positivo que ejercieron los iones Mg^{2+} en la tolerancia a tolueno de la cepa *P. putida* F1 a largo plazo. Los resultados se presentan en la Figura 19, donde se puede observar que a partir de las 24 horas de la inoculación la cepa creció alcanzando densidades celulares de 10^8 UFC/mL a las 72 horas del inicio de la curva de crecimiento.

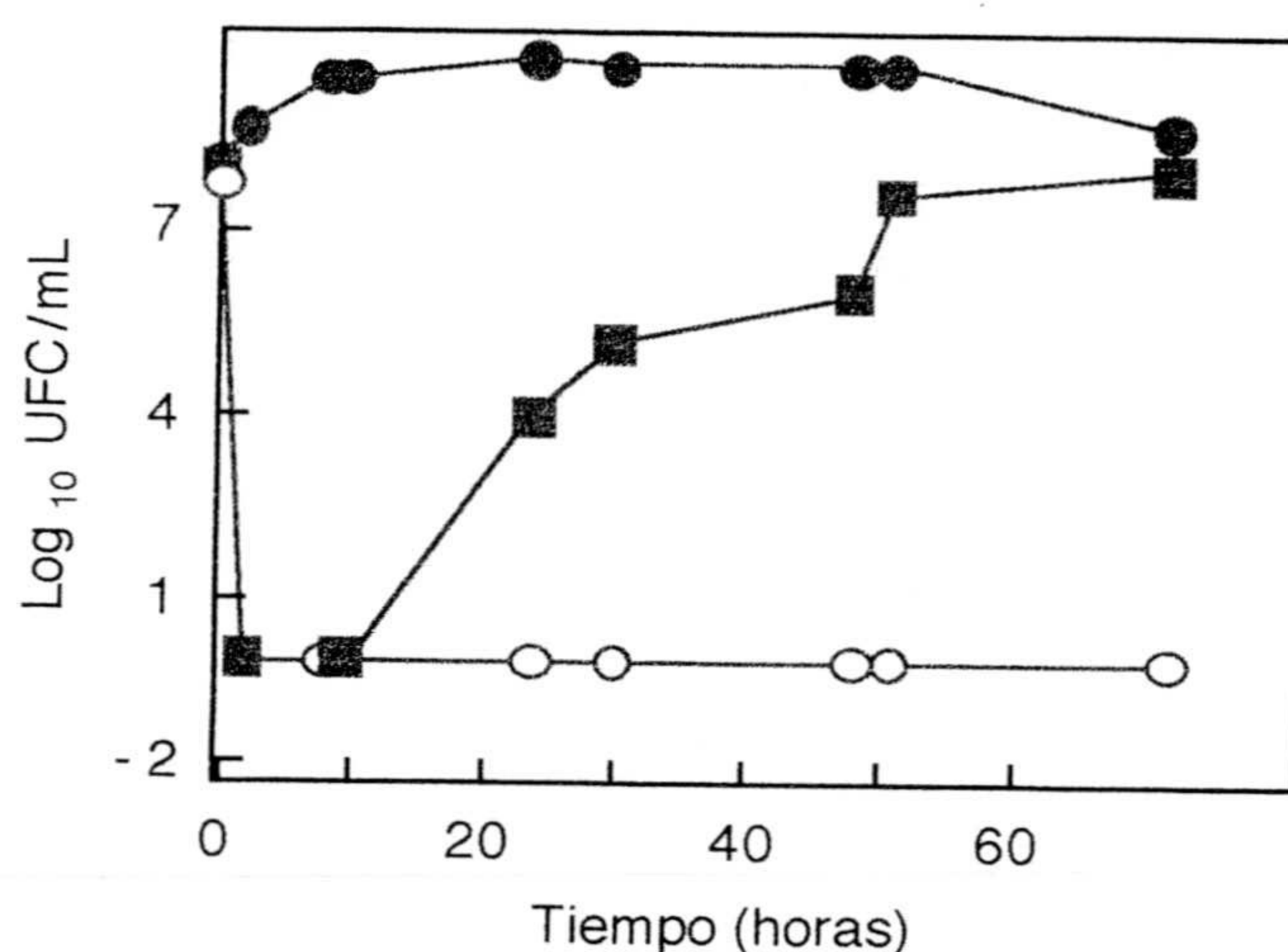


Figura 19. Efecto del Mg^{2+} en la tolerancia a disolventes por parte de la cepa *P. putida* F1. Alrededor de 10^8 UFC/mL de *P. putida* F1 se incubaron en medio LB en ausencia (●) y en presencia de 1% (v/v) de tolueno (○) o con LB en presencia de 10 mM de SO_4Mg y el 1% (v/v) de tolueno (■). A los tiempos indicados se realizaron diluciones seriadas y siembras en placa para determinar el número de UFC/mL.

En conclusión podemos afirmar que para algunas cepas sensibles a disolventes orgánicos, los iones Mg^{2+} ejercen un efecto positivo en la tolerancia a los mismos.

5. *Pseudomonas putida* DOT-T1 TOLERA DISOLVENTES ORGÁNICOS CUYO $\log P_{ow}$ ES MAYOR DE 2,3.

Como se ha referido en la introducción, la hidrofobicidad de un compuesto se expresa en términos de $\log P_{ow}$, valor que define el coeficiente de reparto de un compuesto en un sistema bifásico octanol/agua. Este valor, es útil para evaluar la toxicidad de un disolvente ya que nos permite establecer si un compuesto es tóxico o no para la célula y así definir el intervalo de disolventes que tolera una determinada cepa en función de este coeficiente.

Por esto, una vez establecida la tolerancia a tolueno por parte de DOT-T1 y la sensibilidad de otras cepas, se estudió la tolerancia de la cepa DOT-T1 a otros disolventes orgánicos y se comparó con las cepas consideradas sensibles a tolueno.

5.1 Crecimiento de *P. putida* DOT-T1 en la presencia de disolventes orgánicos

Para evaluar la tolerancia de la cepa frente a otros disolventes orgánicos, células de DOT-T1 se cultivaron en LB en presencia del 10% (v/v) de tolueno con agitación y a 30°C durante 12 horas. Pasado este tiempo, se recogieron las células por centrifugación, se lavaron con tampón fosfato para eliminar restos de tolueno y se incubaron en medio LB al que se había añadido diferentes disolventes orgánicos para alcanzar una concentración del 10% (v/v). Pasadas 24 horas de cultivo se determinó el crecimiento mediante la medida de turbidez a 660 nm. Los disolventes utilizados están listados en la tabla 7 en orden decreciente de hidrofocidad.

Se observó que *P. putida* DOT-T1 toleraba altas concentraciones de disolventes orgánicos cuyo $\log P_{ow}$ fuese igual o mayor a 2,3 (Tabla 7).

5.2 Tolerancia de otras cepas del género *Pseudomonas* a concentraciones elevadas de otros disolventes orgánicos

Para establecer el grado de tolerancia a distintos disolventes orgánicos de las otras cepas del género *Pseudomonas* utilizadas en este capítulo y que se caracterizan por ser degradadoras de tolueno. Se estudió el efecto que ejercían diferentes disolventes sobre el crecimiento de las mismas.

Los disolventes utilizados en la comparación presentaron distintas polaridades entre 4,1 y 2 (Tabla 7). El ensayo se llevo a cabo de la misma manera que en el apartado anterior, excepto que los disolventes se añadieron al medio de cultivo para alcanzar concentraciones de 0,1%, 1% y 10% (v/v). El crecimiento se determinó como incremento de la turbidez de los cultivos a 660 nm tras 24 horas de incubación.

Los resultados obtenidos en comparación con DOT-T1 se muestran en la Tabla 8. Se observó que las cuatro cepas toleraron altas concentraciones de heptano ($\log P_{ow}$ 4,1) y que ninguna de ellas toleraron concentraciones mayores de 0,1% (v/v) de benceno ($\log P_{ow}$ 2). Cuando se ensayó el crecimiento de las cuatro cepas en propilbenceno ($\log P_{ow}$ 3,5), se observó que mientras DOT-T1 toleraba concentraciones mayores del 10% (v/v), *P. putida* F1 y EEZ15 toleraron hasta el 1% (v/v) y que *P. mendocina* KR1 solo toleró 0,1% (v/v) de este hidrocarburo aromático. Con respecto al tolueno ya hemos descrito anteriormente

los niveles de tolerancia de las cepas considerándolas sensibles a concentraciones mayores del 0,1% (v/v) en el medio de cultivo.

Tabla 7. Crecimiento de *P. putida* DOT-T1 en presencia de disolventes orgánicos

Disolvente	logP ^a _{ow}	Crecimiento (D.O.660nm)
<i>n</i> -Decano	5,6	>2
<i>n</i> -Octano	4,5	>2
<i>n</i> -Heptano	4,1	>2
Propilbenceno	3,6	>2
Ciclohexano	3,2	>2
<i>p</i> -xileno	3,1	>2
Estireno	3,0	>2
Tolueno	2,5	>2
1-Heptanol	2,4	>1
Dimetilftalato	2,3	>1
Benceno	2,0	< 0.2
Butanol	0,8	< 0.2

Alrededor de 10⁸ UFC/mL de *P. putida* DOT-T1 se inocularon en medio LB al que habíamos añadido cada uno de los disolventes orgánicos listados en la Tabla a una concentración del 10% (v/v). Tras 24 horas de incubación a 30°C se midió el crecimiento del cultivo como aumento de la turbidez a 660 nm.^a El valor logP_{ow} se tomó de los calculados por Rekker y de Kort (1979).

Tabla 8. Tolerancia a disolventes orgánicos por cepas degradadoras de tolueno pertenecientes el género *Pseudomonas*

Cepas	Concentración de disolventes orgánicos (%)			
	Heptano	Propilbenceno	Tolueno	Benceno
<i>P. putida</i> DOT-T1	> 10	> 10	> 10	< 0.1
<i>P. putida</i> F1	10	1	0.1	< 0.1
<i>P. putida</i> EEZ15	10	1	0.1	< 0.1
<i>P. mendocina</i> KR1	10	0.1	0.1	< 0.1

Las condiciones de ensayo y medida de crecimiento son las indicadas en la tabla 7, excepto que se utilizaron concentraciones crecientes de distintos disolventes aromáticos y las cepas indicadas.

II. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEGRADADORAS DE TOLUENO DE SUELOS CONTAMINADOS

Las cepas MTB5 y MTB6 se aislaron de suelos contaminados con concentraciones elevadas de tolueno (10% (v/p)). La cepa SMO116, procedente del laboratorio de Søren Mølin, se aisló de un biofilm en contacto con este hidrocarburo aromático (Møller *et al.*, 1996). Éstas cepas utilizaron tolueno como fuente de carbono y energía. En este capítulo se describe la caracterización de las cepas bajo estudio, así como la tolerancia a tolueno y a otros disolventes orgánicos. Las tres cepas toleraron concentraciones de hasta el 10% (v/v) de heptano y 1% de propilbenceno y etilbenceno y ninguna toleró concentraciones mayores del 0,1% (v/v) de benceno en el medio. Con respecto a la tolerancia a tolueno MTB5 y SMO116 resultaron ser sensibles a concentraciones mayores de 0,1% (v/v) de tolueno, mientras MTB6 toleró concentraciones de hasta el 10% (v/v) del disolvente en el medio de cultivo. La identificación taxonómica de las cepas MTB5 y MTB6, permitió la asignación de ambas cepas al género *Pseudomonas* y en concreto a la especie *P. putida*. En relación con los mecanismos de defensa frente a concentraciones elevadas de disolventes orgánicos, todas mostraron un aumento en isómeros *trans* de los lípidos insaturados de la membrana. Asimismo estas cepas presentaron genes que codifican proteínas implicadas en el eflujo de tolueno al medio externo.

Por otra parte se estableció que la ruta utilizada por las cepas bajo estudio para el catabolismo de tolueno fue la denominada ruta TOD de la tolueno dioxigenasa que implica la dioxigenación de tolueno y la consecuente formación de *cis*-tolueno dihidrodiol, que tras su oxidación rinde 3-metilcatecol.

1. AISLAMIENTO DE CEPAS DEGRADADORAS DE TOLUENO

Como se han indicado en el capítulo anterior y en la sección de Introducción de esta Tesis Doctoral, numerosos grupos de investigación han aislado y caracterizado cepas degradadoras de tolueno y se han descrito, al menos, cinco rutas distintas para la degradación aeróbica de este hidrocarburo aromático principalmente por cepas del género *Pseudomonas*. Pero se han descrito pocos microorganismos capaces de tolerar concentraciones supersaturantes de tolueno en el medio de cultivo (Cruden *et al.*, 1992, Inoue y Horikoshi, 1989, Pinkart *et al.*, 1996, Ramos *et al.*, 1995 y Weber *et al.*, 1993). En algunos de los casos descritos el microorganismo toleró concentraciones elevadas de estos disolventes pero no utilizó tolueno como fuente de carbono y energía (Inoue y Horikoshi, 1991). En zonas muy contaminadas con tolueno, uno de los factores críticos en su tratamiento es la tolerancia a disolventes. Por eso una vez caracterizada la cepa DOT-T1 que presentó una elevada tolerancia a tolueno en medio líquido se consideró el estudio de su comportamiento tras su inoculación en suelo. Anterior a la introducción de la cepa se planteó la necesidad de conocer si en el suelo que usábamos, sin historia anterior de contaminación por disolventes orgánicos, existían bacterias capaces de tolerar concentraciones elevadas de tolueno y de usar éste como fuente de carbono.

A lo largo de este capítulo se describe la caracterización microbiológica de dos cepas aisladas de suelo del jardín de la Estación Experimental del Zaidín incubado en presencia de 10% (v/p) de tolueno. Asimismo, se consideran los mecanismos de defensa frente a concentraciones elevadas de tolueno que presentaron estas cepas y finalmente se describe la ruta de degradación de tolueno por parte de estas cepas y de otra aislada en Dinamarca y denominada SMO116.

1.1 Supervivencia de la microbiota indígena en presencia de concentraciones elevadas de tolueno

Se llevaron a cabo ensayos para determinar si en un suelo sin antecedentes de contacto con disolventes orgánicos, los microorganismos indígenas toleraban una descarga de tolueno. Así se tomaron 90 g de suelo tamizado del jardín de la Estación Experimental del Zaidín (cuyas características se describen en el apartado 16 de Materiales y Métodos), y se depositaron en vasos de cristal de 100 mL (lo que se denominó microcosmos edáficos) y se adicionaron concentraciones crecientes de tolueno (v/p) para alcanzar: 0; 0,1%; 1%; y 10%. A lo largo del tiempo se analizó la supervivencia de la microbiota mediante siembra y conteo en placas de microorganismos capaces de crecer en

LB, en LB con tetraciclina ($20 \mu\text{g/mL}$) y en medio mínimo con tolueno, glucosa o *p*-hidroxifenilacético como fuentes de carbono. Los resultados obtenidos en todos los casos fueron similares y los referidos a los microorganismos que formaron colonias en medio mínimo con tolueno se presentan en la Figura 20.

Como se puede observar la adición a este suelo de 0,1% (v/p) de tolueno no tuvo efecto significativo sobre la supervivencia bacteriana. Sin embargo, se observó que en presencia de concentraciones mayores el número de bacterias de la microbiota capaces de crecer en medio mínimo con tolueno decreció con respecto al número inicial, pero pasados 10 días de incubación el número de UFC/g de suelo aumentó para alcanzar de 10^4 y 10^5 UFC /g de suelo de células bacterianas presentes en suelos en presencia de 10% y 1% (v/p) de tolueno, respectivamente. Tras 30 días de incubación se encontró que el número de bacterias de la microbiota capaces de utilizar tolueno como fuente de carbono se situó entre 10^5 y 10^6 UFC/g de suelo.

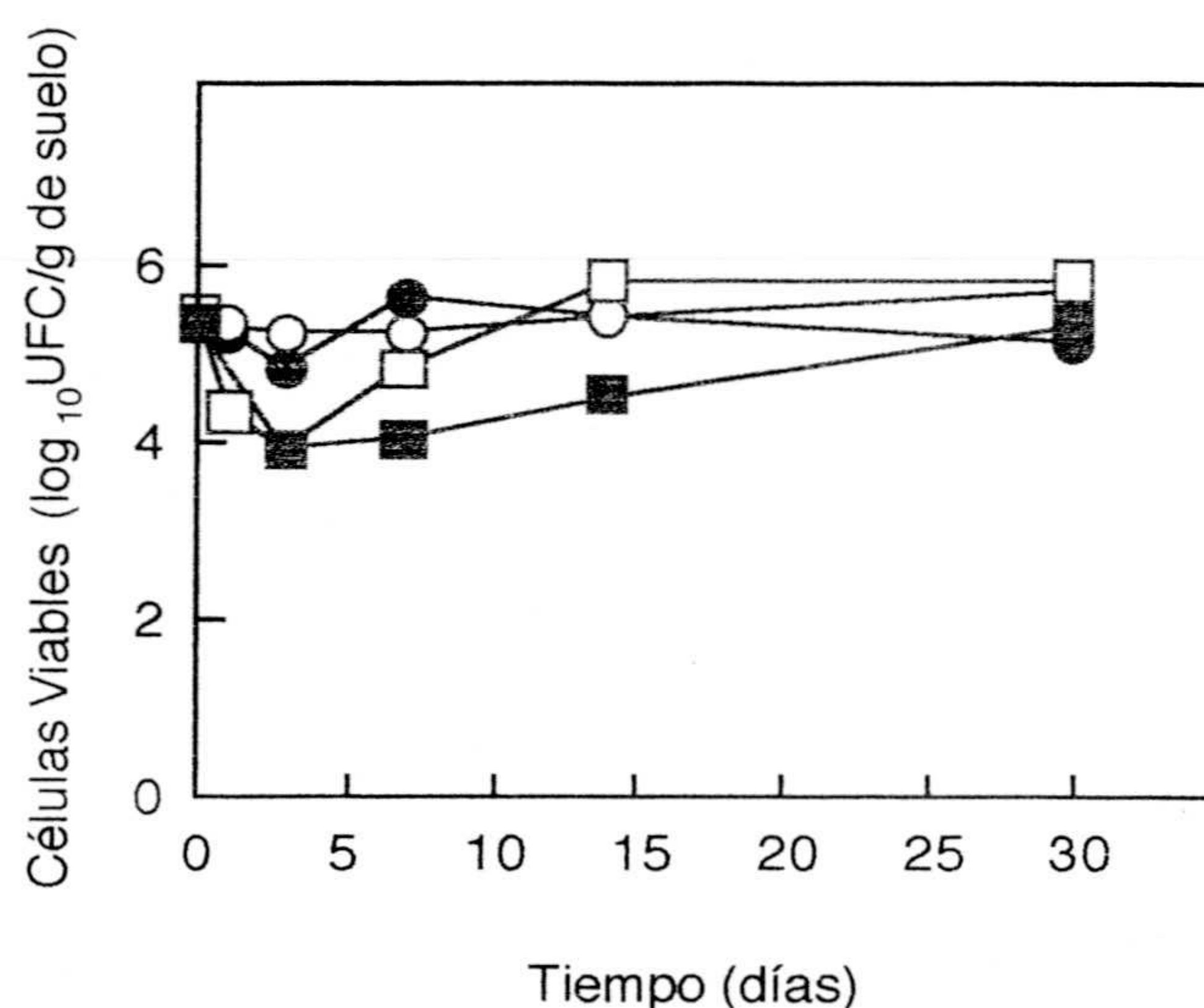


Figura 20. Comportamiento de la microbiota en presencia de concentraciones crecientes de tolueno. Noventa gramos de suelo se incubaron durante 30 días en ausencia (○) o en presencia de diferentes concentraciones de tolueno 0,1% (●), 1% (□) y 10% (■). Periódicamente se tomaron muestras, se hicieron diluciones seriadas y se sembraron en medio mínimo con tolueno como fuente de carbono. Se determinó el número de células viables presentes como el \log_{10} UFC/g de suelo.

1.1.1 Tolerancia a tolueno por la microbiota en otros tipos de suelo

Con objeto de determinar si la observación anterior se debía a la existencia de cepas con unas características determinadas en el suelo elegido, se llevaron a cabo ensayos

procediendo de la misma manera y utilizando otros suelos bien caracterizados en este grupo de investigación: el suelo tipo fluvisol-10 de la costa de Granada (relativamente rico en materia orgánica) y el suelo tipo cambisol-1 de la sierra de Granada (relativamente pobre en materia orgánica) (Ramos *et al.*, 1991). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 9. Se observó que en estos suelos el comportamiento de la microbiota indígena fue similar al obtenido en el ensayo indicado arriba, y que el número de bacterias de la microbiota capaces de crecer en medio mínimo con *p*-hidroxifenilacético, como fuente de carbono, tras 15 días de incubación en presencia de concentraciones crecientes de tolueno fue de alrededor de 10^7 y 10^6 UFC/g de suelo. Por tanto se pudo concluir que en suelos sin historia de exposición a disolventes orgánicos existen bacterias que sobreviven en presencia de concentraciones elevadas de tolueno.

Tabla 9. Tolerancia a tolueno de la microbiota indígena en suelos de la provincia de Granada.

Suelo	Control	0,1 %	1 %	10 %
cambisol-1	7,3	6,4	6,1	5,6
Fluvisol-10	6,3	6,4	6,1	6,0

Las condiciones son similares a las descritas en el pie de la Figura 8, excepto que se utilizaron los suelos cambisol-1 y fluvisol-10 y que el conteo se realizó a los 15 días de añadir tolueno, y que el número de microorganismos correspondió a los microorganismos capaces de utilizar *p*-hidroxifenilacético como fuente de carbono. Los valores se expresan como \log_{10} UFC/mL

1.2 Aislamiento de cepas degradadoras de tolueno

El comportamiento de los microorganismos de la microbiota fue inesperado, ya que no esperábamos encontrar bacterias tolerantes a concentraciones elevadas de tolueno en los suelos bajo estudio. Por ello se consideró el aislamiento de microorganismos de estos suelos con el fin de evaluar la naturaleza de los mismos. El aislamiento se llevó a cabo como se describe en el apartado 4.1 de la sección de Materiales y Métodos. Las muestras se incubaron en placas de medio mínimo con tolueno como fuente de carbono suministrado en fase gaseosa. Se eligió tolueno como fuente de carbono, ya que se presumió que entre los microorganismos tolerantes a concentraciones elevadas de tolueno deberían existir cepas que utilizaran este como fuente de carbono.

Tras 48 horas de incubación a 30°C se encontraron dos tipos de colonias morfológicamente distintas que se denominaron MTB5 y MTB6 y se seleccionaron para su estudio posterior.

2. CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS MTB5 Y MTB6

2.1 Identificación de las cepas MTB5 y MTB6

Las cepas seleccionadas se sometieron a tinción de Gram y a los ensayos metabólicos disponibles en el paquete comercial API (ver Materiales y Métodos), revelando que las cepas denominadas MTB5 y MTB6 eran bacterias gram-negativas pertenecientes al género *Pseudomonas*. La temperatura óptima de crecimiento para ambas fue de 30°C.

La cepa MTB6 utilizó una gran variedad de sustratos como fuente de carbono entre los que se incluyeron: tolueno, etilbenceno, alcohol bencílico, benzoato, *p*-hidroxifenilacético, alcohol 3-metilbencílico, 3,4-dihidroxibenzoato, alcohol 2-hidroxibencílico, catecol y 3-metilcatecol, glucosa, fructosa, manosa, glicerol, antranilato, salicilato, valina y arginina. Sin embargo, no utilizó como fuente de carbono y energía los siguientes compuestos: xilenos, cresoles, sacarosa, fucosa o arabinosa. Para la cepa MTB5 el perfil de sustratos utilizado como fuente de carbono fue el siguiente: tolueno, etilbenceno, alcohol bencílico, benzoato, 3,4-dihidroxibenzoato, catecol, 3-metilcatecol, glucosa, glicerol y arginina; y no utilizó como fuente de carbono 3-metilbenzoato, alcohol 2 y 3-metilbencílico, 4-hidroxibenzoato, xilenos, cresoles, succinato, fructosa, sacarosa, lactosa, antranilato, salicilato, manosa, fucosa, arabinosa y valina.

Para determinar la susceptibilidad de las cepas a antibióticos se realizaron antibiogramas en medio LB sólido, suministrándose los antibióticos a la concentración indicada entre paréntesis ($\mu\text{g/mL}$). Así ambas cepas presentaron resistencia natural a ampicilina (25), rifampicina (10), cloranfenicol (30). La cepa MTB6 presentó resistencia a ácido nalidixico (10) mientras que MTB5 fue sensible a este antibiótico. Ambas cepas presentaron sensibilidad frente a kanamicina (50), tetraciclina (10) y estreptomycin (25).

El análisis del perfil de fosfolípidos y de los test metabólicos llevaron a la identificación de MTB5 y MTB6 como pertenecientes al género *Pseudomonas* y la especie *P. putida*.

2.2 Encuadre filogénico de las cepas MTB5 y MTB6

Para confirmar la identificación inicial de las cepas como pertenecientes al género y a la especie arriba reseñada, se llevaron a cabo amplificaciones del ADN que codifica para el ARNr 16S. Parte de estos ensayos se realizaron en el Departamento de Biología Ambiental de la Universidad de las Islas Baleares durante una estancia sufragada por la RED de Microorganismos de Interés Medioambiental de la CICYT.

Los oligonucleótidos utilizados para amplificación y secuenciación del ADN que codifica para el ARNr fueron suministrados por el Dr. Ramon Rosselló-Mora y sus secuencias fueron las siguientes:

616V; 5'- AGAGTTTGAT(C o T) (A o C) TGGCTCAG-3'

630R; 5'- CA(G o T)AAAGGAGGTGATCC-3'

Las condiciones de amplificación se describen en el apartado 9.5 de la sección de Materiales y Métodos. En la Figura 21 se muestra el producto resultante de la amplificación con oligonucleótidos específicos que presentó un tamaño de aproximadamente 1600 bp.

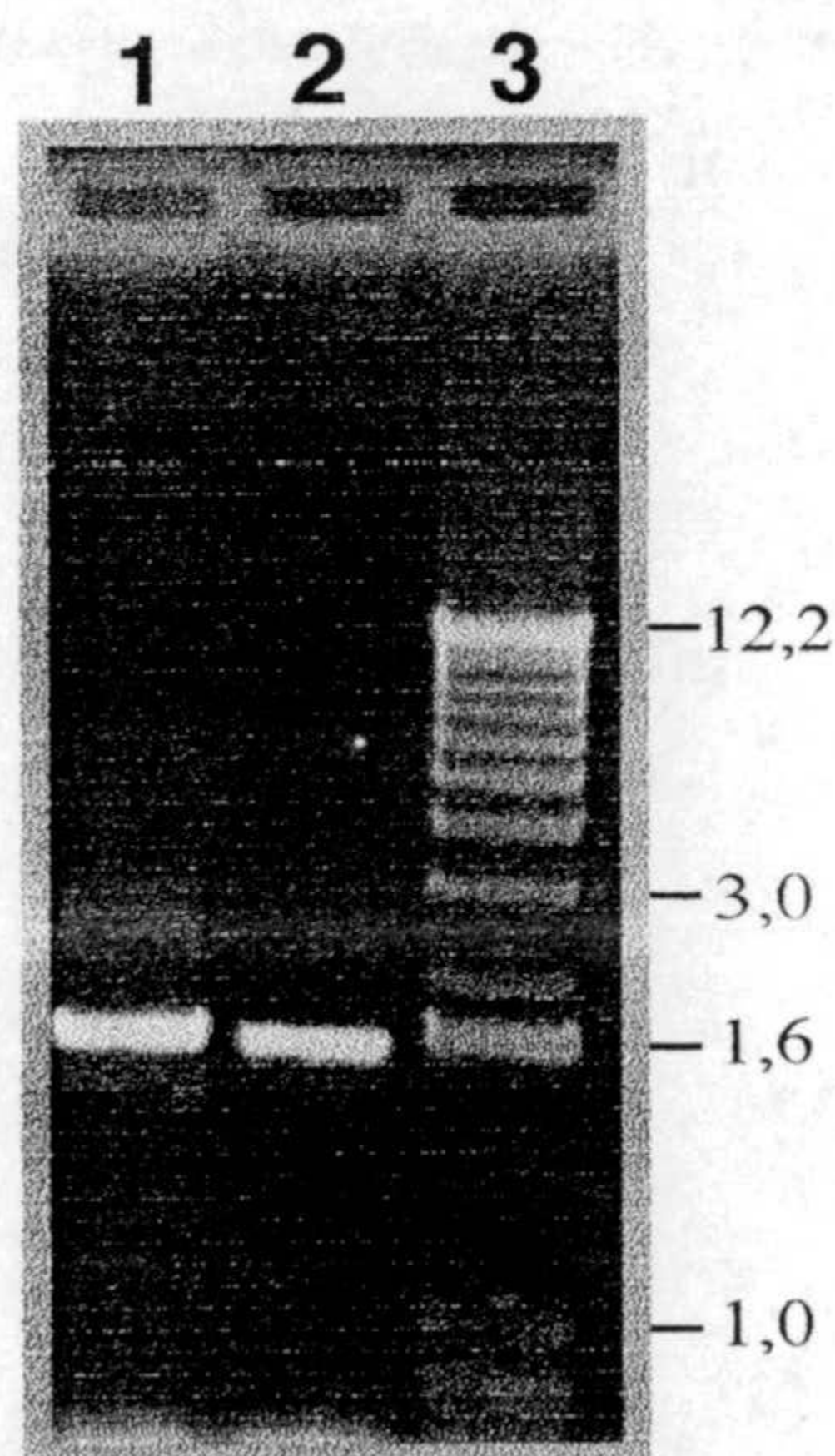


Figura 21. Resultado de la amplificación con ADN molde de las cepas MTB5 y MTB6 utilizando los oligonucleótidos 616V y 630R. Resultado de la PCR utilizando ADN molde de las cepas MTB5 (calle 1) y MTB6 (calle 2). En la calle 3 se muestra el marcador de peso molecular X de Boehringer Mannheim, indicándose a la derecha el tamaño de algunos de sus fragmentos.

El producto resultante para cada una de las cepas se secuenció como se describe en la sección 9.6 del apartado de Materiales y Métodos. La secuenciación se inició desde los cebadores inicial y reverso. La secuencia obtenida para cada una de las cepas bajo estudio

se comparó con las secuencias depositadas en las bases de datos existentes en la red. En la comparación se obtuvo que la secuencia del ADN que codifica para el ARNr 16S de MTB6 presentó un 99,1% de similitud con la que presentan cepas pertenecientes al género *Pseudomonas* y un 98,9% con la que presenta cepas pertenecientes a la especie *P. putida*. MTB5 presentó también alta similitud con las secuencias que codifican para el ARN 16S de *Pseudomonas putida* lo que nos confirmó la identificación inicial. Las secuencias de ambas cepas se depositaron en el banco de datos y su número de acceso es xxxxx y YYYYYYY para MTB6 y MTB5, respectivamente.

Con las secuencias del ADN que codifican el ARNr se hicieron árboles filogenéticos para comparar la cercanía o lejanía taxonómica con otros géneros y especies. Estos árboles fueron realizados por el Dr. Ramón Rosselló-Mora en el Instituto Max Planck de Microbiología Marina en Bremen (Alemania). En la Figura 22 se presenta el árbol filogenético obtenido que encuadra a nuestras cepas como a la misma rama de las *Pseudomonas* además de que presentan similitudes pertenecientes al género *Pseudomonas sensu stricto* del grupo I de ARNr.

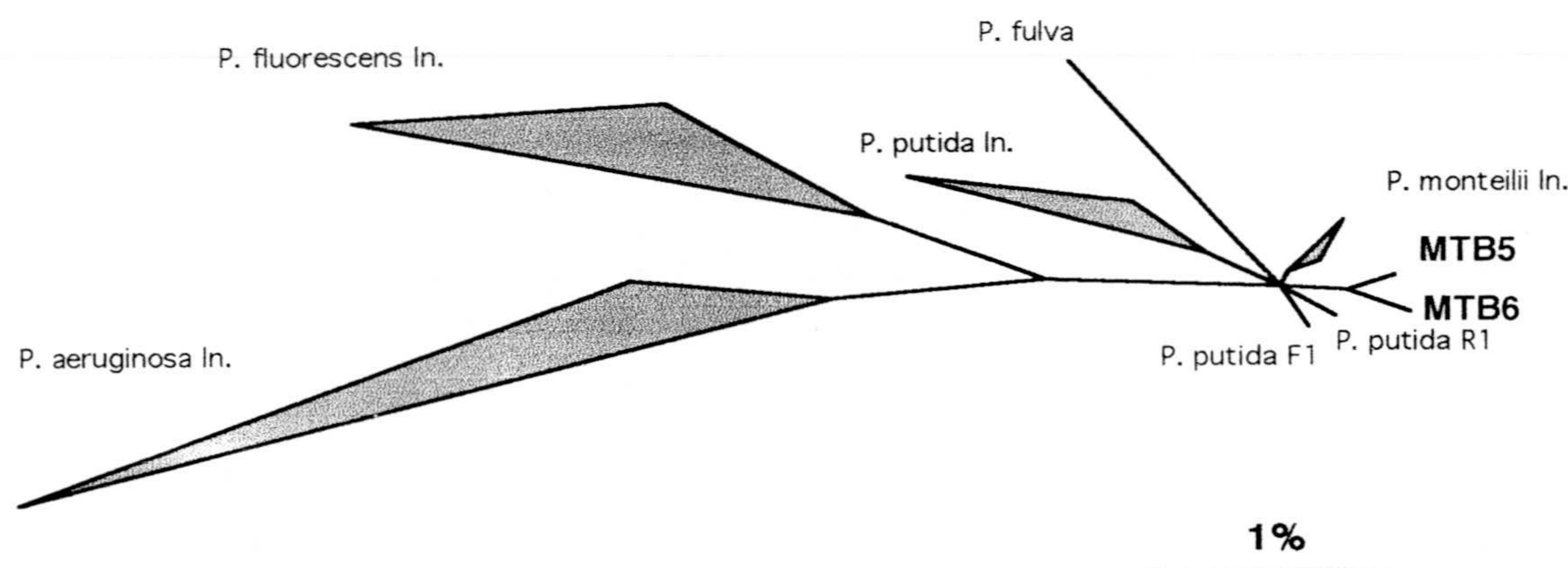


Figura 22. Árbol filogenético que encuadra a las cepas MTB5 y MTB6. Los resultados del árbol están basados en análisis de máxima similitud con las secuencias publicadas del ARNr 16S de otras bacterias representativas. *P. aeruginosa* (In.) incluye a las especies de *P. aeruginosa*, *P. mendocina*, *P. stutzeri* y *P. pseudoalcaligenes*. *P. fluorescens* (In.) incluye a *P. fluorescens* y *P. syringae*. *P. putida* (In.) incluye a las especies *P. putida* (especie tipo), *P. asplenii* y *P. oryzihabitans* y *P. monteilli* (In.) incluye a *P. monteilli*, *P. putida* mt-2, *P. putida* MnB1, *P. putida* K23-1 y *P. putida* BH. La topología del árbol ha sido evaluada y corregida de acuerdo con los resultados del análisis de la matriz de distancia, máxima parsimonia y máxima similitud. La barra 1% indica la divergencia de la secuencia estimada.

3. TOLERANCIA A TOLUENO Y OTROS DISOLVENTES ORGÁNICOS POR PARTE DE LAS CEPAS *P. putida* MTB5, MTB6 Y SMO116.

Como hemos referido MTB5 y MTB6 se aislaron de suelos que no tenían una historia anterior de contaminación, con objeto de compararlas con otras cepas aisladas de zonas contaminadas solicitamos al Doctor Søren Mølin una cepa aislada en su grupo de investigación y proveniente de un biofilm que había estado en contacto con aguas residuales industriales contaminadas con tolueno. La cepa se denominaba SMO116 y tras estudios basados en el ADN que codifica para el ARNr de 16S se encuadró como perteneciente al género y a la especie *P. putida* (Møller *et al.*, 1996).

Así, una vez encuadradas las cepas objeto de estudio, se llevaron a cabo una serie de ensayos con el fin de evaluar la tolerancia de estas cepas a concentraciones elevadas de disolventes orgánicos. Para esto se evaluó la supervivencia en medio líquido de las cepas tras su exposición a concentraciones crecientes de tolueno y otros disolventes orgánicos.

3.1 Tolerancia a tolueno

Para evaluar la tolerancia a tolueno, células de las cepas bajo estudio se cultivaron en medio rico LB en ausencia de tolueno durante 12 horas a 30°C y con agitación. Pasado este tiempo se diluyeron los cultivos 1/100 en medio rico LB en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de tolueno: 0,1%, 1% y 10% (v/v) y se siguió el crecimiento a través de la medida de turbidez a 660 nm y mediante siembra en placas de LB durante 24 horas. Los resultados se recogen en la Tabla 10. Se observó que las cepas MTB5 y SMO116 toleraron concentraciones de 0,1% (v/v) de tolueno en medio líquido, mientras que concentraciones mayores de este hidrocarburo aromático condujeron a la pérdida de viabilidad de las cepas arriba citadas. Sin embargo la cepa MTB6 mostró mayor tolerancia a concentraciones elevadas de tolueno y toleró hasta 10% (v/v) del mismo en el medio de cultivo, aunque, al contrario que la cepa DOT-T1, no toleró concentraciones mayores. El carácter fenotípico de la sensibilidad/tolerancia a tolueno nos permitió considerar a MTB5 y SMO116 sensibles a tolueno y tolerante a la cepa MTB6.

Tabla 10. Tolerancia de las cepas *P. putida* MTB5, MTB6 y SMO116 a concentraciones crecientes de tolueno en el medio de cultivo.

Cepas	[Tolueno] % (v/v)			
	Control	0,1 %	1 %	10 %
<i>P. putida</i> MTB5	4×10^7	4×10^7	<10	<10
<i>P. putida</i> MTB6	$5,8 \times 10^7$	5×10^7	2×10^7	1×10^5
<i>P. putida</i> SMO116	1×10^7	1×10^7	<10	<10

Células de las tres cepas bajo estudio se cultivaron en medio líquido LB en presencia de diferentes concentraciones de tolueno que están indicadas en la Tabla. A las 24 horas se estimó el número de UFC/mL presentes en cada uno de los cultivos.

3.2 Tolerancia a otros disolventes orgánicos

Una vez evaluada la tolerancia de las cepas a concentraciones crecientes de tolueno, se realizaron ensayos encaminados a determinar el grado de tolerancia de las cepas bajo estudio cuando se cultivan en medio LB en presencia de diferentes concentraciones de otros disolventes aromáticos.

Las condiciones de este tipo de ensayos fueron similares a las citadas en el apartado anterior, excepto que se utilizaron disolventes orgánicos que presentaron distinto $\log P_{ow}$: heptano (4,1), propilbenceno (3,5), etilbenceno (3,1) y benceno (2). Los resultados se muestran en la Tabla 11. Se observó que las tres cepas toleraron concentraciones similares de heptano (10%), propilbenceno (1%) y etilbenceno (1%) y ninguna toleró concentraciones mayores de 0,1% (v/v) de benceno.

4. RESPUESTA FISIOLÓGICA DE LAS CEPAS DE *P. putida* MTB5, MTB6 Y SMO116 A CONCENTRACIONES ELEVADAS DE TOLUENO EN EL MEDIO DE CULTIVO.

En general, se han descrito que cepas pertenecientes al género *Pseudomonas* presentan una serie de mecanismos de defensa frente a concentraciones elevadas de disolventes en el medio de cultivo. Éstos consisten, por un lado, en una respuesta a tiempo corto que implica un incremento en el nivel de isómeros *trans* de los lípidos insaturados de la membrana y, por el otro, una respuesta a más largo plazo que implica cambios en los fosfolípidos de la membrana debido a alteraciones de los grupos de cabeza (Chen *et al.*, 1995, Ramos *et al.*, 1997 y Weber *et al.*, 1994). Además, recientemente se

han descrito sistemas activos que expulsan al medio el disolvente acumulado dentro de la membrana celular. (Isken y de Bont., 1996., Ramos *et al.*, 1997 y 1998., Segura *et al.*, 1999).

Tabla 11. Tolerancia de MTB5, MTB6 y SMO116 a distintas concentraciones de disolventes orgánicos.

Cepas	[Disolventes orgánicos] % (v/v)			
	Heptano	Propilbenceno	Etilbenceno	Benceno
MTB6	10%	1%	1%	0.1%
MTB5	10%	1%	1%	0.1%
SMO116	10%	1%	1%	0.1%

Células de MTB5, MTB6 y SMO116 se cultivaron en presencia de concentraciones crecientes de los disolventes orgánicos indicados. En la Tabla se indica el % máximo tolerado para cada cepa. Éste correspondió a cultivos que tras 24 horas de incubación presentaron, al menos, 10^7 UFC/mL.

Con el objeto de evaluar si las cepas objeto de estudio presentaban algunos de los mecanismos de defensa descritos frente a concentraciones elevadas de disolventes orgánicos se llevaron a cabo ensayos para evaluar:

- 1) La composición de lípidos cuando las cepas se incuban en presencia de disolventes orgánicos.
- 2) La acumulación de tolueno en las membranas.
- 3) El análisis de la presencia de genes específicos descritos como integrantes del sistema de eflujo de tolueno fuera de las membranas.

4.1 Determinación cuantitativa de lípidos en células de *P. putida* MTB5, MTB6 y SMO116 cultivadas en medio LB en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de tolueno.

Se llevaron a cabo ensayos para evaluar las diferencias en la composición lipídica de la membrana en las cepas *P. putida* MTB5, MTB6 y SMO116 cuando se incubaron en ausencia o en presencia de tolueno añadido directamente al medio de cultivo o en fase gaseosa. Así, células de las cepas bajo estudio se cultivaron durante 24 horas en medio líquido LB en presencia de concentraciones crecientes de tolueno (v/v): 0; 0,1; 1 y 10% así como en medio mínimo con tolueno como fuente de carbono y suministrado en fase gaseosa. Las células se recogieron por centrifugación y se extrajeron los lípidos. Éstos se

transesterificaron y analizaron por cromatografía de gases tal y como se describe en la sección 14 del apartado de Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos para cada una de las cepas se muestran en las Tablas 12, 13 y 14. Se observó que las tres cepas presentaron mecanismos de respuesta frente a la presencia de tolueno en el medio de cultivo, ya que en presencia de tolueno se observó una disminución en la relación *cis/trans* y saturados/insaturados.

En las cepas MTB5 y SMO116 estos cambios se observaron cuando se incubaron en presencia del 0,1% (v/v) de tolueno en el medio de cultivo y en presencia de tolueno en fase gaseosa. Mientras que en la cepa MTB6 fueron más marcados en presencia de 1% y 10% (v/v) de tolueno. Además, se observó un descenso en el porcentaje de ácido graso C17:ciclopropano como se observó en la cepa DOT-T1 (Ramos *et al.*, 1997).

Tabla 12. Efecto de la presencia de tolueno sobre la composición de ácidos grasos de *P. putida* MTB5.

	Condiciones de cultivo		
	LB	LB+0.1%	M9+Tol (v) ^a
C14:0	1,5	1,6	1,3
C15:0	1,8	1,7	0,3
C16:1w9c	0,6	0,4	2,2
C16:1w9t	0,3	1,0	10,8
C16:0	41,1	41,7	41,9
C17:ciclo	39,0	38,0	25,7
C17:0	1,0	1,2	0,3
C18:1w11c	7,8	7,7	7,4
C18:1w11t	0,7	2,2	7,7
C18:0	0,9	1,1	1,0
C18:ciclo	5,1	3,5	1,5
<i>Cis/Trans</i>	8,4	2,5	0,5
<i>Sat/Insat</i>	4,9	4,1	1,5

Las condiciones de cultivo de la cepa se describen en el texto. La composición de los ácidos grasos se expresa en % del total. La identificación de los ácidos grasos se hizo en base a los espectros de masas de patrones existentes en la librería NBS75K. ^aTol(v), tolueno suministrado en la fase gaseosa.

Tabla 13. Efecto de la presencia de tolueno sobre la composición de ácidos grasos de la cepa *P. putida* MTB6

	Condiciones de cultivo				
	LB	LB+0.1%	LB+1%	LB+10%	M9+Tol(v) ^a
C14:0	3,4	2,5	0,4	0,8	3,0
C15:0	2,7	1,9	0,3	0,6	0,3
C16:1w9c	1,9	0,8	16,5	18,2	5,5
C16:1w9t	0,5	0,7	25,2	22,5	1,2
C16:0	40,4	44,0	34,4	33,7	48,1
C17:ciclo	38,1	40,4	2,6	3,1	36,6
C17:0	0,7	0,9	0,1	0,5	0,3
C18:1w11c	9,4	5,8	11,6	13,2	4,2
C18:1w11t	<0,1	1,0	8,2	6,1	<0,1
C18:0	0,7	0,5	0,6	0,8	0,5
C18:ciclo	2,2	1,4	<0,1	0,3	0,2
<i>Cis/Trans</i>	18,8	3,8	0,8	1,0	7,4
Sat/Insat	4,0	6	0,5	0,6	4,7

Las condiciones fueron las indicadas en la Tabla 12.

Tabla 14. Efecto de la presencia de tolueno sobre la composición de ácidos grasos en la cepa *P. putida* SMO116.

	Condiciones de cultivo		
	LB	LB+0.1 %	M9+Tol (v) ^a
C14:0	0,9	0,7	0,4
C15:0	0,5	0,6	0,1
C16:1w9c	0,7	0,7	18,2
C16:1w9t	0,3	1,1	10,9
C16:0	40,9	38,0	36,4
C17:ciclo	39,8	39,8	13,5
C17:0	0,6	0,7	0,1
C18:1w11c	11,3	12,8	16,4
C18:1w11t	0,6	1,0	2,7
C18:0	1,0	1,1	1,0
C18:ciclo	3,5	3,2	0,2
<i>Cis/Trans</i>	13,3	1	2,5
Sat/Insat	3,4	2,6	0,7

Las condiciones son las indicadas en la Tabla 12.

4.2 Análisis de la acumulación de ^{14}C -tolueno en las membranas celulares de las cepas MTB5, MTB6 y SMO116

Otro de los mecanismos de defensa que ya hemos referido anteriormente es la disminución de la concentración de disolventes en las membranas a través de un sistema activo de eflujo de tolueno al medio externo. Este hecho se está estudiando profundamente para la cepa DOT-T1 en nuestro grupo de investigación (Ramos *et al.*, 1998., Segura *et al.*, 1999, Junker y Ramos, 1999), por lo que poseíamos el material necesario para evaluar la acumulación de disolventes en la membrana de nuestras cepas y por tanto la existencia o no de un sistema activo de expulsión de disolventes fuera de la membrana.

Para ello células de MTB6, MTB5 y SMO116 se cultivaron en LB en agitación durante 12 horas y a 30°C. Pasado este tiempo se recogieron las células por centrifugación, se lavaron y se resuspendieron en medio LB donde se incubaron hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento. En este momento se añadió ^{14}C -tolueno a una concentración de 2 μCi para obtener una concentración final de 0,06% (v/v) de tolueno. Pasados 60 minutos de la adición de tolueno, 0,5 mL de la suspensión se filtró y se lavó con LB. Los filtros se secaron y se estimó el número de cpm/minuto utilizando un radiodetector Packard.

Los resultados se muestran en la Tabla 15. Se observó que las células de la cepa MTB6 acumularon menos tolueno que las de las otras dos cepas, lo que explica la mayor tolerancia al disolvente de la primera con respecto a las otras dos.

Tabla 15. Acumulación de ^{14}C -tolueno en las membranas de las cepas MTB5, MTB6 y SMO116.

Cepas	Acumulación de ^{14}C en las membranas/D.O ₆₆₀ nm
MTB5	875
MTB6	1054
SMO116	1248

Las condiciones son las descritas en el texto. Los valores vienen expresados como el número de cuentas por minuto (CPM)/ D.O₆₆₀

4.3 Análisis molecular mediante amplificación de la presencia de genes que codifican para los sistemas activos de eliminación de disolventes.

La cepa DOT-T1 degrada tolueno a través de la ruta TOD descrita para la cepa *P. putida* F1 (Mosqueda *et al.*, 1999). Existe en el cromosoma de esta cepa, aguas abajo del gen *todT*, una región que codifica para un gen (*ttgD* de "Toluene Tolerant Genes") que parece estar implicado en la estructura o funcionalidad de las bombas de extrusión de disolventes fuera de la membrana (Mosqueda *et al.*, 1999). Con objeto de evaluar la presencia de esta región en el cromosoma de las cepas bajo estudio se llevaron a cabo reacciones de amplificación con oligonucleótidos específicos denominados T3 y 125R y cuya secuencia se presenta en la Tabla 3 de la sección 9 del apartado de Materiales y Métodos. Los resultados se presentan en la Figura 23. Se observó la existencia en las tres cepas de un fragmento de aproximadamente 1900 bp. Este fragmento se secuenció parcialmente y se comparó a través de las bases de datos existentes en la red, obteniéndose un 68% de identidad con los genes *srp* descritos anteriormente (Isken y de Bont, 1996) y que están implicados en los sistemas activos de expulsión de disolventes fuera de las membranas.

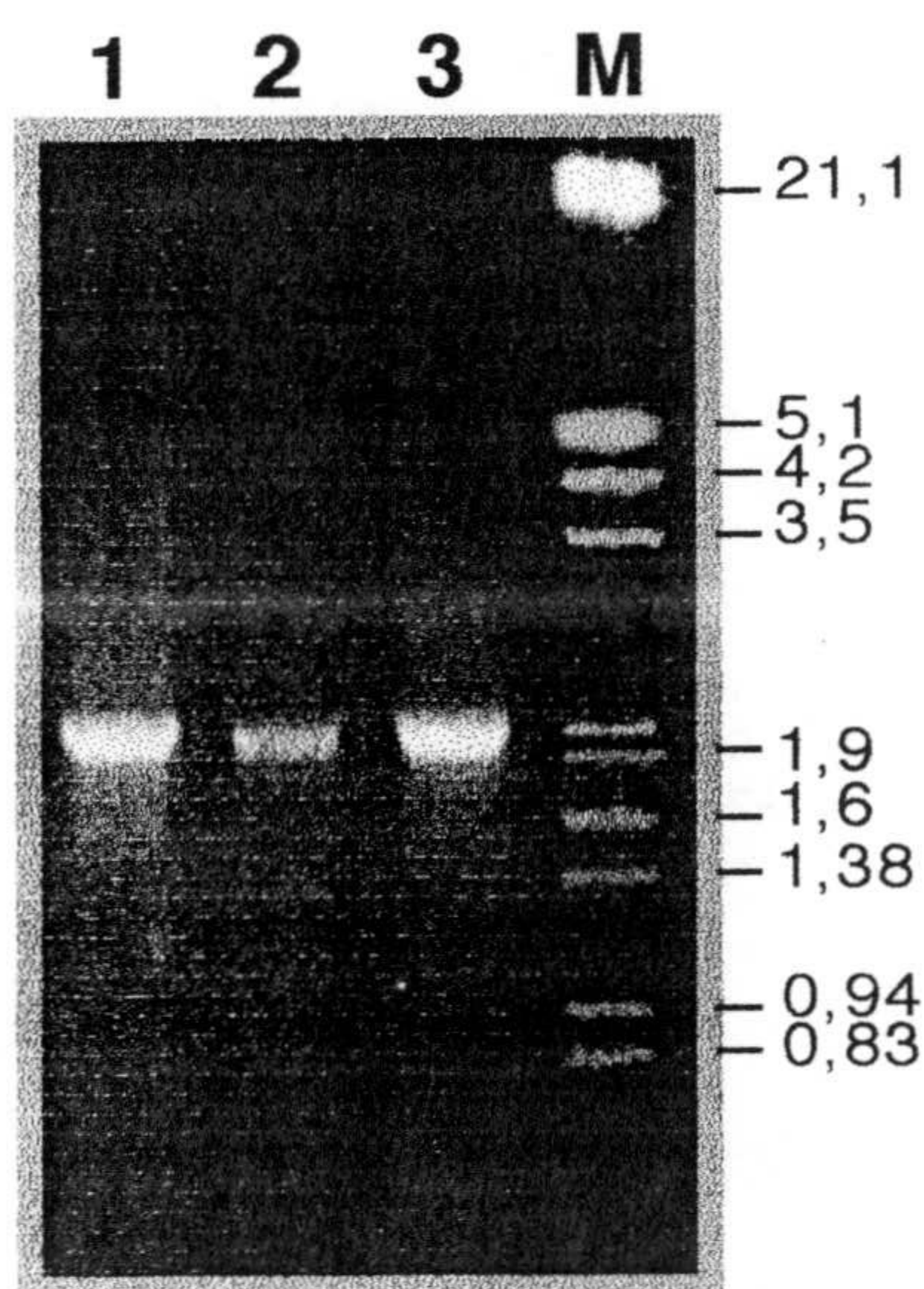


Figura 23. Producto de la PCR realizada con oligonucleótidos específicos para el gen *ttgD*. Calles 1,2 y 3 resultado de la PCR con ADN molde de MTB6, MTB5 y SMO116 con los oligonucleótidos T3 y 125R respectivamente. La calle M corresponde al ADN del fago λ digerido con *HindIII* y *EcoRI*.

5. DEGRADACIÓN DE TOLUENO POR PARTE DE LAS CEPAS *P. putida* MTB5, MTB6 Y SMO116

5.1 Oxidación de posibles intermediarios de distintas rutas de degradación de tolueno por las cepas MTB5, MTB6 y SMO116

Hasta ahora y como se describe en la sección de Introducción de esta Tesis Doctoral, se han descrito, al menos cinco rutas para degradación aeróbica de tolueno por parte de cepas pertenecientes al género *Pseudomonas*. Para conocer la ruta de degradación de tolueno que presentaron las cepas arriba indicadas, se llevaron a cabo en primer lugar ensayos fisiológicos con células de cada una de las cepas bajo estudio cultivadas en tolueno o glucosa y consistentes en determinar cuales eran los posibles intermediarios de las distintas rutas que eran oxidados por estas cepas.

Para las medidas de oxidación de posibles intermediarios se utilizó un electrodo de oxígeno con el que se determinó el consumo de este gas cuando se añadieron a la cámara de reacción distintos intermediarios metabólicos. La calibración del aparato y la medida del consumo de oxígeno por parte de suspensiones bacterianas se describen en el apartado 15 de Materiales y Métodos. En general, la utilización del electrodo de oxígeno nos aportó información acerca de los sustratos que provocan una disminución en la concentración de oxígeno provocada por la respiración bacteriana. Para estas determinaciones se estimó inicialmente el consumo provocado por la respiración endógena de la suspensión bacteriana durante 10 minutos, pasado este tiempo y mediante una microjeringa se añadieron los sustratos de estudio y se siguió el registro del consumo durante otros 10 minutos. En la Figura 24 se muestra un esquema a modo de ejemplo en donde se presenta el cambio de pendiente provocado por el aumento en el consumo de oxígeno en presencia de suspensiones bacterianas

5.1.1 Medida del consumo de oxígeno en células de la cepa MTB5

Células de la cepa MTB5 se cultivaron en medio mínimo con tolueno o con glucosa como fuente de carbono hasta alcanzar la fase exponencial. Pasado este tiempo se recogió un mL de células, se lavaron con tampón fosfato y se utilizaron para las medidas de consumo como se detalla en el apartado anterior. Los sustratos se disolvieron en dimetilformamida y se comprobó que no existía consumo de oxígeno en presencia de éste. Los datos se presentan en la Tabla 16. Se observó que la cepa MTB5 cultivada en presencia de tolueno presentó consumo de oxígeno en presencia de tolueno, etilbenceno,

catecol y 3-metilcatecol y que no hubo consumo en presencia de xilenos y cresoles probados. Tampoco oxidó alquilbenzoatos o alcoholes alquilbencílicos.

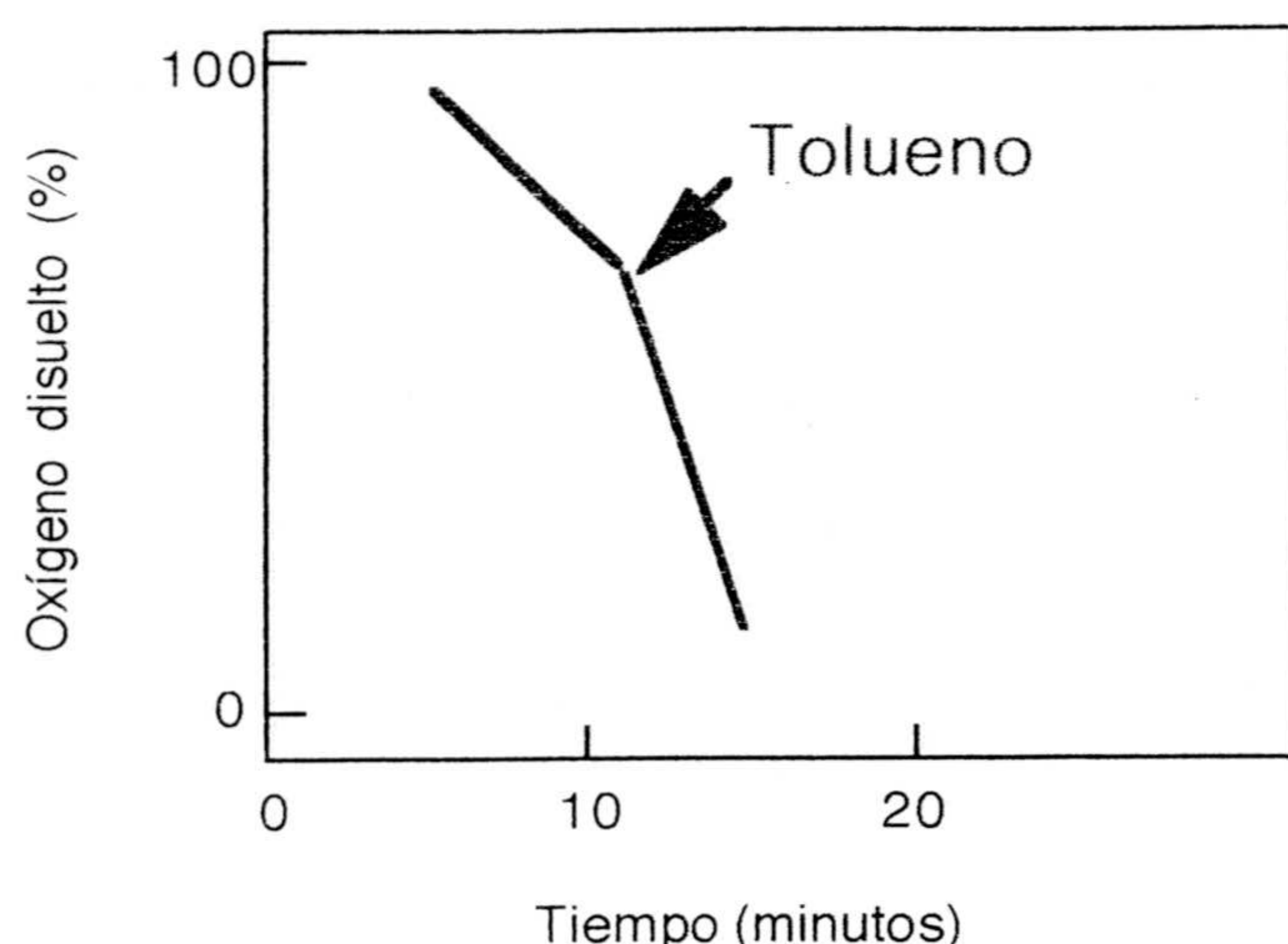


Figura 24. Esquema representativo del cambio en la concentración de oxígeno en la cámara de reacción del electrodo de oxígeno. Se muestra un esquema del cambio de pendiente de la curva de consumo de oxígeno provocado por la adición de tolueno a una mezcla de suspensión bacteriana.

Debido a que la cepa MTB5 presentó consumo de oxígeno en presencia de algunos posibles intermediarios de la ruta codificada por el plásmido TOL, se realizaron ensayos encaminados a evaluar la existencia de genes de esta ruta. Como primer acercamiento se pensó en la introducción en la cepa del plásmido pERD100 que porta una fusión $P_m::lacZ$ de tal forma que si en la cepa existía el gen *xylS* la producción de la proteína XylS estimularía la transcripción desde P_m y por tanto se expresaría la actividad β -galactosidasa. Con el fin de introducir el plásmido en la cepa se llevaron a cabo conjugaciones triparentales, seleccionándose las cepas portadoras del plásmido por presentar resistencia a tetraciclina ($20\mu\text{g/mL}$). Se seleccionaron 6 clones denominados MTB5 P1 a P6 que crecieron en placas de medio mínimo con tolueno como fuente de carbono suministrado en fase gaseosa y con tetraciclina. Para asegurarnos de la existencia del plásmido, que presenta un tamaño de unas 11 Kbp, se realizaron extracciones del plásmido de los clones seleccionados, por método "qiapreps". Se observó la presencia del plásmido en todos los clones (datos no presentados). Dos de los clones se seleccionaron y se utilizaron para ensayos posteriores.

Tabla 16. Consumo de oxígeno por células de MTB5 cultivadas en presencia de tolueno o glucosa como fuente de carbono.

Sustratos	Consumo de oxígeno %	
	Tolueno	Glucosa
Tolueno	100	10
Alcohol bencílico	44	10
<i>o</i> -cresol	0	0
<i>m</i> -cresol	0	0
<i>p</i> -cresol	0	0
<i>o</i> -xileno	0	0
<i>m</i> -xileno	0	0
<i>p</i> -xileno	0	0
Etilbenceno	71	0
Catecol	27	0
3-metilcatecol	42	0
Benzoato	14	12
Alcohol 3-metilbencílico	0	0
3-metilbenzoato	0	31

Células de MTB5 se cultivaron con tolueno o glucosa hasta alcanzar la fase exponencial. Pasado este tiempo se recogió un mL de células que se lavaron en tampón fosfato y se añadieron a la cámara de reacción del electrodo de oxígeno. En la tabla se presentan los intermediarios utilizados. Los valores de consumo de oxígeno vienen dados en %. El 100% equivale a 115 nmoles O₂/min/mg de peso seco.

Los clones P1 y P4 se cultivaron en medio mínimo con glucosa como fuente de carbono durante 12 horas. Pasado este tiempo las células se diluyeron 100 veces en el mismo medio en ausencia y presencia de tolueno, benzoato y alcohol bencílico a concentración 1-5 mM. Para la medida de la actividad enzimática se procedió como se describe en el apartado 12.3 de Materiales y Métodos. En la Figura 25 se observan los resultados obtenidos. Se observó la existencia de actividad enzimática únicamente en células cultivadas en presencia de benzoato. En presencia de 3-metilbenzoato, alcohol bencílico y tolueno no se observó actividad enzimática.

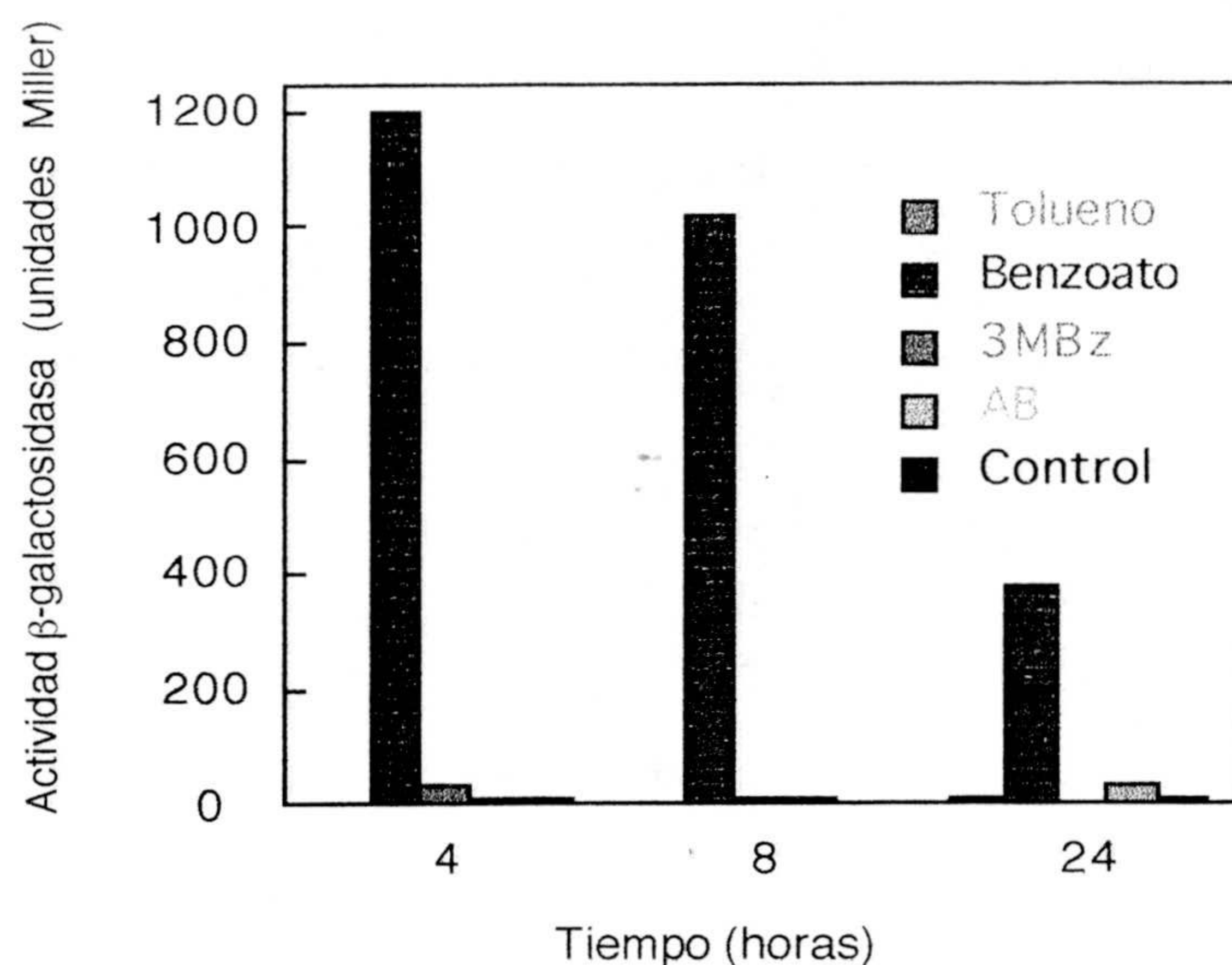


Figura 25. Actividad β -galactosidasa en células de MTB5-P1. Las condiciones de cultivo se detallan en el texto y la actividad β -galactosidasa se determinó a las 4, 8 y 24 horas de la adición del efector.

5.1.2 Medida del consumo de oxígeno en células de la cepa MTB6

Para la medida del consumo de oxígeno de la cepa MTB6 se procedió exactamente de la misma manera que en el caso anterior. Los resultados se muestran en la Tabla 17. Se observó que células cultivadas en presencia de tolueno presentaron consumo de oxígeno elevado en presencia de tolueno y etilbenceno. También oxidaron alcohol bencílico, benzoato, catecol y 3-metilcatecol. Se observó que células cultivadas en presencia de glucosa al no tener inducidos los genes de la ruta no oxidaron los compuestos anteriormente citados, sólo el benzoato se oxidó por células cultivadas en presencia o en ausencia de tolueno.

Debido a que esta cepa cultivada en tolueno oxidó alcohol bencílico se consideró ensayar el consumo de oxígeno dependiente de sustrato por células de MTB6 cultivadas con alcohol bencílico como fuente de carbono. Los resultados se presentan en la Tabla 17. Se observó que las células presentaron consumo de oxígeno en presencia de alcohol bencílico, tolueno, etilbenceno, benzoato y, al contrario que las cultivadas en presencia de tolueno, no presentaron consumo de oxígeno en presencia de 3-metilcatecol

Tabla 17. Consumo de oxígeno por células de MTB6 cultivadas en presencia de tolueno, alcohol bencílico o glucosa como fuente de carbono.

Sustratos	Consumo de oxígeno %		
	Tolueno ^a	Alcohol Bencílico ^b	Glucosa
Tolueno	100	64	0
Alcohol bencílico	57	100	0
<i>o</i> -cresol	0	0	0
<i>m</i> -cresol	28	0	0
<i>p</i> -cresol	0	0	0
<i>o</i> -xileno	0	32	0
<i>m</i> -xileno	0	0	0
<i>p</i> -xileno	0	0	0
Etilbenceno	75	32	0
Catecol	19	17	0
3-metilcatecol	24	0	0
Benzoato	36	32	28
3-metilbenzoato	0	0	0

Células de MTB6 se cultivaron con tolueno, glucosa o alcohol bencílico hasta alcanzar la fase exponencial. Pasado este tiempo se procedió como se describe en el pie de la Tabla 12. Los valores de consumo de oxígeno se expresan en %. a) El 100% equivale a 106 ± 1 nmoles O_2 /min/mg de peso seco, b) el 100% equivale a 46 ± 1 nmoles O_2 /min/mg de peso seco.

5.1.3 Medida del consumo de oxígeno en células de la cepa SMO116

Células de SMO116 se cultivaron con tolueno o glucosa como fuente de carbono y se determinó el consumo de oxígeno por parte de las células. Como se observa en la Tabla 18 el perfil de sustratos oxidados por la cepa cultivada en presencia de tolueno fue muy similar al de las otras dos cepas por lo que en términos generales parece ser que las tres cepas presentan la misma ruta para degradación de tolueno.

Tabla 18. Consumo de oxígeno por células de SMO116 cultivadas en presencia de tolueno o glucosa como fuente de carbono.

Sustratos	Consumo de oxígeno %	
	Tolueno	Control
Tolueno	100	0
Alcohol bencílico	63	0
<i>o</i> -cresol	0	0
<i>m</i> -cresol	0	0
<i>p</i> -cresol	0	0
<i>o</i> -xileno	0	0
<i>m</i> -xileno	0	0
<i>p</i> -xileno	0	0
Etilbenceno	90	0
Catecol	63	0
3-metilcatecol	63	0
Benzoato	32	100
Alcohol 3-metilbencílico	0	0
3-metilbenzoato	0	42

Las condiciones son las mismas que las descritas en la Tabla 12, excepto que el 100% equivale a 31,6 nmoles O₂/min/mg de peso seco.

5.2 Medida de actividades enzimáticas: catecol 2,3-dioxigenasa y catecol 1,2-dioxigenasa en extractos de células de MTB5, MTB6 y SMO116.

La enzima catecol 2,3-dioxigenasa es una de las enzimas catabólicas claves en degradación aeróbica de sustratos monoaromáticos, principalmente porque participa en la fisión del anillo aromático tras ser activado mediante la adición de grupos hidroxilo adyacentes. Esta enzima es común en cuatro de las cinco rutas de degradación de tolueno descritos hasta ahora, ya que estas rutas rinden como producto activado catecol o 3-metilcatecol. Únicamente en la ruta de la tolueno-4-monooxigenasa es donde no participa esta enzima ya que la oxidación del tolueno lleva a la formación de 3,4-dihidroxibenzoato que es sustrato de otra dioxigenasa. Como se han indicado en la sección de Introducción

de esta Tesis Doctoral, la rotura del anillo aromático se puede realizar en posición *orto* o *meta* interviniendo enzimas distintas para cada caso. Así la enzima catecol 2,3-dioxigenasa interviene en la fisión en *meta* del anillo aromático (Dagley y Gibson, 1965), mientras la enzima catecol 1,2-dioxigenasa interviene en la fisión *orto* (Ornston, 1966).

Debido a la ubicuidad de esta enzima se consideró determinar las actividades enzimáticas en extractos celulares de cada una de las cepas bajo estudio cuando se cultivaron en medio mínimo con glucosa, tolueno, alcohol bencílico y benzoato como fuente de carbono y energía y utilizando como sustrato del enzima catecol o 3-metilcatecol. La preparación de los extractos y la medida de las actividades enzimáticas se describen en el apartado 12.1 y 12.2 de la sección de Materiales y Métodos. Los resultados se presentan en la Tabla 19. Para comparar y dado que se presumía la existencia de una ruta de tipo TOD se utilizó la cepa *P. putida* F1 como control de los ensayos. Se observó que células de las tres cepas cultivadas en presencia de tolueno mostraron altos niveles de actividad catecol 2,3-dioxigenasa, mientras que fue indetectable en células cultivadas en glucosa. En general, cuando las células de las cepas bajo estudio se cultivaron en presencia de benzoato y alcohol bencílico la actividad enzimática fue menor que en células cultivadas en presencia de tolueno. Algo similar ocurre con la cepa F1.

Con respecto a la actividad catecol 1,2-dioxigenasa se encontró preferentemente en células de las tres cepas cultivadas en presencia de benzoato, observándose que existía algo de actividad en células cultivadas en presencia de tolueno (Tabla 20) mientras que se ha descrito la ausencia de esta actividad en células de F1 y la presencia en células de una cepa denominada NCIMB 11767 que presenta una ruta independiente para degradación de benzoato (Heald *et al.*, 1996).

Tabla 19. Actividades enzimáticas catecol 2,3-dioxigenasa en extractos celulares de las cepas MTB5, MTB6 y SMO116.

Actividad Específica (nmol/min mgr de peso seco) de enzima en células precultivadas en:					
Cepa		Tolueno	Alcohol Bencilico	Benzoato	Glucosa
<i>P. putida</i> MTB6	Catecol	164	10	9	5
	3-metilcatecol	181	27	61	21
<i>P. putida</i> MTB5	Catecol	146	48	12	3
	3-metilcatecol	153	50	22	14
<i>P. putida</i> SMO116	Catecol	53	31	3	1
	3-metilcatecol	120	69	58	16
<i>P. putida</i> F1	Catecol	131	13	4	2
	3-metilcatecol	139	21	46	13

Los extractos libres de células de las cepas bajo estudio se obtuvieron como se describió en el apartado 12.2 de la sección de Materiales y Métodos. La actividad catecol 2,3-dioxigenasa se determinó como el incremento de la D.O a 375nm y 385 nm utilizando como sustrato catecol y 3-metilcatecol respectivamente.

Tabla 20. Actividad catecol 1,2-dioxigenasa en extractos celulares de las cepas MTB5, MTB6 y SMO116

Cepas	Actividad específica (nmoles/min mgr de peso seco)	
	Tolueno	Benzoato
<i>P. putida</i> MTB6	30	364
<i>P. putida</i> MTB5	35	256
<i>P. putida</i> SMO116	20	113

Los extractos libres de células de las cepas bajo estudio se obtuvieron como se describió en el apartado 12.2 de la sección de Materiales y Métodos. La actividad catecol 1,2-dioxigenasa se determinó como el incremento de la D.O a 260 nm utilizando catecol como sustrato de la reacción.

5.3 Análisis de la presencia o ausencia de genes implicados en degradación de tolueno mediante amplificación con oligonucleótidos derivados de distintas rutas degradativas en las cepas MTB5, MTB6 y SMO116

Tras la observación de los resultados mediante consumo de oxígeno en presencia de determinados intermediarios de distintas rutas y de la medida de actividades enzimáticas, cerramos el cerco a la posible ruta degradativa utilizada por las tres cepas para la degradación de tolueno. Los resultados sugerían que las tres cepas degradaban tolueno a través de la dioxigenación del anillo, lo mismo que la cepa *P. putida* F1 (Gibson, 1970), aunque no permitieron descartar una ruta distinta para la degradación de alcohol bencílico. Para verificar estas hipótesis se diseñaron oligonucleótidos específicos para las primeras enzimas que participan en el ataque al anillo en todas las rutas descritas hasta ahora. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados se presentan en la Tabla 3 del apartado 9 de la sección de Materiales y Métodos. Se comprobó que ADN total aislado de las cepas MTB5, MTB6 y SMO116 amplificó con los cebadores C1A- C1B y C2A-C2B diseñados a partir de la secuencia cuyo producto son los genes *todC1* y *todC2* que codifican junto con los genes *todA* y *todB* para la enzima tolueno-dioxigenasa. En la Figura 26 se muestran los resultados obtenidos. Observándose que las tres cepas amplificaron en estas

condiciones rindiendo fragmentos de 1352 pb y de 563 pb para para *todC1* y *todC2*, respectivamente.

No se encontró amplificación con oligonucleótidos diseñados para genes que codifican para enzimas de otras rutas tales como *tmoA* que codifica para la tolueno-4-monooxigenasa, *tbuA1* que codifica para una subunidad de la enzima tolueno-3-monooxigenasa, *tmbB* que codifica para la subunidad α de la enzima tolueno-2-monooxigenasa y *xylMA* que codifica para la monooxigenasa codificada por el plásmido TOL (datos no presentados).

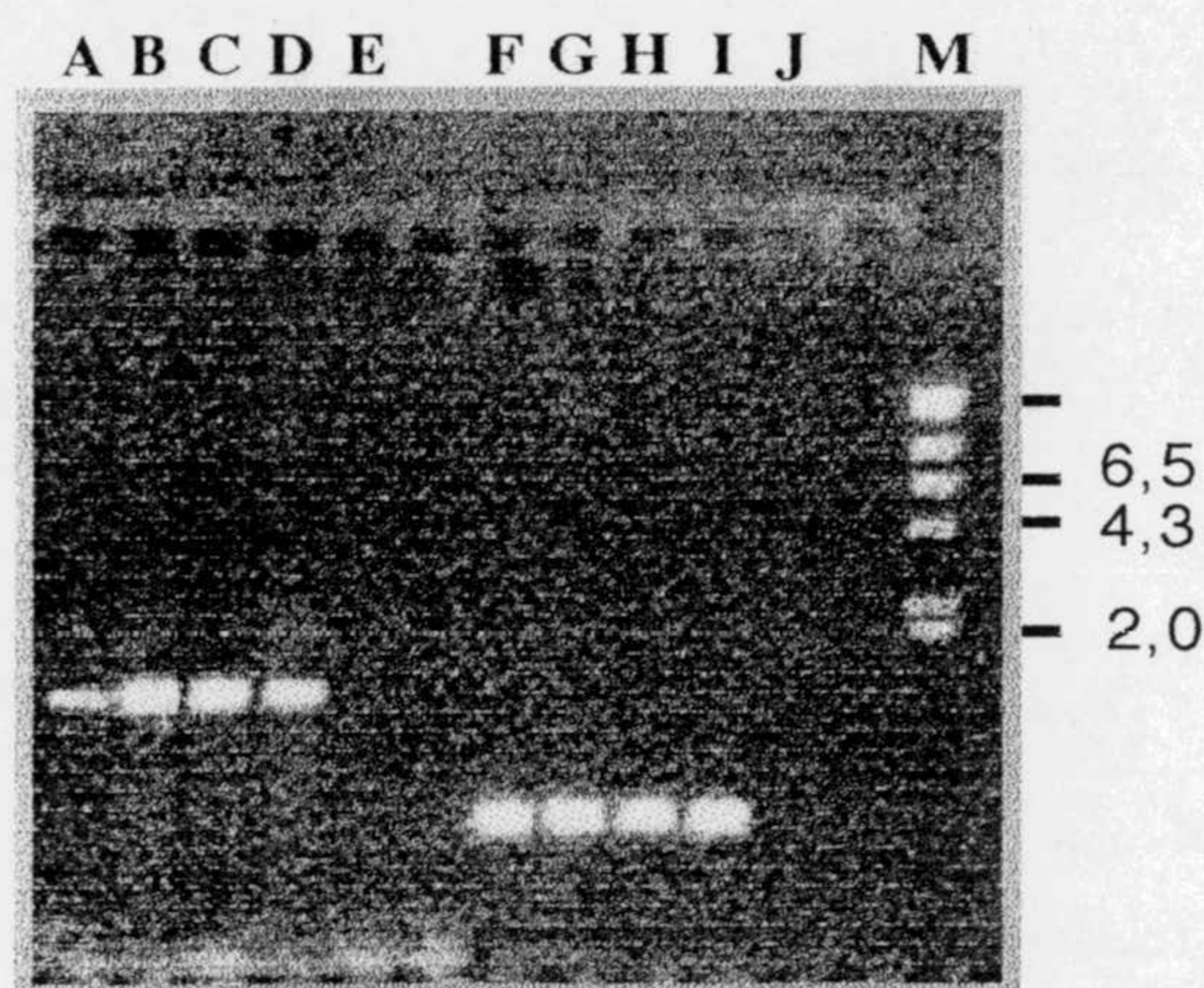


Figura 26 Producto de la PCR con los oligonucleótidos C1A-C1B y C2A-C2B. Calles A, B, C, D, E, producto de PCR obtenido utilizando C1A y C1B como cebadores y Calles F, G, H, I y J resultado de la PCR con los oligonucleótidos C2A y B, utilizando ADN genómico de MTB5 (Calles B y G), MTB6 (Calles A y F), SMO116 (Calles C y H), F1 (Calles D e I) y EEZ15 (Calles E y J) La calle M corresponde al ADN del fago λ digerido con *HindIII*.

Hasta ahora los genes de degradación de tolueno a través de la dioxigenación inicial del anillo han sido clonados y secuenciados. Se conocen que forman un operon de unas 9,3 kb en el siguiente orden *todFC1C2BADEGIH* (Zylstra y Gibson, 1989., Menn *et al.*, 1991, Lau *et al.*, 1994, Mosqueda y Ramos, 1999) Para verificar que nuestras cepas poseían los genes necesarios para la degradación de tolueno a través de esta ruta, se diseñaron oligonucleótidos para cada uno de los genes y se llevaron a cabo reacciones de amplificación. En la Figura 27 se muestran la localización de los oligonucleótidos diseñados y localizados en el operon TOD.

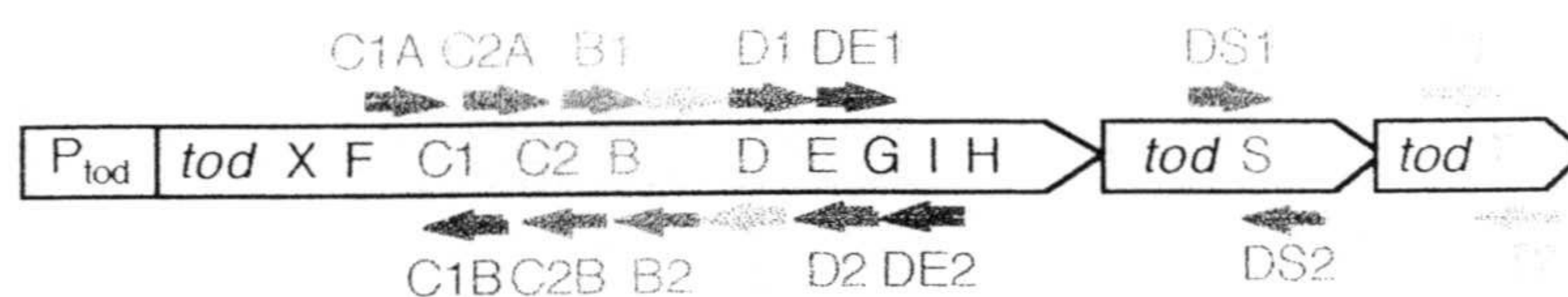


Figura 27. Esquema del operón de la ruta TOD para degradación de tolueno. Se localizan en el operón los distintos cebadores diseñados para las reacciones de amplificación.

Todas las reacciones de amplificación dieron resultado positivo con todos los cebadores diseñados. En la Figura 28 se muestra la amplificación positiva con oligonucleótidos que amplificaron en la zona del gen *todE* que codifica para la enzima 3-metilcatecol 2,3-dioxigenasa.

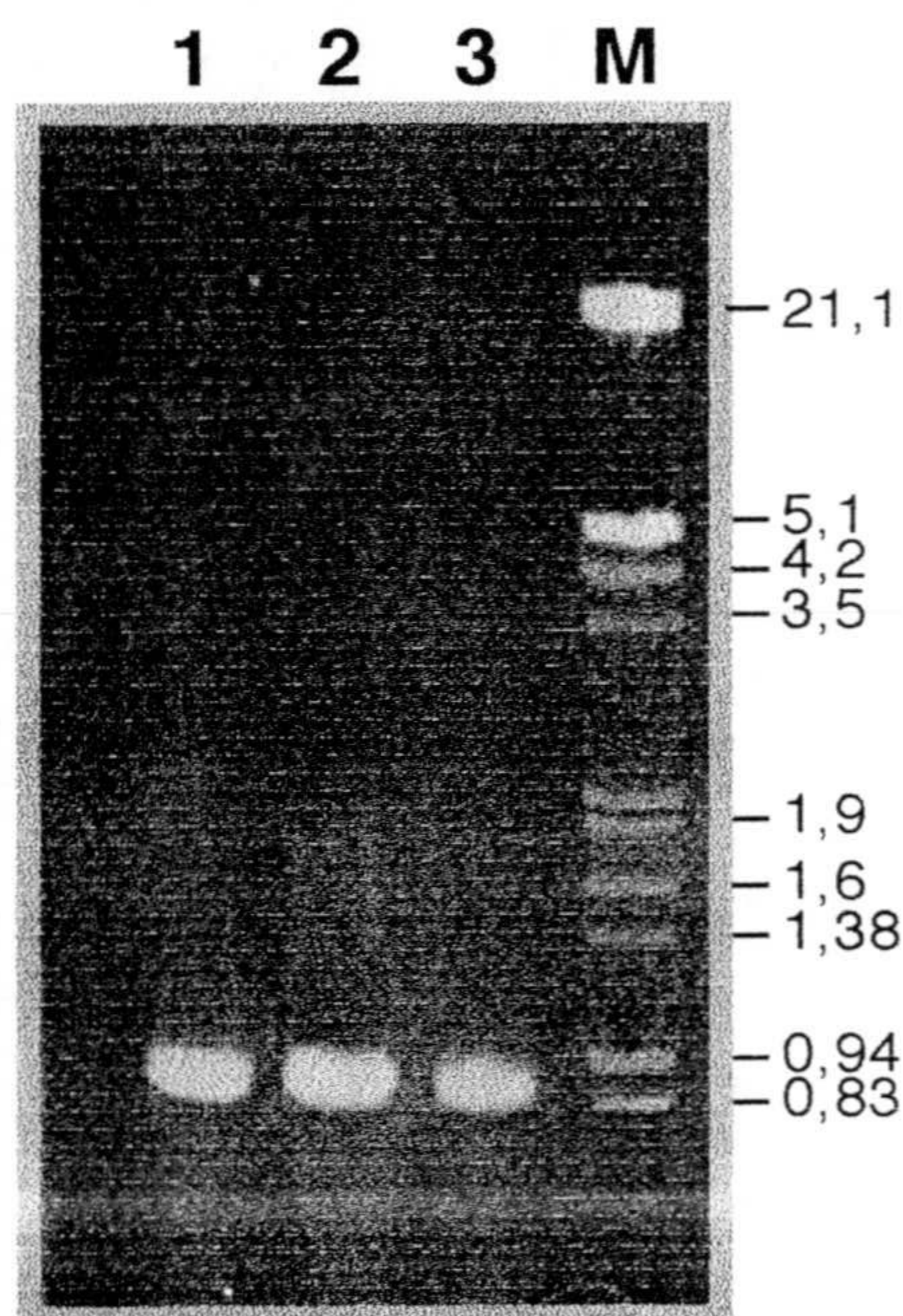


Figura 28. Producto de PCR obtenido con oligonucleótidos DE1 y DE2. Las calles 1, 2 y 3 son el resultado de la amplificación con los oligonucleótidos DE1 y DE2 usando ADN genómico de las cepas MTB5, MTB6 y SMO116. La calle M corresponde al ADN del fago λ digerido con *Hind*III y *Eco*RI.

Para verificar la existencia de estos genes se llevaron a cabo hibridaciones en *Southern* con sondas derivadas de los genes que forman parte de la ruta TOD. Así, ADN cromosómico de las cepas MTB5, MTB6, SMO116 y de las cepas de *P. putida* F1 y EEZ15, como controles positivo y negativo respectivamente, se digirió con el enzima de restricción *Eco*RI. Los fragmentos resultantes se transfirieron a una membrana de nylon, que fue hibridada en *Southern* frente a sondas de los genes *todE*, *todC1*, *todC2* y *todD*. Las sondas se obtuvieron por PCR utilizando ADN genómico de la cepa F1 (ver la

sección 9.2 de Materiales y Métodos). En la Figura 29 se muestran los resultados obtenidos cuando se usó una sonda basada en *todE*. Los resultados mostraron que las tres cepas contenían una copia de estos genes en su cromosoma. Aunque los resultados no se presentan, el ADN genómico de las tres cepas bajo estudio hibridó con las sondas utilizadas para regiones distintas del operon TOD.

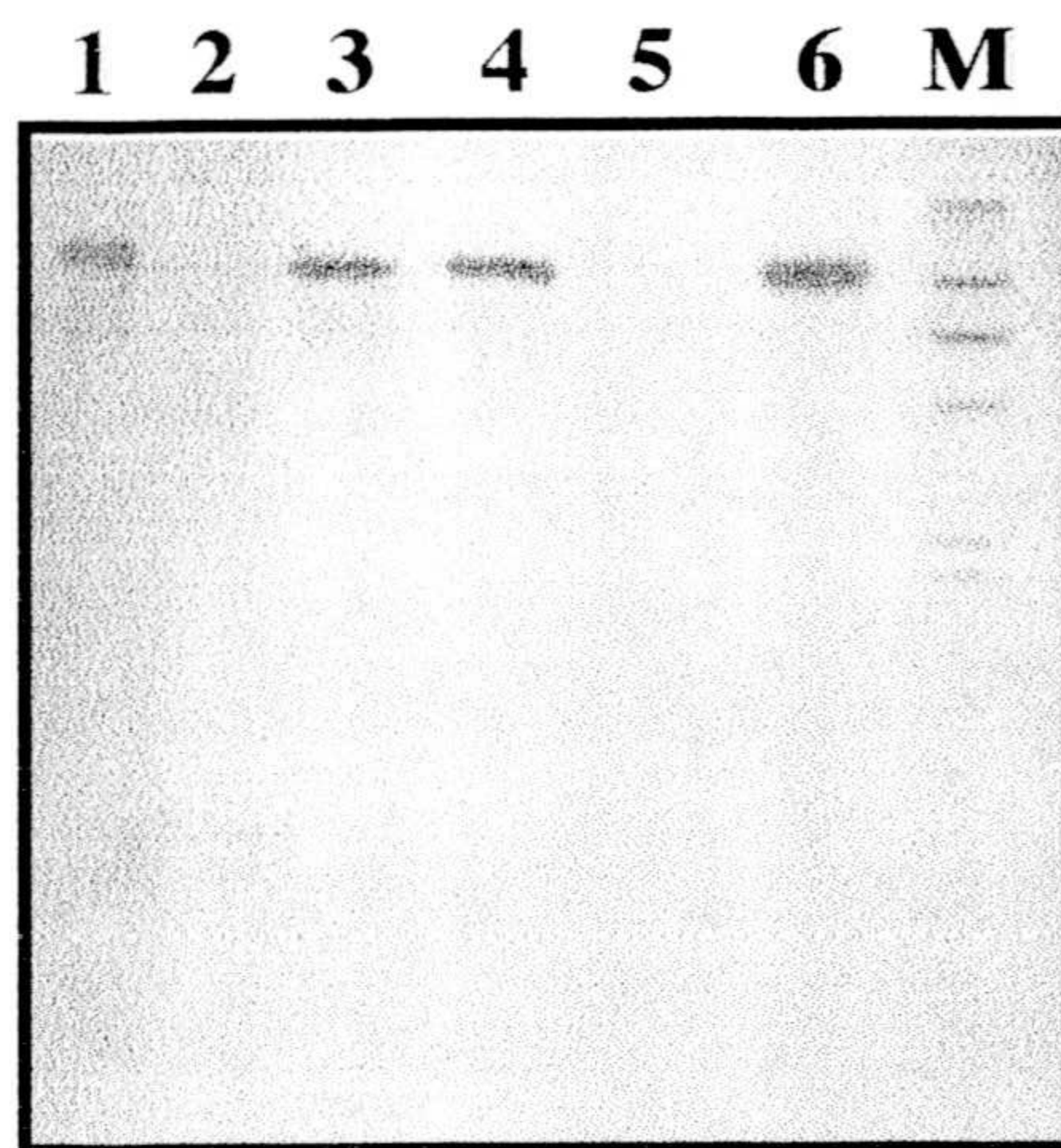


Figura 29. Hibridación en Southern con sondas de los genes *todE*. Hibridación de ADN genómico digerido con *EcoRI* de las cepas MTB6 (calle 1), plásmido de la cepa MTB6 (calle 2), MTB5 (calle3), SMO116 (calle 4), EEZ15 (calle 5) y F1 (calle 6). La calle M corresponde al marcador de peso molecular del ADN del fago λ digerido con *HindIII* y marcado con digoxigenina.

También se hibridó ADN total digerido con *EcoRI* con sondas marcadas con digoxigenina que llevaban genes de degradación de tolueno de la ruta TOL. Las sondas que portaban estos genes se obtuvieron tras la digestión con enzimas específicos y marcaje posterior con digoxigenina (Ver sección 9.2 de Materiales y Métodos) Se comprobó la inexistencia de hibridación con sondas de *xylR*, *xylS*, *xylX*, *xylE* y *xylAB*. Las hibridaciones se realizaron en condiciones estrictas y relajadas. En la Figura 30 se muestra una membrana de hibridación con la sonda que porta los genes *xylAB* y donde se observó la aparición de una única banda de hibridación que correspondió al control positivo.

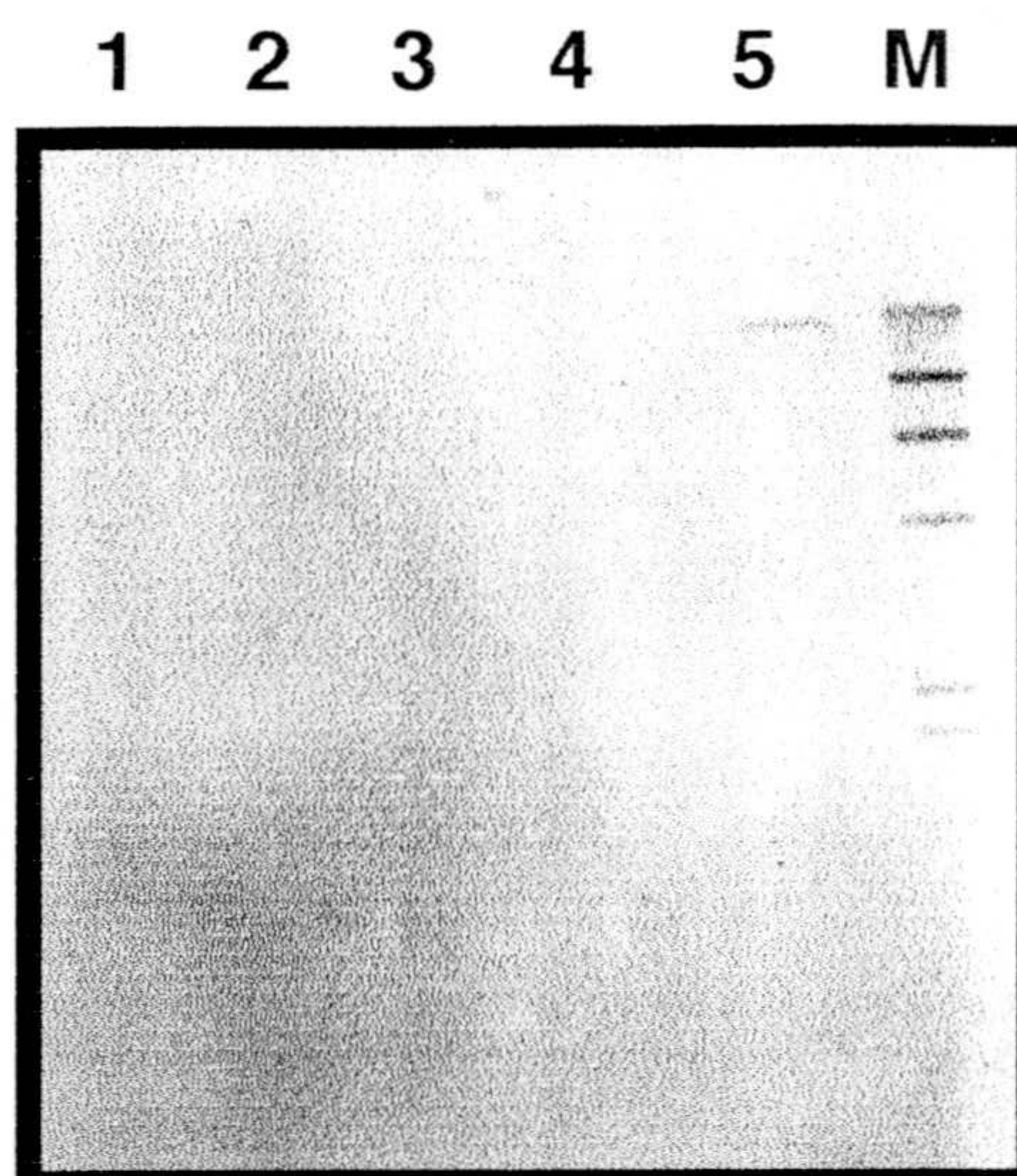


Figura 30. Hibridación del ADN de MTB5, MTB6 y SMO116 digerido con *EcoRI* con sondas que llevan los genes *xylAB* del plásmido TOL pWW0. ADN genómico de MTB5 (calle 1), MTB6 (2), SMO116 (3), F1(4) y EEZ15 (5) se digirió con *EcoRI* y se transfirió a una membrana de nylon que se hibridó en Southern frente a sondas que portaban el gen *xylAB*. Como marcador(M) se empleó ADN del fago λ digerido con *HindIII* y marcado con digoxigenina.

Así y una vez observada la existencia de genes que codifican para enzimas implicadas en la degradación de tolueno a través de la ruta TOD, se pensó en la secuenciación de alguno de los productos obtenidos por PCR con el fin de evaluar la existencia de posibles diferencias. Se eligió el producto de amplificación resultante de la PCR llevada a cabo con los cebadores DE1 y DE2 (ver Figura 28) que rindió un fragmento de unas 800 bp para cada una de las cepas bajo estudio. Éste se aisló y se secuenció. Se comprobó, tras la secuenciación y la comparación con las bases de datos existentes en la red, que el fragmento amplificado con los oligonucleótidos DE1 y DE2 correspondía al gen que codifica para la 3-metilcatecol 2,3-dioxigenasa, *todE*. Cuando se hicieron alineamientos de proteínas correspondientes a la secuencia se comprobó que la zona secuenciada en estas cepas presentó entre un 95% y un 98% de identidad con la proteína codificada por el *todE* descrito para la cepa F1 (datos no mostrados).



III. SUPERVIVENCIA EN SUELOS DE CEPAS DEL GÉNERO

Pseudomonas DEGRADADORAS DE TOLUENO

En los capítulos anteriores se ha descrito el aislamiento y la caracterización fisiológica de cepas de *Pseudomonas* tolerantes a tolueno. En este capítulo se abordó el estudio del comportamiento de las mismas en suelo en ausencia y presencia de disolventes orgánicos. Las cepas aisladas en Granada (*P. putida* EEZ15R, DOT-T1E, MTB5R y MTB6R) y otras suministradas por otros grupos de investigación (*P. putida* F1R, SMO116R y *P. mendocina* KR1R) una vez marcadas con el marcador de resistencia a rifampicina, se introdujeron en suelos y se encontró que todas, excepto *P. mendocina* KR1R, se establecieron y se multiplicaron en éstos en ausencia de disolventes orgánicos. Cuando las cepas se inocularon en suelos contaminados con disolventes orgánicos se observó un descenso del número de células viables por debajo de nuestros límites de detección, en el caso de *P. putida* EEZ15R y SMO116R al entrar en contacto con 1% (v/p) de tolueno; mientras que MTB5R sobrevivió en presencia de esta concentración. Por el contrario solamente las cepas DOT-T1E, MTB6R y F1R sobrevivieron en suelos en presencia de 10% (v/p) de tolueno.

Se analizaron los factores que afectaron a la supervivencia y multiplicación de las cepas en suelo y se comprobó que la temperatura y la humedad ejercían un papel importante en la multiplicación de las mismas. En todos los casos se comprobó que la microbiota indígena no se afectó por la presencia de disolventes orgánicos, ni por cambios en la temperatura de incubación o la humedad.

Asimismo, se determinó la mineralización de ^{14}C -tolueno en el suelo por parte de DOT-T1E y MTB6R, comprobándose que ambas mineralizaron tolueno y que la microbiota indígena también presentaba actividad metabólica contra este aromático en suelo. Una vez evaluada la supervivencia en suelo en presencia de tolueno se analizó el comportamiento de *P. putida* DOT-T1E, F1R, MTB5R, MTB6R y SMO116R en suelos en presencia de mezclas heterogéneas de hidrocarburos aromáticos como gasolina y gasóleo, observándose que sobrevivieron y se multiplicaron en suelos en presencia del 10% (v/p) de estas mezclas.

Finalmente se describen una serie de experiencias con *P. putida* DOT-T1E en columnas de suelo contaminadas, donde se evaluó la supervivencia y distribución vertical de la cepa a lo largo de un perfil de suelo.

1. SUPERVIVENCIA DE CEPAS DEGRADADORAS DE TOLUENO EN MICROCOSMOS EDÁFICOS

Como se ha referido en la sección de Introducción de esta Tesis Doctoral, un factor crítico en la degradación de hidrocarburos aromáticos, en zonas contaminadas con grandes cantidades de disolventes, es la tolerancia a estos compuestos. Por esto las cepas tolerantes a elevadas concentraciones de estos disolventes orgánicos se consideran que podrían ejercer un papel relevante en biorremediación *in situ*.

Dos de las cepas caracterizadas en los capítulos anteriores, *P. putida* DOT-T1 y MTB6, presentaron resistencia a concentraciones de hasta el 10% (v/v) de tolueno en el medio de cultivo. Debido a que el suelo es un sistema heterogeneo en el que hay diferentes factores que afectan a la supervivencia de las cepas introducidas se pensó en la inoculación en suelos, en ausencia y en presencia de disolventes orgánicos, de todas las cepas caracterizadas anteriormente por ser degradadoras de tolueno, con el objeto de evaluar la supervivencia y multiplicación de las mismas. Para el estudio de la supervivencia en suelo se utilizaron microcosmos edáficos que se caracterizan por ser un sistema controlado que nos permite simular condiciones naturales.

1.1 Elección de marcadores para las cepas a inocular en suelo. Estudio de las resistencias naturales a antibióticos que presenta la microbiota del suelo

Uno de los factores a tener en cuenta antes de la introducción de las cepas bajo estudio en suelo, es el marcaje de las mismas con marcadores antibióticos, para facilitar su posterior seguimiento y recuperación del suelo. Debido a que en todos los ensayos realizados se usó suelo no estéril y con objeto de conocer cual era el/os marcador/es ideal/es para el marcaje de nuestras cepas, se determinó el perfil de resistencias que presentaba la microbiota del suelo.

Para llevar a cabo estos ensayos se tomaron muestras de 10 g de suelo del jardín de la Estación Experimental del Zaidín -que fue el suelo utilizado en estos estudios- que se suspendieron en 1xM9 y se agitaron durante 30 minutos. Pasado este tiempo se hicieron diluciones seriadas y se sembraron en medio sólido LB suplementado con los correspondientes antibióticos a distintas concentraciones ($\mu\text{g/mL}$). Se observó que la microbiota del suelo presentó resistencia natural a: tetraciclina (10-20), estreptomycin (25-50), ácido nalidíxico (10-20), y ampicilina (100) y sensibilidad frente a rifampicina (10-20), cloranfenicol (30) y kanamicina (25-50).

Se comprobó que entre la microbiota del suelo se encontraban microorganismos que utilizaron como fuente de carbono glucosa, glicerol, succinato, *p*-hidroxifenilacético, tolueno y benzoato. Debido a la existencia en este tipo de suelo de bacterias degradadoras de tolueno, se procedió a examinar la resistencia a distintos antibióticos de esta subpoblación. Se observó que aparecieron colonias en presencia de ampicilina (100) y ácido nalidíxico (20) y en presencia de los dos antibióticos; en contraste no se encontraron colonias en medio mínimo con tolueno y rifampicina (20), cloranfenicol (30) y kanamicina (50). En base al perfil de resistencias a antibióticos que presentó la microbiota del suelo se consideró el marcaje con rifampicina, por lo que se generaron mutantes espontáneos resistentes a este antibiótico de todas las cepas a introducir en microcosmos. Las cepas marcadas con esta resistencia se denominaron: DOT-T1E, EEZ15R, F1R, KR1R, MTB6R, MTB5R SMO116R.

1.2 Supervivencia en microcosmos edáficos de *P. putida* DOT-T1E, EEZ15R, F1R, MTB6R, MTB5R, SMO116R y *P. mendocina* KR1R.

Una vez marcadas las cepas bajo estudio con resistencia a rifampicina, se llevaron a cabo estudios encaminados a evaluar la supervivencia y multiplicación de las mismas en suelo. Salvo que se especifique lo contrario, todos los experimentos que se detallan en este capítulo se llevaron a cabo en suelo tomado del jardín de la Estación Experimental del Zaidín, cuyas características se recogieron en la sección 16 del apartado de Materiales y Métodos. La preparación de los inóculos y la toma de muestras se realizó como se describió en la sección 16.1 del apartado de Materiales y Métodos.

1.2.1 Supervivencia en microcosmos edáficos en ausencia de disolventes orgánicos.

Microcosmos que contenían 90 g de suelo se inocularon con células de *P. putida* DOT-T1E, EEZ15R, F1R, MTB5R, MTB6R, SMO116R y *P. mendocina* KR1R para alcanzar una densidad celular inicial de 10^7 UFC/g de suelo. Periódicamente se tomaron muestras durante dos meses. Los resultados se presentan en la Figura 31. Se observó que todas las cepas se establecieron en suelos no estériles, excepto *P. mendocina* KR1R que pasados 15 días de la introducción presentó un número de células por debajo de nuestro límite de detección ($< 10^2$ UFC/g de suelo), y tras 30 días del inicio de la inoculación no se encontraron células viables de esta cepa en suelo (datos no mostrados).

El resto de las cepas se establecieron en este tipo de suelo alcanzando densidades celulares de hasta 10^8 UFC/g de suelo a los 60 días de la inoculación. Tras esta

experiencia inicial se descartó la cepa *P. mendocina* KR1R debido a su limitada viabilidad en suelo.

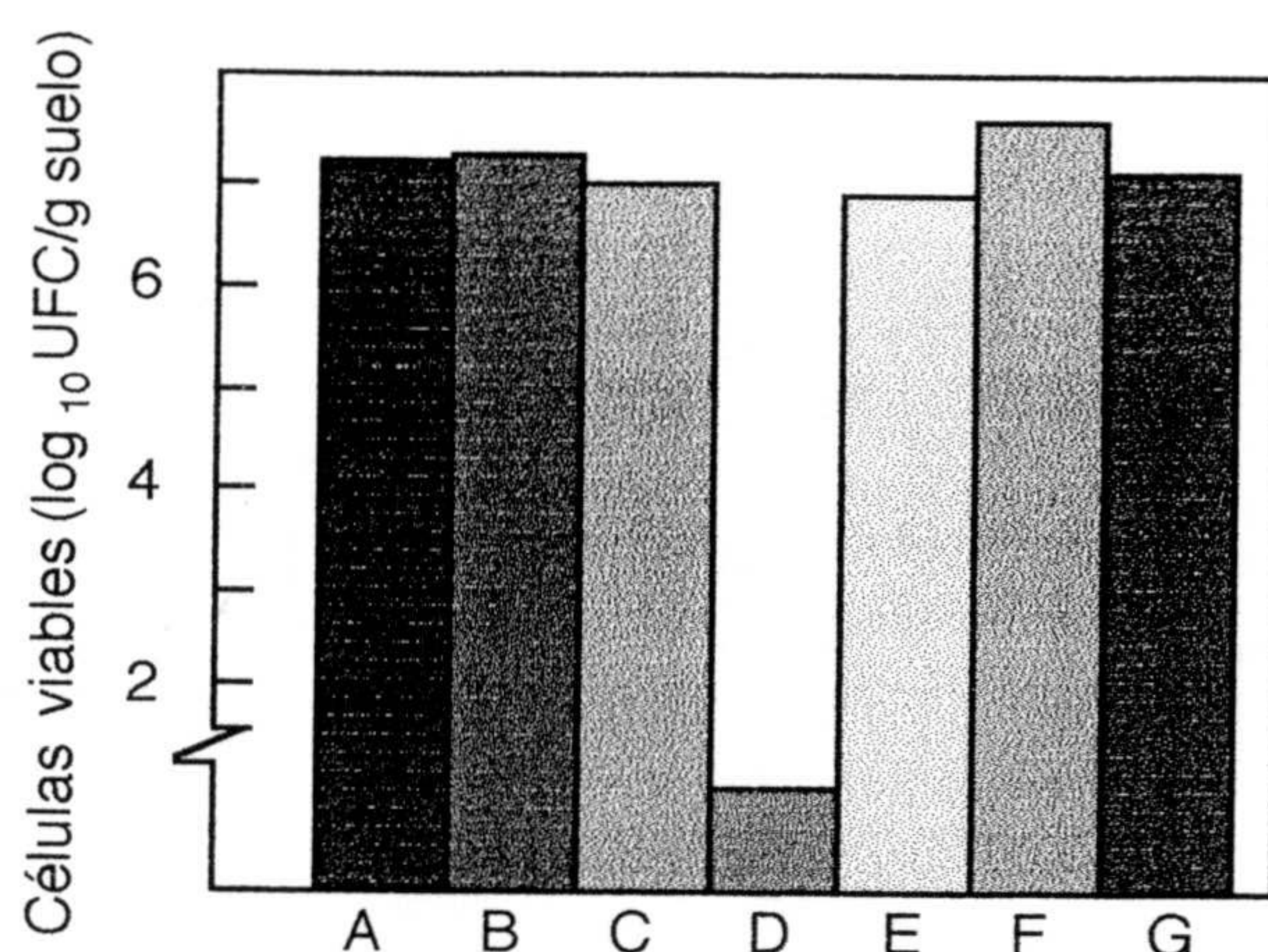


Figura 31. Supervivencia de las cepas de estudio tras la introducción en suelos en ausencia de disolventes orgánicos. Alrededor de 10^7 UFC/g de suelo de cada una de las cepas se inocularon en microcosmos edáficos no estériles. En la Figura se muestra el número de células viables de cada cepa por gramo de suelo presente a los 15 días de su introducción. *P. putida* DOT-T1E (A), *P. putida* F1R (B), *P. putida* EEZ15R (C), *P. mendocina* KR1R (D), *P. putida* MTB6R (E), *P. putida* MTB5R (F) y *P. putida* SMO116R (G).

1.2.2 Supervivencia de cepas de *P. putida* en microcosmos edáficos en presencia de concentraciones crecientes de tolueno.

Se diseñaron una serie de experimentos encaminados a evaluar la supervivencia de las cepas bajo estudio en microcosmos en presencia de tolueno. Se consideró de interés evaluar la supervivencia de las mismas, independientemente del grado de tolerancia al hidrocarburo aromático en medio líquido. Para ello, se inocularon microcosmos edáficos con las distintas cepas de *P. putida* a una densidad celular de 10^7 UFC/g de suelo y en presencia de concentraciones crecientes de tolueno (v/p): 0; 0,1%; 1% y 10%. Los resultados se muestran en la Tabla 21. Se observó que la adición de 0,1% (v/p) de tolueno no ejerció efecto alguno sobre la supervivencia de las cepas bajo estudio. Sin embargo, la presencia de 1% (v/p) de tolueno llevó a la pérdida de viabilidad de *P. putida* EEZ15R y SMO116R, cuyo número de células viables por gramo de suelo, descendió más de 6 ordenes de magnitud respecto al número inicial (Tabla 21), y tras 20 días de incubación no se recuperaron bacterias de estos suelos (datos no mostrados). El resto de las cepas

(DOT-T1E, F1R, MTB5R y MTB6R) sobrevivieron en presencia de 1% (v/p) de tolueno y mostraron un comportamiento característico (ver la Figura 32 para DOT-T1E) ya que se observó un descenso inicial en el número de células viables hasta densidades de 10^3 UFC/g de suelo, aunque pasados unos días, comenzó a multiplicarse hasta alcanzar a los 30 días un número de células de alrededor de 10^6 UFC/g de suelo.

Tabla 21. Supervivencia de las cepas de estudio en microcosmos en presencia de concentraciones crecientes de tolueno

Cepa	[Tolueno] % (v/p)		
	0,1 %	1 %	10 %
<i>P. putida</i> DOT-T1E	10^7	10^5-10^6	10^5
<i>P. putida</i> F1R	10^7	10^5-10^6	10^3
<i>P. putida</i> EEZ15R	10^7	$<10^2$	0
<i>P. putida</i> MTB5R	10^7	10^5	0
<i>P. putida</i> MTB6R	10^7	10^5	10^4
<i>P. putida</i> SMO116R	10^7	10^2	0

Alrededor de 10^7 UFC/g de suelo de células de cada una de las cepas bajo estudio, se inocularon en microcosmos edáficos con concentraciones crecientes de tolueno. El número de células viables se estimó mediante conteo en placas de medio mínimo con tolueno como fuente de carbono y con rifampicina. Los valores de la Tabla corresponden al número de células viables tras 15 días de incubación.

Cuando las células se incubaron en suelo en presencia de 10% (v/p) de tolueno, se observó a lo largo del tiempo una pérdida de viabilidad de la cepa MTB5R, mientras que DOT-T1E, F1R y MTB6R se multiplicaron alcanzando densidades celulares de 10^5 , 10^3 y 10^4 respectivamente tras 15 días de incubación. En los tres casos se observó un descenso en el número de células con respecto al inicial que fue mayor cuanto mayor fue la concentración inicial del disolvente. En la figura 32 se puede observar este comportamiento para la cepa DOT-T1E.

En base a estos resultados se consideró que las cepas *P. putida* DOT-T1E, F1R y MTB6R fueron capaces de sobrevivir y multiplicarse en suelo en presencia de altas concentraciones de disolventes orgánicos.

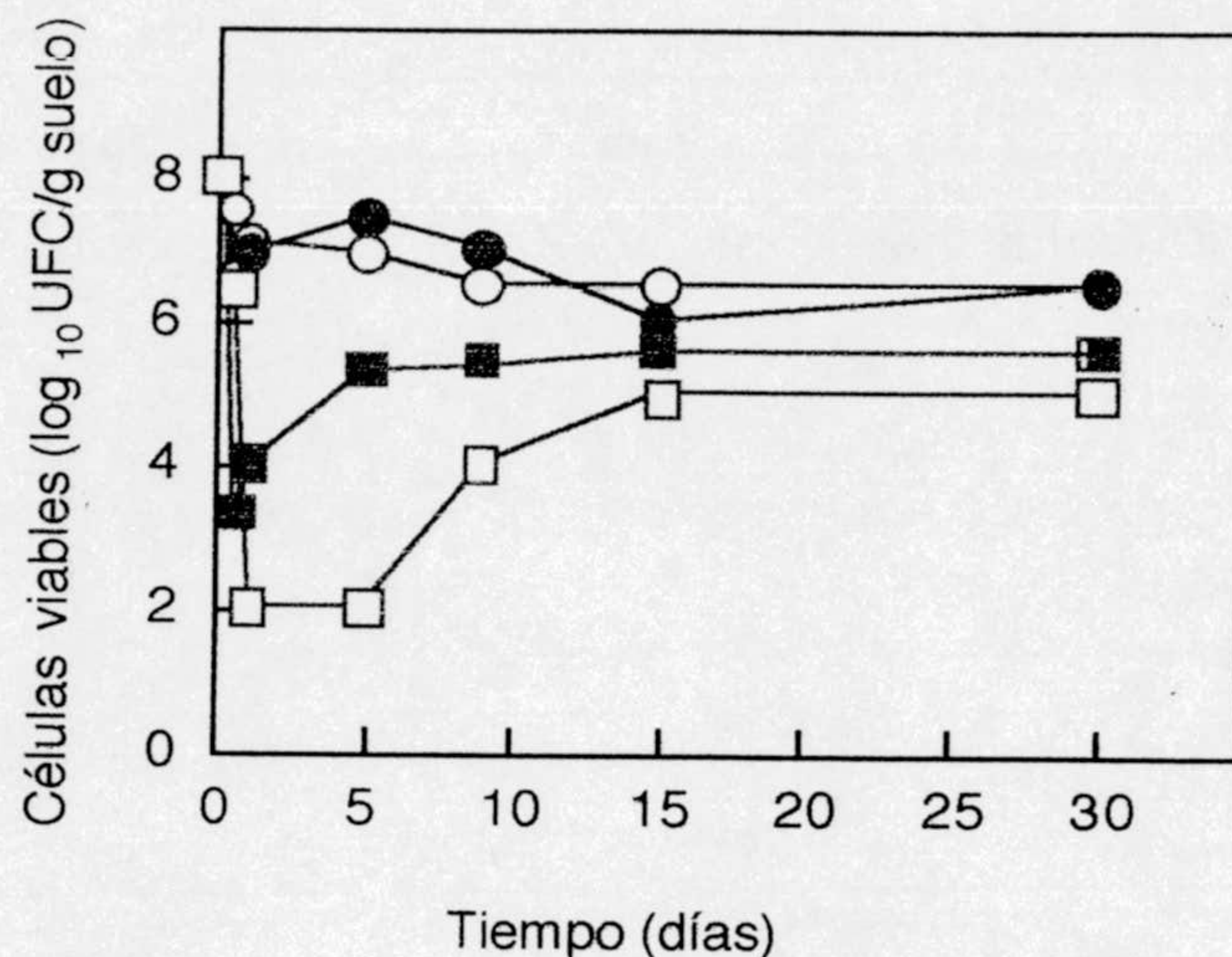


Figura 32. Supervivencia de *P. putida* DOT-T1E en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de tolueno en microcosmos edáficos. Alrededor de 10^8 UFC/ g de suelo se inocularon en microcosmos edáficos en ausencia (○) y presencia de concentraciones crecientes de tolueno 0,1% (●); 1% (■) y 10% (□). Periódicamente se tomaron muestras, se realizaron diluciones seriadas y se sembraron en medio mínimo M9 con tolueno como fuente de carbono y con rifampicina.

1.2.2.1 Supervivencia en el tiempo de DOT-T1E tras choque con tolueno.

El comportamiento de las cepas capaces de sobrevivir en presencia de concentraciones elevadas de tolueno fue muy similar, con una fase inicial de descenso en el número de células viables y una multiplicación posterior de las cepas. Con objeto de investigar este descenso inicial en el número de células cuando se incubaron las cepas en suelo en presencia de 10% (v/p) de tolueno, se llevaron a cabo conteos del número de UFC/g de suelo de la cepa DOT-T1E en suelo durante una semana. La toma de muestras se realizó principalmente en las primeras 90 horas, con el fin de evaluar el número de células viables presentes justo después de la adición de tolueno y anterior al inicio de la multiplicación.

Los resultados se presentan en la Figura 33. Se observó que la cepa DOT-T1E sufrió un descenso en el número de células de alrededor de 5 ordenes de magnitud tras 2 horas de la inoculación en presencia de concentraciones elevadas de tolueno. El número de células entonces permaneció constante hasta pasados 4 días de su introducción en microcosmos. Tras este tiempo se observó que las células comenzaron a multiplicarse alcanzándose densidades celulares de 10^4 UFC/g de suelo a los 7 días de la inoculación.

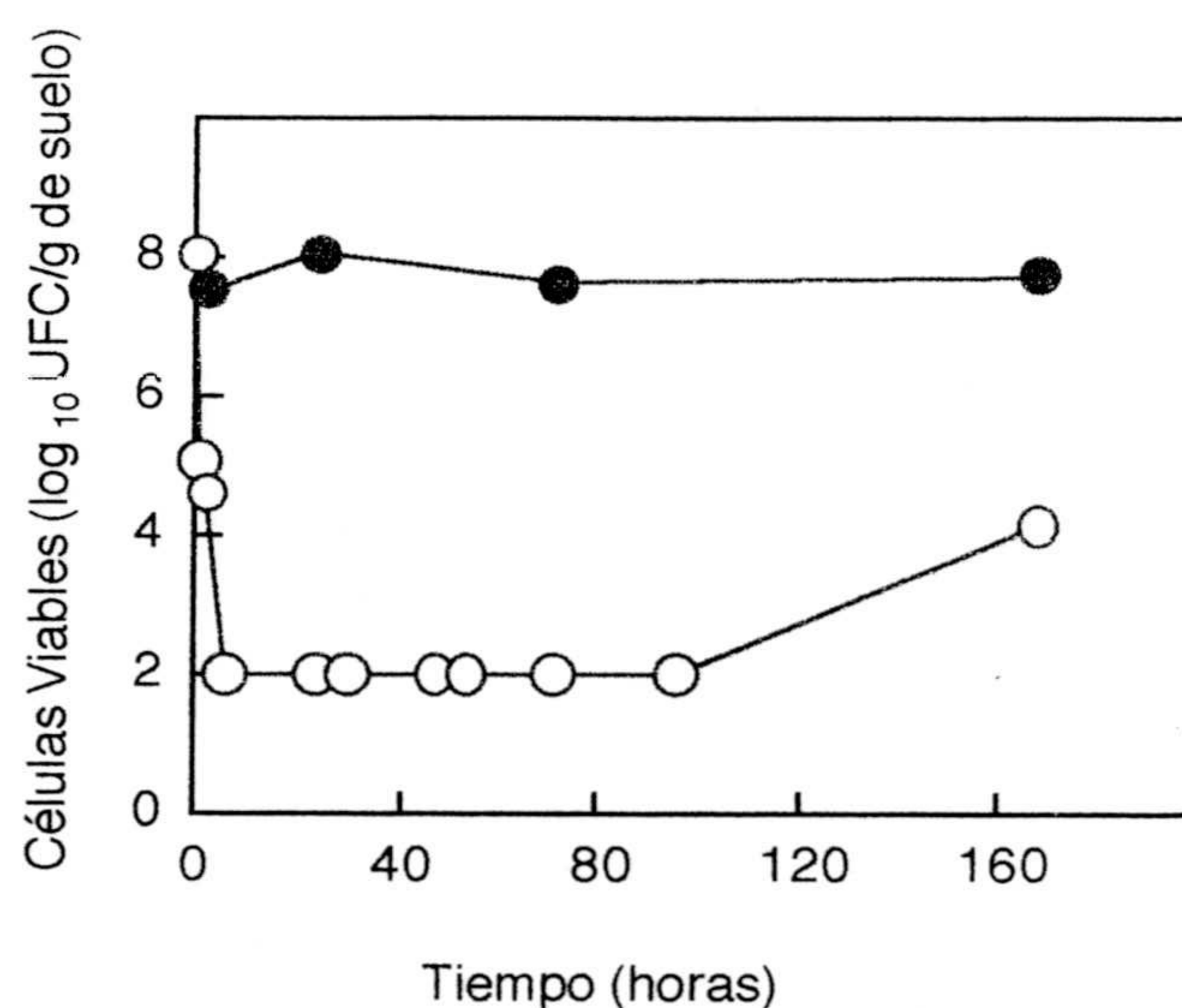


Figura 33. Supervivencia de *P. putida* DOT-T1E en suelo en presencia de tolueno 10% (v/p) en microcosmos edáficos. Alrededor de 10^8 UFC/g de suelo se inocularon en microcosmos en ausencia (●) y en presencia del 10% (v/p) de tolueno (○). El número de células viables se estimó a los tiempos indicados y se expresó como el log₁₀ UFC/g de suelo.

En base a estos resultados se consideró que la caída inicial en el número de células de DOT-T1E en suelos en presencia de tolueno, podría deberse a que la cepa no había tenido un periodo de adaptación previo a su inoculación en suelos contaminados. Por ello se cultivó DOT-T1E en medio mínimo con tolueno a una concentración del 1% y 10% (v/v) y con 10 mM de iones Mg^{2+} .

Las células precultivadas en estas condiciones se inocularon en microcosmos edáficos en presencia de 1 y 10% (v/p) de tolueno. Los resultados se muestran en la Figura 34. Se observó que células precultivadas en presencia del 1% (v/v) no sufrieron un descenso inicial tan marcado como el descrito en la Figura 33 cuando se inocularon en suelos en presencia de 1% (v/p) de tolueno. Asimismo, células de DOT-T1E cultivadas en presencia de 10% (v/v) de tolueno e inoculadas en microcosmos con 10% (v/p) del hidrocarburo aromático presentaron un descenso inicial en el número de células viables que no fue tan marcado como el descrito anteriormente. De todos modos existió un descenso en el número de células con respecto al inicial, lo que nos llevó a concluir que el periodo de adaptación inicial mejoró la supervivencia de la cepa en suelo en presencia de tolueno pero existen otra serie de factores que podrían afectar a la supervivencia de la cepa.

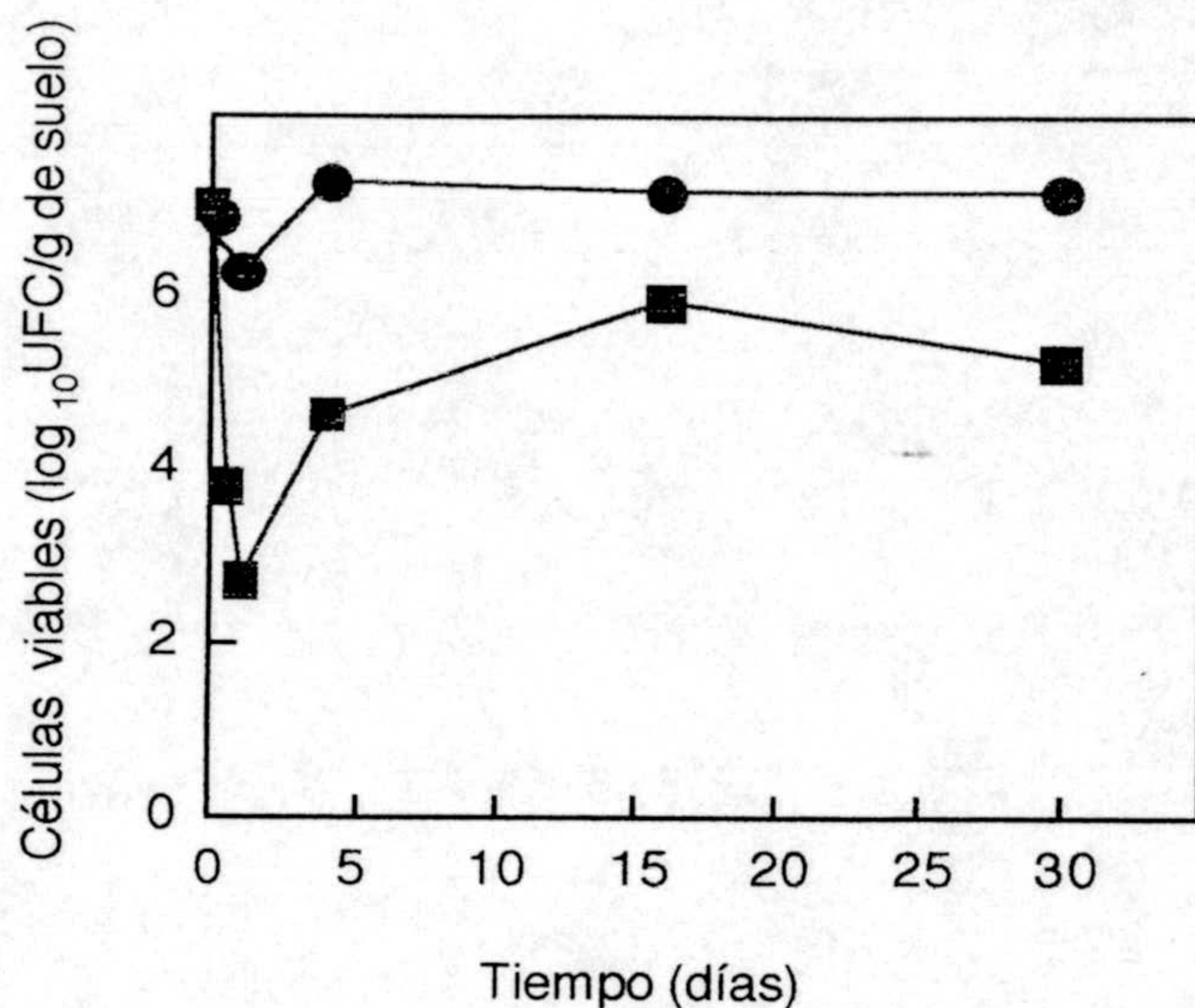


Figura 34. Supervivencia de *P. putida* DOT-T1E en microcosmos con tolueno. Alrededor de 10^7 UFC/g de suelo precultivadas en medio mínimo con tolueno a una concentración de 1% (v/v) (círculos) y 10% (v/v) (cuadrados) se inocularon en microcosmos en presencia de 1% (v/p) (●) y de 10% (v/p) (■) de tolueno.

1.2.3 Supervivencia de *P. putida* DOT-T1E y F1R en presencia de otros disolventes orgánicos

De los resultados arriba expuestos se pudo deducir que *P. putida* F1R presentaba mayor tolerancia a tolueno en suelo que en medio líquido. Nos interesó comprobar a partir de esta observación, la tolerancia que presentó esta cepa y DOT-T1E en suelo en presencia de otros disolventes orgánicos. Se inocularon microcosmos independientes con las dos cepas a una densidad celular inicial de 10^7 UFC/g de suelo en ausencia y presencia de disolventes orgánicos que presentaron diferentes $\log P_{ow}$. Se utilizó heptano ($\log P_{ow}$ 4,5) y propilbenzeno ($\log P_{ow}$ 3,5) a una concentración del 10% (v/p); y tolueno ($\log P_{ow}$ 2,5) y benceno ($\log P_{ow}$ 2,0) a una concentración del 1% (v/p).

En la Figura 35 se presentan los resultados para *P. putida* F1R debido a que se observó un comportamiento similar en los dos casos. Se comprobó que en suelos en presencia de 10% (v/p) de heptano y propilbenzeno el número de células viables permaneció relativamente constante en el tiempo y entre 10^6 y 10^7 UFC/g de suelo. En presencia de tolueno el comportamiento fue similar al descrito anteriormente y en presencia de benceno se observó que tras la inoculación el número de células descendió por debajo de nuestros límites de detección.

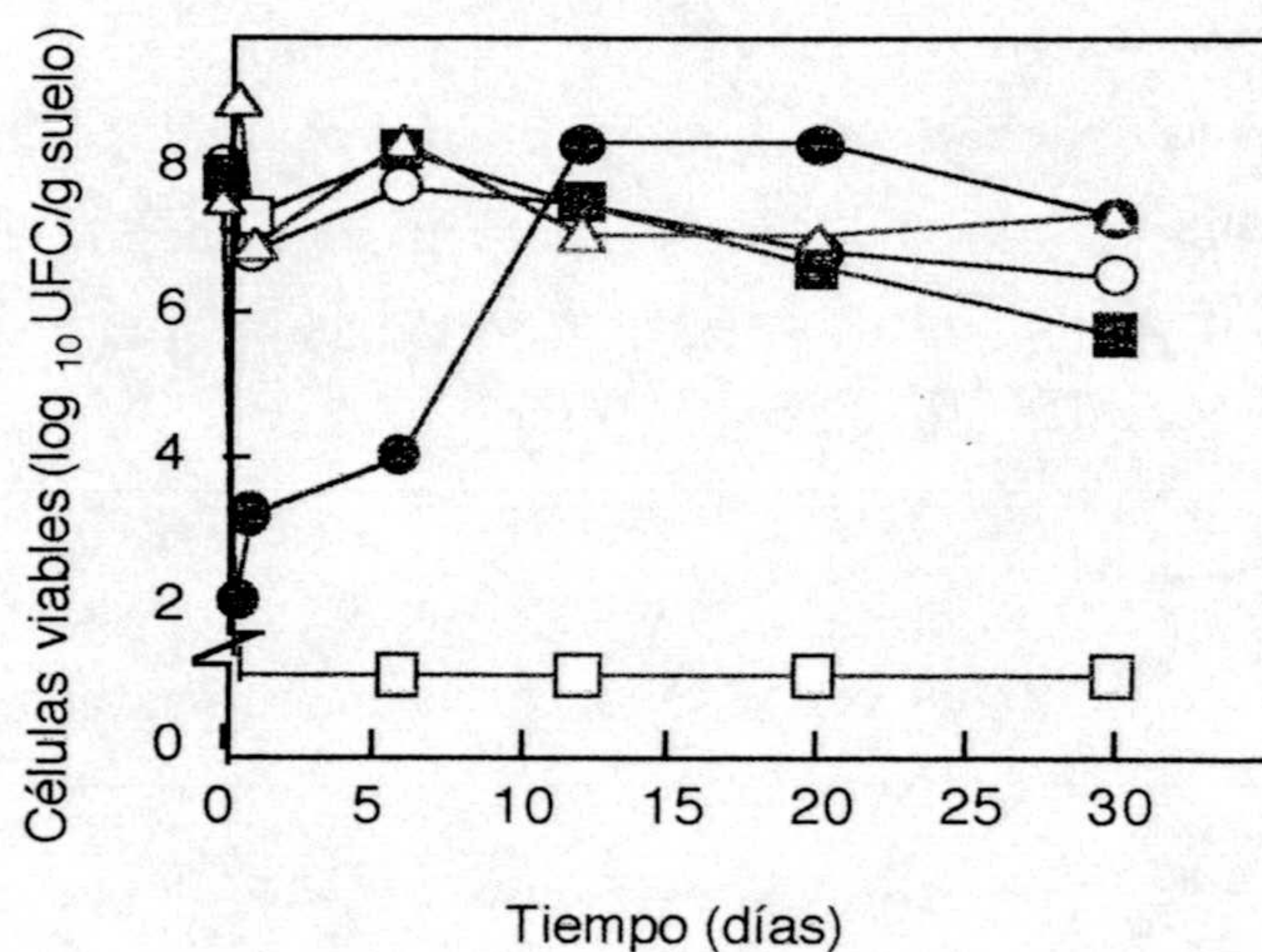


Figura 35. Supervivencia en suelo de *P. putida* F1R en suelo en presencia de distintos disolventes orgánicos. Alrededor de 10^7 UFC/g de suelo se introdujeron en microcosmos en ausencia (○) o en presencia de 10% (v/p) de heptano (△), 10% de propilbenceno (■), 1% de tolueno (●) y 1% de benceno (□). Periódicamente se tomaron muestras y se estimó el número de UFC por gramo de suelo.

2. ESTUDIO DE LOS FACTORES QUE AFECTAN A LA SUPERVIVENCIA DE LAS CEPAS EN MICROCOSMOS EDÁFICOS.

Debido a que el interés de nuestro trabajo fue evaluar la supervivencia de las cepas caracterizadas en suelos en ausencia y presencia de disolventes orgánicos, se consideró analizar los factores abióticos que influyen en la supervivencia en suelos de las cepas en presencia de disolventes orgánicos. Estos ensayos se llevaron a cabo con las cepas de *P. putida* DOT-T1E y F1R debido a la característica de tolerancia que presenta la primera y la capacidad de colonizar zonas contaminadas, a pesar de considerarse sensible en medio líquido, que presenta la segunda.

2.1 Efecto de la humedad del suelo sobre la supervivencia de *P. putida* DOT-T1E y F1R.

Ramos *et al.* (1991) pusieron de manifiesto que la supervivencia de *P. putida* en suelos estériles se afectó por la humedad del suelo y por la temperatura de incubación de las mismas. Con objeto de evaluar la influencia de la humedad en la supervivencia de

DOT-T1E y F1R en suelos no estériles, en ausencia y presencia de tolueno, se llevaron a cabo ensayos en los que se utilizaron suelo con diferentes porcentajes de humedad. Para ello se calculó la humedad, referida a la capacidad de campo del suelo como se describió en la sección 16.1 del apartado de Materiales y Métodos, y se ajustó la humedad del suelo para obtener microcosmos con suelo a una humedad del 5%, 15%, 30% y 45% de la capacidad del campo y en ausencia y presencia de 1% (v/p) de tolueno. Una vez ajustada la humedad del suelo se adicionó tolueno y se procedió a la inoculación de las cepas a una densidad celular de alrededor de 10^8 UFC/g de suelo.

Los resultados para ambas cepas fueron similares, y en la Figura 36 se presentan los obtenidos para la cepa DOT-T1E. Éstos mostraron que en microcosmos en ausencia de tolueno la supervivencia de las dos cepas fue óptima cuando la humedad del suelo estuvo entre el 15 y el 45% de la capacidad de campo (Figura 36, panel A). La supervivencia de las cepas disminuyó aproximadamente 2 ordenes de magnitud cuando el suelo presentó una humedad del 5% de la capacidad de campo.

Cuando las células se incubaron en presencia de tolueno (Figura 36, panel B), se observó que inmediatamente después de la adición del aromático el número de células viables de las dos cepas disminuyó en todos los casos en alrededor de 5 a 6 ordenes de magnitud. En suelos con un porcentaje de humedad del 5% el número de células se mantuvo a una densidad de 10^2 UFC/g de suelo a lo largo del tiempo y pasados 30 días de la inoculación no se recuperaron células viables de estos microcosmos.

Cuando ambas cepas se inocularon en microcosmos con un porcentaje de humedad del 45%, el impacto inicial al entrar en contacto con el disolvente fue similar al descrito anteriormente, pero pasadas 24 horas de la inoculación las cepas comenzaron a multiplicarse. Cuando el suelo presentó una humedad del 30% de humedad la recuperación de las células comenzó una semana después de la inoculación y 15 días más tarde cuando las cepas se inocularon en microcosmos con 15% de humedad.

En general, se observó, que el tiempo de retardo anterior a la multiplicación estuvo afectado por la humedad del suelo, cuanto mayor fue la humedad menor fue el tiempo de recuperación de ambas cepas.

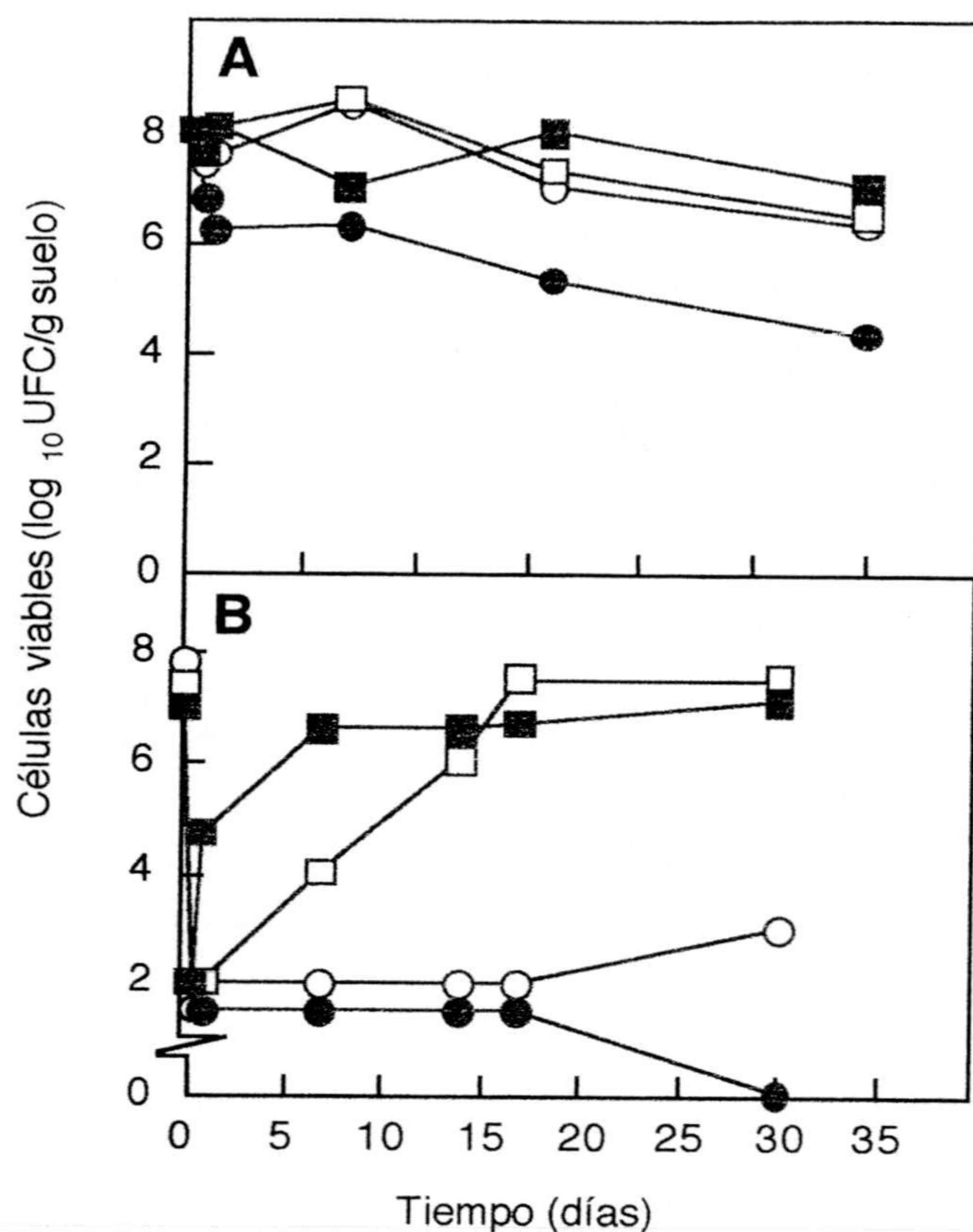


Figura 36. Supervivencia de *P. putida* DOT-T1E en suelo con diferentes porcentajes de humedad, en ausencia (A) y presencia de 1% (v/p) de tolueno (B). Alrededor de 10^7 UFC/g de suelo de ambas cepas se inocularon en suelos con diferentes contenidos de humedad 5% (●), 15% (○), 30% (□) y 45% (■) de la capacidad de campo en suelos en ausencia (A) y en presencia de 1% (v/p) de (B). Periódicamente se tomaron muestras y se estimó el número de UFC por gramo de suelo.

El efecto de la humedad sobre la microbiota del suelo se evaluó mediante conteos de bacterias capaces de formar colonias en medio mínimo con *p*-hidroxifenilacético. Como se puede observar en la Tabla 22 en todos los microcosmos el número de células de la microbiota permaneció constante en el tiempo, independientemente de la humedad que presentara el suelo y en la ausencia o presencia de tolueno. De estos resultados se concluyó que la variación en el porcentaje de humedad no afectó a la microbiota del suelo y si lo hizo a las cepas introducidas, principalmente si lo eran en presencia de tolueno.

Tabla 22. Efecto de la humedad sobre la microbiota del suelo.

	5%		15%		30%		45%	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
Sin tolueno	6,3	6,7	6,4	7,2	6,3	7,2	6,4	6
Con tolueno	6,3	6,1	6,2	6,1	6,2	6,3	6,3	6

La población de bacterias indígenas de suelo se estimó mediante conteo de bacterias capaces de crecer en medio mínimo con *p*-hidroxifenilacético como fuente de carbono. Los ensayos se realizaron en microcosmos que presentaron diferentes porcentajes de humedad y en ausencia y presencia de tolueno al inicio y tras 30 días de incubación. El valor de la Tabla esta referido al \log_{10} UFC/g de suelo.

Sobre la base de estos resultados el porcentaje de humedad se mantuvo entre el 30% y el 45% de la capacidad de campo para los experimentos que se llevaran a cabo en suelo.

2.2 Efecto de la temperatura sobre la supervivencia de *P. putida* DOT-T1E y F1R en suelo.

Como hemos referido en el apartado anterior, Ramos *et al.* (1991) y más tarde M.C Ronchel (Tesis Doctoral, 1997) pusieron de manifiesto que la supervivencia de *P. putida* en suelos se afectaba por la temperatura de incubación. Con objeto de establecer la temperatura óptima para estos ensayos se analizó la supervivencia de las cepas *P. putida* DOT-T1E y F1R en microcosmos edáficos en condiciones de ausencia y presencia de tolueno (10% [v/p]) e incubados a 4°, 18°, 25°, 30° y 37°C con oscilación de $\pm 2^\circ\text{C}$. Los microcosmos se inocularon con células de las cepas mencionadas para alcanzar una densidad celular inicial del orden de 10^7 UFC/ g de suelo. Los resultados para las cepas incubadas a distintas temperaturas y en presencia de tolueno se muestran en la Tabla 23. Se observó que la supervivencia de las cepas se afectó por la temperatura de incubación.

En microcosmos incubados a 4° y 37°C y en ausencia de tolueno se observó una disminución en el número de células iniciales (datos no presentados). Asimismo en microcosmos en presencia de 10% (v/p) de tolueno e incubados a 4°C y 37°C, el número de células viables se situó por debajo de nuestros límites de detección tras 8 días de incubación, e incluso no se recuperaron células de microcosmos incubados a 4°C pasados 30 días del inicio de la inoculación (datos no mostrados).

En general la supervivencia fue óptima entre 25° y 30°C en ausencia y presencia de tolueno.

Tabla 23. Efecto de la temperatura de incubación en la supervivencia de *P. putida* DOT-T1E y F1R en microcosmos edáficos en presencia de tolueno.

Temperatura de incubación (°C)	Densidad celular (UFC/g de suelo)	
	<i>P. putida</i> DOT-T1E	<i>P. putida</i> F1R
4	< 10 ²	< 10 ²
18	10 ⁴	10 ³
25	4x10 ⁵	2x10 ³
30	2x10 ⁵	5x10 ³
37	<10 ²	<10 ²

P. putida DOT-T1E y F1R se introdujeron en suelo del jardín de la estación Experimental del Zaidín a una densidad de 10⁶ UFC/g de suelo con una humedad del 30% de la capacidad de campo y en presencia del 10% (v/p) de tolueno. Los microcosmos se incubaron a las temperaturas indicadas durante 15 días. El valor de la Tabla está referido al número de UFC/g de suelo.

Cuando se analizó el comportamiento de la microbiota, se observó que no se afectó por la temperatura de incubación tanto en ausencia como en presencia de tolueno. El número de células permaneció relativamente constante a lo largo del ensayo y fue de alrededor de 1x10⁶ UFC/g de suelo.

Sobre la base de los resultados discutidos arriba, en ensayos posteriores la incubación de los microcosmos se realizó entre 25° y 30°C.

2.3 Supervivencia de *P. putida* DOT-T1E y F1R en suelo inoculado a diferentes densidades celulares iniciales.

Se analizó la supervivencia de *P. putida* DOT-T1E y F1R en microcosmos en ausencia o en presencia de 10% (v/p) de tolueno, mantenidos a 30°C y 30% humedad e inoculados con un número de bacterias del orden de 10⁴ y 10⁸ UFC/g de suelo. Se comprobó que, en general, la presencia de tolueno influyó el comportamiento de las dos cepas ya que se observaron diferencias en la supervivencia de las cepas inoculadas a densidades celulares bajas en presencia de tolueno (Tabla 24 A y B). En suelo en ausencia

de tolueno inoculado a densidades celulares de 10^4 y 10^8 UFC/g de suelo se observó que, el número de células de las dos cepas aumentó alcanzándose valores de densidades celulares de alrededor de 10^6 y 10^7 UFC/g de suelo respectivamente, pasados 30 días de la inoculación. En contraste, cuando se inocularon células de las dos cepas a una densidad celular de 10^4 UFC/g de suelo en presencia del 10% (v/p) de tolueno, se observó que las células no se recuperaron del impacto inicial al entrar en contacto con el disolvente, y permanecieron a una densidad de alrededor de 10^2 UFC/g de suelo al lo largo del ensayo.

Tabla 24. Efecto de la densidad celular sobre la supervivencia de *P. putida* DOT-T1E y *P. putida* F1R en microcosmos edáficos.

A

Bacterias iniciales de <i>P. putida</i> DOT-T1E	Sin tolueno		Con tolueno	
	Inicial	Final	Inicial	Final
1×10^4	3,6	6	3,7	2
1×10^8	7,7	6,8	7,7	6,3

B

Bacterias iniciales de <i>P. putida</i> F1R	Sin tolueno		Con tolueno	
	Inicial	Final	Inicial	Final
1×10^4	4	5,6	4	2
1×10^8	7,5	6,3	7,7	5

Células de cada una de las cepas se introdujeron en microcosmos en ausencia o presencia de tolueno 10% (v/p) y a las densidades celulares referidas en la Tabla. Los valores que aparecen son el número de células viables al principio y al final del ensayo, tras 30 días de incubación, y vienen expresados como el \log_{10} UFC/g de suelo.

Cuando se inocularon los suelos en presencia de tolueno a una densidad celular de alrededor de 10^8 UFC/g de suelo se observó un comportamiento similar al referido anteriormente, con un descenso en el número de células inicial y una recuperación posterior, alcanzándose densidades celulares para DOT-T1E y F1R de 10^6 y 10^5 UFC/g de suelo respectivamente.

A partir de estos resultados se estableció la introducción de las cepas en microcosmos con tolueno a densidades celulares de alrededor de 10^7 - 10^8 UFC/g de suelo, debido a que densidades menores la recuperación, tras el choque con disolventes, fue más lenta.

2.4 Efecto del preestablecimiento en suelo de *P. putida* DOT-T1E y F1R sobre su supervivencia.

En los ensayos descritos en secciones anteriores, la pérdida de viabilidad de las cepas al entrar en contacto con concentraciones elevadas de disolventes se afectaba por una serie de factores que hemos discutido hasta ahora. Se llevaron a cabo ensayos encaminados a determinar si un periodo de preadaptación de las cepas en suelo previo a la adición de tolueno tenía algún efecto sobre la supervivencia de las cepas.

Para ello las cepas se incubaron en ausencia de tolueno, a 30°C y a una humedad del 30% de la capacidad de campo durante 2 y 14 días, pasado este tiempo se adicionó 10% (v/p) de tolueno y se siguió la toma de muestras durante 30 días. Los resultados se muestran en la Figura 37 para DOT-T1E (Panel A) y para F1R (Panel B). Se observó que, la incubación de las cepas durante 2 o 14 días en ausencia del disolvente no tuvo efecto beneficioso en la supervivencia, ya que tras la adición de tolueno (indicado por flechas en la Figura) se observó un descenso en el número de células viables de entre 4 y 5 ordenes de magnitud y un aumento en esta densidad pasados unos días como ocurría en el caso de la adición anterior a la inoculación.

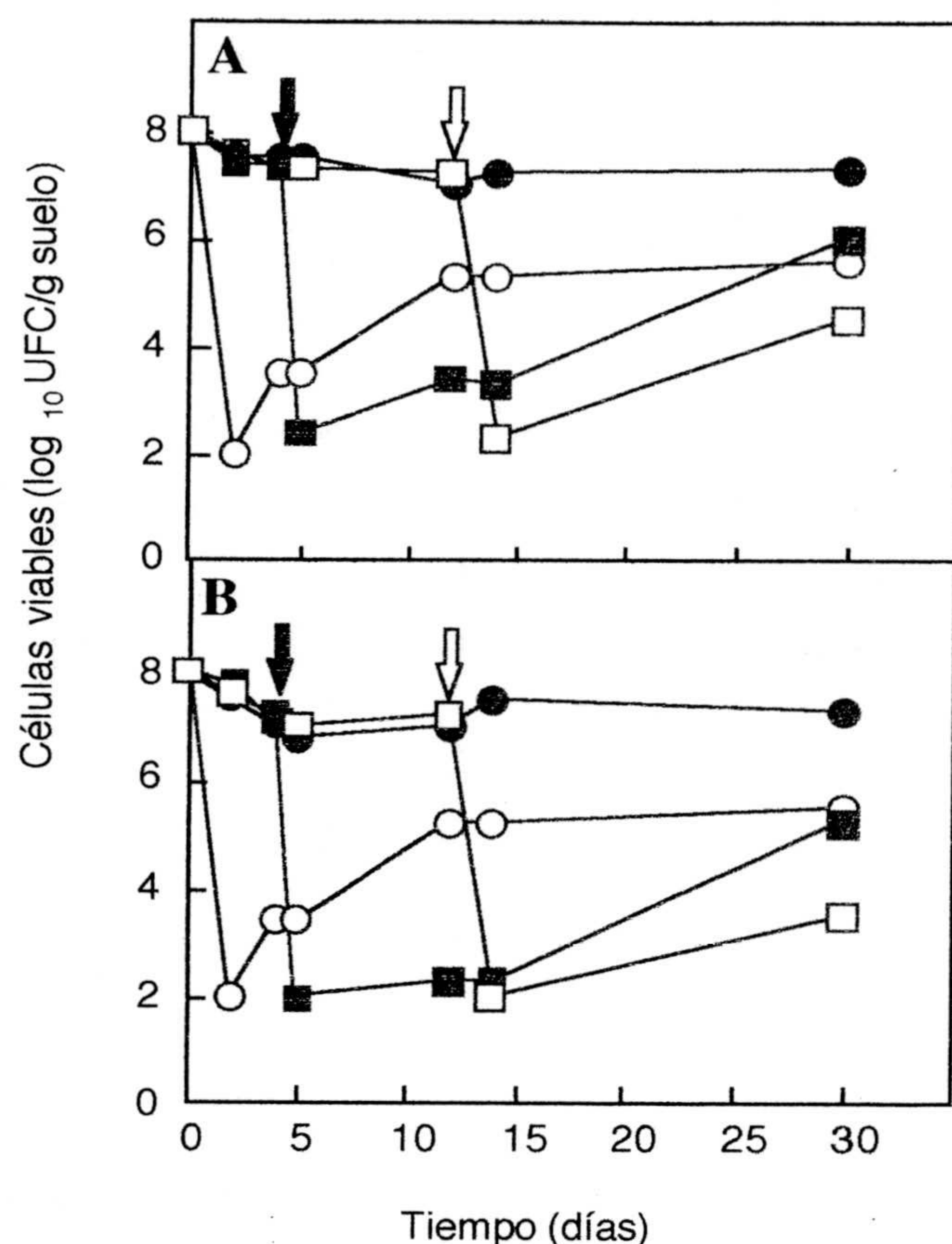


Figura 37. Efecto del preestablecimiento de *P. putida* DOT-T1E y F1R en suelo sobre su supervivencia Alrededor de 10^8 UFC/g de suelo se inocularon en microcosmos en ausencia de tolueno, tras dos (■) y 14 días (□) de incubación se adicionó 10% (v/p) de tolueno. Como controles se inocularon microcosmos en ausencia (●) y en presencia del 10% de tolueno (○). Periódicamente se tomaron muestras para determinar el número de células viables presentes en el suelo. Los valores de la figura se refieren al \log_{10} UFC/g de suelo.

3. ESTUDIO DE LA COMPETENCIA ENTRE CEPAS DEL GÉNERO *PSEUDOMONAS* DEGRADADORAS DE TOLUENO EN SUELOS CONTAMINADOS

Como hemos discutido en los apartados anteriores, las cepas *P. putida* DOT-T1E, F1R y MTB6R se establecieron en suelos en presencia del 10% (v/p) de tolueno. Esto nos indicó que F1R y MTB6R presentaron un comportamiento distinto en medio líquido que en suelo. Por ello se consideró evaluar la supervivencia de las cepas cuando se introducían simultáneamente en suelos contaminados con tolueno. El objeto de esta serie

de ensayos fue determinar si la introducción simultánea de parejas de cepas capaces de establecerse en suelos en ausencia y presencia de disolventes orgánicos, mejoraba, era neutra o por el contrario perjudicaba la supervivencia de una de las cepas o de ambas.

3.1 Marcaje de las cepas a introducir en suelo para ensayos de competencia

Hasta aquí todos los ensayos llevados a cabo en suelo se realizaron utilizando las cepas de *P. putida* marcadas con resistencia a rifampicina; por lo tanto, y dado que íbamos a introducir en suelo las cepas de dos en dos, se consideró el marcaje con otras resistencias con el fin de distinguirlas una de otra y facilitar su seguimiento en suelo. Las cepas seleccionadas para marcar fueron las parentales (sensibles a rifampicina) de *P. putida* DOT-T1 y F1R. MTB6R se mantuvo con el marcador de resistencia a rifampicina.

Se usaron marcadores de resistencia a antibióticos y a sales metálicas. Así, se utilizaron los minitransposones diseñados por de Lorenzo *et al* (1991) y por Sánchez *et al* (1998) que codifican resistencia a kanamicina y telurito sódico. Para la introducción del minitransposón se llevaron a cabo conjugaciones triparentales y se generaron derivados de las cepas parentales de *P. putida* que se denominaron DOT-T1-Km y F1R-Tel, resistentes a kanamicina y a telurito respectivamente.

Con las cepas transconjugantes DOT-T1-Km y F1R-Tel, se realizaron curvas de crecimiento en medio mínimo con tolueno para evaluar si la introducción del marcador afectaba a su comportamiento fisiológico. Se comprobó que la curva de crecimiento de estas cepas, en medio mínimo con tolueno en fase gaseosa como fuente de carbono y energía, fue similar a la de las cepas parentales (datos no presentados).

Por otro lado se llevaron a cabo ensayos en suelo en ausencia y presencia de tolueno, con el objeto de determinar el comportamiento de las cepas marcadas. Así DOT-T1-Km y F1R-Tel se inocularon en suelos en ausencia y en presencia de 10% (v/p) de tolueno a una densidad celular de aproximadamente 10^7 UFC/g de suelo. Se determinó el número de células viables a lo largo del tiempo. Los resultados se presentan en la Figura 38. Se comprobó que cuando las cepas marcadas se introdujeron en suelo en ausencia y en presencia de tolueno la supervivencia fue similar a la mostrada por las cepas no marcadas. En ausencia de tolueno el número de células viables fue constante a lo largo del tiempo (datos no mostrados), mientras que en suelo en presencia del 1% (v/p) de tolueno (Figura 38) el número de células viables disminuyó al entrar en contacto con el disolvente recuperándose posteriormente. Por lo tanto se consideró que la introducción del marcador no afectó al fenotipo de las cepas y se seleccionaron para los ensayos de co-inoculación.

También se comprobó que ninguna bacteria de la microbiota indígena creció en medio mínimo con tolueno y kanamicina o telurito.

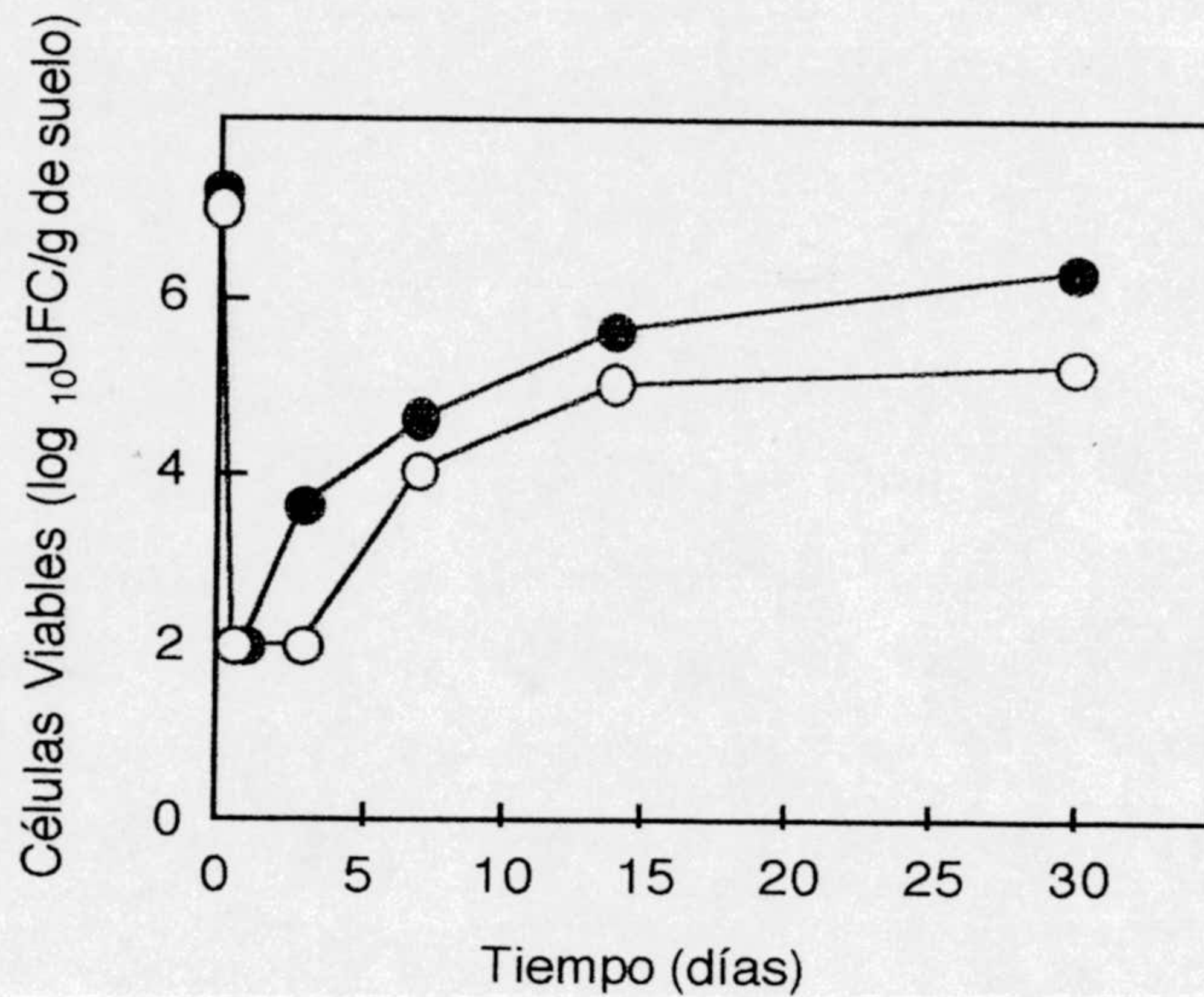


Figura 38. Supervivencia en suelo de las cepas marcadas en ausencia o presencia de tolueno. Alrededor de 10^8 UFC/g de suelo de DOT-T1E-Km (●) y F1R-Tel (○) se introdujeron en suelo en presencia de 1% (v/p) de tolueno. Periódicamente se tomaron muestras, se hicieron diluciones seriadas y se sembraron en medio selectivo para estimar el número de células viables.

Una vez comprobado que las cepas marcadas se comportaron en líquido y en suelo como las parentales (resistentes a rifampicina), y que no existían bacterias de la microbiota capaces de crecer en el medio de selección de las mismas, se procedió a la co-inoculación en suelos.

3.2 Inoculación conjunta de *P. putida* DOT-T1E-Km y F1-Tel.

Debido a la característica de tolerancia, en medio líquido y en suelo, de DOT-T1 y a la sensibilidad en líquido y tolerancia de F1 en suelo a concentraciones elevadas de tolueno, se consideró la inoculación conjunta de las dos cepas con objeto de determinar el comportamiento en suelos en ausencia y presencia de 10% (v/p) de tolueno.

Los resultados se muestran en la Figura 39. Se observó que en microcosmos en ausencia de tolueno (Panel A) el número de células viables de ambas cepas permaneció relativamente constante a lo largo del tiempo y que, por lo tanto, no se observó competencia en estas condiciones.

Cuando las cepas se inocularon en microcosmos en presencia del 10% (v/p) de tolueno (Panel B), se observó un descenso inicial en el número de células viables de entre

5 y 6 ordenes de magnitud. Veinticuatro horas más tarde de la inoculación se determinó el número de células viables de ambas cepas que fue del orden de 10^2 UFC/g de suelo para DOT-T1-Km y F1-Tel. Se observó que DOT-T1-Km se recuperó del choque inicial con 10% (v/p) de tolueno más rápido que F1-Tel ya que alcanzó una densidad celular de 10^5 UFC/g de suelo 3 días después de la inoculación, mientras que F1R-Tel alcanzó una densidad celular de 10^3 UFC/g de suelo 15 días después de su inoculación. Pasados 30 días de la inoculación DOT-T1-Km mostró un número de células viables de 10^7 UFC/g de suelo, mientras que la densidad celular de F1R-Tel fue de 10^3 UFC/g de suelo. Por lo tanto DOT-T1-Km mostró un número más elevado de células que F1-Tel cuando se inocularon juntas en suelos en presencia de 10% (v/p) de tolueno, pero sus comportamientos no diferirían significativamente de aquellos encontrados cuando las inoculaciones fueron individuales (ver Figura 32).

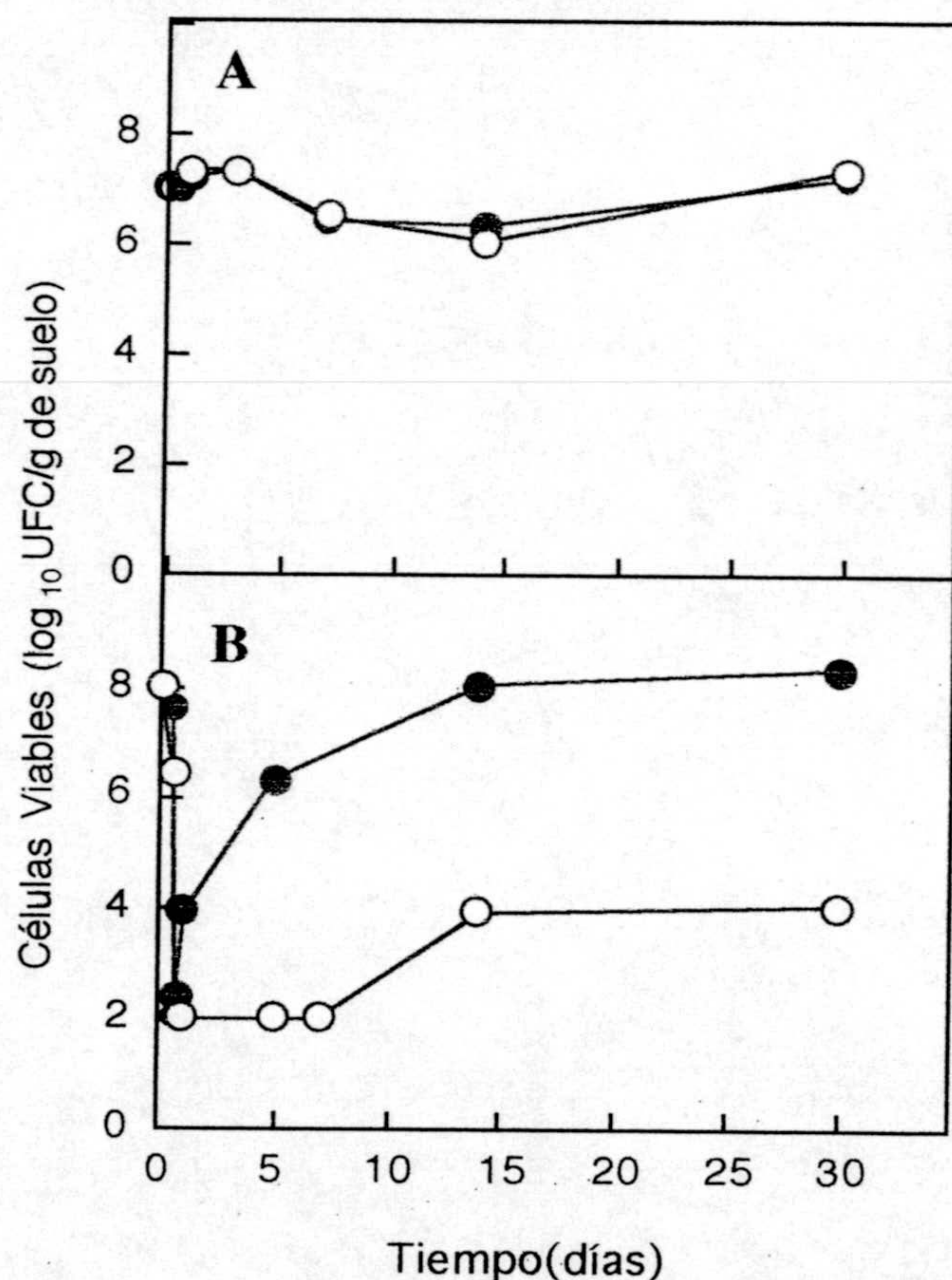


Figura 39. Competencia entre DOT-T1-Km y F1-Tel en suelo en ausencia (A) y en presencia de 10% (v/p) de tolueno (B). Las cepas *P. putida* F1 marcada con resistencia a telurito (○) y DOT-T1 marcada con resistencia a kanamicina (●) se inocularon conjuntamente en microcosmos a una densidad celular de 10^8 UFC/g de suelo. El número de células viables se estimó periódicamente como el log₁₀ UFC/g de suelo.

3.3 Inoculación conjunta de *P. putida* DOT-T1-Km y MTB6R

La cepa *P. putida* MTB6 se caracteriza por poseer tolerancia a concentraciones del orden de 10% de tolueno en medio líquido y por sobrevivir en suelos que presentaron concentraciones del 10% (v/p) (ver apartado 13 de esta sección de resultados). Al ser una cepa aislada de suelo se estudió si esta cepa presentaba o no ventaja en suelo frente a DOT-T1-Km en una inoculación conjunta en presencia de 10% (v/p) de tolueno.

Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 40, en la que se muestra el comportamiento de las cepas cuando se introdujeron en microcosmos independientes (Panel A) o las dos juntas en un microcosmos en presencia de 10% (v/p) de tolueno (Panel B).

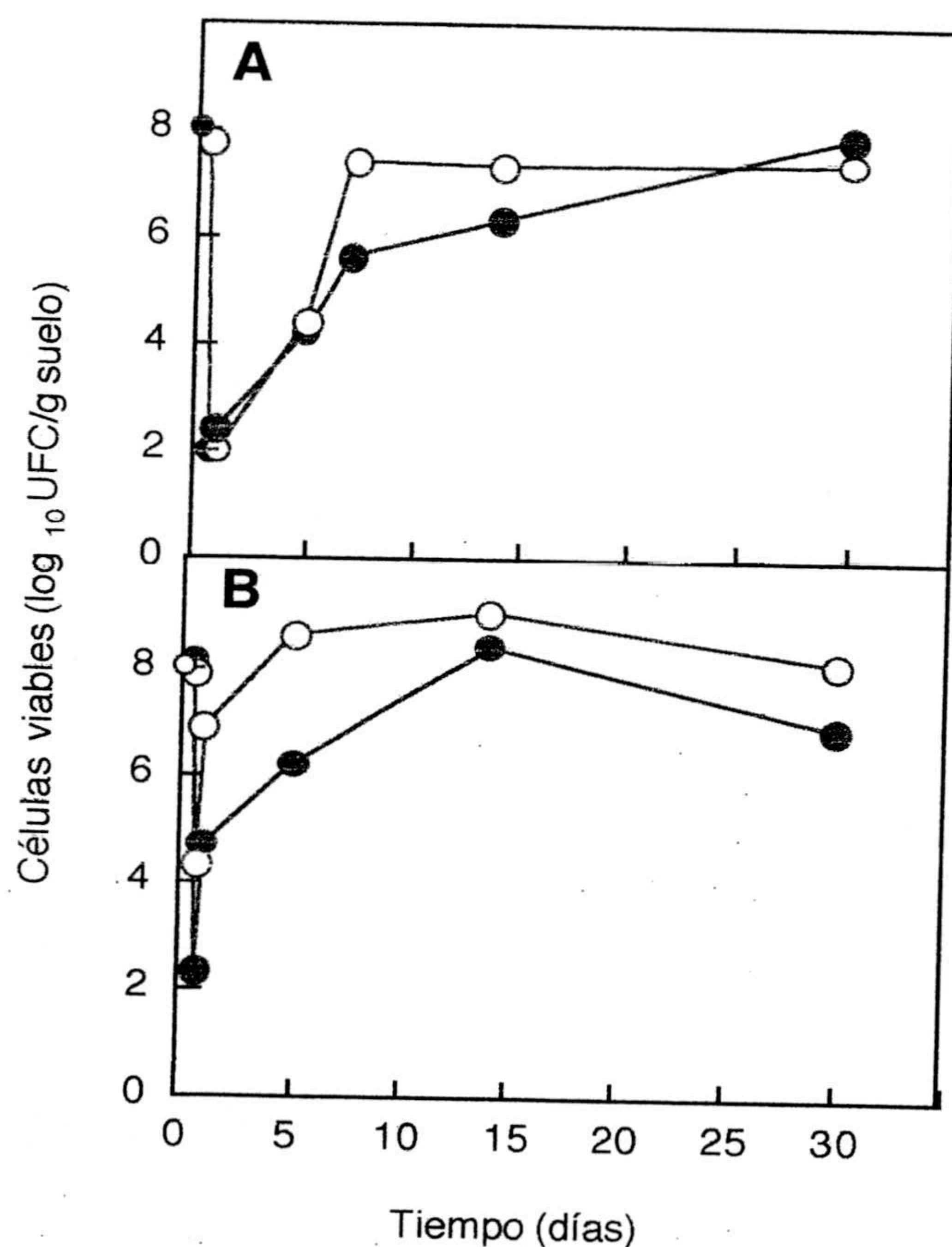


Figura 40. Competencia entre *P. putida* DOT-T1E-Km y MTB6R en presencia de tolueno. Alrededor de 10^8 UFC/g de suelo de *P. putida* DOT-T1E-Km (●) y de MTB6R (○) se inocularon en microcosmos con tolueno por separado (A) o de forma conjunta (B) en presencia del 10% (v/p) de tolueno. Periódicamente se tomaron muestras y se estimó el número de células viables.

Cuando se introdujeron por separado (Panel A) se observó que presentaron el mismo comportamiento descrito hasta ahora para todas las cepas capaces de establecerse

en microcosmos con tolueno. Cuando la inoculación fue conjunta en microcosmos en presencia de tolueno (Panel B) se observó que las dos cepas presentaron un comportamiento distinto al obtenido cuando se inoculan por separado, especialmente en el periodo previo al inicio de la multiplicación.

Las dos cepas pasadas 24 horas de la inoculación presentaron una densidad celular de 10^5 y 10^6 UFC/g de suelo y a los 15 días de la introducción presentaron una densidad de alrededor de 10^8 UFC/g de suelo. Así se puede sugerir que la inoculación de las dos cepas conjuntamente no afectó de forma negativa a la supervivencia de las mismas, aunque parece que la recuperación es más rápida.

4. MINERALIZACIÓN DE ^{14}C -TOLUENO EN SUELO

Para que exista mineralización eficiente de contaminantes en suelo, los microorganismos se deben establecer en este entorno y expresar los genes catabólicos necesarios para la degradación completa del compuesto. Además, debido a que el suelo es un medio ambiente complejo puede ocurrir que la expresión de ciertos genes se inhiba o se active por compuestos presentes en los mismos (Duque *et al.*, 1993). Para comprobar si las cepas caracterizadas por sobrevivir en microcosmos en presencia de tolueno mineralizaban este compuesto, esto es, lo utilizaban como fuente de carbono, se estudió la mineralización en suelo de ^{14}C -tolueno como desprendimiento de $^{14}\text{CO}_2$.

Los ensayos se llevaron a cabo con *P. putida* DOT-T1E y MTB6R debido a que son las que presentan mejor supervivencia en suelos en presencia de tolueno. Las cepas se introdujeron en suelos no estériles a una densidad celular inicial del orden de 10^6 UFC/g de suelo. Al suelo se añadió ^{14}C -tolueno para alcanzar una actividad específica de $0,5\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ (como se describe en la sección 18 del apartado de Materiales y Métodos) y a concentración del 1% (v/p). Tanto las bacterias como el compuesto radioactivo se mezclaron homogéneamente. Periódicamente se recogió 1 mL de etanolamina donde se recogió el $^{14}\text{CO}_2$ y se determinó a lo largo del tiempo el número de desintegraciones por minuto por mL de etanolamina.

Los resultados se presentan en la Figura 41 para DOT-T1E (Panel A) y MTB6R (Panel B). En los dos casos se observó un aumento lineal de desprendimiento de $^{14}\text{CO}_2$ que estuvo relacionado con el aumento en el número de células viables de las dos cepas tras su exposición a tolueno. Asimismo, los resultados sugerían que la cepa DOT-T1E mineralizaba tolueno más rápidamente que MTB6R ya que se alcanzó mayor acumulación de $^{14}\text{CO}_2$ en los microcosmos en los que se incubó la primera cepa.

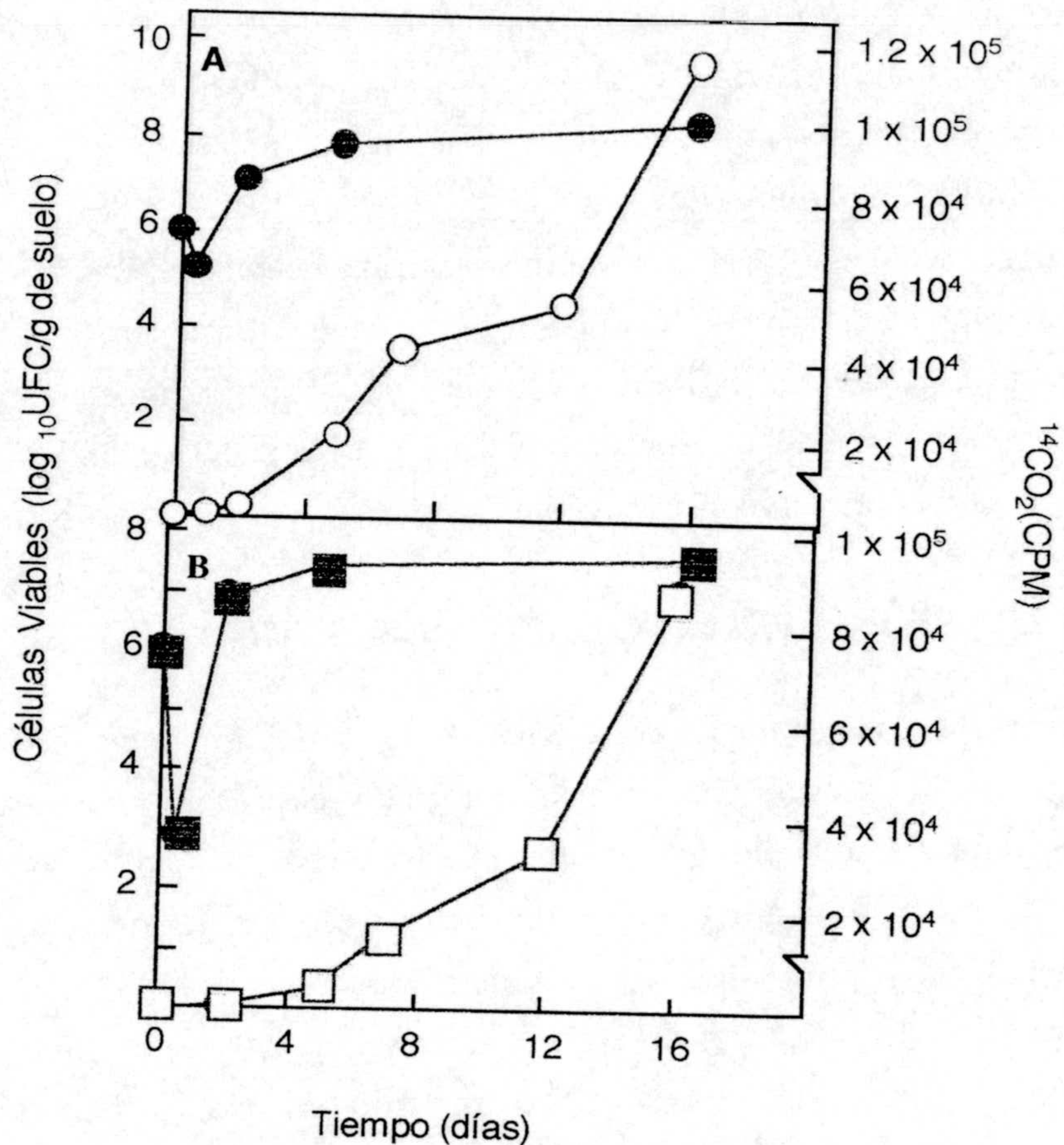


Figura 41. Desprendimiento de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de ^{14}C -tolueno por *P. putida* DOT-T1E(A) y MTB6R(B). Noventa gramos de suelo del jardín de la Estación Experimental del Zaidín se colocaron en recipientes herméticos de 1 Kg de capacidad y se inocularon con *P. putida* DOT-T1E (Panel A) o con *P. putida* MTB6R (Panel B) para alcanzar una densidad inicial del orden de 10^7 UFC/g de suelo. Al suelo se le añadió 1% (v/p) ^{14}C -tolueno ($0,5\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$). El $^{14}\text{CO}_2$ desprendido se recogió en 20 mL de etanolamina. A los tiempos indicados se determinó el número de células viables de DOT-T1E (●) y MTB6R (■) el número de cuentas por minuto para DOT-T1E (○) y para MTB6R (□) como se describió en el apartado 18 de la sección de Materiales y Métodos.

El ensayo descrito anteriormente se llevó a cabo en suelo no estéril por lo que se añadió 1% (v/p) de ^{14}C -tolueno a 90 g de suelo sin inocular y se siguió el desprendimiento de $^{14}\text{CO}_2$ provocado por la microbiota degradadora de tolueno. Los resultados se presentan en la Figura 42. Se observó que existía desprendimiento de $^{14}\text{CO}_2$ lo que sugería que las cepas de la microbiota mineralizaron tolueno, aunque el desprendimiento de $^{14}\text{CO}_2$ fue hasta dos ordenes de magnitud menor que en el caso de los suelos inoculados con las cepas bajo estudio.

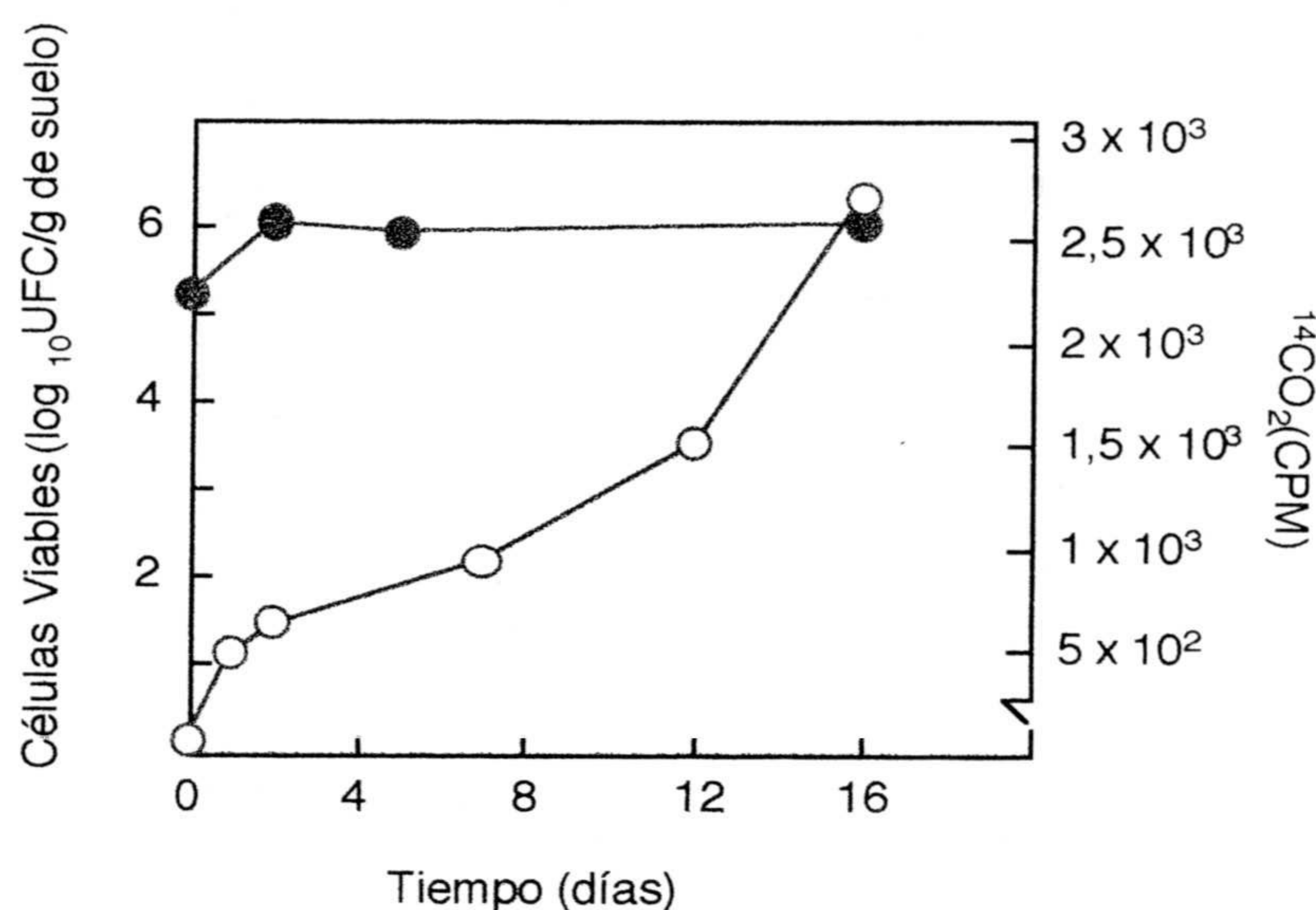


Figura 42. Desprendimiento de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de ^{14}C -tolueno por la microbiota indígena. Las condiciones del ensayo son similares al anterior, excepto que no se inoculó el suelo con ninguna de las cepas.

5. SUPERVIVENCIA DE LAS CEPAS DE *P. putida* DOT-T1E, F1R, MTB5R, MTB6R Y SMO116R EN PRESENCIA DE MEZCLAS COMPLEJAS DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS.

Como hemos señalado a lo largo del capítulo un factor importante a tener en cuenta en biorremediación de zonas contaminadas, es que las cepas introducidas sobrevivan y ejerzan la función para la que han sido inoculadas. Hasta ahora, hemos estudiado el comportamiento de las cepas en presencia de concentraciones crecientes de tolueno y otros disolventes orgánicos, pero existen otras fuentes de contaminación del medio ambiente, como son los vertidos de derivados del petróleo que representan contaminación por mezclas complejas de hidrocarburos lineales y aromáticos. Una de las aproximaciones a problemas de vertidos de este tipo de mezclas, es la del aprovechamiento de las características de la microbiota existente en el suelo para que, proporcionando las fuentes de nitrógeno necesarias, puedan degradar parte de los compuestos presentes en estas mezclas.

Debido al comportamiento observado en suelos contaminados por parte de las cepas de *P. putida* se decidió evaluar la supervivencia de las mismas en presencia de mezclas de

complejas de hidrocarburos aromáticos. Estas mezclas presentan cantidades significativas de compuestos aromáticos a una concentración que varía entre 0 y 5% de tolueno, xilenos, benceno, etilbenceno y otros.

Así células de todas las cepas de *P. putida* bajo estudio se inocularon en suelos en presencia de 10% (v/p) de gasolina de 98 octanos, gasolina de 95 octanos y gasóleo a una densidad celular de 10^8 UFC/ g de suelo. Los resultados se presentan en la Tabla 25. Se observó que todas las cepas sobrevivieron y se multiplicaron en presencia de 10% (v/p) de gasolina y gasóleo.

Tabla 25. Supervivencia de las cepas en presencia de concentraciones elevadas de gasolina y gasóleo.

	Control		Gasolina 98		Gasolina 95		Gasóleo	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
<i>P. putida</i> DOT-T1E	8,2	7,7	8,2	7,6	8,2	7,7	8,2	8
<i>P. putida</i> F1R	7,3	7,4	7,3	7,1	7,3	8,1	7,3	8,1
<i>P. putida</i> MTB5R	8,1	7,1	8,1	7,4	8,1	7,6	8,1	7,8
<i>P. putida</i> MTB6R	7,9	7,3	7,9	8	7,9	8,1	7,9	8
<i>P. putida</i> SMO116R	7,8	6,6	7,8	7,9	7,8	7,7	7,8	8,1

Alrededor de 10^8 UFC/ g de suelo de cada cepa se inocularon en microcosmos en presencia del 10% de las mezclas de hidrocarburos. En la Tabla se muestra el número de células viables, expresado como el \log_{10} UFC/g de suelo, presentes en microcosmos 15 días después de la inoculación.

6. SUPERVIVENCIA Y DISTRIBUCIÓN DE *P. putida* DOT-T1E EN MICROCOSMOS COMPLEJOS CONTAMINADOS CON TOLUENO

6.1 Establecimiento y multiplicación de DOT-T1E a lo largo de una columna de suelo en presencia de tolueno

Como hemos visto en el capítulo anterior, el uso de los microcosmos nos permitió simular condiciones naturales en el laboratorio. Pero en microcosmos sencillos sólo se puede evaluar la supervivencia en la superficie de las cepas introducidas, por lo que se

diseñaron microcosmos más complejos encaminados a evaluar otros factores que influyeran en el establecimiento y multiplicación de DOT-T1E a lo largo de un perfil de suelo y en presencia de tolueno.

La descripción de las columnas de suelo diseñadas para este fin se describió en el apartado 17.1 de la sección de Materiales y Métodos y en la Figura 14 de esa sección se muestra una fotografía de las mismas. Las columnas eran un tubo de vidrio de 35 cm de largo en el que se insertaron entradas para la toma de muestras cada 5 cm. La toma de muestras, inoculación de las columnas y medida de O₂, CO₂ y tolueno por cromatografía de gases se describió en el apartado 17.2 y 17.3 de la sección de Materiales y Métodos.

Para la inoculación, células de la cepa DOT-T1E se cultivaron en medio mínimo con tolueno en fase gaseosa y rifampicina a 30°C y con agitación. Tras 12 horas de incubación se centrifugaron las células y se resuspendieron en medio 1xM9 para su inoculación en suelo a una densidad de aproximadamente 10⁶-10⁷ UFC/g de suelo. A su vez, se tomaron 500g de suelo tamizado con una humedad del 30% de la capacidad de campo que se mezcló con las células. El suelo se introdujo en las columnas, se compactó para evitar la aparición de huecos y se adicionó 1% (v/p) de tolueno por la parte superior. Periódicamente se estimó el número de células viables a lo largo del tiempo y a lo largo de la columna. Se pretendía evaluar el establecimiento y multiplicación de la cepa bajo estudio por lo que las columnas se mantuvieron abiertas durante el transcurso del experimento.

En las Figuras 43 A y B se muestran los resultados. Se observó que pasado un día de la inoculación, el número de células de la cepa fue de entre 10⁴ y 10⁵ por gramo de suelo en la parte inferior y superior, respectivamente, y aumentó, pasados 17 días de la descarga de tolueno hasta alcanzar densidades de aproximadamente 10⁷ UFC/g de suelo.

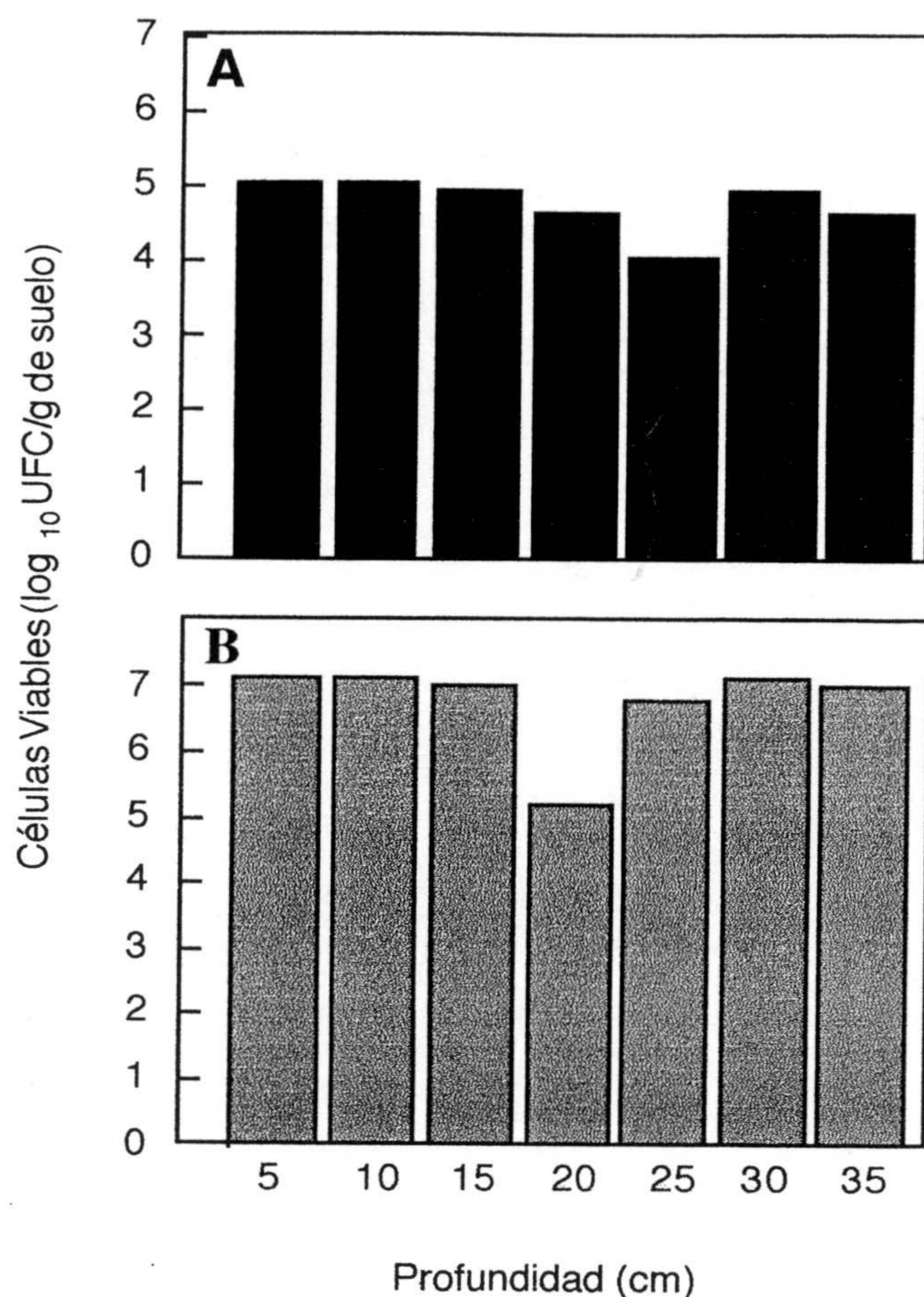


Figura 43. Supervivencia de la cepa DOT-T1E en columnas abiertas y en presencia de 1% (v/p) de tolueno. Células de la cepa DOT-T1E se mezclaron con suelo del Jardín de la Estación Experimental del Zaidín tamizado y se depositaron en una columna de suelo, al suelo se le adicionó 1% de tolueno por la parte superior. Las Figuras A y B muestran la supervivencia de la cepa pasados 1 (A) y 17 (B) días de la descarga de tolueno.

6.1.1 Influencia de la concentración de oxígeno en la supervivencia de DOT-T1E en columnas de suelo

Para los fines de biorremediación en suelo para los que nos interesaría utilizar a la cepa DOT-T1E un factor importante a tener en cuenta es la supervivencia de la cepa a lo largo de un perfil de suelo en condiciones de limitación de aporte de oxígeno. Se procedió a la inoculación de columnas de suelo como ya se ha indicado anteriormente excepto que las entradas de éstas se mantuvieron cerradas con tapones mininert (ver sección 17.1 de

Materiales y Métodos) para evitar la salida o la entrada de gases. La parte superior de la columna se mantuvo abierta para simular condiciones naturales. En estas condiciones se determinó el número de células viables y la concentración de oxígeno durante 15 días.

Los resultados se muestran en la Figura 44 donde se presenta la estimación del número de células (A) y la medida de la concentración de oxígeno (B). Se observó que se estableció un perfil de UFC por gramo de suelo, de manera que en la parte superior y hasta 10 cm el número de UFC por gramo de suelo de la cepa bajo estudio se mantuvo constante entre 10^7 y 10^6 durante los 15 días de la realización del ensayo. Entre 10 y 20 cm el número de UFC por gramo de suelo de DOT-T1E se mantuvo a una densidad celular de aproximadamente 10^6 durante los primeros 7 días del ensayo, pasado este tiempo el número de células disminuyó alcanzándose del orden de 10^3 UFC/g de suelo al final del ensayo. En la parte inferior de la columna (a partir de 20 cm) el número de UFC por gramo de suelo descendió pasados dos días de la inoculación hasta niveles por debajo de nuestros límites de detección.

Por otra parte, se determinó la concentración de oxígeno presente en cada entrada de la columna a lo largo del tiempo. En la Figura 44B se muestran los resultados obtenidos. La medida de la concentración del oxígeno nos reveló la existencia de un perfil de concentraciones a lo largo de la columna y a lo largo del tiempo. Así la concentración del gas fue mayor en la parte superior y en los primeros días del ensayo y alcanzó los valores mínimos en la parte inferior y tras 15 días de incubación. Se observó que la pérdida de viabilidad celular estuvo asociada a la disminución de la concentración de oxígeno presente en el suelo.

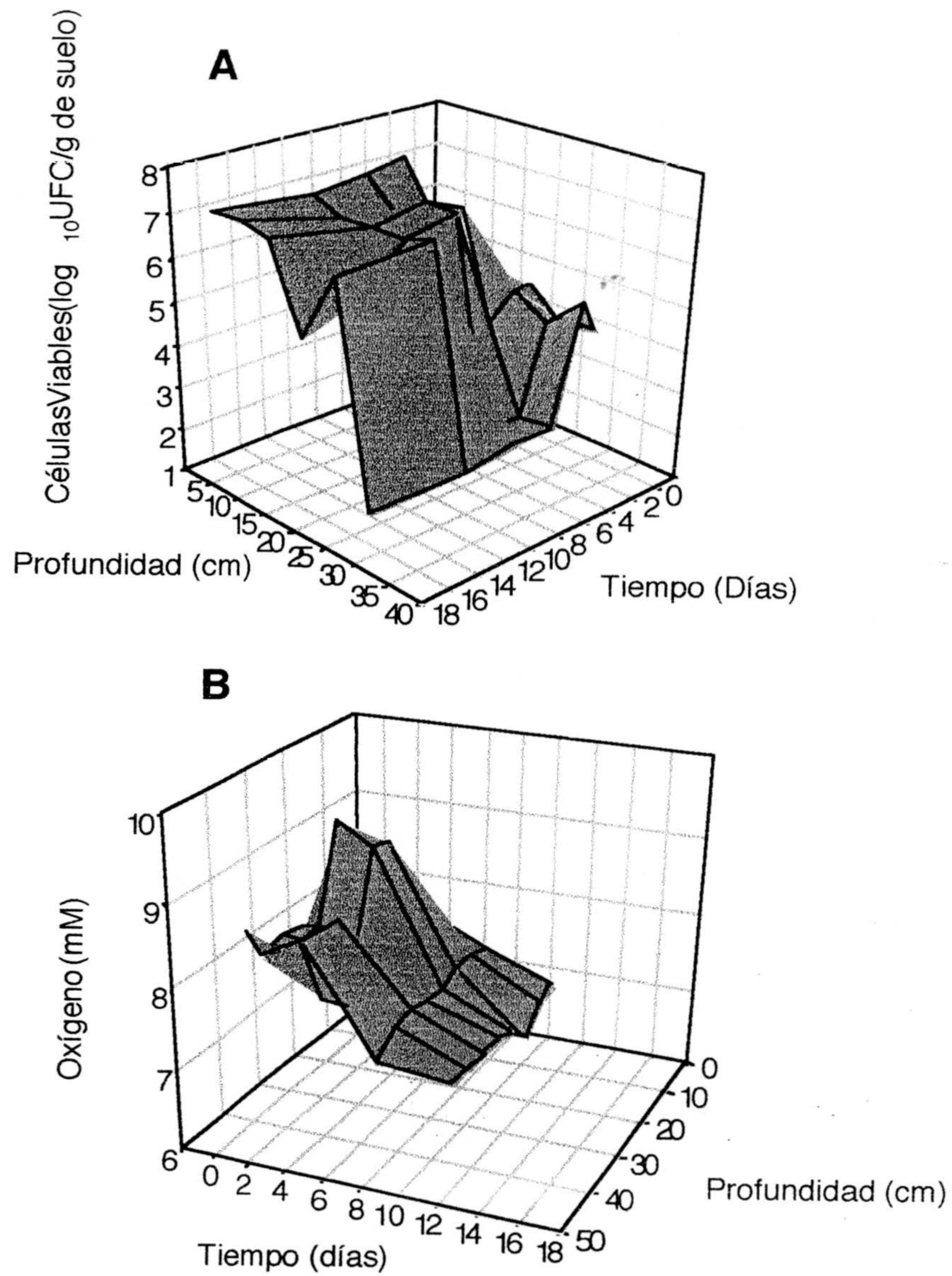


Figura 44. Supervivencia de DOT-T1E y determinación de la concentración de oxígeno en el tiempo y a lo largo de columnas de suelo en presencia de tolueno. La inoculación de las columnas se realizó como se ha descrito anteriormente excepto que las entradas a lo largo de la columna se cerraron, manteniéndose abierta solo la parte superior. En las gráficas se presenta el número de células viables presentes como el \log_{10} UFC/g de suelo (A) y la concentración de oxígeno en mM (B) frente al tiempo y a la profundidad de la columna en cm. La concentración de oxígeno se determinó por cromatografía de gases como se describe en el apartado 17.3 de la sección de Materiales y Métodos.

6.1.2 Medida de la concentración de tolueno y CO₂ en columnas de suelo inoculadas con DOT-T1E en presencia de tolueno

Una vez evaluada la supervivencia de las cepas en columnas cerradas se pensó en la evaluación del estado metabólico de las mismas a lo largo de éstas columnas. Para ello se determinó la concentración de CO₂ como indicadora de mineralización de tolueno por parte de la cepa introducida. También se determinó la concentración de tolueno presente en las columnas. Debido al comportamiento observado por parte de la cepa en columnas cerradas, se llevaron a cabo ensayos en los que se determinaron distintos parámetros en las primeras 24 horas de la inoculación ya que ello aseguraba la presencia de oxígeno. Para la inoculación se procedió como se ha descrito anteriormente y la toma de muestras se realizó a las 0, 2 y 24 horas. Los resultados para las determinaciones a tiempo 0, 2 y 24 horas se muestran en la Figura 45. Se observó que pasadas dos horas de la adición de tolueno, este se localizó principalmente en la parte superior de la columna a una concentración del orden de 1mM, en estas condiciones el número de UFC de la cepa bajo estudio por gramo de suelo fue de aproximadamente 10⁷ en toda la columna y la cantidad de CO₂ fue superior en la parte superior, justo donde se localizó mayor cantidad de tolueno. La situación cambió pasadas 24 horas debido a que se observó un descenso en el número de células en la parte baja. En estas condiciones se localizó tolueno a lo largo de toda la columna aunque presentaba mayor concentración en la parte superior. Cuando se midió la concentración de CO₂ se observó que independientemente de la densidad celular alcanzada por la cepa bajo estudio a lo largo de la columna existió un aumento similar en la concentración de este gas.

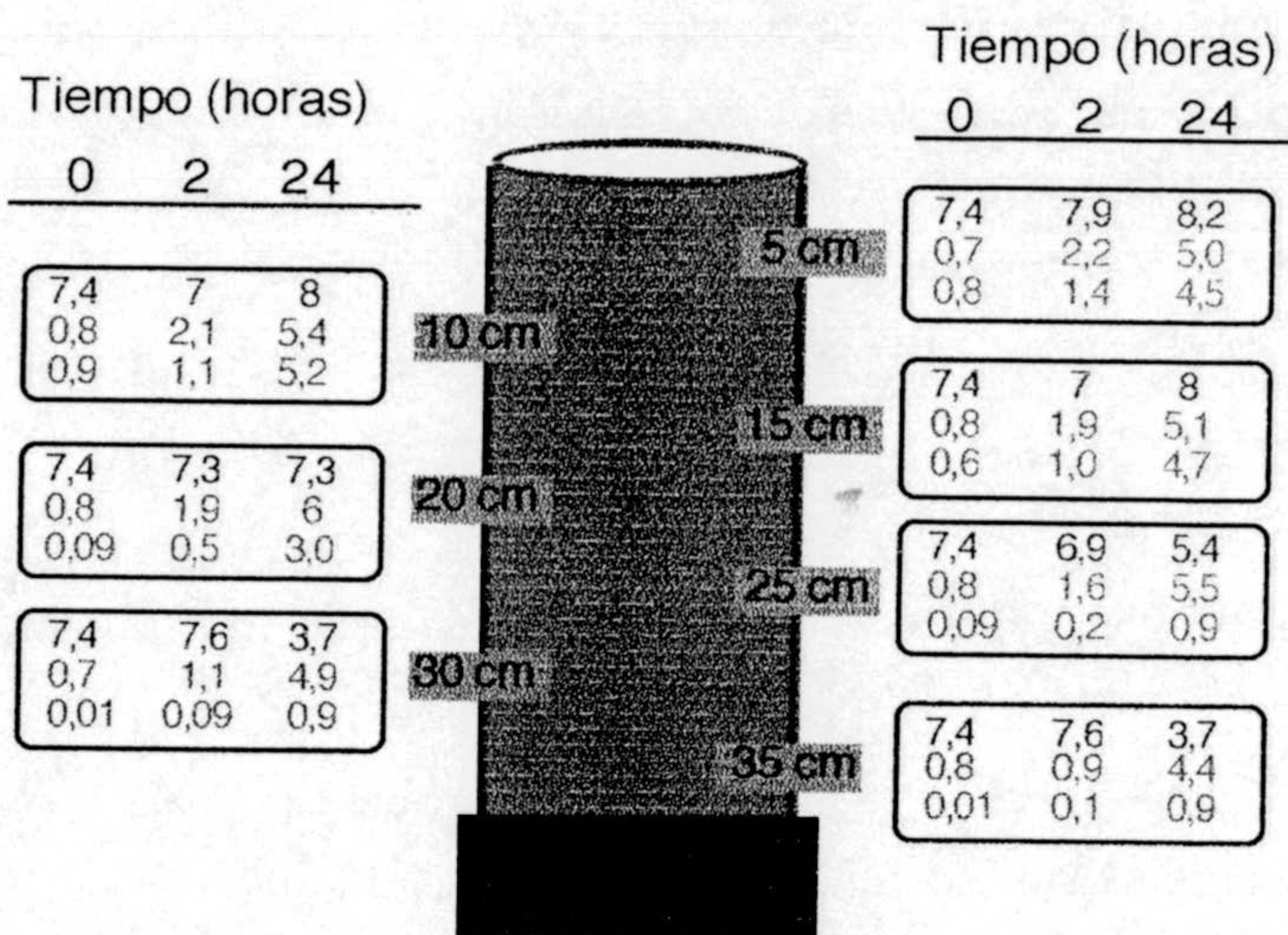


Figura 45. Esquema de una columna de suelo en la que se muestra la supervivencia de DOT-T1E y las determinaciones de la concentración de CO₂ y oxígeno presentes a lo largo del tiempo. Células de DOT-T1E se inocularon en columnas a las que se adicionó posteriormente 1% (p/v) de tolueno por la parte superior de la misma. Pasados 0, 2 y 24 horas de la adición del hidrocarburo aromático se estimó el número de células como el log₁₀ UFC/g de suelo (en verde) y la concentración de CO₂ (mM) (en azul) y de tolueno (mM) (en rojo).

6.2 Distribución de la cepa DOT-T1E a lo largo de la columna de suelo.

6.2.1 Distribución en columnas con tolueno

Hasta ahora para determinar la supervivencia de la cepa en columnas se mezcló ésta con el suelo y se le adicionó tolueno. A efectos de aproximación a una situación real de contaminación de un suelo se diseñaron ensayos con columnas cerradas encaminados a evaluar la supervivencia, multiplicación y distribución de la cepa a lo largo de columnas de suelo anteriormente contaminadas con 1% (v/p) de tolueno. Para ello columnas de suelo en presencia de tolueno se inocularon con 1 mL de células a una densidad de 10⁷ UFC/g de suelo por la parte superior. Se analizó la presencia de la cepa y la concentración de CO₂ presente tomando muestras de cada entrada al inicio y pasados 7 días de la inoculación. Los resultados se muestran en la Figura 46. Se observó que pasadas 2 horas de la inoculación la mayoría de las células de la cepa se localizaron en la parte superior de la columna y dentro de los 10 primeros cm. Sin embargo pasados 7 días se observó que las bacterias alcanzaron las partes bajas de la misma alcanzando una densidad de 10² UFC/g de suelo. Esto demostró movimiento vertical de la cepa facilitado probablemente por el movimiento del agua existente en el suelo. Con respecto a la concentración de CO₂

presente a lo largo de la columna se observó un aumento de la misma a los 7 días de la inoculación indicando que incluso a densidades bajas la cepa presentó actividad metabólica elevada como hemos referido anteriormente.

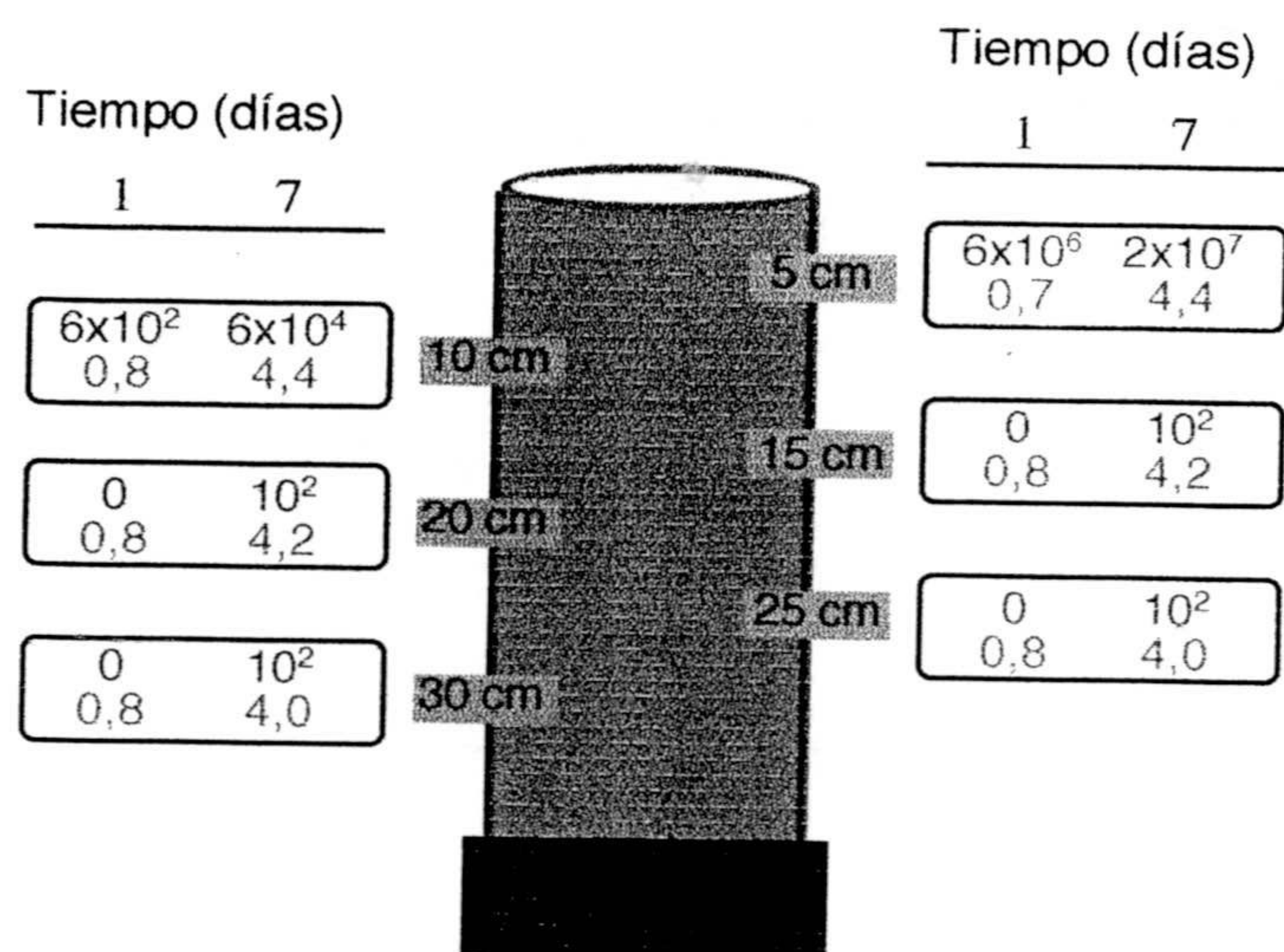


Figura 46. Esquema de la distribución vertical de la cepa DOT-T1E a lo largo de una columna de suelo. Células de DOT-T1E se inocularon en columnas contaminadas con 1% (p/v) de tolueno por la parte superior de la misma. Pasados 1 y 7 días de la introducción se estimó el número de células como el \log_{10} UFC/g de suelo (en verde) y la concentración de CO₂ (mM) (en azul).

6.2.2 Distribución vertical en columnas en presencia de mezclas de hidrocarburos

Con el fin de determinar el comportamiento de la cepa en situaciones reales de contaminación se evaluó la supervivencia y multiplicación de la cepa cuando se inoculó en columnas de suelo en presencia de mezclas complejas de hidrocarburos. Como se describió en la sección 5 la cepa DOT-T1E se estableció y se multiplicó en suelos en presencia de 10% de gasolina de 98 octanos. Se consideró la inoculación de ésta en una columna de suelo contaminada con este tipo de gasolina a una concentración del 10% (v/p). La cepa se introdujo por la parte superior de la columna en 1 mL de 1xM9 a una densidad de 10^7 UFC/g de suelo. Los resultados se muestran en la Tabla 26. Se observó que tras 2 horas de la inoculación la cepa alcanzó a situarse en los primeros 15 cm de la columna, se multiplicó en estas zonas y como en el caso anterior pasados 7 días alcanzó las partes bajas de la columna alcanzando una densidad celular de 10^2 UFC/g de suelo a partir de los 20 cm y hasta abajo.

Tabla 26. Distribución a lo largo de una columna de suelo contaminada con mezclas de hidrocarburos aromáticos de la cepa DOT-T1E

Tiempo (Días)	Profundidad desde la parte superior de la columna (cm)						
	5	10	15	20	25	30	35
1	8×10^4	15×10^4	9×10^2	0	0	0	0
7	9×10^6	33×10^6	16×10^6	10^2	10^2	10^2	10^2

Células de DOT-T1E se inocularon a una densidad de 10^7 UFC/g de suelo en columnas contaminadas con 10% (p/v) de gasolina. El número de células presentes a lo largo de la misma se estimó pasados 1 y 7 días de la inoculación.

En este caso se pudo observar que debido a que la mezcla de hidrocarburos no resultó ser tan tóxica para la célula, como demuestran los experimentos de microcosmos, esta alcanza partes más bajas de la columna que en el caso de la inoculación en columnas con tolueno. Pero pasados 20 cm lo que se hace limitante en todos los casos es la concentración de oxígeno que impide en los dos casos que la cepa se establezca a densidades celulares más elevadas.

DISCUSIÓN



La degradación biológica de contaminantes, conocida como biorremediación, conlleva ventajas con respecto a los métodos tradicionales físico-químicos ya que los microorganismos ofrecen la posibilidad de mineralizar los compuestos hasta CO_2 y agua, por lo que no se generan de manera secundaria compuestos recalcitrantes tóxicos. Además tiene bajo coste económico. A pesar de las ventajas de los tratamientos biológicos, éstos no se suelen utilizar para tratamientos de zonas contaminadas.

Por el contrario, la extracción de contaminantes del suelo utilizando procesos físico-químicos no lleva a la eliminación de los contaminantes, sino que en algunos casos simplemente se cambian de localización generando zonas con concentraciones tóxicas para los microorganismos. Así la utilización de estos métodos es debida a que los tratamientos físico-químicos son rápidos y permiten que se concluyan en un periodo corto de tiempo necesario para su eliminación. La razón de los fracasos en biorremediación se deben por un lado a que la mayoría de los microorganismos degradadores de hidrocarburos aromáticos no toleran concentraciones elevadas de éstos y, por el otro lado a la falta de estudios fisiológicos y ecológicos acerca de la supervivencia de bacterias en sitios contaminados y los factores que infuyen en la biodegradación por parte de estos microorganismos.

La descripción en los últimos años de cepas del género *Pseudomonas* tolerantes a altas concentraciones de disolventes orgánicos ha suscitado un considerable interés debido a que, por un lado permiten estudiar los mecanismos fisiológicos y moleculares de esta inusual capacidad y, por el otro lado, porque permitirán la aplicación práctica de estos microorganismos en sitios con altas concentraciones de compuestos aromáticos (estireno, tolueno, benceno, xilenos, etc) que a concentraciones elevadas son muy tóxicos para la microbiota que lleva a cabo su mineralización.

En este sentido, en el Grupo de Degradación de Tóxicos Orgánicos se están haciendo esfuerzos por determinar las bases fisiológicas y moleculares que permiten a determinadas cepas de *Pseudomonas* tolerar altas concentraciones de disolventes orgánicos, así como evaluar la supervivencia de las mismas en suelos en presencia de concentraciones tóxicas de los mismos.

En este trabajo de Tesis Doctoral se ha examinado el tratamiento de suelos contaminados por un cepas del género *Pseudomonas* que presentan distintos niveles de tolerancia a disolventes y que utilizan tolueno como fuente de carbono y energía.

1. CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DE UNA CEPA DE *Pseudomonas* CAPAZ DE TOLERAR ALTAS CONCENTRACIONES DE DISOLVENTES ORGÁNICOS

Como se ha referido en la Introducción de esta Tesis Doctoral la identificación de microorganismos capaces de utilizar disolventes orgánicos como fuente de carbono y energía se describió por primera vez al principio de este siglo. Sin embargo, hasta los últimos años no se habían descrito microorganismos capaces de tolerar concentraciones elevadas de disolventes orgánicos en el medio de cultivo. En nuestro grupo de investigación y anterior al inicio de esta Tesis Doctoral se describió la existencia de una cepa denominada DOT-T1 que toleraba hasta el 90% (v/v) de tolueno en el medio (Ramos *et al.*, 1995).

En todos los casos descritos de bacterias tolerantes, éstas se identificaron como pertenecientes al género *Pseudomonas* y la mayoría como pertenecientes a la especie *P. putida* (Aono *et al.*, 1992, Cruden *et al.*, 1992, Inoue y Horikoshi., 1989, Li *et al.*, 1998, Ramos *et al.*, 1995, Shima *et al.*, 1991, Weber *et al.*, 1994, Weber *et al.*, 1993). De todas las cepas que presentaron la capacidad de tolerar altas concentraciones de determinados disolventes en el medio sólo la cepa *P. putida* Idaho (Cruden *et al.*, 1992) y *P. putida* DOT-T1 utilizaron estos como fuente de carbono y energía. En contraste con *P. putida* Idaho que utiliza la ruta TOL para degradación de tolueno, DOT-T1 utiliza la ruta TOD (Mosqueda *et al.*, 1999) lo que indica que la capacidad de multiplicarse en presencia de concentraciones elevadas de disolventes orgánicos es, en principio, independiente de la ruta metabólica de degradación del mismo, y es característico de cada cepa. En concordancia con esta hipótesis, es que un mutante de DOT-T1, construido por mutagenesis dirigida para eliminar la actividad tolueno dioxigenasa, era tan tolerante a tolueno como la cepa silvestre (Mosqueda *et al.*, 1999). Por otro lado, cepas descritas como degradadoras de tolueno tales como *P. putida* EEZ15 (ruta TOL), *P. putida* F1 (ruta TOD) y *P. mendocina* KR1 (ruta tolueno 4-monooxigenasa) muestran alta sensibilidad a tolueno cuando se cultivan en presencia de concentraciones elevadas de este hidrocarburo aromático. Así en presencia de concentraciones mayores de 0,2% (v/v) de tolueno se observó la pérdida de viabilidad total de las tres últimas cepas. Además, al contrario que la cepa DOT-T1 que tolera concentraciones del 10% (v/v) de disolventes orgánicos cuyo $\log P_{ow}$ es igual o mayor a 2.3 (ej. Heptano ($\log P_{ow}$ 4,1), *p*-xileno ($\log P_{ow}$ 3,1), heptanol ($\log P_{ow}$ 2,4)) la mayoría de las cepas de *Pseudomonas* (como *P. putida* F1, EEZ15 y *P. mendocina* KR1) sólo toleran concentraciones del 10% (v/v) de disolventes cuyo $\log P_{ow}$ es igual a 4,1.

El grupo del Dr. B. Witholt describió que *Pseudomonas oleovorans* es capaz de multiplicarse en presencia de altas concentraciones de n-octano y 1-octeno. El crecimiento de esta cepa en presencia de concentraciones elevadas de n-octano provocó daños celulares que se pusieron de manifiesto a través de la observación de la rotura de la membrana celular (de Smet *et al.*, 1978 y 1983). De forma similar, Cruden y colaboradores (1992) describieron que la cepa *P. putida* Idaho presentaba daños en la membrana celular cuando se cultivaba en presencia de 20% (v/v) de *p*-xileno tal y como puso de manifiesto el estudio de imágenes de microscopía electrónica de esta cepa. En estudios de microscopía electrónica con la cepa DOT-T1 se observó que cuando las células se cultivaron en presencia de 1% (v/v) de tolueno mostraron un espacio periplásmico ensanchado con respecto al observado en células cultivadas en ausencia del hidrocarburo aromático (Figura 16 A y B). En bacterias Gram-negativas el mantenimiento del espacio periplásmico implica la existencia de interconexiones entre las proteínas de la membrana interna y externa con la capa de peptidoglicano (Bouveret *et al.*, 1995., de Mot y Vanderleylen, 1994., Lazzaroni y Portalier, 1992), lo que implica que la membrana externa puede tener una implicación en los mecanismos de resistencia a disolventes por parte de esta cepa. Células de *P. putida* DOT-T1 cultivadas en medio líquido con 10% (v/v) de tolueno se observó que, además del espacio periplásmico ensachado, aparecieron evaginaciones de la membrana (Figura 17A y B), aunque el significado de esas evaginaciones es desconocido.

En relación a la tolerancia a xileno de células de *P. putida* Idaho se describió que durante el crecimiento en presencia de 20% (v/v) existía un periodo inicial anterior a la multiplicación en el que se observó muerte celular seguido de un periodo de crecimiento exponencial. Además, al alcanzar la fase estacionaria de crecimiento se observó pérdida de viabilidad celular. Cuando se estudió la viabilidad de la cepa *P. putida* DOT-T1 tras añadir tolueno se observó la pérdida de viabilidad inicial cuando las células se precultivaron en medio LB, pero cuando se precultivaron en presencia de 10% (v/v) no se observó pérdida de viabilidad. En esta cepa no se observó la sensibilidad presentada por *P. putida* Idaho en la fase estacionaria ya que cuando se cultivó en presencia de 10% (v/v) de tolueno el número de UFC/mL no disminuyó significativamente al alcanzar esta fase de crecimiento.

Se ha descrito que la presencia de cationes divalentes en el medio de cultivo (Ca^{2+} , Mg^{2+}) fortalece las interacciones laterales entre moléculas de LPS de bacterias gram-negativas, ya que neutralizan la repulsión electrostática de los LPS entre sí y favorecen la formación de una red estable de naturaleza hidrofílica sobre la superficie de la membrana externa (Nikaido y Vaara, 1985., Okuyama *et al.*, 1991). Esto origina que una de las consecuencias inmediatas sea que las bacterias gram-negativas sea menos sensibles a la presencia de disolventes orgánicos produciéndose un incremento en el rendimiento celular

como describieron Inoue y colaboradores en 1991 y Weber y de Bont en 1995. Parece que los iones Mg^{2+} también mejoran la tolerancia de la cepa DOT-T1 a choques de tolueno ya que en presencia de 10 mM de $MgSO_4$ (frente a 1 mM en el medio estandar), la adición de 1% (v/v) de tolueno, no resultó en la pérdida de viabilidad inicial al entrar en contacto con el disolvente de células precultivadas en LB (Tabla 6). Asimismo, cabe mencionar el papel que estos cationes pueden ejercer en la tolerancia a tolueno en cepas sensibles. Así, se observó que células de la cepa *P. putida* F1 eran capaces de crecer en presencia de 1% (v/v) de tolueno cuando se adicionan al medio 10 mM de Mg^{2+} , cuando en ausencia de este aporte adicional esta cepa es incapaz de tolerar 1% (v/v) de tolueno. Esto marca el factor crítico de la membrana citoplasmática como sitio de actuación de los disolventes orgánicos y el papel protector de la membrana externa en los mecanismos de defensa de los microorganismos frente a concentraciones tóxicas de disolventes.

2. AISLAMIENTO DE CEPAS DEGRADADORAS DE TOLUENO DE SUELOS CONTAMINADOS

En muchos de los casos descritos en la bibliografía, con respecto a la biorremediación de suelos contaminados, la utilización de los microorganismos integrantes de la microbiota del suelo conlleva ventajas con respecto al uso de otros microorganismos inoculados (Song y Bartha, 1990, Mu y Scow, 1994, Leahy *et al.*, 1990). Estas ventajas se deben, fundamentalmente, a que en el suelo existen numerosos factores bióticos y abióticos que determinan en última instancia la supervivencia y la actividad de microorganismos introducidos para un fin determinado (Van Veen *et al.*, 1997). Pero como se ha referido en la Introducción y en la sección anterior el tolueno y otros disolventes orgánicos son tóxicos para los microorganismos, ya que se acumulan en la membrana citoplasmática, la desorganizan y colapsan el potencial de membrana; esto unido a la pérdida de iones y proteínas provoca numerosos daños que conducen irreversiblemente a la muerte celular (de Smet *et al.*, 1978, Sikkema *et al.*, 1995).

En este sentido se han llevado a cabo estudios que han determinado que uno de los factores que afecta a la biodegradación en suelo por parte de la microbiota es que en presencia de concentraciones elevadas de contaminantes, en muchos casos no se produce la biodegradación del compuesto, debido principalmente a la toxicidad del mismo sobre los microorganismos del suelo (Davis y Madsen, 1996). Sin embargo, el número de estudios relacionados con la tolerancia intrínseca de la microbiota indígena al impacto provocado tras la adición de concentraciones elevadas de disolventes en suelo, no se ha estudiado en detalle.

Como una aproximación al inicio de los estudios de supervivencia en suelos contaminados con la cepa *P. putida* DOT-T1, se consideró el estudio del comportamiento de la microbiota indígena tras choques con concentraciones elevadas de tolueno.

Para evaluar si en un suelo, sin antecedentes de contaminación, existían bacterias tolerantes se simuló una descarga de tolueno en los mismos y se analizó su efecto en la supervivencia de las bacterias. Cabe destacar que en todos los suelos y poblaciones analizadas de bacterias de la microbiota, la respuesta a tolueno estuvo en función de la concentración del hidrocarburo, así mientras que la adición de 10% (v/p) de tolueno resultó en la supervivencia del 1% de la población, concentraciones inferiores de tolueno permitieron la supervivencia de más del 90% de las bacterias. Esto fue una sorpresa pues la adición de 1% (p/v) de tolueno a suelos en los que se había introducido la cepa *P. putida* DOT-T1 resultó en la supervivencia de sólo el 0,001% de las UFC/g de suelo de la cepa (como referiremos más adelante).

Debido a esta observación consideramos estudiar la naturaleza de las bacterias de la microbiota del suelo que toleraban altas concentraciones de tolueno. Como resultado se aislaron dos cepas, denominadas MTB5 y MTB6, que tras diferentes análisis, entre los que destaca la secuenciación del ADN que codifica al ARNr 16S, se encuadraron como pertenecientes al género *Pseudomonas sensu stricto* de la subclase gamma de protobacterias y a la especie *P. putida*.

Para la caracterización de estas cepas, así como la de una cepa degradadora de tolueno aislada de un biofilm en contacto con el mismo, *P. putida* SMO116, se estimó la tolerancia que presentaron en medio líquido a diferentes disolventes orgánicos. Las cepas MTB5 y SMO116 no toleraron concentraciones mayores de 0,1% (v/v) de tolueno en el medio de cultivo y se consideraron sensibles a concentraciones elevadas de tolueno. Por el contrario, MTB6 toleró hasta el 10% (v/v) por lo que se consideró tolerante, aunque en contraste con los datos obtenidos para *P. putida* DOT-T1 fue más sensible ya que no toleró concentraciones mayores del 10% (v/v) en el medio de cultivo.

En relación a estos resultados concluimos que la tolerancia a disolventes orgánicos presentada por las cepas del suelo puede deberse a una combinación de factores bien al acceso limitado del disolvente, a la existencia de cepas tolerantes en el suelo o las dos posibilidades.

2.1 Respuesta fisiológica a concentraciones elevadas de disolventes

Como se ha indicado en la sección de Introducción de esta Tesis Doctoral los microorganismos han desarrollado una serie de mecanismos frente a concentraciones tóxicas

de disolventes en el medio que en cepas del género *Pseudomonas* consisten en la existencia de mecanismos bioquímicos que eliminan los disolventes orgánicos de las membranas (Isken y de Bont., 1996, Kieboom *et al.*, 1997, Ramos *et al.*, 1997 y 1998) y barreras físicas que ayudan a la célula a incrementar su impermeabilidad a los disolventes (Heipieper *et al.*, 1992, Pinkar *et al.*, 1996, Ramos *et al.*, 1997, Weber *et al.*, 1994).

La isomerización *cis/trans* de los ácidos insaturados de la membrana, se ha considerado un mecanismo de adaptación en respuesta a cambios de temperatura en células de *E. coli* (Diefenbach *et al.*, 1992) y provee a la célula de un mecanismo muy rápido para compensar el incremento en la fluidez de la membrana. Además, se ha descrito como mecanismo en la respuesta a disolventes orgánicos por cepas tolerantes ya que podría ejercer un efecto rigidificante sobre la membrana (Sikkema *et al.*, 1995, Ramos *et al.*, 1997, Weber *et al.*, 1994, Weber, 1995).

En ausencia de tolueno las cepas MTB6, MTB5 y SMO116 mostraron niveles bajos de ácidos grasos insaturados en *trans*. La adición de 0,1% (v/v) de tolueno o la presencia de tolueno en la fase gaseosa, provocó el aumento del nivel de ácido grasos insaturados en forma *cis* en la relación *cis/trans*. Esta reacción de isomerización la lleva a cabo la isomerasa Cti que se sintetiza constivamente y que provoca la isomerización no sólo en respuesta a tolueno, sino también a la presencia de otros disolventes como propilbenceno y compuestos no aromáticos como octanol y metales pesados como cadmio y zinc (Junker y Ramos, 1999, Godoy y Ramos, resultados sin publicar). Esta respuesta ocurre tanto en células sensibles a tolueno como tolerantes a éste. Por ello se considera que este mecanismo de defensa opera como parte de un sistema de defensa a estreses mediambientales en las células.

La existencia de este tipo de mecanismos en células sensibles y tolerantes corrobora los estudios realizados por Isken y de Bont (1996) y Ramos y colaboradores (1997) que llegaron a la conclusión que en cepas tolerantes el mecanismo de isomerización *cis/trans* no es el único implicado en la defensa frente a concentraciones elevadas de tolueno en el medio, sino que en cepas que presentan tolerancia existen otro tipo de mecanismos más eficaces que previenen la acumulación de los disolventes en las membranas celulares tales como los sistemas de exclusión (Isken y de Bont, 1996, Kieboom *et al.*, 1997, Ramos *et al.*, 1998, Segura *et al.*, 1999).

La existencia de sistemas de exclusión activa de disolventes hace muy interesante su estudio molecular, debido a las implicaciones prácticas y de conocimiento acerca de los mecanismos de tolerancia que presentan las cepas resistentes a altas concentraciones de disolventes. Por ello en los últimos años se ha hecho hincapié en los mecanismos moleculares y hasta ahora se han descrito la existencia de genes que codifican para estos sistemas (Kieboom *et al.*, 1998 y Segura *et al.*, 1999, Mosqueda y Ramos 1999). Así se han

identificado dos sistemas implicados en la tolerancia a disolventes, el codificado por los genes *srpABC* (Kieboom et al., 1998) y los codificados por los genes *ttgABC* (Ramos et al., 1998). En estudios realizados con la cepa *P. putida* S12 Kieboom y colaboradores (1998) demostraron que cuando se transfieren estos genes a cepas sensibles se produce un aumento de la tolerancia a disolventes, por lo que este sistema parece inducible en presencia de tolueno en cepas tolerantes. Por otro lado estudios realizados por Mosqueda y colaboradores (1999) en la cepa *P. putida* DOT-T1 llevaron a la descripción de un gen localizado aguas abajo de los genes *todST*, del operón TOD, que parece estar implicado en la tolerancia a tolueno y denominado *ttgD*.

Utilizando oligonucleótidos específicos para los genes *ttgABC* y *ttgD* se observó su existencia en las cepas MTB5, MTB6 y SMO116. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos para la cepa DOT-T1E-18 (que es un mutante en el gen *ttgB*) en la que no se observó descenso en la acumulación de tolueno en las membranas, sin embargo en presencia de tolueno suministrado en la fase gaseosa el sistema funcionaba y se observó una disminución de la cantidad de tolueno acumulado (Ramos et al., 1998) en esta cepa estos resultados indicaron que la cepa poseía un sistema de exclusión constitutivo (constituido por los genes *ttgABC*) y otro sistema inducible, como el de *srpABC*. La existencia en las cepas sensibles de estos sistemas corrobora lo referido que ocurre en la cepa DOT-T1E-18 por lo que posiblemente estos sistemas descritos se expresen de forma constitutiva y existen otro/s sistema/s que se expresen en células tolerantes en presencia de altas concentraciones de tolueno.

Para evaluar la eficacia de estos sistemas en las cepas bajo estudio se consideró la medida de la acumulación de ^{14}C -tolueno en las membranas. Isken y de Bont (1996) y Ramos y colaboradores (1997) utilizando ^{14}C -tolueno y 1,2,4- (^{14}C)-triclorobenceno (un análogo del tolueno que no es metabolizable por las células) observaron que mientras esta disponible un suministro suficiente de energía las células de cepas tolerantes mantienen una concentración baja de disolvente en las membranas celulares. Se encontró que las cepas *P. putida* MTB5 y SMO116 acumularon más tolueno en las membranas que MTB6. Estos resultados nos llevaron a concluir que la cepa MTB6 utiliza otro sistema de eliminación de disolventes que se expresan cuando las células se cultivan en tolueno.

Lo que quedaría por determinar es si en estas cepas sensibles estos genes se expresan o no, o a que intensidad.

2.2 Degradación de tolueno

Hasta ahora y como se ha descrito en la Introducción de esta Tesis Doctoral existen descritas en la bibliografía cinco rutas para degradación aerobia de tolueno en cepas pertenecientes al género *Pseudomonas* (Gibson *et al.*, 1970, Olsen *et al.*, 1994, Shields *et al.*, 1989, Whited y Gibson., 1991, Worsey y Williams, 1975). De todas las rutas la codificada en el plásmido TOL pWW0 está estudiada muy bien a nivel de organización genética y de regulación (Ramos *et al.*, 1997), el resto están siendo estudiadas por numerosos grupos de investigación (ver sección de Introducción). La mayoría de las cepas utilizan una única ruta para degradación de aromáticos aunque las enzimas que participan en la degradación, en muchos casos se caracterizan por poseer un perfil de sustrato muy amplio y son inducidas por numerosos sustratos. Así por ejemplo, la enzima tolueno dioxigenasa codificada en el operon TOD de *Pseudomonas putida* F1 no sólo cataliza la dioxigenación del tolueno sino que funciona como monooxigenasa con fenol y nitrotoluenos (Spain y Gibson., 1988, Spain *et al.*, 1989, Robertson *et al.*, 1992) además de ser la responsable de la declorinación aerobia del tricloroetileno (Wackett y Gibson, 1988).

Como hemos referido anteriormente tanto las cepas aisladas en nuestro laboratorio, como la cepa cedida por el grupo de Dinamarca se caracterizaban por utilizar tolueno como fuente de carbono y energía. Así, se consideró el establecimiento de la ruta utilizada por estas cepas para degradación de tolueno. El estudio de la ruta se abordó en primer lugar a partir de las medidas de consumo de oxígeno en células de las cepas bajo estudio cultivadas en presencia de tolueno y a expuestas a diferentes compuestos que son intermediarios en las distintas rutas de oxidación de tolueno. En este tipo de estudios se ha descrito que hay que tener en cuenta el paso del compuesto a través de la membrana citoplasmática para la medida del aumento en la concentración de oxígeno utilizando células enteras (Weber *et al.*, 1995). Así se espera que sustratos tales como el tolueno, los cresoles y los xilenos pasen al interior de la célula por difusión a través de la membrana citoplasmática por lo que la ausencia de consumo de oxígeno en presencia de *o*-, *m*- , *p*-cresol indicó que estos compuestos no eran intermediarios en la degradación de tolueno en ninguna de las cepas analizadas. Estos resultados descartan la existencia en la cepa de las rutas de degradación de tolueno a través de las enzimas tolueno 2-, 3- y 4-monooxigenasa en las que los primeros intermediarios de la rutas son el *o*-, *m*- y *p*-cresol. Utilizando oligonucleótidos específicos para los genes: *tmoA* de la tolueno 4-monooxigenasa , *tbuA1* de la tolueno 3-monooxigenasa y *tbmA* de la tolueno 2-monooxigenasa se confirmó que estas rutas no eran las utilizadas por las cepas para degradación de tolueno.

La ruta TOL admite *m*- y *p*-xileno como sustrato. Células de MTB5, MTB6 y SMO116 no oxidaron estos compuestos por lo que se descartó inicialmente la degradación de tolueno a través de hidroxilación del grupo metilo como la codificada en el plásmido TOL.

Sin embargo y debido a que la cepa presentó consumo de oxígeno en presencia de alcohol bencílico y benzoato no se podía descartar inequívocamente la existencia de una ruta TOL de perfil de sustrato restringido. Pero esta hipótesis se descartó por la evidencia de que células de las tres cepas cultivadas en benzoato no provocaron un aumento en la actividad catecol 2,3 dioxigenasa como se esperaría en el caso de de una ruta TOL (Bestetti y Galli., 1987). Además la inexistencia de amplificación con oligonucleótidos diseñados para el gen *xylM*, *xylAB*, *xylC*, *xylE*, *xylR* y *xylS*, y de hibridación con sondas específicas para el gen *xylAB* llevaron a la conclusión de que esta ruta no es la utilizada por las cepas para la degradación de tolueno.

En vista de estos resultados se concluyó que las tres cepas presentaron la misma ruta degradativa que implica la dioxigenación inicial del anillo aromático a través de la tolueno dioxigenasa y descrita para la cepa *P. putida* F1 (Gibson, 1970).

Esta hipótesis se confirmó utilizando oligonucleótidos específicos para los genes del operon TOD y obteniéndose resultados positivos en todos ellos para las cepas de estudio. Además se secuenció el producto obtenido tras la amplificación con oligonucleótidos específicos para el gen *todE* obteniéndose que las tres cepas presentaron entre el 95 y el 100% de similitud a nivel de proteínas con la codificada por la cepa F1. Estos resultados se confirmaron por estudios de hibridación con sondas específicas para estos genes. Además, a través de la determinación de la actividad catecol 2,3 dioxigenasa se encontró que existía un nivel elevado de actividad enzimática en células de las tres cepas cultivadas en tolueno y en presencia de 3-metilcatecol como sustrato como era de esperar en cepas que presentan la ruta TOD para degradación de tolueno.

Por otro lado la medida de actividad enzimática catecol 1,2-dioxigenasa puso de manifiesto que las células presentaron actividad elevada cuando se cultivaron en presencia de benzoato mientras que no se detectó esta actividad en presencia de tolueno. En el caso de la cepa F1 se ha descrito que carece de esta enzima y esto le impide su crecimiento en 3,6-clorocatecol (Spain y Gibson, 1988). Estas observaciones indican que nuestras cepas, que presentaron actividad catecol 1,2 dioxigenasa en presencia de benzoato, son distintas a F1. Por su parte mutantes de la cepa SMO116 incapaces de crecer en alcohol bencílico son capaces de utilizar tolueno como fuente de carbono (Ramos comunicación personal) por lo que estos datos unidos a los obtenidos por células de MTB6 y MTB5 en presencia de alcohol bencílico llevaron a la conclusión que las tres cepas presentan otra ruta de degradación de alcohol bencílico a través de benzoato que es sustrato para la enzima catecol 1,2 dioxigenasa.

Además toda esta serie de datos concuerdan con los obtenidos para la cepa DOT-T1 que presentó un perfil de sustratos similar. Además presenta los genes para degradación de tolueno a través de la ruta TOD (Mosqueda y Ramos, 1999) y se considerará, al igual que en estas tres cepas descritas que presenta otra ruta de degradación.

El hecho de que estas cepas presenten la capacidad de expresar enzimas que degradan un amplio espectro de compuestos que son intermediarios de distintas rutas metabólicas, sugiere que en cepas que están en mediambientes heterogeneos donde existen cambios continuos. La posesión de determinadas capacidades degradativas frente a un perfil elevado de sustratos implica una ventaja, y no necesariamente un peso (Leddy *et al.*, 1995, Johnson *et al.*, 1997). Esta capacidad conlleva a la rapidez en la adaptación de estos microorganismos a condiciones selectivas en el medio ambiente y por lo tanto la ventaja competitiva en la naturaleza. Así se han descrito recientemente en la bibliografía la existencia de cepas con más de una ruta para degradación de un determinado compuesto, en esta cepa los genes que codifican para las rutas están presentes pero no se expresan simultáneamente (Johnson *et al.*, 1997). El hecho de que las tres cepas caracterizadas presenten la ruta TOD y otra ruta alternativa para degradación de alcohol bencílico es llamativo. Leahly y Olsen (1997) describieron que cepas que utilizan la vía de la tolueno dioxigenasa para degradar tolueno degradaban 10 veces más rápido este aromático que otras cepas que sintetizaban tolueno monooxigenasas para el ataque inicial. Estos autores describieron que estas enzimas son más sensibles a bajas concentraciones de oxígeno que las monooxigenasas, esto está de acuerdo con los resultados presentados por Duetz y colaboradores (1994) donde en estudios de competencia en quimiostato de cepas que presentaron distintas rutas degradativas ganaron la competencia las que presentaron rutas de degradación a través de la tolueno monooxigenasa en presencia de concentraciones bajas de oxígeno. Esto implica la gran versatilidad metabólica de las cepas aisladas así como la acomodación a distintas situaciones en el medio ambiente.

3. SUPERVIVENCIA EN SUELOS DE LAS CEPAS DEGRADADORAS DE TOLUENO

La eficiencia de los microorganismos tolerantes a elevadas concentraciones de disolventes orgánicos en la eliminación *in situ* de contaminantes depende tanto de su capacidad de supervivencia, una vez que los microorganismos son introducidos en la zona a descontaminar, como de la adecuada expresión y el funcionamiento de las rutas catabólicas *in situ*. Para ello, una vez caracterizadas las cepas, éstas deben de ser sometidas a una serie de ensayos que permitan evaluar su capacidad de supervivencia y su potencial para eliminar el compuesto contaminante en las condiciones que prevalecen en el medio en el que ha de

funcionar. Además, es de interés evaluar aquellos factores bióticos, fundamentalmente depredadores, y abióticos como la temperatura, pH, oxígeno que estimulen o inhiban el funcionamiento del microorganismo en el medio ambiente (van Veen *et al.*, 1997). Para una aproximación al medio real se utilizan microcosmos, que son una aproximación experimental consistente en la extracción de una parte de un ecosistema natural y su transferencia al laboratorio para realizar ensayos en los que se controlen todos los parámetros a considerar.

Existen muchos diseños de microcosmos y la complejidad de los mismos varía desde unos pocos gramos en un recipiente (Jaffe *et al.*, 1992, Angle *et al.*, 1995) hasta un gran espacio donde pueden controlarse algunas variables medioambientales (Gile *et al.*, 1982, Gillet y Gile, 1976). En muchos casos se ha descrito que los resultados obtenidos en microcosmos son muy aproximados a los estudios realizados *in situ* (Hopkings *et al.*, 1993) por lo que el estudio del comportamiento de cepas en microcosmos edáficos toma gran interés debido a su uso en la evaluación de los posibles efectos ecológicos que pueden derivar de la introducción de un microorganismo.

El tolueno y sus derivados son muy tóxicos para los microorganismos (Sikkema *et al.*, 1995). Las cepas degradadoras de tolueno no son inmunes a estos efectos generales y son sensibles a choques con tolueno. Esto es relevante para *P. putida* EEZ15 (un derivado de *P. putida* mt-2), *P. putida* F1, *P. putida* MTB5, *P. putida* SMO116 y *P. mendocina* KR1 que en medio líquido no son capaces de crecer en presencia de 0,2% (v/v) de tolueno. En contraste DOT-T1 es una de las cepas descritas tolerante a altas concentraciones de tolueno en el medio y MTB6 se consideró tolerante.

Nuestros resultados muestran que las seis cepas de *P. putida* estudiadas son capaces de establecerse en suelos en periodos cortos de tiempo en ausencia de tolueno a niveles de aproximadamente 10^5 a 10^6 UFC/g de suelo, mientras *P. mendocina* KR1 no es capaz de establecerse en estos suelos. Esta misma cepa en estudios realizados por Duetz y colaboradores (1994) se consideró aventajada en estudios de competencia con otras cepas que presentaron diferentes rutas degradativas en ensayos de quimiostato bajo condiciones de limitación de oxígeno, en nuestro caso la incapacidad de establecerse en suelos la hace menos competitiva. Estos resultados sugieren además que los resultados de competición llevados a cabo en el laboratorio no pueden siempre ser extrapolados a medioambientes complejos tales como el suelo.

En suelos contaminados con concentraciones elevadas de disolventes orgánicos observamos que las cepas *P. putida* F1R, MTB5R y SMO116R toleraron choques de tolueno de 1% (v/v) de tolueno en contraste con los resultados obtenidos en líquido. Además la cepa F1R incluso toleró en suelo concentraciones de 10% (v/p) de tolueno. Esto puede reflejar el acceso limitado del disolvente a las células introducidas en suelo debido por una

parte a la adsorción del mismo por las partículas de suelo, y por otra a la ausencia de una mezcla homogénea en el suelo, en contraste con la situación de un medio líquido agitado.

P. putida DOT-T1 tolera altas concentraciones en medio líquido y de acuerdo con esto la cepa tolera altas concentraciones de propilbenceno y de tolueno en suelo. Lo mismo ocurre con la cepa MTB6 que tolera 10% (v/p) de tolueno en suelo. Sin embargo, el número de UFC de DOT-T1 y F1 por gramo de suelo decreció después de choques con 1% y 10% (v/p) de tolueno. Encontramos que después de la adición de tolueno el número de F1 y DOT-T1 por gramo de suelo disminuyó en cerca de 5 órdenes de magnitud para aumentar más tarde. Esto sugirió que la mayoría de las células no fueron capaces de tolerar el choque inicial con los disolventes aunque las células "más tolerantes" fueron capaces de multiplicarse y colonizar el nicho. Así se observó que la preadaptación de células de DOT-T1 a la presencia de disolventes llevó a una disminución en la caída inicial del número de células tras el choque con tolueno. Esto está en consonancia con el hecho de que la respuesta de los microorganismos introducidos en suelos con determinadas características depende de su acervo genético y su situación fisiológica (van Veen *et al.*, 1997). Pero a pesar de esto existen otros factores en suelo que pueden influenciar la bajada en el número de células de las cepas inoculadas en determinadas condiciones.

Así, existen determinados factores que influyen en la supervivencia de los microorganismos inoculados a efectos de biorremediación. Entre los factores abióticos cabe destacar que la disponibilidad de agua, la temperatura, el pH y la concentración de oxígeno y nutrientes son muy importantes (Sims *et al.*, 1993, van Veen *et al.*, 1997) ya que provocan el descenso en el número de células de las cepas introducidas; en algunos casos estos factores actúan indirectamente afectando a la actividad de la microbiota. Los factores bióticos tales como, la depredación por parte de protozoos o a la competencia por parte de otros microorganismos de la microbiota pueden influir también en la supervivencia de las cepas introducidas (van Veen *et al.*, 1997).

La influencia de algunos de estos factores se determinó en microcosmos edáficos en ausencia y en presencia de tolueno tras la introducción de *P. putida* DOT-T1 y F1. Se observó que el grado de recuperación de las cepas después del choque de tolueno estuvo influenciado por la humedad y la temperatura de incubación de las cepas en suelos. Ambas cepas se recuperaron mejor a humedades entre 30% y 45% de la capacidad de campo, en microcosmos en ausencia y presencia de tolueno. La influencia de la humedad en la supervivencia fue más marcada en presencia de tolueno ya que se observó que en presencia de 15% de humedad las células permanecieron viables pero su recuperación fue más lenta, por el contrario la presencia de 5% de humedad en estos suelos contaminados, llevó a un

establecimiento pero las células no se multiplicaron e incluso al final del ensayo hubo pérdida de viabilidad celular.

En general, humedades por debajo del 15% redujeron la supervivencia de las cepas mientras que la supervivencia fue óptima al 30% de la humedad. Algunos autores han descrito que la disponibilidad de agua es un factor determinante en la actividad metabólica de las células introducidas en suelo (Harris, 1981, Brown, 1990). La recuperación más rápida probablemente refleje el hecho de que en estas condiciones la actividad metabólica de las células sea mayor lo cual le ayuda a eliminar tolueno de la membranas a través de sistemas activos, en el caso de DOT-T1, e incrementando la rigidez de la membrana o metabolizando tolueno (Heipieper *et al.*, 1994., Isken y de Bont, 1996., Ramos *et al.*, 1997, 1998, Weber *et al.*, 1994., Segura *et al.*, 1999)

La temperatura de incubación de los suelos es un factor que afecta a la persistencia de la bacteria en los mismos. La actividad de las cepas DOT-T1 y F1 fue óptima a un intervalo de temperatura entre 25° y 30° C, lo cual debería favorecer las actividades metabólicas de las cepas y la eliminación de disolventes fuera de las membranas. No es así en el caso de temperaturas más bajas ya que la síntesis dependiente de temperatura de enzimas y reguladores, así como la termosensibilidad de éstos pueden ser factores que afecten a la mineralización de contaminantes en condiciones medioambientales. A este respecto se ha de mencionar que la expresión del gen *xylS* en *P. putida* no ocurre a temperaturas elevadas (Ramos *et al.*, 1988).

En todos los ensayos realizados en microcosmos, la población de bacterias indígenas capaces de degradar *p*-hidroxifenilacético permaneció relativamente constante lo que indicó que la microbiota del suelo en general no se vió interferida por la introducción de cepas determinadas.

Dado que las cepas *P. putida* DOT-T1E, F1R y MTB6R se establecieron en microcosmos contaminados con concentraciones elevadas de tolueno nos interesó conocer el comportamiento de las cepas cuando se inocularon de forma conjunta. La introducción de DOT-T1E y F1R en suelos contaminados llevó a la conclusión de que la primera coloniza más rápidamente el suelo y por lo tanto sería más efectiva en tratamientos de zonas contaminadas. Datos aportados por Ka y colaboradores (1994) están en concordancia con estos resultados, ya que en estudios de competencia entre cepas degradadoras de 2,4-diclorofenoxiacético el tiempo de retardo anterior a la multiplicación fue el determinante principal de la ventaja de unas cepas sobre otras. Este tiempo de retardo es menos marcado en la cepa DOT-T1 cuando se inocula con F1 y en condiciones de presencia de tolueno. En ausencia de tolueno las dos cepas se establecen en suelos y alcanzan densidades celulares similares.

Cuando se inoculan DOT-T1E y MTB6R en suelos contaminados no se observó competencia, por lo que se consideró que ambas cepas presentan el mismo grado de establecimiento en suelos contaminados. El hecho de la tolerancia tan elevada a disolventes de la primera y que la segunda es un aislado de suelo, que además presenta un nivel de tolerancia a disolventes, hace que las dos se establezcan en este tipo de suelos y alcancen densidades celulares elevadas.

Los resultados obtenidos sugieren que la inoculación de DOT-T1 en suelos contaminados podría ser efectiva para biorremediación de zonas contaminadas con altas concentraciones de tolueno e incluso para aumentar las capacidades de la microbiota existente en suelo. Existen estudios que han demostrado la aplicabilidad de la introducción de microorganismos con determinadas capacidades para potenciar la biodegradación de un compuesto, fundamentalmente en zonas donde la concentración del mismo es tóxico para los microorganismos de la microbiota (Bewley, 1992, Comeau *et al.*, 1993, Hoepet *et al.*, 1994).

De todas las cepas utilizadas se observó que las cepas DOT-T1 y MTB6 se establecieron bien en suelos contaminados en todas las condiciones controladas y alcanzaron altas densidades celulares tras 30 días de incubación. Pero hasta este punto se desconocía si eran o no funcionales en los suelos introducidos, es decir si llevaban a cabo la mineralización total del contaminante. En este sentido Sharabi y Bartha (1993) tras una serie de experiencias llegaron a la conclusión que la producción de CO₂ es proporcional a la degradación de un determinado compuesto por parte de los microorganismos y que la medida del desprendimiento de éste puede considerarse como una medida de biodegradación en suelo.

En nuestros estudios las cepas DOT-T1 y MTB6 fueron funcionales en suelos en presencia de tolueno, como se puso de manifiesto mediante ensayos de mineralización de ¹⁴C-tolueno. En estos ensayos se observó desprendimiento de ¹⁴CO₂ a partir del aromático marcado, lo que demostró que las rutas catabólicas presentadas por las cepas fueron funcionales en bacterias. Estos resultados están en consonancia por los publicados por Delgado y colaboradores (1992) y Duque y colaboradores (1993) sobre la funcionalidad *in situ* de cepas derivadas de *Pseudomonas* B13, un degradador de cloroaromáticos y *P. putida* KT2440, la cual degrada una amplia batería de alquilaromáticos.

Las poblaciones microbianas del suelo también metabolizaron tolueno como se dedujo del aumento en el desprendimiento de ¹⁴CO₂ a partir de ¹⁴C-tolueno aunque la velocidad de mineralización fue menor que el de las cepas introducidas. Esta observación está en consonancia con estudios realizados por Sharabi y Bartha, (1993) que demostraron que la comunidad microbiana que está en estado estacionario en suelo es menos activa que la

población que se está multiplicando de forma activa y que responde a la adición del contaminante.

En general, nuestros resultados muestran que determinadas cepas de *Pseudomonas* son más resistentes a disolventes orgánicos en suelo que en líquido, esto se puede explicar ya que estos microorganismos son capaces de utilizar estos disolventes en suelo y en biofilms (Moller *et al.*, 1996., Reihard *et al.*, 1997) y las partículas de suelo ejercerían de factor de protección frente a concentraciones elevadas de disolventes. De ahí que la microbiota del suelo no se afecte ni por la introducción de microorganismos ni de la adición de contaminantes (como se mostró en la sección anterior). Sin embargo el nivel de tolerancia en suelos está relacionado con el nivel de tolerancia en líquido, ya que a mayor tolerancia en líquido mejor es la recuperación en suelo después de un choque con tolueno. Así en sitios contaminados por aromáticos las cepas tolerantes a disolventes podrían establecerse primero, colonizar el sitio y ser predominantes en la eliminación de estos compuestos.

3.1 Supervivencia en columnas de suelo

El estudio de la biodegradación en suelo es un reto para los investigadores debido a la heterogeneidad del suelo con respecto a los nichos biológicos y a la distribución espacial y disponibilidad de los contaminantes. Uno de los métodos usados para estudiar la actividad de los microorganismos en suelo es el uso de microcosmos como ya hemos indicado, pero nos interesó el desarrollo de métodos más complejos encaminados a evaluar el tratamiento de grandes volúmenes de suelo contaminado y para una aproximación más real a la situación de ambientes naturales. Uno de los sistemas que se han utilizado para estos propósitos han sido las columnas de suelo. Existen numerosos estudios con distintos tipos de columnas, y lo mismo que ocurre en el caso de los microcosmos el diseño de éstas está relacionado con el tipo de interacciones que se deseen analizar (Sun *et al.*, 1993, Cattaneo *et al.*, 1997, Hekman *et al.*, 1994).

En un perfil de suelo las poblaciones microbianas se adhieren a las partículas de suelo y la concentración de microorganismos y la de nutrientes cambia de la parte superior a la inferior con el tiempo. Factores tales como los cambios en la concentración de nutrientes y la concentración de oxígeno a través del perfil pueden afectar al estado fisiológico de los microorganismos (Pickett y Bazin, 1980., Parke *et al.*, 1986). Así el uso de columnas de suelo puede ser utilizado como representativo de un perfil de suelo y además permitir el estudio de factores particulares tales como el movimiento de las bacterias en suelo y el efecto de otros factores que influyen en la biodegradación bajo condiciones mediambientales controladas (Hekman *et al.*, 1994).

En nuestros estudios la cepa DOT-T1E se estableció a lo largo de una columna de suelo en presencia de tolueno. En condiciones de limitación de oxígeno se observó el establecimiento de la cepa en las partes superiores de la misma. La bajada de la concentración de oxígeno llevó a la pérdida de viabilidad de la cepa en las partes inferiores de la columna pasados 15 días de la introducción de la cepa. La bajada tan drástica de la concentración de oxígeno fue debida probablemente a la alta actividad metabólica de las células introducidas. Así nuestras cepas en condiciones de falta de oxígeno no son capaces de sobrevivir en suelos contaminados, posiblemente la falta de oxígeno impide que las células lleven a cabo la expulsión de los disolventes de la membrana que es un proceso activo y necesita energía metabólica que requiere oxígeno como aceptor final de electrones en la cadena respiratoria (Ramos *et al.*, 1997)

El oxígeno ha sido uno de los factores más estudiados en biorremediación. La disponibilidad del mismo en suelo se ha visto que depende de una serie de factores como el tipo de suelo, el consumo por parte de la microbiota y además se ha identificado como uno de los factores que limitan la biodegradación del petróleo y la gasolina en suelo (Zhou y Crawford, 1995). Por ello se han desarrollado numerosas técnicas relacionadas con el aporte de oxígeno a zonas contaminadas para potenciar la biodegradación, tales como el aporte de agua saturada en oxígeno y la oxigenación de la zona a través de bombas de inyección de aire (Raymon, 1974, Jamison *et al.*, 1995).

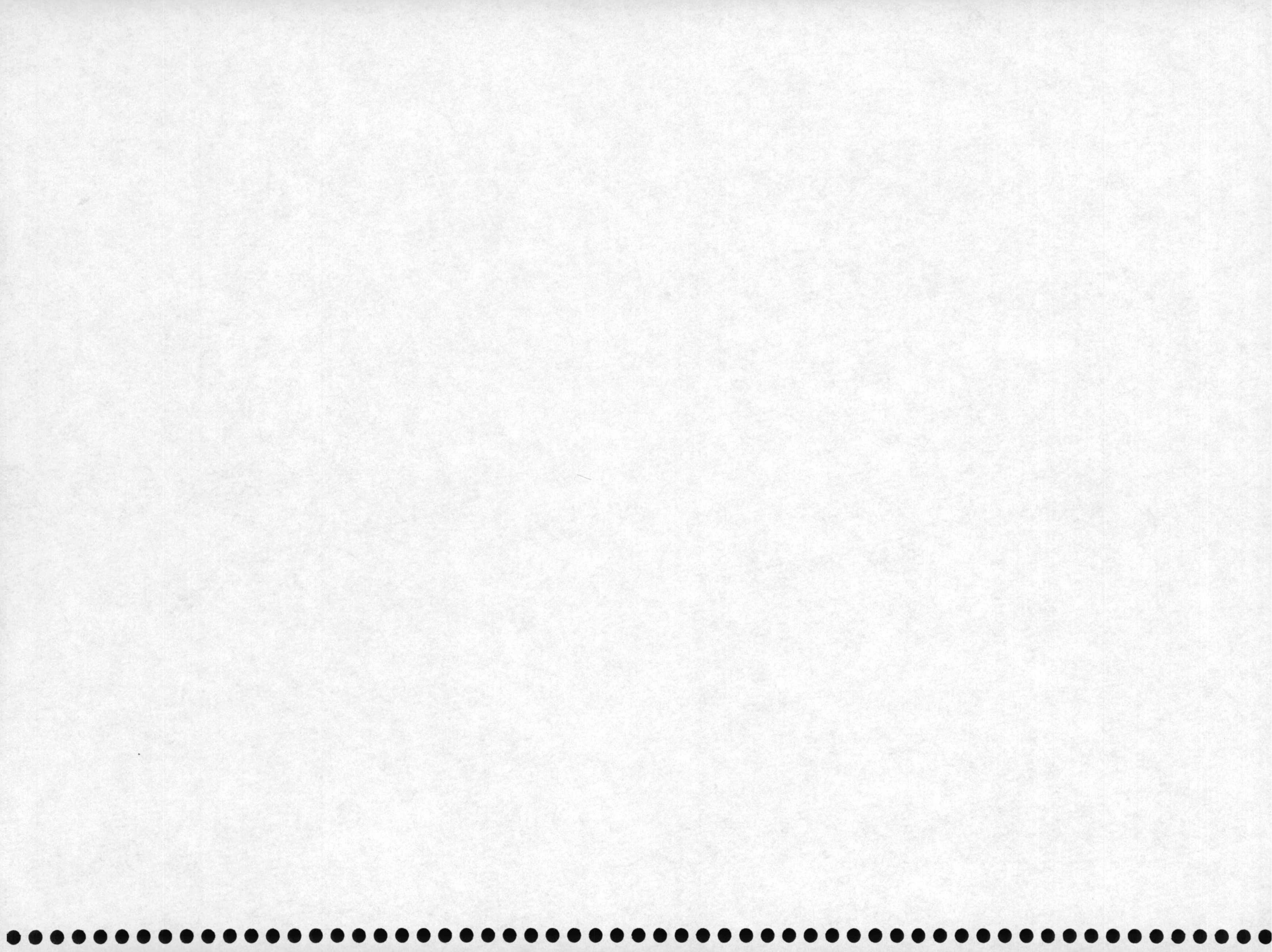
En ensayos realizados a tiempos cortos se observó que pasadas 24 horas de la introducción el número de células fue mayor en la parte superior decreciendo en alrededor de 4 ordenes de magnitud en la inferior. Las medidas de CO₂ indicaron que las células presentes en las partes bajas de la columna presentaron una actividad metabólica muy elevada. Esto nos llevó a considerar que aunque el oxígeno es un factor limitante no se necesitan densidades celulares altas para llevar a cabo la mineralización de un compuesto determinado. Como hemos referido la posesión de diferentes rutas degradativas hace que la cepa se acomode a distintas situaciones imperantes en el medio externo, tales como la limitación de oxígeno.

Otro de los factores que se evaluó fue el movimiento de la cepa introducida por la parte superior de la columna y si existían diferencias en la mineralización del compuesto según en el lugar donde se localicen éstas a lo largo de un perfil de suelo. En nuestros estudios se observó que en columnas contaminadas con tolueno y con gasolina la cepa DOT-T1E se establece a lo largo de toda la columna pasados siete días, alcanzando densidades celulares mayores en la parte superior. Uno de los factores que ayudan a esta dispersión es el movimiento del agua a través de una columna (Hekman *et al.*, 1994).

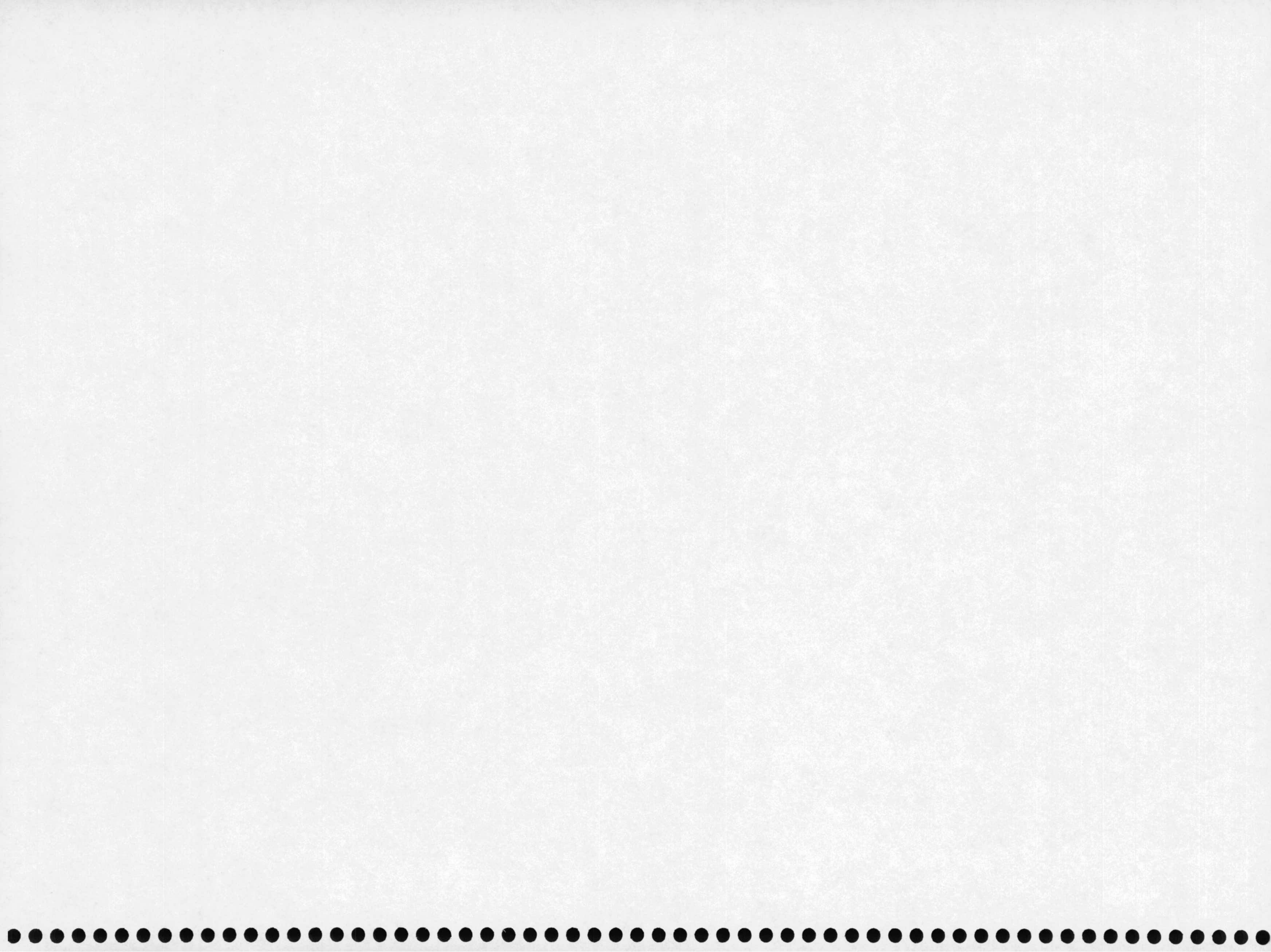
Con respecto a la mineralización se observó desprendimiento de CO₂ a lo largo de la columna lo que indico la actividad metabólica de esta cepa a lo largo de un perfil de suelo independientemente de la densidad celular que presente.

En conclusión, la presencia de tolueno en condiciones de limitación de oxígeno lleva a que se alcancen densidades celulares menores. Pero las células de DOT-T1 que son capaces de resistir estas condiciones llevan a cabo eficientemente la mineralización del compuesto. Las capacidades de *P. putida* DOT-T1 en estas condiciones se debe fundamentalmente a dos factores: a la posesión de capacidades metabólicas muy versátiles (como la utilización de distintas rutas según las condiciones imperantes) y la posesión de sistemas de mecanismos de tolerancia a disolventes, que en el medio ambiente pueden ejercer un papel en la defensa frente a otras situaciones adversas en la naturaleza. En este sentido se ha observado que condiciones de estrés para la célula tales como la salinidad, la presencia de etanol o la entrada en fase estacionaria inducen el sistema de exclusión *AcrAB* en *E. coli* (Ma *et al.*, 1995).

Sirva de corolario de esta Tesis Doctoral que el aislamiento de cepas tolerantes a disolventes orgánicos proveen una vía efectiva para su uso en biorremediación, ya que se establecen en suelos contaminados y llevan a cabo su eliminación de una forma efectiva.



CONCLUSIONES



En este apartado se distinguen dos tipos de conclusiones, aquellas referentes al aislamiento y caracterización de cepas degradadoras y tolerantes a tolueno, y las referentes a la supervivencia de éstas cepas en suelo.

En cuanto a la caracterización de cepas degradadoras se extraen las siguientes conclusiones:

1. *Pseudomonas putida* DOT-T1 tolera concentraciones elevadas de tolueno y utiliza éste como fuente de carbono y energía. La viabilidad de la cepa no se afecta por la presencia de concentraciones de 10% (v/v) de tolueno en medio líquido.
2. Los iones Mg^{2+} ejercen un papel importante en la tolerancia a tolueno en las cepas *P. putida* DOT-T1 y *P. putida* F1. La adición de estos cationes al medio de cultivo reduce el tiempo de retardo anterior a la multiplicación en *P. putida* DOT-T1 y permite la supervivencia de *P. putida* F1 en presencia de 1% (v/v) de tolueno.
4. Tras la adición de altas concentraciones de tolueno al suelo se observó que la microbiota toleraba concentraciones elevadas. Con objeto de evaluar la naturaleza de las bacterias que residían en estos suelos se aislaron dos cepas MTB5 y MTB6 encuadradas como pertenecientes al género *Pseudomonas* y a la especie *P. putida*.
6. Las cepas *P. putida* MTB5, MTB6, aisladas de suelos contaminados y *P. putida* SMO116, aislada de un biofilm por un grupo de Dinamarca, presentaron distintos niveles de tolerancia frente a concentraciones elevadas de tolueno. Considerándose *P. putida* MTB5 y SMO116 sensibles a concentraciones mayores de 0,2% (v/v) de tolueno y *P. putida* MTB6 tolerante a concentraciones de hasta el 10% (v/v) de tolueno.
7. Las cepas *P. putida* MTB5, MTB6 y SMO116 degradan tolueno a través de la ruta TOD y presentan, al menos, otra ruta alternativa para degradación de alcohol bencílico y benzoato.

8. Las cepas *P. putida* MTB5, MTB6 y SMO116 presentan isomerización *cis/trans* como primer mecanismo de tolerancia a disolventes. Estas cepas presentan genes que codifican para sistemas de exclusión de eliminación de disolventes de las membranas descritos en la cepa *P. putida* DOT-T1. Pero estudios de acumulación en las membranas de tolueno ponen de manifiesto que en las cepas sensibles, *P. putida* MTB5 y SMO116, se acumula más cantidad que en la tolerante lo que lleva a la implicación de otros sistemas de exclusión en esta cepa.

En lo que respecta a la introducción en suelo de las cepas caracterizadas por ser degradadoras de tolueno se extraen las siguientes conclusiones:

1. Las cepas *P. putida* DOT-T1E, F1R y MTB6R son capaces de sobrevivir en suelos contaminados con 10% (v/p) de tolueno. Otras cepas degradadoras de tolueno estudiadas en esta Tesis Doctoral no fueron capaces de sobrevivir en suelos contaminados con altas concentraciones de tolueno.
2. Las cepas MTB5 y SMO116 se establecen en suelos contaminados con 1% (v/p) de tolueno, mientras que F1 sobrevive y se multiplica en suelos contaminados con 10% (v/p) de tolueno, por lo que se observa que estas cepas presentan distinta tolerancia en líquido y en suelo.
3. En suelos contaminados con concentraciones elevadas de tolueno, la temperatura y la humedad son dos factores abióticos que contribuyeron en mejor medida a la recuperación de las cepas *P. putida* DOT-T1 y *P. putida* F1.
4. En estudios de competencia la cepa *P. putida* DOT-T1 presentó ventaja en la colonización de suelos contaminados frente a la cepa *P. putida* F1, pero no frente a MTB6.
5. Las cepas MTB6 y DOT-T1 mineralizan muy eficientemente tolueno en suelo.

7. La cepa *P. putida* DOT-T1 se establece en suelos contaminados a lo largo de un perfil de suelo y en el tiempo. En estos ensayos aunque la densidad celular de la cepa se vió afectada por la concentración de oxígeno, las células se mantienen activas metabólicamente y llevan a cabo la mineralización del tolueno.



BIBLIOGRAFIA

4



- Angle J.S., Levin M.A., Gagliardi J.V., y McIntosh M.S. 1995. Validation of microcosm for examining the survival of *Pseudomonas aerofaciens* (*lacZY*) in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:2835-2839.
- Aono R., Ito M., Inoue A., y Horikoshi K. 1992. Isolation of novel toluene-tolerant strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1**:145-146.
- Aronstein B. N., Calvillo Y. M., y Martin A. 1991. Effect of surfactants at low concentrations on the desorption and biodegradation of sorbed aromatic compounds in soil. *Environ. Sci. Technol.* **25**:1728-1731.
- Asako H., Nakajima H., Kobayashi K., Kobayashi M., y Aono R. 1997. Organic solvent tolerance and antibiotic resistance increased by overexpression of *marA* in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:1428-1433.
- Atlas R.M., 1988. Biodegradation of hydrocarbons in the environment. *Basic Life Sci* **45**:211-222.
- Ausubel F.M., Brent R.E., Kingston D.D., Moore J.G., Seidman J.A., Smith, y Struhl K. 1991. Current protocols in molecular biology, John Wiley & Sons, New York.
- Barreiro R., y Pratt J. R. 1992. Toxic effects of chemicals on microorganisms. *Water environment Research.* **64**:632-641.
- Bartels I., Knackmuss H.J., y Reineke W. 1984. Suicide inactivation of catechol 2,3-Dioxygenase from *Pseudomonas putida* mt-2 by 3-Halocatechols. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**:500-505.
- Bayly R.C., y Dagley S. 1969. Oxobenzoic acids as metabolites in the bacterial degradation of catechols. *Biochem. J.* **111**:303-307.
- Bestetti G., y Galli E.. 1987. Characterization of a novel TOL-like plasmid from *Pseudomonas putida* involved in 1,2,4-trimethylbenzene degradation. *J. Bacteriol.* **169**:1780-1783.
- Bewley R.J., 1992. Bioremediation and waste management, p.33-45. Steward-Tull D.E.S. y Sussman M. (ed.), En: The release of genetically modified microorganisms, Plenum Press, New York.
- Bickerdike R.S., Holt R.A., y Stephens G.M. 1997. Evidence for metabolism of *o*-xylene by simultaneous ring and methyl group oxidation in a new soil isolate. *Microbiol.* **143**:2321-2339.
- Bligh E.G., y Dyer W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**:911-917.
- Bolhuis H., van Veen H.W., Poolman B., Driessen A.J.M., y Konings W.N. 1997. Mechanisms of multidrug transporters. *FEMS Microbiol Rev* **21**:55-84.
- Bouveret E., Derouiche R., Rigal A., Llobès R., Lazdunski C., y Bénédicti H. 1995. Peptidoglycan-associated lipoprotein-TolB interaction. A possible key to explaining the formation of contact sites between the inner and outer membranes of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **270**:11071-11077.
- Bozal N., Tudela E., Rosselló-Mora R., Lalucat J., y Guinea J.. 1997. *Pseudoalteromonas antarctica* sp. nov., isolated from an antarctic coastal environment. *International Journal of Systematic Bacteriology.* **47**:345-351.

- Byrne A.M., Kukor J.J., y Olsen R.H.** 1995. Sequence analysis of the gene cluster encoding toluene-3-monooxygenase from *Pseudomonas pickettii* PKO1. *Gene* **154**:65-70.
- Byrne A.M., y Olsen R.H.** 1996. Cascade regulation of the Toluene-3-Monooxygenase operon (*tbuA1UBVA2C*) of *Burkholderia pickettii* PKO1: role of the *tbuA1* promoter (*PtbuA1*) in the expression of its cognate activator, TbuT. *J.Bacteriol.* **178**:6327-6337.
- Carruthers A., y Melchior D.L.** 1986. How bilayers lipids affect membrane protein activity. *Trends Biochem.Sci* **11**:331-335.
- Cartwright C.P., Juroszek J.R., Beavan M.J., Ruby F.M.S., de Morais S.F.M., y Rose A.H.** 1986. Ethanol dissipates the proton-motive force across the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Gen.Microbiol.* **132**:369-377.
- Cattaneo M.V., Masson C., y Greer C.W.** 1997. The influence of moisture on microbial transport, survival y 2,4-D biodegradation with a genetically marked *Burkholderia cepacia* in unsaturated soil columns. *Biodegradation.* **8**:87-96.
- Chen Q., Janssen D. B., y Witholt B.** 1995. Growth on octane alters the membrane lipid fatty acids of *Pseudomonas oleovorans* due to the induction of *alkB* y synthesis of octanol. *J.Bacteriol.* **177**:6894-6901.
- Colbert S. F., Isakeit T., Weinhold A. R., Hendson M., y Schroth M. N.** 1993. Use of an exotic carbon source to selectively increase metabolic activity and growth of *Pseudomonas putida* in soil. *Appl.Environ.Microbiol.* **59**:2056-2063.
- Comeau Y., Greer C.W., y Samson R.** 1993. Role of inoculum preparation y density of bioremediation of 2,4-D-contaminated soil by bioaugmentation. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* **38**:681-687.
- Cruden D.L., Wolfram J.H., Rogers R.D., y Gibson D.T.** 1992. Physiological properties of a *Pseudomonas* strain that grows with *p*-xylene in a two-phase (organic-aqueous) medium. *Appl.Environ.Microbiol.* **58**:2723-2729.
- Dagley S.,** 1978. Pathways for the utilization of organic growth substrates, p.305-388. Ornston L.N. y Sockatch J.R. (ed.), En: *The Bacteria*, Academic, New York.
- Dagley S.,** 1986. Biochemistry of aromatic hydrocarbon degradation in Pseudomonads, p.527-555. Ornston L.N. y Sockatch J.R. (ed.), En: *The Bacteria*, Academic, New York.
- Dagley S., y Gibson D.T.** 1965. . *Biochem.J.* **95**:466-474.
- Davey J. F., y Gibson D. T.** 1974. Bacterial metabolism of *para*- y *meta*-xylene:oxidation of a methyl substituent. *J.Bacteriol.* **119**:923-929.
- Davis J.W., y Madsen S.** 1996. Factors affecting the biodegradation of toluene in soil. *Chemosphere* **33**:107-130.
- De Bont J.A.M., y Poolman B.** 1995. Mechanims of membrane toxicity of hidrocarbons. *Microbiological reviews* **59**:
- De Lorenzo V., , Herrero M.V., Jakubzik U., y Timmis K.N.** 1990. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, y chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J.Bacteriol.* **172**:6568-6572.

- De Lorenzo V., y Timmis K. N. 1994. Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5 y Tn10-derived minitransposon. *Methods in enzymology*. **235**:386-405.
- De Mot R., y Vanderleyen J.. 1994. The C-terminal sequence conservation between OmpA-related outer membrane proteins y MotB suggest a common function in both Gram-positive y Gram-negative bacteria, possibly in the interaction of these domains with peptidoglycan. *Mol.Microbiol.* **12**:333-334.
- De Smet M.J., , Kingma J., y Witholt B.. 1978. The effect of toluene on the structure y permeability of the outer y cytoplasmic membranes of *Escherichia coli* . *Biochem.Biophys.Acta* **506**:64-80.
- De Smet M.J., , Kingma J., Wynberg H., y Witholt B.. 1983. *Pseudomonas oleovorans* as a tool in biocconversion of hydrocarbons: growth, morphology y conversion characteristic in different two-phase systems. *Enzyme.Microb.Technol.* **5**:352-360.
- Delgado A., Duque E., y Ramos J.L. 1992. Behavior in agricultural soil of a recombinant *Pseudomonas* bacterium that simultaneously degrades alkyl- y haloaromatics. *Microbial releases* **1**:23-28.
- Diefenbach R., Heipieper H.J., y Keweloh H. 1992. The conversion of cis into trans unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida* P8:evidence for a role in the regulation of membrane fluidity. *Appl.Environ.Microbiol.* **38**:382-387.
- Diefenbach R., y Keweloh H. 1994. Synthesis of *trans* unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida* P8 by direct isomerization of the double bond of lipids. *Arch Microbiol* **162**:120-125.
- Dorn E., y Knackmuss H.J. 1978. Chemical structure y biodegradability of halogenated aromatic compounds. *Biochem.J.* **174**:73-84.
- Duetz Wouter A., de Jong C., Williams P. A., y van Andel J. 1994. Competition in chemostat culture between *Pseudomonas* strain that use different pathways for the degradation of toluene. *Appl.Environ.Microbiol.* **60**:2858-2863.
- 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.
- Eaton R.W., 1997. *p*-Cymene catabolic pathway in *Pseudomonas putida* F1: cloning y characterization of DNA encoding conversion of *p*-cymene to *p*-cumate. *J.Bacteriol.* **179**:3171-3180.
- Feist C.F., y Hegeman G.D. 1969. Regulation of the *meta* cleavage pathway for benzoate oxidation by *Pseudomonas putida*. *J.Bacteriol.* **100**:1121-1123.
- Filip Z., 1973. Clay minerals as a factor influencing the biochemical activity of soil microorganisms. *Folia Microbiol.* **18**:56-74.
- Fuller M.E., y Scow K.M.. 1996. Effects of toluene on microbially-mediated processes involved in the soil nitrogen cycle. *Microb Ecol* **32**:171-184.
- Gallegos M.-T., Marqués S., y Ramos J. L. 1996. Expression of the TOL plasmid *xyIS* gene in *Pseudomonas putida* occurs from a d⁷⁰-dependent promoter or from d⁷⁰-y d⁵⁴-dependent tandem promoters according to the compound used for growth. *J.Bacteriol.* **178**:2356-2361.

- Gibson D.T., Abdul A.S., y Olsen R.H.** 1988. Microbial degradation of aromatic hydrocarbon in hydrogeologic material: microcosm studies, p.53-69. In Proceedings of the Second National outdoor action conference on aquifer restoration: groundwater y geophysical methods, National Water Well Association, Dublin, Ohio.
- Gibson D.T., y Subramanian V.** 1984. Microbial degradation of aromatic hydrocarbons, p.181-252. Gibson D.T. (ed.), En: Microbial degradation of organic compounds, Marcel Dekker, New York.
- Gibson D.T., Zylstra G.J., y Chauchan S.** 1990. Biotransformations catalysed by toluene dioxygenase from *Pseudomonas putida* F1, p.121-132. Silver S., Cakrabarty A.M., Iglewski B., y Kaplan S. (ed.), En: Pseudomonas: biotransformations, pathogenesis y evolving biotechnology, American Society for Microbiology, Washintong.
- Gibson David T.**, 1993. Biodegradation; biotransformation and the belmont. J.of industrial microbiol. **12**:1-12.
- Gibson D. T., Hensley M., Yoshioka H., y Mabry T.J.** 1970. Formation of (+)-cis-2,3-dihydroxy-1-methylcyclohexa-4,6-diene from toluene by *Pseudomonas putida*.. Biochemistry **9**:1626-1630.
- Gibson D. T., Mahadevan V., y Davey J. F.** 1974. Bacterial metabolism of *para*- y *meta*-xylene: oxidation of the aromatic ring. J.Bacteriol. **119**:930-936.
- Gile J.D., Collins J.C., y Gillet J.W.** 1982. Fate and impact of wood preservatives in a terrestrial microcosm. J.Agric.Food Chem. **30**:295-301.
- Gillet J.W., y Gile J.D.** 1976. Pesticide fate in terrestrial laboratory ecosystems. Int.J.Envirn.Stud. **10**:15-22.
- Haigler B.E., Pettigrew C.A., y Spain J.C.** 1992. Biodegradation of mixtures of substituted benzenes by *Pseudomonas sp.* strain JS150. Appl.Envirn.Microbiol. **58**:2237-2244.
- Harayama S.**, 1984. Transposon mutagenesis analysis of the *meta*-cleavage pathway operon genes of the TOL plasmid of *Pseudomonas putida* mt-2. J.Bacteriol. **160**:251-255.
- Harayama S., Kok M., y Neidle E.L.** 1992. Functional y evolutionary relationships among diverse oxygenases. Annu.Rev.Microbiol. **46**:565-601.
- Harayama S., Leppik R.A., Rekik M., Mermond N., Lehrbach P.R., Reineke W., y Timmis K.N.** 1986. Gene order of the TOL catabolic plasmid upper pathway operon y oxidation of both toluene y benzyl alcohol by the *xylA* product. J.Bacteriol. **167**:455-461.
- Harayama S., y Rekik M.** 1989. Bacterial aromatic ring-cleavage enzymes are classified in two diferent gene families. J.Biol.Chem. **264**:15328-15333.
- Harayama S., y Rekik M.** 1990. The meta-cleavage operon of TOL degradative plasmid pWW0 comprises 13 genes. Mol.Gen.Genet. **221**:113-120.
- Harayama S., Rekik M., Wasserfallen A., y Bairoch A.** 1987. Evolutionary relationships between catabolic pathways for aromatics:conservation of gene order y nucleotide sequences of catechol oxidation genes of pWW0 y NAH7. Mol.Gen.Genet. **210**:241-247.
- Harayama S., , Rekik M., Wubbolts M., Rose K., Leppik R.A., y Timmis K.N.** 1989. Characterization of five genes in the upper-pathway operon of TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida* y identification of the gene products. J.Bacteriol. **171**:5084-5055.

- Harayama S., y Timmis K.N. 1989. Catabolism of aromatics hydrocarbons by *Pseudomonas*, p.151-174. Hopwood D.A. y Charter K. (ed.), En: Genetics of bacterial diversity, Academic, New York.
- Harayama S., y Timmis K.N. 1992. Aerobic biodegradation of aromatics hydrocarbons by bacteria, p.99-156. En Sigel H. y Sigel A. (ed.), Degradation of environmental pollutants by microorganism y their metalloenzymes, Marcel Dekker Inc, New York.
- Harms H., y Bosma T.N.P. 1997. Mass transfer limitation of microbial growth and pollutant degradation. Journal of industrial microbiology & biotechnology **18**:97-105.
- Harrop A.J., , Kocknull M.D., y Lilly M.D. 1989. Biotransformations in organics solvents: a difference between gram-positive y gram-negative bacteria. Biotechnol.Lett. **11**:807-810.
- Head Ian M., 1998. Bioremediation: Towards a credible technology. Microbiol. **144**:599-608.
- Heald S.C., y Jenkins R.O. 1996. Expression y substrate specificity of toluene dioxygenase of *Pseudomonas putida* NCIMB 11767. Appl Microbiol Biotechnol **45**:56-62.
- Heipieper H.J., , Diefenbach R., y Keweloh H.. 1992. Conversion of *cis* unsaturated fatty acids to *trans*, a posible mechanism for the protection on phenol-degrading *Pseudomonas putida* P8 from substrate toxicity. Appl.Environ.Microbiol. **58**:1847-1852.
- Heipieper H.J., Keweloh H., y Rehm H.J. 1991. Influence of phenols on growth y membrane permeability of free and immobilized *Escherichia coli*. Appl.Environ.Microbiol. **57**:1213-1217.
- Heipieper H. J., Loffeld B., Keweloh H., y de Bont Jan A.M. 1995. The *cis/trans* isomerisation of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida* S12 : an indicator for enviromental stress due to organic compounds. Chemosphere **30**:1041-1051.
- Heipieper H. J., , Meulenbeld G., van Oirschot Q., y de Bont Jan A.M. 1996. Effect of Environmental factors on the *cis/trans* ratio of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida* S12. Appl.Environ.Microbiol. **62**:2773-2777.
- Heipieper H. J., Weber F. J., Sikkema J., Keweioh H., y de Bont J. A.M.. 1994. Mechanisms of resistance of whole cells to toxic organic solvents. Reviews **12**:409-415.
- Heipieper H. J., y de Bont J. A.M.. 1994. Adaptation of *Pseudomonas putida* S12 to ethanol y toluene at the level of fatty acid composition of membranes. Appl.Environ.Microbiol. **60**:4440-4444.
- Hekman W.E., , Heijnen C.E., Trevors J.T., y van Elsas J.D.. 1994. Water flow induced transport of *Pseudomonas fluorescens* cells through soil columns as affected by inoculant treatment. FEMS Microbiol.Ecol. **13**:313-324.
- Herrero M.V., , de Lorenzo V., y Timmis K.N.. 1990. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning y stable chromosomal insertion of foreing genes in gram-negative bacteria. J.Bacteriol. **172**:6557-6567.
- Holden P. A., Halverson L. J., y Firestone M. K. 1997. Water stress effectson toluene biodegradation by *Pseudomonas putida*. Biodegradation. **8**:143-151.
- Holtwick R., , Meinhard F., y Keweloh H.. 1997. *Cis-trans* isomerization of unsaturated fatty acids: cloning y sequencing of the *cti* gene from *Pseudomonas putida* P8. Appl.Environ.Microbiol. **63**:4292-4297.

- Hopkins G.D., Semprini L., y McCarty P.L.** 1993. Microcosm y in situ field studies of enhanced biotransformation of trichloroethylene by phenol-utilizing microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:2277-2285.
- Ingram L.O.**, 1977. Changes in lipid composition of *Escherichia coli* resulting from growth with organic solvents and with food additives. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**:1233-1236.
- Inoue A., y Horikoshi K.** 1989. A *Pseudomonas* thrives in high concentrations of toluene. *Nature* **338**:264-266.
- Inoue A., Yamamoto M., y Horikoshi K.** 1991. *Pseudomonas putida* which can grow in the presence of toluene. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:1560-1562.
- Inouye S., Gomada M., Sangodar U.M.X., Nakazawa A., y Nakazawa T.** 1999. Upstream regulatory sequence for transcriptional activator *XylR* in the first operon of xylene metabolism on the TOL plasmid. *J. Mol. Biol.* **216**:251-260.
- Inouye S., Nakazawa A., y Nakazawa T.** 1983. Molecular cloning of gene *xylS* of the TOL plasmid: evidence for positive regulation of the *xylDEGF* operon by *XylS*. *J. Bacteriol.* **148**:413-418.
- Inouye S., Nakazawa A., y Nakazawa T.** 1986. Nucleotide sequence of the regulatory gene *xylS* on the *Pseudomonas putida* TOL plasmid y identification of the protein product. *Gene* **44**:235-242.
- Isken S., y de Bont J.A.M.** 1996. Active efflux of toluene in a solvent-resistant bacterium. *J. Bacteriol.* **178**:6056-6058.
- Isomaa B., Hägerstry G., Paatero A., y Engblom C.** 1986. Permeability alterations y antihaemolysis induced by amphiphiles in human erythrocytes. *Biochem. Biophys. Acta* **860**:510-524.
- Jafee B., Phillips A., Muldoon A., y Mangel M.** 1992. Density-dependent host-pathogen dynamics in soil microcosms. *Ecology* **73**:495-506.
- Johnson G.R., y Olsen R.H.** 1995. Nucleotide sequence analysis of the genes encoding a Toluene/Benzene-2-Monooxygenase from *Pseudomonas sp.* strain JS150. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:3336-3346.
- Johnson G.R., y Olsen R.H.** 1995. Nucleotide sequence analysis of genes encoding a Toluene/bencene-2-monoxygenase from *Pseudomonas sp.* strain JS150. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:3336-3346.
- Johnson G.R., y Olsen R.H.** 1997. Multiple pathways for toluene degradation in *Burkholderia sp.* strain JS150. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:4047-4052.
- Jouain L.P., de la Judie P., Bagztoux S., y Huguet T.** 1981. . *Mol. Gen. Genet.* **182**:189-195.
- Ka J.O., Holben W.E., y Tiedje J.M.** 1994. Analysis of competition in soil among 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degrading bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:1121-1128.
- Kado C.I., y Liu S.T.** 1981. Rapid procedure for detection y isolation of large and small plasmid. *J. Bacteriol.* **145**:1365-1373.

- Kaphammer B.J., Kukor J.J., y Olsen R.H.** 1990. Cloning and characterization of a novel toluene degradative pathway from *Pseudomonas pickettii* PKO1, p.243. En Abstr, 90th Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol, American Society for Microbiology, Washington D.C.
- .Kessler B., de Lorenzo V., y Timmis K.N.** 1992. A general system to integrate *lacZ* fusions into the chromosomes of gram-negative eubacteria: regulation of the Pm promoter of the TOL plasmid studied with all controlling elements in monocopy. *Mol.Gen.Genet.* **233**:293-301.
- Kieboom J., Dennis J.J., Zylstra G.J., y de Bont J.A.M.** 1998a. Active efflux of organic solvents by *Pseudomonas putida* S12 is induced by solvents. *J.Bacteriol.* **180**:6769-6772.
- Kieboom J., Dennis J.J., de Bont J.A.M., y Zylstra G.J.** 1998b. Identification y molecular characterization of an efflux pump involved in *Pseudomonas putida* S12 solvent tolerance. *J.Biol.Chem.* **273**:85-91.
- Kruse H., y Sorum H.** 1994. Transfer of multiple drug resistance plasmid between bacteria of diverse origins in natural microenvironments. *Appl.Environ.Microbiol.* **60**:4015-4021.
- Kukor J.J., y Olsen R.H.** 1990. Molecular cloning, characterization, y regulation of a *Pseudomonas pickettii* PKO1 gene encoding phenol hydroxylase y expression of the gene in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1c. *J.Bacteriol.* **172**:4624-4630.
- Kukor J.J., y Olsen R.H.** 1991. Genetic organization y regulation of a *meta* cleavage pathway for catechols produced from catabolism of toluene, benzene, phenol, y cresols by *Pseudomonas pickettii* PKO1. *J.Bacteriol.* **173**:4587-4594.
- Kwang K., Sungjin L., Kyunghye L., y Dongbin L.** 1998. Isolation y characterization of toluene-sensitive mutants from the toluene-resistant bacterium *Pseudomonas putida* GM73. *J.Bacteriol.* **180**:3692-3696.
- Lau P.C.K., Bergeron H., Labbé D., Wang Y., Brousseau R., y Gibson D.T.** 1994. Sequence y expression of the *todGHI* genes involved in the last three steps of toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1. *Gene* **146**:7-13.
- Lau P.C.K., Wang Y., Patel A., Labbé D., Bergeron H., Brousseau R., Kosnishi Y., y Rawlings M.** 1997. A bacterial basic region leucine zipper histidine kinase regulating toluene degradation. *Proc.Natl.Acad.Sci.* **94**:1453-1458.
- Lazzaroni J.C., y Portalier R.** 1992. The *excC* gene of *Escherichia coli* K-12 required for cell envelope integrity encodes the peptidoglycan-associated lipoprotein (pal). *Mol.Microbiol.* **6**:735-742.
- Leahy J.G., y Colwell R.R.** 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol.Rev.* **54**:305-315.
- Leahy J.G., Johnson G.R., y Olsen R.H.** 1997. Cross-regulation of toluene monooxygenases by the transcriptional activators TbmR y TbuT. *Appl.Environ.Microbiol.* **63**:3736-3739.
- Leahy J.G., y Olsen R.H.** 1997. Kinetics of toluene degradation by toluene-oxidizing bacteria as a function of oxygen concentration y the effect of nitrate. *FEMS Microbiol.Ecol.* **23**:23-30.
- Leddy M.B., Phipps D.W., y Ridgway H.F.** 1995. Catabolite-mediated mutations in alternate toluene degradative pathways in *Pseudomonas putida*. *J.Bacteriol.* **177**:4713-4720.
- Lehning A., Fock U., Wittich R., Timmis K. N., y Pieper D.** 1997. Metabolism of chlorotoluenes by *Burkholderia* sp strain PS12 y toluene dioxygenase of *Pseudomonas putida* F1: Evidence for monooxygenation by toluene y chlorobenzene dioxygenases. *Appl.Environ.Microbiol.* **63**:1974-1979.

- Lendenmann U., y Spain J.C.** 1996. 2-aminophenol 1,6-dioxygenase: a novel aromatic ring cleavage enzyme purified from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45. *J.Bacteriol.* **178**:6227-6232.
- Levy S.B.**, 1992. Active efflux mechanism for antimicrobial resistance. *Antimicrobiol.Agents.Chemother.* **36**:695-703.
- Lewis K., Hooper D.C., y Ouellete M.** 1997. Multidrug resistance pumps provide broad defense. *ASM News* **63**:605-610.
- Lindemann J., y Suslow T. V.** 1987. Competition between ice nucleation-active wild type y ice nucleation-deficient deletion mutant strain of *Pseudomonas syringae* y *P. fluorescens biovar I* and biological control of frost injury on strawberry blossoms. *Phytopatology* **77**:882-886.
- Lindow Steven E.**, 1992. Enviromental release of Pseudomonads: Potential benefits y risks, p.399-407. In Galli E., Silver S., y Without B. (ed.), *Pseudomonas Molecular Biology y Biotechnoly*, ASM,
- Lindstrom Tom F., y Piver Warren T..** 1985. A mathematical model for the transport y fate of organic chemical in unsaturated/saturated soils. *Environmental Health perspectives.* **60**:11-28.
- Lohner K.**, 1991. Effects of small organic molecules on phospholipid phase transition. *Chem.Phys.Lipids.* **57**:341-362.
- Ludwig M.L., Weber L.D., y Ballou D.P.** 1984. Characterization of crystals of protocatechuate 3,4-dioxygenase from *Pseudomonas cepacia*. *J.Biol.Chem.* **259**:14840-14842.
- Moller S., , Pedersen A. R., Poulsen L. K., Arvin E., y Molin S..** 1996. Activity and three-dimensional distribution of toluene-degrading *Pseudomonas putida* in a multispecies biofilm assessed by quantitative in situ hibridization y scanning confocal laser microscopy. *Appl.Environ.Microbiol.* **62**:4632-4640.
- Maniatis T., Fritsch E.F., y Sambrock J.** 1982. *Molecular cloning: A laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York.
- Marqués S., Gallegos M.T., y Ramos Juan L.** 1995. Role of d^s in transcription from the positively controlled Pm promoter of the TOL plasmid of *Pseudomonas putida*. *Mol.Microbiol.* **18**:851-857.
- Mars A.E., Kasberg T., Kaschabek S.R., Van Agteren M.H., Janssen D.B., y Reineke W.** 1997. Microbial degradation of Chloroaromatics: use of the *meta*-Cleavage pathway for mineralization of chlorobenzene. *J.Bacteriol.* **179**:4530-4537.
- Masuda N., Sakagawa E., y Ohya S.** 1995. Outer membrane proteins responsible for multiple drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents y chemotherapy.* **39**:645-649.
- McClay K. , Streger S. H., y Steffan R. J.** 1995. Induction of toluene oxidation activity in *Pseudomonas mendocina* KR1 and *Pseudomonas sp.* strain ENVPC5 by chlorinated solvents y alkanes. *Appl.Environ.Microbiol.* **61**:3479-3481.
- Menn F.M., Zylstra G.J., y Gibson D.T.** 1991. Location y sequence of the *todF* gene encoding 2-hydroxy-6-oxohepta-2,4-dienoate hydrolase in *Pseudomonas putida* F1. *Gene* **104**:91-94.

- Merchior D.L.**, 1982. Lipid phase transitions y regulation of membrane fluidity in prokariotes. *Curr.Top.Memb.Transp.* **17**:263-316.
- Miller J.**, 1972. Experiments in molecular genetics, Cold Spring Harbor, New York. USA.
- Molina L., Ramos C., Ronchel M.C., Molin S., y Ramos J.L.** 1998. Construction of an efficient biologically contained *Pseudomonas putida* strain y its survival in outdoor assays. *Appl.Environ.Microbiol.* **64**:2072-2078.
- Morgan P., y Watkinson R. J.** 1989. Hydrocarbon degradation in soils y methods for soil biotreatment. *Critical reviews in Biotechnology.* **8**:305-333.
- Murray K., y Williams P.A.** 1974. Role of catechol and the methylcatechols as inducers of aromatic metabolism in *Pseudomonas putida*. *J.Bacteriol.* **117**:1153-1157.
- Nakai C., Kagamiyama H., Nozaki M., Nakazawa T., Inouye S., Elbina Y., y Nakazawa A.** 1983. Complete nucleotide sequence of the metapyrocatechase gene on the TOL plasmid of *P. putida* mt-2. *J.Biol.Chem.* **258**:2923-2928.
- Natarajan M.R., , Lu Zexun., y Oriol P.** 1994. Cloning y expression of a pathway for benzene and toluene from *Bacillus stearothermophilus*.. *Biodegradation.* **5**:77-82.
- Newman L.M., y Wackett L.P.** 1995. Purification y characterization of toluene 2-monooxygenase from *Burkholderia cepacia* G4. *Biochemistry* **34**:14006-14076.
- Newman L.M., y Wackett L.P.** 1997. Trichloroethylene oxidation by purified toluene 2-monooxygenase: products, kinetics, y turnover-dependent inactivation. *J.Bacteriol.* **170**:90-96.
- Nikaido H.**, 1999. Microdermatology: cell surface in the interaction of microbes with the external world. *J.Bacteriol.* **181**:4-8.
- Nikaido H., y Vaara M.** 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol.Rev.* **49**:1-32.
- Nishizuka Y., , Ichiyama A., Nakamura S., y Hayaishi O.** 1962. . *J.Biol.Chem.* **237**:269-272.
- Olsen R., Kukor J.J., y Kaphamer B.** 1994. A novel toluene-3-moxigenase pathway cloned from *Pseudomonas pickettii* PKO1. *J.Bacteriol.* **176**:3749-3756.
- Ornston L.N.**, 1966. The conversion of catechol y protocatechuate to beta-ketoadipate by *Pseudomonas putida*. *Regulation. J.Biol.Chem.* **241**:3800-3810.
- Osborne S.J., , Leaver J., Turner M.K., y Dunnill P.** 1990. Correlation of biocatalytic activity in a organic-aqueous two-liquid phase system with solvent concentration in the cell membrane. *Enzyme.Microbiol.Technol.* **12**:281-291.
- Overbeek Van L.S., , Eberl L., Givskov M., Molin S., y Elsas van J.D.** 1995. Survival of, and induced stress resistance in, carbon-starved *Pseudomonas fluorescens* cells residing in soil. *Appl.Environ.Microbiol.* **4202**-4028.
- Panke S., , Sánchez-Romero J., y De Lorenzo V.** 1998. Engineering of quasi-natural *Pseudomonas putida* strains for toluene metabolism through an *ortho*-Cleavage degradation pathway. *Appl.Environ.Microbiol.* **64**:748-751.

- Pinkart H.C., y White D.C.** 1997. Phospholipid biosynthesis y solvent tolerance in *Pseudomonas putida* strains. *J.Bacteriol.* **179**:4219-4226.
- Pinkart H.C., Wolfram J.W., Rogers R., y White D.C.** 1996. Cell envelope changes in solvent-tolerant y solvent-sensitive *Pseudomonas putida* strains following exposure to *o*-xylene. *Appl.Environ.Microbiol.* **62**:1129-1132.
- Raetz C.H.R.,** 1978. Enzymology, genetics, y regulation of membrane phospholipid synthesis in *Escherichia coli*. *Microbiol.Rev.* **42**:614-659.
- Rainey Paul B., , Bailey M.J., y Thompson I. P.** 1994. Phenotypic y genotypic diversity of fluorescens pseudomonads isolated from field-grown sugar beet. *Microbiol.* **140**:2315-2331.
- Ramos J.L., Duque E., Godoy P., y Segura A.** 1998. Efflux pumps involved in toluene tolerance in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *J.Bacteriol.* **180**:3323-3329.
- Ramos J.L., Duque E., Huertas M.J., y Haïdour A.** 1995. Isolation y expansion of the catabolic potential of a *Pseudomonas putida* strain able to grow in the presence of high concentrations of aromatic hydrocarbons. *J.Bacteriol.* **177**:3911-3916.
- Ramos J.L., Duque E., Rodríguez-Herva J.J., Godoy P., Haïdour A., Reyes F., y Fernández-Barrero A.** 1997. Mechanisms for solvent tolerance in bacteria. *J.Biol.Chem.* **272**:3887-3890.
- Ramos J.L., , Duque E., y González M.I.** 1991. Survival in soils of an herbicide-resistant *Pseudomonas putida* strain bearing a recombinant TOL plasmid. *Appl.Environ.Microbiol.* **260**-266.
- Ramos J.L., González-Carrero M., y Timmis K.N.** 1988. Broad-host range expression vectors containing manipulated *meta*-cleavage pathway regulatory elements of the TOL plasmid. *FEBS Lett.* **226**:241-246.
- 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 y plasmid-encoded regulators. *Annu.Rev.Rev.Microbiol.* **51**:341-373.
- Ramos J.L., Mermod N., y Timmis K.N.** 1987. Regulatory circuits controlling transcription of TOL plasmid operon encoding *meta*-cleavage pathway for degradation of alkylbenzoates by *Pseudomonas*. *Mol.Microbiol.* **1**:293-300.
- Ramos J.L., Michán C., Rojo F., Dwyer D., y Timmis K.N.** 1990. Signal-regulator interactions. Genetic analysis of the effector binding site of *xylS*, the benzoate-activated positive regulator of *Pseudomonas* TOL plasmid *meta*-cleavage pathway operon. *J.Mol.Biol.* **211**:373-382.
- Ramos J.L., y Rojo F.** 1990. Biodegradacion e ingenieria genética. *Investigacion y ciencia.* **164**:72-79.
- Ramos-González M.I., Duque E., y Ramos J.L.** 1991. Conjugational transfer of recombinant DNA cultures y in soil: host range of *Pseudomonas putida* TOL plasmids. *Appl.Environm.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 plasmid. *J.Bacteriol.* **176**:4635-4641.
- Reed K.C., y Mann D.A..** 1985. Rapid tranfer of DNA from agarose gels to nylon membranes. *Nucleic Acid.Res.* **13**:7207-7221.

- Reihard M., , Shang S., Kitanides K., Orwin E., Hopckins D., y Lebron A.C.** 1997. In situ BTEX biotransformations under enhanced nitrate- y sulfate-reducing conditions. *Environ.Sci.Technol.* **31**:28-36.
- Reineke W., , Jeenes D.J., Williams P.A., y Knackmuss H.J..** 1982. TOL plasmid pWW0 in constructed halobenzoate-degrading *Pseudomonas* strains: prevention of *meta* pathway. *J.Bacteriol.* **150**:195-201.
- Rekker R.F., y de Kort H.M.** 1979. The hydrophobic fragmental constant; an extension to a 1000 data point set. *Eur.J.Med.Chem.* **14**:479-488.
- Riegert U., Heiss G., Fischer P., y Stolz A.** 1998. Distal cleavage of 3-chorocatechol by an extradiol dioxygenase to 3-choro-2-hydroxymuconic semialdehyde. *J.Bacteriol.* **180**:2849-2853.
- Robertson J.B., Spain J.C., Haddock J.D., y Gibson D.T.** 1992. Oxidation of nitrotoluenes by toluene dioxygenase: evidence for a monooxygenase reaction. *Appl.Environ.Microbiol.* **58**:2643-2648.
- Rock C.O., y Cronan Jr J.E..** 1982. Regulation of bacterial membrane synthesis. *Curr.Top.Membr.Transp.* **17**:209-233.
- Rodríguez-Herva J.-J., , Ramos-Gonzalez M.I, y Ramos J.L..** 1996. The *Pseudomonas putida* peptidoglycan-associated outer membrane lipoprotein is involved in maintenance of the integrity of the cell envelope. *J.Bacteriol.* **178**:1699-1706.
- Rojo F., , Pieper D.H., Engesser K.H., Knackmuss H.J., y Timmis K.N..** 1987. Assemblage of ortho cleavage route for simultaneous degradation of chloro- y methylaromatics. *Science* **238**:1395-1398.
- Ronchel M.C., , Ramos C., Jensen L. B., Molin S., y Ramos J. L..** 1995. Construction y behavior of biologically contained bacteria for environmental applications in bioremediation. *Appl.Environ.Microbiol.* **61**:2990-2994.
- Rosselló-Mora R., , Ludwid Wolfgang., Kämpfer Peter., Amann Rudolf, y Schleifer Karl Heinz..** 1995. *Ferrimonas balearica* gen. nov., spec. nov., a new marine facultative Fe(III)-reducing bacterium. *System.Appl.Microbiol* **18**:196-202.
- Sala-Trepat J.M., , Murray K., y Williams P.A..** 1972. The metabolic divergence in the *meta* cleavage pathway of catechols by *Pseudomonas putida* NCIB 10015. *Eur.J.Biochem.* **28**:347-356.
- Sanderman H.,** 1983. Lipid solvation y kinetic cooperativity of functional membrane proteins. *TIBS* **8**:408-411.
- Schocher Riet J., , Seyfried Birgit., Vazquez Francisco., y Zeyer Josef..** 1991. Anaerobic degradation of toluene by pure cultures of denitrifying bacteria. *Arch Microbiol* **157**:7-12.
- Schwank Si., , Rajacic Z., Zimmerli W., y Blaser J.** 1998. Impact of bacterial biofilm formation on in vitro and in vivo activities of antibiotics. *Antimicrobial agents y chemotherapy.* **42**:895-898.
- Segura A., Duque E., Mosqueda G., Ramos J.L., y Junker F.** 1999. Multiple responses of Gram-negative bacteria to organic solvents. Pendiente de publicación
- Seifert J.,** 1998. Water potential of the soil as a basis of the influence of moisture on number of bacteria in the soil.

- Sharabi E.N., y Bartha R.** 1993. Testing of some assumptions about biodegradability in soil as measure by carbon dioxide evolution. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:1201-1205.
- Shen J., y Bartha R.** 1996. Metabolic efficiency y turnover of soil microbial communities in biodegradation test. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:2411-2415.
- Sheu C.W., y Freese E.** 1973. Lipopolysaccharide layer protection of Gram-negative bacteria against inhibition by long-chain fatty acids. *J. Bacteriol.* **115**:869-875.
- Shields M.S., Montgomery S.O., Chapman P.J., Cuskey S.M., y Pritchard P.H.** 1989. Novel pathway of toluene catabolism in the trichloroethylene-degrading bacterium G4. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:1624-1629.
- Shields M.S., Reagin M.J., Gerger R.R., Campbell R., y Somerville C.** 1995. TOM, a new aromatic degradative plasmid from *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* G4. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:1352-1356.
- Shima H., Kudo T., y Horikoshi K.** 1991. Isolation of toluene-resistant mutants from *Pseudomonas putida* PpG1 (ATCC 17453). *Agric. Biol. Chem.* **55**:1197-1199.
- Sierra-Alvarez R., y Lettinga G.** 1991. The effect of the aromatic structure on the inhibition in granular sludge. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**:544-550.
- Sikkema J., de Bont J.A.M., y Poolman B.** 1994. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J. Biol. Chem.* **269**:8022-8028.
- Sikkema J., de Bont J.A.M., y Poolman B.** 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.* **59**:201-222.
- Sims J.L., Sims R.C., DuPont R.R., Matthews J.E., y Russell H.H.** 1993. In situ bioremediation of contaminated unsaturated subsurface soils, U.S. Environmental Protection Agency, , Office of Solid Waste y Emergency response, Washington.
- Sinensky M.**, 1974. Homeoviscous adaptation- A homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **71**:522-525.
- Smith Mark R.**, 1990. The biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria. *Biodegradation.* **1**:191-206.
- Song H.G., y Bartha R.** 1990. Effects of yet fuell spills on the microbial community of soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:646-651.
- Spain J.C., y Gibson D.T.** 1988. Oxidation of substituted phenols by *Pseudomonas putida* F1 y *Pseudomonas* sp. strain JS6. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:1399-1404.
- Spain J.C., Zylstra G.J., Blake C.K., y Gibson D.T.** 1989. Monohydroxylation of Phenol y 2,5-Dichlorophenol by Toluene Dioxygenase in *Pseudomonas putida* F1. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:2648-2652.
- Stan-Lotter H., Gupta M., y Sanderson K.E.** 1979. The influence of cations on the permeability of the outer membrane of *Salmonella typhimurium* y other gram-negative bacteria. *Can. J. Microbiol.* **25**:475-485.
- Stotzky G.**, 1989. Gene Transfer among bacteria in soil, p.165-222. In Levy S.B. y Miller R.V. (ed.), *Gene transfer in the enviroment*, Mc Graw Hill, New York.

- Sun L., Bazin M.J., y Lynch J.M. 1993. Plasmid dynamics in a model soil column. *Mol.Ecol.* **2**:9-15.
- Vaara M., 1993. Antibiotic-supersusceptible mutants of *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*. *Antimicrobiol.Agents.Chemother.* **37**:2255-2260.
- Van Veen J.A., , van Oberbeek L.S., y van Elsas J.D.. 1997. Fate y activity of microorganisms introduced into soil. *Microbiology y Molecular Biology Reviews* **61**:121-135.
- Vermüe M., , Sikkema J., Verheul A., Bakker R., y Tramper J.. 1993. Toxicity of homologous solvents for the Gram-negative bacteria *Arthrobacter* y *Nocardia* sp. y the Gram-negative bacteria *Acinetobacter* y *Pseudomonas* sp. *Biotechnol.Bioeng.* **42**:747-758.
- Vighi M., y Calamari D.. 1987. A triparametric equation to describe QSARs for heterogeneous chemical substances. *Chemosphere* **16**:1043-1051.
- Wackett L.P., y Gibson D.T.. 1988. Degradation of trichloroethylene by toluene dioxygenase in whole cells studies with *Pseudomonas putida* F1. *Appl.Environ.Microbiol.* **54**:1704-1708.
- Wang Y., , Rawlings M., Gibson D.T., Labbé D., Bergeron H., Brousseau R., y Lau P.C.K.. 1995. Identification of a membrane protein y a truncated LysR-Type regulator associated with the toluene degradation pathway in *Pseudomonas putida* F1. *Mol.Gen.Genet.* **246**:570-579.
- Weber F.J., , Hage K.C., y de Bont J.A.M.. 1995. Growth of the fungus *Cladosporium sphaerospermum* with toluene as the sole Carbon y energy source. *Appl.Environ.Microbiol.* **61**:3562-3566.
- Weber F.J., , Isken S., y de Bont J.A.M.. 1994. Cis/trans isomerization of fatty acids as a defence mechanism of *Pseudomonas putida* strains to toxic concentrations of toluene. *Microbiol.* **140**:2013-2017.
- Weber F.J., 1993. Adaptation of *Pseudomonas putida* S12 to high concentrations of styrene and other organic solvents. *Appl.Environ.Microbiol.* 3502-3504.
- Whited G.M., y Gibson D.T. 1991. Toluene-4-monooxygenase, a three-component enzyme system that catalyzes the oxidation of toluene to p-cresol in *Pseudomonas mendocina* KR1.. *J.Bacteriol.* **173**:3010-3016.
- Whited G.M., y Gibson D.T. 1991. Separation y partial characterization of the enzymes of the toluene- 4-monooxygenase catabolic pathway in *Pseudomonas mendocina* KR1. *J.Bacteriol.* **173**:3017-3020.
- Williams Peter A., y Worsey Michael J.. 1976. Ubiquity of plasmid in coding for toluene and xylene metabolism in soil bacteria: Evidence for the existence of new TOL plasmids. *J.Bacteriol.* **125**:818-828.
- Williams P.A., , Shaw L.M., Pitt C.W., y Vreal M.. 1991. *XylUW*, two genes at the start of the upper pathway operon of TOL plasmid pWW0, appear to play no essential part in determining its catabolic phenotype. *Microbiol.* **143**:101-107.
- Williams Peter A., y Sayers Jon R.. 1994. The evolution of pathways for aromatic hydrocarbon oxidation in *Pseudomonas*. *Biodegradation* **5**:195-217.
- Worsey M.J., y Williams P.A. 1975. Metabolism of toluene y the xylenes by *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: evidence for a new function of the TOL plasmid. *J.Bacteriol.* **124**:7-13.

- Wright A., y Olsen R.H.** 1994. Self-mobilization y organization of the genes encoding the toluene metabolic pathway of *Pseudomonas mendocina* KR1.. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:235-244.
- Xian L., Zhang L., y Poole K.** 1998. Role of the multidrug efflux systems of *Pseudomonas aeruginosa* in organic solvent tolerance. *J. Bacteriol.* **180**:2987-2991.
- Xian-Zhi li., Livermore D. M., y Nikaido H.** 1994. Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: Resistance to tetracycline, Chloramphenicol, y Norfloxacin. *Antimicrobial agents y chemotherapy.* **38**:1732-1741.
- Yeagle P.L.,** 1989. Lipid regulation of cell membrane structure y function. *FASEB J.* **3**:1833-1842.
- Yen K., Karl M., Blatt L., Simon M., Winter R., Fausset P., Lu H., Harcourt A.A., y Chen K.K.** 1991. Cloning y characterization of a *Pseudomonas mendocina* KR1 gene cluster encoding toluene-4-moxigenase. *J. Bacteriol.* **173**:5315-5327.
- Yen K., y Karl M.R.** 1992. Identification of a new gene, *tmoF*, in the *Pseudomonas mendocina* KR1 gene cluster encoding toluene-4-monooxygenase. *J. Bacteriol.* **174**:7253-7261.
- Yi Mu Der., y Scow Kate M.** 1994. Effect of trichloroethylene (TCE) and toluene contrations on TCE and toluene biodegradation and the population density of TCE and toluene degraders in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:2661-2665.
- Yoshimura F., y Nikaido H.** 1982. Permeability of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane to hydrophobic solutes. *J. Bacteriol.* **152**:636-642.
- Zechman James M., y Casida L.E.** 1982. Death of *Pseudomonas aeruginosa* in soil. *Can. J. Microbiol.* **28**:788-794.
- Zhou E., y Crawford R.L.** 1995. Effects of oxygen, nitrogen, y temperature on gasoline biodegradation in soil. *Biodegradation* **6**:127-140.
- Zylstra G.J., y Gibson D.T.** 1989. Toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1: nucleotide sequence of the *todC1C2BADE* genes y their expression in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **264**:14940-14946.