

Provi. 14/78

T
12
117

Facultad de Ciencias
Sección Biológicas
UNIVERSIDAD DE GRANADA

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha 22-7-94
ENTRADA NUM. 1109

"DEGRADACION BACTERIANA DE COMPUESTOS NITROAROMATICOS:
POTENCIAL DEL PLASMIDO TOL pWW0 DE PSEUDOMONAS PUTIDA PARA LA
TRANSFORMACION DE NITROTOLUENOS"

Tesis Doctoral

"DEGRADACION BACTERIANA DE COMPUESTOS NITROAROMATICOS:
POTENCIAL DEL PLASMIDO TOL pWW0 DE PSEUDOMONAS PUTIDA
PARA LA TRANSFORMACION DE NITROTOLUENOS"

El Director

Mención que presenta la Licenciada en
Ciencias Biológicas Asunción Delgado
Delgado para aspirar al Título de Doctor

Fdo: Juan Luis Ramos Martín
Doctor en Biología
Investigador Científico del CSIC

Fdo: Asunción Delgado Delgado

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
Nº Documento 519663195
Copia 2121203X

Asunción Delgado Delgado
1994

"DEGRADACION BACTERIANA DE COMPUESTOS NITROAROMATICOS:
POTENCIAL DEL PLASMIDO TOL pWW0 DE *PSEUDOMONAS PUTIDA* PARA LA
TRANSFORMACION DE NITROTOLUENOS"

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.

Vº Bº
El Director

Memoria que presenta la Licenciada en
Ciencias Biológicas Asunción Delgado
Delgado para aspirar al Título de Doctor



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



Fdo.: Asunción Delgado Delgado

Al finalizar este trabajo de tesis doctoral quiero expresar mi agradecimiento profundo a las personas que de algún modo han contribuido a su realización:

A Dr. Juan Luis Ramos, director de este trabajo, por todas las cosas que he aprendido de él, que me han ayudado no sólo en el plano científico, sino en otros aspectos de mi vida.

A M^ª Teresa González, que me condujo hasta lo que han sido estos años de vida de ilusión, por desempeñar con creces sus funciones de tutoría en la Universidad.

A Marian Saiz y a Guadalupe Pardo, por su rectitud, transparencia y disponibilidad, y por haberme acogido en la Unidad Estructural de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de Plantas de la Estación Experimental del Zaidín (C.S.I.C.), Granada.

A Guadalupe Pardo, por su constante presencia y apoyo, que supone notar esa presencia constante.

A Silvia Marqués, por su ayuda en la preparación y análisis de ARN, y sobre todo por ella "en sí misma".

A M^ª Angeles Ramos por su serenidad, y a M^ª Carmen Renchel por su humor, que me han ayudado a ver las cosas desde otros puntos de vista.

A Ali Haidour por sus valiosos comentarios científicos y por su ayuda en la realización de extractos y en la identificación de metabolitos, a Rafael Salto por la reconstrucción del plásmido pERD411.

A todos ellos y al resto del grupo de Biodegradación, por contribuir a poner esa chispa especial a las horas en el laboratorio, por tantos ratos de risas y por su apoyo siempre.

A tantas personas de mi familia y amigos con los que he brindado algunas veces y que han sido respaldo y apoyo otras, sencillamente por estar conmigo.

A todos, GRACIAS

Al finalizar este trabajo de tesis doctoral quiero expresar mi agradecimiento profundo a las personas que de algún modo han contribuído a su realización:

Al Dr. Juan Luis Ramos, director de este trabajo, por todas la cosas que he aprendido de él, que me han ayudado no sólo en el plano científico, sino en otros aspectos de mi vida.

A M^a Teresa González, que me condujo hasta lo que han sido estos años de trabajo e ilusión, por desempeñar con creces sus funciones de tutoría en la Universidad.

A Mariam Sahrawy y Gabriela Pastori, por su rectitud, transparencia y disponibilidad, y por lo que ha supuesto para mí contar con su apoyo incondicional.

A Guadalupe Piñar, por demostrarme una vez más lo que supone notar esa cercanía constante, en los buenos y en los malos momentos.

A Silvia Marqués, por su ayuda en la preparación y análisis de ARN, y sobre todo por ella "en sí misma".

A M^a Angeles Ramos por su serenidad, y a M^a Carmen Ronchel por su humor, que me han ayudado a ver las cosas desde otros puntos de vista.

A Ali Haïdour por sus valiosos comentarios científicos y por su ayuda en la realización de extractos y en la identificación de metabolitos; a Rafael Salto por la reconstrucción del plásmido pERD411.

A todos ellos y al resto del grupo de Biodegradación, por contribuir a poner esa chispa especial a las horas en el laboratorio, por tantos ratos de risas y por su apoyo siempre.

A tantas personas de mi familia y amigos con los que he brindado algunas veces y que han sido respaldo y apoyo otras, sencillamente por estar conmigo.

A todos, GRACIAS.

A Antonio
A mis padres y hermanos

INDICE

INTRODUCCIÓN

I. Degradación bacteriana de hidrocarburos aromáticos	1
1. Estrategias bioquímicas para el catabolismo de compuestos aromáticos	5
1.1. Formación de los derivados dihidroxilados	6
1.2. Existencia de dos tipos de fisión del anillo que determinan la vía degradativa posterior	23
1.3. Degradación de los productos de fisión de anillos aromáticos hasta intermediarios del ciclo de Krebs	27
2. Organización genética de las rutas degradativas	27
3. Evolución en el laboratorio de rutas catabólicas de compuestos aromáticos	29
II. Degradación bacteriana de compuestos nitroaromáticos	
Rutas degradativas de compuestos nitroaromáticos	
1.1. Formas de ataque al grupo nitro	29
1.1.1. La liberación directa del grupo nitro	29
1.1.2. La reducción del grupo nitro en el anillo aromático	30
1.2. La fisión del anillo	30
2. Organización genética	30
III. Las rutas degradativas codificadas por el plásmido TOL pWW0 de <i>Pseudomonas putida</i>	31
1. Características generales de TOL	32
2. Las rutas degradativas codificadas por TOL	28
2.1. La ruta "upper" de TOL	30
2.1.1. Tolueno monooxigenasa	31
2.1.2. Alcohol bencílico deshidrogenasa	31
2.1.3. Benzaldehído deshidrogenasa	32
2.2. La ruta <i>meta</i> de TOL	32
3. El modelo de regulación de la transcripción de las rutas catabólicas de TOL	33
4. La estimulación de la transcripción mediada por XylR	34
4.1. El gen <i>xyIR</i> y su producto	34
4.2. Los promotores activados por XylR	36

INDICE

INTRODUCCION

I. Degradación bacteriana de hidrocarburos aromáticos.....	5
1. Estrategias bioquímicas para el catabolismo de compuestos aromáticos.....	5
1.1. Formación de los derivados dihidroxilados.....	6
1.2. Existen dos tipos de fisión del anillo que determinan la ruta degradativa posterior.....	8
1.3. Degradación de los productos de fisión de anillos aromáticos hasta intermediarios del ciclo de Krebs.....	10
2. Organización genética de las rutas degradativas.....	13
3. Evolución en el laboratorio de rutas catabólicas de compuestos aromáticos.....	14
II. Degradación bacteriana de compuestos nitroaromáticos.....	17
1. Rutas degradativas de compuestos nitroaromáticos.....	18
1.1. Formas de ataque al grupo nitro.....	19
1.1.1. La liberación directa del grupo nitro.....	20
1.1.2. La reducción del grupo nitro en el anillo aromático.....	22
1.2. La fisión del anillo.....	25
2. Organización genética.....	26
III. Las rutas degradativas codificadas por el plásmido TOL pWW0 de <i>Pseudomonas putida</i>	27
1. Características generales de TOL.....	28
2. Las rutas degradativas codificadas por TOL.....	28
2.1. La ruta "upper" de TOL.....	30
2.1.1. Tolueno monooxigenasa.....	31
2.1.2. Alcohol bencílico deshidrogenasa.....	31
2.1.3. Benzaldehído deshidrogenasa.....	32
2.2. La ruta <i>meta</i> de TOL.....	32
3. El modelo de regulación de la transcripción de las rutas catabólicas de TOL.....	33
4. La estimulación de la transcripción mediada por XylR.....	34
4.1. El gen <i>xylR</i> y su producto.....	34
4.2. Los promotores activados por XylR.....	36

OBJETIVOS

41

MATERIALES Y METODOS

45

1. Cepas bacterianas.....	47
1.1. Identificación de bacterias.....	47
2. Medios de cultivo	47
2.1. Medios ricos.....	49
2.2. Medios mínimos.....	50
2.3. Antibióticos.....	51
3. Conservación de cepas bacterianas	52
4. Plásmidos	52
5. Aislamiento de ADN plasmídico.....	52
5.1. Método "Magic Miniprep"	55
5.2. Método de la lisis alcalina.....	55
5.2.1. Aislamiento de plásmidos a pequeña escala	55
5.2.2. Aislamiento de plásmidos a escala media	57
5.2.3. Aislamiento de plásmidos a gran escala y purificación en gradiente de cloruro de cesio.....	57
5.3. Aislamiento de megaplásmidos.....	58
6. Transformación de <i>Escherichia coli</i>	59
6.1. Preparación de células competentes	59
6.2. Transformación.....	60
7. Transferencia de plásmidos por conjugación.....	60
8. Manipulación de ADN	61
8.1. Determinación de la concentración de ADN.....	61
8.2. Restricción de ADN.....	62
8.3. Separación de moléculas de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa.....	62
8.4. Recuperación de moléculas de ADN de geles de agarosa	64
8.5. Ligación de ADN	64
8.6. Secuenciación de ADN	64
8.6.1. Reacción de extensión.....	65
8.6.2. Separación de las cadenas extendidas.....	68
8.7. Preparación de ARN y análisis de extensión de cebador.....	69
9. Preparación de extractos libres de células.....	71

10. Medida de actividades enzimáticas	71
10.1. Ensayo de actividad alcohol bencílico deshidrogenasa.....	71
10.2. Ensayo de la actividad benzaldehído deshidrogenasa	72
10.3. Ensayo de la actividad β -galactosidasa.....	73
11. Determinación cuantitativa de proteínas	74
12. Determinación de amonio.....	75
13. Determinación de nitrito.....	76
14. Preparación de extractos para el análisis por espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear de protones.....	77
15. Separación de compuestos aromáticos mediante cromatografía líquida de alta presión.....	77
RESULTADOS	79
I. Compuestos nitroaromáticos como sustratos de la ruta "upper" del plásmido TOL.....	81
1. Nitrotoluenos como sustratos de la tolueno monooxigenasa de TOL	81
1.1. Transformación de nitrotoluenos por la tolueno monooxigenasa en <i>Escherichia coli</i>	83
1.2. Transformación de nitrotoluenos por la tolueno monooxigenasa en <i>Pseudomonas putida</i>	86
2. Alcoholes nitrobencílicos como sustratos de la alcohol bencílico deshidrogenasa de TOL	87
3. Nitrobenzaldehídos como sustratos de la benzaldehído deshidrogenasa de TOL	89
II. Compuestos nitroaromáticos como inductores de las rutas catabólicas del plásmido TOL.....	91
1. Nitroaromáticos como efectores de XylR.....	97
2. Aislamiento de mutantes de XylR.....	98
3. XylR7, un mutante de XylR capaz de reconocer 3-nitrotolueno.....	100
3.1. Cambios en la secuencia del alelo mutante <i>xylR7</i>	100
3.2. Caracterización de la estimulación de la transcripción desde el promotor Pu por XylR7.....	103
3.2.1. Perfil de efectores del regulador mutante XylR7.....	105
3.2.2. Determinación del punto de iniciación de la transcripción desde Pu por XylR7.....	105

Al iniciarse este trabajo, no se habían descrito bacterias capaces de degradar nitroarómatos, mientras que la degradación de otros nitroaromáticos más peores se sabía que era bien documentada.

Estudios preliminares habían mostrado que *Pseudomonas putida* 2-001 portadora de *NR* es capaz de utilizar nitrotoluenos como fuente de carbono y de nitrógeno.

El plásmido TOL es el mejor caracterizado plásmido de *Pseudomonas putida* en cuanto a la organización genética de las rutas catabólicas que codifica de los sistemas operacionales que componen dichas rutas catabólicas y de sus mecanismos de regulación. Basándose en este, clasificando un candidato apropiado para estudiar si en alguna ruta de los dependientes enzimáticos de este plásmido se reconocían compuestos nitroaromáticos, en particular era de interés esperar la especificidad relativa de los enzimas de la ruta "upper" para biotransformar nitrotoluenos en nitrobenzoatos. De este modo, los objetivos de este trabajo fueron los siguientes:

1. Por un lado determinar si los compuestos nitroaromáticos eran sustratos de los enzimas de la ruta "upper" de TOL.

2. Por otro lado establecer el perfil de nitroaromáticos que son reconocidos por el regulador XylR, y en caso necesario inducir las mutaciones adecuadas para expandir el potencial de este regulador en la biodegradación de nitroaromáticos.

3. Aislar bacterias capaces de degradar nitrobenzoatos como preferentemente en ambientes como hospedadores para la expansión de las rutas de degradación de nitroaromáticos mediante la transferencia de los sistemas de TOL por medio de plásmidos mutacionados.

OBJETIVOS

La caracterización de estos tres elementos realizada en este trabajo supone las bases fundamentales para la construcción de rutas biológicas para la degradación completa de nitrotoluenos, mediante el acoplamiento de los elementos de TOL con aquellos para la degradación de nitrobenzoatos.

Por otro lado, el estudio del efecto de mutaciones de la proteína XylR sobre la expresión de los promotores que induce ha conducido al esclarecimiento de ciertos aspectos del mecanismo de activación de la transcripción estimulada por el regulador.

3.2.3. Requerimiento de NtrA para la estimulación de la transcripción desde Pu por XylR7	105
3.2.4. Requerimiento de IHF para la estimulación de la transcripción desde Pu por XylR7	106
3.2.5. Requerimiento de la zona UAS1 de Pu para la estimulación de la transcripción por XylR7	107
3.3. Estimulación de la transcripción desde el promotor Ps por XylR7	108
3.4. XylR7 reprime débilmente su propia síntesis.....	109
4. XylR49, un mutante constitutivo de XylR.....	110
4.1. Cambios en la secuencia del alelo mutante <i>xylR49</i>	110
4.2. Caracterización de la estimulación constitutiva de la transcripción desde el promotor Pu por XylR49	111
4.2.1. Determinación del punto de iniciación de la transcripción de Pu por XylR49	112
4.2.2. Requerimiento de NtrA para la estimulación de la transcripción desde Pu por XylR49.....	113
4.2.3. La estimulación de la transcripción desde Pu por XylR49 es independiente de IHF.....	114
4.2.4. Requerimiento de la región UAS de Pu para la estimulación de la transcripción por XylR49.....	115
4.2.5. Efecto de mutaciones puntuales en la región UAS sobre la estimulación de la transcripción por XylR49.....	116
4.3. Estimulación constitutiva de la transcripción desde el promotor Ps por XylR49	117
4.4. XylR49 reprime fuertemente su propia síntesis.....	118
III. Aislamiento y caracterización de una bacteria capaz de crecer a expensas de 4-nitrobenzoato.....	119
1. Aislamiento de microorganismos degradadores de 4-nitrobenzoato.....	120
2. Caracterización fisiológica de la cepa 410P.....	121
2.1. Identificación de la cepa 410P.....	121
2.2. 4-nitrobenzoato como sustrato para el crecimiento de la bacteria <i>Klebsiella oxytoca</i> 410P	122
2.2.1. Efecto de la concentración inicial de 4-nitrobenzoato sobre el crecimiento.....	123

2.2.2. El crecimiento en 4-nitrobenzoato de la cepa 410P conlleva la acumulación de amonio	124
2.2.3. Efecto de la adición de extracto de levadura sobre el crecimiento de la cepa 410P en 4-nitrobenzoato.....	126
2.2.4. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de la cepa 410P.....	127
2.3. El fenotipo de crecimiento en 4-nitrobenzoato de la bacteria 410P es estable	128
2.4. Acumulación de metabolitos durante el crecimiento de la cepa 410P en 4-nitrobenzoato	130
2.5. Identificación del sustrato de la dioxigenasa en la ruta de degradación del 4-nitrobenzoato por la bacteria 410P	134
2.6. Sustratos de crecimiento de la bacteria 410p	136
3. Presencia de un megaplásmido en la cepa 410P	138
4. Inducibilidad de la ruta de degradación de 4-nitrobenzoato de la bacteria 410P	139
4.1. Utilización de otros nitrobenzoatos por células inducidas de la cepa 410P.....	141
DISCUSION	143
I. Degradación bacteriana de nitroaromáticos	145
1. Potencial de la ruta "upper" del plásmido TOL para la degradación de nitrotoluenos	146
1.1. Reconocimiento de nitroaromáticos por los elementos enzimáticos y reguladores de la ruta "upper"	147
1.2. Desbloqueo del reconocimiento de nitroaromáticos por XylR.....	149
2. Degradación de 4-nitrobenzoato por <i>Klebsiella oxytoca</i> 410P	150
II. Efecto de mutaciones puntuales en el dominio N-terminal de XylR.....	159
CONCLUSIONES	167
BIBLIOGRAFIA	173



ABREVIATURAS

Ap: ampicilina.

Cm: cloranfenicol.

EDTA: ácido etilendiaminotetracético.

IHF: factor de integración del hospedador ("integration host factor").

IPTG: isopropil- β -D-tiogalactopiranosido.

Km: kanamicina.

MATAB: bromuro de alquiltrimetilamonio.

NTG: N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina.

ONPG: *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido.

PIPES: piperacina-N,N'-bis[2-etanosulfonato].

SDS: laurilsulfato sódico.

Sm: estreptomicina.

TEMED: N,N,N',N',-tetrametiletildiamino[1,2-bis(dimetilamino)]-etano.

UAS: secuencia de activación de la transcripción ("upstream activation sequence").

X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido.

INTRODUCCION

El mantenimiento del ciclo del carbono en la naturaleza es consecuencia directa de la existencia de un equilibrio entre los procesos de síntesis y de consumo de materia orgánica llevados a cabo por los organismos vivos. Cuando un compuesto es de difícil degradación debido a su estabilidad química, como es el caso de los compuestos aromáticos, el proceso de reciclaje del carbono en la naturaleza se ralentiza, ya que estos compuestos se encuentran excluidos del ciclo durante periodos más o menos prolongados de tiempo. En este sentido, el papel que juegan la enorme diversidad bacteriana y su gran capacidad de adaptación al medio es fundamental, ya que las bacterias poseen un arsenal extremadamente variado de enzimas catabólicas con los que atacar sustratos potenciales de crecimiento.

Sin embargo, la liberación a la biosfera de productos aromáticos ha aumentado en los últimos años como consecuencia de las actividades agrícola e industrial del hombre. Algunos de estos compuestos pueden ser degradados por rutas catabólicas, en particular aquellos denominados bioprenos, por presentar estructuras similares a las sintetizadas por los seres vivos. Sin embargo otros, los xenobióticos, en general persisten en el medio ambiente, bien porque son tóxicos en algún grado para los microorganismos, o bien porque sus estructuras o sustituyentes son inusuales para estos; por ello permanecen inalterados o son transformados a compuestos recalcitrantes. De esta forma, los compuestos xenobióticos constituyen el punto final de un flujo unidireccional que, partiendo de los recursos naturales, conduce a productos que no son degradados o lo son muy lentamente.

INTRODUCCION

Por tanto, uno de los desafíos principales de nuestro tiempo, es mejorar y explotar las rutas biodegradativas existentes para la eliminación de contaminantes ambientales, o si esto no es posible, desarrollar experimentalmente nuevas rutas catabólicas que sean efectivas para este propósito. El primer caso descrito de degradación bacteriana de compuestos aromáticos data de 1908, cuando Stormer aisló una bacteria del género *Bacillus* capaz de crecer en tolueno y xileno. A partir de entonces se ha aislado un gran número de bacterias que utilizan este tipo de compuestos como fuentes de carbono y energía. En otros casos no tiene lugar la mineralización del compuesto, sino sólo procesos de biotransformación que únicamente alteran su estructura química.

El mantenimiento del ciclo del carbono en la naturaleza es consecuencia directa de la existencia de un equilibrio entre los procesos de síntesis y de consumo de materia orgánica llevados a cabo por los organismos vivos. Cuando un compuesto es de difícil degradación debido a su estabilidad química, como es el caso de los compuestos aromáticos, el proceso de reciclaje del carbono en la naturaleza se enlentece, ya que estos compuestos se encuentran excluidos del ciclo durante períodos más o menos prolongados de tiempo. En este sentido, el papel que juegan la enorme diversidad bacteriana y su gran capacidad de adaptación al medio es fundamental, ya que las bacterias poseen un arsenal extremadamente variado de enzimas catabólicas con los que atacar sustratos potenciales de crecimiento.

Sin embargo, 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 pueden ser degradados por rutas catabólicas, en particular aquellos denominados biogénicos, por presentar estructuras similares a las sintetizadas por los seres vivos. Sin embargo otros, los xenobióticos, en general persisten en el medio ambiente, bien porque son tóxicos en algún grado para los microorganismos, o bien porque sus estructuras o sustituyentes son inusuales para éstos; por ello permanecen inalterados o son transformados a compuestos recalcitrantes. De esta forma, los compuestos xenobióticos constituyen el punto final de un flujo unidireccional que, partiendo de los recursos naturales, conduce a productos que no son degradados o lo son muy lentamente.

Por tanto, uno de los desafíos principales de nuestro tiempo, es mejorar y explotar las rutas biodegradativas existentes para la eliminación de contaminantes ambientales, o si esto no es posible, desarrollar experimentalmente nuevas rutas catabólicas que sean efectivas para este propósito. El primer caso descrito de degradación bacteriana de compuestos aromáticos data de 1908, cuando Stormer aisló una bacteria del género *Bacillus* capaz de crecer en tolueno y xileno. A partir de entonces se ha aislado un gran número de bacterias que utilizan este tipo de compuestos como fuentes de carbono y energía. En otros casos no tiene lugar la mineralización del compuesto, sino sólo procesos de biotransformación que únicamente alteran su estructura química.

Además de la degradación por bacterias individuales, en muchos casos comunidades bacterianas formadas por varios microorganismos están implicadas en la biodegradación de distintos compuestos, mediante complejos procesos de cometabolismo que ocurren tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas.

El objeto de este trabajo ha sido el estudio de procesos degradativos de compuestos nitroaromáticos por cultivos puros de bacterias en condiciones de aerobiosis. En esta sección de Introducción se describen las rutas generales por las que las bacterias degradan oxidativamente anillos aromáticos derivados del benceno, de las que las codificadas por el plásmido TOL pWW0 son las mejor caracterizadas a nivel bioquímico y genético. De igual forma se describen procesos biodegradativos que ocurren en el caso particular de compuestos con sustituciones nitro.

I. DEGRADACION BACTERIANA DE HIDROCARBUROS AROMATICOS

El estudio bioquímico y genético de los mecanismos por los cuales las bacterias degradan compuestos aromáticos es imprescindible para el diseño estrategias que permitan acelerar la evolución de rutas catabólicas en el laboratorio y permitir el metabolismo de compuestos recalcitrantes.

Una característica común de los mecanismos de degradación de compuestos aromáticos por bacterias, es la canalización de los 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 distintos microorganismos. El perfil de sustratos de estos enzimas es amplio, y los tipos de reacciones que llevan a cabo están encaminadas a la activación del anillo aromático. Por otro lado, en general las rutas catabólicas para este tipo de compuestos se encuentran sometidas a procesos de regulación, esto es, los enzimas se sintetizan en respuesta a la presencia de determinados compuestos. Los beneficios de la canalización de diversos compuestos hasta unas pocas rutas centrales y la regulación de estos procesos, como son la reducción de la carga genética y la simplificación de los circuitos regulatorios, son claramente de una gran ventaja para los microorganismos, que con frecuencia se encuentran en ambientes desfavorables que contienen bajas concentraciones de fuentes de carbono para su crecimiento.

1. ESTRATEGIAS BIOQUIMICAS PARA EL CATABOLISMO DE COMPUESTOS AROMATICOS

En el catabolismo aeróbico de moléculas aromáticas por bacterias, las reacciones iniciales conducen a la formación de intermediarios dihidroxilados con los grupos hidroxilo situados en las posiciones *orto* o *para* de la molécula (Nozaki, 1974). La formación de estos derivados es la estrategia bioquímica que han adoptado los microorganismos para desestabilizar la estructura resonante del anillo aromático (Dagley, 1978 y 1986). Los compuestos dihidroxilados son sustrato de las dioxigenasas, los enzimas responsables de la fisión del anillo aromático. Posteriormente, los productos

de la rotura de éste son degradados hasta intermediarios del metabolismo central de la célula.

1.1. FORMACION DE LOS DERIVADOS DIHIDROXILADOS

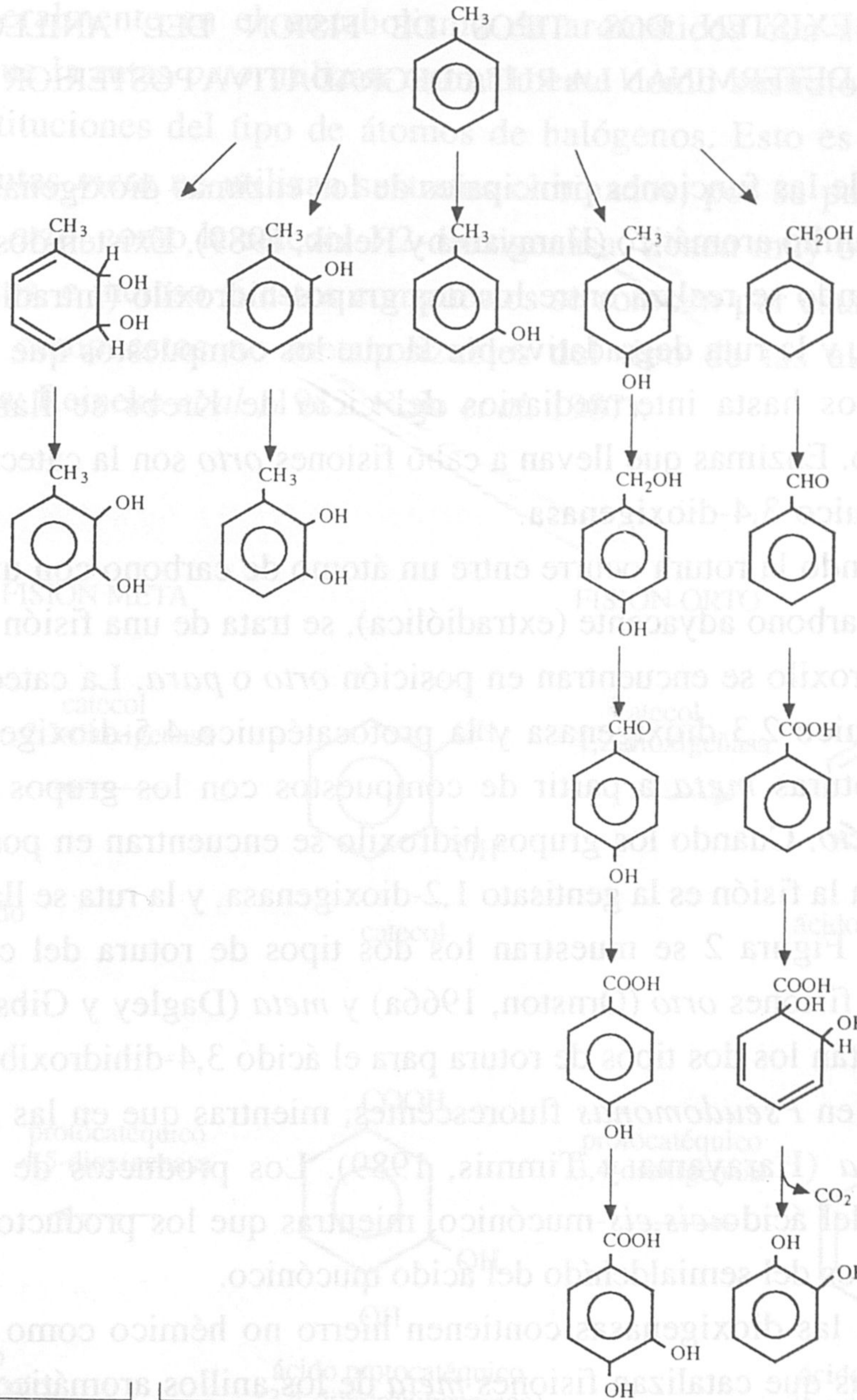
La biotransformación de los compuestos aromáticos hasta sus derivados dihidroxilados se realiza en general a base de procesos de oxidación y de sustitución por grupos hidroxilo de diversos sustituyentes, como grupos metoxilo, amino, nitro, átomos halógenos, etc. Un mismo compuesto aromático puede sufrir distintos tipos de ataque que conduzcan a la forma activada con los dos grupos hidroxilo. Estos ataques son llevados a cabo por enzimas oxigenasas, que catalizan la incorporación de oxígeno a sustratos orgánicos como grupos hidroxilo. Se clasifican en dos grupos, monooxigenasas y dioxigenasas, según catalicen la incorporación de uno o los dos átomos de una molécula de oxígeno (Nozaki, 1979).

El ataque de las dioxigenasas se puede realizar directamente sobre el anillo bencénico, o sobre un sustituyente de éste. En la Figura 1.a se muestra un esquema de las reacciones descritas de formación de derivados hidroxilados a partir del tolueno. Existen monooxigenasas capaces de atacar inicialmente las posiciones 2, 3 y 4 del anillo (Folsom *et al.*, 1990; Shields *et al.*, 1989; Kukor y Olsen, 1990; Whited y Gibson, 1991). Cuando éste es sustrato de una dioxigenasa se forma un *cis*-diol que posteriormente es oxidado hasta metilcatecol (Gibson *et al.*, 1970). Alternativamente la cadena alquílica 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 el ácido benzoico; éste es descarboxilado y oxigenado para producir catecol (Murray *et al.*, 1972; Worsey y Williams, 1975).

Cuando el compuesto presenta ya un grupo hidroxilo, como el fenol, éste se oxida a catecol por una fenol hidroxilasa, como se representa en la Figura 1.b (Shingler *et al.*, 1989).

El catabolismo de sustratos aromáticos con sustituciones de tipo metoxilo o átomos de cloro, etc., suele implicar pasos adicionales para el procesamiento de los sustituyentes. Estas reacciones son catalizadas por monooxigenasas o hidroxilasas (Harayama y Timmis, 1989). Por ejemplo, en el caso del 4-metoxibenzoato que se forma durante la degradación de la lignina, existe una demetilasa hidroxilante que separa el grupo metoxilo e introduce un grupo hidroxilo (Figura 1.c); el 4-hidroxibenzoato resultante se hidroxila para rendir 3,4-dihidroxibenzoato (Kirk, 1984).

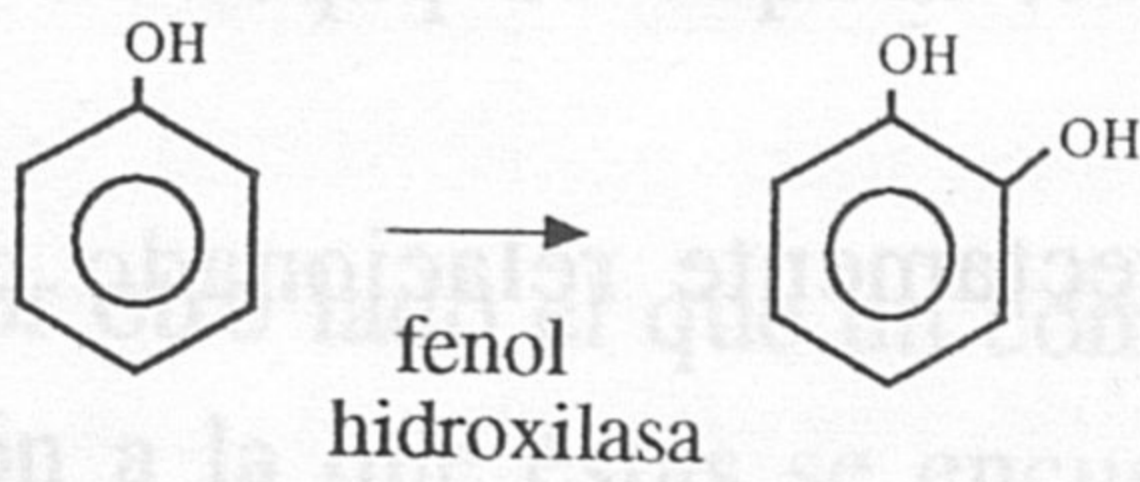
1.a



oxigenasa inicial: dioxigenasa monooxigenasa

ataque al anillo ataque al sustituyente

1.b



1.c

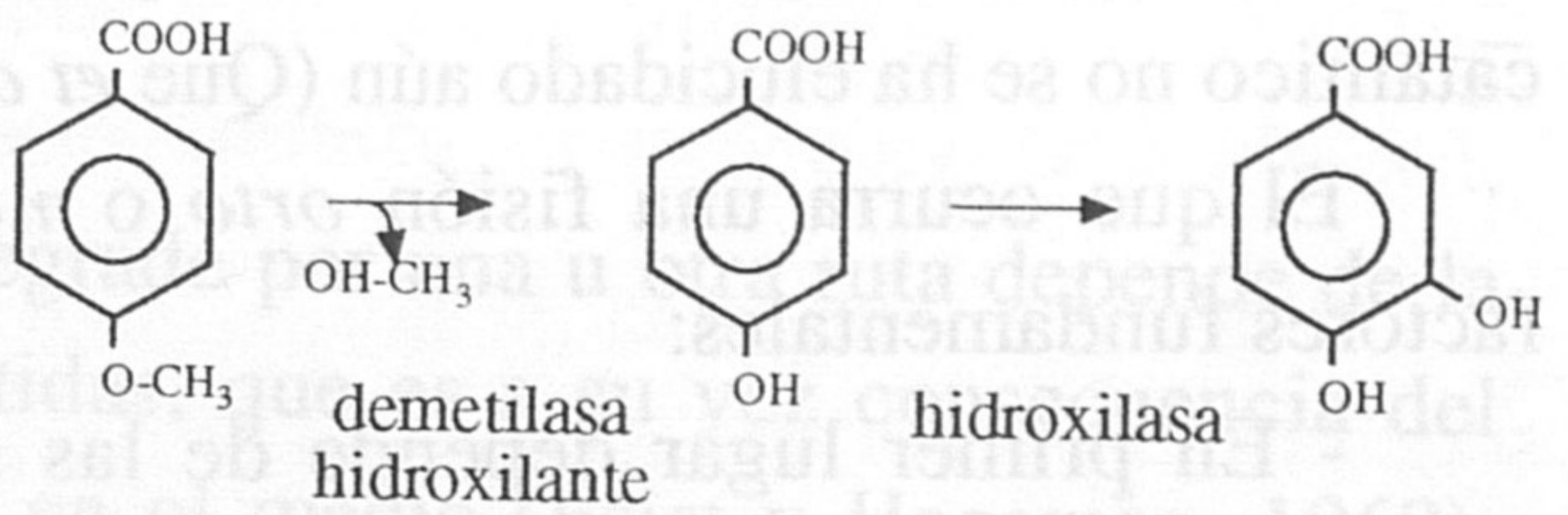


Figura 1. Formación de derivados hidroxilados a partir de compuestos aromáticos.

1.2. EXISTEN DOS TIPOS DE FISION DEL ANILLO AROMATICO QUE DETERMINAN LA RUTA DEGRADATIVA POSTERIOR

Una de las funciones principales de los enzimas dioxigenasas es la catálisis de la rotura del anillo aromático (Harayama y Reikik, 1989). Existen dos formas de fisión:

- Cuando se realiza entre los dos grupos hidroxilo (intradiólica) se conoce como fisión *orto*, y la ruta degradativa por la que los compuestos que han sufrido esta rotura son llevados hasta intermediarios del ciclo de Krebs se llama ruta *orto* o del β -cetoacido. Enzimas que llevan a cabo fisiones *orto* son la catecol 1,2-dioxigenasa y la protocatéquico 3,4-dioxigenasa.

- Cuando la rotura ocurre entre un átomo de carbono con un grupo hidroxilo y un átomo de carbono adyacente (extradiólica), se trata de una fisión *meta*. En este caso los grupos hidroxilo se encuentran en posición *orto* o *para*. La catecol 2,3-dioxigenasa, la protocatéquico 2,3-dioxigenasa y la protocatéquico 4,5-dioxigenasa son enzimas que realizan roturas *meta* a partir de compuestos con los grupos hidroxilo situados en posición *orto*. Cuando los grupos hidroxilo se encuentran en posición *para*, el enzima que cataliza la fisión es la gentisato 1,2-dioxigenasa, y la ruta se llama ruta del gentisato.

En la Figura 2 se muestran los dos tipos de rotura del catecol cuando este es sustrato de fisiones *orto* (Ornston, 1966a) y *meta* (Dagley y Gibson, 1965). Igualmente se representan los dos tipos de rotura para el ácido 3,4-dihidroxibenzoico, que sufre una fisión *orto* en *Pseudomonas* fluorescentes, mientras que en las no fluorescentes sufre rotura *meta* (Harayama y Timmis, 1989). Los productos de las fisiones *orto* son derivados del ácido *cis,cis*-mucónico, mientras que los productos de las fisiones *meta* son derivados del semialdehído del ácido mucónico.

Todas las dioxigenasas contienen hierro no hémico como grupo prostético. Las dioxigenasas que catalizan fisiones *meta* de los anillos aromáticos contienen Fe^{3+} en la forma activa de la proteína y son homopolipéptidos; en contraste, las que catalizan roturas *orto* contienen Fe^{2+} en la forma activa de la proteína, y están compuestas por una subunidad o dos subunidades diferentes (Nozaki 1979; Ludwig *et al.* 1984). El hierro es esencial para la catálisis por estas enzimas, aunque su papel en el ciclo catalítico no se ha elucidado aún (Que *et al.* 1987).

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 los enzimas iniciales de estas rutas con frecuencia muestran un 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 la rutas *orto* utilizan normalmente como sustratos anillos no sustituidos o con sustituciones del tipo de átomos de halógenos. Esto es así, ya que algunos enzimas de rutas *meta* no utilizan sustratos clorinados; por su parte enzimas que catalizan fisiones *orto*, como la catecol 1,2-dioxigenasa, tienen muy baja afinidad por los alquilaromáticos, e incluso si estos compuestos se rompen por esta vía, por lo general se acumulan compuestos no metabolizables del tipo de las alquilactonas (Harayama *et al.* 1987a; Reineke *et al.*, 1982; Rojo *et al.* 1987).

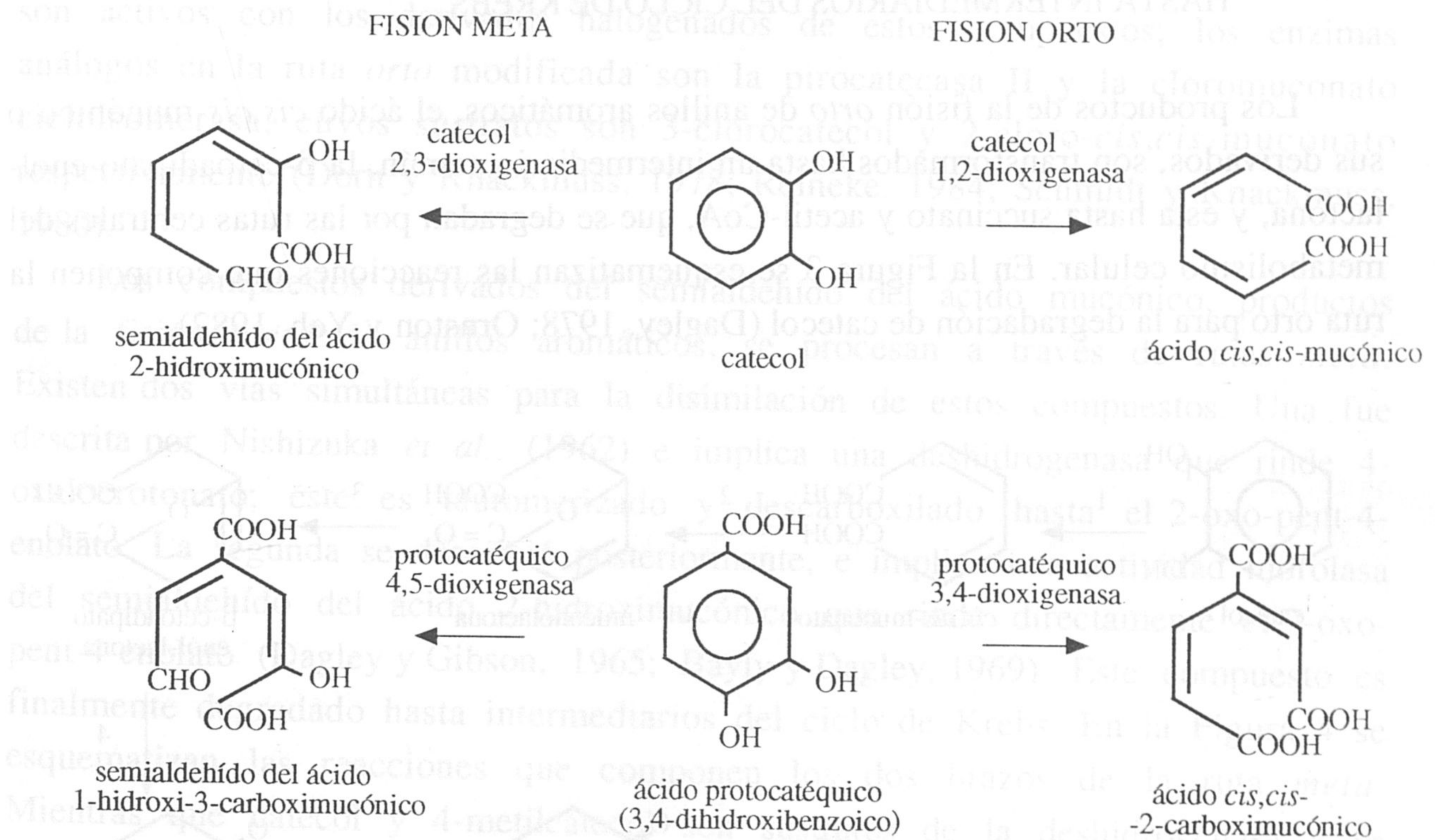


Figura 2. Fisiones *orto* y *meta* de catecol y ácido 3,4-dihidroxi-benzoico.

- 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. En el caso del

benzoato, por ejemplo, y de su producto dihidroxilado, el catecol, éstos son degradados en *Pseudomonas putida* por la ruta *orto*, (Johnson y Stanier, 1971); aunque el catecol no es inductor ni de *orto* ni de *meta*, el producto de su fisión, 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, 1966b; 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 por esta vía (Feist y Hegeman, 1969; Sala-Trepapat *et al.*, 1972).

1.3. DEGRADACION DE LOS PRODUCTOS DE FISION DE ANILLOS AROMATICOS 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, la β -cetoadipato enol-lactona, y ésta hasta succinato y acetyl-CoA, que se degradan por las rutas centrales del metabolismo celular. En la Figura 3 se esquematizan las reacciones que componen la ruta *orto* para la degradación de catecol (Dagley, 1978; Ornston y Yeh, 1982).

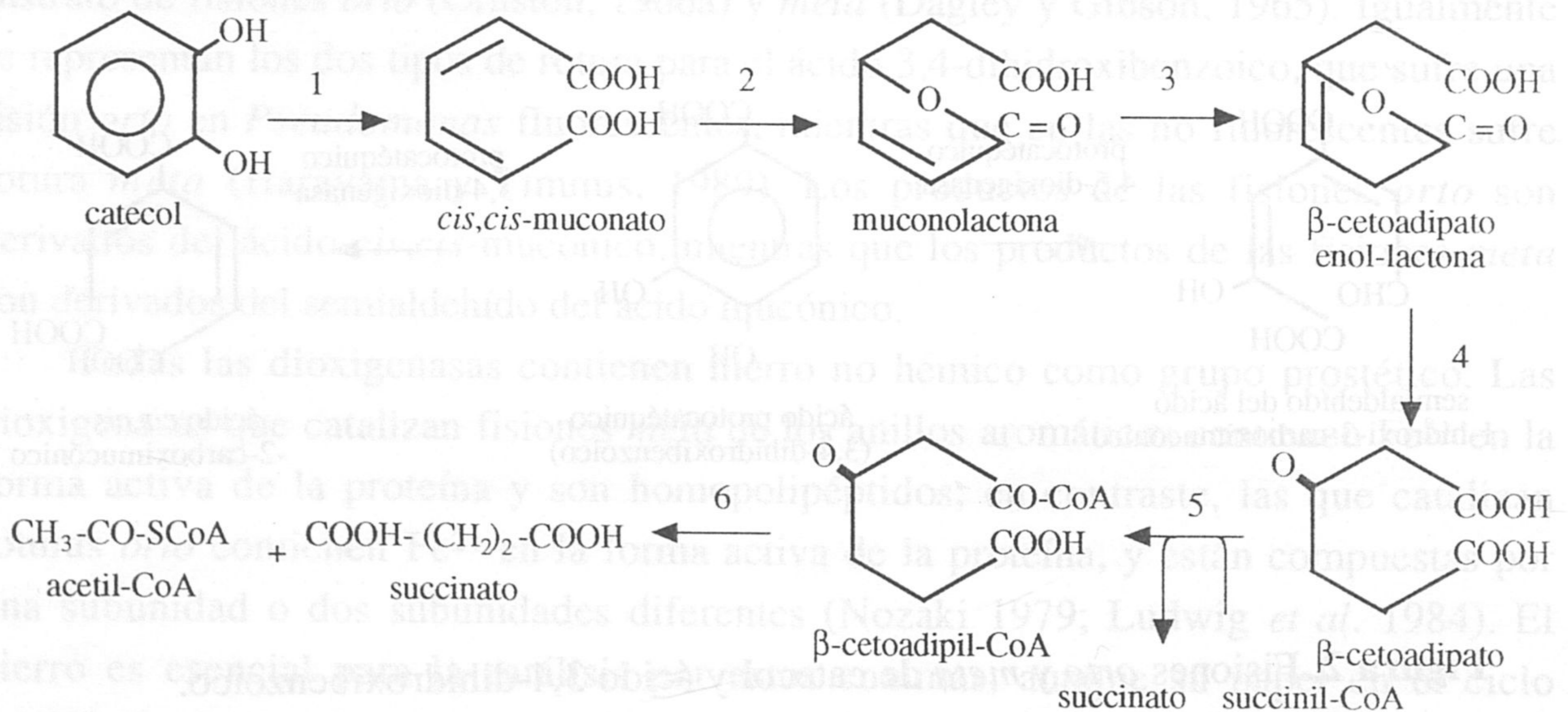


Figura 3. Esquema de la ruta *orto* para la degradación de catecol. Los enzimas son: (1) catecol 1,2-dioxigenasa, (2) enzima lactonizante de *cis,cis*-muconato, (3) muconolactona isomerasa, (4) β -cetoadipato-enol-lactona hidrolasa, (5) succinil-CoA: β -cetoadipil-CoA transferasa y (6) β -cetoadipil-CoA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

Organismos como *Pseudomonas* B13 que son capaces de degradar benzoato y 3-clorobenzoato tienen dos rutas paralelas del β -cetoadipato distintas, designadas ruta *orto* (para benzoato) y ruta *orto* modificada (para 3-clorobenzoato), que consisten en enzimas paralelos con especificidades de sustrato alteradas. Estas rutas divergen a nivel de los derivados dihidroxilados, catecol y 3-clorocatecol respectivamente; de este modo los pasos de rotura del anillo, lactonización, isomerización y delactonización de los sustratos no sustituidos son llevados a cabo por enzimas análogos pero claramente diferentes a los que utilizan los correspondientes sustratos sustituidos. Por ejemplo, la pirocatecasa I o la muconolactona isomerasa son altamente específicos para catecol y *cis,cis*-muconato respectivamente, y no son activos con los derivados halogenados de estos compuestos; los enzimas análogos en la ruta *orto* modificada son la pirocatecasa II y la cloromuconato cicloisomerasa, cuyos sustratos son 3-clorocatecol y 2-cloro-*cis,cis*-muconato respectivamente (Dorn y Knackmuss, 1978; Reineke, 1984; Schmidt y Knackmuss, 1980).

Los compuestos derivados del semialdehído del ácido mucónico, productos de la fisión *meta* de anillos aromáticos, se procesan a través de rutas *meta*. Existen dos vías simultáneas para la disimilación de estos compuestos. Una fue descrita por Nishizuka *et al.*, (1962) e implica una deshidrogenasa que rinde 4-oxalocrotonato; éste es tautomerizado y descarboxilado hasta el 2-oxo-pent-4-enolato. La segunda se describió posteriormente, e implica una actividad hidrolasa del semialdehído del ácido 2-hidroximucónico 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. En la Figura 4 se esquematizan las reacciones que componen los dos brazos de la ruta *meta*. Mientras que catecol y 4-metilcatecol son sustratos de la deshidrogenasa y se degradan hasta 2-oxo-pent-4-enolato por esta vía, el 3-metilcatecol es atacado por la hidrolasa (Sala-Trepat *et al.*, 1972). Dado que ambos brazos se inducen simultáneamente, el que se utilice una u otra vía es función de la K_m de la deshidrogenasa y de la hidrolasa por el catecol y los metilcatecoles.

Rutas metabólicas similares a la ruta *meta* también existen para el ácido 3,4-dihidroxibenzoico. Las rutas del gentisato para la degradación de compuestos como *m*-cresol y ácido 2,5-dihidroxibenzoato están menos directamente relacionadas con la ruta *meta*, pero hay una similitud significativa en el orden de las reacciones enzimáticas a las del brazo hidrolítico de la ruta *meta* del catecol (Dagley, 1978 y 1986).

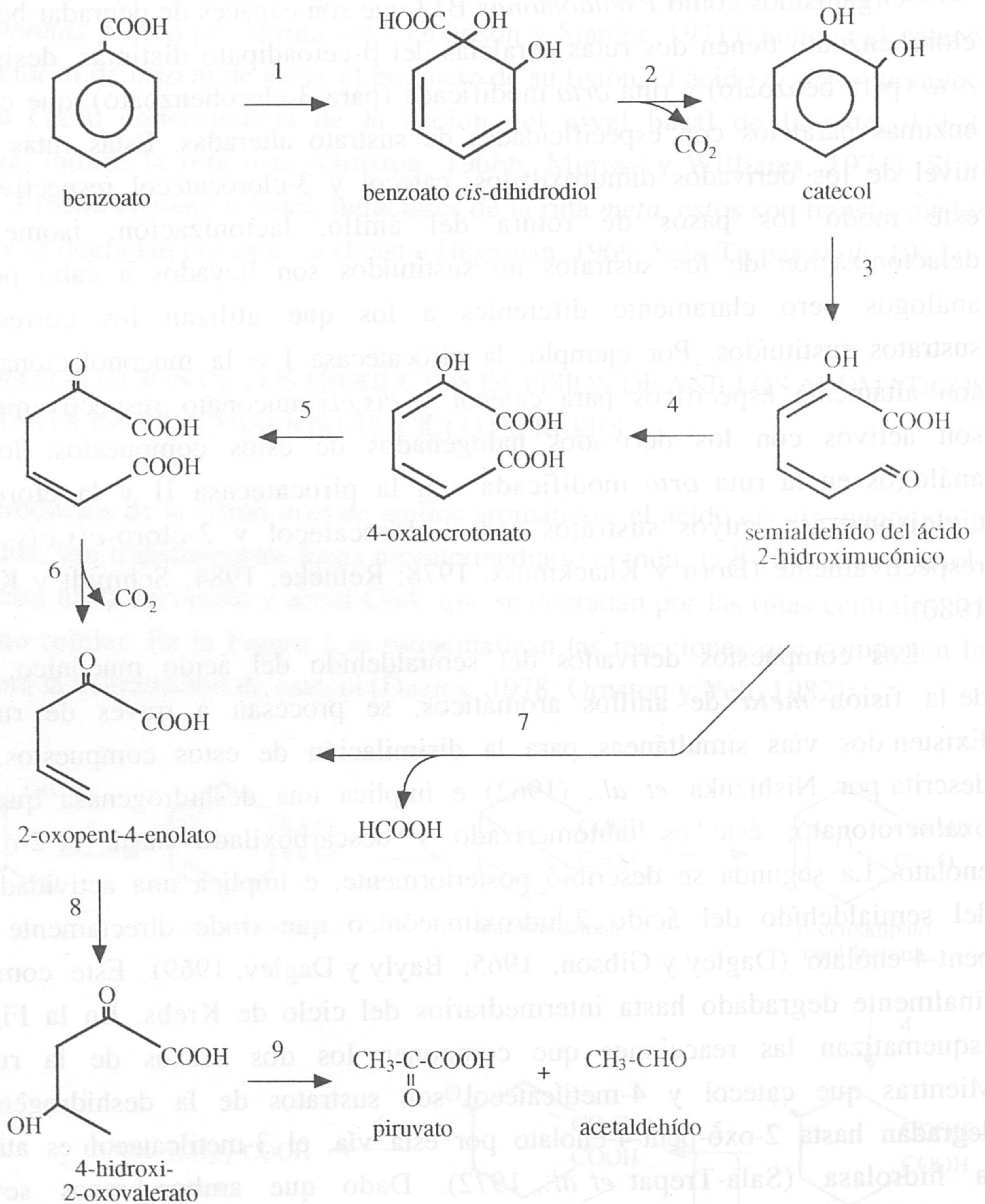


Figura 4. Esquema de la ruta *meta* para la degradación de benzoato. Los enzimas son: (1) benzoato 1,2-dioxigenasa, (2) 1,2-dihidroxi-3,5-ciclohexadieno-1-carboxilato deshidrogenasa, (3) catecol 2,3-dioxigenasa, (4) 2-hidroximucónico semialdehído deshidrogenasa, (5) 4-oxalocrotonato tautomerasa, (6) 4-oxalocrotonato descarboxilasa, (7) 2-hidroximucónico semialdehído hidrolasa, (8) 2-oxopent-4-enolato hidratasa y (9) 4-hidroxi-2-oxovalerato aldolasa.

2. ORGANIZACION GENETICA DE LAS RUTAS DEGRADATIVAS

Muchas rutas catabólicas bacterianas están codificadas por plásmidos (Haas, 1983; Farrell y Chakrabarty, 1979; Franz y Chakrabarty, 1986), algunos de los cuales son autotransferibles o movilizables por otros plásmidos. De esta forma, el espectro de bacterias hospedadoras que los portan se expande, y con ello el potencial metabólico de otros miembros de un ecosistema. Es por tanto fácil de entender la importancia de los plásmidos como agentes que facilitan el intercambio genético y la evolución bacteriana. En un ambiente rico en un compuesto orgánico particular, los organismos que lo degradan poseen ventajas selectivas frente a los no degradadores, de manera que la presencia del compuesto polucionante ejerce una presión selectiva para el mantenimiento de la ruta catabólica correspondiente.

Las rutas del β -cetoacido para la degradación de benzoato y 3,4-dihidroxibenzoato son, por lo general, de codificación cromosómica (Holloway y Morgan, 1986) lo que sugiere que la adquisición de esta ruta puede haber sido beneficiosa para ciertas bacterias durante un largo período de tiempo. En contraste, los enzimas de la ruta *orto* para la mineralización de clorocatecoles son de codificación plasmídica. En efecto, el plásmido pWR1 porta los genes específicos que codifican los enzimas para la degradación de 3-clorocatecol hasta intermediarios del ciclo de Krebs, que son pirocatecasa II, cloromuconato isomerasa, y diene lactona hidrolasa (Chatterjee y Chakrabarty, 1983; Dorn y Knackmuss, 1978; Reineke, 1984; Schmitd y Knackmuss, 1980). Estos genes están sometidos a amplificación génica en bacterias cultivadas en 3-clorobenzoato, de forma que la baja afinidad de los enzimas por sus sustratos respectivos se compensa mediante dosis génica (Ngai y Ornston, 1988; Rangnekar, 1988).

Por lo general, las rutas catabólicas tanto de codificación cromosómica como plasmídica están organizadas en operones. En ocasiones, no sólo el orden de los genes en un operón se conserva en rutas para la degradación de un compuesto determinado por microorganismos aislados independientemente, sino también los patrones de restricción. Por ejemplo, la ruta *meta* codificada por el plásmido NAH para la degradación de salicilato se parece a la del plásmido TOL para la degradación de benzoato y metilbenzoatos. Los genes que codifican para la degradación de catecol hasta piruvato y acetaldehído del plásmido TOL tienen el mismo orden que los del plásmido NAH (Harayama *et al.*, 1987b; Yen y Gunsalus, 1982), incluso existe homología de secuencias de ADN de enzimas isofuncionales (Harayama y Timmis, 1989). La organización estructural de los operones catabólicos de TOL y NAH es

consistente por tanto con una evolución de rutas complejas a través de la combinación de módulos genéticos discretos que codifican unidades bioquímicas funcionales (Harayama y Timmis).

3. EVOLUCION EN EL LABORATORIO DE RUTAS CATABOLICAS DE COMPUESTOS AROMATICOS

A pesar de la baja especificidad de algunos enzimas catabólicos, y de la gran diversidad metabólica bacteriana, en particular dentro del género *Pseudomonas*, es de interés la explotación de estas rutas degradativas para la degradación de otros compuestos recalcitrantes y tóxicos. El desarrollo de estas nuevas capacidades metabólicas se ha llevado a cabo mediante 3 estrategias principales: la selección en quimiostato, que permite mantener una presión selectiva por la utilización de un determinado compuesto; la transferencia génica "in vivo" mediante procesos de transducción, transformación y conjugación; y la evolución "in vitro" de nuevas rutas catabólicas, bien mediante la transferencia selectiva a diferentes microorganismos de genes clonados y bien caracterizados, o bien por medio de la inducción de una mutación en la especificidad de componentes enzimáticos y reguladores de la expresión génica.

El mantenimiento de presión selectiva en quimiostato se ha utilizado para el aislamiento de bacterias con determinadas capacidades catabólicas. Un ejemplo de esto lo constituye la cepa *Pseudomonas* B13, una bacteria capaz de crecer en benzoato que adquirió la capacidad de crecer en 3-clorobenzoato tras un periodo prolongado de incubación en presencia de este compuesto (Dorn *et al.*, 1974).

La evolución de rutas mediante la transferencia génica "in vivo" o "in vitro" puede ser utilizada cuando el compuesto recalcitrante tiene una estructura química similar a la de un compuesto mineralizable, esto es, convertible en CO₂ y H₂O. En primer lugar es necesaria la identificación de los elementos de la ruta que no son permisivos para el compuesto en cuestión y su modificación posterior, con objeto de hacerlos permisivos. Esto conduce a la expansión del perfil de sustratos de la ruta originaria. Esta expansión puede ser de dos tipos:

- Horizontal: se realiza mediante la transferencia de un enzima isofuncional de otra ruta degradativa, o por mutación que altere la especificidad de sustratos de un enzima. De esta forma la ruta expandida permite la metabolización de análogos de un compuesto degradable por ésta.

Esta estrategia fue utilizada por Reineke y Knackmuss, (1979) para la degradación de clorobenzoatos por la cepa *Pseudomonas* B13. En este caso fue necesaria la inactivación de enzimas isofuncionales preexistentes que conducían a la formación de intermediarios no metabolizables: B13, capaz de degradar 3-clorobenzoato por la ruta *orto*, no utiliza 4-clorobenzoato, debido a una falta de reconocimiento de este compuesto como sustrato por el primer enzima de la ruta, la benzoato dioxigenasa (Reineke, y Knackmuss, 1978). La transferencia a esta cepa del plásmido TOL, portador de una benzoato 1,2-dioxigenasa con un amplio espectro de sustratos, salvaría el bloqueo que existe únicamente a nivel de este enzima, ya que B13 es capaz de crecer en 4-clorocatecol. Sin embargo, cuando se transfirió TOL a B13 esta cepa fue capaz de crecer en 3-metilbenzoato, pero no en 4-clorobenzoato (Reineke y Knackmuss, 1979), y la razón de esto era que el producto de la oxidación del 4-clorocatecol por la catecol 2,3-dioxigenasa, el semialdehído del ácido 5-cloro-2-hidroxi-3-metil-3,5-ciclohexadieno-1-carboxilato, no es degradable por la bacteria, lo que provocaba su acumulación. La selección de un derivado de esta cepa en el que la catecol 2,3-dioxigenasa era inactiva permitió la transformación de 4-clorobenzoato a 4-clorocatecol mediante la benzoato 1,2-dioxigenasa y la 1,2-dihidroxi-3,5-ciclohexadieno-1-carboxilato deshidrogenasa del plásmido TOL, y la degradación posterior de éste por la ruta *orto* de B13 (Lehrbach *et al.*, 1984).

Por otro lado el procedimiento de mutagénesis para la alteración de la especificidad de enzimas determinados ha sido utilizado para la utilización de amidas alifáticas por *P. aeruginosa* (Hall y Hartl, 1974; Tuberville y Clarke, 1981), y del metabolismo de 4-etiltolueno por bacterias del género *Pseudomonas* que portan el plásmido TOL (Abril *et al.*, 1989).

La evolución de nuevas capacidades catabólicas puede implicar la necesidad de alterar el perfil de efectores de proteínas reguladoras de la expresión de los genes catabólicos. Un ejemplo de esto fue la alteración del perfil de efectores del regulador XylS del plásmido TOL para que adquiriera la capacidad de reconocer 3,5-diclorobenzoato, que permitió la construcción de una cepa derivada de B13 que degradaba este compuesto (Ramos *et al.*, 1986). Por otro lado, la alteración del perfil de efectores del regulador XylS, junto con la alteración puntual de la catecol 2,3-dioxigenasa del plásmido TOL permitió el aislamiento de cepas de *Pseudomonas putida* que degradaban 4-etilbenzoato (Ramos *et al.*, 1987b).

2. -Vertical: mediante la transferencia de segmentos de rutas de hospedadores con distintas capacidades catabólicas, de forma que se obtienen rutas expandidas por ensamblaje de otras vías metabólicas (Ramos y Timmis, 1987). La expansión de rutas degradativas mediante esta estrategia se ha usado en la degradación de 3-clorotolueno

por *Pseudomonas* B13, mediante la transferencia a esta bacteria del plásmido TOL pWW0, que aunque a baja velocidad, es capaz de oxidar 3-clorotolueno a 3-clorobenzoato. El 3-clorobenzoato es posteriormente degradado por la ruta *orto* modificada de B13 (Abril *et al.*, 1989).

Un ejemplo elegante y complejo de evolución de rutas catabólicas es el de ensamblaje de rutas para la degradación simultánea de alquil- y haloaromáticos realizado por Rojo y colaboradores (1987). La degradación de mezclas de estos sustratos por las rutas *meta* y *orto* respectivamente es incompatible, ya que ambas vías están inducidas en presencia de los dos tipos de compuestos, y como resultado del metabolismo de clorocatecoles por la ruta *meta* se acumulan productos no degradables (Bartels *et al.*, 1984; Schmidt *et al.*, 1985). Mediante la introducción en el cromosoma de la cepa *Pseudomonas* B13 de los genes *xylXYZ* y *xylL* que codifican para los enzimas benzoato dioxigenasa y 1,2-dihidroxi-3,5-ciclohexadieno-1-carboxilato deshidrogenasa del plásmido TOL respectivamente, junto con el gen regulador *xylS* necesario para la expresión de estos genes, se construyó una bacteria capaz de degradar 3- y 4-clorobenzoato similar a la obtenida por el grupo de Knackmuss. Esta bacteria, llamada FR1, degradaba 4-metilbenzoato hasta 4-metil-2-enelactona que se acumulaba como producto terminal. Sin embargo, FR1 era capaz de crecer en el isómero de ésta, 3-metil-2-ene-lactona. El clonaje en un vector de amplio espectro huésped del gen de una isomerasa de la bacteria *Alcaligenes eutrophus* JMP134 que transformaba 4-metil-2-enelactona en 3-metil-2-ene-lactona, y su introducción en FR1, permitió la expansión de la ruta degradativa completa del 4-metilbenzoato en esta bacteria. De este modo, FR1 portando el gen de la isomerasa crece en 3-clorobenzoato, 4-clorobenzoato y 4-metilbenzoato, y el catabolismo de estos compuestos puede ocurrir simultáneamente.

El diseño de nuevas rutas catabólicas mediante el ensamblaje de enzimas y elementos reguladores es una alternativa prometedora para la degradación de compuestos recalcitrantes. El conocimiento de la bioquímica y regulación de las rutas catabólicas es fundamental para el desarrollo de nuevas rutas, que surgirían de forma natural, pero a través de procesos mucho más lentos.

II. DEGRADACION BACTERIANA DE COMPUESTOS NITROAROMATICOS

Los compuestos nitroaromáticos están catalogados como residuos tóxicos y peligrosos debido a su carácter mutagénico y a otros efectos perjudiciales que ejercen sobre células eucariotas y procariotas (Funk *et al.*, 1993; La y Froines, 1993; Shimizu y Yano, 1986; Smock *et al.*, 1976). El origen natural de estos compuestos en el medio ambiente deriva de la combustión del petróleo y de otras sustancias orgánicas (Rosenkranz y Mermelstein, 1983), así como de la síntesis biológica, como en el caso del cloranfenicol (Raistrick, 1949) o del pirrol (van Pée *et al.*, 1981). Sin embargo en su mayoría proceden de la actividad industrial derivada de la síntesis química de una gran variedad de compuestos, como son pesticidas, productos farmacéuticos, tintes y explosivos (Shackmann y Müller, 1991).

La degradación bacteriana de compuestos nitroaromáticos se ve dificultada por la resistencia a la degradación de los mismos, que deriva de sus características químicas. En efecto, los grupos nitro, al igual que los sustituyentes cloro, reducen la densidad electrónica del anillo aromático, e impiden o dificultan el ataque electrofílico de las oxigenasas. Además debido al carácter electronegativo del grupo nitro de estos compuestos, particularmente los polinitroaromáticos son sustrato de reductasas que dan lugar a derivados nitroso e hidroxilamino que espontáneamente generan derivados azo-, azoxi- y otros compuestos poliméricos (Channon *et al.*, 1944; Haïdour y Ramos, 1994; McCormick *et al.*, 1976 y 1978). Hasta el momento no se han aislado microorganismos capaces de degradar los polímeros resultantes de la reducción de nitroaromáticos. Además en el suelo, tanto estos compuestos como las aminas aromáticas, forman conjugados con los ácidos húmicos, lo que conduce a su inmovilización e impide su posterior degradación por los microorganismos (Hsu y Bartha, 1976; Parris, 1980; Hallas y Alexander, 1983).

Sin embargo en la bibliografía se ha descrito una gran variedad de bacterias capaces de llevar a cabo la degradación de nitroaromáticos. Las primeras referencias datan de los años 40, en los que Erikson (1941) y Moore (1949) aislaron actinomicetos capaces de utilizar ácido pícrico y nitrobenceno. En algunos casos el aislamiento de estas bacterias procedió de la observación de que herbicidas del tipo del dinitro-orto-

cresol eran inactivados en el suelo aparentemente por agentes biológicos (Jensen y Gundersen, 1955).

Entre las bacterias capaces de llevar a cabo transformaciones de este tipo de compuestos predominan las del género *Pseudomonas*, aunque bacterias pertenecientes a los géneros *Arthrobacter*, *Nocardia*, *Comamonas*, *Alcaligenes*, *Moraxella* y otros son activas contra nitroaromáticos. Algunas de éstas se limitan a biotransformar el nitroaromático, por lo que el proceso no conlleva la obtención de energía, sino que sólo consiste en cambios en la estructura química del compuesto que conducen en algunos casos a la formación de productos aún más tóxicos o más difícilmente degradables que el compuesto original. Otras veces las bacterias son capaces de utilizar estos compuestos como únicas fuentes de carbono y/o nitrógeno.

El estudio de los procesos degradativos de compuestos nitroaromáticos ha conducido en muchos casos a la determinación de los pasos bioquímicos que ocurren en la ruta. Sin embargo el conocimiento actual que se tiene sobre los mecanismos íntimos implicados en la liberación del grupo nitro del anillo aromático, o la formación de los derivados dihidroxilados necesarios para su rotura es escasa. En lo que respecta a la organización genética de estas rutas degradativas el conocimiento es aún menor.

En este apartado se describen los procesos mejor conocidos de degradación de compuestos nitroaromáticos, en particular los procesos específicos relacionados con las biotransformaciones que sufre el grupo nitro y su liberación de la molécula.

1. LAS RUTAS DEGRADATIVAS DE COMPUESTOS NITROAROMATICOS

En general puede decirse que los nitroaromáticos polares del tipo de nitrobencenos y nitrofenoles, son más fácilmente mineralizables en relación con los no polares, como los nitrotoluenos o nitrobenzenos, que son más resistentes a la degradación (Spanggord *et al.*, 1991).

La mineralización bacteriana de compuestos nitroaromáticos implica la liberación del grupo nitro del esqueleto carbonado del anillo. Como consecuencia de la liberación de éste o posteriormente se forman los derivados difenólicos sustrato de las dioxigenasas que rompen los anillos, momento a partir del cual la degradación de estos compuestos parece regirse por los mismos patrones que la de otros productos derivados del benceno descritos en el apartado I de esta sección. De hecho, se han descrito procesos degradativos de compuestos nitroaromáticos en diversas cepas de *Pseudomonas* en los que ha sido posible el aislamiento de los intermediarios de rutas

orto como el *cis,cis*-muconato y el b-cetoadipato en la ruta de degradación de 2-nitrofenol (Zeyer y Kearney, 1984), y la detección de actividades 3,4-protocatéquico dioxigenasa (Rhys-Williams *et al.*, 1993) y 4,5-protocatéquico dioxigenasa (Haigler y Spain, 1993) dependientes del crecimiento de la bacteria en 4-nitrotolueno.

En otros casos las transformaciones que sufre el grupo nitro unido al anillo conducen a la formación de productos no degradables que se acumulan en el medio de cultivo.

1.1. FORMAS DE ATAQUE AL GRUPO NITRO

En la degradación bacteriana de compuestos nitroaromáticos hay varias formas de ataque con liberación del grupo nitro del anillo, que se esquematizan en la Figura 5. Una implica la liberación directa del grupo nitro al medio en forma de nitrito que, como se verá, puede conllevar la formación o no de un fenol dependiendo del tipo de ataque sobre el anillo. Otra, la reducción de éste a través de los derivados nitroso e hidroxilamino y la liberación posterior en forma de amonio al medio; el derivado amino puede o no ser un intermediario en este tipo de procesos. Los mecanismos íntimos de la liberación del grupo nitro en ambos casos no son bien conocidos.

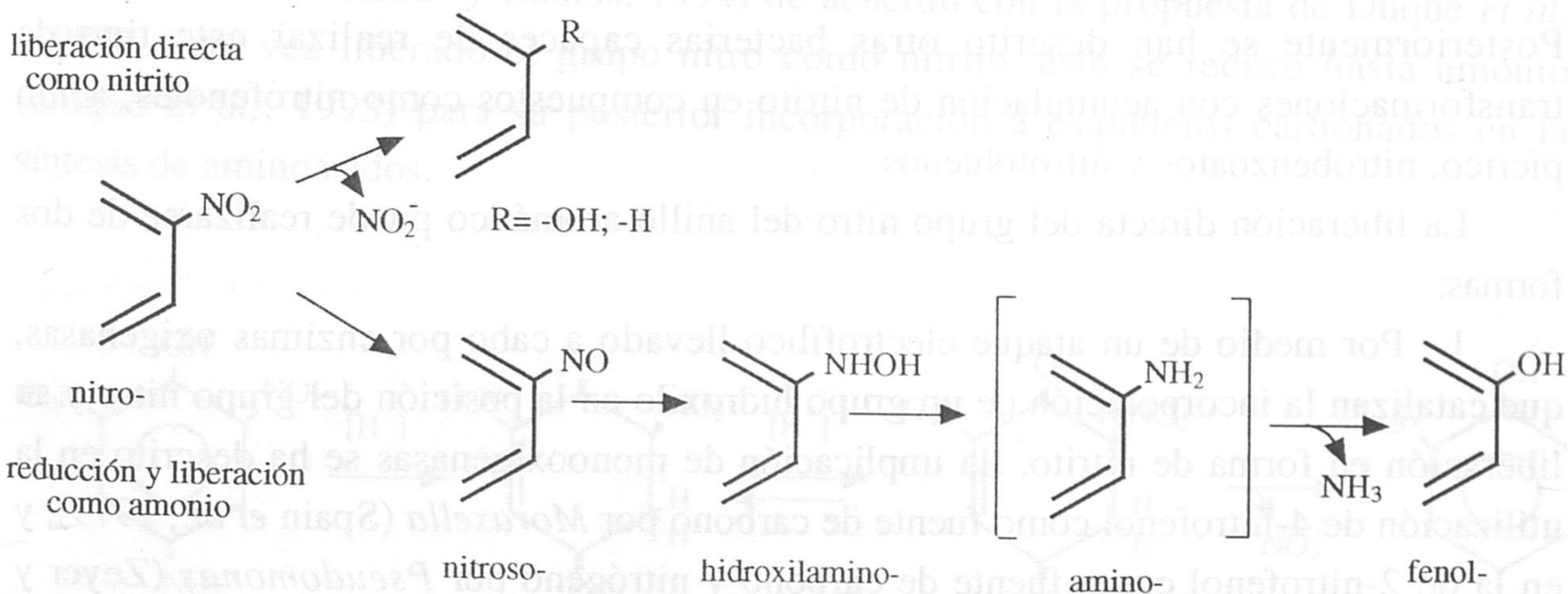


Figura 5. Esquema de las formas de liberación del grupo nitro de un anillo aromático llevadas a cabo por bacterias. El derivado amino puede o no ser un intermediario de la ruta, y se representa entre corchetes.

Aunque un compuesto nitroaromático puede sufrir varios tipos de ataque dependiendo del microorganismo, la naturaleza química de éste determina la reactividad del grupo nitro y por tanto su mayor o menor susceptibilidad de ataque por reductasas. McCormick *et al.*, (1976) estudiaron la influencia de sustituyentes de distinta naturaleza química y la de su posición relativa en la molécula respecto al grupo nitro sobre la reactividad de éste. Dicho estudio estableció una regla según la cual la velocidad de reducción del grupo nitro aumenta con el incremento del poder electronegativo del grupo situado en posición *para* del anillo, según la serie siguiente: $-\text{NH}_2 < -\text{OH} < -\text{H} < -\text{CH}_3 < -\text{COOH} < -\text{NO}_2$. De este modo, el grupo nitro de un nitrobenzoato será más fácilmente reducido que el de un nitrofenol.

En algunos microorganismos se producen los dos tipos de ataque sobre el nitroaromático; las reacciones que conducen a la liberación de nitrito permiten la utilización de este compuesto como fuente de carbono y/o nitrógeno; las reacciones de reducción de éste suelen constituir rutas no productivas que conducen a la acumulación de compuestos no degradables (Bruhn *et al.*, 1987; Duque *et al.*, 1993; Won *et al.*, 1974).

1.1.1. La liberación directa del grupo nitro

Simpson y Evans (1953) aislaron una bacteria del género *Pseudomonas* capaz de llevar a cabo la degradación de 2- y 4-nitrofenol con la acumulación de nitrito. Posteriormente se han descrito otras bacterias capaces de realizar este tipo de transformaciones con acumulación de nitrito en compuestos como nitrofenoles, ácido pícrico, nitrobenzoatos y nitrotoluenos.

La liberación directa del grupo nitro del anillo aromático puede realizarse de dos formas:

- 1.- Por medio de un ataque electrofílico llevado a cabo por enzimas oxigenasas, que catalizan la incorporación de un grupo hidroxilo en la posición del grupo nitro y su liberación en forma de nitrito. La implicación de monooxigenasas se ha descrito en la utilización de 4-nitrofenol como fuente de carbono por *Moraxella* (Spain *et al.*, 1979), y en la de 2-nitrofenol como fuente de carbono y nitrógeno por *Pseudomonas* (Zeyer y Kearney, 1984). El ataque por una dioxigenasa se ha descrito en la degradación de 2,4-dinitrotolueno por una cepa de *Pseudomonas* (Spanggord *et al.*, 1991); el enzima cataliza la incorporación de dos átomos de oxígeno en las posiciones 4 y 5 del anillo; el

grupo nitro se elimina espontáneamente de la molécula, con la formación de 4-metil-5-nitrocatecol, como se esquematiza en la Figura 6.

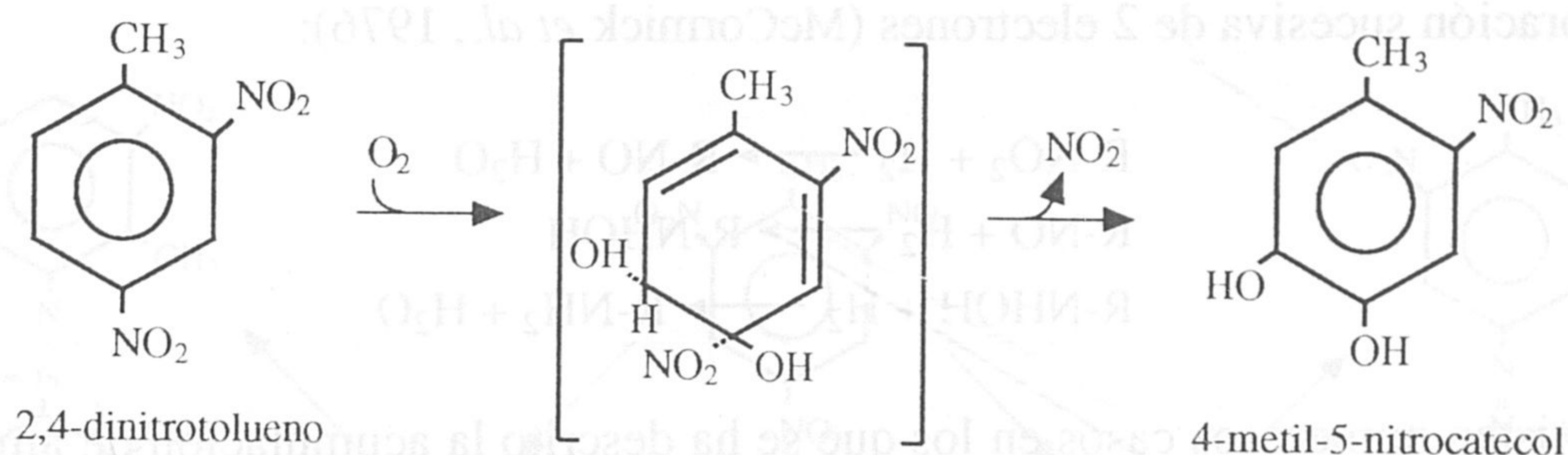


Figura 6. Mecanismo propuesto de liberación de nitrito a partir de 2,4-dinitrotolueno mediante un ataque electrofílico (Spanggord *et al.*, 1991).

2.- La liberación del grupo nitro en compuestos polinitroaromáticos puede ocurrir tras un ataque nucleofílico en el que participa un ión hidruro. El ataque ocurre a nivel del carbono 3, y conlleva la formación del complejo de Meisenheimer, el cual pierde su aromaticidad y la recupera tras la liberación de nitrito (Buncel, 1981; Crampton, 1969; Meisenheimer, 1902). Esta reacción, cuyo esquema se muestra en la Figura 7, se ha descrito en la utilización bacteriana de ácido pícrico (Lenke y Knackmuss, 1992) y recientemente se ha demostrado para la eliminación del primer grupo nitro del trinitrotolueno (Haïdour y Ramos, 1994) de acuerdo con la propuesta de Duque *et al.* (1993). Una vez liberado el grupo nitro como nitrito, éste se reduce hasta amonio (Duque *et al.*, 1993) para su posterior incorporación a esqueletos carbonados en la síntesis de aminoácidos.

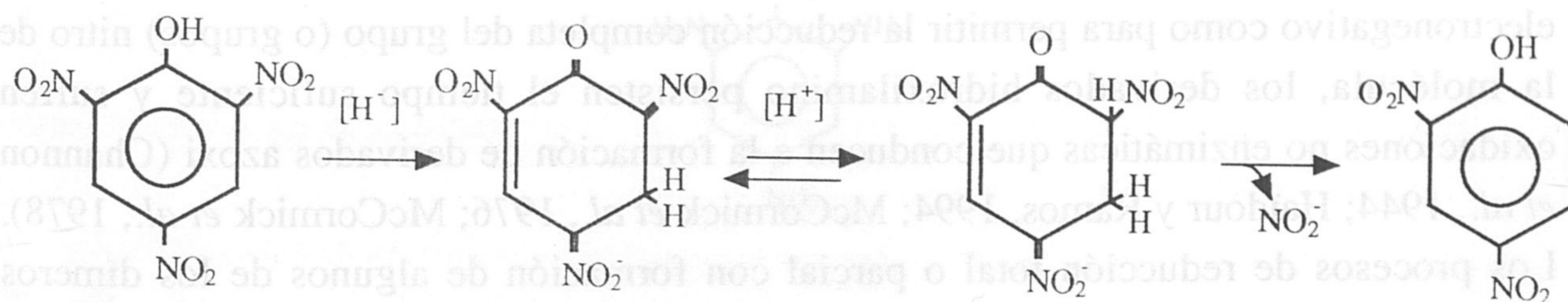
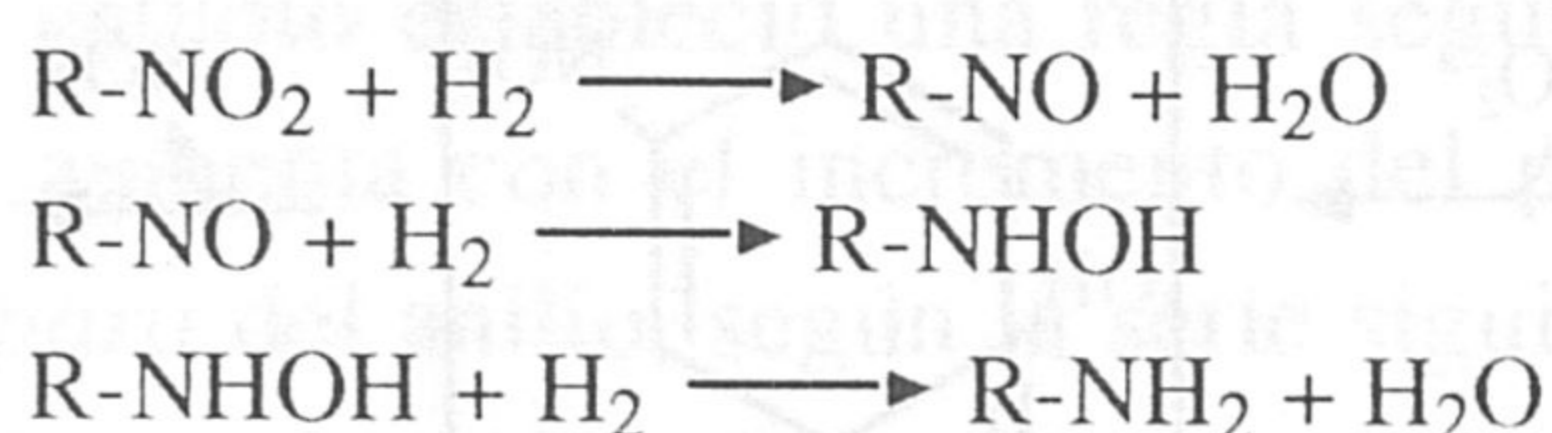


Figura 7. Mecanismo propuesto para la liberación de nitrito del ácido pícrico mediante un ataque nucleofílico (Lenke y Knackmuss, 1992).

1.1.2. La reducción del grupo nitro en el anillo aromático

La reducción de grupos nitro a amino en los sistemas biológicos ocurre a través de los derivados nitroso e hidroxilamino en una secuencia de reacciones que ocurren por la incorporación sucesiva de 2 electrones (McCormick *et al.*, 1976):



Existen numerosos casos en los que se ha descrito la acumulación de amonio en el medio de cultivo durante la degradación bacteriana de compuestos nitroaromáticos. La identificación del intermediario aromático hidroxilamino conduce a la conclusión de que en estos casos la reducción del grupo nitro ocurre cuando éste se encuentra aún unido al anillo. El grupo nitro es utilizado en estos compuestos como aceptor final de electrones. En los casos en los que se ha caracterizado la actividad implicada en la reducción de estos compuestos se ha demostrado que es dependiente de NAD(P)H (Schackmann y Müller, 1991; Groenewegen *et al.*, 1992; Nishino y Spain, 1993), aunque en ninguno de estos casos se han purificado estas enzimas a homogeneidad.

Las aminas aromáticas resultantes de la reducción completa de compuestos nitroaromáticos pueden formarse tanto en condiciones de aerobiosis como de anaerobiosis. En el caso de polinitroaromáticos, la presencia de un grupo nitro potencia la reactividad de otro grupo nitro en la misma molécula (Pearson, 1948); en relación con la posición relativa de este grupo respecto a otros sustituyentes, el grupo nitro situado en posición *para* es reducido más rápidamente que el de la posición *orto* del anillo en el caso de nitrotoluenos y nitrobenzoatos, mientras que ocurre lo contrario en nitrofenoles y nitroanilinas (McCormick *et al.*, 1976; Schackmann y Müller, 1991).

En aerobiosis o cuando el potencial reductor del sistema no es lo suficientemente electronegativo como para permitir la reducción completa del grupo (o grupos) nitro de la molécula, los derivados hidroxilamino persisten el tiempo suficiente y sufren oxidaciones no enzimáticas que conducen a la formación de derivados azoxi (Channon *et al.*, 1944; Haïdour y Ramos, 1994; McCormick *et al.*, 1976; McCormick *et al.*, 1978). Los procesos de reducción total o parcial con formación de algunos de los dímeros correspondientes de los grupos nitro del trinitrotolueno se esquematizan en la Figura 8. Haïdour y Ramos (1994) han demostrado que los derivados azoxi en la degradación de trinitrotolueno por una cepa de *Pseudomonas* se forman espontáneamente a partir de los derivados hidroxilamino, intermediarios en los procesos de reducción de los grupos

nitro a amino que sufre la molécula; en presencia de oxígeno molecular se forma nitroso a partir del derivado hidroxilamino que, junto con otra molécula de hidroxilamino, forman el azoxiderivado correspondiente.

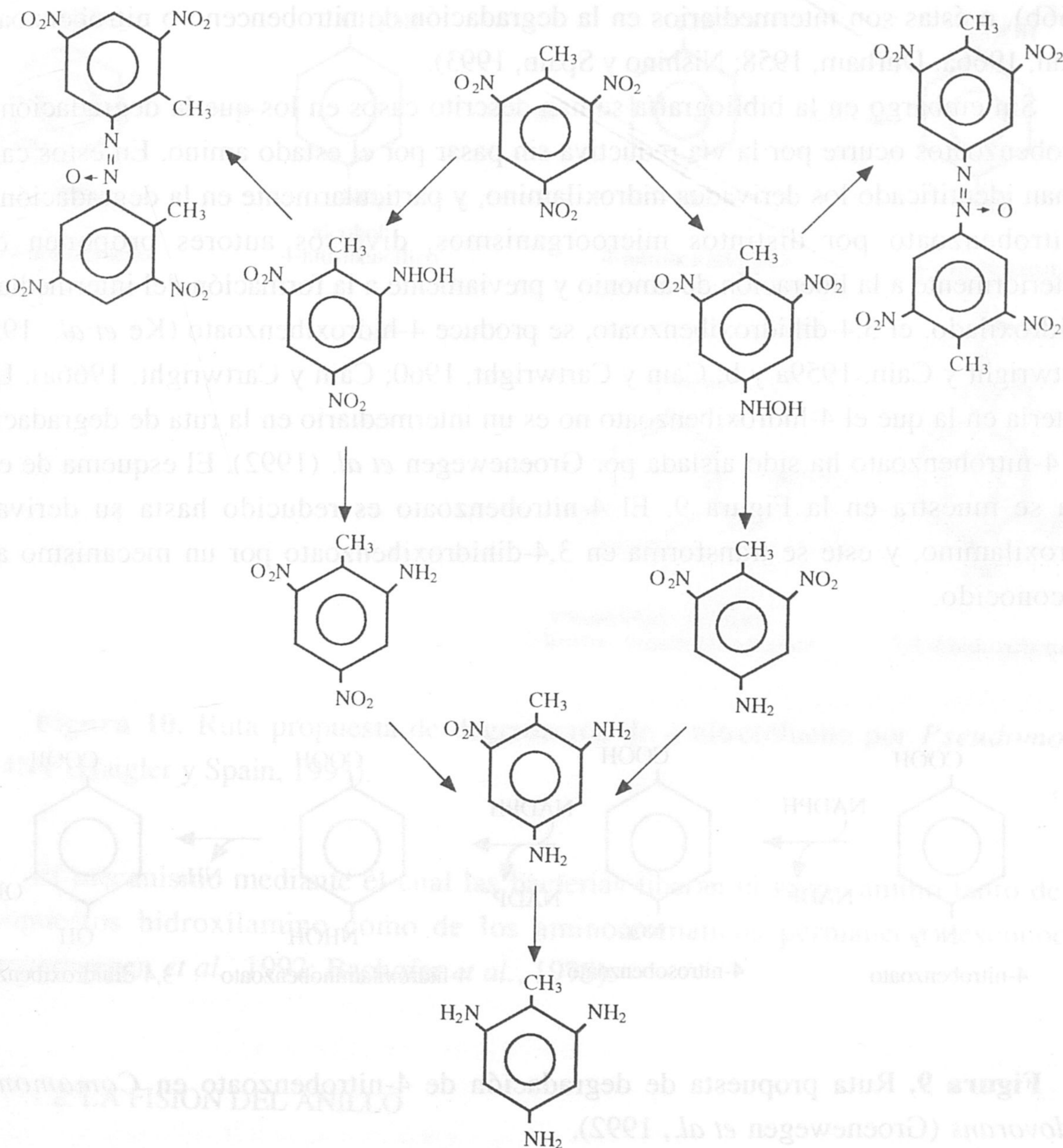


Figura 8. Rutas propuestas de reducción de los grupos nitro del trinitrotolueno (McCormick et al., 1978).

Por tanto, los productos finales de reducción de compuestos aromáticos son aminas aromáticas o derivados azoxi. Mientras que, como se ha dicho anteriormente, no se han descrito microorganismos capaces de degradar los dímeros azoxi, sí existen bacterias que degradan aminas aromáticas, como anilina (Zeyer y Kearney, 1983) o 2-aminobenzoato, en el que el grupo amino se sustituye por un grupo hidroxilo (Cain, 1966b), o éstas son intermediarios en la degradación de nitrobenceno o nitrobenzoatos (Cain, 1966a; Durham, 1958; Nishino y Spain, 1993).

Sin embargo en la bibliografía se han descrito casos en los que la degradación de nitrobenzoatos ocurre por la vía reductiva sin pasar por el estado amino. En estos casos se han identificado los derivados hidroxilamino, y particularmente en la degradación de 4-nitrobenzoato por distintos microorganismos, diversos autores proponen que posteriormente a la liberación de amonio y previamente a la formación del intermediario dihidroxilado, el 3,4-dihidroxi benzoato, se produce 4-hidroxibenzoato (Ke *et al.*, 1959; Cartwright y Cain, 1959a y b; Cain y Cartwright, 1960; Cain y Cartwright, 1966a). Una bacteria en la que el 4-hidroxibenzoato no es un intermediario en la ruta de degradación del 4-nitrobenzoato ha sido aislada por Groenewegen *et al.* (1992). El esquema de esta ruta se muestra en la Figura 9. El 4-nitrobenzoato es reducido hasta su derivado hidroxilamino, y este se transforma en 3,4-dihidroxi benzoato por un mecanismo aún desconocido.

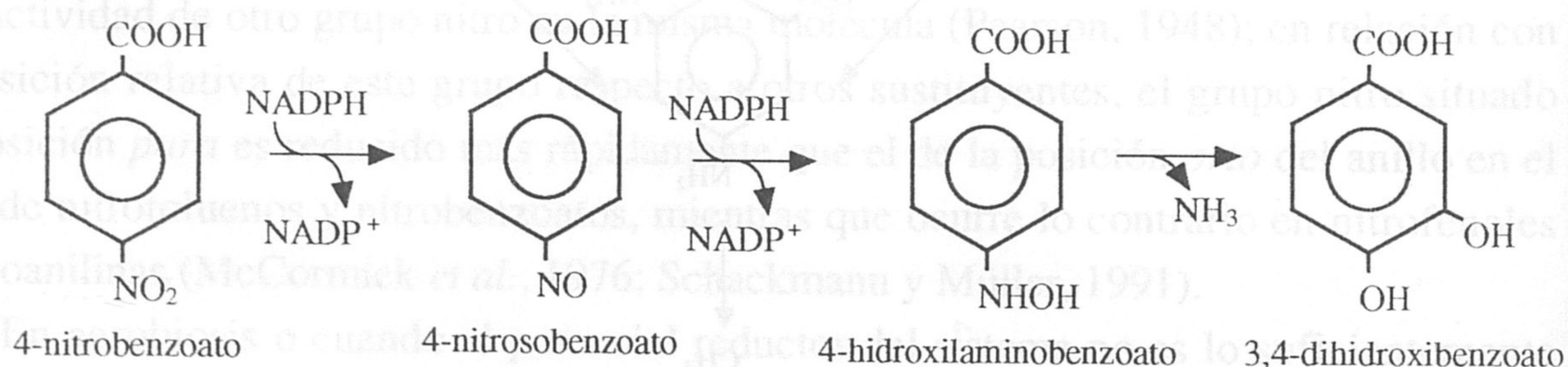


Figura 9. Ruta propuesta de degradación de 4-nitrobenzoato en *Comamonas acidovorans* (Groenewegen *et al.*, 1992).

Recientemente se han aislado bacterias capaces de llevar a cabo la degradación completa de 4-nitrotolueno en las que ocurre reducción del grupo nitro (Rhys-Williams *et al.*, 1992; Haigler y Spain, 1993). En estos casos el grupo metilo es oxidado inicialmente a carboxilo a través de los intermediarios alcohol y aldehído, y se han

detectado actividades alcoholbencílico deshidrogenasa y benzaldehído deshidrogenasa dependientes de 4-nitrotolueno en un proceso que recuerda a la ruta "upper" del plásmido TOL (Figura 10). La ruta de degradación del 4-nitrobenzoato formado es similar a la descrita por Groenewegen *et al.* (1992):

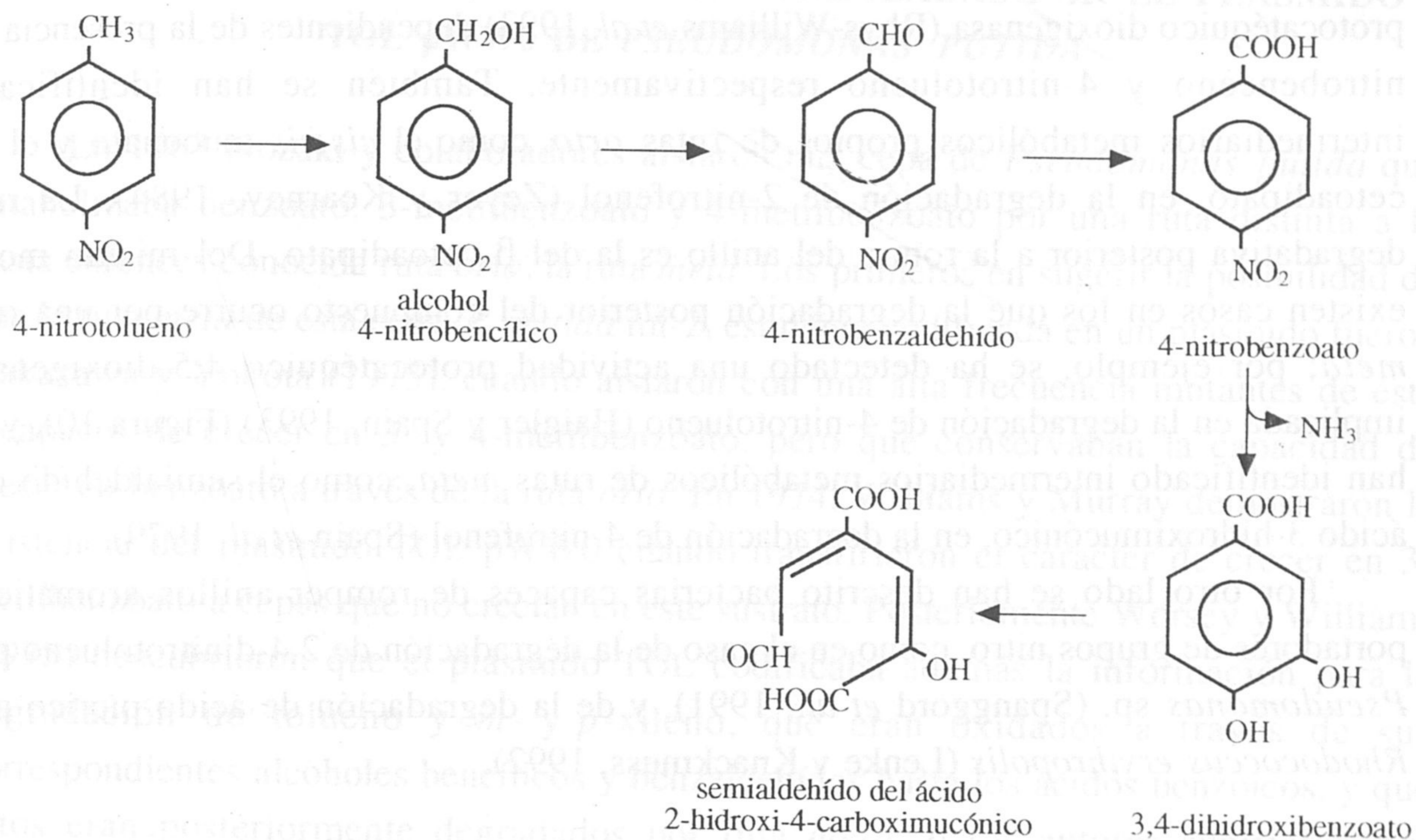


Figura 10. Ruta propuesta de degradación de 4-nitrotolueno por *Pseudomonas* sp 4NT (Haigler y Spain, 1993).

El mecanismo mediante el cual las bacterias liberan el grupo amino tanto de los compuestos hidroxilamino como de los aminoaromáticos permanece desconocido (Groenewegen *et al.*, 1992; Bachofer *et al.*, 1975).

1.2. LA FISION DEL ANILLO

En las rutas degradativas de compuestos nitroaromáticos por bacterias no se han descrito hasta el momento los enzimas oxigenasas o hidroxilasas que rinden los derivados dihidroxilados necesarios para la rotura del anillo aromático. Únicamente en la biotransformación de nitrobenzeno en 3- y 4-nitrocatecol por diversas oxigenasas de *Pseudomonas*, Haigler y Spain (1991) han propuesto que la adición del segundo grupo

hidroxilo tras la sustitución del grupo nitro por un grupo hidroxilo debe estar mediada por una hidroxilasa o una monooxigenasa, pero este enzima es desconocido.

Por el contrario sí se han detectado actividades enzimáticas implicadas en la rotura de estos anillos aromáticos. En algunos casos se trata de fisiones *orto*, y se han detectado actividades catecol 1,2-dioxigenasa (Nishino y Spain, 1993) y 3,4-protocatéquico dioxigenasa (Rhys-Williams *et al.*, 1993) dependientes de la presencia de nitrobenceno y 4-nitrotolueno respectivamente. También se han identificado intermediarios metabólicos propios de rutas *orto*, como el *cis,cis*-muconato y el β -ceto adipato, en la degradación de 2-nitrofenol (Zeyer y Kearney, 1984). La ruta degradativa posterior a la rotura del anillo es la del β -ceto adipato. Del mismo modo existen casos en los que la degradación posterior del compuesto ocurre por una ruta *meta*; por ejemplo, se ha detectado una actividad protocatéquico 4,5-dioxigenasa implicada en la degradación de 4-nitrotolueno (Haigler y Spain, 1993) (Figura 10), y se han identificado intermediarios metabólicos de rutas *meta*, como el semialdehído del ácido 3-hidroximucónico, en la degradación de 4-nitrofenol (Spain *et al.* 1979).

Por otro lado se han descrito bacterias capaces de romper anillos aromáticos portadores de grupos nitro, como en el caso de la degradación de 2,4-dinitrotolueno por *Pseudomonas* sp. (Spanggord *et al.*, 1991), y de la degradación de ácido pícrico por *Rhodococcus erythropolis* (Lenke y Knackmuss, 1992).

2. ORGANIZACION GENETICA

Hasta el momento se desconoce casi completamente la organización genética de las rutas implicadas en la degradación de compuestos nitroaromáticos.

Suen y Spain (1993) describieron la localización plasmídica de 3 genes implicados en la degradación de 2,4-dinitrotolueno por una cepa de *Pseudomonas*. Los autores proponen que la ruta está organizada en 3 operones en base a procesos de adaptación secuencial en los que se acumulaban progresivamente determinados intermediarios de la ruta, lo que sugiere además la existencia de un sistema inducible en cascada.

Igualmente se ha mostrado que determinados nitroaromáticos son inductores de sus rutas degradativas, como en el caso de la degradación de nitrofenoles (Zeyer y Kearney, 1984; Schmidt *et al.*, 1987), o de 4-nitrotolueno (Haigler y Spain, 1993) por bacterias del género *Pseudomonas*.

El conocimiento de la estructura, organización y regulación de los genes implicados en las rutas degradativas de estos compuestos es de enorme importancia para el desarrollo de nuevas capacidades metabólicas.

III. LAS RUTAS DEGRADATIVAS CODIFICADAS POR EL PLÁSMIDO TOL pWW0 DE *PSEUDOMONAS PUTIDA*

En 1963 Nozaki y colaboradores aislaron una cepa de *Pseudomonas putida* que catabolizaba benzoato, 3-metilbenzoato y 4-metilbenzoato por una ruta distinta a la hasta entonces conocida ruta *orto*, la ruta *meta*. Los primeros en sugerir la posibilidad de que la ruta *meta* de esta cepa, *P. putida* mt-2, estuviera codificada en un plásmido fueron Nakazawa y Yokota (1973), cuando aislaron con una alta frecuencia mutantes de ésta incapaces de crecer en 3- y 4-metilbenzoato, pero que conservaban la capacidad de crecer en benzoato a través de la ruta *orto*. En 1974, Williams y Murray demostraron la existencia del plásmido TOL pWW0 cuando transfirieron el carácter de crecer en 3-metilbenzoato a cepas que no crecían en este sustrato. Posteriormente Worsey y Williams (1975) descubrieron que el plásmido TOL codificaba además la información para la degradación de tolueno y *m*- y *p*-xileno, que eran oxidados a través de sus correspondientes alcoholes bencílicos y benzaldehídos hasta los ácidos benzoicos, y que éstos eran posteriormente degradados por ruta *meta*. Estos autores sugirieron por primera vez que tolueno y xilenos inducían los enzimas necesarios para su degradación y la de sus correspondientes ácidos benzoicos, mientras que éstos sólo inducían los enzimas de la ruta *meta*, lo que sugería la existencia de varias unidades transcripcionales. A partir de entonces diversos grupos de investigación han participado en el estudio de las rutas catabólicas codificadas en este plásmido y en su modo de regulación, y actualmente TOL es el plásmido catabólico mejor caracterizado.

En los últimos años se han aislado otros plásmidos TOL que difieren del arquetipo, pWW0, en una serie de características como transmisibilidad, estructura molecular, patrones de restricción, o aparición de deleciones (Duggleby *et al.*, 1977; Friello *et al.*, 1976; Williams y Worsey, 1976; Worsey y Williams, 1977).

En este apartado se resumen las características de las rutas degradativas codificadas por el plásmido arquetipo pWW0 y el modelo de regulación a que están sometidas. En especial se detalla la descripción de los elementos enzimáticos y reguladores que han sido utilizados en este estudio, que son el operón "upper" y el regulador que induce su transcripción, la proteína XylR.

1. CARACTERISTICAS GENERALES DEL PLÁSMIDO TOL pWW0

El plásmido TOL pWW0 pertenece al grupo de incompatibilidad Inc P-9. Es un plásmido autotransmisible, aunque su espectro de hospedador está restringido a *Pseudomonas* pertenecientes al grupo I de ARN ribosómico y a algunas enterobacterias (Nakazawa, 1978; Ramos-González *et al.*, 1991), y su replicación es termosensible (Nakazawa, 1978).

Su tamaño es de aproximadamente 117 kilobases, y las rutas catabólicas que codifica se encuentran localizadas en un fragmento de unas 40 kilobases incluido dentro de un transposón de 56 kilobases, el Tn4651, perteneciente a la familia del Tn3 (Chakrabarty *et al.*, 1978; Meulien *et al.*, 1981; Tsuda e Iino, 1987). Este transposón está a su vez incluido en otro, el Tn4653, de la misma familia, que probablemente representa el transposón de mayor tamaño conocido, 70 Kb (Tsuda e Iino, 1988). La caracterización genética de estos transposones, así como de las funciones de transposición codificadas por éstos ha sido realizada en detalle por Tsuda *et al.* (1989). De las restantes 47-50 Kb del plásmido se conoce poco, aunque se han localizado la zona del origen de replicación y la región implicada en las funciones de transferencia (Franklin *et al.*, 1981). Bradley y Williams (1982) describieron que los pili codificados por TOL se transcribían constitutivamente.

En la Figura 11 se muestra un esquema de este plásmido con la situación de los genes que han sido identificados, junto con el mapa de restricción para los enzimas *Xho*I, *Eco*RI y *Hind*III (Burlage *et al.*, 1989; Downing y Broda, 1979).

2. LAS RUTAS CATABOLICAS CODIFICADAS POR TOL

Los genes catabólicos del plásmido TOL pWW0 se encuentran organizados en dos unidades transcripcionales denominadas "upper" y *meta*. El operón "upper" codifica la información genética para los enzimas implicados en la oxidación de tolueno y xilenos hasta benzoato y metilbenzoatos (Harayama *et al.*, 1986a). El operón *meta* codifica la información genética para la degradación de los benzoatos y metilbenzoatos hasta acetaldehído y piruvato (Harayama *et al.*, 1984). *Pseudomonas putida* portadora del plásmido pWW0 es capaz de utilizar como única fuente de carbono además de tolueno, *m*- y *p*-xileno (Worsey y Williams, 1975), 1,2,4-trimetilbenceno y 3-etiltolueno (Kunz y Chapman, 1981).

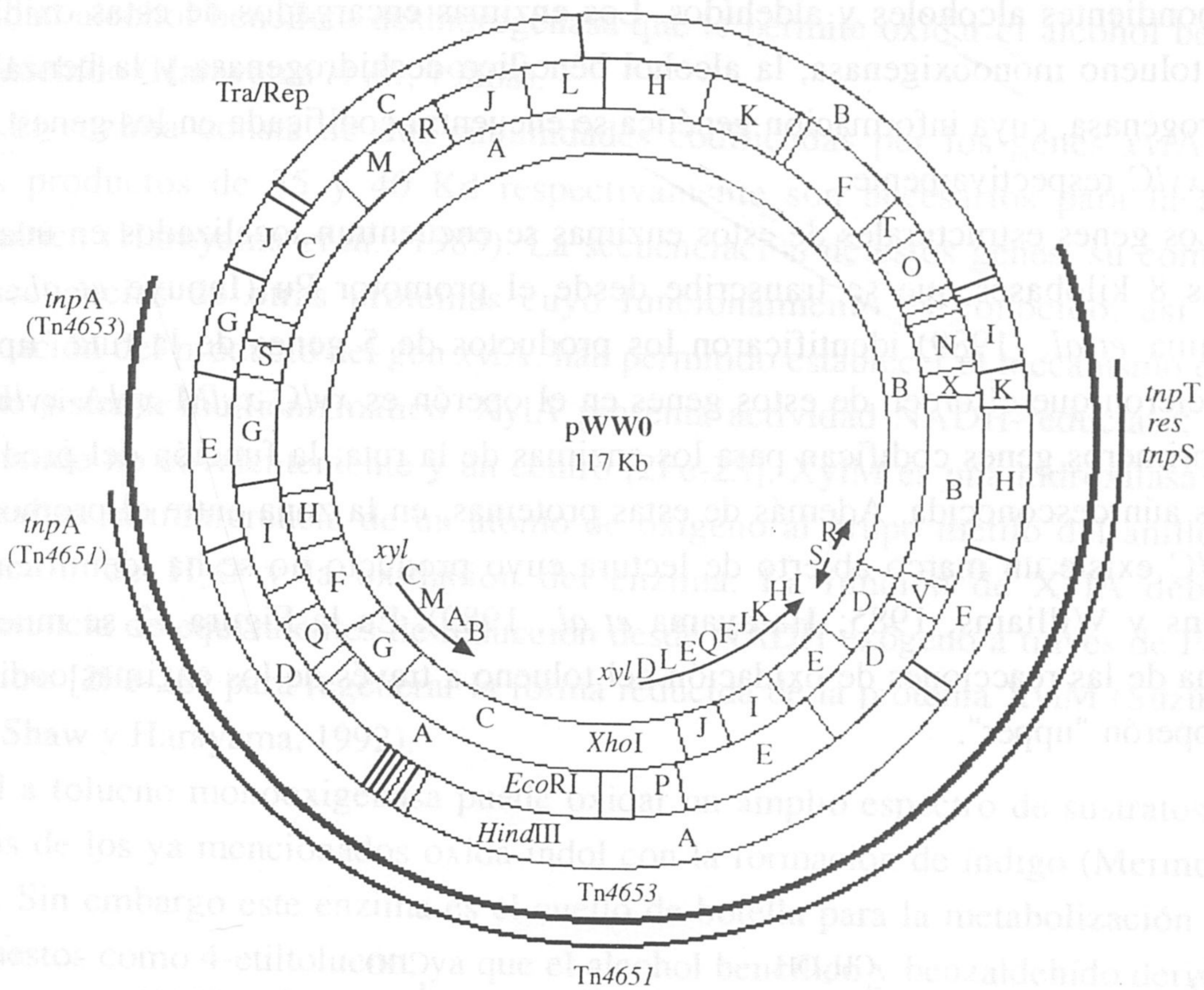


Figura 11. Esquema del plásmido TOL pWW0 de *Pseudomonas putida*. Se representan los mapas de restricción del plásmido para los enzimas *XhoI*, *EcoRI* y *HindIII*; los fragmentos se nombran por orden alfabético en orden decreciente de acuerdo con su tamaño. Las flechas indican las regiones que contienen los operones "upper" y *meta* así como los genes reguladores *xylR* y *xylS*, y su sentido indica el sentido de la transcripción. Se muestra la localización de los transposones Tn4651 y Tn4653, así como de los genes que codifican para las transposasas (*tnpA*) específicas de cada transposón, y resolvasas (*tnpS* y *tnpT*) y el sitio *res* de Tn4651 común para ambos transposones. De igual forma se indica la posición de las regiones de transferencia (Tra) y replicación (Rep).

1.1. LA RUTA "UPPER" DE TOL

Los enzimas de la ruta "upper" son responsables de la oxidación secuencial del grupo metilo del anillo del tolueno y derivados hasta carboxilo a través de los correspondientes alcoholes y aldehídos. Los enzimas encargados de estas oxidaciones son la tolueno monooxigenasa, la alcohol bencílico deshidrogenasa y la benzaldehído deshidrogenasa, cuya información genética se encuentra codificada en los genes *xylMA*, *xylB* y *xylC* respectivamente.

Los genes estructurales de estos enzimas se encuentran localizados en una región de unas 8 kilobases que se transcribe desde el promotor Pu (Inouye *et al.*, 1983). Harayama *et al.* (1989) identificaron los productos de 5 genes de la ruta "upper", y establecieron que el orden de estos genes en el operón es *xylC-xylM-xylA-xylB-xylN*. Los 4 primeros genes codifican para los enzimas de la ruta; la función del producto de *xylN* es aún desconocida. Además de estas proteínas, en la zona entre el promotor y el gen *xylC* existe un marco abierto de lectura cuyo producto no se ha identificado aún (Lebbens y Williams, 1985; Harayama *et al.*, 1989). En la Figura 12 se muestra un esquema de las reacciones de oxidación del tolueno a través de los enzimas codificados por el operón "upper".

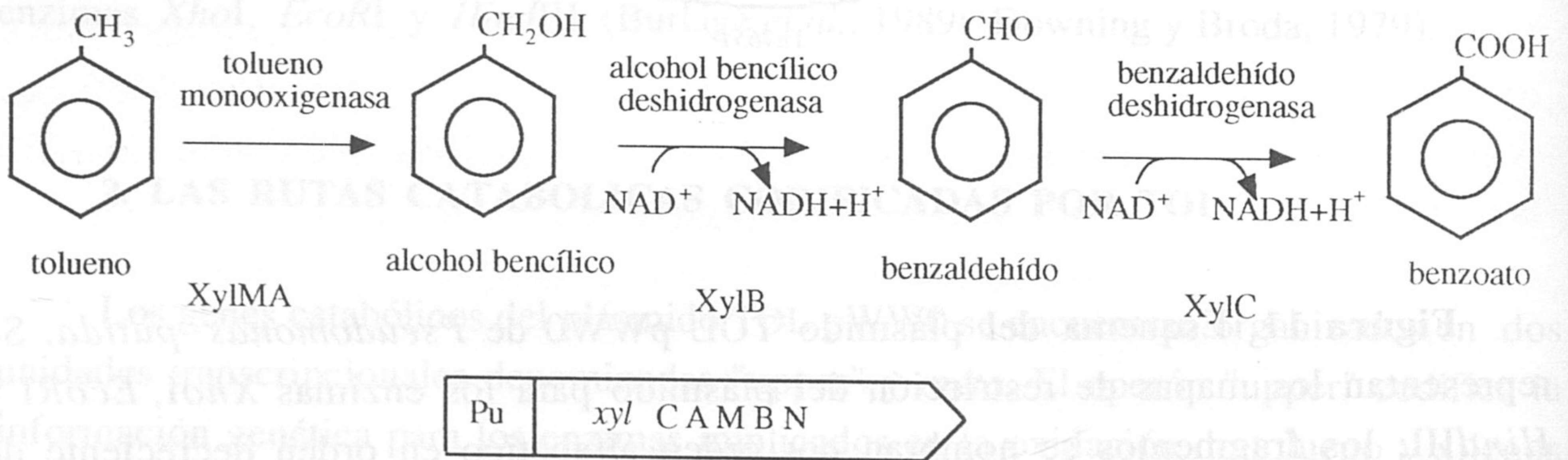


Figura 12. Oxidación de tolueno a través de los enzimas de la ruta "upper" del plásmido TOL y organización de los genes catabólicos del operón "upper". Los productos de los genes *xylMA*, *xylB* y *xylC* que codifican para los enzimas tolueno monooxigenasa, alcohol bencílico deshidrogenasa y benzaldehído deshidrogenasa respectivamente, se indican debajo de cada uno de ellos.

1.1.2. Tolueno monooxigenasa

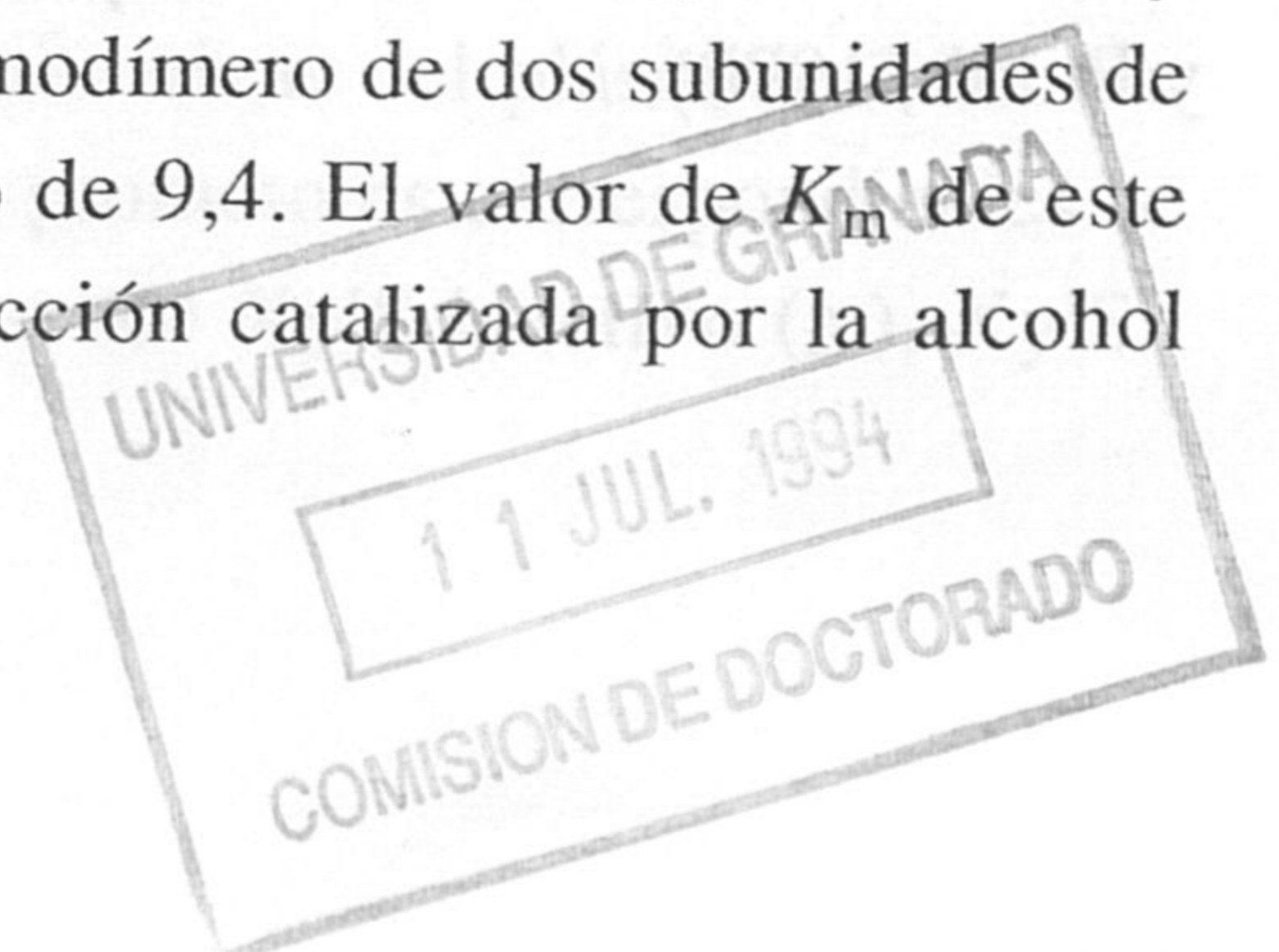
La tolueno monooxigenasa del plásmido TOL cataliza la oxidación del grupo metilo del tolueno para generar alcohol bencílico (Figura 12). Además posee una actividad alcohol bencílico deshidrogenasa que le permite oxidar el alcohol bencílico a benzaldehído (Harayama *et al.*, 1986a).

El 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). La secuenciación de estos genes, su comparación con secuencias de otras proteínas cuyo funcionamiento es conocido, así como la purificación del producto del gen *xylA*, han permitido establecer el mecanismo de acción de este sistema multienzimático. *XylA* presenta actividad NADH-reductasa; contiene FAD unido no covalentemente y un centro [2Fe-2S]. *XylM* es una hidroxilasa terminal que realiza la transferencia de un átomo de oxígeno al grupo metilo del anillo, con la formación de H₂O y la oxidación del enzima. La función de *XylA* debe ser la transferencia de equivalentes de reducción desde NADH exógeno a través de FAD y de un centro [2Fe-2S] para regenerar la forma reducida de la proteína *XylM* (Suzuki *et al.*, 1991; Shaw y Harayama, 1992).

La tolueno monooxigenasa puede oxidar un amplio espectro de sustratos, ya que además de los ya mencionados oxida indol con la formación de índigo (Mermod *et al.*, 1986). Sin embargo este enzima es el cuello de botella para la metabolización de otros compuestos como 4-etiltolueno, ya que el alcohol bencílico y benzaldehído derivados de éste sí son sustratos del resto de los enzimas de la ruta "upper" (Abril *et al.*, 1989). Los clorotoluenos sustituidos en las posiciones 3 y 4 son oxidados por el enzima, aunque a baja velocidad (Abril *et al.*, 1989).

1.1.2. Alcohol bencílico deshidrogenasa

El gen *xylB* codifica la alcohol bencílico deshidrogenasa, que cataliza la oxidación de alcohol bencílico a benzaldehído con la reducción concomitante de NAD a NADH (Figura 12) (Worsey y Williams, 1975). Shaw y Harayama (1990) purificaron y caracterizaron este enzima. La proteína activa es un homodímero de dos subunidades de 42 kDa, cuya actividad "in vitro" tiene un pH óptimo de 9,4. El valor de K_m de este enzima por alcohol bencílico es de 220 mM. La reacción catalizada por la alcohol



bencílico deshidrogenasa es reversible, con un pH óptimo de 5,7. Estudios preliminares indican que el enzima se inhibe en presencia de NADH (Shaw y Harayama, 1990).

1.1.3. Benzaldehído deshidrogenasa

Este enzima, al igual que la alcohol bencílico deshidrogenasa fue caracterizada por Shaw y Harayama (1990). La proteína activa es un dímero de dos subunidades idénticas de 57 kDa, codificadas por el gen *xylC* que cataliza la oxidación de benzaldehído a benzoato con la reducción de NAD (Figura 12). Esta reacción es irreversible y su pH óptimo es de 9,6. La K_m de la benzaldehído deshidrogenasa por benzaldehído es de 460 mM. La baja afinidad del enzima por su sustrato se compensa con una alta concentración de éste en la célula, que es alrededor de un 6% de la proteína total (Shaw y Harayama, 1990).

1.2. LA RUTA *META* DE TOL

El ácido benzoico o sus derivados resultantes de la oxidación de toluenos y xilenos por los enzimas de la ruta "upper" son transformados en intermediarios del ciclo de Krebs por medio de una serie de reacciones que constituyen una ruta *meta* típica de las descritas en el apartado I de esta Introducción (Figura 4). Los genes que codifican para los enzimas de esta ruta se encuentran en un fragmento de unas 11 kilobases. El orden de éstos es *xylXYZLEGFJQKIH*, de acuerdo con Harayama y Rekik (1990) y se transcriben desde un promotor único denominado Pm (Mermod *et al.*, 1984; Marqués *et al.*, 1993).

Los enzimas de esta ruta son los encargados de transformar los ácidos benzoicos en catecoles, cuya fisión *meta* produce los correspondientes derivados del semialdehído del ácido mucónico. Estos pueden seguir las dos vías alternativas descritas anteriormente, bien de deshidrogenación y descarboxilación posterior o bien de hidrólisis (Figura 4), para converger posteriormente en el 2-oxo-pent-4-enolato, que entra en el metabolismo central de la célula a nivel de piruvato y acetaldehído (Harayama *et al.*, 1986b; Harayama y Rekik, 1990).

3. EL MODELO DE REGULACION DE LA TRANSCRIPCION DE LAS RUTAS CATABOLICAS DE TOL

El plásmido TOL pWW0 es un ejemplo más de la existencia de sistemas de regulación finamente controlados para la expresión de rutas catabólicas de compuestos orgánicos. Mientras que el crecimiento de *P. putida* (pWW0) en toluenos y xilenos implica la expresión de los operones "upper" y *meta*, el crecimiento en metilbenzoatos resulta en la expresión del operón *meta*, pero no del "upper" (Franklin *et al.*, 1981; Franklin *et al.*, 1983; Inouye *et al.*, 1981; Worsey *et al.*, 1978).

El modelo general de inducción de la expresión de las rutas "upper" y *meta* del plásmido TOL aparece esquematizado en la Figura 13. La regulación de la expresión de estas dos rutas degradativas corre a cargo de las proteínas XylR y XylS; ambas son reguladores positivos que se transcriben desde promotores independientes y divergentes. La expresión de los genes del operón "upper" requiere la proteína XylR, mientras que ambas XylR y XylS son necesarias para la expresión del operón *meta* (Inouye *et al.*, 1981 y 1983; Franklin *et al.*, 1981 y 1983; Ramos *et al.*, 1987a), como sugirieron Worsey y Williams en 1975.

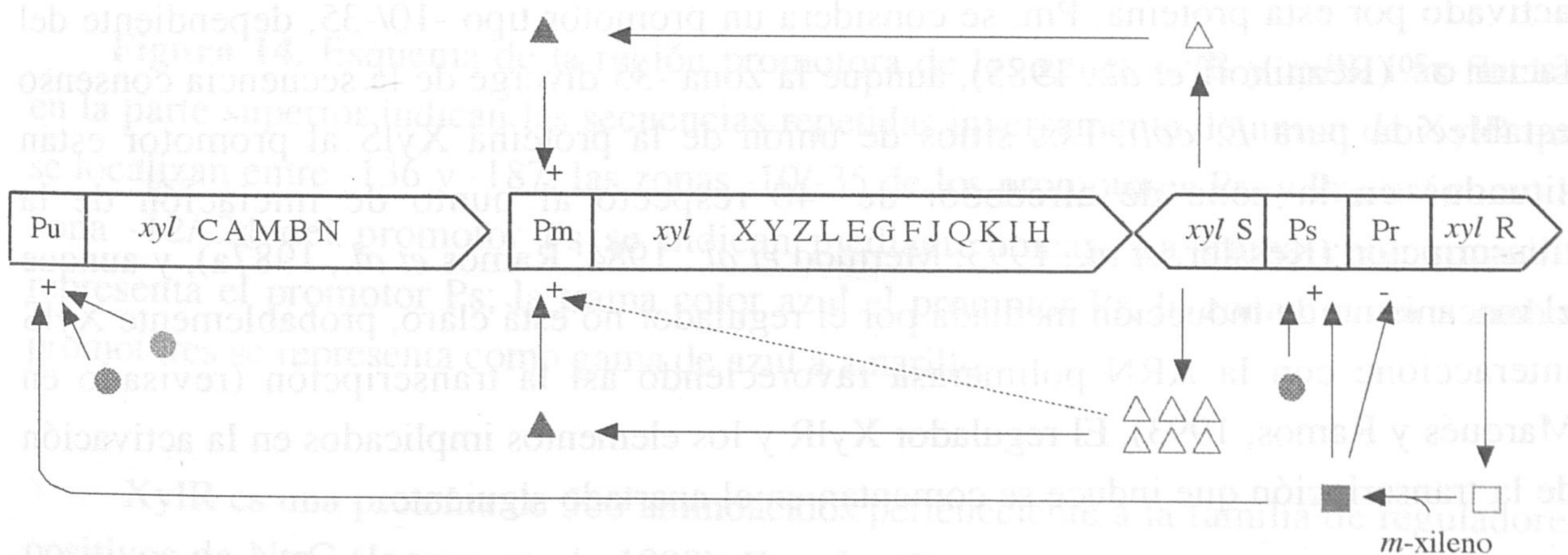


Figura 13. Modelo de regulación de las rutas degradativas del plásmido TOL. La activación (+) o represión (-) de cada proteína sobre los promotores correspondientes se indica mediante flechas. XylR inactivo (□), XylR activo (■), XylS inactivo (Δ), XylS activo (▲), NtrA (●), IHF (○).

El regulador XylR se expresa constitutivamente en forma inactiva (Inouye *et al.*, 1985). Su activación depende de la presencia en el medio de una gran variedad de hidrocarburos aromáticos, alcoholes bencílicos y 4-clorobenzaldehído (Abril *et al.*, 1989). La proteína activa, junto con el factor σ^{54} de la ARN polimerasa (también llamado NtrA o RpoN) y una proteína implicada en inducir dobleces en el ADN denominada IHF ("Integration Host Factor") (revisado en Marqués y Ramos, 1993) origina una cascada de inducción de la transcripción que conlleva a la expresión de la ruta catabólica completa: por un lado induce la transcripción de los genes catabólicos de la ruta "upper" a partir del promotor Pu, y por otro la expresión del gen *xylS* desde el promotor Ps (Inouye *et al.*, 1987a; Ramos *et al.*, 1987a). La hiperproducción de XylS conduce a la expresión de la ruta *meta* en ausencia de efectores de la proteína (Inouye *et al.*, 1987b; Ramos *et al.*, 1987a). En presencia de sustratos de esa ruta, XylS interacciona con ellos e induce la expresión de la misma (Ramos *et al.*, 1986 y 1987a).

Los reguladores XylR y XylS no son homólogos entre sí, y existen diferencias en el mecanismo de activación de la transcripción llevado a cabo por cada uno de ellos. XylS es una proteína de 321 aminoácidos y muestra homología en su extremo C-terminal con las proteínas de la familia de AraC, implicadas en la estimulación de la transcripción de funciones relacionadas con el metabolismo del carbono, patogénesis y respuesta a agentes alquilantes en bacterias (Gallegos *et al.*, 1993; Ramos *et al.*, 1990). El promotor activado por esta proteína, Pm, se considera un promotor tipo -10/-35, dependiente del factor σ^{70} (Reznikoff *et al.*, 1985), aunque la zona -35 diverge de la secuencia consenso establecida para *E. coli*. Los sitios de unión de la proteína XylS al promotor están situados en la zona de alrededor de -40 respecto al punto de iniciación de la transcripción (Kessler, *et al.*, 1993; Mermoud *et al.*, 1984; Ramos *et al.*, 1987a), y aunque el mecanismo de inducción mediada por el regulador no está claro, probablemente XylS interaccione con la ARN polimerasa favoreciendo así la transcripción (revisado en Marqués y Ramos, 1993). El regulador XylR y los elementos implicados en la activación de la transcripción que induce se comentan en el apartado siguiente.

4. LA ESTIMULACION DE LA TRANSCRIPCION MEDIADA POR XYL R

4.1. EL GEN *xylR* Y SU PRODUCTO

La expresión del gen *xylR* tiene un papel fundamental en el sistema regulado de la expresión de los genes *xyl*. Dos características hacen la expresión de este gen distinta del

resto de los genes de la ruta: una es que se expresa constitutivamente como se ha mencionado en el apartado anterior (Inouye *et al.*, 1985); la otra es que reprime su propia síntesis (Inouye *et al.*, 1987a; Abril *et al.*, 1989).

En el promotor de *xyIR*, Pr, existen dos puntos de iniciación de la transcripción, Pr₁ y Pr₂ (Inouye *et al.*, 1987), cuya estructura es similar a la de promotores de *Escherichia coli* con estructura típica -10/-35 que son reconocidas por el factor σ^{70} de la ARN (Reznikoff *et al.*, 1985). El gen *xyIR* se transcribe divergentemente de Ps, el promotor adyacente a él, y las zonas de unión de XylR a este promotor para activar su transcripción se encuentran superpuestas a los dos promotores Pr (Holtel *et al.*, 1992). De este modo, se ha sugerido que XylR se une al mismo sitio para activar Ps y para reprimir su propia síntesis (Marqués y Ramos, 1993). En la Figura 14 se representa un esquema de la zona promotora que incluye los promotores de los genes *xyIR* y *xyIS*.

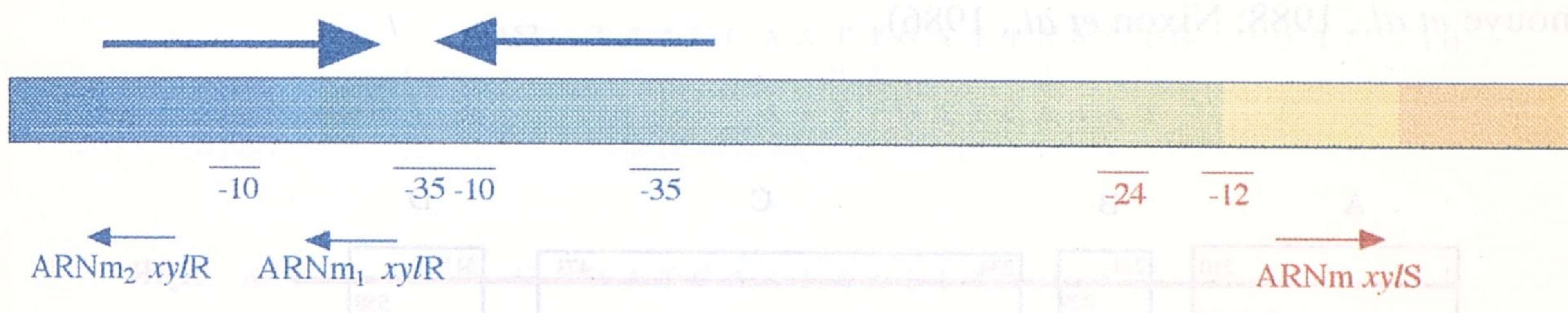


Figura 14. Esquema de la región promotora de los genes *xyIR* y *xyIS*. Las flechas en la parte superior indican las secuencias repetidas inversamente de unión de XylR que se localizan entre -136 y -187; las zonas -10/-35 de los promotores Pr₁ y Pr₂, así como la zona -12/-24 del promotor Ps se indican mediante líneas. La trama color amarillo representa el promotor Ps; la trama color azul el promotor Pr; la zona común a ambos promotores se representa como gama de azul a amarillo.

XylR es una proteína de 566 aminoácidos perteneciente a la familia de reguladores positivos de NtrC (Inouye *et al.*, 1988). Esta familia incluye proteínas que controlan la expresión de determinados operones en respuesta a una gran variedad de estímulos ambientales y otros procesos fisiológicos en bacterias (Ronson *et al.*, 1987; Miller *et al.*, 1989); algunos de éstos son limitación de nitrógeno (NtrC) en *Escherichia coli*, *Rhizobium meliloti* y otras bacterias Gram negativas, fijación de nitrógeno (NifA) en *Klebsiella pneumoniae*, *R. leguminosarum* y *R. meliloti*, limitación de fosfato (phoB) en *E. coli*, control de virulencia (VirG) en *Agrobacterium tumefaciens*, y transporte de ácidos dicarboxílicos (DctD) en *Rhizobium leguminosarum* (revisado en Gross *et al.*,

1989 y Ronson *et al.*, 1987). La Figura 15 esquematiza el alineamiento de XylR con algunas proteínas de la familia. Estas proteínas se caracterizan por la existencia de 4 dominios, 3 de los cuales son altamente homólogos. La zona C-terminal o dominio D contiene un motivo a-hélice-giro-a-hélice característico de proteínas que se unen a ADN. La región central o dominio C es la zona con un mayor porcentaje de homología; probablemente corresponde con la zona de interacción del regulador con el factor σ^{54} de la ARN polimerasa, y contiene la región de unión e hidrólisis de ATP para la liberación de la energía necesaria en la formación de complejos abiertos del promotor (Kustu *et al.*, 1989). El dominio B es un dominio de unión entre los dominios C y A. El dominio N-terminal de estas proteínas está mucho menos conservado. En el caso de XylR este dominio únicamente es homólogo al del regulador DmpR implicado en la expresión de la degradación de fenol en *Pseudomonas putida* (Shingler *et al.*, 1993). Se ha sugerido que esta región es la zona de recepción de la señal ambiental específica de cada sistema (Inouye *et al.*, 1988; Nixon *et al.*, 1986).

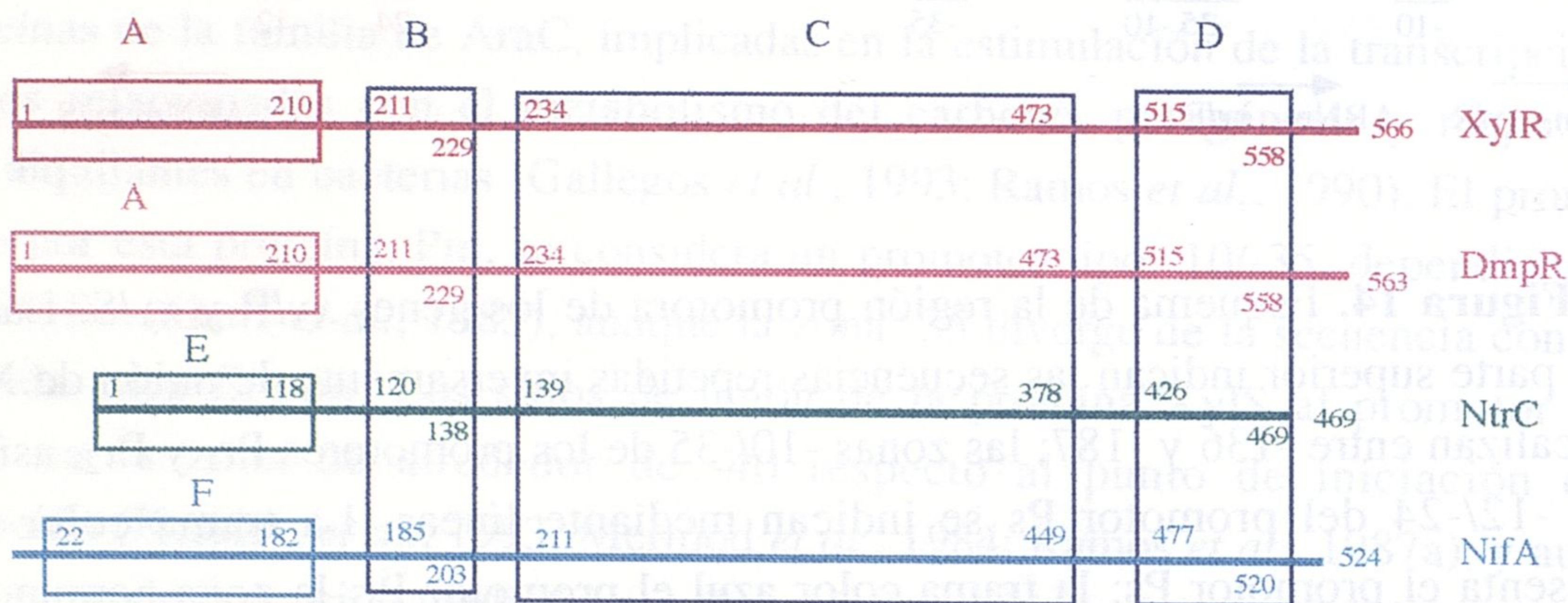


Figura 15. Esquema de los dominios conservados de XylR con proteínas de la familia de NtrC. Las regiones homólogas se representan como recuadros comunes; las no homólogas como recuadros independientes.

4.2. LOS PROMOTORES ACTIVADOS POR XYLR

Los promotores activados por el regulador XylR, Pu y Ps, son homólogos a los de los genes regulados por nitrógeno (*ntr* "nitrogen regulation") y a los de fijación de

nitrógeno (*nif* "nitrogen fixation") y otros procesos en bacterias, ya que conservan las secuencias consenso situadas en -12/-24 respecto al sitio de iniciación de la transcripción (5'-TTGCA-3' y 5'-CTGGC-3') (Ausubel, 1984; Dixon, 1984a). Existen además otras dos zonas de homología que se localizan alrededor de -35/-70 y -120/-190 de Pu y Ps. En el promotor Ps existen hay además otras 2 regiones homólogas a la situada entre -35/-70, que se encuentran entre -140/-150 (Holtel *et al.*, 1990). En la Figura 16 se esquematizan las secuencias homólogas de estos dos promotores.

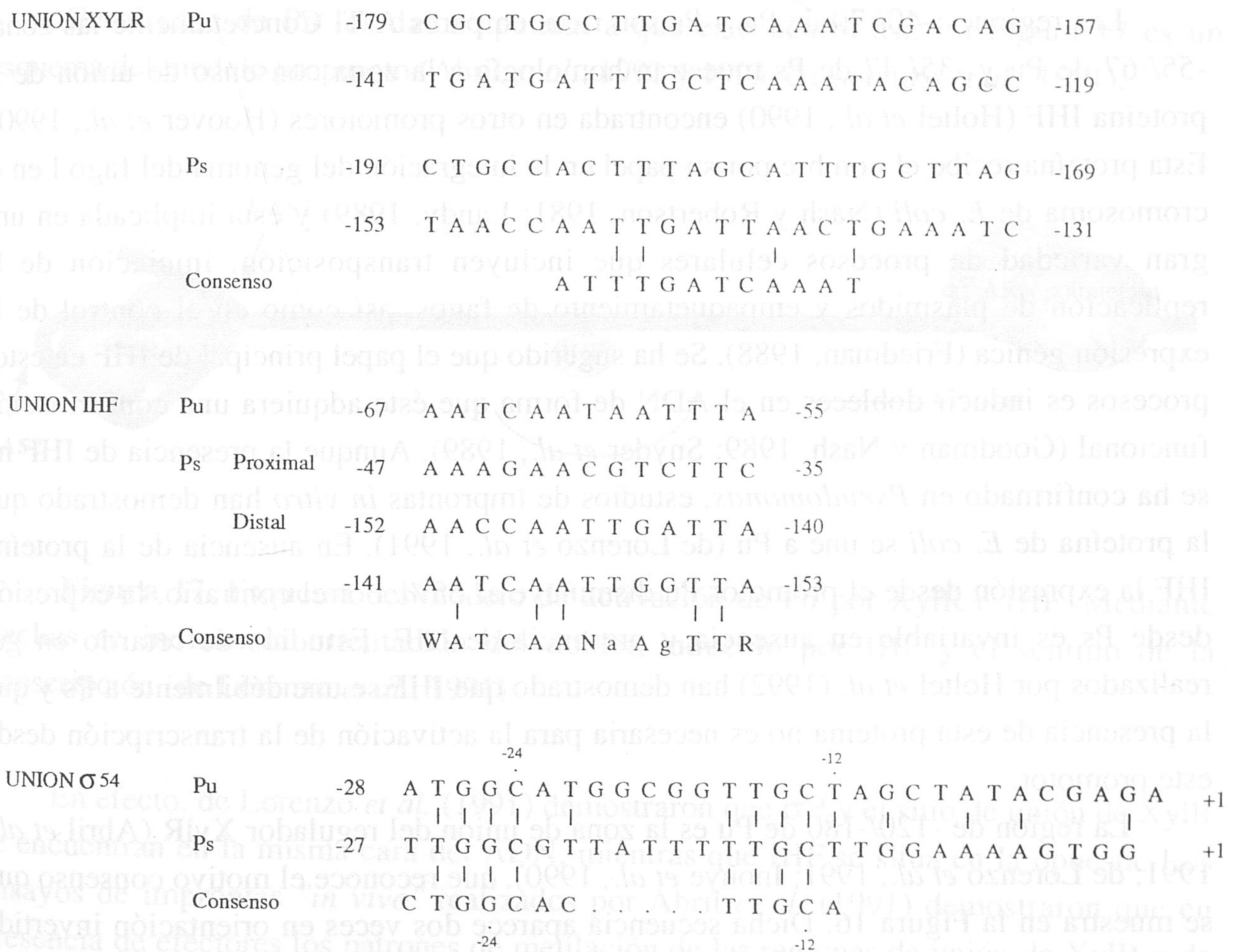


Figura 16. Secuencias homólogas de los promotores Pu y Ps con promotores -12/-24. Los números indican las posiciones de las bases respecto al punto +1 de iniciación de la transcripción.

Las regiones conservadas en -12/-24 son típicas de reconocimiento específico por el factor σ^{54} de la ARN polimerasa (Kustu *et al.*, 1989). Esta proteína, que inicialmente se definió como un activador de la expresión del gen *glnA* en enterobacterias (Dixon, 1984b; Krajewska-Grynkiewicz y Kustu, 1983), se requiere para la estimulación de la transcripción de genes implicados en procesos diversos como transporte de ácidos dicarboxílicos (Ronson, 1988) y producción de melanina en *R. leguminosarum* (Hawkins y Johnson, 1988) o fijación y asimilación de nitrógeno en *A. vinelandii* (Toukdarian y Kennedy, 1986). Se ha demostrado que la expresión desde el promotor Pu es dependiente de esta proteína (Dixon, 1986; Ramos *et al.*, 1987a).

Las regiones -40/-70 de Pu y Ps son ricas en pares A-T. Concretamente las zonas -55/-67 de Pu y -35/-47 de Ps muestran homología a la zona consenso de unión de la proteína IHF (Holtel *et al.*, 1990) encontrada en otros promotores (Hoover *et al.*, 1990). Esta proteína recibe el nombre por su papel en la integración del genoma del fago λ en el cromosoma de *E. coli* (Nash y Robertson, 1981; Landy, 1989) y está implicada en una gran variedad de procesos celulares que incluyen transposición, iniciación de la replicación de plásmidos y empaquetamiento de fagos, así como en el control de la expresión génica (Friedman, 1988). Se ha sugerido que el papel principal de IHF en estos procesos es inducir dobleces en el ADN de forma que éste adquiera una conformación funcional (Goodman y Nash, 1989; Snyder *et al.*, 1989). Aunque la presencia de IHF no se ha confirmado en *Pseudomonas*, estudios de improntas *in vitro* han demostrado que la proteína de *E. coli* se une a Pu (de Lorenzo *et al.*, 1991). En ausencia de la proteína IHF la expresión desde el promotor Pu disminuye al 25%. Por el contrario, la expresión desde Ps es invariable en ausencia y presencia de IHF. Estudios de retardo en gel realizados por Holtel *et al.* (1992) han demostrado que IHF se une débilmente a Ps y que la presencia de esta proteína no es necesaria para la activación de la transcripción desde este promotor.

La región de -120/-180 de Pu es la zona de unión del regulador XylR (Abril *et al.*, 1991; de Lorenzo *et al.*, 1991; Inouye *et al.*, 1990), que reconoce el motivo consenso que se muestra en la Figura 16. Dicha secuencia aparece dos veces en orientación invertida en este segmento. En el caso de Ps, la secuencia de unión de XylR se encuentra en la región de -130/-190 (Holtel *et al.*, 1990). La dependencia de regiones que se encuentran relativamente alejadas del punto de iniciación de la transcripción es una característica extendida entre los promotores dependientes del factor σ^{54} de la ARN polimerasa. Al igual que ocurre en estos promotores, la zona de unión del regulador XylR puede alejarse hasta 1 kb del punto de iniciación de la transcripción en Pu y en Ps (Gomada *et al.*, 1992; Inouye *et al.*, 1990).

De este modo, Pu y Ps son homólogos a promotores que controlan la expresión de genes relacionados con funciones metabólicas diversas en distintos microorganismos, y que parecen compartir sistemas similares de inducción. El mecanismo de activación de estos promotores dependientes de σ^{54} es similar al de los promotores dependientes de σ^{70} en el sentido en que el activador debe estar en contacto con la ARN polimerasa (Collado-Vides *et al.*, 1991). En los promotores dependientes de σ^{54} , se ha propuesto que el ADN se dobla de forma que el regulador y el factor σ^{54} entran en contacto. La proteína IHF capaz de inducir dobleces en el ADN, podría favorecer estos contactos (Collado-Vides *et al.*, 1991).

En el caso de Pu los datos apuntan a que esto ocurre así. La Figura 17 es un esquema del modelo propuesto (Abril *et al.*, 1991 y 1993; de Lorenzo *et al.*, 1991).

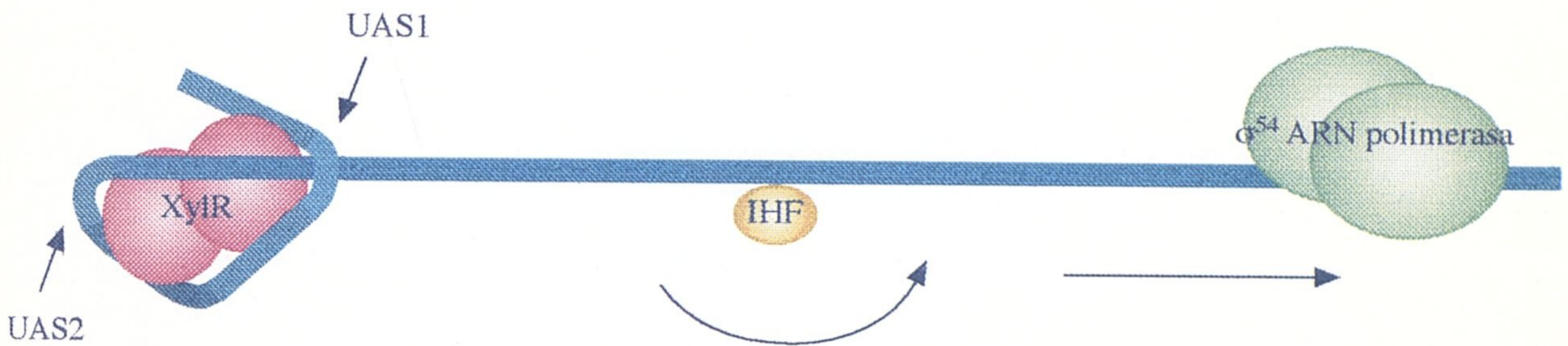


Figura 17. Esquema del modelo de activación de Pu por XylR e IHF. Mediante flechas se indican la orientación del doblez inducido por IHF y el sentido de la transcripción (de Lorenzo *et al.*, 1991).

En efecto, de Lorenzo *et al.* (1991) demostraron que σ^{54} y el sitio de unión de XylR se encuentran en la misma cara del ADN, mientras que IHF se sitúa en la opuesta. Los ensayos de improntas "in vivo" realizados por Abril *et al.* (1991) demostraron que en presencia de efectores los patrones de metilación de las regiones de unión de XylR y de IHF de Pu cambian. Estos cambios se interpretaron como reflejo de los cambios conformacionales inducidos en XylR en presencia del efector, que facilitan el contacto con el complejo formado por el promotor y el factor σ^{54} en la región -12/-24. El estudio exhaustivo realizado por Abril *et al.*, en 1991 y 1993 sobre el efecto de mutaciones en el promotor Pu, que colocan en distintas caras del ADN los sitios de unión de XylR, IHF y σ^{54} , permitió elucidar el papel físico de IHF en la transcripción desde Pu; de hecho, el sitio

de unión de IHF al ADN puede ser sustituido por regiones ricas en AT, cuya flexibilidad permite del mismo modo estos dobleces (Pérez-Martín *et al.*, 1994). En el caso de Ps la independencia de IHF para la activación de la transcripción de este promotor parece ser innecesaria debido a su riqueza en AT (Holtel *et al.*, 1992), al igual que se ha demostrado en el caso de otros promotores -12/-24 no dependientes absolutamente de IHF (Claverie-Martín y Magasanik, 1991).



En el presente trabajo, no se habían descrito las formas específicas de degradación de los compuestos que la degradación de otros hidrocarburos aromáticos por parte de *P. putida* se realiza por vías alternativas.

Los estudios preliminares habían mostrado que el sistema *lacZ* parte 2 del regulador *lac* de *E. coli* no puede utilizarse para la medición de la fuerza de regulación en *P. putida*.

El regulador *lacZ* es el mejor caracterizado plásmido reportado que permite en *P. putida* la medición cuantitativa de las tasas catalíticas que se difunden de los sistemas de regulación que se encuentran en las tasas catalíticas y de sus promotores de regulación. La construcción de un sistema de medición para este fin en algunos de los elementos genéticos de *P. putida* se ha intentado siempre por los investigadores en parte para intentar explotar la especificidad estanca de los genes de la ruta "operón" para biotransformar nitrotoluenos y nitrobenzocenos. En este sentido los objetivos de este trabajo fueron los siguientes:

1. Por un lado determinar si los compuestos nitroaromáticos son señalizadores de los genes de la ruta "operón" de *lacZ*.

2. Por otro lado estudiar el papel de nitroaromáticos que son reconocidos por el regulador *NyhK* y en caso de ser capaces de iniciar las mutaciones seleccionadas para expandir el número de este regulador en la biodegradación de nitroaromáticos.

3. Ver la bacteria capaz de degradar nitrobenzocenos que promueve la diversificación de los predadores para la expansión de las rutas de biodegradación de nitroaromáticos mediante la transferencia de los sistemas de *lacZ* permitiendo así la selección de mutaciones.

OBJETIVOS

La caracterización de estos tres elementos realizada por este trabajo supone los bases fundamentales para la construcción de un sistema de medición de la degradación completa de nitrotoluenos, mediante el empleo de los fragmentos de *lacZ* con aquellos para la degradación de nitrobenzocenos.

Por otro lado, el estudio del efecto de mutaciones de la proteína *NyhK* sobre la expresión de los promotores que induce ha conducido al esclarecimiento de ciertos aspectos del mecanismo de activación de la transcripción estimulada por el regulador.

di, ma ad un certo punto, si è accorto che non poteva più continuare a vivere in quel modo. Ha deciso di cambiare vita, di dedicarsi a un lavoro che gli ha permesso di esprimere le sue idee e di aiutare gli altri. È un uomo che ha fatto una scelta difficile, ma che è convinto di aver fatto la scelta giusta. Ha una grande passione per il suo lavoro e per la sua vita. È un uomo che ha fatto una scelta difficile, ma che è convinto di aver fatto la scelta giusta. Ha una grande passione per il suo lavoro e per la sua vita.

ALBERTO

Al iniciarse este trabajo, no se habían descrito bacterias capaces de degradar nitrotoluenos, mientras que la degradación de otros nitroaromáticos más polares se encontraba bien documentada.

Ensayos preliminares habían mostrado que *Pseudomonas putida* 2440 portadora de TOL es incapaz de utilizar nitrotoluenos como fuente de carbono y/o nitrógeno.

El plásmido TOL es el mejor caracterizado plásmido catabólico que existe en cuanto a la organización genética de las rutas catabólicas que codifica, de los sistemas enzimáticos que componen dichas rutas catabólicas y de sus mecanismos de regulación. Esto hacía de este plásmido un candidato apropiado para estudiar si en alguna extensión los elementos enzimáticos y reguladores reconocían compuestos nitroaromáticos; en particular era de interés explotar la especificidad relajada de los enzimas de la ruta "upper" para biotransformar nitrotoluenos en nitrobenzoatos. De este modo, los objetivos de este trabajo fueron los siguientes:

1.- Por un lado determinar si los compuestos nitroaromáticos eran sustratos de los enzimas de la ruta "upper" de TOL.

2.- Por otro lado establecer el perfil de nitroaromáticos que son reconocidos por el regulador XylR, y en caso necesario inducir las mutaciones adecuadas para expandir el potencial de este regulador en la biodegradación de nitroaromáticos.

3.- Aislar bacterias capaces de degradar nitrobenzoatos que pudieran ser utilizadas como hospedadores para la expansión de las rutas de degradación de nitroaromáticos, mediante la transferencia de los sistemas de TOL permisivos o modificados por mutación.

La caracterización de estos tres elementos realizada en este trabajo supone las bases fundamentales para la construcción de rutas híbridas para la degradación completa de nitrotoluenos, mediante el ensamblaje de los elementos de TOL con aquellos para la degradación de nitrobenzoatos.

Por otro lado, el estudio del efecto de mutaciones de la proteína XylR sobre la expresión de los promotores que induce ha conducido al esclarecimiento de ciertos aspectos del mecanismo de activación de la transcripción estimulada por el regulador.

CEPAS BACTERIANAS

En este trabajo se han utilizado cepas bacterianas de conservación de tipo tipo de laboratorio del grupo de Biodegradación de Carbohidratos de origen a partir del aislamiento de una bacteria del suelo con características metabólicas similares a la cuya descripción se realiza en el apartado correspondiente de la presente tesis doctoral. Las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo se detallan en el Anexo I del presente tesis doctoral con sus respectivos números y años.

IDENTIFICACION DE BACTERIAS

La identificación de bacterias aisladas del sistema se realizó por el sistema "Axiom" (1963) de la casa comercial Sigma y finalmente por el sistema

de identificación de bacterias se utilizaron los manuales de identificación de la casa comercial "Spectra" (1969) para bacterias no fermentantes "Axi 29NF" (1969) y el "2003" y para enterobacterias y otros bacilos gramnegativos "Axi 20 E" (1969) de la casa comercial "Spectra". Estos paquetes comerciales permiten la identificación de distintas reacciones metabólicas a partir de suspensiones bacterianas conservadas en un sistema de conservación para la identificación de bacterias. Como protocolo general para la

identificación del tipo de metabolismo sobre **MATERIALES Y METODOS** bacteria se utilizó el sistema "Axi OF Medium" (referencia nº 50111) y para la realización de las pruebas de movilidad el sistema "Axi M Medium" (referencia nº 50112).

1- 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 115°C y 1 atmósfera de presión, o por filtración utilizando filtros de 0.22 µm de diámetro de poro.

1. CEPAS BACTERIANAS

En este trabajo se han utilizado cepas bacterianas de colecciones de cultivos tipo y de la colección del grupo de Biodegradación de Granada. Además se ha llevado a cabo el aislamiento de una bacteria del suelo con capacidades metabólicas determinadas, cuya descripción se realiza en el apartado correspondiente de la sección de Resultados. Las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo se relacionan en la Tabla 1 junto con sus genotipos o características más relevantes.

1.1. IDENTIFICACION DE BACTERIAS

La tinción de Gram de bacterias aisladas del suelo se realizó utilizando el sistema "Accustain Gram Stain" de la casa comercial Sigma (referencia nº HT90).

Para la identificación de estas bacterias se utilizaron los sistemas de identificación de la casa comercial Api Systems Biomérieux para bacterias no entéricas "Api 20NE" (referencia nº 2005) y para enterobacterias y otros bacilos gram-negativos "Api 20 E" (referencia nº 2010). Estos paquetes comerciales permitían la realización de distintas pruebas metabólicas a partir de suspensiones bacterianas, constituyendo un sistema satisfactorio para la identificación de bacterias. Como pruebas complementarias para la determinación del tipo de metabolismo sobre la glucosa llevado a cabo por la bacteria se utilizó el sistema "Api OF Medium" (referencia nº 5011) y para la realización de las pruebas de motilidad el sistema "Api M Medium" (referencia nº 5012).

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 115°C y 1 atmósfera de presión, o por filtración utilizando filtros de 0,22 µm de diámetro de poro.

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.

Estirpe	Genotipo	Referencia
<i>Pseudomonas putida</i>		
KT2440	<i>hsdM, hsdR</i>	Franklin <i>et al.</i> , (1981)
<i>Klebsiella oxytoca</i>		
410P	4-nitrobenzoato ⁺	Este trabajo
<i>Escherichia coli</i>		
5K	<i>res, thr, thi, tonA, supE</i>	R. L. Robson
71/18	$\Delta(lac-proAB)$, <i>thi, supE</i> , F'[<i>proAB</i> ⁺ , <i>lacI</i> ^q , <i>lacZ</i> Δ M15]	Messing <i>et al.</i> , (1977)
DBP101	<i>rpsL</i> , $\Delta(lac-pro)$, <i>himD451::mini-tet</i>	Biek y Cohen, (1986)
ET8000	<i>lacZ319::IS1, gyrA, hutC</i> _k	Mc.Neil <i>et al.</i> , (1982)
ET8045	ET8000 (<i>ntrA::Tn10</i>)	Pahel y Tyler, (1979)
HB101	<i>supE44, hsdS20, (r_B⁻m_B⁻)</i> <i>recA13, ara14, proA2, lacY1,</i> <i>galK2, rpsL20, xyl5, mtl1</i>	Boyer y Roulland-Dussoix, (1969)
JM101	<i>lac, pro, thi, supE</i> , F'[<i>traD36,</i> <i>proAB</i> ⁺ , <i>lacI</i> ^q , <i>lacZ</i> Δ M15]	Messing, (1979)
MC4100	F ⁻ , <i>araD139, deoC1, thiA1,</i> $\Delta[(argF-lac)U169]$, <i>rpsL150,</i> <i>relA1, flbB5301, ptsF25</i>	Silhavy <i>et al.</i> , (1984)
S90C	<i>rpsL, lac, pro</i>	Biek y Cohen, (1986)

Los medios de cultivo ocuparon un volumen entre el 25 y el 35% del volumen del matraz.

Para los cultivos en limitación de oxígeno se utilizaron tapones de goma para cerrar el matraz.

2.1. MEDIOS RICOS

Como medio habitual de crecimiento se utilizó el medio Luria-Bertani (LB) (Maniatis *et al.*, 1982), cuya composición fue la siguiente:

Bactotriptona	10 g
Extracto de levadura.....	5 g
NaCl.....	10 g
H ₂ O	hasta 1 l

Para la preparación de medio sólido se añadió bactoagar 1,5% (p/v).

Este medio se esterilizó en el autoclave.

En los casos en que se requirió un medio sólido diferencial para la expresión del gen de la β -galactosidasa se utilizaron los siguientes medios:

a) Agar MacConkey 5,2% (p/v) esterilizado en el autoclave. Este medio contiene lactosa y rojo neutro como indicador de pH, que vira a rojo como consecuencia de la acidificación del medio producida por la hidrólisis de la lactosa. El medio permitía la diferenciación de colonias Lac⁺ como colonias rojas, frente a las colonias Lac⁻ que aparecían sin color.

b) LB suplementado con 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-gal), un análogo de la lactosa cuya hidrólisis por el enzima β -galactosidasa produce un compuesto insoluble en agua de color azul. El medio se suplementó con isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) con objeto de bloquear la represión por LacI. Los clones que presentaron actividad β -galactosidasa se reconocieron como colonias azules en este medio, frente a colonias sin color que no expresaban el enzima.

El X-gal se adicionó al medio a una concentración de 40 μ g/ml a partir de una solución 2% (p/v) en N,N-dimetilformamida que se conservó a -20°C.

El IPTG se añadió a concentración 0,2 mM a partir de una solución 100 mM esterilizada por filtración y almacenada a -20°C.

2.2. MEDIOS MINIMOS

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
MgSO ₄ 1M	1 ml
Citrato férrico amónico 6‰ (p/v).....	1 ml
H ₂ O	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:

Na ₂ HPO ₄ x 7H ₂ O.....	70 g
KH ₂ PO ₄	30 g
NH ₄ Cl.....	10 g
NaCl.....	5 g
H ₂ O	hasta 1 l

La solución A9 se componía de:

HBO ₃	300 mg
ZnCl ₂	50 mg
MnCl ₂ x 4H ₂ O	30 mg
CoCl ₂	200 mg
CuCl ₂ x 2H ₂ O	10 mg
NiCl ₂ x 6H ₂ O.....	20 mg
NaMO ₄ x 2H ₂ O.....	30 mg
H ₂ O	hasta 1 l

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

a) Azúcares : la glucosa y la fructosa se prepararon en soluciones madre al 20% (p/v) que se esterilizaron en el autoclave, y se añadieron al medio para alcanzar una concentración final de 0,5% (p/v).

b) Compuestos aromáticos: se utilizaron a una concentración final en el medio de 5 mM. Estos compuestos se prepararon en soluciones madre alcalinas equimoleculares en NaOH, para su disolución: el benzoato y el 3-metilbenzoato se prepararon como soluciones 0,5 M; los nitroaromáticos se prepararon como soluciones 0,1-0,5 M. Estos aromáticos se esterilizaron en el autoclave. El alcohol 3-metilbencílico se preparó en solución 0,5 M en etanol:H₂O (1:1) (v/v). El tolueno y sus derivados líquidos se suministraron al medio en fase gaseosa, introduciendo varillas huecas de vidrio con 0,5 ml del compuesto aromático en los matraces de cultivo, y sellando éstos con parafina.

En los casos en los que se utilizaron compuestos nitroaromáticos como fuentes de nitrógeno, el NH₄Cl se suprimió de la solución 10xM9, y esta solución, llamada 10xM8, se utilizó en su lugar. Los nitroaromáticos se suministraron a partir de las soluciones madre anteriores hasta alcanzar una concentración final en el medio de 1 mM.

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

Eventualmente los medios mínimos líquidos se suplementaron con extracto de levadura 0,02% (p/v) con el fin de disminuir el tiempo de la fase de latencia de los cultivos. La solución madre de extracto de levadura se preparó al 20% (p/v) y se esterilizó en el autoclave.

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

2.3. ANTIBIOTICOS

Las soluciones de antibióticos se prepararon 1000 veces concentradas en H₂O destilada, excepto la tetraciclina y el cloranfenicol que se prepararon en etanol absoluto, y la rifampicina que se disolvió en metanol. Los antibióticos se utilizaron usualmente a las concentraciones finales indicadas en µg/ml:

Ampicilina	100
Cloranfenicol.....	30
Estreptomicina.....	50

Acido nalidíxico.....	10
Tetraciclina.....	10
Kanamicina.....	25

Las soluciones preparadas en H₂O se esterilizaron por filtración y se almacenaron a -20°C.

3. CONSERVACION DE CEPAS BACTERIANAS

La conservación de cepas a corto plazo se realizó a 4°C en cultivos en estría en placas del correspondiente medio sólido suplementado con los antibióticos adecuados. A largo plazo se hizo por congelación de cultivos líquidos suplementados con glicerol 40% (v/v) a -20°C y -70°C.

4. PLASMIDOS

En la Tabla 2 se relacionan los plásmidos utilizados en este trabajo junto con sus características más relevantes. Los plásmidos de nueva construcción se describen en los apartados correspondientes de la sección de Resultados.

5. AISLAMIENTO DE ADN PLASMIDICO

Para el aislamiento de ADN plasmídico se utilizó uno de los tres métodos que se describen a continuación, dependiendo del grado de pureza requerida para el uso posterior del ADN y del volumen de cultivo de partida según la cantidad de ADN que se quisiera obtener.

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.

Tabla 2. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmidos	Características	Referencia
pAD1	pTS174, <i>xylR7</i>	Este trabajo
pAD2	pTZ19R, fragmento 1,7 Kb <i>HpaI-SalI</i> de <i>xylR7</i>	Este trabajo
pAD3	pTZ19R, fragmento 0,8 Kb <i>SalI-HpaI</i> de <i>xylR7</i>	Este trabajo
pAD4	pTZ19R, fragmento 1,7 Kb <i>HpaI-SalI</i> de <i>xylR49</i>	Este trabajo
pAD5	pTZ19R, fragmento 0,8 Kb <i>SalI-HpaI</i> de <i>xylR49</i>	Este trabajo
pAD49	pTS174, <i>xylR49</i>	Este trabajo
pAH100	Ap ^r , <i>ori R1</i> , Ps:: <i>lacZ</i>	Holtel <i>et al.</i> , (1992)
pAH120	Ap ^r , <i>ori R1</i> , Pr:: <i>lacZ</i>	Holtel <i>et al.</i> , (1992)
pERD401	Ap ^r , <i>ori pMB1</i> , Pu:: <i>lacZ</i>	Abril <i>et al.</i> , (1991)
pERD411	Ap ^r , <i>ori pMB1</i> , Δ (-240 a -106)Pu:: <i>lacZ</i>	Abril <i>et al.</i> , (1991)
pERD412	Ap ^r , <i>ori pMB1</i> , Δ (-240 a -144)Pu:: <i>lacZ</i>	Abril <i>et al.</i> , (1991)
pERD424	Ap ^r , <i>ori pMB1</i> , (G ₋₁₃₁ ->A)Pu:: <i>lacZ</i>	Abril y Ramos, (1993)
pERD425	Ap ^r , <i>ori pMB1</i> , (G ₋₁₃₉ ->A)Pu:: <i>lacZ</i>	Abril y Ramos, (1993)
pERD426	Ap ^r , <i>ori pMB1</i> , (G ₋₁₆₀ ->A)Pu:: <i>lacZ</i>	Abril y Ramos, (1993)
pERD427	Ap ^r , <i>ori pMB1</i> , (G ₋₁₆₉ ->A)Pu:: <i>lacZ</i>	Abril y Ramos, (1993)
pRD579	Ap ^r , <i>ori R1</i> , Pu:: <i>lacZ</i>	Dixon, (1986)
pRK2013	Km ^r , <i>ori ColE1</i> , <i>mob</i> , <i>tra</i>	Figurski y Helinski, (1979)
pTS174	Cm ^r , <i>ori p15A</i> , <i>xylR</i>	Inouye <i>et al.</i> , (1983)
pTZ19R	Ap ^r , <i>ori M13</i> , <i>ori f1</i>	Zoller y Smith, (1983)
pWA21	Ap ^r , Sm ^r , <i>IncQ</i> , <i>Plac::xylMA</i>	Wubbolts, (1987) Delgado <i>et al.</i> , (1992)
pWW0	<i>IncP9</i> , tolueno ⁺ , <i>m</i> -, <i>p</i> -xileno ⁺ , <i>m</i> -, <i>p</i> -metilbenzoato ⁺	Worsey y Williams, (1975)

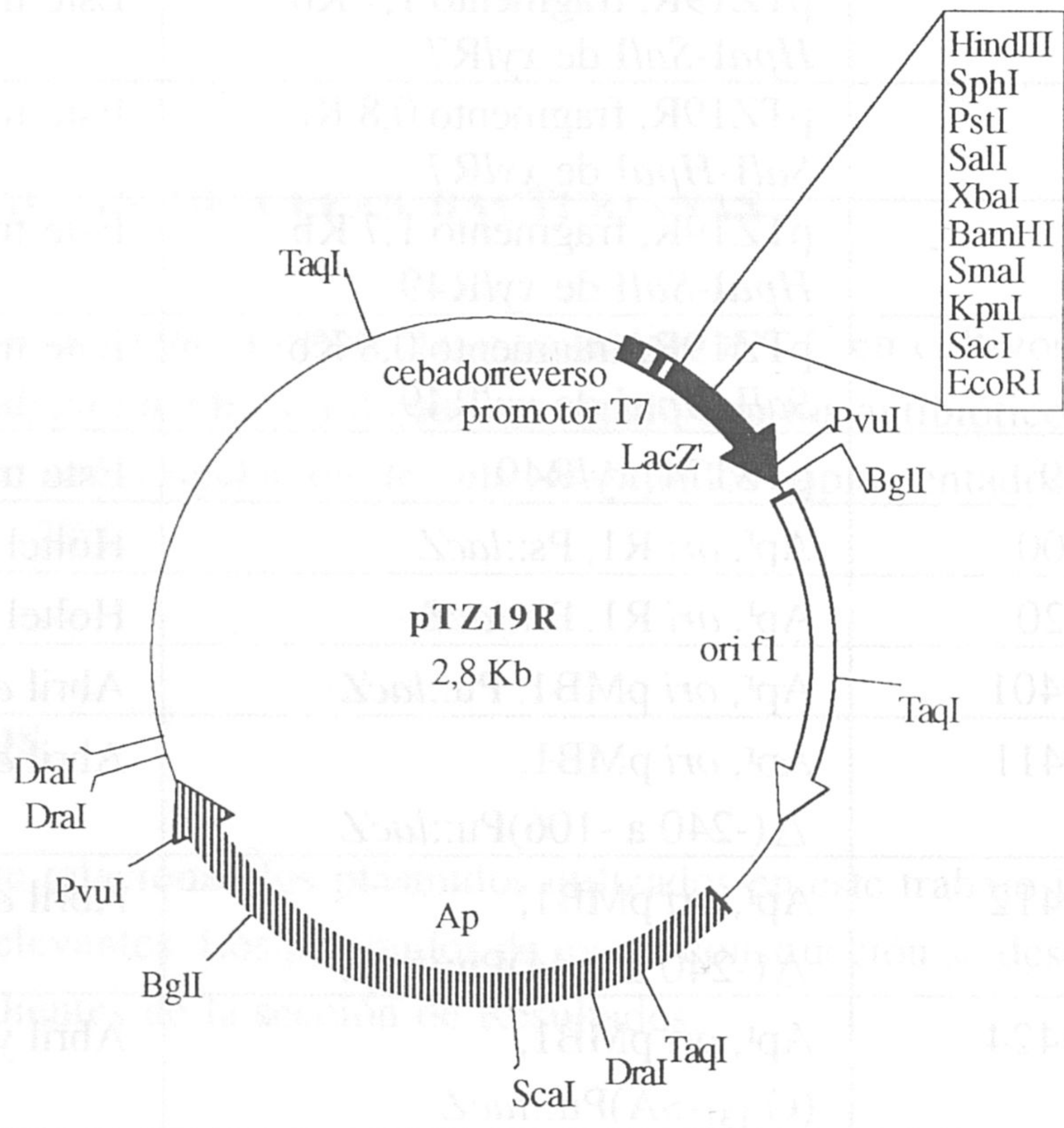


Figura 18. Esquema del plásmido pTZ19R. Este plásmido es un derivado del vector de clonaje pUC19 (Viera y Messing, 1982) que contiene los orígenes de replicación de pBR322 y f1. Se muestra la situación de los genes *lacZ'* y de resistencia a ampicilina, así como del promotor de T7; las flechas indican el sentido de transcripción. Igualmente se muestra la posición de los puntos de corte para las restrictasas que se indican. Este plásmido se ha usado en este trabajo para la clonación de fragmentos de ADN y su secuenciación con dideoxinucleótidos. La clonación de un fragmento de ADN en el polinquer interrumpe la transcripción del fragmento α de la β -galactosidasa, de forma que es posible detectar clones portadores del inserto como colonias blancas, frente a azules que no lo llevan, utilizando el medio selectivo LB suplementado con X-gal e IPTG según se ha descrito en el apartado 2.1 de esta sección.

5.1. METODO "MAGIC-MINIPREP"

Este sistema se utilizó para la preparación rápida de ADN plasmídico libre de ARN para su uso en secuenciación y clonación. El procedimiento se realizó partiendo de un volumen de cultivo de 3 ml y siguiendo las instrucciones del fabricante (Promega "Magic Miniprep" referencia nº A7100).

5.2. METODO DE LA LISIS ALCALINA

5.2.1. Aislamiento de plásmidos a pequeña escala

Para el aislamiento de plásmidos a pequeña escala se utilizó el método de la lisis alcalina de Ish-Horowitz y Burke, (1981). La composición de las soluciones empleadas en este procedimiento se indica al final del apartado.

Se partió de un volumen de 1,5 ml de cultivo. Las células se recogieron por centrifugación a 12000g durante 5 minutos. Tras desechar el sobrenadante, éstas se resuspendieron en 100 µl de GTE, y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación se añadieron 200 µl de solución de lisis de SDS/NaOH, se agitó el tubo por inversión y se incubó durante 5 minutos en un baño de hielo. El lisado se neutralizó añadiendo 150 µl de acetato potásico pH 4,8 y, tras agitar el tubo invertido en un agitador mecánico, se incubó durante 5 minutos en un baño de hielo. Las proteínas y restos celulares se eliminaron por centrifugación a 12000g durante 5 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se trató con 200 µl de fenol ácido con el fin de eliminar las proteínas unidas al ADN; tras agitar vigorosamente, las fases se separaron por centrifugación a 12000g durante 5 minutos. La fase superior acuosa se transfirió a un tubo limpio y se repitió la operación utilizando fenol-cloroformo-alcohol isoamílico.

Para precipitar el ADN, a la fase acuosa libre de proteínas se le añadieron 800 µl de etanol absoluto frío, y se incubó a -20°C durante 30 minutos. El ADN se precipitó por centrifugación a 12000g durante 10 minutos. El sedimento de ADN se secó al vacío y se resuspendió en 25 µl de H₂O o TE.

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

GTE:

Glucosa	50 mM
Tris-HCl	25 mM
EDTA-Na ₂	10 mM

La solución se esterilizó en el autoclave y se conservó a 4°C. El método original incluía en esta solución lisozima (4 mg/ml) que se añadía en el momento de su uso. Sin embargo habitualmente se obtuvo una rotura de las paredes celulares satisfactoria en su ausencia, y por ello se omitió de la solución.

Solución de lisis:

SDS	1% (p/v)
NaOH.....	0,2 N

Esta solución fue de preparación extemporánea a partir de soluciones madre del 10% (p/v) SDS y de 2 N de NaOH.

Tampón acetato potásico pH 4,8:

Acetato potásico 5 M	60 ml
Acido acético glacial.....	11,5 ml
H ₂ O.....	hasta 100 ml

El pH se ajustó a 4,8 con ácido acético glacial. La solución se esterilizó en el autoclave y se conservó a 4°C.

TE:

Tris-HCl pH 8	10 mM
EDTA-Na ₂	1 mM

Esta solución se esterilizó en el autoclave.

Fenol ácido: los cristales de fenol se fundieron a 55°C, y se añadió hidroxiquinoleína 0,1% (p/v) como antioxidante. La solución se saturó con acetato sódico 50 mM pH 4,8 y se conservó a 4°C.

Fenol-cloroformo-alcohol isoamílico: los cristales de fenol se fundieron a 55°C y se mezclaron con cloroformo y alcohol isoamílico en proporción 25:24:1 (v/v). La solución se saturó con Tris-HCl 1 M, pH 8 hasta que la fase acuosa mantuvo este pH. Posteriormente se retiró el Tris-HCl y se sustituyó por TE. La solución se conservó a 4°C.

5.2.2. Aislamiento de plásmidos a escala media

El procedimiento para la preparación de plásmidos a escala media fue básicamente el mismo que se utilizó para la preparación alcalina a pequeña escala, salvo que se partió de un volumen inicial de 20 ml. La lisis celular se llevó a cabo con los mismos reactivos que en las preparaciones a pequeña escala, excepto que los volúmenes fueron 10 veces superiores. La neutralización se hizo utilizando 10 volúmenes superiores de KAcF, cuya composición se indica a continuación, en lugar de acetato potásico. Al sobrenadante recogido tras centrifugar 5 minutos a 12000g se añadieron 8 ml de isopropanol frío (-20°C) para precipitar el ADN, que se recogió por centrifugación 12000g durante 15 minutos. Posteriormente el ADN se trató con fenol y se precipitó del mismo modo que en la preparación a pequeña escala, igualmente en volúmenes 10 veces superiores. El ADN se resuspendió en un volumen final de 100 µl de H₂O o TE.

Eventualmente la solución de ADN se trató con ARNasa con el fin de eliminar el ARN de ésta. Para ello a la suspensión de ADN se añadió ARNasa para alcanzar una concentración final de 20 µg/ml y 3 µl de NaCl 5 M, y se incubó durante 1 hora a 37°C. Finalmente el ADN se trató con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y se precipitó con etanol como se ha descrito en el apartado anterior.

La solución madre de ARNasa contenía 10 mg/ml de ribonucleasa A en TE. Esta solución se hirvió durante 10 minutos con objeto de eliminar nucleasas específicas de ADN, y se conservó a -20°C.

KAcF:

Acetato potásico..... 3 M

Acido fórmico.....1,8 M

5.2.3. 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 horas. Las células se recogieron por centrifugación a 4000g 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 minutos y el lisado obtenido se neutralizó añadiendo 45 ml de KAcF. Después de incubar 15 minutos en hielo, las proteínas y gran parte del ADN cromosómico precipitados por la neutralización, se retiraron por centrifugación 5000g durante 15 minutos. 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 12000g durante 15 minutos. 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 4000g durante 15 minutos 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 145000g en un rotor Beckman 50Ti durante 48 horas 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 isopropanol 90% (v/v), se mezcló y se centrifugó a 12000 g durante 2 minutos. 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 H_2O y 6 volúmenes de etanol absoluto, y tras incubar a -20°C durante 2 horas, se recogió por centrifugación a 12000g durante 10 minutos. El ADN precipitado se secó al vacío y se resuspendió en un volumen variable de H_2O o TE entre 100 y 400 μl dependiendo del número de copias del plásmido aislado.

5.3. AISLAMIENTO DE MEGAPLASMIDOS

Para la preparación de megaplásmidos se utilizó el sistema de Kado y Liu, (1981) con algunas modificaciones, como describieron Ramos-González *et al.*, (1991).

Se partió de cultivos en LB o medio mínimo de la cepa portadora del plásmido a aislar, que habían sido incubados a 30°C en agitación durante 12-16 horas. Un volumen de 1,5 ml del cultivo se centrifugó a 12000g durante 2 minutos para recoger las células. El sobrenadante se descartó, y las células se resuspendieron en 200 µl de una solución de Tris-HCl 25 mM, EDTA-Na₂ 25 mM pH 8, sacarosa 20% (p/v), a la que se añadió entonces 1 mg/ml de lisozima. La suspensión se incubó a 37°C durante 10 minutos para permitir la actuación de la lisozima sobre la pared bacteriana. La lisis celular se obtuvo añadiendo 100 µl de una solución de SDS 2% (p/v) y NaOH 0,3 N y mezclando suavemente por inversión de los tubos. La suspensión se incubó a 55°C durante 30 minutos para disminuir la integridad del ADN cromosómico. Los restos celulares se eliminaron mediante la extracción con 1 volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico con agitación suave, y la fase acuosa que contenía el ADN se conservó a -20°C.

6. TRANSFORMACION DE *ESCHERICHIA COLI*

6.1. PREPARACION DE CELULAS COMPETENTES

La preparación de células competentes de *E. coli* para su transformación posterior se hizo por el método de Nishimura *et al.*, (1990). Al final del apartado se describe la composición de las soluciones empleadas en este procedimiento.

La cepa correspondiente de *E. coli* se inoculó en 3 ml de LB suplementado con los antibióticos adecuados, y se incubó a 37°C con agitación durante 12-16 horas. Este cultivo se diluyó 100 veces en 50 ml de solución A y se incubó a 37°C con agitación hasta alcanzar la fase exponencial temprana de crecimiento ($A_{660} = 0,6-0,8$). A partir de este momento se trabajó en frío, ya que la eficiencia de transformación es de este modo 100 veces superior. Las células se mantuvieron en un baño de hielo durante 10 minutos, y se recogieron por centrifugación a 12000g durante 5 minutos a 4°C. A continuación se resuspendieron cuidadosamente en 0,5 ml de solución A. Posteriormente se añadieron 2,5 ml de solución B y se mezcló suavemente. La suspensión celular se repartió en alícuotas de 150 µl que se mantuvieron a -70°C hasta el momento de su uso.

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

Solución A: LB suplementado con:

MgSO₄ x 7H₂O10 mM

Glucosa0,2% (p/v)

Solución B: LB suplementado con:

Glicerol.....36% (v/v)

PEG-750012% (p/v)

MgSO₄ x 7H₂O12 mM

6.2. TRANSFORMACION

Para la transformación de las células con ADN plasmídico, una alícuota de células mantenida a -70°C se transfirió a un baño de hielo. Se añadieron 0,1-1 µg de ADN, y las células junto con el ADN se incubaron en hielo durante 30 minutos con agitación ocasional. A continuación se sometieron a un choque térmico mediante la incubación a 42°C durante 1 minuto, y se mantuvieron en hielo durante 1-2 minutos. Posteriormente se añadió 1 ml de LB y las células se incubaron a 30°C durante 1-3 horas para permitir la expresión de los genes de resistencia a antibióticos codificados por el plásmido. Las células que habían adquirido el plásmido, y por tanto la resistencia antibiótica, se seleccionaron mediante siembra de alícuotas de 50-200 µl de la suspensión celular en placas de LB sólido suplementado con los antibióticos adecuados. Las placas se incubaron a 30°C hasta la aparición de colonias.

7. TRANSFERENCIA DE PLASMIDOS POR CONJUGACION

La conjugación bacteriana se utilizó como sistema para la transferencia de ADN plasmídico a cepas de *Pseudomonas*.

Cuando el plásmido que se quería transferir era autotransmisible, como es el caso del plásmido TOL pWW0 (Benson y Shapiro, 1978; Bradley y Williams, 1982), se utilizó el sistema de cruces sencillos, en los que participaron únicamente las cepas donadora y receptora del plásmido de interés.

En los casos en que se quería transferir un plásmido carente de las funciones de transferencia, estas se aportaron en *trans* en un plásmido auxiliar autotransferible que es capaz de movilizar el plásmido en cuestión; de esta forma la bacteria portadora del

plásmido auxiliar formó también parte del cruce. El plásmido auxiliar utilizado en este estudio, pRK2013 (Tabla 2), presenta un origen de replicación del tipo ColE1 que no es reconocido en *Pseudomonas*, por lo que este plásmido no se establece en este hospedador.

El plásmido a movilizar así como las cepas donadora y receptora estaban marcados adecuadamente bien con resistencias a antibióticos o bien con capacidades metabólicas específicas que permitieron la selección de los transconjugantes.

Se partió de cultivos de las cepas donadora y receptora del plásmido en cuestión así como, en su caso, de la cepa portadora del plásmido auxiliar, que habían sido cultivados a 30°C con agitación durante 12-16 horas. Aproximadamente 10^8 células de cada cultivo se recogieron por centrifugación a 12000g durante 5 minutos, y el sedimento se lavó con 1 ml de medio M8. Posteriormente las células se mezclaron y se recogieron juntas por centrifugación a 12000g durante 5 minutos. A continuación se suspendieron en 50 μ l de M8. 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, y se incubó a 30°C durante 16-20 horas. Transcurrido este tiempo el filtro con las células se colocó en un tubo con 5 ml de M8, y las células se suspendieron 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; éstos son receptores que habían adquirido el plásmido de los donadores. Las placas se incubaron a 30°C hasta la aparición de los transconjugantes. Las cepas donadora, receptora, y auxiliar cuando así se requería, se sometieron al mismo tratamiento y se sembraron en placas del mismo medio selectivo, sirviendo de esta manera como controles negativos de la conjugación.

Simultáneamente se hicieron siembras en los medios correspondientes para el crecimiento de las cepas donadora, receptora, y auxiliar en su caso, con objeto de realizar el conteo del número de bacterias totales iniciales presentes en el cruce.

8. MANIPULACION DE ADN

8.1. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION 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 de lo utilizado para 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 µg/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.

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

8.3. SEPARACIÓN DE MOLECULAS DE ADN MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GEL 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. La composición de las soluciones utilizadas se describe al final del apartado.

Cuando se trató de ADN de megaplásmidos se utilizaron geles de agarosa 0,7 % (p/v) en tampón TAE. En el resto de los casos los geles de agarosa se prepararon al 0,8 % (p/v) en TAE o TBE.

Los geles se sumergieron en el mismo tampón en que se preparó la 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. La separación se realizó por electroforesis horizontal sumergida a un voltaje de 5-10 V/cm.

Para la visualización del ADN los geles se tiñeron por inmersión en una solución de bromuro de etidio (1 $\mu\text{g/ml}$) durante 15 minutos y, después de lavar con agua, se expusieron a luz ultravioleta de 254 nm en un transiluminador.

El tamaño de las moléculas de ADN se estimó por interpolación en curvas del logaritmo del tamaño de cada fragmento frente a su movilidad relativa, usando como patrón los fragmentos de retricción del fago λ cortado con los enzimas *HindIII* ó *HindIII* y *EcoRI*. Los geles se fotografiaron en una película Polaroid 667.

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

Tampón TAE :

Tris-Base.....	4,84 g
Acido acético glacial	1,14 ml
EDTA- Na_2 0,5M, pH8	2ml
H_2O	hasta 1 l

Tampón TBE:

Tris-Base.....	10,8 g
Acido bórico.....	5,5 g
EDTA- Na_2	0,93 g
H_2O	hasta 1 l

Estos tampones se prepararon a partir de soluciones 10 veces concentradas y esterilizadas en un autoclave.

Tampón de carga:

Glicerol	30% (v/v)
Azul de bromofenol.....	0,3% (p/v)

Los marcadores de pesos moleculares se prepararon de la siguiente forma: se cortaron 80 μl de ADN de fago λ (250 $\mu\text{g/ml}$) con 1,5 unidades/ μg ADN de los enzimas *HindIII* y, en su caso, *EcoRI*. A la reacción se añadieron finalmente 80 μl de tampón de carga y se completó el volumen hasta 400 μl con TE, de forma que la concentración final de ADN en la solución fue de 50 $\mu\text{g/ml}$. Una vez digerido el ADN se calentó a 80°C para separar la región *cos* de λ .

8.4. RECUPERACION DE MOLECULAS DE ADN DE GELES DE AGAROSA

Una vez identificado el fragmento de ADN que se quería recuperar como se ha descrito en el apartado anterior, se cortó el trozo de agarosa del gel que contenía el fragmento con ayuda de un bisturí, y se extrajo del mismo. El ADN se recuperó utilizando el sistema comercial "GeneClean" (BIO101 Inc.) según las instrucciones indicadas por el fabricante.

8.5. LIGACION DE ADN

Para la ligación de moléculas de ADN se partió de fragmentos lineales obtenidos por digestión con enzimas de restricción en sitios compatibles para la ligación. Se partió, por un lado, de vector linearizado, y por otro de un fragmento de ADN obtenido por digestión con uno o varias enzimas de restricción y purificado como se ha descrito en los apartados 8.3. y 8.4. Estas moléculas se mezclaron en una proporción vector:inserto de 1:3. La reacción se llevó a cabo añadiendo 0,1 volúmenes de tampón de ligación y 1 unidad de ligasa del fago T4 en un volumen final 10-20 μ l completado con H₂O o TE. La mezcla de reacción se incubó a 8-12°C durante 24 horas.

La composición del tampón de ligación 10 veces concentrado es la siguiente:

Tris-HCl 1 M, pH 7,5.....	660 mM
MgCl ₂	50 mM
Ditiotreitol.....	10 mM
ATP	10 mM

La solución se conservó a -20°C.

8.6. SECUENCIACION DE ADN

La secuenciación de ADN bicatenario se realizó por el método de terminación de la extensión de un ADN cebador con didesoxinucleótidos (Sanger *et al.*, 1977). Como ADN cebador se utilizó por un lado el cebador inverso complementario a la secuencia adyacente al polilinker de pTZ19R. Por otro oligonucleótidos complementarios a *xylR*, cuyas secuencias y localización con respecto a la A del codón de iniciación se muestran

en la Tabla 3; éstos oligonucleótidos son complementarios a la cadena menos de *xylR*, excepto 3,5R y ww538, que lo son a la cadena más.

Tabla 3. Oligonucleótidos complementarios a la secuencia de *xylR* utilizados en este trabajo.

Nombre	Secuencia	Localización
1	5'-AGGCCTTGACGTTGCAAGGT-3'	-90 a -70
ww538	5'-ACGGATCTGGCTGCTAAGGTCTTGC-3'	+156 a +131
2	5'-GCTTCCGTCGCGAAATTAT-3'	+230 a +249
3	5'-CCGAGTGGATTGATTCCTT-3'	+467 a +486
3,5 R	5'-TTCCTTAGTTAGGTGAGCC-3'	+601 a +584
4	5'-AAAAGCGACCCGATCGTA-3'	+700 a +719
5	5'-GTGAACTGTGCGGCAATT-3'	+958 a +977
6	5'-ACCGCAACAAACGAGAAC-3'	+1207 a +1226
6,5	5'-ACTCTTGGCCTGTCTGAT-3'	+1384 a +1402
7	5'-GGTGATTCTTACCGAGA-3'	+1476 a +1495
8	5'-TAAGAAGCTTGACCCCAG-3'	+1746 a +1765

Los números en la localización de cada oligonucleótido representan las posiciones de las bases respecto al punto principal de iniciación de la transcripción.

8.6.1. Reacción de extensión

En la reacción de extensión se utilizó la ADN polimerasa del fago T7, y mezclas de desoxi/didesoxinucleótidos (dNTP/ddNTP). Para el marcaje radiactivo se utilizó [α - ^{35}S]dCTP. Con objeto de minimizar las compactaciones debido al alto contenido en pares G:C del ADN de *Pseudomonas*, las reacciones de extensión se incubaron a 40°C; en el caso de compactaciones fuertes se utilizó el análogo 7-deazaGTP en lugar de dGTP en la mezcla de marcaje. La composición de las soluciones utilizadas en este procedimiento se describe al final del apartado.

Se partió de una solución que contenía 2 μg de ADN plasmídico en un volumen de 18 μl de H_2O o TE. El ADN se desnaturalizó añadiendo 2 μl de NaOH 2 N e incubando a temperatura ambiente durante 5 minutos. La solución que contenía ahora las cadenas

sencillas se neutralizó con 2 µl de una solución de acetato amónico 2 M, pH 4,5 y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. A continuación se añadieron 75 µl de etanol absoluto, y las muestras se incubaron a -70°C durante 15 minutos. El ADN precipitado se recogió por centrifugación a 12000g durante 10 minutos; tras eliminar el sobrenadante, el ADN se secó al vacío y finalmente se resuspendió en 5 µl de H₂O.

Una vez desnaturalizado el ADN se procedió a la hibridación con el oligonucleótido adecuado, que se encontraba a una concentración de 1 µg/ml. A la solución de ADN se añadieron 3 µl de la solución con el oligonucleótido y 2 µl de tampón de hibridación. Las muestras se incubaron a 70°C durante 2 minutos y se dejaron enfriar al menos hasta alcanzar los 30°C.

Para la extensión del ADN cebador hibridado a las cadenas de ADN problema se añadieron 3 µl de la mezcla de marcaje, 1 µl de [α -³⁵S]dCTP (10 mCi/ml, 1000 Ci/mmol) y 2 µl de ADN polimerasa del fago T7 diluída 5 veces en su correspondiente tampón de dilución. La reacción de extensión se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Las reacciones de terminación para los 4 nucleótidos se llevaron a cabo añadiendo 4 µl de la mezcla de reacción a tubos independientes que contenían 2,5 µl cada uno de las correspondientes mezclas de terminación para A, C, G y T e incubando 5 minutos a 37°C. A continuación se añadieron 5 µl de solución de parada. Las muestras se transfirieron a un baño a 90°C durante 2 minutos con objeto de desnaturalizar las cadenas extendidas de diferente longitud, e inmediatamente se enfriaron en un baño de hielo o se guardaron a -20°C hasta su separación electroforética, con el fin de evitar renaturalizaciones.

Las soluciones empleadas en este proceso se conservaron a -20°C y su composición fue la siguiente:

Tampón de hibridación:

Tris-HCl pH 7,6	1 M
MgCl ₂	100 mM
Ditiotreitol.....	160 mM

Tampón de dilución de ADN polimerasa del fago T7:

Tris-HCl pH 7,5	20 mM
Ditiotreitol.....	5 mM
Seroalbúmina bovina	100 µg/ml
Glicerol.....	5% (v/v)

Mezcla de marcaje:

dATP	1,375 μ M
dGTP	1,375 μ M
dTTP.....	1,375 μ M
NaCl.....	333,5 mM

Mezclas de terminación de dNTP/ddNTP:

Mezcla "A":

dATP.....	93,5 μ M
ddATP	14 μ M
dCTP.....	840 μ M
dGTP.....	840 μ M
dTTP	840 μ M
Tris-HCl pH 7,6	40 mM
NaCl.....	50 mM

Mezcla "C":

dCTP	93,5 μ M
ddCTP	17 μ M
dATP	840 μ M
dGTP	840 μ M
dTTP	840 μ M
Tris-HCl pH 7,6	40 mM
NaCl	50 mM

Mezcla "G":

dGTP.....	93,5 μ M
ddGTP	14 μ M
dATP.....	840 μ M
dCTP.....	840 μ M
dTTP	840 μ M
Tris-HCl pH 7,6	40 mM
NaCl.....	50 mM

Mezcla "T":

dTTP	93,5 μ M
ddTTP.....	14 μ M
dATP	840 μ M
dCTP	840 μ M
dGTP	840 μ M
Tris-HCl pH 7,6.....	40 mM
NaCl	50 mM

Solución de parada:

Azul de bromofenol.....	0,3% (p/v)
Xilanilcianol FF	0,3% (p/v)
EDTA- Na_2 pH 7,5	10 mM
Formamida desionizada.....	97,5% (v/v)

8.6.2. Separación de las cadenas extendidas

La separación de las cadenas sencillas extendidas de diferente longitud se llevó a cabo mediante electroforesis en geles (40 x 20 cm) de poliacrilamida 6% (p/v). Los geles se prepararon a partir de una solución que tenía la siguiente composición:

Solución madre de acrilamida	11,25 ml
Urea	31,87 g
5xTBE	15 ml
H ₂ O	hasta 75 ml

La solución madre de acrilamida contenía acrilamida 38% (p/v) y bisacrilamida 2% (p/v); ésta solución se desionizó añadiendo amberlita 5% (p/v) y agitando durante 30 minutos. La amberlita se eliminó por filtración y la solución se almacenó a 4°C protegida de la luz para evitar reacciones de deaminación.

Las placas de cristal de la unidad de electroforesis, una de las cuales había sido tratada con dimetildiclorosilano para evitar la adhesión del gel, se montaron conforme a las instrucciones del fabricante.

Para sellar la parte inferior del gel, a 15 ml de la mezcla anterior se añadieron 250 µl de persulfato amónico 10% (p/v) y 75 µl de TEMED. Esta solución se vertió en un papel de filtro, y las placas unidas se colocaron sobre el mismo para permitir que la solución sellara por capilaridad la parte inferior de éstas. A los 60 ml restantes se añadieron 300 µl de persulfato amónico 10% (p/v) y 50 µl de TEMED. Esta mezcla se decantó entre los dos cristales evitando la formación de burbujas, y una vez polimerizado el gel y previamente a la carga de las muestras, éste se sometió a un campo eléctrico de 31 mA en tampón TBE para aumentar la temperatura del gel hasta aproximadamente 50°C.

Una vez alcanzada esta temperatura, y para separar las cadenas de diferente longitud, volúmenes de 4 µl de muestra se cargaron en el gel, y la electroforesis se llevó a cabo a una intensidad constante de 31 mA en tampón TBE.

Una vez finalizada la electroforesis el gel se desmontó y se transfirió a papel Whatman 3MM por adherencia, se fijó lavando con una solución de ácido acético glacial 10% (v/v) y se cubrió con papel de plástico transparente. El gel se secó al vacío en un secador de geles Bio-Rad a 80°C durante 90 minutos. Posteriormente se expuso a una película Hyperfilm MP (Amersham) durante al menos 24 horas en oscuridad y a

temperatura ambiente. Tras este período la película fotográfica se reveló utilizando métodos estándar.

8.7. PREPARACION DE ARN Y ANALISIS DE EXTENSION DE CEBADOR

La preparación de ARN y su análisis posterior fueron llevados a cabo en colaboración con Silvia Marqués en este grupo de investigación, según el método descrito en Maniatis *et al.*, (1982) con modificaciones (Marqués *et al.*, 1993). La composición de las soluciones utilizadas en este procedimiento se indica al final del apartado.

Para la preparación de ARN se partió de alícuotas de 2 ml de cultivo. Las células se recogieron por centrifugación en tubos enfriados previamente en nitrógeno líquido, y los sedimentos celulares se mantuvieron a -70°C hasta la extracción de ARN. Las células congeladas se resuspendieron en 0,3 ml de solución de lisis precalentada a 60°C , y la suspensión celular se incubó durante 10 minutos con agitación ocasional. A continuación se suplementó con 0,3 ml de fenol a 60°C saturado con Tris-HCl 0,06 M pH 8,2, se agitó durante 30 segundos y se incubó durante 5 minutos a 60°C . Posteriormente se añadieron 0,3 ml de solución ATE y 0,45 ml de una mezcla de cloroformo/alcohol isoamílico 24/1 (v/v). La suspensión se incubó durante 10 minutos a 60°C con agitación ocasional, se mantuvo en hielo durante 15 minutos y se centrifugó durante 15 minutos a 10000g. La fase acuosa se trató una vez con 0,6 ml de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico y dos veces con 0,6 ml de cloroformo. Después de la precipitación con etanol, las muestras se trataron durante 1 hora con ARNasa libre de ADNasa según Ausubel *et al.*, (1991). Posteriormente se añadieron 0,1 ml de tampón de proteinasa K con 75 μg de proteasa y se incubaron durante 1 hora a 37°C . A continuación se realizó otra extracción con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico, las muestras se llevaron a 0,3 M de acetato sódico, se precipitaron con etanol y se resuspendieron en H_2O estéril tratada con dietilpirocarbonato.

La extensión de oligonucleótidos para la determinación del punto de iniciación de la transcripción desde el promotor Pu se llevó a cabo de acuerdo con Marqués *et al.*, (1993). El extremo 5' del oligonucleótido 5'-GATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTG -3' complementario a la secuencia de *lacZ* se marcó con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ ($> 6000 \text{ mCi/mmol}$) y T4-polinucleótido quinasa; el nucleótido radiactivo sobrante se eliminó por filtración a través de una columna rellena con gel

Sephadex G-25. La mezcla de hibridación se componía de 2 µl de tampón de hibridación, 10⁵ cpm del oligonucleótido marcado y 20 µg de ARN total en un volumen de 10 µl, y la hibridación se realizó como se ha descrito en el apartado anterior para la secuenciación de ADN. La reacción de extensión se realizó añadiendo 40 µl de tampón de transcriptasa reversa, 1 mM de cada uno de los 4 desoxinucleótidos, y 0,5 U/µl de RNasin, un inhibidor de ARNasa suministrado por Promega (Referencia nº N2111) y 8 unidades de transcriptasa reversa del virus de la mieloblastosis de ave, e incubando durante 1 hora a 44°C. La reacción se paró por la adición de 5 µl de acetato sódico 3 M y 150 µl de etanol. El ADN-copia se separó, y se analizó por electroforesis en gel de poliacrilamida como se ha descrito en el apartado 8.8. La exposición de los geles y el revelado de las autorradiografías se realizaron siguiendo métodos estándar.

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

Solución de lisis:

isotiocianato	6,8 M
β-mercaptoetanol.....	1 % (v/v)
citrato sódico pH 7	0,017 M
N-laurilsarcosina.....	2% (p/v)

Solución ATE:

acetato sódico pH 5	0,1 M
EDTA-Na ₂	1 mM
Tris-HCl pH 4,8	10 mM

Tampón de proteinasa K:

EDTA-Na ₂	20 mM
Tris-HCl.....	100 mM
SDS	0,4% (p/v)

Tampón de hibridación:

NaCl.....	2 M
PIPES pH 7	50 mM

Tampón de transcriptasa reversa:

Tris-HCl.....	12,5 mM
ditiotreitól	12,5 mM

MgCl ₂	7,5 mM
actinomicina D.....	75 µg/ml

9. PREPARACION DE EXTRACTOS LIBRES DE CELULAS

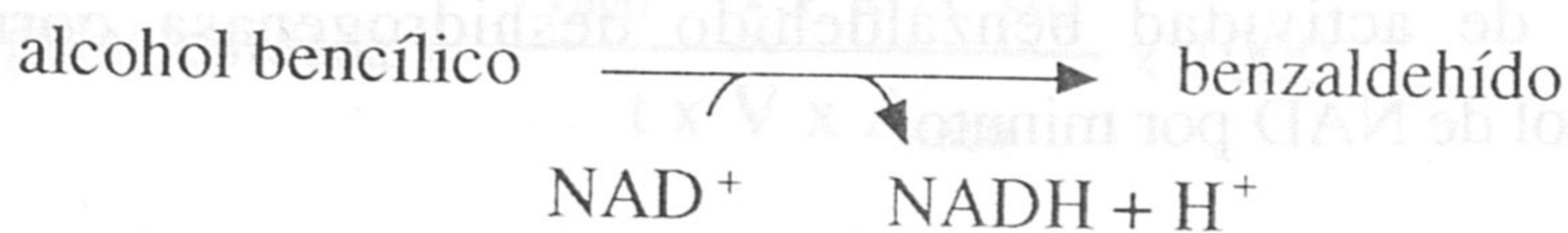
Se partió de cultivos de las cepas en LB con los correspondientes antibióticos incubados a 30°C con agitación durante 12-16 horas. Estos se diluyeron 100 veces en 100 ml de medio mínimo con glucosa como fuente de carbono y *m*-xileno suministrados en fase gaseosa como inductores de la expresión de los genes de TOL. Una vez alcanzada la fase exponencial de crecimiento ($A_{660} = 0,6-0,7$), las células se recogieron por centrifugación a 4000g durante 5 minutos, se lavaron con solución tampón fosfato 100 mM, pH 7, 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 50W, 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 12000g durante 2 minutos a 4°C. El sobrenadante constituyó el extracto libre de células que se conservó a 4°C.

10. MEDIDA DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS

10.1. ENSAYO DE ACTIVIDAD ALCOHOL BENCÍLICO DESHIDROGENASA

La estimación de la actividad alcohol bencílico deshidrogenasa se realizó espectrofotométricamente siguiendo la reducción de piridin-nucleótidos en extractos libres de células obtenidos por sonicación, según el método descrito por Worsey y Williams, (1975).

El enzima alcohol bencílico deshidrogenasa cataliza la siguiente reacción:



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

Solución de MATAB:

MATAB	20 mg
Tris-HCl 0,2 M, pH 8	10 ml

Tampón Z:

Na ₂ HPO ₄	60 mM
NaH ₂ PO ₄	40 mM
KCl	10 mM
MgSO ₄	1 mM
β-mercaptoetanol	50 mM

Esta solución es estable a 4°C.

Solución de ONPG:

ONPG	40 mg
Tampón fosfato 100 mM, pH 7	10 ml

Esta solución es estable a 4°C en oscuridad.

11. DETERMINACION CUANTITATIVA DE PROTEINAS

El contenido protéico de una muestra se determinó siguiendo el método de Markwell *et al.*, (1978). Este método consiste en una modificación del método de Lowry *et al.*, (1951) que al incluir SDS permite la determinación de proteínas en células enteras. El procedimiento básico consiste en una combinación de las reacciones de Biuret y de Folin en la que los grupos amino de los aminoácidos que reaccionan con Cu²⁺ en medio alcalino, reducen el reactivo de Folin, dando un producto de color azul. La composición de las soluciones utilizadas se indica al final del apartado.

Como muestras patrón se utilizaron soluciones seriadas de seroalbúmina bovina que contenían 0, 30, 70, 150, 225 y 300 µg/ml en un volumen final de 200 µl. De la muestra problema, bacterias enteras o extractos libres de células, se preparon distintas diluciones en un volumen final de 200 µl completado con H₂O. A cada muestra patrón o problema se añadieron 50 µl de NaOH 0,5 N y 0,75 ml de solución C. Los tubos se

incubaron a 30°C durante 15 minutos, y posteriormente se añadieron 75 µl de reactivo de Folin (Sigma Art. 9001) diluído en H₂O 1:1 (v/v). Las muestras se agitaron vigorosamente y se incubaron a 30°C durante 30 minutos. Una vez transcurrida la reacción se determinó la absorbancia a 750 nm. La concentración de proteína de las muestras problema se obtuvo por interpolación en curvas de A₇₅₀ frente a las concentraciones de la proteína patrón.

La solución C se preparó en el momento de su uso a partir de las soluciones A y B en proporción 100:1 (v/v).

Solución A:

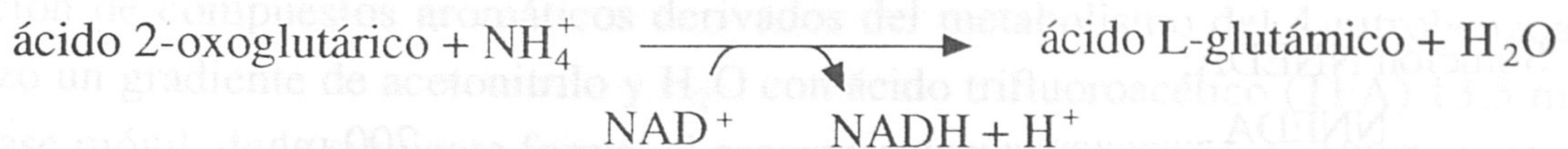
Na ₂ CO ₃	2% (p/v)
NaOH.....	0,4%(p/v)
Tartrato sódico	0,16% (p/v)
SDS	1% (p/v)

Solución B:

CuSO ₄	4% (p/v)
-------------------------	----------

12. DETERMINACION DE AMONIO

La medida de amonio se realizó utilizando el sistema para determinación de amonio suministrado por la casa comercial Boehringer Mannheim (referencia nº 1-112-732). Este sistema se basa en que en presencia de glutámico deshidrogenasa (GDH) y NADH el amonio reacciona con el ácido 2-oxoglutámico para rendir ácido L-glutámico, con la consiguiente reducción de NAD a NADH:



La cantidad de NAD que se reduce en esta reacción es estequiométricamente igual a la cantidad de amonio presente en la muestra. La cantidad de NADH se determinó espectrofotométricamente midiendo su absorbancia a 340 nm y utilizando un coeficiente de extinción molar para el NADH de 6,3 (l x mmol⁻¹ x cm⁻¹).

Para la determinación de amonio en los sobrenadantes de los cultivos celulares, las células se eliminaron por centrifugación a 12000g durante 5 minutos, y la concentración de amonio se determinó siguiendo las instrucciones del fabricante.

13. DETERMINACION DE NITRITO

La determinación de nitrito se hizo según el método de Snell y Snell, (1949) que consiste en una reacción de diazotación. El producto que se forma, 1-naftilamina, es un compuesto coloreado cuya concentración en el medio se determinó espectrofotométricamente. Las soluciones utilizadas en este método se describen al final del apartado.

A un volumen de sobrenadante de un cultivo libre de células se adicionaron volúmenes iguales de las soluciones de sulfanilamida y ácido N-naftil-etilen-diamino (NNEDA). Las muestras se agitaron y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. Posteriormente se determinó la absorbancia de éstas a 540 nm.

Como patrón se utilizaron soluciones seriadas de nitrito sódico 5 mM, y la concentración de nitrito de las muestras problema se obtuvo por interpolación gráfica en curvas de A_{540} frente a las concentraciones de nitrito de la curva patrón.

Las soluciones empleadas en este sistema son estables en la oscuridad y sus composiciones fueron las siguientes:

Solución de sulfanilamida:

Sulfanilamida.....	10 g
HCl 12 N	200 ml
H ₂ O.....	hasta 1 l

Solución NNEDA:

NNEDA.....	200 mg
H ₂ O.....	hasta 1 l

14. PREPARACION DE EXTRACTOS PARA EL ANALISIS POR ESPECTROMETRIA DE MASAS Y RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR DE PROTONES

Los análisis de espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear del protón (RMN- ^1H) se realizaron en colaboración con Ali Haidour en este grupo de investigación, utilizando los equipos de los Servicios Técnicos de la Universidad de Granada.

La preparación de los extractos de los cultivos para la realización de estos análisis se llevó a cabo de la siguiente forma: inicialmente se realizó una extracción con acetato de etilo para eliminar las impurezas; a continuación se llevó a cabo una acidulación de la fase acuosa con HCl hasta alcanzar un pH de 2 con objeto de recuperar los ácidos en la fase orgánica, seguida de una nueva extracción con acetato de etilo. El extracto se lavó con H_2O , y se secó sobre SO_4Na_2 anhidro. Finalmente se evaporó al vacío y se resuspendió en un volumen adecuado de acetona o dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d_6) para su análisis por espectrometría de masas y RMN- ^1H , respectivamente.

15. SEPARACION DE COMPUESTOS AROMATICOS MEDIANTE CROMATOLOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION

El equipo utilizado para la separación de compuestos aromáticos fue un cromatógrafo de líquidos de alta presión Hewlett-Packard modelo 1050A, equipado con un detector de luz visible y ultravioleta, una columna Hypersil C18 ODS de 10 x 0,46 cm, y un integrador 3394A.

RESULTADOS

Los compuestos aromáticos se detectaron a 254 nm. En el caso de la detección de alcoholes bencílicos y benzaldehídos las muestras se cromatografiaron utilizando como fase móvil una mezcla metanol: H_2O (60:40) (v/v) a un flujo de 0,5 ml por minuto. Para la separación de compuestos aromáticos derivados del metabolismo del 4-nitrobenzoato se utilizó un gradiente de acetonitrilo y H_2O con ácido trifluoroacético (TFA) 13,5 mM como fase móvil, de la siguiente forma: el programa de elución partió de 100% de H_2O -TFA) y 0% de acetonitrilo y cambió hasta 40% de H_2O -TFA) y 60% de acetonitrilo en un tiempo de 6 minutos. El flujo fue de 1,5 ml por minuto.

Como patrones se utilizaron soluciones de concentración conocida de los compuestos aromáticos, cuya pureza era mayor del 98 % (p/v).

LOS COMUESTOS NITROAROMATICOS COMO SUSTRATOS DE LA RUTA "UPPER" DEL PLASMIDO TOL

Una de las rutas de la ruta "upper" del plásmido TOL p_WW₁ son capaces de utilizar como sustrato un amplio espectro de compuestos aromáticos, como toluenos y xilenos. La capacidad de oxidación de estos compuestos por los enzimas que componen esta ruta, como la tolueno monooxigenasa, alcohol benéfico deshidrogenasa y benzaldehído oxidasa, resulta en la biotransformación de los toluenos en sus correspondientes alcohol benéficos (Abril *et al.*, 1989; Kunz y Chapman, 1981; Worsey y Williams, 1975). En este apartado se presenta el estudio realizado sobre el espectro de sustratos que los enzimas de la ruta "upper" del plásmido TOL son capaces de utilizar como sustratos.

LOS NITROTOLUENOS COMO SUSTRATOS DE LA TOLUENO MONOOXIGENASA

La tolueno monooxigenasa, el primer enzima de la ruta degradativa de toluenos y xilenos del plásmido TOL, es un sistema multienzimático codificado por los genes *xylMA* (Kawano *et al.*, 1986a) que cataliza la oxidación de la tolueno a alcohol benéfico correspondiente. Este enzima no sólo es capaz de oxidar tolueno hasta alcohol benéfico, sino que también oxida éste a benzaldehído (Kawano *et al.*, 1986a). Estudios realizados sobre la especificidad de sustratos de la tolueno monooxigenasa habían mostrado que este enzima es capaz de oxidar tolueno, *m*- y *p*-xileno (Worsey y Williams, 1975), 3- etiltolueno, 1,2,4-trimetilbenceno (Kunz y Chapman, 1981), 3- y 4-clorotolueno, mientras que *o*-xileno y 4-etiltolueno no son sustratos del enzima (Abril *et al.*, 1989).

El estudio del espectro de nitrotoluenos que podían actuar como sustratos de la tolueno monooxigenasa fue llevado a cabo en sistemas "in vivo", mediante el seguimiento de la acumulación de los productos de oxidación del nitroareno en el medio de cultivo. Los estudios se realizaron en *E. coli* y *P. putida* portando el plásmido

I. COMPUESTOS NITROAROMATICOS COMO SUSTRATOS DE LA RUTA "UPPER" DEL PLASMIDO TOL

Los enzimas de la ruta "upper" del plásmido TOL pWW0 son capaces de utilizar como sustratos un amplio espectro de compuestos aromáticos, como toluenos y xilenos. La oxidación secuencial de estos compuestos por los enzimas que componen esta ruta, a saber, tolueno monooxigenasa, alcohol bencílico deshidrogenasa y benzaldehído deshidrogenasa, resulta en la biotransformación de los toluenos en sus correspondientes ácidos benzoicos (Abril *et al.*, 1989; Kunz y Chapman, 1981; Worsey y Williams, 1975).

En este apartado se presenta el estudio realizado sobre el espectro de nitrotoluenos que los enzimas de la ruta "upper" del plásmido TOL son capaces de utilizar como sustratos.

1. NITROTOLUENOS COMO SUSTRATOS DE LA TOLUENO MONOOXIGENASA

La tolueno monooxigenasa, el primer enzima de la ruta degradativa de toluenos y xilenos del plásmido TOL, es un sistema multienzimático codificado por los genes *xy/MA* (Harayama *et al.*, 1986a) que cataliza la oxidación de la cadena alquílica del sustrato para formar el alcohol bencílico correspondiente. Este enzima no sólo es capaz de oxidar tolueno hasta alcohol bencílico, sino que también oxida éste a benzaldehído (Harayama *et al.*, 1986a). Estudios realizados sobre la especificidad de sustratos de la tolueno monooxigenasa habían mostrado que este enzima es capaz de oxidar tolueno, *m*- y *p*-xileno (Worsey y Williams, 1975), 3- etiltolueno, 1,2,4-trimetilbenceno (Kunz y Chapman, 1981), 3- y 4-clorotolueno, mientras que *o*-xileno y 4-etiltolueno no son sustratos del enzima (Abril *et al.*, 1989).

El estudio del espectro de nitrotoluenos que podían actuar como sustratos de la tolueno monooxigenasa fue llevado a cabo en sistemas "*in vivo*", mediante el seguimiento de la acumulación de los productos de oxidación del nitroareno en el medio de cultivo. Los estudios se realizaron en *E. coli* y *P. putida* portando el plásmido

pWA21 (Figura 19) un vector de expresión en el que los genes *xylMA* se expresan a partir del promotor de *lac*.

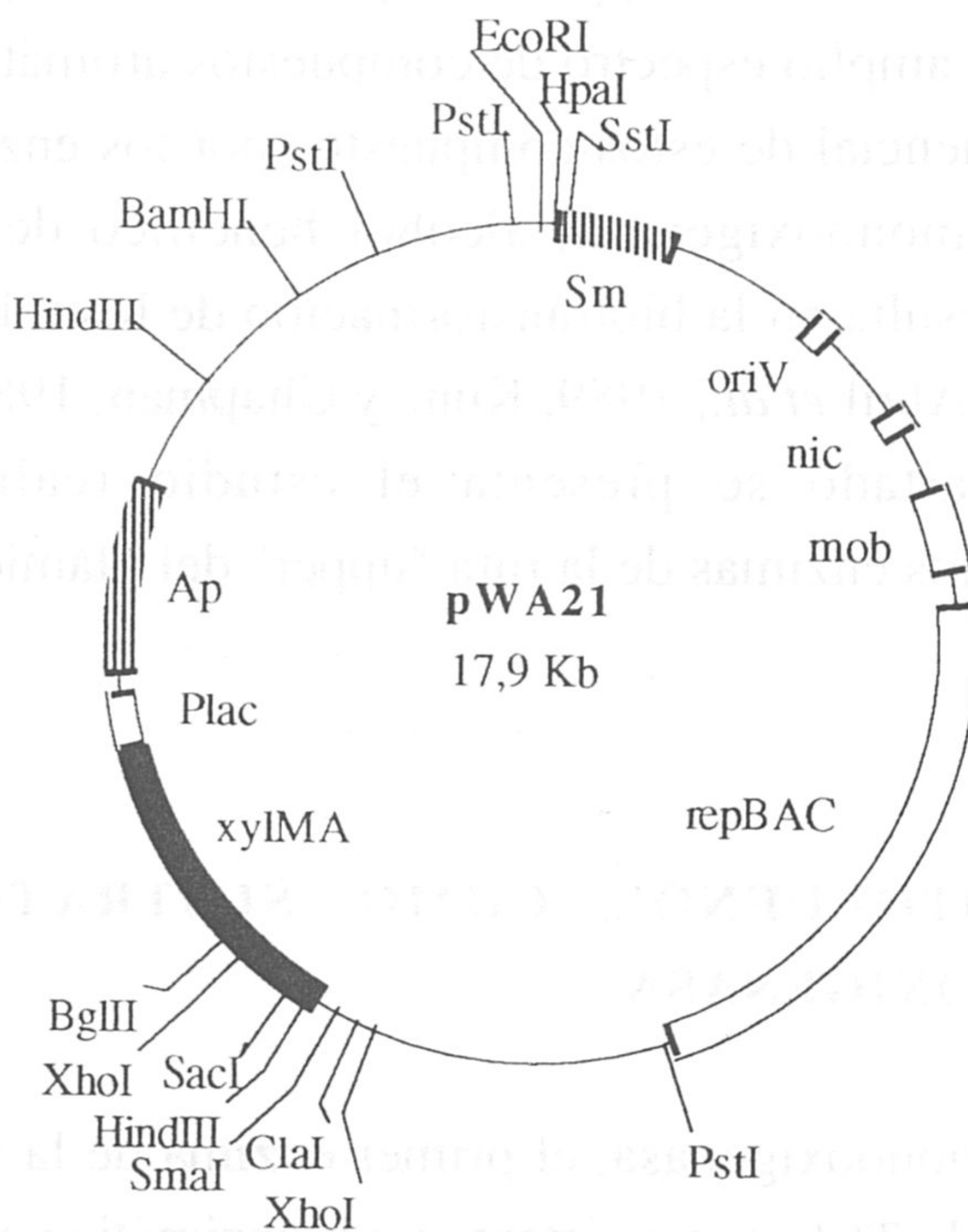


Figura 19. Esquema del plásmido pWA21. Este plásmido es un derivado del vector de amplio espectro de huésped pKT231 (Babdasarian *et al.*, 1981), y porta los genes *xylMA* clonados bajo el control del promotor *Plac*. Se muestran los sitios de restricción para los enzimas que se indican, así como la localización del origen de replicación, la de los genes de resistencia a antibióticos, y la de los genes implicados en la movilización y replicación del plásmido.

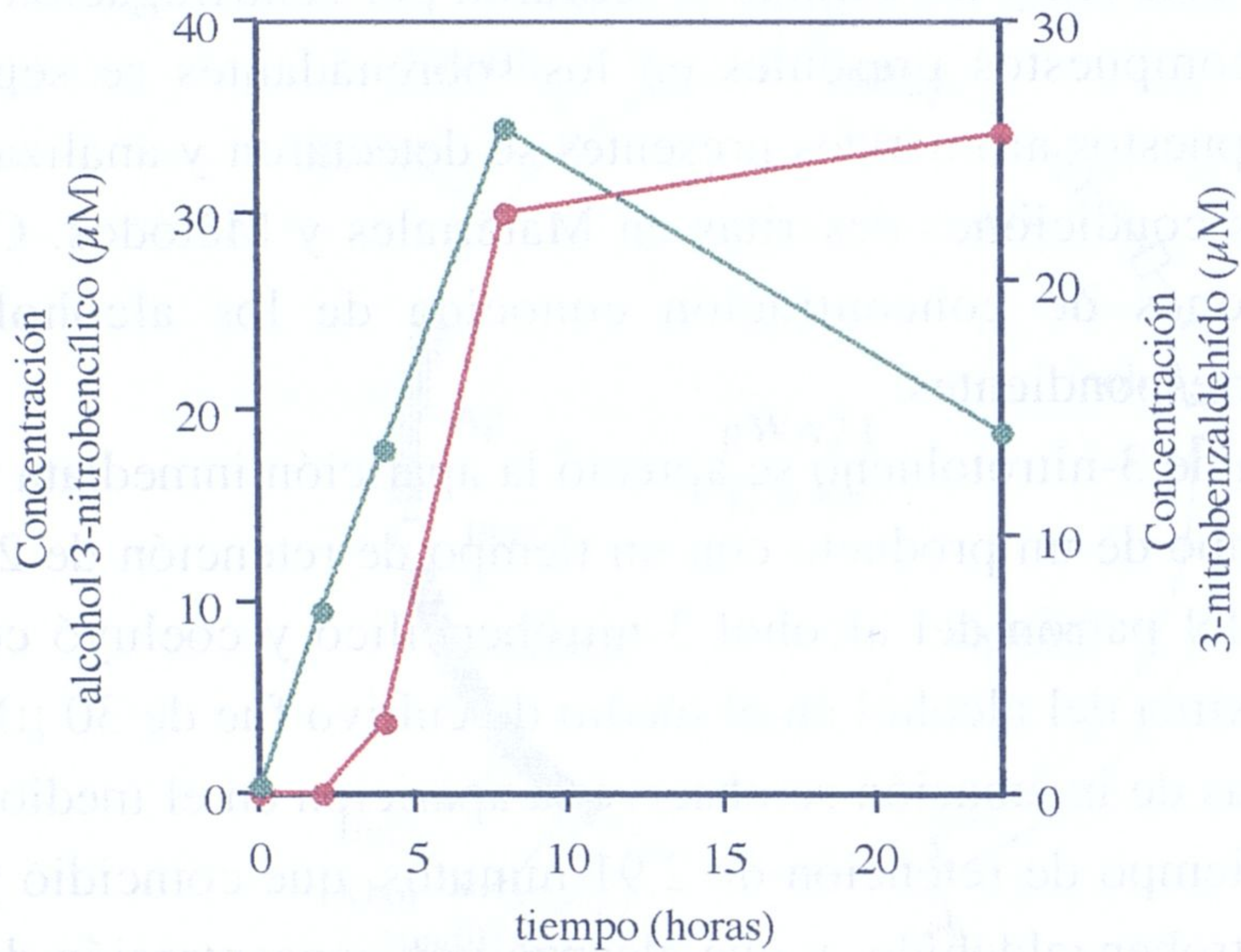
1.1. TRANSFORMACION DE NITROTOLUENOS POR LA TOLUENO MONOOXIGENASA EN *ESCHERICHIA COLI*

La cepa *E. coli* JM101 (pWA21) se cultivó en medio M9 con glucosa como fuente de carbono y los correspondientes antibióticos, y se incubó a 30°C en agitación durante 12-16 horas. El cultivo se diluyó 20 veces en el mismo medio fresco suplementado con IPTG con objeto de evitar la represión del promotor *Plac* por el producto del gen *lacI*, y se incubaron a 30°C en agitación en presencia de vapores de 2-nitrotolueno y 3-nitrotolueno, y de 4-nitrotolueno y 3,4-dinitrotolueno suministrados al cultivo como cristales para alcanzar su saturación. A lo largo del tiempo se tomaron muestras de estos cultivos y las células se retiraron por centrifugación a 5000 g durante 5 minutos. Los compuestos presentes en los sobrenadantes se separaron mediante HPLC, y los compuestos aromáticos presentes se detectaron y analizaron mediante luz ultravioleta en las condiciones descritas en Materiales y Métodos. Como patrones se utilizaron soluciones de concentración conocida de los alcoholes bencílicos y benzaldehídos correspondientes.

En presencia de 3-nitrotolueno se apreció la aparición inmediata y la acumulación a lo largo del tiempo de un producto con un tiempo de retención de 2,72 minutos, que coincidió con el del patrón del alcohol 3-nitrobencílico y coeluyó con el mismo. La concentración máxima del alcohol en el medio de cultivo fue de 30 μM (Figura 20). A partir de las 2 horas de incubación se observó la aparición en el medio de cultivo de un producto con un tiempo de retención de 2,91 minutos, que coincidió y coeluyó con el del patrón de 3-nitrobenzaldehído, y que alcanzó una concentración de 25 μM tras 7,5 horas de incubación. En la Figura 20 se representa la acumulación en el tiempo de estos productos.

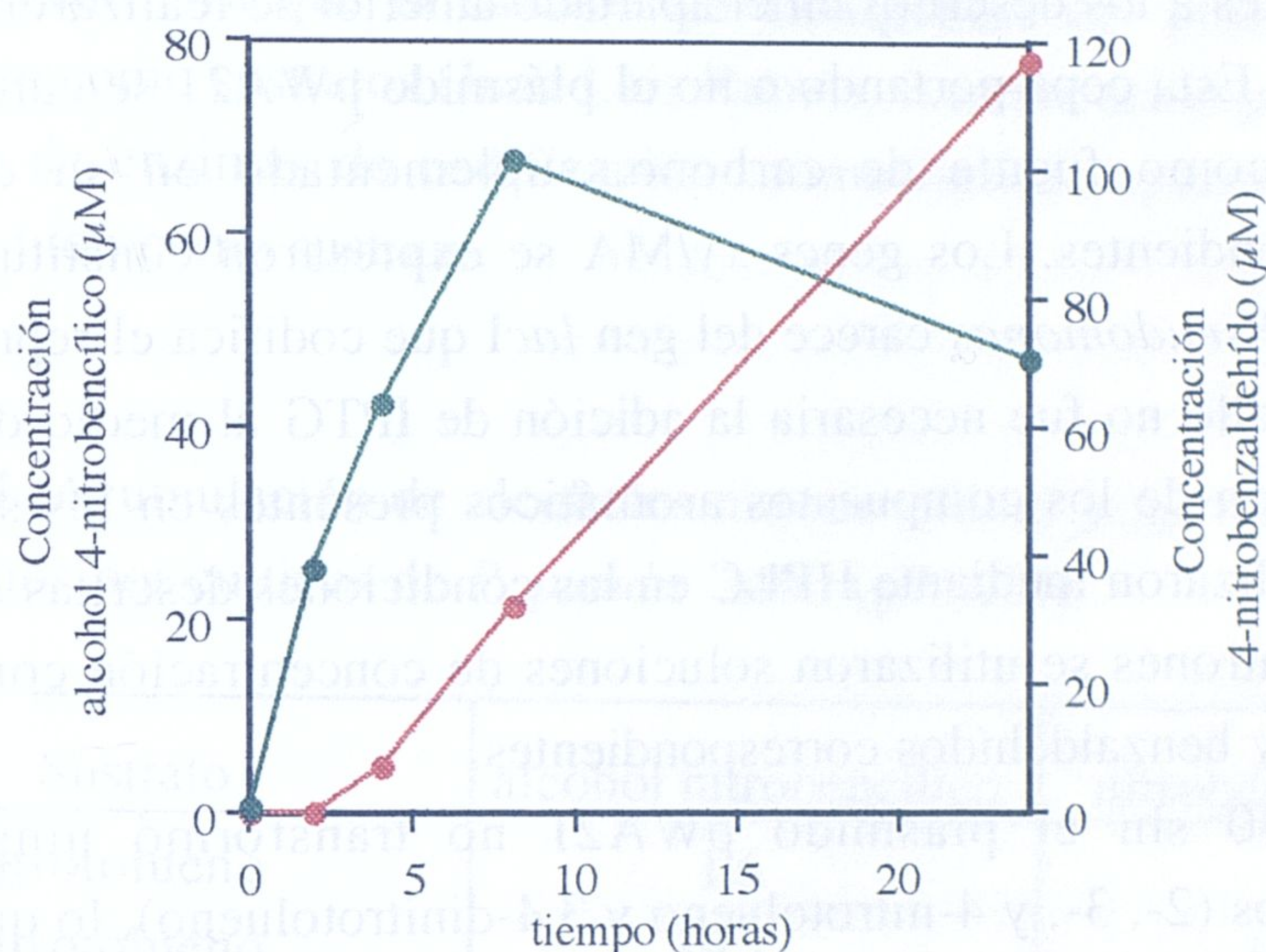
De igual forma los cultivos de *E. coli* JM101 (pWA21) incubados en presencia de 4-nitrotolueno acumularon un producto con un tiempo de retención de 2,77 minutos, que coincidió y coeluyó con el del patrón del alcohol 4-nitrobencílico. El compuesto se acumuló hasta alcanzar una concentración de 60 μM , como se muestra en la Figura 21. Con un retraso de 2-3 horas respecto a la aparición del alcohol 4-nitrobencílico se detectó la acumulación progresiva en el medio de un producto con un tiempo de retención de 2,96 minutos, el cual coeluyó con el del patrón de 4-nitrobenzaldehído y alcanzó una concentración en el medio de 120 μM en un tiempo de 24 horas de iniciada la experiencia. En la Figura 21 se representa la acumulación en el tiempo de estos productos.

Figura 20. Transformación de 3-nitrotolueno por *E. coli* JM101 (pWA21).



E. coli JM101 (pWA21) se incubó a 30°C en agitación en medio M9 con glucosa suplementado con IPTG en presencia de vapores de 3-nitrotolueno. La acumulación de alcohol 3-nitrobenzílico (●) y de 3-nitrobenzaldehído (●) se determinó a los tiempos indicados, tras analizar el sobrenadante del cultivo mediante HPLC como se describe en Materiales y Métodos. Las concentraciones de alcohol y aldehído se estimaron por comparación con soluciones patrón de los mismos de concentración conocida.

Figura 21. Transformación de 4-nitrotolueno por *E. coli* JM101 (pWA21).



E. coli JM101 (pWA21) se incubó a 30°C en agitación en medio M9 con glucosa suplementado con IPTG en presencia de 4-nitrotolueno suministrado en exceso como cristales para alcanzar su saturación. La acumulación de alcohol 4-nitrobencílico (●) y de 4-nitrobenzaldehído (●) se determinó a los tiempos indicados, tras analizar los sobrenadantes del cultivo mediante HPLC como se describe en Materiales y Métodos. Las concentraciones de alcohol y aldehído se estimaron por comparación con soluciones patrón de los mismos de concentración conocida.

La aparición de productos con tiempos de retención correspondientes a los alcoholes 2-nitrobencílico y 3,4-dinitrobencílico en los cromatogramas procedentes de los cultivos incubados en presencia de 2-nitrotolueno y 3,4-dinitrotolueno se observó en cantidades inferiores a 5 μM , sugiriendo que estos compuestos no eran sustratos del enzima.

1.2. TRANSFORMACION DE NITROTOLUENOS POR LA TOLUENO MONOOXIGENASA EN *PSEUDOMONAS PUTIDA*

Ensayos similares a los descritos en el apartado anterior se realizaron utilizando la cepa *P. putida* 2440. Esta cepa portando o no el plásmido pWA21 se cultivó en medio M9 con benzoato como fuente de carbono, suplementado en su caso con los antibióticos correspondientes. Los genes *xylMA* se expresaron constitutivamente en esta bacteria, ya que *Pseudomonas* carece del gen *lacI* que codifica el represor LacI del promotor *Plac*; por ello no fue necesaria la adición de IPTG al medio de cultivo. La separación y detección de los compuestos aromáticos presentes en los sobrenadantes de los cultivos se realizaron mediante HPLC en las condiciones descritas en Materiales y Métodos. Como patrones se utilizaron soluciones de concentración conocida de los alcoholes bencílicos y benzaldehídos correspondientes.

P. putida 2440 sin el plásmido pWA21 no transformó ninguno de los nitrotoluenos probados (2-, 3-, y 4-nitrotolueno y 3,4-dinitrotolueno), lo que indicó que la cepa carecía de actividad contra estos nitroarenos. En contraste, los cultivos de *P. putida* 2440 (pWA21) incubados en presencia de 3- y 4-nitrotolueno acumularon en el medio productos que coeluyeron con los de los patrones de los alcoholes bencílicos correspondientes hasta alcanzar concentraciones de 20 y 50 μM respectivamente tras 24 horas de incubación, mientras que se detectaron concentraciones del orden de 2 μM de los alcoholes 2-nitrobencílico y 3,4-dinitrobencílico. En la Tabla 4 se recogen los resultados obtenidos.

Tanto en presencia de 3-nitrotolueno como de 4-nitrotolueno se acumularon en el medio de cultivo compuestos que coeluyeron con los patrones de 3-nitrobenzaldehído y 4-nitrobenzaldehído respectivamente. En la Tabla 4 se recogen las concentraciones de estos compuestos tras 24 horas de incubación en presencia del nitroareno correspondiente.

De igual forma se acumularon compuestos cuyos tiempos de retención coincidieron con los de los correspondientes nitrobenzaldehídos. Sin embargo, los

niveles de 3-nitrobenzaldehído y 4-nitrobenzaldehído en los cultivos de 2440 (pAW21) fueron 1,5 y 6 veces inferiores a los determinados en cultivos de JM101 (pWA21) respectivamente (Tabla 4). Esto sugirió que ciertas enzimas de codificación cromosómica de esta cepa de *Pseudomonas* podrían estar retirando los nitrobenzaldehídos. Para comprobar esta hipótesis se ensayó para el caso de los nitrosustituídos en posición 4 del anillo, de forma que se estudió si la cepa 2440 sin pWA21 era capaz de oxidar el 4-nitrobenzaldehído en las mismas condiciones que los estudios de bioconversión de nitrotoluenos. En presencia de 4-nitrobenzaldehído 1 mM se apreció la desaparición de este compuesto, y la acumulación en el medio de un producto con un tiempo de retención de 2,02 minutos que probablemente correspondía al 4-nitrobenzoato, ya que la catecol 2,3-dioxigenasa del plásmido TOL no utiliza nitrobenzoatos como sustratos (Juan Luis Ramos, comunicación personal). Esto sugería la existencia de enzimas de codificación cromosómica capaces de utilizar como 4-nitrobenzaldehído como sustrato.

Tabla 4. Acumulación de alcoholes nitrobencílicos y nitrobenzaldehídos a partir de nitrotoluenos por cultivos de *P. putida* 2440 (pWA21).

Sustrato	alcohol nitrobencílico	nitrobenzaldehído
2-nitrotolueno	1,6	-
3-nitrotolueno	19,2	16,3
4-nitrotolueno	51,2	19,5
3,4-dinitrotolueno	2,8	-

Cultivos de *P. putida* 2440 (pWA21) se incubaron a 30°C en agitación en medio M9 con benzoato en presencia de los nitrotoluenos indicados. Los sobrenadantes se analizaron mediante HPLC como se describe en Materiales y Métodos. Los valores de concentración (μM) dados corresponden a acumulación de los productos a las 24 horas de incubación, y se estimaron por comparación con patrones de concentración conocida de los alcoholes nitrobencílicos y nitrobenzaldehídos correspondientes. "-" significa no detectado.

2. ALCOHOLES NITROBENCILICOS COMO SUSTRATOS DE LA ALCOHOL BENCILICO DESHIDROGENASA DE TOL

La estimación de la actividad alcohol bencílico deshidrogenasa para alcoholes nitrobencílicos se ensayó en extractos libres de células de *Pseudomonas putida* 2440 (pWW0) cultivadas en condiciones de inducción. Los extractos libres de células se

prepararon a partir de cultivos en medio mínimo con glucosa de *P. putida* 2440 con y sin el plásmido pWW0 que habían sido incubados a 30°C en agitación durante 12-16 horas; las células se cultivaron tanto en condiciones de inducción (presencia de *m*-xileno) como de no inducción (ausencia de *m*-xileno) de las rutas de TOL.

En la Tabla 5 se recogen los resultados obtenidos. Todos los alcoholes bencílicos ensayados fueron oxidados a baja velocidad, entre 8,5 y 21,5 nmoles/mg proteína y minuto, por extractos de *P. putida* carente del plásmido TOL cultivadas con y sin *m*-xileno. Estos niveles fueron similares cuando las células llevaron el plásmido TOL pero se cultivaron en ausencia del inductor. En cambio las células de *P. putida* (pWW0) cultivadas con *m*-xileno presentaron 20 veces más actividad alcohol bencílico deshidrogenasa para el alcohol bencílico que los extractos en ausencia de *m*-xileno, y del orden de 6 veces superior para los alcoholes 3-nitrobencílico y 4-nitrobencílico; en cambio no presentaron incremento de la actividad basal con alcohol 2-nitrobencílico y alcohol 3,4-dinitrobencílico. Estos resultados indicaron que el enzima alcohol bencílico deshidrogenasa del plásmido TOL era capaz de utilizar los alcoholes 3-nitrobencílico y 4-nitrobencílico como sustratos, mientras que los alcoholes 2-nitrobencílico y 3,4-dinitrobencílico no eran oxidados por el enzima. Las actividades relativas de alcohol bencílico deshidrogenasa para los alcoholes 3-nitrobencílico y 4-nitrobencílico respecto al alcohol bencílico fueron del 25% y del 45% respectivamente.

Tabla 5. Actividad alcohol bencílico deshidrogenasa para alcoholes nitrobencílicos en *P. putida* 2440 sin y con el plásmido pWW0.

sustrato	2440		2440 (pWW0)	
	- <i>m</i> -xileno	+ <i>m</i> -xileno	- <i>m</i> -xileno	+ <i>m</i> -xileno
alcohol bencílico	10,8	10,7	20,7	440,9
alcohol 2-nitrobencílico	8,5	9,0	11,6	16,3
alcohol 3-nitrobencílico	21,5	18,3	21,9	196,6
alcohol 4-nitrobencílico	14,5	15,4	21,2	117,9
alcohol 3,4-dinitrobencílico	12,2	12,4	14,6	13,5

Las células se cultivaron a 30°C en agitación en M9 con glucosa en ausencia y presencia de *m*-xileno durante 12-16 horas, y la actividad alcohol bencílico deshidrogenasa se determinó en extractos libres de células preparados como se ha descrito en Materiales y Métodos. La concentración del alcohol bencílico y nitrobencílicos en el ensayo fue 2,5 mM. La actividad específica se expresa en mU por mg de proteína, 1 mU corresponde a 1 nmol de producto formado por minuto. Los valores dados son media de 2 a 4 determinaciones independientes, y las desviaciones estándar fueron inferiores al 20%.

3. NITROBENZALDEHIDOS COMO SUSTRATOS DE LA BENZALDEHIDO DESHIDROGENASA DE TOL

Para estimar la actividad benzaldehído deshidrogenasa para nitrobenzaldehídos se utilizaron extractos libres de células de *Pseudomonas putida* 2440 (pWW0) bajo condiciones de inducción. Los extractos libres de células se prepararon a partir de cultivos en medio mínimo con glucosa de *P putida* 2440 con y sin el plásmido pWW0 que habían sido incubados a 30°C en agitación durante 12-16 horas; las células se cultivaron tanto en condiciones de inducción (presencia de *m*-xileno) como de no inducción (ausencia de *m*-xileno) de las rutas de TOL.

Como se observa en la Tabla 6, los extractos celulares de *P. putida* carente del plásmido TOL que habían sido cultivadas con y sin *m*-xileno eran capaces de oxidar benzaldehído, 3-nitrobenzaldehído y 4-nitrobenzaldehído con actividades del orden de 25 nmoles/mg proteína y minuto. Las células de *P. putida* (pWW0) cultivadas con *m*-xileno presentaron del orden de 6 a 10 veces más actividad benzaldehído deshidrogenasa para los 3 sustratos del enzima que los extractos en ausencia de efector. Es de señalar que en el caso los sustratos sustituidos con grupos nitro la actividad fue 2 veces superior a la actividad con benzaldehído. No se detectó actividad benzaldehído deshidrogenasa para el alcohol 2,6-dinitrobenzílico.

Tabla 6. Actividad benzaldehído deshidrogenasa para nitrobenzaldehídos en *Pseudomonas putida* 2440 sin y con el plásmido pWW0.

sustrato	2440		2440 (pWW0)	
	- <i>m</i> -xileno	+ <i>m</i> -xileno	- <i>m</i> -xileno	+ <i>m</i> -xileno
benzaldehído	23	25	16	134
2-nitrobenzaldehído	0	0	0	0
3-nitrobenzaldehído	25	27	22	228
4-nitrobenzaldehído	22	26	32	297
2,6-dinitrobenzaldehído	0	0	0	0

Las células se cultivaron a 30°C en agitación en M9 con glucosa en ausencia y presencia de *m*-xileno durante 12-16 horas, y la actividad benzaldehído deshidrogenasa se determinó en extractos libres de células como se ha descrito en Materiales y Métodos. La concentración de benzaldehído y de los nitrobenzaldehídos en el ensayo fue 0,3 mM. La actividad específica se expresa en mU por mg de proteína. 1 mU corresponde a 1 nmol de producto formado por minuto. Los valores dados son media de 2 a 4 determinaciones independientes, y las desviaciones estándar fueron inferiores al 20%.

II. COMPUESTOS NITROAROMATICOS COMO INDUCTORES DE LAS RUTAS CATABOLICAS DEL PLASMIDO TOL

La activación de la proteína XylR mediada por la unión de una amplia gama de compuestos aromáticos que actúan como efectores (Abril *et al.*, 1989), es el primer paso en la inducción de la transcripción de los enzimas degradativos de las rutas catabólicas del plásmido TOL pWW0 (Ramos *et al.*, 1987), según el modelo descrito en la Introducción de este trabajo. La expresión desde los promotores Pu y Ps inducida por la proteína XylR activa, requiere el factor σ^{54} de la ARN-polimerasa, también llamado NtrA y RpoN (Dixon, 1986; Köhler *et al.*, 1989; Ramos *et al.*, 1987), y de la presencia de secuencias activadoras (UAS) para la unión del regulador, que se localizan entre -120 y -180 pb en 5' con respecto al punto de iniciación de la transcripción (Abril *et al.*, 1991; de Lorenzo *et al.*, 1991; Inouye *et al.*, 1990). En el caso de Pu se ha puesto de manifiesto el requerimiento de la proteína IHF para la máxima expresión desde este promotor (Abril *et al.*, 1991; de Lorenzo *et al.*, 1991).

La existencia de un bloqueo a nivel del reconocimiento como efectores de los nitrotoluenos por el regulador XylR podría ser una de las razones para la resistencia a la degradación de estos compuestos por *Pseudomonas putida* 2440 (pWW0). De este modo, el objetivo inicial fue determinar si los compuestos nitroaromáticos se comportaban como efectores de la proteína XylR. En caso de que no fuera así, el bloqueo a nivel de la expresión de los genes de esta ruta degradativa podría salvarse mediante el aislamiento de mutantes de XylR capaces de estimular la expresión desde Pu, bien constitutivamente o bien en presencia de nitroarenos. Por otro lado, el estudio del efecto de estos mutantes en la activación de los promotores Pu, Ps y Pr podría ayudar a esclarecer ciertos aspectos del mecanismo de activación de la transcripción desde estos promotores por el regulador XylR.

La transcripción desde los promotores Pu, Ps y Pr se estimó en todos los casos como actividad β -galactosidasa en cepas de *Escherichia coli* portadoras de las fusiones correspondientes de estos promotores al gen *lacZ* carente de su promotor natural. Las fusiones Pu::*lacZ* que se han utilizado han sido las codificadas en los plásmidos

pRD579 y pERD401, cuyos esquemas se muestran en las Figuras 22 y 23. Las fusiones $P_s::lacZ$ y $P_r::lacZ$ utilizadas han sido las codificadas en los plásmidos pAH100 y pAH120, que se representan en las Figuras 24 y 25 respectivamente. El gen *xyIR* se aportó en *trans* en el plásmido pTS174, cuyo esquema se representa en la Figura 26. Las condiciones de los ensayos se especifican en cada caso, y las determinaciones de la actividad β -galactosidasa se realizaron según el procedimiento descrito en Materiales y Métodos.

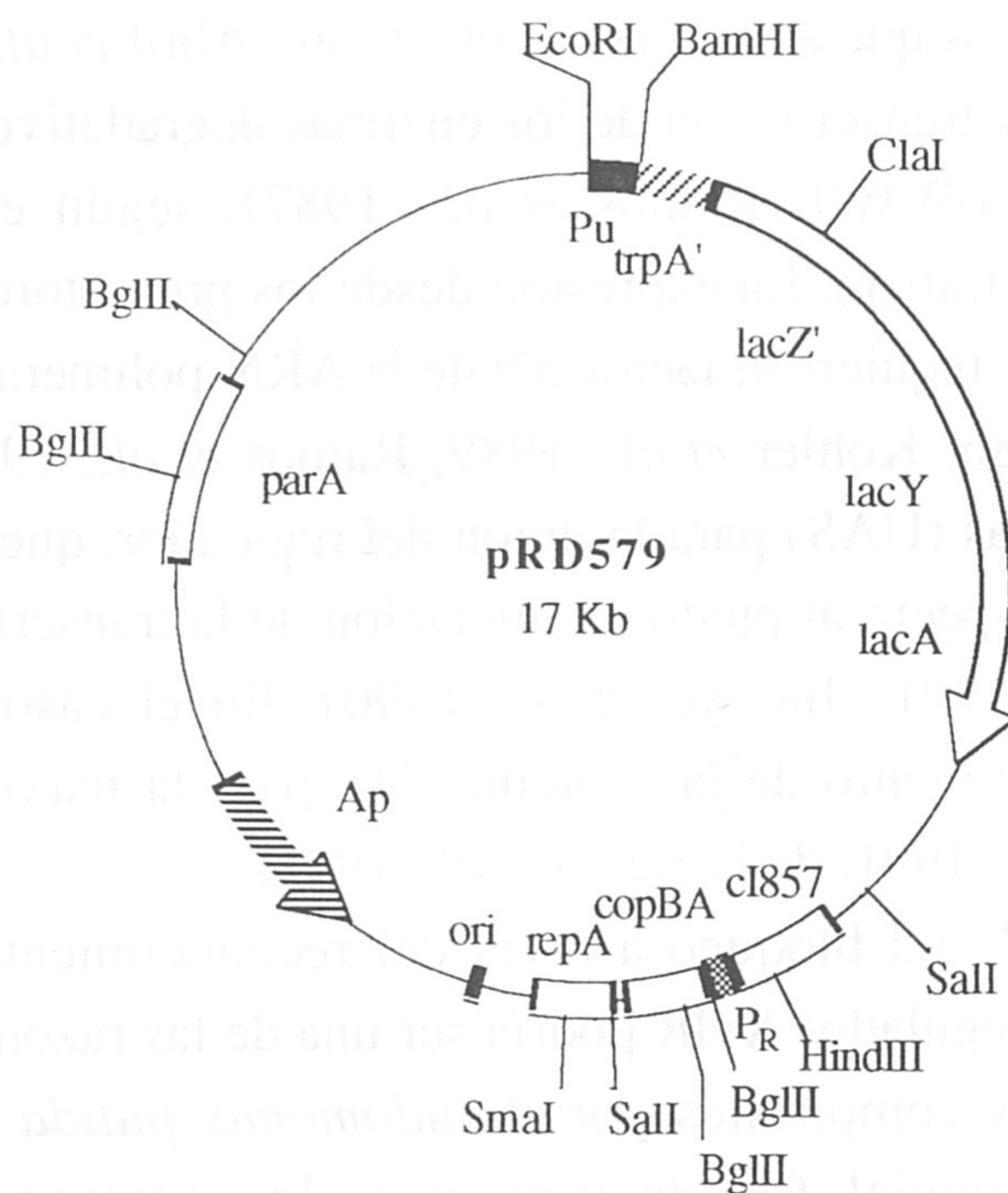


Figura 22. Esquema del plásmido pRD579. Este plásmido es un derivado del vector de fusión transcripcional pJEL126 (Valentin-Hansen *et al.*, 1986), y porta una fusión del promotor Pu al operón de la lactosa. Se muestra la posición de estos elementos indicando la flecha el sentido de la transcripción, así como la del gen de resistencia a ampicilina y de los sitios de restricción para los enzimas que se indican. Igualmente se muestra la situación del gen *parA* y del replicón de R1 (*copBA*, *repA* y *ori*), junto con el gen *cI* y el promotor P_R del fago λ .

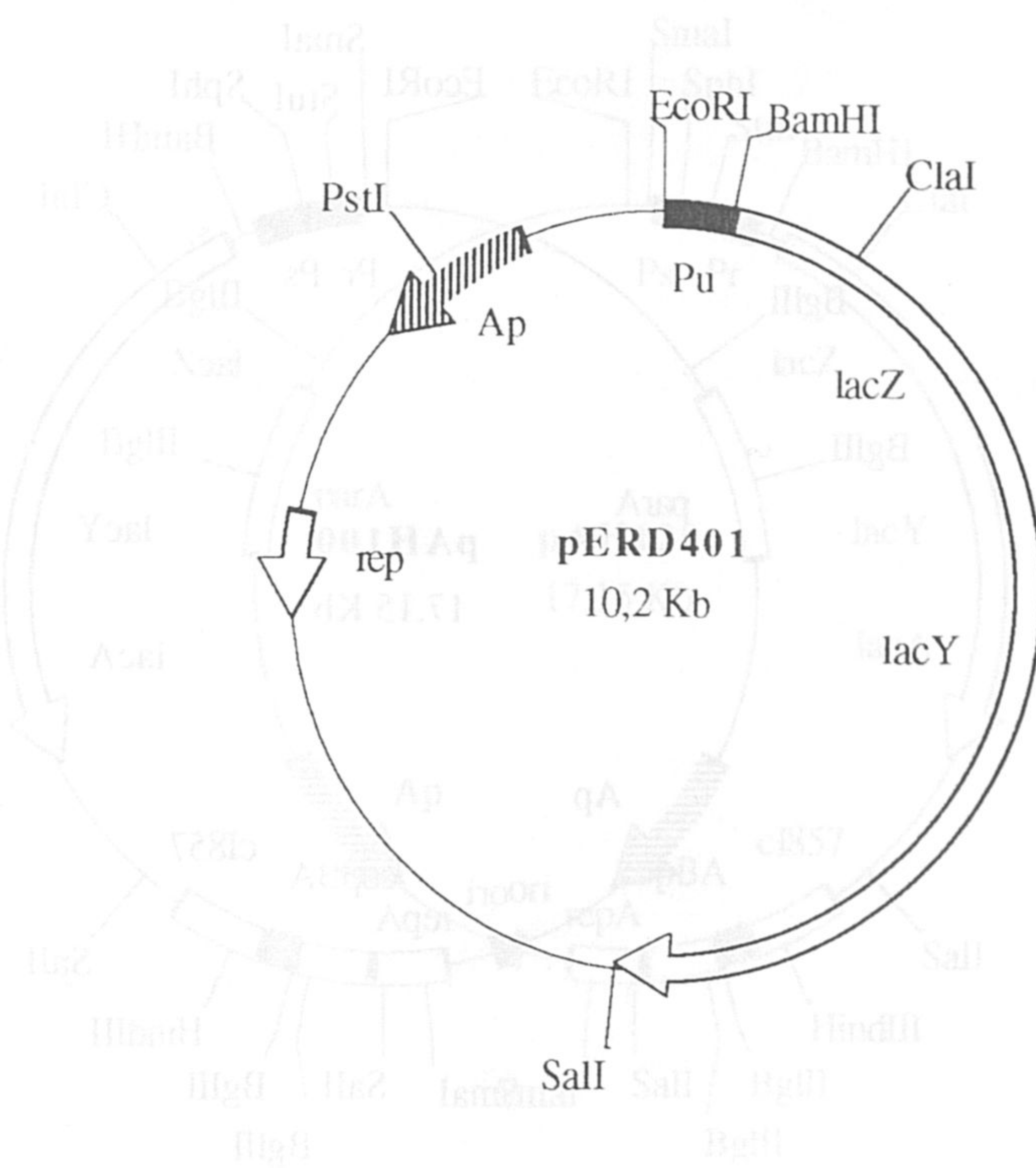


Figura 23. Esquema del plásmido pERD401. Este plásmido es un derivado del vector para clonaje y ensayo de promotores pMC1403 (Casadaban *et al.*, 1980) que porta una fusión del promotor Pu al operon de la lactosa. Se muestra la posición de estos elementos, y la flecha indica el sentido de la transcripción. Igualmente se muestra la situación del gen de resistencia a ampicilina, de la zona implicada en la replicación del plásmido y de los sitios de restricción para los enzimas que se indican.

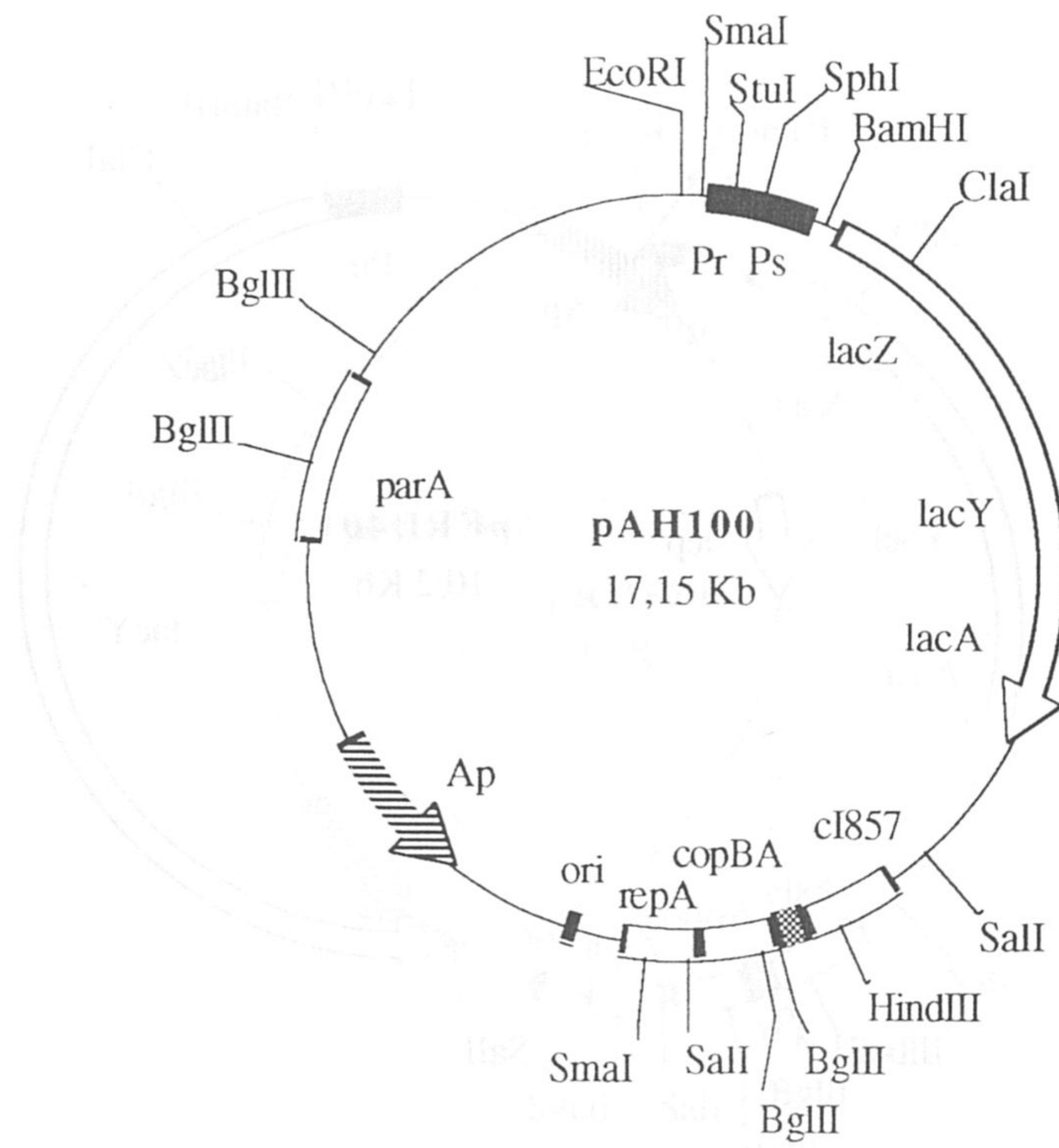
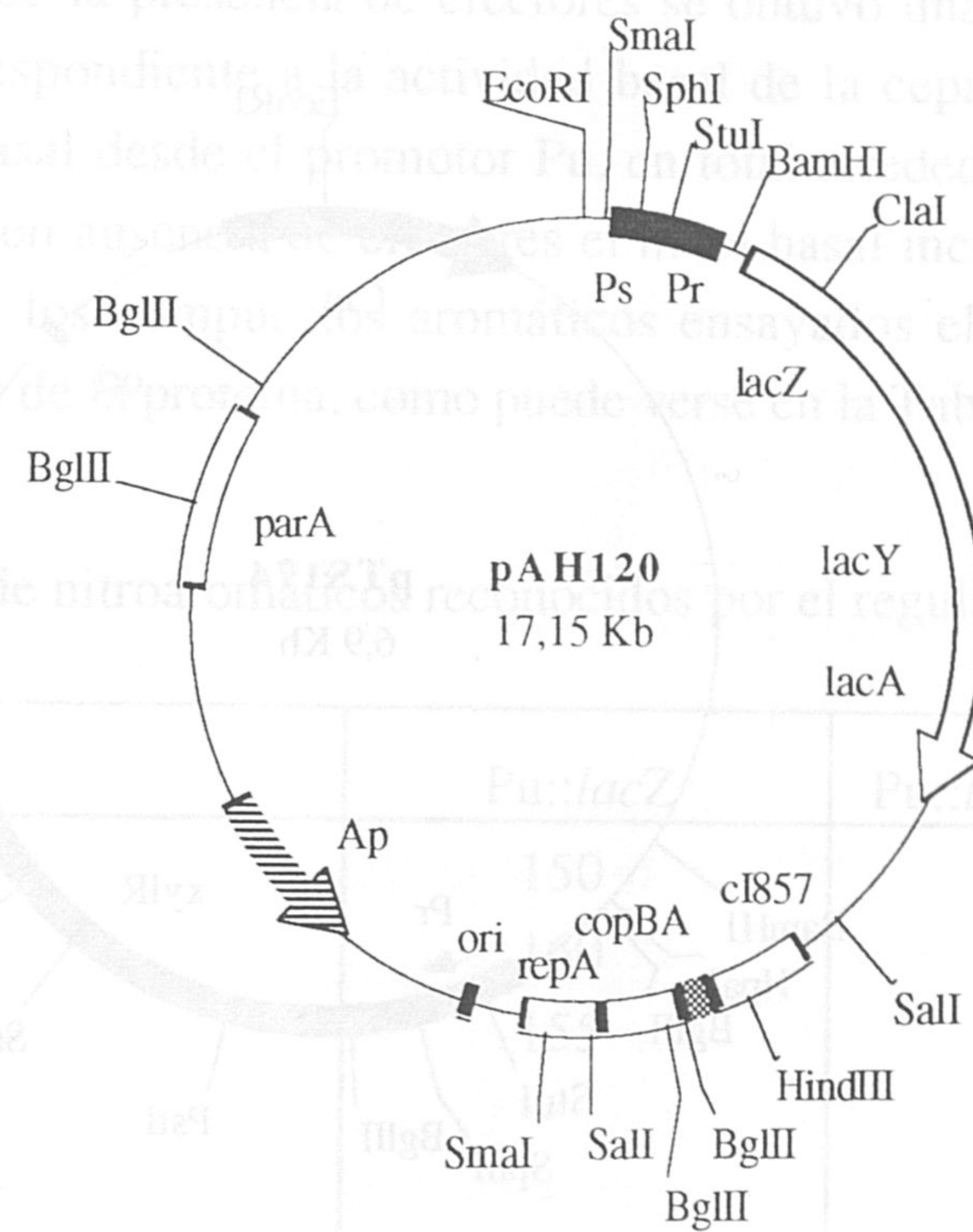


Figura 24. Esquema del plásmido pAH100. Este plásmido es un derivado del vector pJEL122 (Valentin-Hansen *et al.*, 1986) y porta un fragmento que contiene los promotores Ps y Pr, clonado en la orientación que permite la expresión del gen de la β -galactosidasa desde el promotor Ps. Se muestra la posición de estos elementos, indicando la flecha el sentido de la transcripción, así como la del gen de resistencia a ampicilina y de los sitios de restricción para los enzimas que se indican. Otros marcadores como en la leyenda de la Figura 22.

1-NITROAROMATICOS COMO EFECTORES DEL REGULADOR XylR

Una cepa de *E. coli* 5K portando el plásmido pRD579 que lleva el promotor Pu controlado por *lacZ* (Figura 22), se transformó o no con el plásmido pTS174 (*xylR*). Las transformantes se cultivaron en medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes, se incubaron a 30°C en agitación durante 12-16 horas, y se utilizaron como fuentes de actividad β -galactosidasa.

Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 7. En ausencia de XylR e independientemente de la presencia de efectores se obtuvo una expresión de actividad β -galactosidasa correspondiente a la actividad de la cepa (100 unidades) más el efecto basal desde el promotor Pu (alrededor de 150 unidades). En presencia de XylR en ausencia de efectores el β -galactosidasa se incrementó hasta alrededor de 260 unidades. De los compuestos aromáticos ensayados el *m*-xileno se comportó como el mejor inductor de XylR, como puede verse en la Tabla 7.



	Pu: <i>lacZ</i>	Pu: <i>lacZ</i> + XylR
1-nitrobenzénico	150	260
2-nitrobenzénico	150	1800
3-nitrobenzénico	150	500
4-nitrobenzénico	150	135
2-nitrobenzaldehído	150	460
3-nitrobenzaldehído	150	220
4-nitrobenzaldehído	150	190
2-nitrobenzaldehído	150	270
3-nitrobenzaldehído	150	165
4-nitrobenzaldehído	150	170
2-nitrobenzaldehído	150	240

Se cultivaron en LB con Ap de *E. coli* 5K (pRD579) (Pu:*lacZ*) y en LB con Ap y Cm de 5K (pAH120) con los compuestos aromáticos indicados a una concentración de 1 mM.

Figura 25. Esquema del plásmido pAH120. Las características de este plásmido son las mismas que las del pAH100 (Figura 24) con la excepción de que el fragmento que contiene los promotores Pr y Ps está clonado en la dirección contraria, de forma que la actividad β -galactosidasa se expresa desde Pr.

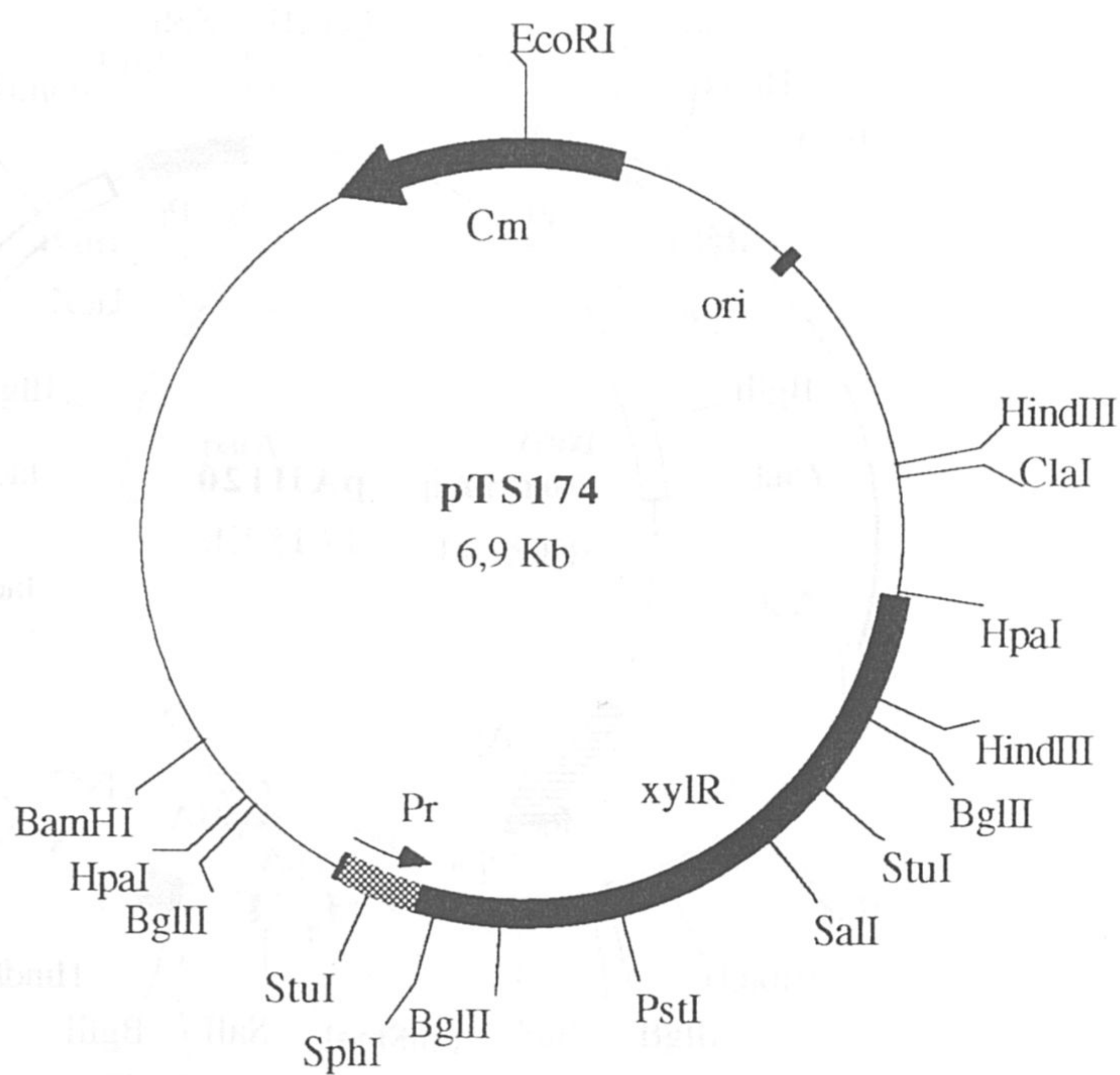


Figura 26. Esquema del plásmido pTS174. Este plásmido es un derivado del vector pACYC184 (Chang y Cohen, 1978; Rose, 1988) y porta un fragmento que contiene el gen *xylR* junto con su zona promotora. Se muestra la situación de estos elementos, la del origen de replicación y del gen de resistencia a cloranfenicol, así como los sitios de restricción para los enzimas que se indican.

1. NITROAROMATICOS COMO EFECTORES DEL REGULADOR XYL R

La cepa 5K de *E. coli* portando el plásmido pRD579 que lleva el promotor Pu fusionado al gen *lacZ'* (Figura 22), se transformó o no con el plásmido pTS174 (*xylR*). Los transformantes se cultivaron en medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes, se incubaron a 30°C en agitación durante 12-16 horas, y se utilizaron para los ensayos de actividad β -galactosidasa.

Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 7. En ausencia de XylR e independientemente de la presencia de efectores se obtuvo una expresión de actividad β -galactosidasa correspondiente a la actividad basal de la cepa (100 unidades) más el nivel de expresión basal desde el promotor Pu, en total alrededor de 150 unidades. En presencia de XylR y en ausencia de efectores el nivel basal incrementó hasta alrededor de 250 unidades. De los compuestos aromáticos ensayados el *m*-xileno se comportó como el mejor efector de la proteína, como puede verse en la Tabla 7.

Tabla 7. Perfil de nitroaromáticos reconocidos por el regulador XylR.

Efector	Pu:: <i>lacZ</i>	Pu:: <i>lacZ</i> + XylR
ninguno	150	260
<i>m</i> -xileno	160	1800
2-nitrotolueno	155	500
3-nitrotolueno	-	135
4-nitrotolueno	-	460
alcohol 2-nitrobencílico	-	220
alcohol 3-nitrobencílico	-	190
alcohol 4-nitrobencílico	-	270
2-nitrobenzaldehído	-	165
3-nitrobenzaldehído	-	170
4-nitrobenzaldehído	-	240

Cultivos en LB con Ap de *E. coli* 5K (pRD579) (Pu::*lacZ*) y en LB con Ap y Cm de 5K (pRD579)(pTS174) (Pu::*lacZ* y *xylR*) se diluyeron 1/100 en el medio fresco correspondiente y se suplementaron o no con los compuestos aromáticos indicados a una concentración final de 1 mM. La actividad β -galactosidasa se determinó tras 5 horas de incubación a 30°C en agitación. Los valores dados son media de 3 a 5 determinaciones independientes, y las desviaciones estándar fueron inferiores al 20%. "-" significa no determinado.

Además de en presencia de este compuesto, sólo se observó incremento de la actividad β -galactosidasa con 2- y 4-nitrotolueno. En el caso del resto de compuestos nitroaromáticos ensayados la actividad no aumentó, sugiriendo que los nitroarenos ensayados, con la excepción de 2- y 4-nitrotolueno, no se comportaban como efectores de la proteína XylR.

2. AISLAMIENTO DE MUTANTES DE XYL R

Los resultados anteriores sugerían que existía una limitación en el reconocimiento de 3-nitrotolueno, alcoholes nitrobencílicos y nitrobenzaldehídos como efectores de XylR. Por ello se planteó como objetivo en la expansión de rutas catabólicas para la eliminación de nitrotoluenos el aislamiento de mutantes de la proteína que fueran capaces de reconocer un espectro más amplio de nitrotoluenos y/o con más efectividad para promover la expresión desde Pu en ausencia de efectores.

Para el aislamiento de mutantes del regulador, el gen *xylR* en el plásmido pTS174 se mutagenizó "in vivo" con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) en la cepa *Escherichia coli* MC4100, y se utilizó la estrategia de selección de mutantes que se describe a continuación.

E. coli MC4100 (pTS174) se incubó en LB suplementado con Cm a 30°C en agitación hasta alcanzar una densidad celular de 0,6 a 660 nm. Para la mutagénesis se tomó 1 ml del cultivo, y se incubó durante 10 minutos a 30°C con NTG a una concentración final de 30 μ g/ml. Las células se recogieron por centrifugación durante 5 minutos a 5000g, se lavaron en 2 ml de LB y se incubaron durante 3 horas a 37°C. El ADN plasmídico procedente de las células que sobrevivieron la mutagénesis, fue extraído y transformado en la cepa MC4100 portando la fusión Pu::*lacZ* en el plásmido pRD579. Las colonias resistentes a Ap y Cm se seleccionaron en agar McConkey suplementado o no con 2-, 3- o 4-nitrotolueno. Del orden de 80 colonias rojas de un total de 80.000 se seleccionaron para estudios posteriores. Estas se purificaron y se utilizaron para estudiar la expresión de la actividad β -galactosidasa en presencia y ausencia de nitrotoluenos en medio líquido.

De esta forma se aislaron varios tipos de mutantes, cuyos fenotipos se muestran en la Tabla 8. Unos con especificidad de efectores alterada y capaces de reconocer nitrotoluenos como efectores, como el mutante XylR7. Otros semiconstitutivos del tipo de XylR6, que inducían una actividad desde Pu del orden de 5 veces superior a la de XylR en ausencia de efectores, y que eran además reconocían 3-nitrotolueno, un

compuesto que no es un efector del regulador silvestre (Tabla 7). Otros como el mutante XylR49 eran capaces de inducir altos niveles de expresión desde Pu en ausencia de efectores.

Tabla 8. Perfil de efectores de los tipos de mutantes de XylR aislados por mutagénesis con NTG.

Efector	XylR	XylR7	XylR6	XylR49
ninguno	180	85	520	1370
tolueno	-	125	1070	1815
<i>o</i> -xileno	-	145	1070	2495
<i>m</i> -xileno	1315	150	1560	2620
<i>p</i> -xileno	-	145	1150	1860
1,2,3-trimetilbenceno	-	130	1105	2600
1,2,4-trimetilbenceno	-	180	1490	2420
2-nitrotolueno	-	675	1645	3540
3-nitrotolueno	180	460	625	2955
4-nitrotolueno	-	405	2115	3380

Cultivos en LB con Ap y Cm de *E. coli* MC4100 (pRD579) (Pu::*lacZ*), portadora de pTS174 con *xylR* o los derivados de éste con los correspondientes alelos mutantes, se diluyeron 1/100 en medio fresco, y se suplementaron o no con los compuestos aromáticos indicados a una concentración final de 1 mM. La actividad β -galactosidasa se determinó tras 5 horas de incubación a 30°C en agitación. Los valores dados son media de 3 a 5 determinaciones independientes, y las desviaciones estándar fueron inferiores al 20%. "-" significa no determinado.

Los mutantes XylR7 y XylR49 fueron elegidos para su posterior caracterización en base al interés para su posible uso en la expansión de rutas degradativas, específicamente de 3-nitrotolueno en el caso de XylR7, y de otros sustratos incapaces de inducir la expresión de los genes catabólicos en el de XylR49. Los estudios llevados a cabo para la caracterización de estos mutantes se muestran a continuación.

3. XYLR7, UN MUTANTE DE XYLR CAPAZ DE RECONOCER 3-NITROTOLUENO

El mutante XylR7 se aisló en agar McConkey suplementado con vapores de 3-nitrotolueno. El clon se cultivó en medio líquido, y la determinación de la actividad β -galactosidasa en ausencia y presencia de 3-nitrotolueno puso de manifiesto que el producto del alelo mutante de *xylR* tenía una actividad basal ligeramente inferior a la silvestre, y que era capaz de reconocer 3-nitrotolueno como efector (Tabla 8).

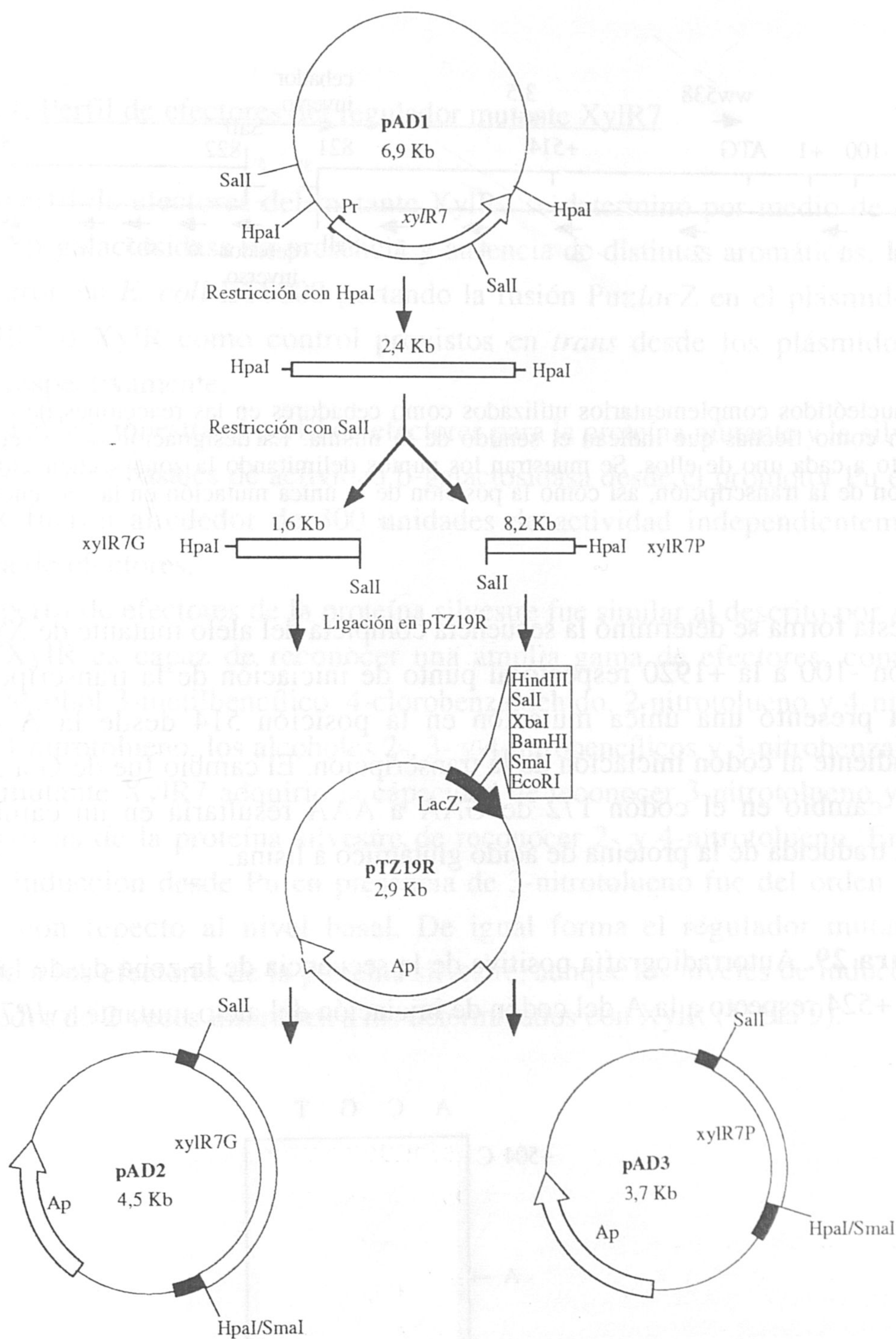
Con objeto de confirmar que el carácter estaba asociado al regulador, el derivado de pTS174 se aisló y transformó en la cepa *E. coli* ET8000 (pRD579), y la expresión de actividad β -galactosidasa expresada desde el promotor Pu se determinó de nuevo en ausencia y presencia de 3-nitrotolueno. En la Tabla 9 puede observarse que el fenotipo en esta cepa fue el mismo que el obtenido en el caso de MC4100. El plásmido derivado de pTS174 portador del alelo mutante *xylR7* fue llamado pAD1 (Figura 27).

3.1. CAMBIOS EN LA SECUENCIA DEL ALELO MUTANTE XYLR7

Con objeto de identificar la mutación o mutaciones inducidas por la mutagénesis al azar llevada a cabo, el fragmento *HpaI* de 2441 pb del plásmido pAD1 portador del mutante *xylR7* fue secuenciado en el vector pTZ19R. El clonaje de este fragmento completo resultó imposible debido a que ocurrían deleciones de la secuencia interna del gen. Por esta razón el clonaje se realizó en dos fragmentos, utilizando el sitio único de restricción *SalI* del alelo silvestre que se conservaba en el mutante. La restricción con este enzima dió como resultado dos fragmentos de 1640 pb y 821 pb respectivamente. El fragmento *HpaI-SalI* de 1620 pb de *xylR7* que contenía el promotor Pr, se clonó entre los sitios *SmaI* y *SalI* de pTZ19, originándose el plásmido pAD2; el fragmento de 821 pb se clonó en sentido contrario entre los sitios *SmaI* y *SalI* de pTZ19, originándose el plásmido pAD3. Un esquema de la construcción de estos plásmidos se muestra en la Figura 27.

Los plásmidos pAD2 y pAD3 se usaron para la secuenciación del alelo mutante completo, mediante el uso de oligonucleótidos específicos y complementarios al gen *xylR*, cuyas secuencias se muestran en la Tabla 3, así como el cebador inverso complementario a la secuencia adyacente al polilinquer de pTZ19R. En la Figura 28 se representa un esquema de la estrategia de secuenciación utilizada.

Figura 27. Construcción de los plásmidos pAD2 y pAD3.



El plásmido pTS174 portador del alelo mutante de xyIR fue digerido con los enzimas de restricción que se indican. Los fragmentos se separaron por electroforesis en gel de agarosa y se extrajeron y ligaron en los sitios de restricción correspondientes en el vector pTZ19R, según los procedimientos descritos en la sección de Materiales y Métodos.

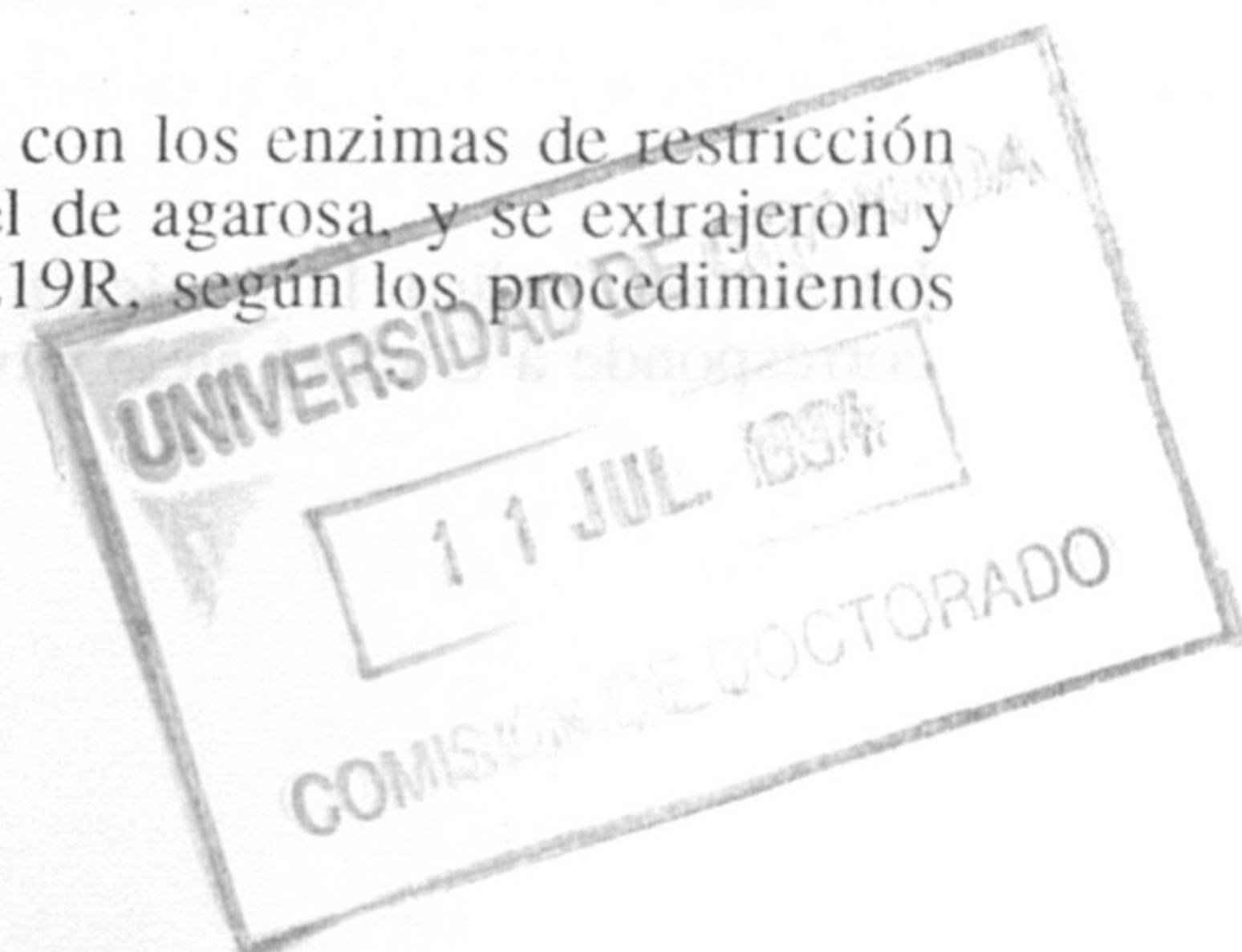
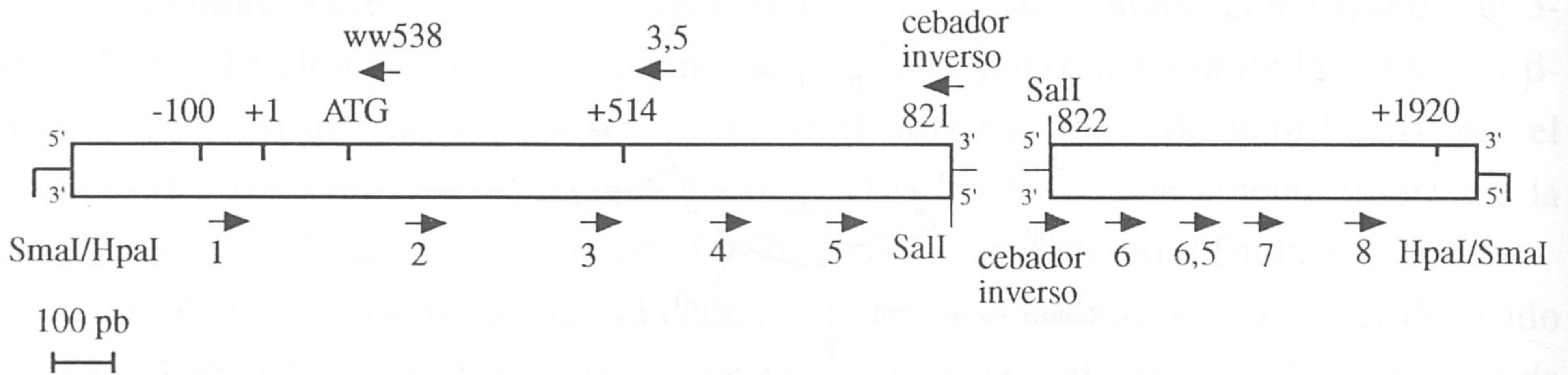


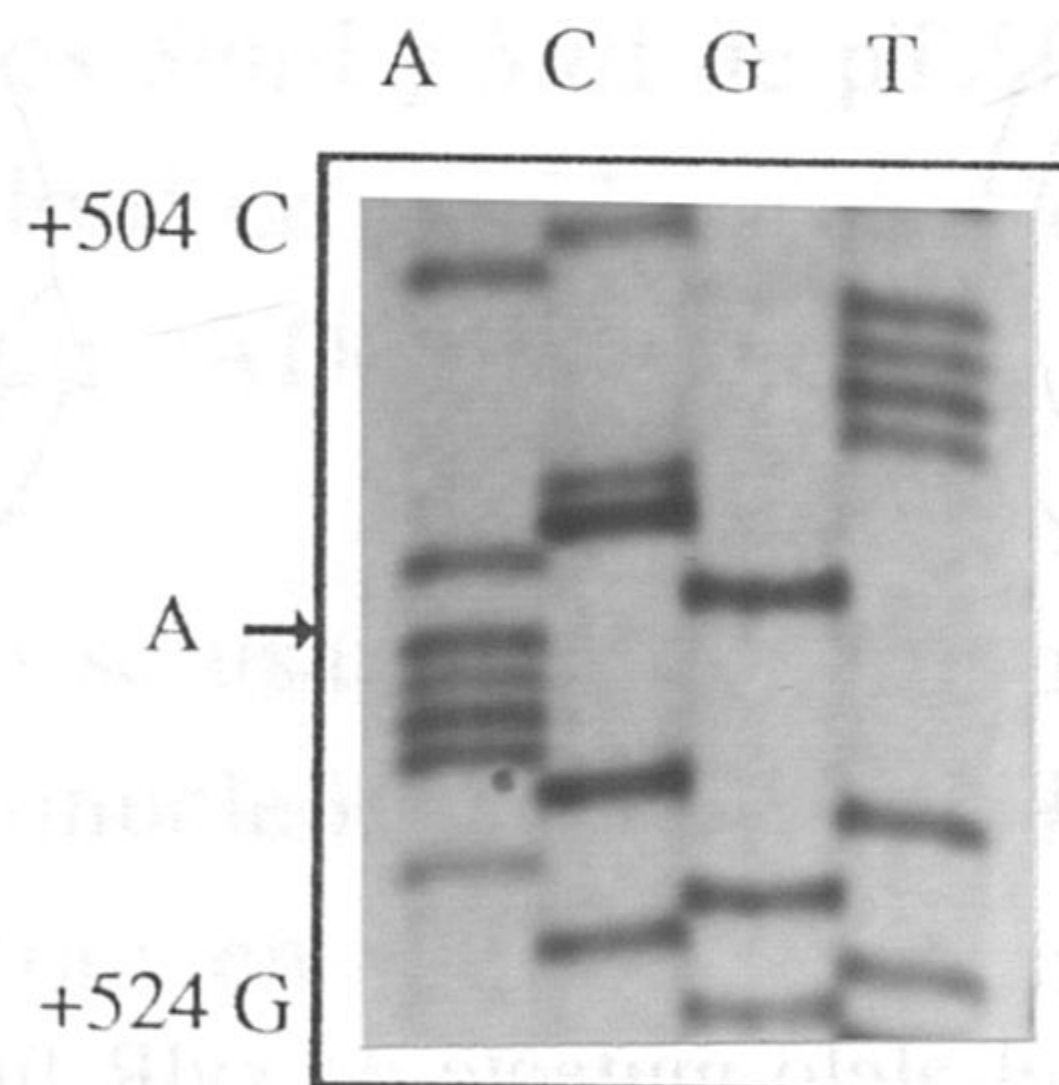
Figura 28. Estrategia de secuenciación del alelo mutante *xyIR7*.



Los oligonucleótidos complementarios utilizados como cebadores en las reacciones de extensión se representan como flechas que indican el sentido de la misma. La designación de los cebadores se detalla junto a cada uno de ellos. Se muestran los puntos delimitando la zona secuenciada, el punto de iniciación de la transcripción, así como la posición de la única mutación en la secuencia del alelo mutante.

De esta forma se determinó la secuencia completa del alelo mutante de XylR desde la posición -100 a la +1920 respecto al punto de iniciación de la transcripción. Esta secuencia presentó una única mutación en la posición 514 desde la A del ATG correspondiente al codón iniciación de la transcripción. El cambio fue de G a A (Figura 29). Este cambio en el codón 172 de GAA a AAA resultaría en un cambio en la secuencia traducida de la proteína de ácido glutámico a lisina.

Figura 29. Autorradiografía positiva de la secuencia de la zona desde la posición +504 a la +524 respecto a la A del codón de iniciación del alelo mutante *xyIR7*.



La flecha indica la posición de la mutación en la secuencia, una A en la posición +514 que corresponde a G en el alelo silvestre.

3.2. CARACTERIZACION DE LA ESTIMULACION DE LA TRANSCRIPCION DESDE EL PROMOTOR Pu POR XYLR7

3.2.1. Perfil de efectores del regulador mutante XylR7

El perfil de efectores del mutante XylR7 se determinó por medio de ensayos de actividad β -galactosidasa en presencia y ausencia de distintos aromáticos. Las medidas se realizaron en *E. coli* ET8000 portando la fusión Pu::*lacZ* en el plásmido pRD579, con XylR7 o XylR como control provistos en *trans* desde los plásmidos pAD1 y pTS174 respectivamente.

La Tabla 9 muestra el perfil de efectores para la proteína mutante y la silvestre.

Los niveles basales de actividad β -galactosidasa desde el promotor Pu en ausencia de XylR fueron alrededor de 300 unidades de actividad independientemente de la presencia de efectores.

El perfil de efectores de la proteína silvestre fue similar al descrito por Abril *et al.*, (1989). XylR es capaz de reconocer una amplia gama de efectores, como tolueno, xilenos, alcohol 3-metilbencílico, 4-clorobenzaldehído, 2-nitrotolueno y 4-nitrotolueno; pero no 3-nitrotolueno, los alcoholes 2-, 3- y 4-nitrobencílicos y 3-nitrobenzaldehído.

El mutante XylR7 adquirió la capacidad de reconocer 3-nitrotolueno y retuvo las características de la proteína silvestre de reconocer 2- y 4-nitrotolueno. En efecto, el nivel de inducción desde Pu en presencia de 3-nitrotolueno fue del orden de 5 veces superior con respecto al nivel basal. De igual forma el regulador mutante XylR7 reconoció a los efectores de la proteína silvestre, aunque los niveles de inducción fueron de alrededor de 2 veces inferiores a los determinados con XylR (Tabla 9).

Tabla 9. Perfil de efectores de XylR y XylR7.

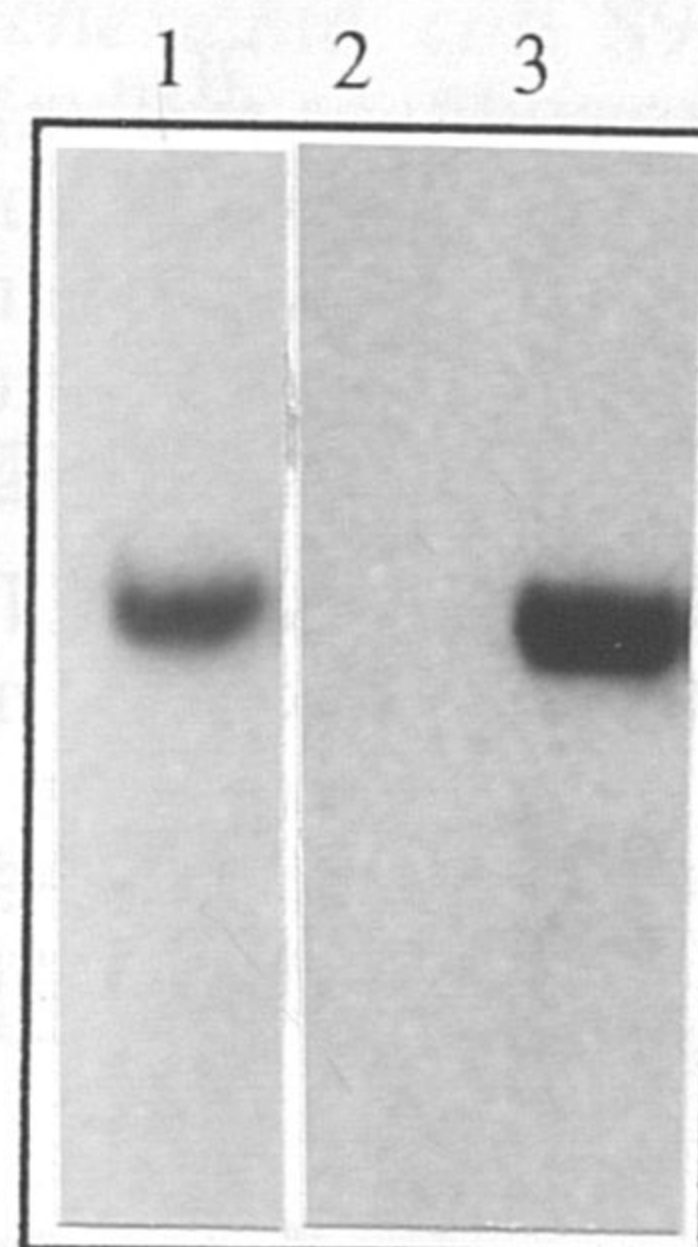
Efactor	Pu:: <i>lacZ</i> + XylR	Pu:: <i>lacZ</i> + XylR7
ninguno	300	170
tolueno	1220 (4)	425 (2,5)
<i>o</i> -xileno	1500 (5)	420 (2,5)
<i>m</i> -xileno	1540 (5)	490 (3)
<i>p</i> -xileno	1415 (4,5)	440 (2,5)
1,2,3-trimetilbenceno	850 (3)	460 (2,5)
1,2,4-trimetilbenceno	1590 (5)	415 (2,5)
1,3,5-trimetilbenceno	500 (1,5)	250 (1,5)
2-etiltolueno	610 (2)	385 (2)
3-etiltolueno	540 (1,8)	335 (2)
4-etiltolueno	460 (1,5)	330 (2)
2-nitrotolueno	1310 (4)	1405 (8)
3-nitrotolueno	150 (0,5)	930 (5,5)
4-nitrotolueno	1160 (3,5)	820 (5)
alcohol bencílico	390 (1)	185 (1)
alcohol 3-metilbencílico	1160 (3,5)	440 (2,5)
alcohol 2-nitrobencílico	350 (1)	270 (1,5)
alcohol 3-nitrobencílico	260 (1)	235 (1,5)
alcohol 4-nitrobencílico	340 (1)	170 (1)
benzaldehído	250 (1)	103 (1)
4-clorobenzaldehído	2260 (7,5)	720 (4)
3-nitrobenzaldehído	190 (0,6)	84 (1)

Cultivos en LB con Ap y Cm de *E. coli* ET8000 portando la fusión Pu::*lacZ* en pRD579 con pTS174 (*xylR*) o pAD1 (*xylR7*) se diluyeron 100 veces en medio fresco y se incubaron durante 2 horas a 30°C en agitación. A continuación se suplementaron o no con los aromáticos indicados a una concentración de 1 mM, y la actividad β -galactosidasa se determinó tras 5 horas de incubación en las mismas condiciones. Los valores dados son media de 3 a 5 determinaciones independientes, y las desviaciones estándar fueron inferiores al 20%. Entre paréntesis el número de veces que se incrementó la actividad respecto a la actividad basal correspondiente en ausencia de efector.

3.2.2. Determinación del punto de iniciación de la transcripción desde Pu por XylR7

Ensayos de extensión del cebador realizados en colaboración con Silvia Marqués en nuestro grupo de investigación, mostraron que el extremo 5' de iniciación de la transcripción desde el promotor Pu mediada por XylR7 activado por 3-nitrotolueno fue, como se esperaba, el mismo que el del regulador silvestre activado por un efector (Inouye *et al.*, 1984). En la Figura 30 se muestran los resultados obtenidos.

Figura 30. Determinación del punto de iniciación de la transcripción desde el promotor Pu mediada por XylR7.



Cultivos en LB con Ap y Cm de *E. coli* ET8000 (pRD579)(pTS174) con la fusión Pu::*lacZ* y *xylR* (línea 1), y ET8000 (pRD579)(pAD1) con Pu::*lacZ* y *xylR7* (líneas 2 y 3) se diluyeron 100 veces en el medio fresco correspondiente y se incubaron durante 1,5 horas a 30°C en agitación. A continuación el cultivo portador el alelo silvestre se suplementó con alcohol 3-metilbencílico 1 mM (línea 1) y el cultivo portador del alelo mutante se suplementó o no con 3-nitrotolueno 1 mM (líneas 2 y 3 respectivamente). La extracción de ARN y los ensayos de extensión del cebador se realizaron como se describe en el apartado correspondiente de la sección de Materiales y Métodos.

3.2.3. Requerimiento de NtrA para la estimulación de la transcripción desde Pu por XylR7

El requerimiento del factor NtrA para la transcripción desde el promotor Pu con el regulador XylR7 se ensayó utilizando cepas isogénicas de *E. coli* NtrA⁺ (ET8000) y NtrA⁻ (ET8045). Los plásmidos portadores de la fusión Pu::*lacZ* (pRD579) y de *xylR* (pTS174) o *xylR7* (pAD1) fueron transformados en estas dos cepas, y la actividad β-galactosidasa se ensayó siguiendo el procedimiento estándar.

La transcripción basal desde el promotor Pu en la cepa NtrA⁻ fue inferior a la basal en la cepa NtrA⁺, tanto en presencia de XylR como de XylR7, como se observa en la Tabla 10. De acuerdo con Abril *et al.*, (1991) en el caso de la proteína silvestre e independientemente de la presencia de efectores, no se observó inducción de la transcripción en ausencia de NtrA. Del mismo modo XylR7 no estimuló la expresión desde Pu en un fondo genético NtrA⁻ en presencia y ausencia de efectores.

Tabla 10. Inducción del promotor Pu por XylR y XylR7 en fondos genéticos NtrA⁺ y NtrA⁻.

Efactor	XylR		XylR7	
	NtrA ⁺	NtrA ⁻	NtrA ⁺	NtrA ⁻
ninguno	300	20	150	20
alcohol 3-metilbencílico	1700	25	550	20
3-nitrotolueno	200	25	800	25

Cultivos en LB con Ap y Cm de *E. coli* ET8000 (NtrA⁺) y ET8045 (NtrA⁻) con pRD579 (Pu::*lacZ*) y pTS174 (*xyIR*) o pAD1 (*xyIR7*) se diluyeron 100 veces en medio fresco y se incubaron durante 2 horas a 30°C en agitación. A continuación se suplementaron o no con los aromáticos indicados a una concentración de 1 mM. La actividad β-galactosidasa se determinó a las 5 horas de incubación en las mismas condiciones. Los valores son la media de 3 a 5 determinaciones independientes y las desviaciones estándar fueron inferiores al 20%.

3.2.4. Requerimiento de IHF para la estimulación de la transcripción desde Pu por XylR7

Los niveles de expresión desde Pu se estimaron en fondos genéticos IHF⁺ e IHF⁻, con objeto de determinar si la inducción máxima mediada por XylR7 era dependiente de la presencia de IHF al igual que la proteína silvestre. Se utilizaron cepas isogénicas de *E. coli* IHF⁺ (S90C) e IHF⁻ (DBP101), y los plásmidos portadores de la fusión Pu::*lacZ* (pRD579) y de *xyIR* (pTS174) o *xyIR7* (pAD1) se transformaron en estas dos cepas para la determinación de la actividad β-galactosidasa.

En la Tabla 11 se recogen los resultados obtenidos. Tanto en presencia de XylR como de XylR7 se detectó una actividad basal desde Pu independiente de efectores. De acuerdo con Abril *et al.*, (1991) en ausencia de IHF y en presencia de alcohol bencílico, la expresión desde Pu inducida por XylR fue del orden de un 20% de la actividad en el fondo genético IHF⁺. De igual forma en el caso del regulador mutante XylR7, la inducción máxima de Pu en presencia de 3-nitrotolueno dependía de la proteína IHF, de

forma que la actividad en un fondo IHF⁻ fue de alrededor del 20% respecto al fondo IHF⁺.

Tabla 11. Inducción del promotor Pu por XylR y XylR7 en fondos genéticos IHF⁺ e IHF⁻.

Efactor	XylR		XylR7	
	IHF ⁺	IHF ⁻	IHF ⁺	IHF ⁻
ninguno	55	60	50	55
alcohol 3-metilbencílico	1345	250	80	55
3-nitrotolueno	55	45	250	60

Cultivos en LB con Ap y Cm de *Escherichia coli* S90C (IHF⁺) y DBP101 (IHF⁻) con pRD579 (Pu::*lacZ*) y pTS174 (*xylR*) o pAD1 (*xylR7*) se diluyeron 100 veces en medio fresco y se incubaron durante 2 horas a 30°C en agitación. A continuación se suplementaron o no con los aromáticos indicados a una concentración de 1 mM. La actividad β -galactosidasa se determinó a las 5 horas de incubación en las mismas condiciones. Los valores son la media de 3 a 5 determinaciones independientes, y las desviaciones estándar fueron inferiores al 20%.

3.2.5. Requerimiento de la región UAS1 de Pu para la estimulación de la transcripción por XylR7

Los sitios de unión de la proteína XylR localizados en la zona de -120 a -180 en el promotor Pu (Abril *et al.*, 1991; de Lorenzo *et al.*, 1991; Inouye *et al.*, 1990)), son necesarios para la activación de la transcripción por el regulador XylR. En el caso de XylR7 se ensayó si esta zona era de igual forma necesaria para la estimulación de la transcripción. Para ello se utilizaron las fusiones del promotor silvestre Pu y de un mutante de éste carente de la zona UAS1, Pu Δ UAS1. La delección Δ UAS1 incluye la región de -144 a -240 con respecto al sitio de iniciación de la transcripción. Las fusiones de estos promotores al gen *lacZ* en el vector pMC1403 resultó en los plásmidos pERD401 y pERD412 respectivamente. Estos plásmidos se introdujeron por transformación en *E. coli* ET8000, junto con pTS174 (*xylR*) y pAD1 (*xylR7*), y la actividad β -galactosidasa se determinó en las condiciones estándar.

La Tabla 12 recoge los resultados obtenidos en los ensayos de inducción. El promotor mutante retuvo alrededor de un 5% de la actividad respecto al silvestre en presencia de XylR y XylR7, independientemente de la presencia de efectores. Con la fusión Pu::*lacZ* con XylR o XylR7 se observó inducción desde Pu como se esperaba.

En contraste, no se observó inducción desde Pu Δ UAS1, sugiriendo el requerimiento estricto de ese sitio para la activación del promotor con el regulador silvestre o mutante.

Tabla 12. Efecto de la delección de la zona UAS1 de Pu sobre la actividad del promotor en presencia de XylR y XylR7.

Efector	Pu:: <i>lacZ</i>		Pu Δ UAS1:: <i>lacZ</i>	
	XylR	XylR7	XylR	XylR7
ninguno	180	60	10	3
alcohol 3-metilbencílico	1085	150	40	3
3-nitrotolueno	80	350	3	10

Cultivos en LB con Ap y Cm de *E. coli* ET8000 portando la fusión Pu::*lacZ* en pERD401 o Pu Δ UAS1::*lacZ* en pERD412 con *xylR* (pTS174) o *xylR7* (pAD1) se diluyeron 100 veces en medio fresco y se incubaron durante 2 horas a 30°C en agitación. A continuación se suplementaron o no con los aromáticos indicados a una concentración de 1 mM. La actividad β -galactosidasa se determinó después de 5 horas de incubación en las mismas condiciones. Los valores dados son media de 3 a 5 determinaciones independientes, y las desviaciones estándar fueron inferiores al 20%.

3.3. ESTIMULACION DE LA TRANSCRIPCION DESDE EL PROMOTOR Ps POR XYL7

Para determinar si el regulador XylR7 estimulaba la transcripción desde el promotor Ps, *E. coli* ET8000 con la fusión Ps::*lacZ* en el plásmido pAH100, se transformó junto con pTS174 (*xylR*) o pAD1 (*xylR7*). La actividad β -galactosidasa se ensayó en ausencia y presencia de los aromáticos indicados a una concentración de 5 mM.

Los resultados de los ensayos de inducción se muestran en la Tabla 13. La actividad basal del promotor Ps en ausencia de XylR y XylR7 fue de alrededor de 30 unidades. El patrón de inducción de Ps por XylR fue similar al determinado por Holtel *et al.*, (1992), esto es, se detectó un incremento en la actividad β -galactosidasa en presencia de *m*-xileno y de alcohol 3-metilbencílico, pero no en presencia de 3-nitrotolueno; sin embargo, los niveles de inducción con *m*-xileno fueron significativamente inferiores a los obtenidos para el caso del promotor Pu. En el caso del regulador XylR7, y en contraste con los resultados obtenidos en Pu, la expresión desde el promotor Ps no se indujo en respuesta a 3-nitrotolueno, y se incrementó débilmente con el alcohol 3-metilbencílico.

Tabla 13. Inducción desde el promotor Ps por XylR y XylR7 en presencia y ausencia de efectores.

Efactor	Ps:: <i>lacZ</i> + XylR	Ps:: <i>lacZ</i> + XylR7
ninguno	135	145
<i>m</i> -xileno	360	170
alcohol 3-metilbencílico	1005	240
3-nitrotolueno	50	150

Cultivos en LB con Ap y Cm de *E. coli* ET8000 portando la fusión Ps::*lacZ* en pAH100 con *xylR* (pTS174) o *xylR7* (pAD1) se diluyeron 100 veces en medio fresco y se incubaron durante 16 horas a 30°C en agitación suplementados o no con los aromáticos indicados a una concentración de 5 mM. Los valores dados de actividad β -galactosidasa son la media de 3 a 5 determinaciones independientes, y las desviaciones estándar fueron inferiores al 20%.

3.4. XYLR7 REPRIME DEBILMENTE SU PROPIA SINTESIS

El regulador silvestre XylR regula su propia síntesis (Abril *et al.*, 1989; Inouye *et al.*, 1987; Marqués *et al.*, 1993). La fusión Pr::*lacZ* en pAH120 se utilizó para determinar si XylR7 reprimía su propia síntesis, utilizando XylR como control.

En la Tabla 14 se recogen los resultados obtenidos. El nivel transcripcional desde Pr en presencia del regulador XylR e independientemente de la presencia de efector se redujo a un 40-50% del nivel en ausencia del regulador. En el caso de XylR7, el nivel de represión desde Pr fue sólo de alrededor del 25%. Estos resultados sugieren que el regulador XylR7 muestra alterada su capacidad para reprimir su propia síntesis.

Tabla 14. Regulación de la expresión de Pr por XylR y XylR7.

alcohol 3-metilbencílico	- XylR	+ XylR	+ XylR7
-	580 (100)	265 (46)	435 (75)
+	520 (100)	200 (39)	380 (73)

Cultivos en LB con Ap y Cm de *E. coli* ET8000 portando la fusión Pr::*lacZ* en pAH120 con *xylR* (pTS174) o *xylR7* (pAD1) en *trans* se diluyeron 100 veces en medio fresco y se incubaron durante 16 horas a 30°C en agitación suplementados o no con alcohol 3-metilbencílico a una concentración de 5 mM. Los valores dados de actividad β -galactosidasa son la media de 3 a 5 determinaciones independientes, y las desviaciones estándar fueron inferiores al 20%. Entre paréntesis se muestran los porcentajes de actividad del promotor en ausencia de XylR.

4. XYLR49, UN MUTANTE CONSTITUTIVO DE XYLR

En la serie de transformación de MC4100 (pRD579) se aisló una colonia roja en agar McConkey en ausencia de efectores. El clon se cultivó en medio líquido y se determinó la actividad β -galactosidasa dependiente o no de la presencia de 4-nitrotolueno. El plásmido portador del posible alelo mutante de *xylR* era capaz de inducir altos niveles de transcripción en ausencia de efector, que se incrementaron al doble en presencia de 4-nitrotolueno (Tabla 8).

Para confirmar que el carácter estaba asociado al plásmido con *xylR*, el derivado de pTS174 se transformó en *E. coli* ET8000 (pRD579) y se determinó la actividad β -galactosidasa en presencia y ausencia de 4-nitrotolueno. Como se muestra en la Tabla 15, en presencia del derivado de pTS174 los niveles basales de actividad desde el promotor Pu fueron del orden de 7 veces superiores a los del alelo silvestre, y se incrementaron al doble en presencia de 4-nitrotolueno. El alelo mutante fue llamado *xylR49* y el plásmido portador de éste pAD49.

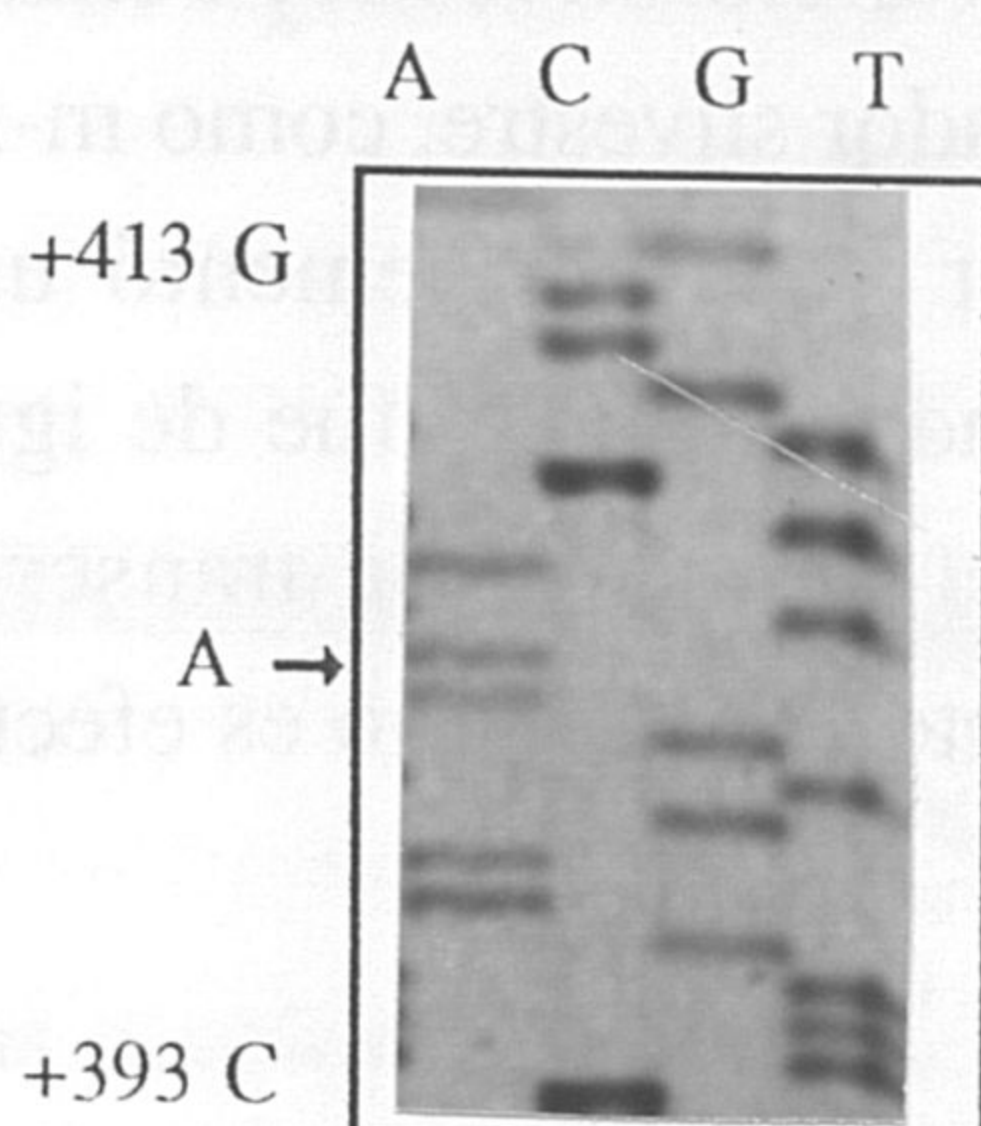
4.1. CAMBIOS EN LA SECUENCIA DEL ALELO MUTANTE XYLR49

Con objeto de identificar la mutación o mutaciones inducidas por la mutagénesis al azar en el gen *xylR*, el fragmento *HpaI* de 2441 pb del plásmido pAD49 portador del mutante *xylR49* se clonó en el vector pTZ19R, utilizando la estrategia descrita anteriormente para el alelo *xylR7* (Figura 28) y el sitio único *SalI* en la posición 821 de la secuencia que se conservaba en el alelo mutante. Los fragmentos *HpaI-SalI* de 1640 y 821 pb respectivamente se clonaron entre los sitios *SmaI* y *SalI* de pTZ19R para originar los plásmidos pAD4 y pAD5 respectivamente.

La secuenciación del alelo mutante completo se realizó utilizando como cebadores los oligonucleótidos específicos complementarios a *xylR* cuyas secuencias se muestran en la Tabla 3, así como el cebador reverso.

Se determinó la secuencia completa del mutante *xylR49* desde la posición -100 a la +1920 respecto al punto de iniciación de la transcripción. La secuencia del alelo mutante presentó una única mutación en la posición +403 relativa a la A del ATG del codón de iniciación que resultó en un cambio de G a A, como puede observarse en la Figura 31. Este cambio en el codón 135 de GAT a AAT resultaría en un cambio de ácido aspártico a asparragina en la cadena polipeptídica traducida.

Figura 31. Autorradiografía positiva de la secuencia de la zona desde la posición 393 a la 413 respecto al codón de iniciación del alelo mutante *xylR49*.



La flecha indica la posición de la mutación en la secuencia, una A en la posición +403 que corresponde a G en el alelo silvestre.

4.2. CARACTERIZACION DE LA ESTIMULACION CONSTITUTIVA DE LA TRANSCRIPCION DESDE EL PROMOTOR Pu POR XYLR49

Para determinar la estimulación de la transcripción desde el promotor Pu mediada por el regulador mutante XylR49 en presencia y en ausencia de efectores, se utilizó la fusión Pu::*lacZ* en el plásmido pRD579. Este plásmido, junto con pTS174 y pAD49 se transformó en la cepa de *E. coli* ET8000 y se ensayó la actividad β -galactosidasa en respuesta a la serie de compuestos aromáticos que se recogen en la Tabla 15.

Tabla 15. Inducción del promotor Pu por XylR y XylR49 en presencia y ausencia de efectores.

Efector	XylR	XylR49
ninguno	280	1380
<i>m</i> -xileno	1660	2620
alcohol 3-metilbencílico	1160	2300
2-nitrotolueno	1250	3540
3-nitrotolueno	140	2955
4-nitrotolueno	1210	3380

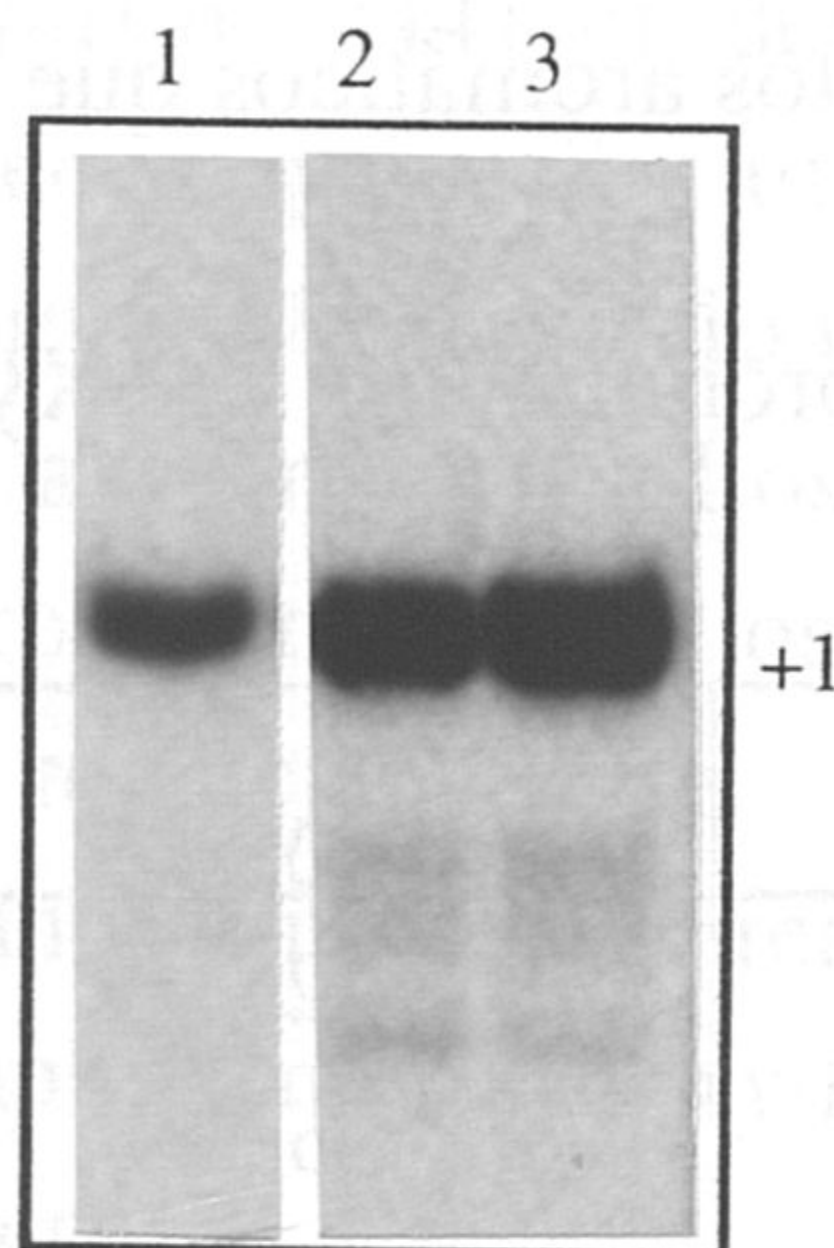
Cultivos en LB con Ap y Cm de *E. coli* ET8000 (pRD579), portando la fusión Pu::*lacZ* y *xylR* (pTS174) o *xylR49* (pAD49) se diluyeron 100 veces en medio fresco y se incubaron durante 2 horas a 30°C en agitación. A continuación se suplementaron o no con los aromáticos indicados a una concentración de 1 mM, y se incubaron durante 5 horas en las mismas condiciones. Los valores dados de actividad β -galactosidasa son la media de 3 a 5 determinaciones independientes, y las desviaciones estándar fueron inferiores al 20%.

El regulador mutante XylR49 fue capaz de estimular la transcripción desde Pu en ausencia de efectores, mediando un incremento de la actividad 7 veces superior a la actividad basal mediada por el alelo silvestre, como se observa en la Tabla 15. En presencia de efectores del regulador silvestre, como m-xileno y alcohol 3-metilbencílico, la actividad desde el promotor Pu se incrementó unas 2 veces sobre el alto nivel mediado por XylR49. El regulador mutante fue de igual modo capaz de promover un incremento de 2 veces del nivel basal alto de transcripción desde Pu en presencia de nitrotoluenos, incluido el 3-nitrotolueno que no es efector del regulador silvestre.

4.2.1. Determinación del punto de iniciación de la transcripción de Pu por XylR49

Los ensayos de extensión del cebador para la determinación del punto de iniciación de la transcripción desde el promotor Pu por XylR49 se realizaron en colaboración con Silvia Marqués en nuestro grupo de investigación. En la Figura 32 se recogen estos resultados.

Figura 32. Determinación del punto de iniciación de la transcripción desde el promotor Pu mediada por XylR49.



Cultivos en LB con Ap y Cm de *E. coli* ET8000 (pRD579)(pTS174) con la fusión Pu::*lacZ* y *xylR* (línea 1), y ET8000 (pRD579)(pAD49) con Pu::*lacZ* y *xylR49* (líneas 2 y 3) se diluyeron 100 veces en el medio fresco correspondiente y se incubaron durante 1,5 horas a 30°C en agitación. A continuación se suplementaron con alcohol 3-metilbencílico (líneas 1 y 3) a una concentración de 1 mM. La extracción de ARN y los ensayos de extensión del cebador se realizaron como se describe en el apartado correspondiente de la sección de Materiales y Métodos.

Estos ensayos mostraron que el extremo 5' de iniciación de la transcripción desde el promotor Pu mediada por XylR49 tanto en presencia como en ausencia de efector fue el mismo que el determinado con el regulador silvestre (Inouye *et al.*, 1984) en presencia de alcohol 3-metilbencílico.

4.2.2. Requerimiento de NtrA para la estimulación de la transcripción desde Pu por XylR49

Para determinar si los altos niveles de estimulación de la transcripción mediados por XylR49 en ausencia de efector eran o no independientes del factor NtrA, se utilizaron las cepas ET8000 (NtrA⁺) y ET8045 (NtrA⁻), y se determinó la actividad β -galactosidasa expresada desde el promotor Pu en pRD579 dependiente de XylR49. Los plásmidos pRD579, así como pTS174 (*xylR*) y pAD49 (*xylR49*) se introdujeron por transformación en estas cepas.

La Tabla 16 muestra los resultados obtenidos. Como puede observarse que en el fondo NtrA⁻ e independientemente de la presencia de efector, ni XylR ni XylR49 estimularon la expresión desde Pu. En contraste, en el fondo NtrA⁺ el comportamiento de los reguladores silvestre y mutante fue el esperado.

Tabla 16. Inducción del promotor Pu por XylR y XylR49 en fondos genéticos NtrA⁺ y NtrA⁻.

alcohol 3-metilbencílico	XylR		XylR49	
	NtrA ⁺	NtrA ⁻	NtrA ⁺	NtrA ⁻
-	300	30	1830	30
+	1415	30	2280	30

Cultivos en LB con Ap y Cm de *E. coli* ET8000 (NtrA⁺) y ET8045 (NtrA⁻) con pRD579 (Pu::*lacZ*) y pTS174 (*xylR*) o pAD49 (*xylR49*) se diluyeron 100 veces en medio fresco y se incubaron durante 2 horas a 30°C en agitación. A continuación se suplementaron o no con alcohol 3-metilbencílico 1 mM, y se incubaron durante 5 horas en las mismas condiciones. Los valores dados de actividad β -galactosidasa son la media de 3 a 5 determinaciones independientes, y las desviaciones estándar fueron inferiores al 20%.

4.2.3 La estimulación de la transcripción desde Pu por XylR49 es independiente de IHF

Los niveles de expresión desde Pu se estimaron en fondos genéticos IHF⁺ e IHF⁻ con objeto de determinar si la inducción mediada por XylR49 era dependiente de la presencia de IHF al igual que la proteína silvestre. Los plásmidos pTS174 (*xylR*) y pAD49 (*xylR49*) se transformaron en las cepas isogénicas IHF⁺ (S90C) e IHF⁻ (DBP101) portadoras de la fusión Pu::*lacZ* en el plásmido pRD579 para la determinación de la actividad β -galactosidasa.

En la Tabla 17 puede observarse que las medidas de actividad control utilizando el alelo silvestre fueron similares a las obtenidas por Abril *et al.*, (1991). Nuestros resultados confirmaron el papel estimulador de IHF en la transcripción desde Pu mediada por XylR en presencia de alcohol 3-metilbencílico, ya que en un fondo IHF⁻ la expresión desde el promotor fue del orden del 20% de la actividad en presencia de IHF. En contraste, el nivel de actividad β -galactosidasa desde Pu mediada por XylR49 en ausencia de efector en el fondo IHF⁻ fue alrededor del 60% del nivel máximo en un fondo IHF⁺. En presencia de efector el nivel de expresión desde Pu en el fondo IHF⁻ se incrementó hasta llegar a ser del orden del 80% del máximo nivel de expresión desde Pu en IHF⁺. Estos resultados sugerían que XylR49 salva el requerimiento de IHF para estimular la transcripción desde Pu.

Tabla 17. Inducción del promotor Pu por XylR y XylR49 en fondos genéticos IHF⁺ e IHF⁻.

alcohol 3-metilbencílico	XylR		XylR49	
	IHF ⁺	IHF ⁻	IHF ⁺	IHF ⁻
-	80	100	445	1037
+	1463	310	1745	1350

Cultivos en LB con Ap y Cm de *E. coli* S90C (IHF⁺) y DBP101 (IHF⁻) con pRD579 (Pu::*lacZ*) y pTS174 (*xylR*) o pAD49 (*xylR49*) se diluyeron 100 veces en medio fresco y se incubaron durante 2 horas a 30°C en agitación. A continuación se suplementaron o no con alcohol 3-metilbencílico 1 mM, y se incubaron durante 5 horas en las mismas condiciones. Los valores de actividad β -galactosidasa son la media de 3 a 5 determinaciones independientes, y las desviaciones estándar fueron inferiores al 20%.

4.2.4. Requerimiento de la región UAS de Pu para la estimulación de la transcripción por XylR49

Para determinar si la activación de la transcripción desde Pu por XylR49 era dependiente de las zonas UAS1 y UAS2 del promotor, al igual que para el caso del alelo silvestre (Abril *et al.*, 1991), se utilizaron los plásmidos pERD401 (Pu::*lacZ*), y las deleciones del promotor de -240 a -144 y de -240 a -106 fusionadas a *lacZ* en los plásmidos pERD412 (Pu Δ UAS1) y pERD411 (Pu Δ UAS1 Δ UAS2) respectivamente, y se determinó la actividad β -galactosidasa en respuesta a la presencia de XylR (pTS174) y XylR49 (pAD49).

Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 18. Al igual que con el regulador silvestre (Abril *et al.*, 1991), con XylR49 ocurrió una pérdida total de la actividad desde el promotor Pu carente de UAS1 y UAS2, independientemente de la presencia de efector. La deleción de la zona UAS1 de Pu suponía una disminución de la actividad estimulada por XylR del orden del 95% tanto en presencia como en ausencia de efector. En contraste, el nivel de expresión desde Pu Δ UAS1 con XylR49 fue del orden del 45% de la actividad máxima tanto en presencia como en ausencia de efector.

Tabla 18. Efecto de la deleción de las zonas UAS1 y UAS2 de Pu sobre la actividad del promotor en presencia de XylR y XylR49.

	alcohol 3-metilbencílico	XylR	XylR49
Pu:: <i>lacZ</i>	-	210	1280
	+	995	1275
Pu Δ UAS1:: <i>lacZ</i>	-	5	540
	+	40	630
Pu Δ UAS1 Δ UAS2:: <i>lacZ</i>	-	1	1
	+	1	1

Cultivos en LB con Ap y Cm de *E. coli* ET8000 portando la fusión Pu::*lacZ* en pERD401, Pu Δ UAS1::*lacZ* en pERD412 o Pu Δ UAS1 Δ UAS2::*lacZ* en pERD411, con *xylR* (pTS174) o *xylR49* (pAD49) se diluyeron 100 veces en medio fresco y se incubaron durante 2 horas a 30°C en agitación. A continuación se suplementaron o no con alcohol 3-metilbencílico 1 mM. La actividad β -galactosidasa se determinó tras 5 horas de incubación en las mismas condiciones. Los valores dados son media de 3 a 5 determinaciones independientes, y las desviaciones estándar fueron inferiores al 20 %.

4.2.5. Efecto de mutaciones puntuales en la zona UAS de Pu sobre la estimulación de la transcripción por XylR49

Abril *et al.*, (1991) identificaron por medio de ensayos de improntas 'in vivo' lugares protegidos de metilación por dimetilsulfato en presencia de XylR en las G's situadas en las posiciones -131, -139 dentro del segmento UAS2, y en -160 y -169 dentro de la región UAS1 del promotor Pu. Mutaciones independientes de estas G's por A's (Abril *et al.*, 1993) se utilizaron para determinar si existían variaciones respecto al patrón silvestre de inducción de la transcripción en los promotores mutados por el alelo XylR49. Los plásmidos derivados de pERD401 portando estas mutaciones se transformaron en *E. coli* ET8000, y se determinó actividad β -galactosidasa dependiente de la presencia de XylR (pTS174) o XylR49 (pAD49).

Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 19. Con el regulador silvestre, estas mutaciones en los sitios protegidos de metilación no tenían un efecto significativo sobre la transcripción desde Pu en presencia de efectores.

Tabla 19. Efecto de mutaciones puntuales en la región UAS sobre la transcripción desde Pu por XylR y XylR49.

	alcohol 3-metilbencílico	XylR	XylR49
Pu:: <i>lacZ</i>	-	260	1175
	+	1060	1310
PuG ₁₃₁ ->A:: <i>lacZ</i>	-	235	825
	+	1325	1320
PuG ₁₃₉ ->A:: <i>lacZ</i>	-	205	455
	+	1465	1040
PuG ₁₆₀ ->A:: <i>lacZ</i>	-	220	905
	+	1375	995
PuG ₁₆₉ ->A:: <i>lacZ</i>	-	245	1180
	+	1200	1320

Cultivos en LB con Ap y Cm de *E. coli* ET8000 portando las fusiones al gen *lacZ* de los promotores silvestre Pu (pERD401), y mutantes PuG₁₃₁->A (pERD424), PuG₁₃₉->A (pERD425), PuG₁₆₀->A (pERD426) y PuG₁₆₉->A (pERD427) en presencia de XylR (pTS174) o XylR49 (pAD49) se diluyeron 100 veces en medio fresco y se incubaron durante 2 horas a 30°C en agitación. A continuación se suplementaron o no con alcohol 3-metilbencílico 1 mM, y se incubaron durante 5 horas en las mismas condiciones. Los valores dados de actividad β -galactosidasa son la media de 3 a 5 determinaciones independientes, y las desviaciones estándar fueron inferiores al 20%.

En el caso de XylR49 el nivel basal de expresión en ausencia de efectores con las mutaciones -131, -139 y -169 fue del orden del 75 al 100% del nivel con el promotor silvestre, mientras que con la mutación -139 el nivel de expresión fue solo del 35%. Con las cuatro mutaciones puntuales del promotor, el nivel de actividad mediado por XylR49 en presencia de alcohol 3-metilbencílico fue del 80 al 100% del nivel determinado para el promotor silvestre. Esto sugería que UAS2 juega un papel importante en la estimulación de la transcripción desde el promotor de la ruta "upper" del plásmido TOL.

4.3. ESTIMULACION CONSTITUTIVA DE LA TRANSCRIPCION DESDE EL PROMOTOR Ps POR XYLR49

La determinación de la actividad transcripcional del promotor Ps mediada por el regulador mutante XylR49 en presencia y en ausencia de efectores se estudió utilizando la fusión Ps::*lacZ* en el plásmido pAH100. Este plásmido se transformó, junto con pTS174 (*xylR*) y pAD49 (*xylR49*) en la cepa de *E. coli* ET8000 y se ensayó la actividad β -galactosidasa en respuesta a la serie de compuestos aromáticos que se recogen en la Tabla 20.

Tabla 20. Inducción del promotor Ps por XylR y XylR49 en ausencia y presencia de efectores.

Efactor	XylR	XylR49
ninguno	135	2165
<i>m</i> -xileno	360	2235
2-nitrotolueno	330	1710
3-nitrotolueno	50	1190
alcohol 3-metilbencílico	1005	1920

Cultivos en LB con Ap y Cm de *E. coli* ET8000 (pAH100) con la fusión Ps::*lacZ*, y XylR (pTS174) o XylR49 (pAD49) se diluyeron 100 veces en medio fresco y se incubaron durante 16 horas a 30°C en agitación suplementados o no con los aromáticos indicados a una concentración de 5 mM. Los valores dados de actividad β -galactosidasa son la media de 3 a 5 determinaciones independientes, y las desviaciones estándar fueron inferiores al 20%.

Al igual que en Pu el mutante XylR49 fue capaz de estimular la transcripción constitutiva desde el promotor Ps, de forma que la actividad mediada por el alelo mutante fue 16 veces superior a la actividad basal del silvestre. Sin embargo, y en contraste con los resultados obtenidos para el caso de Pu, no se observó incremento de la actividad de Ps mediada por XylR49 en presencia de efectores.

4.4. XYLR49 REPRIME FUERTEMENTE SU PROPIA SINTESIS

Del mismo modo que para el caso del mutante XylR7, la fusión Pr::*lacZ* en pAH120 se usó para determinar si XylR49 autorregulaba su síntesis, utilizando XylR como control. Los plásmidos pTS174 (*xylR*) y pAD49 (*xylR49*) se introdujeron por transformación en la cepa ET8000 (pAH120) y se determinó la actividad β -galactosidasa siguiendo el procedimiento estándar.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 21. El nivel transcripcional desde Pr en presencia de XylR sin efector se redujo un 40-50% con respecto al nivel en ausencia del regulador como se ha determinado anteriormente. Con el regulador XylR49, el nivel de represión desde el promotor Pr fue superior al 75% del nivel en su ausencia. Estos resultados sugieren que el regulador XylR49 muestra una fuerte autorregulación de su propia síntesis.

Tabla 21. Regulación de la expresión desde Pr por XylR y XylR49.

Efector	- XylR	+ XylR	+ XylR49
ninguno	579 (100)	265 (46)	131 (77)
alcohol 3-metilbencílico	521 (100)	201 (39)	108 (79)

Cultivos en LB con Ap y Cm de *E. coli* ET8000 con la fusión Pr::*lacZ* en pAH120 y *xylR* (pTS174) o *xylR49* (pAD49) se diluyeron 100 veces en medio fresco y se incubaron durante 16 horas a 30°C en agitación suplementados o no con alcohol 3-metilbencílico 5 mM. Los valores de actividad β -galactosidasa son la media de 3 a 5 determinaciones independientes, y las desviaciones estándar fueron inferiores al 20%. Entre paréntesis se muestran los porcentajes de actividad respecto al promotor en ausencia de XylR.

III. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE UNA BACTERIA CAPAZ DE CRECER A EXPENSAS DE 4-NITROBENZOATO

En el primer apartado de esta sección de Resultados se ha demostrado el potencial de los enzimas de la ruta "upper" de TOL en *Pseudomonas putida* 2440 (pWW0) para biotransformar 3- y 4-nitrotolueno en los ácidos 3- y 4-nitrobenzoico. Por otro lado, el regulador XylR que presenta un amplio perfil de efectores reconocía 4-nitrotolueno como efector; pero no el análogo 3-nitrotolueno. El aislamiento de mutantes de XylR, bien constitutivos o bien con especificidad de efectores alterada, es una vía para salvar el bloqueo del metabolismo de 3-nitrotolueno a través de los enzimas de la ruta de TOL.

Cuando se inició este trabajo no se conocían microorganismos que degradaran nitrotoluenos, y sólo recientemente se ha descrito el aislamiento por dos grupos de investigación independientes (Rhys-Williams *et al.*, 1993; Haigler y Spain, 1993) de bacterias del género *Pseudomonas* capaces de utilizar 4-nitrotolueno como fuente de carbono y nitrógeno, pero no los otros mononitrotoluenos.

A la vista de estos antecedentes, y con objeto de expandir el potencial degradativo de bacterias que metabolizaran nitrobenzoatos a nitrotoluenos, se inició la búsqueda de microorganismos que utilizaran como fuente de carbono y energía los productos resultantes de la biotransformación de nitrotoluenos por el plásmido TOL, estos son 3- y 4-nitrobenzoato. Estas bacterias se utilizarían posteriormente como receptores potenciales de una unidad genética portadora de los genes de la ruta "upper" y el regulador *xyI*R o sus alelos mutantes, que permitiera la transformación de 3- y 4-nitrotolueno en sus nitrobenzoatos correspondientes.

— Los intentos de aislar microorganismos que crecieran a expensas de 3-nitrobenzoato resultaron infructuosos; sin embargo, se aisló una bacteria capaz de utilizar 4-nitrobenzoato como única fuente de carbono y nitrógeno. El aislamiento de esta bacteria, su identificación, así como otras pruebas realizadas para su caracterización se describen seguidamente.

1. AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS DEGRADADORES DE 4-NITROBENZOATO

La fuente para los aislamientos de bacterias capaces de crecer a expensas de 4-nitrobenzoato fueron suelos procedentes de una factoría de producción de explosivos de Unión Española de Explosivos, en Quintanilla de Sobresierra (Burgos). Alrededor de 100 g de suelo se suspendieron en 1 litro de medio M8, con objeto de no añadir a la suspensión ninguna fuente de nitrógeno que pudiera interferir en los aislamientos posteriores.

El aislamiento de bacterias capaces de crecer en 4-nitrobenzoato se abordó tomando como base la realización de enriquecimientos progresivos en medios mínimos con 4-nitrobenzoato como única fuente exógena de carbono y/o nitrógeno. Los enriquecimientos se hicieron de la siguiente forma: la suspensión inicial de suelo se dejó sedimentar y a la fase líquida de la suspensión se añadieron 0,25 % (v/v) de solución de micronutrientes A9, 1 mM de SO_4Mg y 1 mM de 4-nitrobenzoato; posteriormente este medio se suplementó con:

a) NH_4Cl 10 mg/ml, con objeto de enriquecer la suspensión en microorganismos que utilizaran 4-nitrobenzoato como fuente de carbono.

b) Fructosa 0,5 % (p/v), para el enriquecimiento en microorganismos que utilizaran el nitroaromático como fuente de nitrógeno.

c) sin adición, con objeto de enriquecer la suspensión en microorganismos que utilizaran 4-nitrobenzoato como fuente de carbono y nitrógeno.

Las suspensiones se incubaron durante un período de 2 a 7 días a 30°C con agitación. En todos los medios se observó incremento de la turbidez. Al cabo de este período se hicieron diluciones 1/10 de estos cultivos en el medio fresco correspondiente. El proceso se repitió 5-6 veces en cada uno de los casos, con el fin de favorecer la selección. Como fase final se sembraron diluciones seriadas en placas del medio mínimo selectivo correspondiente y las colonias que presentaban distinta apariencia en placa se aislaron y purificaron en sus correspondientes medios sólidos.

Alrededor de 20 colonias de cada uno de los medios de enriquecimiento se ensayaron para comprobar su fenotipo. Para ello las bacterias se inocularon en el medio de cultivo correspondiente suplementado con 1 mM de 4-nitrobenzoato, con y sin fructosa (0,5% p/v) y con y sin NH_4Cl , (10 mg/ml), y se incubaron a 30°C con agitación hasta la aparición de turbidez. Se observó que alrededor del 80% de los cultivos crecieron en las condiciones del ensayo correspondiente. Se comprobó que independientemente de las condiciones de enriquecimiento y selección utilizadas, todos

los microorganismos seleccionados en esta fase crecieron en 4-nitrobenzoato como fuente de carbono y nitrógeno.

Con objeto de seleccionar el microorganismo más eficiente se realizaron curvas de crecimiento en 4-nitrobenzoato como fuente de carbono y nitrógeno, y se estimó la velocidad de consumo del aromático mediante HPLC. Estos ensayos permitieron la selección del microorganismo más efectivo en la degradación de 4-nitrobenzoato, en cuanto a tiempo medio de generación en este medio y velocidad de consumo de 4-nitrobenzoato. El resultado de la selección fue un microorganismo, designado como cepa 410P, capaz de crecer a expensas de 4-nitrobenzoato como única fuente de carbono y nitrógeno, que fue posteriormente caracterizado.

2. CARACTERIZACION FISIOLÓGICA DE LA CEPA 410P

Con objeto de utilizar la cepa 410P para posibles manipulaciones genéticas en relación con la expansión vertical de su ruta degradativa de 4-nitrobenzoato a 4-nitrotolueno, se procedió a su identificación así como a la realización de una serie de ensayos de caracterización de la ruta metabólica utilizada por este microorganismo. Los resultados obtenidos en estos ensayos aportan datos útiles para determinar cuales son los primeros pasos en el metabolismo del 4-nitrobenzoato en esta cepa.

2.1. IDENTIFICACION DE LA CEPA 410P

La observación al microscopio óptico confirmó que el aislamiento era un clon puro de forma bacilar. La tinción de Gram mostró que esta cepa era una bacteria Gram negativa.

Las pruebas "Api" revelaron que la cepa 410P es una bacteria inmóvil, oxidasa negativa y capaz de reducir nitratos. La prueba de utilización de citrato fue positiva. No producía H_2S a partir de tiosulfato sódico, y produjo indol y acetoina utilizando triptófano y piruvato sódico como sustratos respectivamente. Los ensayos de actividad para los enzimas b-galactosidasa, ureasa y lisina descarboxilasa fueron positivos, mientras que fueron negativos los de arginina dehidrolasa, ornitina descarboxilasa, triptófano desaminasa, y gelatinasa. La bacteria era capaz de fermentar glucosa, manitol, inositol, sorbitol, ramnosa, sacarosa, melibiosa, amigdalina y arabinosa. La prueba sobre el metabolismo de la glucosa por este microorganismo reveló la producción de ácidos

tanto en el proceso fermentativo como en el oxidativo. Los resultados de estas pruebas permitieron la identificación de 410P como *Klebsiella oxytoca*.

Los análisis de fosfolípidos de membrana de esta bacteria realizados por la compañía Microbial Identification Systems confirmaron la naturaleza de enterobacteria de la cepa 410P realizada por las pruebas "Api".

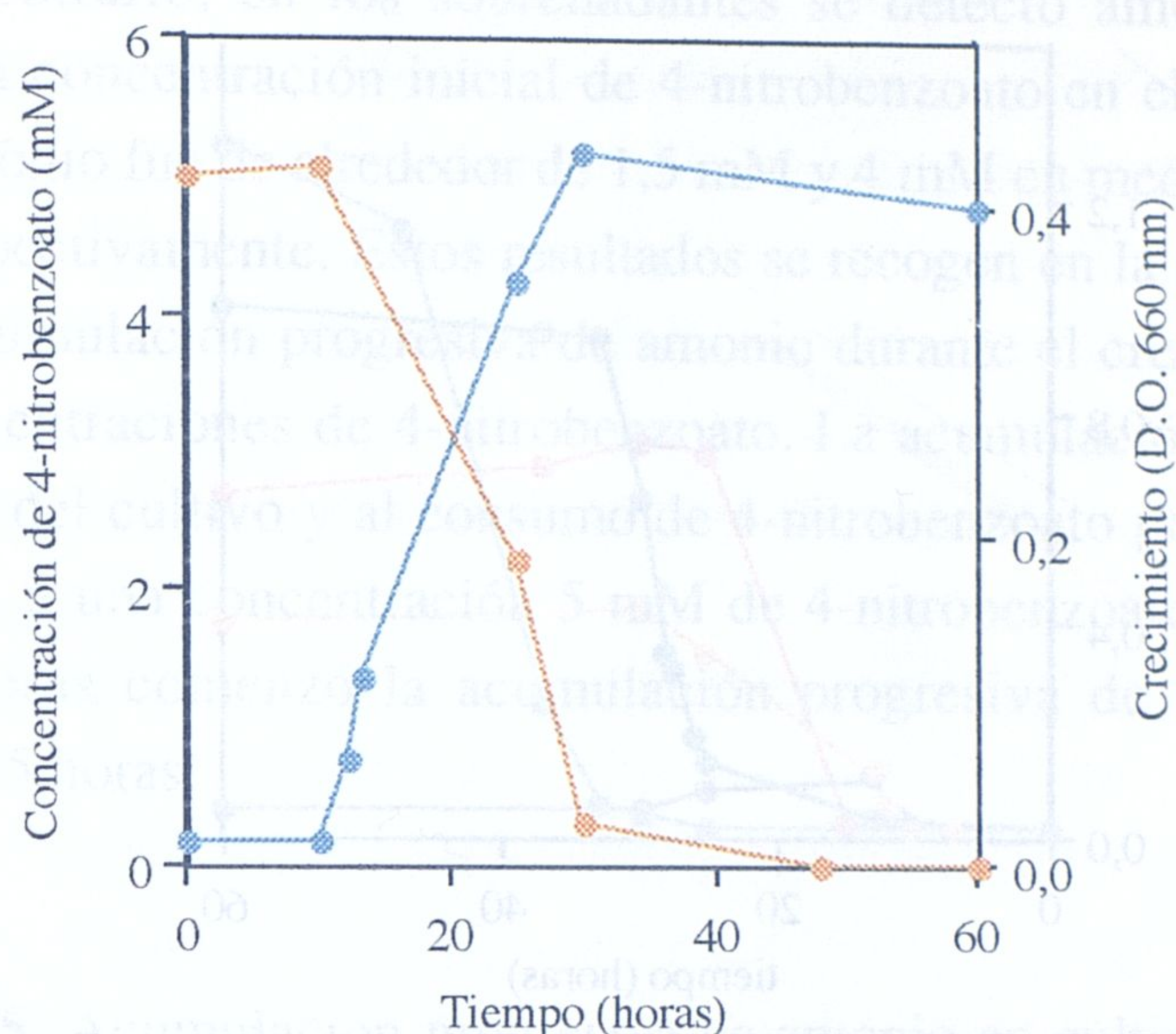
2.2. 4-NITROBENZOATO COMO SUSTRATO DE CRECIMIENTO PARA LA BACTERIA *KLEBSIELLA OXYTOCA* 410P

Con objeto de fijar las condiciones óptimas de cultivo, se ensayó el efecto que ejercían sobre el crecimiento de la cepa determinados factores, como la concentración inicial de 4-nitrobenzoato en el medio, la adición de extracto de levadura y la temperatura de incubación.

Para ello se realizaron curvas de crecimiento, en las que se partió en cada caso de un cultivo de la bacteria incubado a 30°C en agitación durante 30 horas en medio M8 con 5 mM de 4-nitrobenzoato. A partir de éste cultivo se hicieron diluciones 1/100 en los medios correspondientes. La densidad celular de éstos a lo largo del tiempo se determinó espectrofotométricamente midiendo su turbidez a 660 nm. La desaparición del sustrato en el medio se determinó mediante HPLC a partir de sobrenadantes de los cultivos, como se ha descrito en el apartado correspondiente de la sección de Materiales y Métodos.

En la Figura 33 se muestra una curva de crecimiento de la bacteria en medio mínimo M8 con 4-nitrobenzoato 5 mM como fuente de carbono y nitrógeno, junto con el consumo de este compuesto a lo largo del tiempo. El crecimiento de 410P en este medio presentó una curva típica de crecimiento bacteriano con una fase de retardo de 10 horas, y una fase de crecimiento exponencial con un tiempo medio de generación estimado de 2 horas. La fase estacionaria se alcanzó a las 30 horas de incubación. Paralelamente al crecimiento se apreció la desaparición del 4-nitrobenzoato del medio de cultivo; la desaparición de éste fue total tras 30 horas de incubación, y la turbidez máxima del cultivo coincidió con el consumo total del 4-nitrobenzoato presente en el medio.

Figura 33. Crecimiento de *K. oxytoca* 410P con 4-nitrobenzoato como fuente de carbono y nitrógeno.

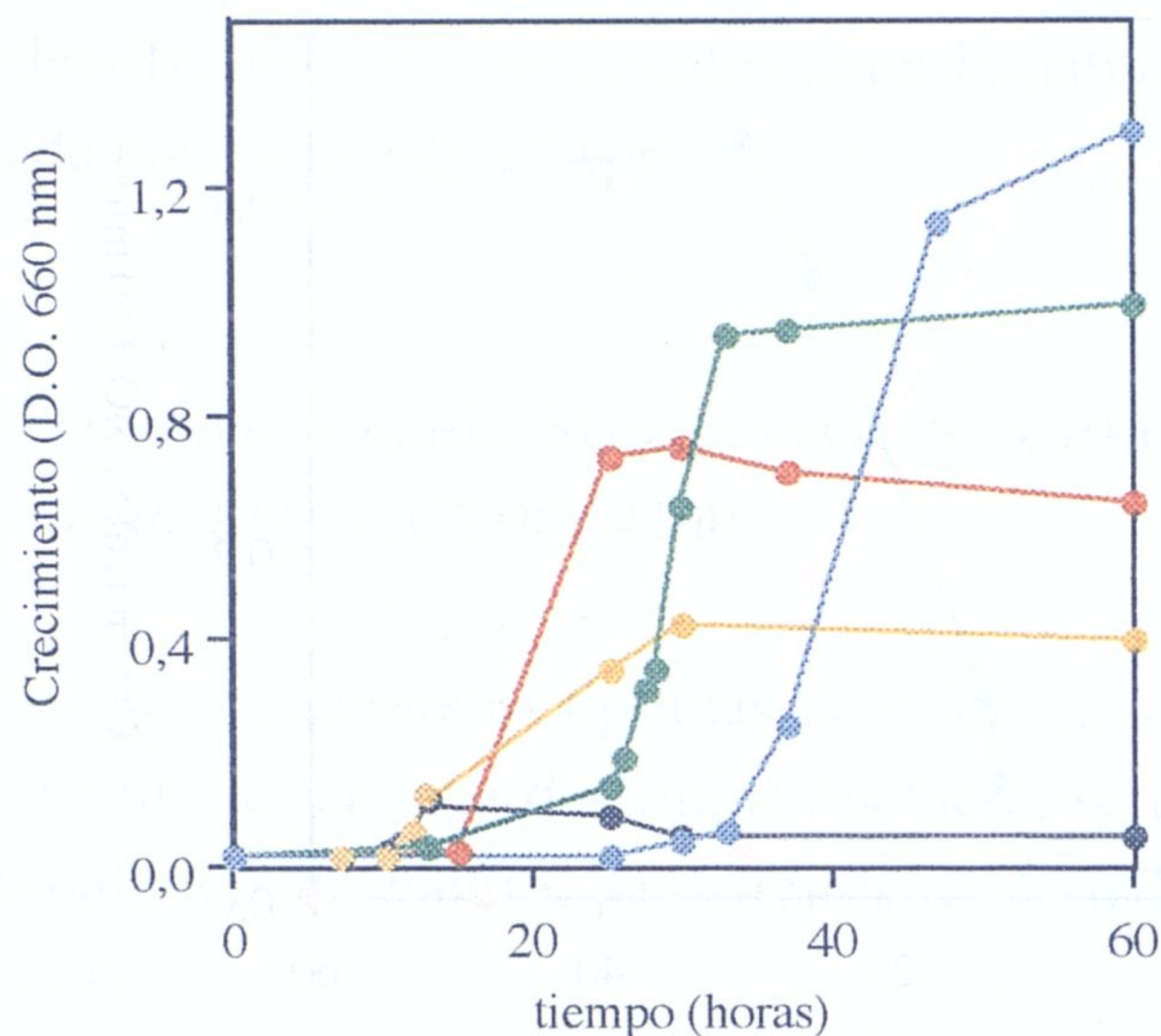


Un cultivo de *K. oxytoca* 410P en medio M8 con 5 mM de 4-nitrobenzoato se diluyó 1/100 en el mismo medio, y se incubó a 30°C con agitación. A los tiempos indicados se determinó la densidad celular (●) y la concentración remanente de 4-nitrobenzoato en el medio de cultivo (○).

2.2.1. Efecto de la concentración inicial de 4-nitrobenzoato sobre el crecimiento

El efecto que distintas concentraciones de 4-nitrobenzoato ejercían sobre el crecimiento de la bacteria 410P se recoge en la Figura 34. La turbidez final del cultivo en 4-nitrobenzoato fue dependiente de la concentración inicial de éste en el medio y directamente proporcional a ésta. El tiempo de la fase de latencia del cultivo aumentó con la concentración de 4-nitrobenzoato, hasta las 30 horas cuando se utilizó 20 mM de 4-nitrobenzoato. La velocidad de crecimiento de la bacteria 410P en 4-nitrobenzoato fue independiente de la concentración inicial de éste en el medio, ya que el tiempo medio de generación estimado fue de 2-3 horas en las distintas concentraciones del aromático ensayadas.

Figura 34. Crecimiento de *K. oxytoca* 410P a distintas concentraciones de 4-nitrobenzoato.



Un cultivo de *K. oxytoca* 410p en M8 con 5 mM de 4-nitrobenzoato se diluyó 1/100 en M8 con 4-nitrobenzoato, cuya la concentración inicial fue 1 mM (●), 5 mM (●), 10 mM (●), 15 mM (●) y 20 mM (●). Los cultivos se incubaron a 30°C con agitación y la turbidez de éstos se determinó a los tiempos indicados.

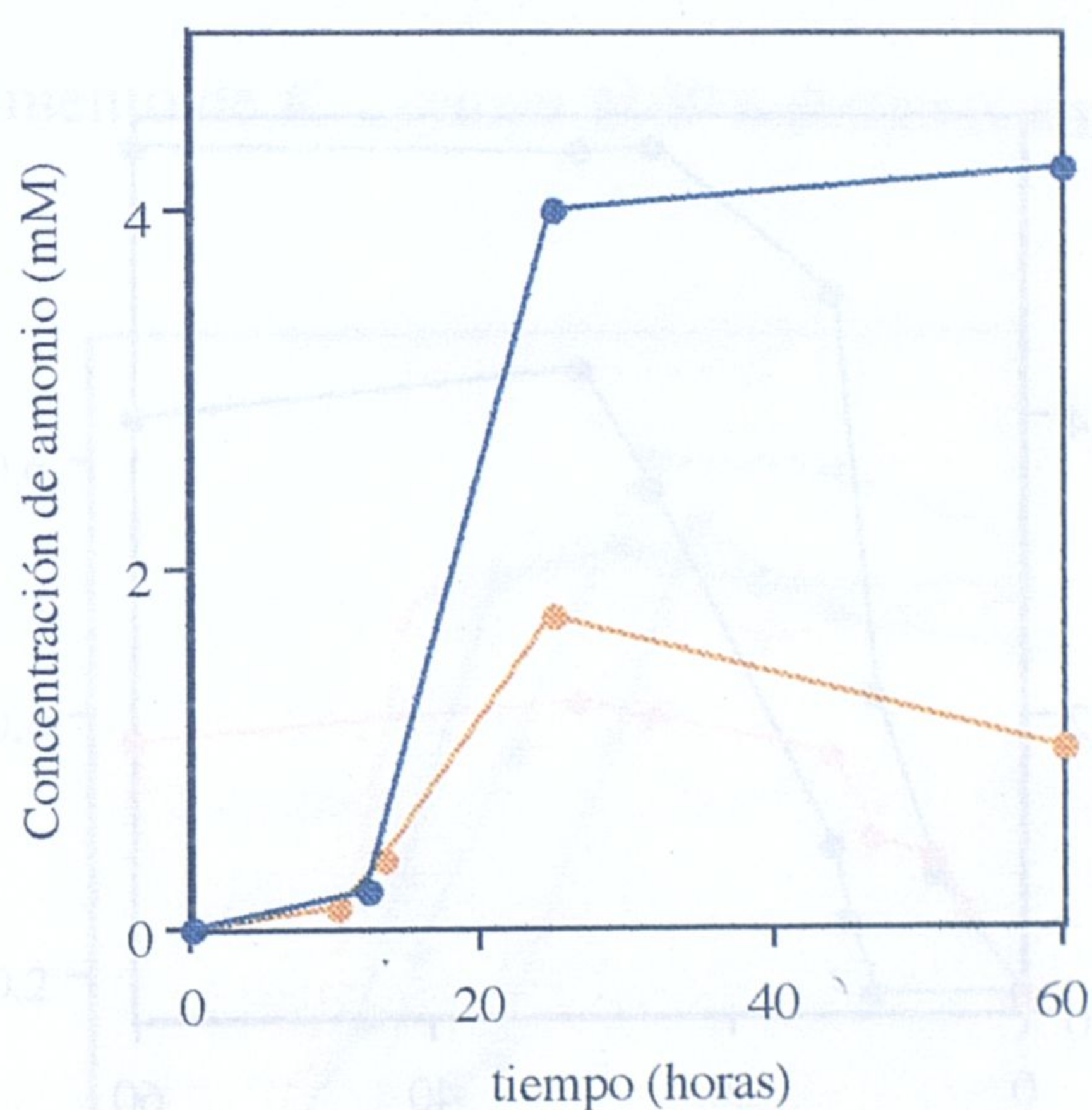
2.2.2. El crecimiento en 4-nitrobenzoato de la cepa 410P conlleva la acumulación de amonio

Como se ha descrito en la Introducción de este trabajo, en la degradación microbiana de compuestos nitroaromáticos existen varias formas de liberación del grupo nitro del anillo aromático, bien como nitrito (Duque *et al.*, 1993; Lenke y Knackmuss, 1992; Spain *et al.*, 1979; Spanggord *et al.*, 1991; Zeyer y Kearney, 1984) o bien como el producto de reducción de éste a amonio (Groenewegen *et al.*, 1992; Haller y Finn, 1978; Haigler y Spain, 1993; Nishino y Spain, 1993; Rhys-Williams *et al.*, 1993). La acumulación de nitrito o amonio en cultivos de microorganismos creciendo a expensas de compuestos nitroaromáticos ha servido en muchos casos para determinar cuales son los pasos iniciales en la degradación de estos compuestos. Con objeto de determinar si tenía lugar acumulación de nitrito o de amonio en los cultivos de la cepa 410P utilizando 4-nitrobenzoato como fuente de carbono y nitrógeno, se hicieron determinaciones de éstos en sobrenadantes de cultivos de esta cepa en M8 suplementado con 4-nitrobenzoato.

Las determinaciones de nitrito, realizadas como se ha descrito en el apartado correspondiente de la sección de Materiales y Métodos, fueron negativas.

Por el contrario, en los sobrenadantes se detectó amonio cuya concentración dependió de la concentración inicial de 4-nitrobenzoato en el medio; la concentración máxima de amonio fue de alrededor de 1,5 mM y 4 mM en medio M8 con 5 y 10 mM del nitroareno respectivamente. Estos resultados se recogen en la Figura 35, que muestra la aparición y acumulación progresiva de amonio durante el crecimiento de la cepa 410P con estas concentraciones de 4-nitrobenzoato. La acumulación de amonio fue paralela al crecimiento del cultivo y al consumo de 4-nitrobenzoato por la bacteria (Figura 33). De este modo, a una concentración 5 mM de 4-nitrobenzoato tras una fase de retardo de unas 10 horas comenzó la acumulación progresiva de amonio, que alcanzó un máximo a las 25 horas.

Figura 35. Acumulación progresiva de amonio en cultivos de *K. oxytoca* 410P a distintas concentraciones de 4-nitrobenzoato.



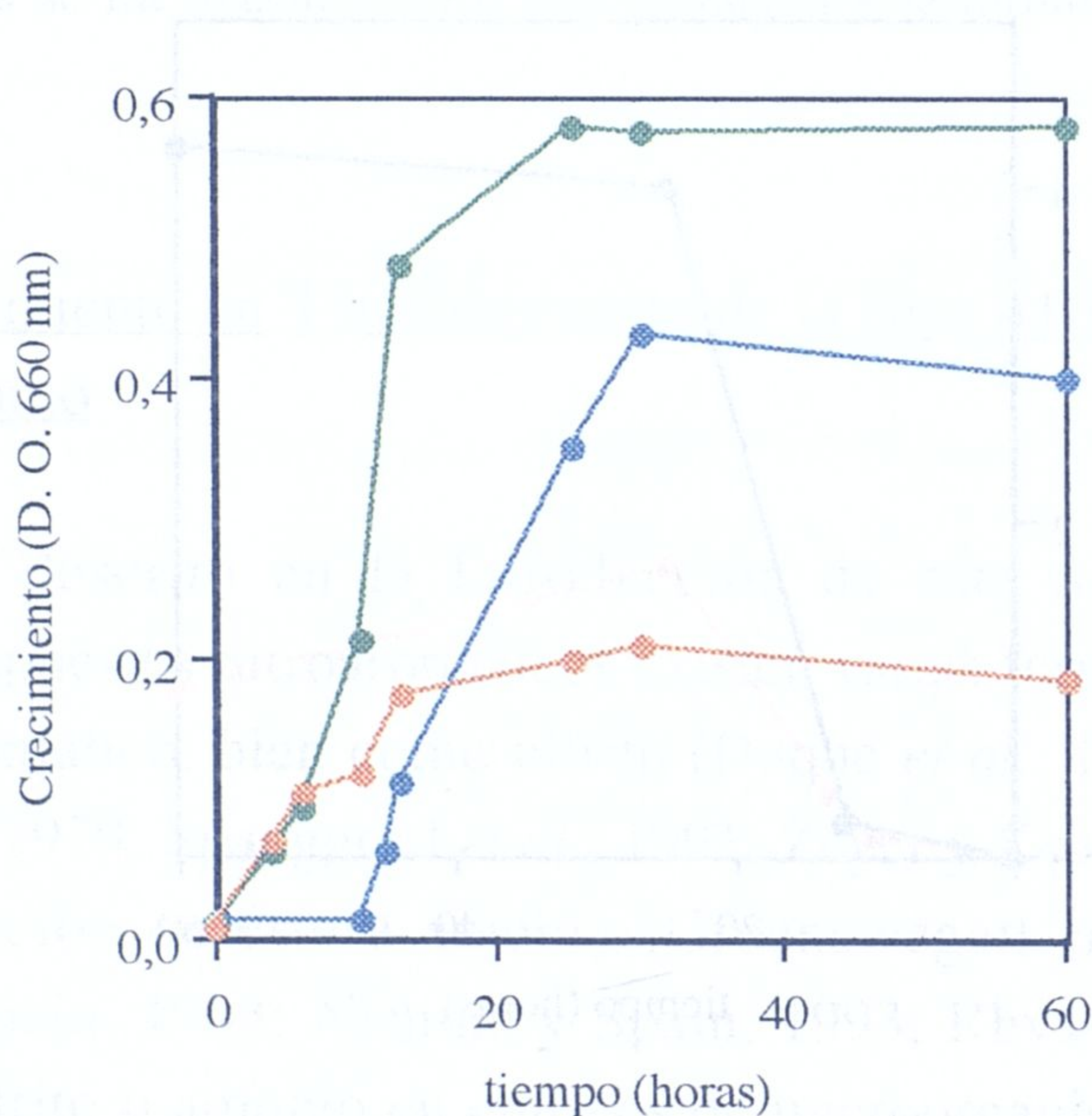
Un cultivo de la cepa 410P en M8 con 5 mM de 4-nitrobenzoato se diluyó 1/100 en M8 suplementado con 4-nitrobenzoato 5 mM (●), o 10 mM (●). Los cultivos se incubaron a 30°C con agitación. A los tiempos indicados se determinó la concentración de amonio (mM) en los sobrenadantes de estos cultivos.

2.2.3. Efecto de la adición de extracto de levadura sobre el crecimiento de la cepa 410P en 4-nitrobenzoato

La adición de extracto de levadura a los medios de cultivo líquidos de bacterias con capacidades degradativas se realiza como vía para acortar los períodos de latencia y obtener mayor rendimiento celular (Jensen y Gundersen, 1955; Spain *et al.*, 1979; Zeyer y Kearney, 1984). En algunos casos la presencia de extracto de levadura en los cultivos es imprescindible, ya que supone un aporte de vitaminas y de otros factores de crecimiento para la bacteria insustituible por soluciones de vitaminas estandar (Locher *et al.* 1989).

En el caso de la cepa 410P se ensayó el efecto de la adición de extracto de levadura 0,02% (p/v) a un cultivo de la misma en medio M8 con 5 mM de 4-nitrobenzoato. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 36.

Figura 36. Crecimiento de *K. oxytoca* 410P en 4-nitrobenzoato con y sin suplemento de extracto de levadura.



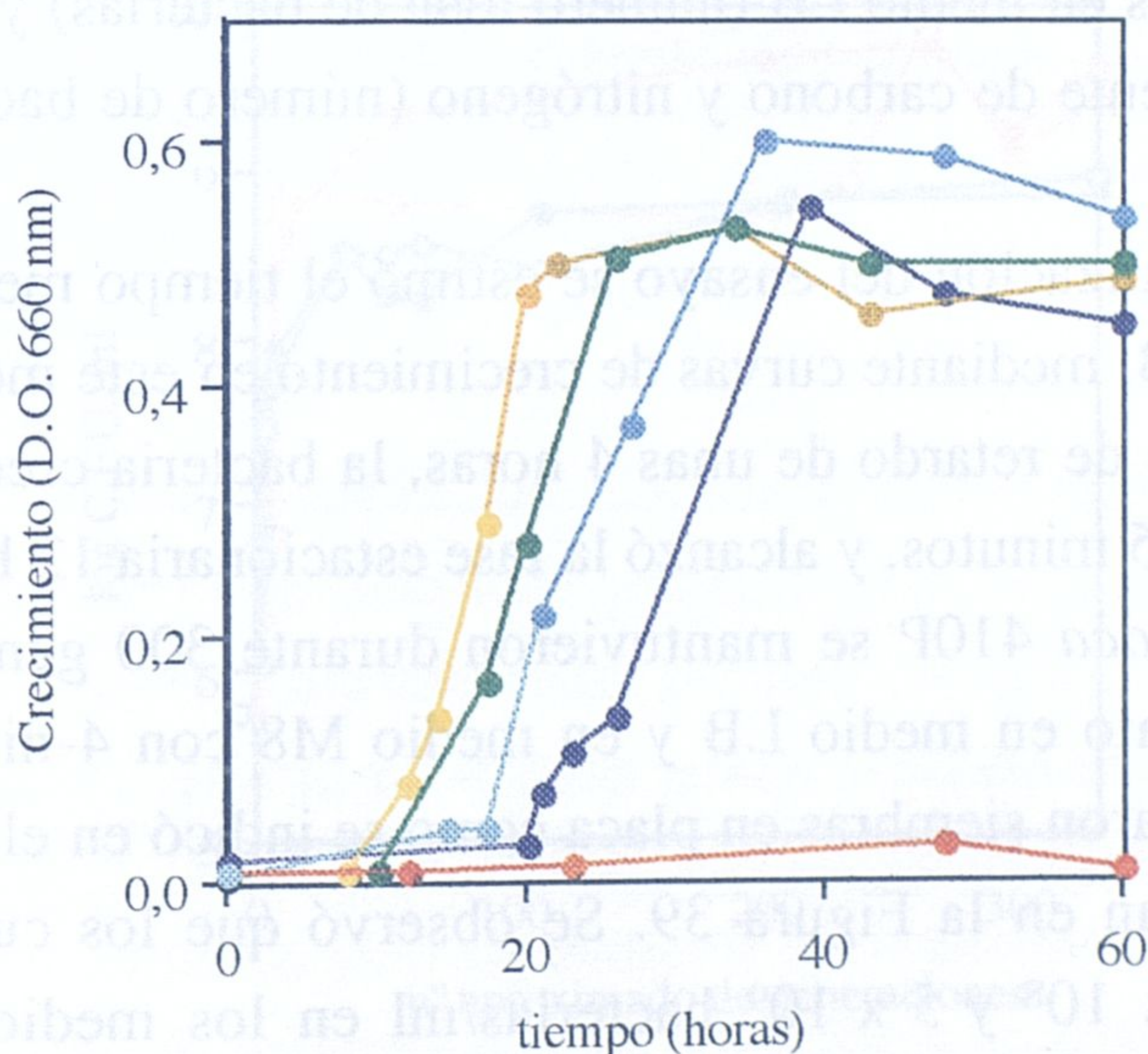
Un cultivo de la bacteria 410P en M8 con 5 mM de 4-nitrobenzoato se diluyó 1/100 en M8 suplementado con extracto de levadura 0,02% (p/v) (◐); 4-nitrobenzoato 5 mM (○); o extracto de levadura 0,02% (p/v) y 4-nitrobenzoato 5 mM (●). Los cultivos se incubaron a 30°C con agitación, y a los tiempos indicados se determinó su turbidez.

La adición de extracto de levadura estimuló el crecimiento de la bacteria 410P en 4-nitrobenzoato, ya que disminuyó la fase de latencia del cultivo y aumentó la densidad celular final del mismo. Sin embargo el extracto de levadura no es necesario para el crecimiento de la bacteria 410P a expensas de 4-nitrobenzoato, ya que es capaz de utilizar 4-nitrobenzoato como fuente de carbono y nitrógeno también en ausencia de éste como se ha visto anteriormente (Figuras 1 y 4). De este modo el extracto de levadura en cultivos de 410P se añadió ocasionalmente con objeto de acortar la fase de latencia.

2.2.4. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de la cepa 410P

Con objeto de determinar la temperatura óptima de crecimiento de 410P en 4-nitrobenzoato, se siguieron las curvas de crecimiento en medio mínimo M8 suplementado con 5 mM de 4-nitrobenzoato a distintas temperaturas. Los resultados de estos ensayos se muestran en la Figura 37.

Figura 37. Crecimiento de *K. oxytoca* 410P a distintas temperaturas.



Un cultivo de la cepa 410P en M8 con 5 mM de 4-nitrobenzoato se diluyó 100 veces en el mismo medio. Los cultivos se incubaron con agitación a 12°C (●), 20°C (●), 25°C (●), 30°C (●) y 37°C (●), y la turbidez de éstos se determinó a los tiempos que se indican.

Como puede observarse el crecimiento de 410P se vió inhibido a 37°C. Por debajo de esta temperatura el crecimiento de la bacteria siguió curvas similares, y se alcanzaron valores máximos de turbidez de aproximadamente 0,5. A 12°C y 20°C la fase de latencia de los cultivos fue alrededor de 2 veces superior a la de 25°C y 30°C. El tiempo medio de generación a 12°C y a 20°C fue del orden de 5 horas, mientras que a 25°C y 30°C fue del orden de 2-3 horas. Por tanto la temperatura óptima de crecimiento para la bacteria 410P en medio M8 con 4-nitrobenzoato se encuentra entre 25 y 30°C.

2.3. EL FENOTIPO DE CRECIMIENTO EN 4-NITROBENZOATO DE LA BACTERIA 410P ES ESTABLE

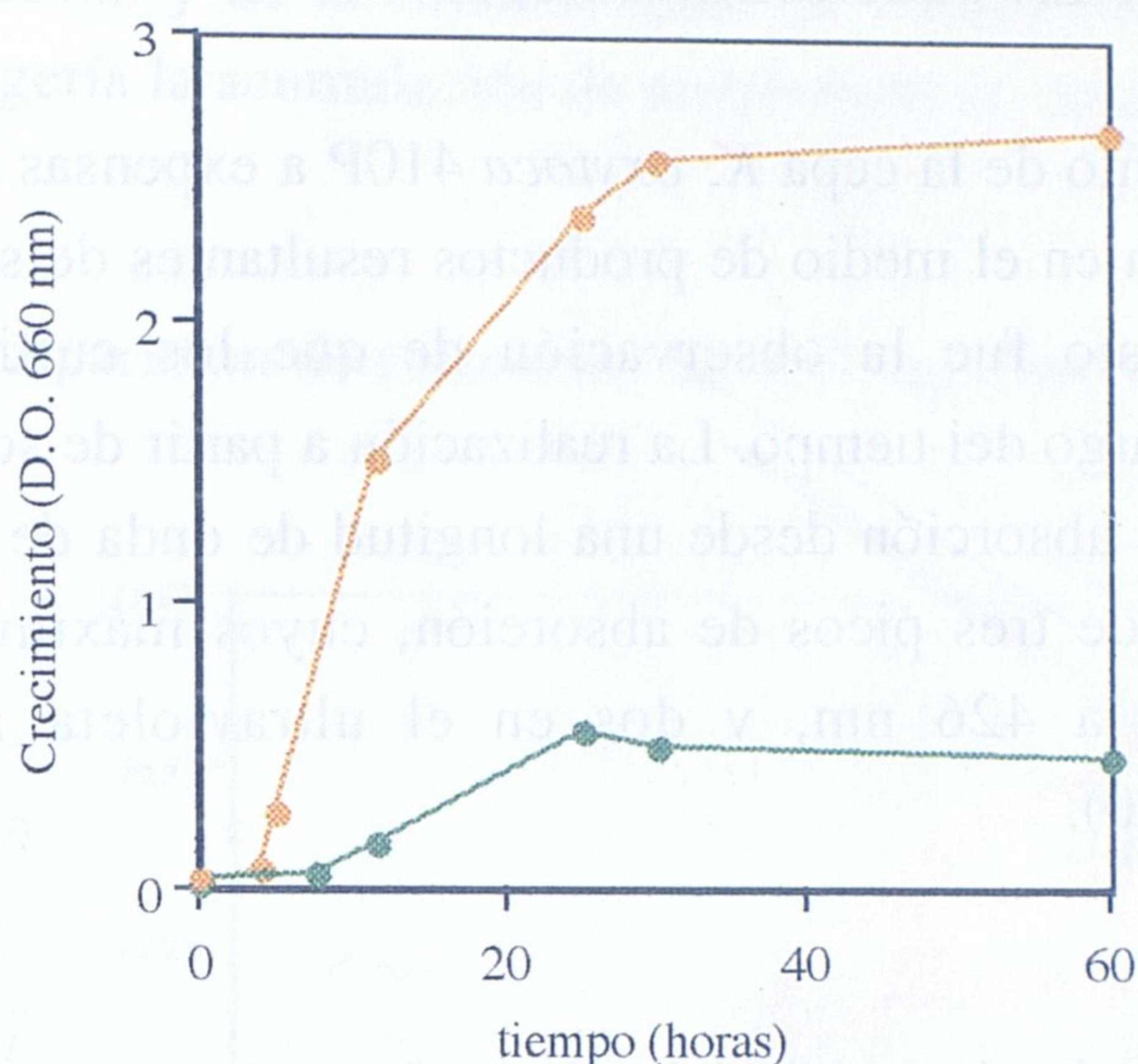
En distintos sistemas bacterianos se ha observado la inestabilidad de determinadas capacidades metabólicas, lo cual suele estar relacionado con la pérdida de plásmidos que codifican la información para el desarrollo de las mismas en ausencia de presión selectiva (Williams y Murray, 1974; Williams, 1981).

Para estudiar la estabilidad del fenotipo asociado a *K. oxytoca* 410P de crecer en 4-nitrobenzoato, se cultivó la bacteria en medio rico LB, ausencia de presión selectiva, y en medio mínimo M8 suplementado con 4-nitrobenzoato como medio con presión selectiva. En ambos casos los conteos se hicieron mediante siembra de diluciones seriadas de ambos cultivos en medio LB (número total de bacterias) y en medio M8 con 4-nitrobenzoato como fuente de carbono y nitrógeno (número de bacterias que crecían en el nitroaromático).

Previamente a la realización del ensayo se estimó el tiempo medio de generación de *K. oxytoca* 410P en LB, mediante curvas de crecimiento en este medio. La Figura 38 muestra que tras una fase de retardo de unas 4 horas, la bacteria creció con un tiempo medio de generación de 45 minutos, y alcanzó la fase estacionaria 12 horas más tarde.

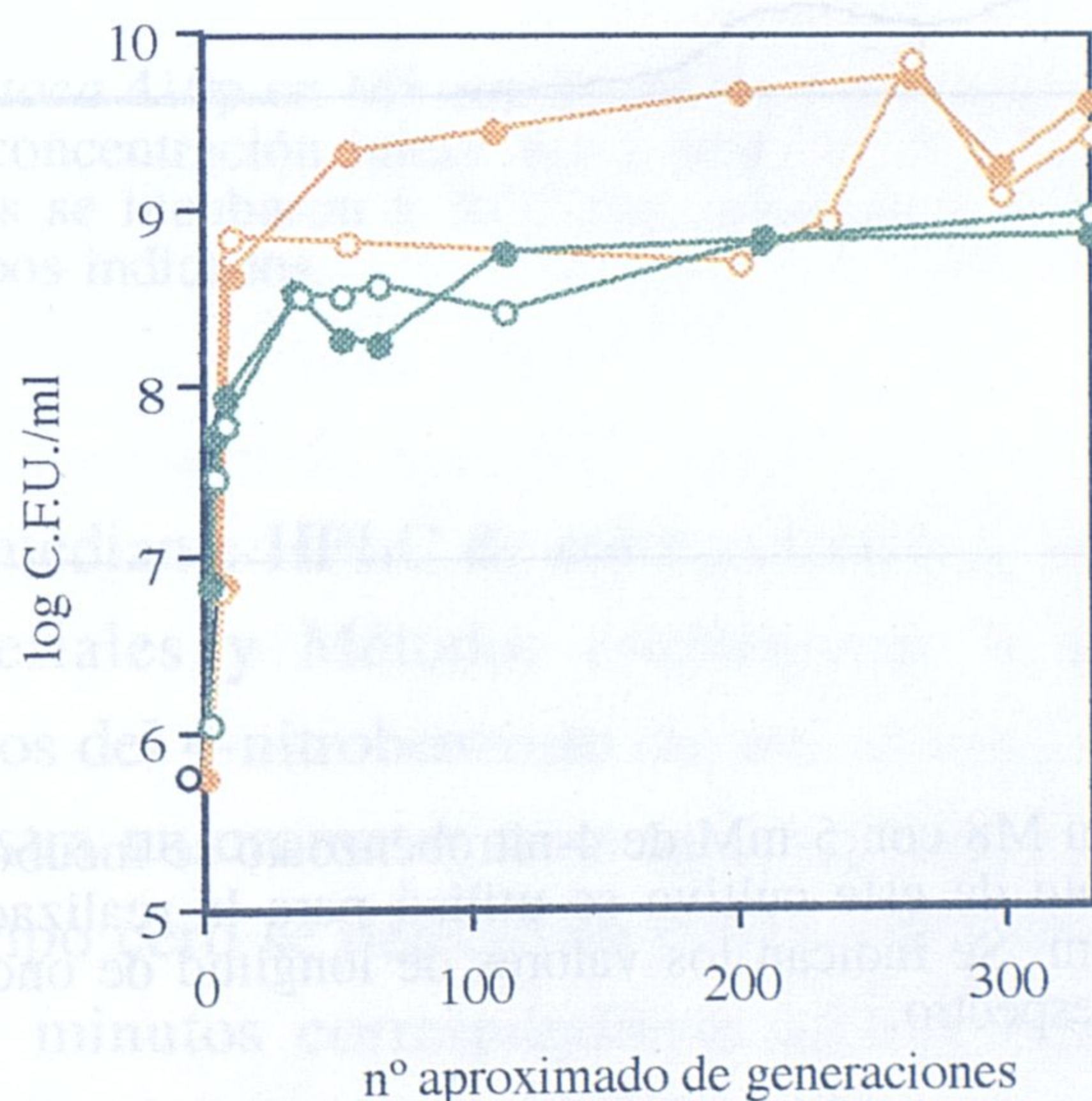
Cultivos de *K. oxytoca* 410P se mantuvieron durante 300 generaciones en fase exponencial de crecimiento en medio LB y en medio M8 con 4-nitrobenzoato. A lo largo del tiempo se realizaron siembras en placa como se indicó en el párrafo anterior y los resultados se muestran en la Figura 39. Se observó que los cultivos alcanzaron niveles del orden de 5×10^8 y 5×10^9 bacterias/ml en los medios mínimo y rico respectivamente tras las 10 primeras generaciones. El número de bacterias capaces de crecer utilizando 4-nitrobenzoato como fuente de carbono y nitrógeno fue similar al de bacterias totales, lo que sugería que el fenotipo era estable en ausencia de presión selectiva.

Figura 38. Crecimiento de *K. oxytoca* 410P en medio rico y medio mínimo.



Un cultivo de la cepa 410P en M8 con 4-nitrobenzoato 5 mM se diluyó 1/100 en medio LB (●) y medio M8 con 5 mM de 4-nitrobenzoato (●). Los cultivos se incubaron con agitación a 30°C, y a los tiempos indicados se determinó su turbidez.

Figura 39. Estabilidad de la capacidad de crecimiento en 4-nitrobenzoato de *K. oxytoca* 410P cultivada en ausencia y presencia de presión selectiva.

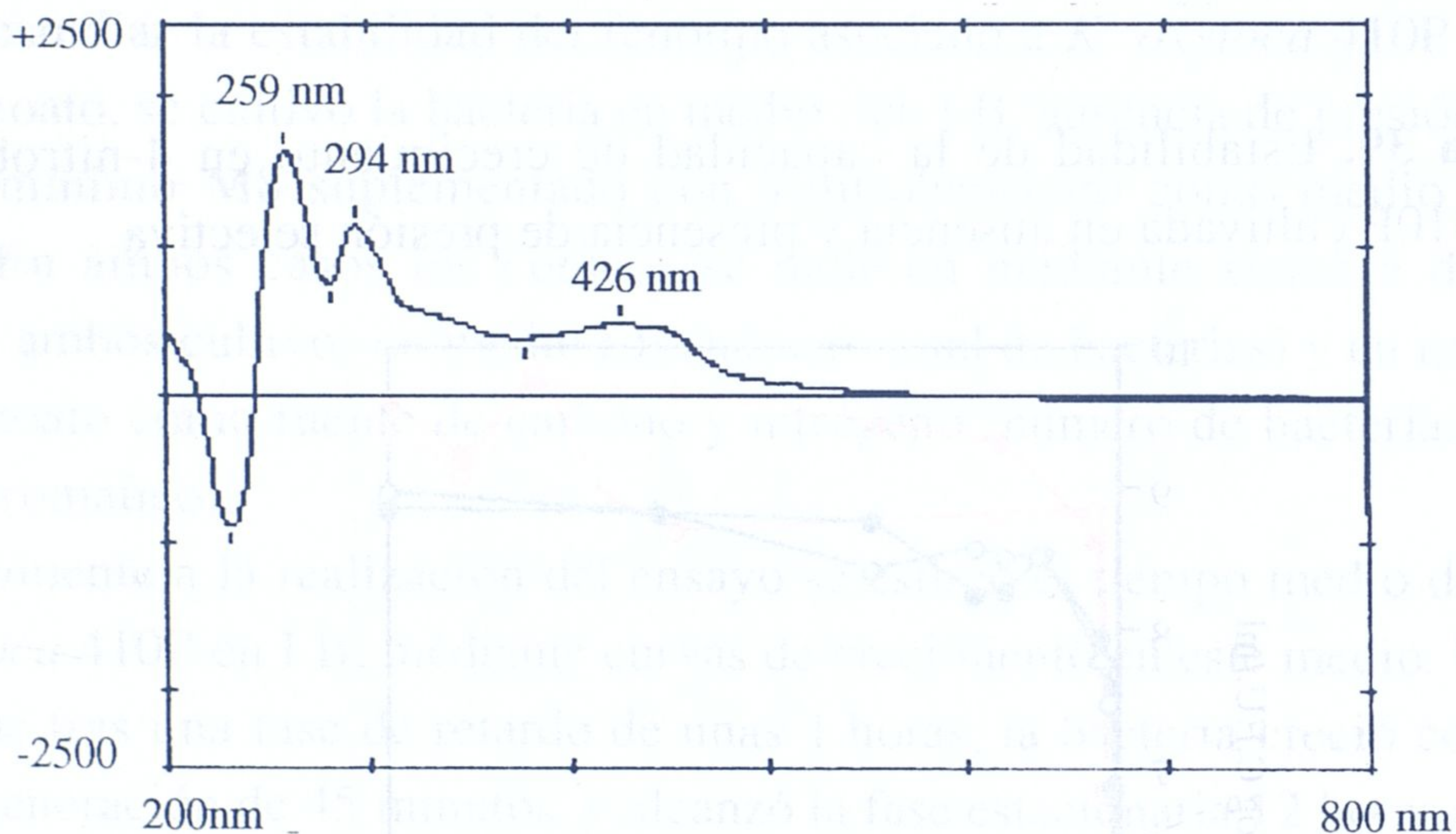


Un cultivo de la bacteria 410P en medio M8 con 5 mM de 4-nitrobenzoato se diluyó 100 veces en LB y en M8 con la misma fuente de carbono y nitrógeno. Los cultivos se incubaron a 30°C con agitación, y se diluyeron cada 12 horas y cada 24 horas respectivamente con el fin de mantener las células en fase exponencial de crecimiento. A los tiempos indicados se realizaron siembras en placa de LB (símbolos cerrados) y de M8 con 5 mM de 4-nitrobenzoato (símbolos abiertos) a partir del cultivo en LB (símbolos amarillos) y a partir del cultivo en M8 con 4-nitrobenzoato (símbolos verdes).

2.4. ACUMULACION DE METABOLITOS DURANTE EL CRECIMIENTO DE LA BACTERIA 410P EN 4-NITROBENZOATO

Durante el crecimiento de la cepa *K. oxytoca* 410P a expensas de 4-nitrobenzoato se detectó la acumulación en el medio de productos resultantes de su metabolismo. La primera evidencia de esto fue la observación de que los cultivos tomaban una coloración amarilla a lo largo del tiempo. La realización a partir de sobrenadantes de los cultivos de un barrido de absorción desde una longitud de onda de 800 nm hasta 200 nm reveló la existencia de tres picos de absorción, cuyos máximos eran uno en el espectro de luz visible a 426 nm, y dos en el ultravioleta a 259 y 294 nm respectivamente (Figura 40).

Figura 40. Espectro de absorción del sobrenadante de un cultivo de *K. oxytoca* 410P en 4-nitrobenzoato.

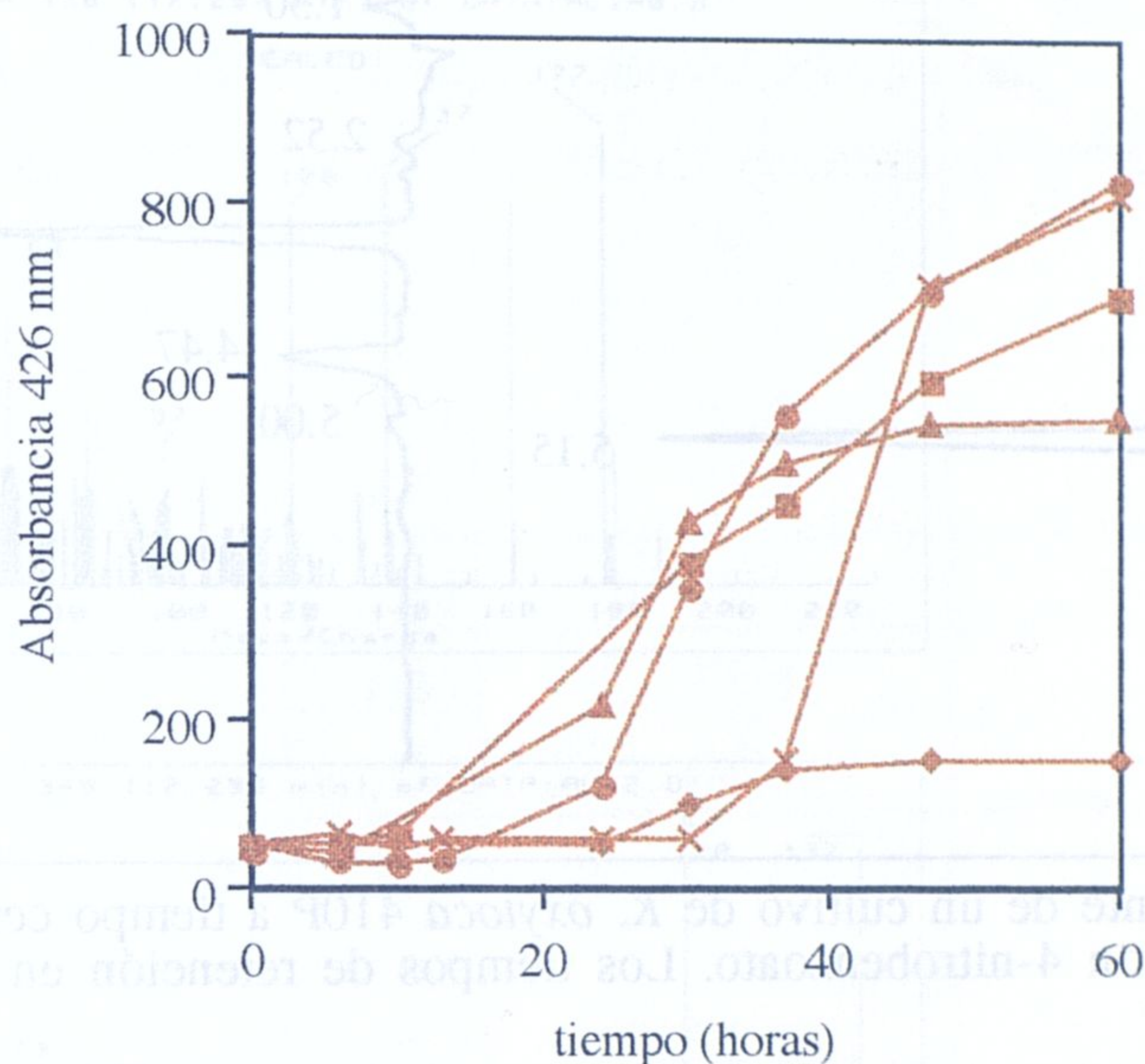


Un cultivo de *K. oxytoca* 410P en M8 con 5 mM de 4-nitrobenzoato se incubó durante 60 horas con agitación a 30°C. El sobrenadante de este cultivo se utilizó para la realización de un barrido de absorción entre 800 nm y 200 nm. Se indican los valores de longitud de onda que corresponden a los máximos de absorbancia del espectro.

Se realizaron medidas de absorbancia a 426 nm a partir de sobrenadantes de los cultivos a distintas concentraciones de 4-nitrobenzoato; los resultados se recogen en la Figura 41. Estas medidas revelaron que la coloración comenzaba a aparecer

simultáneamente a la degradación del 4-nitrobenzoato, y su intensidad dependía del tiempo de incubación y de la concentración de 4-nitrobenzoato inicial presente en el medio, lo cual sugería la acumulación de metabolitos no degradables por la bacteria.

Figura 41. Aparición de coloración amarilla en cultivos de *K. oxytoca* 410P en 4-nitrobenzoato.

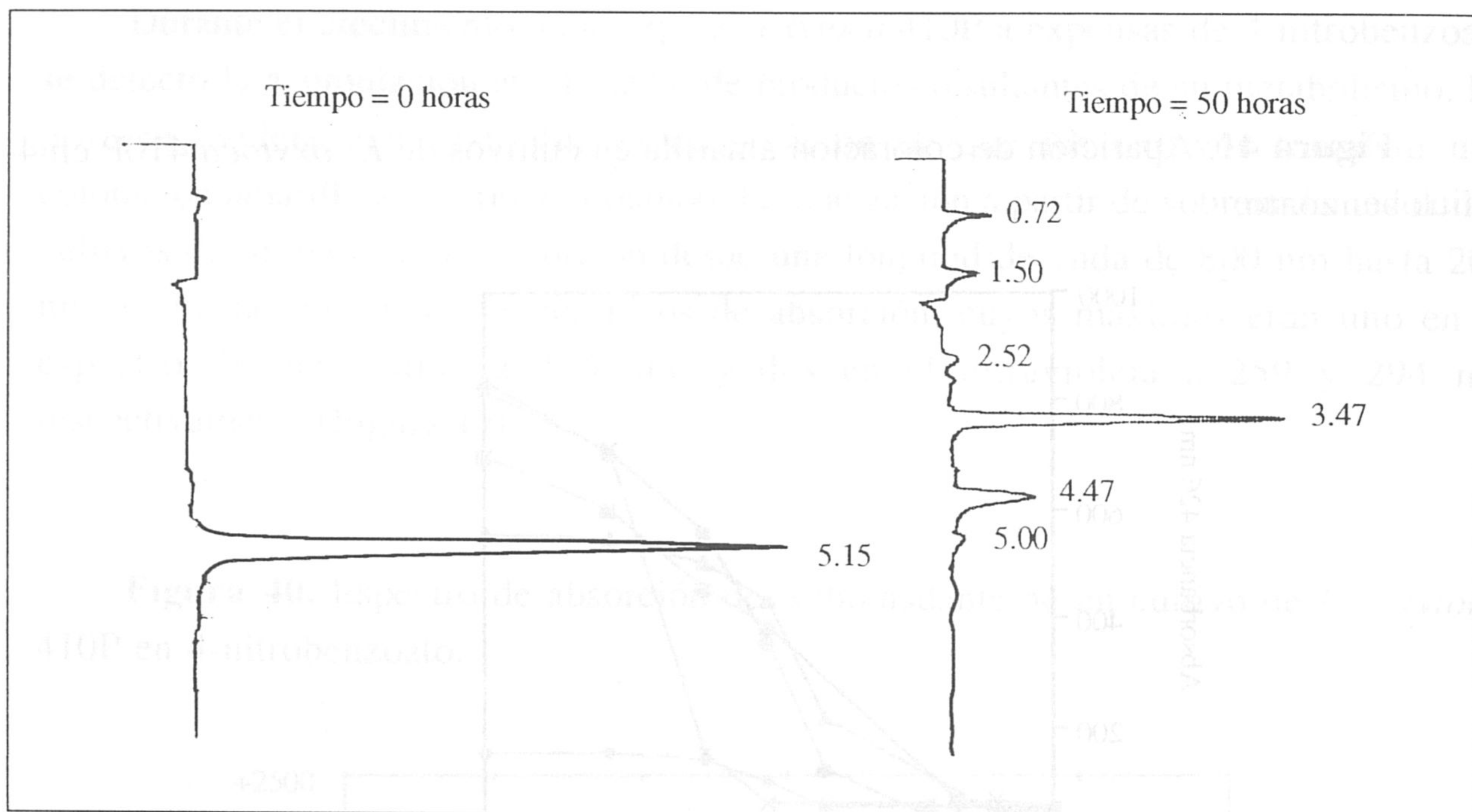


Un cultivo de *K. oxytoca* 410p en M8 con 5 mM de 4-nitrobenzoato se diluyó 1/100 en M8 con 4-nitrobenzoato, cuya concentración inicial fue 1 mM (◇), 5 mM (▲), 10 mM (■), 15 mM (●) y 20 mM (x). Los cultivos se incubaron a 30°C con agitación y la absorbancia de éstos a 426 nm se determinó a los tiempos indicados.

Los análisis mediante HPLC de sobrenadantes de estos cultivos en las condiciones descritas en Materiales y Métodos confirmaron la aparición y acumulación de compuestos distintos del 4-nitrobenzoato durante el crecimiento de 410P en este medio. La Figura 42 muestra un cromatograma típico al inicio del ensayo y tras 50 horas de incubación. A tiempo cero se detectó un solo compuesto aromático con un tiempo de retención de 5,10 minutos correspondiente al 4-nitrobenzoato. A las 50 horas de incubación se detectó la desaparición del 4-nitrobenzoato, y la aparición de al menos 4 nuevos productos cuyos tiempos de retención fueron 1.50, 2.52, 3.47 y 4.47 minutos respectivamente.

Figura 43. Espectros de masas de los compuestos mayoritarios acumulados durante el crecimiento de *K. oxytoca* 410P en 4-nitrobenzoato.

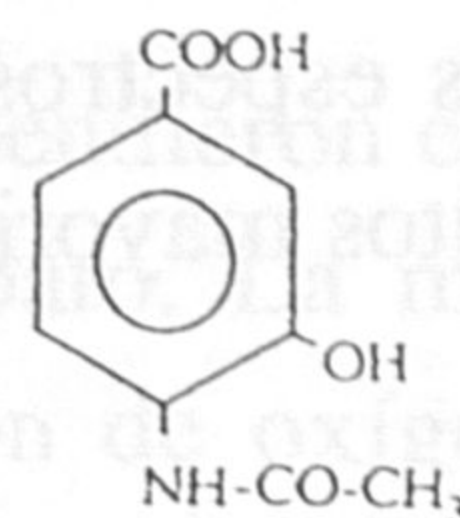
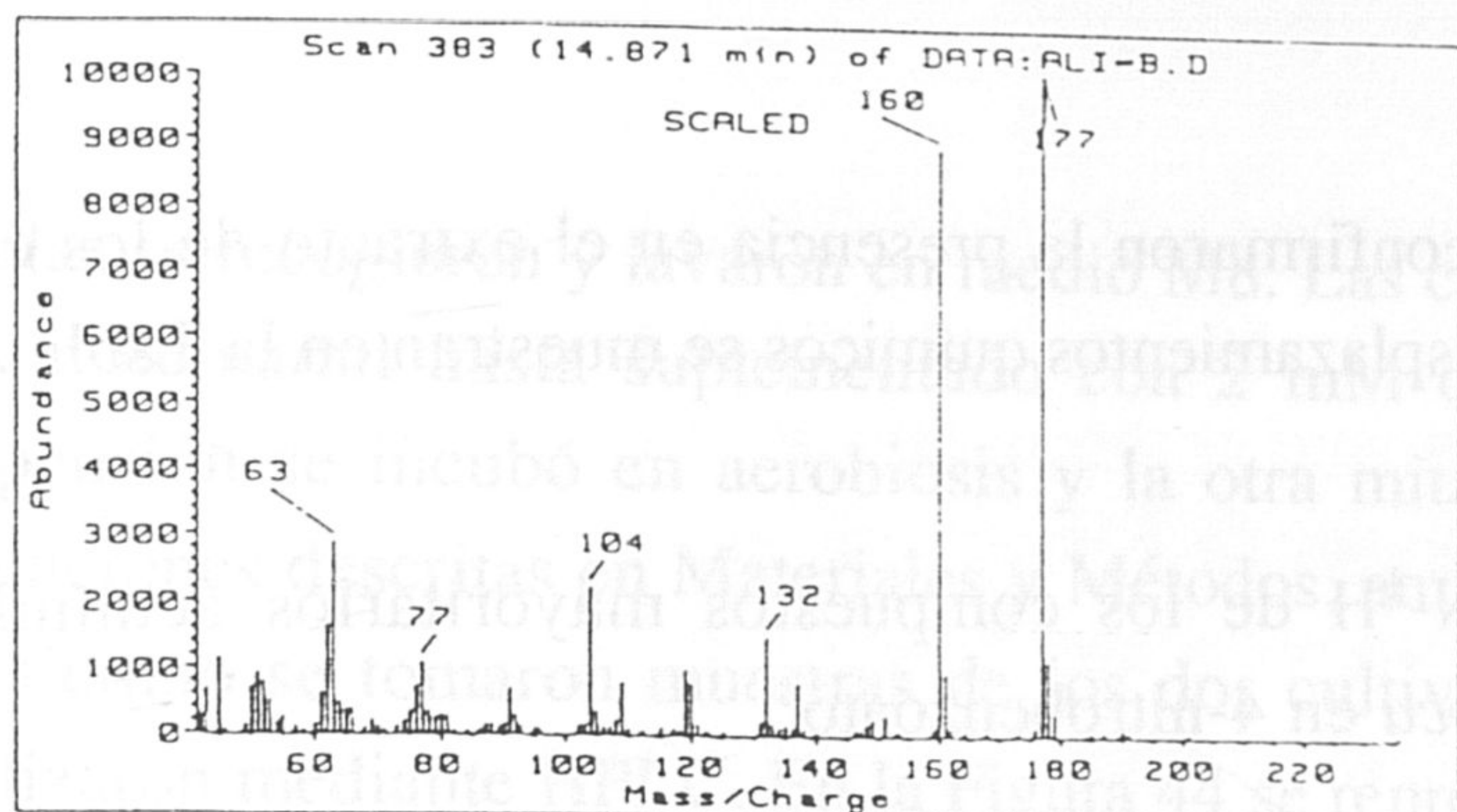
Figura 42. Acumulación de productos durante el crecimiento de la bacteria 410P en 4-nitrobenzoato.



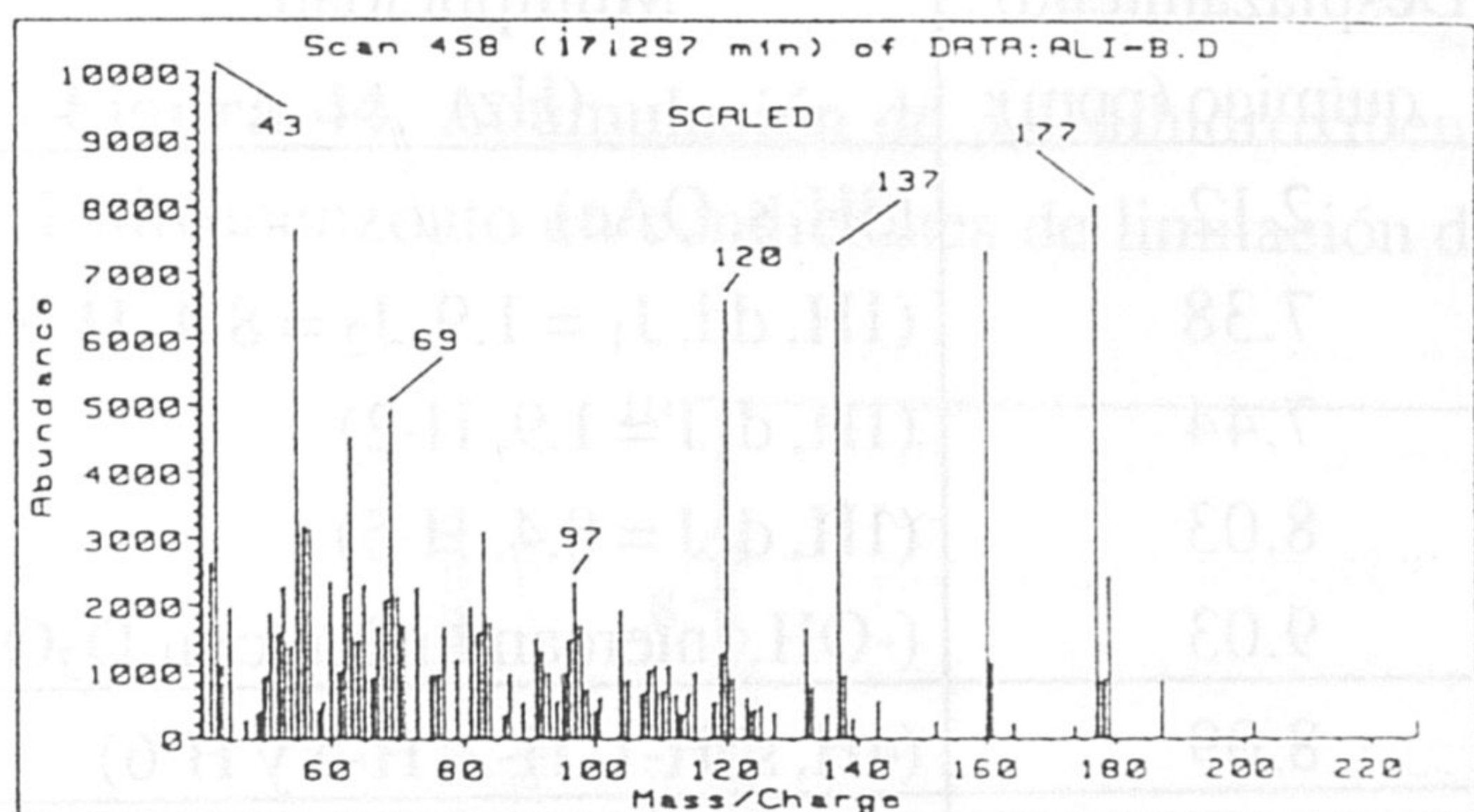
Cromatogramas del sobrenadante de un cultivo de *K. oxytoca* 410P a tiempo cero y 50 horas más tarde en medio mínimo M8 con 4-nitrobenzoato. Los tiempos de retención en minutos aparecen junto a cada pico.

Para la identificación de estos compuestos se realizaron extractos de los sobrenadantes de cultivos de la cepa 410P en M8 con 10 mM de 4-nitrobenzoato. Los extractos se analizaron mediante RMN-¹H y espectrometría de masas. Estos análisis fueron llevados a cabo en colaboración con Ali Haidour de este grupo de investigación, utilizando los equipos de los Servicios Técnicos de la Universidad de Granada.

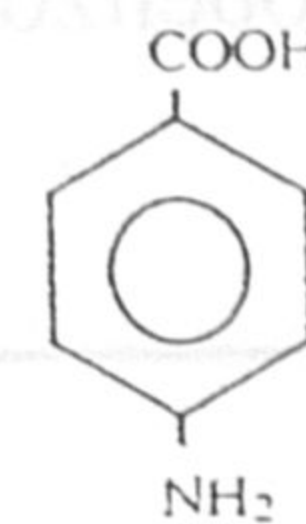
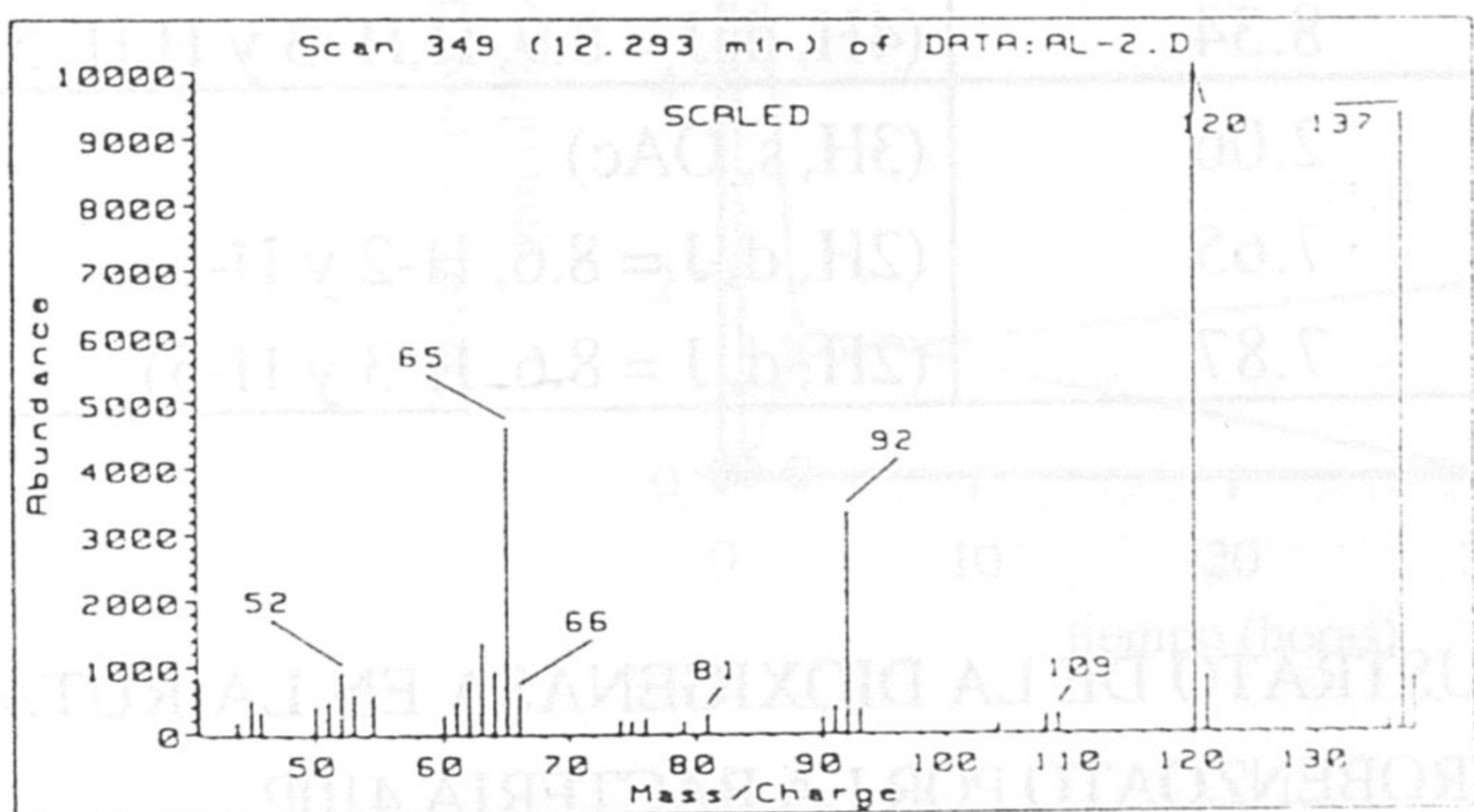
Estas pruebas permitieron la identificación de 4 productos principales, aparte de una cantidad remanente de 4-nitrobenzoato (15% del total de productos del extracto), cuyos espectros de masas aparecen en la Figura 43. Los compuestos fueron 3-hidroxi-4-acetilaminobenzoato (75% del total), 4-acetilaminobenzoato (9% del total), 4-aminobenzoato (1% del total) y 4,4'-azoxibenzoato (trazas). Los tiempos de retención en HPLC que corresponden a estos compuestos son de 3.47, 3.55, 2.52 y 4.47 minutos respectivamente. No se logró identificar en el extracto ningún compuesto con un tiempo de retención 1.50 minutos.



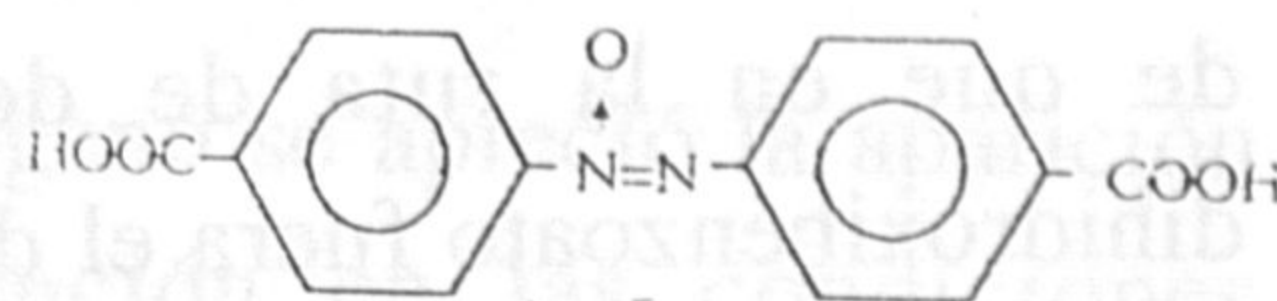
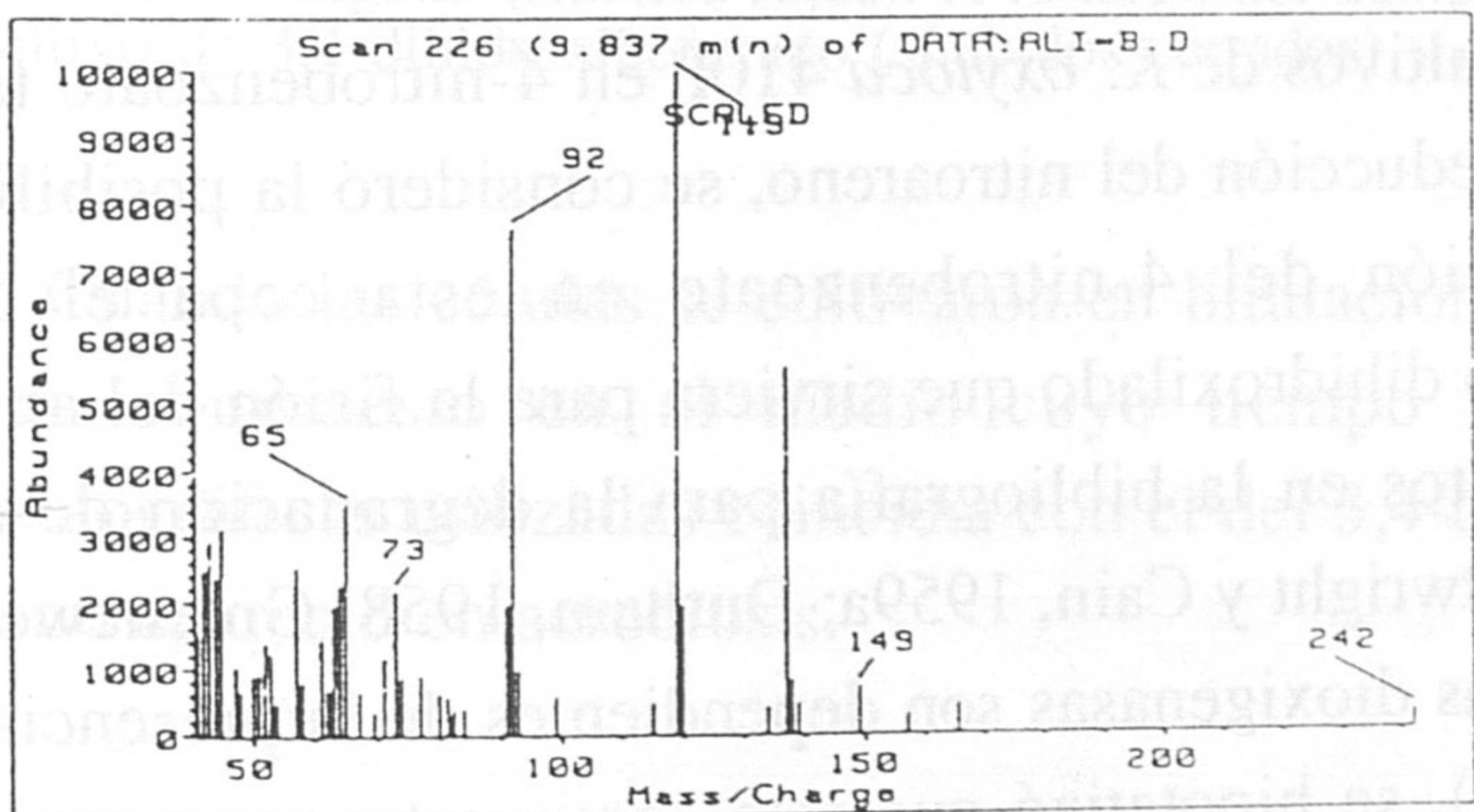
3-hidroxi,
4-acetilaminobenzoato



4-acetilaminobenzoato



4-aminobenzoato



4,4'-azoxibenzoato

Figura 43. Espectros de masas de los compuestos mayoritarios acumulados durante el crecimiento de *K. oxytoca* 410P en 4-nitrobenzoato.

Los espectros de RMN-¹H confirmaron la presencia en el extracto de los cuatro metabolitos mayoritarios, cuyos desplazamientos químicos se muestran en la Tabla 22.

Tabla 22. Valores de RMN-¹H de los compuestos mayoritarios acumulados durante el crecimiento de *K. oxytoca* en 4-nitrobenzoato

Compuesto	Desplazamiento químico (ppm)	Multiplicidad (Hz)
3-hidroxi-4-acetilaminobenzoato	2.12	(3H, s, OAc)
	7.38	(1H, dd, J ₁ = 1.9, J ₂ = 8.4, H-6)
	7.44	(1H, d, J = 1.9, H-2)
	8.03	(1H, d, J = 8.4, H-5)
	9.03	(-OH, intercambiable con D ₂ O)
4-nitrobenzoato	8.09	(4H, s, H-1, H-2, H-5 y H-6)
4,4'-azoxibenzoato	8.15	(4H, d, J = 8.9, H,H'-2 y H,H'-6)
	8.34	(4H, d, J = 8.9, H,H'-3 y H,H'-5)
4-acetilaminobenzoato	2.06	(3H, s, OAc)
	7.65	(2H, d, J = 8.6, H-2 y H-6)
	7.87	(2H, d, J = 8.6, H-3 y H-5)

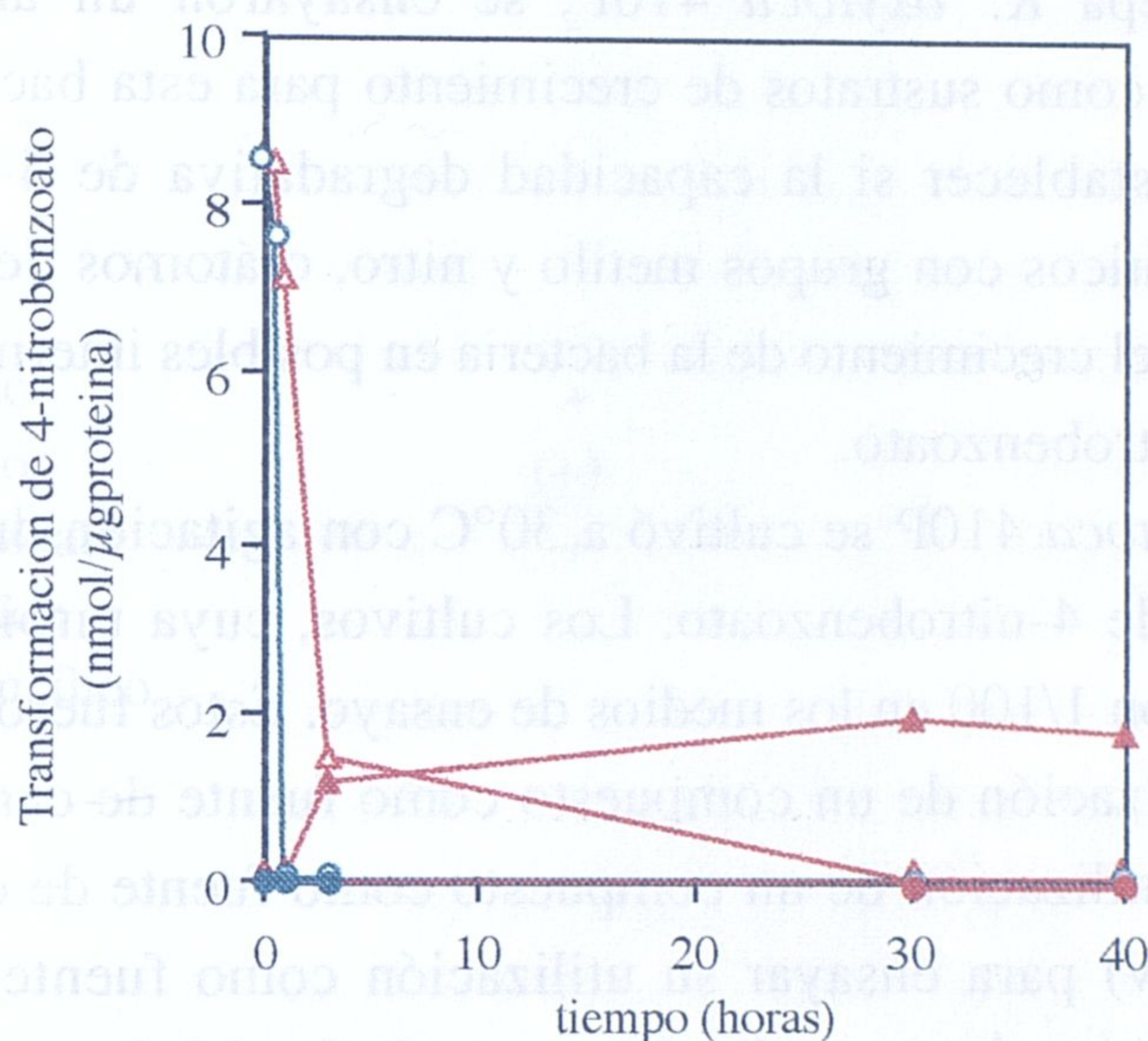
2.5. IDENTIFICACION DEL SUSTRATO DE LA DIOXIGENASA EN LA RUTA DE DEGRADACION DE 4-NITROBENZOATO POR LA BACTERIA 410P

Debido a la acumulación en cultivos de *K. oxytoca* 410P en 4-nitrobenzoato tanto de amonio como de productos de reducción del nitroareno, se consideró la posibilidad de que en la ruta de degradación del 4-nitrobenzoato en esta cepa el 3,4-dihidroxibenzoato fuera el derivado dihidroxilado que sirviera para la fisión del anillo, como ocurre en otros casos descritos en la bibliografía para la degradación de este compuesto por la vía reductiva (Cartwright y Cain, 1959a; Durham, 1958; Groenewegen *et al.*, 1992). Puesto que los enzimas dioxigenasas son dependientes de la presencia de oxígeno (Harayama y Reikik, 1989), se hipotetizó que este compuesto se acumularía mediante el bloqueo de la ruta en condiciones de limitación de oxígeno.

Para realizar el ensayo un cultivo de la cepa 410P de 500 ml en M8 suplementado con 5 mM de 4-nitrobenzoato se incubó a 30°C con agitación durante 24 horas. Las

células se recogieron y lavaron en medio M8. Las células se resuspendieron en M8 (230 mg proteína/ml hasta suplementado con 2 mM de 4-nitrobenzoato. La mitad de la suspensión se incubó en aerobiosis y la otra mitad en limitación de oxígeno en las condiciones descritas en Materiales y Métodos, ambas a 30°C con agitación. A lo largo del tiempo se tomaron muestras de los dos cultivos, y los sobrenadantes de éstos se analizaron mediante HPLC. En la Figura 44 se representan los resultados obtenidos.

Figura 44. Acumulación de 3,4-dihidroxibenzoato en un cultivo de la cepa 410P con 4-nitrobenzoato en condiciones de limitación de oxígeno.



Células de *K. oxytoca* 410P (230 mg proteína/ml) se incubaron en aerobiosis (símbolos verdes) o con limitación de oxígeno (símbolos rojos). A lo largo del tiempo se estimó la concentración en el medio de cultivo de 3,4-dihidroxibenzoato (símbolos cerrados) y de 4-nitrobenzoato (símbolos abiertos).

Cuando las células se cultivaron en limitación de oxígeno se apreció la aparición de un compuesto en el medio cuyo tiempo de retención en las condiciones cromatográficas utilizadas coincidía con el del 3,4-dihidroxibenzoato, mientras que este pico no apareció en aerobiosis.

2.4. SUSTRATOS DE CRECIMIENTO DE LA BACTERIA 410P

Algunas bacterias, entre las que se encuentra *P. putida* 2440 (pWW0), son capaces de utilizar una gran variedad de compuestos aromáticos como sustratos de crecimiento. Esto está relacionado con un amplio perfil de sustratos de los primeros enzimas de las rutas degradativas, que permiten la canalización a un número restringido de formas activadas, como se ha descrito en la Introducción de este trabajo. En otros casos la utilización de múltiples sustratos se debe a la existencia en el microorganismo de una amplia gama de enzimas catabólicos (Reineke, 1984; Clarke, 1986).

Con objeto de determinar la especificidad de la ruta de degradación de 4-nitrobenzoato de la cepa *K. oxytoca* 410P, se ensayaron un amplio número de compuestos aromáticos como sustratos de crecimiento para esta bacteria. El objeto de estos ensayos fue: i) establecer si la capacidad degradativa de 4-nitrobenzoato era ampliable a otros aromáticos con grupos metilo y nitro, o átomos de cloro en distintas posiciones, y ii) estimar el crecimiento de la bacteria en posibles intermediarios de la ruta de degradación del 4-nitrobenzoato.

La bacteria *K. oxytoca* 410P se cultivó a 30°C con agitación durante 36 horas en medio M8 con 5 mM de 4-nitrobenzoato. Los cultivos, cuya turbidez a 660 era del orden de 0,6, se diluyeron 1/100 en los medios de ensayo. Estos fueron los siguientes: i) M8 para ensayar la utilización de un compuesto como fuente de carbono y nitrógeno; ii) M9 para ensayar la utilización de un compuesto como fuente de carbono; y iii) M8 con fructosa 0,5 % (p/v) para ensayar su utilización como fuente de nitrógeno. La concentración del aromático fue en todos los casos de 3 mM. La serie de compuestos utilizados se relacionan en la Tabla 23 indicando su ensayo como fuente de carbono, nitrógeno, o carbono y nitrógeno. Los cultivos se incubaron durante 72 horas con agitación a 30°C, y al cabo de este tiempo se determinó el crecimiento de 410P en estos medios como turbidez a 660 nm. En la Tabla 23 se recogen los resultados obtenidos.

La bacteria carece de los enzimas necesarios para la degradación de toluenos ya que no fue capaz de crecer en tolueno ni en ninguno los nitrotoluenos probados. El alcohol 4-nitrobencílico y el 4-nitrobenzaldehído no son utilizados como sustratos de crecimiento por esta cepa. La bacteria tampoco crecía en alcohol bencílico o benzaldehído.

Se ensayó el crecimiento de la cepa en compuestos aromáticos como benceno, fenol, benzoato, salicilato y catecol que son considerados como encrucijadas metabólicas en la biodegradación de diversos compuestos aromáticos. De éstos, la cepa *K. oxytoca* 410P únicamente creció en benzoato.

Tabla 23. Espectro de sustratos para el crecimiento de *K. oxytoca* 410P.

compuesto	carbono	nitrógeno	carbono y nitrógeno
benceno	-		
fenol	-		
tolueno	-		
alcohol bencílico	-		
benzaldehído	(+)		
benzoato	+		
salicilato	-		
catecol	-		
3-metilbenzoato	-		
4-metilbenzoato	-		
3-clorobenzoato	-		
4-clorobenzoato	-		
3-hidroxibenzoato	+		
4-hidroxibenzoato	(+)		
3,4-dihidroxibenzoato	+		
4-nitrobenzaldehído		-	
alcohol 4-nitrobencílico		-	
2-nitrofenol		-	
3-nitrofenol		-	
4-nitrofenol		-	
4-nitrocatecol	-	-	
4-nitrotolueno		-	
2,4-dinitrotolueno	-	-	
2,6-diamino,4-nitrotolueno	-	-	
4-aminobenzoato	-	-	
anilina		-	
3-aminosalicilato	-	-	
5-aminosalicilato	-	-	
2-nitrobenzoato		-	-
3-nitrobenzoato		-	-
4-nitrobenzoato	+	+	+
2,4-dinitrobenzoato		-	-
3,5-dinitrobenzoato		-	-

Los compuestos indicados se ensayaron como fuente de carbono y/o nitrógeno para la cepa 410P de *Klebsiella oxytoca*. "+" indica crecimiento ($A_{660} > 0,5$), "(+)" crecimiento pobre ($0,2 < A_{660} < 0,5$) y "-" ausencia de crecimiento ($A_{660} < 0,08$). La concentración de los compuestos aromáticos fué 3 mM.

Otros compuestos aromáticos con sustituciones de tipo amino y nitro diferentes del 4-nitrobenzoato, tampoco fueron utilizados ni como fuente de carbono ni de nitrógeno por esta cepa. El hecho de que tampoco fuera capaz de crecer en nitrocatecol sugirió que la eliminación del grupo nitro en la degradación del 4-nitrobenzoato por esta bacteria ocurría antes que la fisión del anillo aromático.

Se ensayaron también otros aromáticos con grupos metilo e hidroxilo y átomos de cloro. Ninguno de ellos fue sustrato de crecimiento de *K. oxytoca* 410P. Sin embargo esta cepa creció en 3-hidroxibenzoato y 3,4-dihidroxibenzoato, y con menor rendimiento en 4-hidroxibenzoato. Esto sugirió que estos compuestos podrían ser intermediarios en la ruta de degradación de 4-nitrobenzoato por la bacteria 410P, ya que se han descrito rutas degradativas de nitrobenzoatos en las que la retirada del grupo nitro de la molécula resulta en un derivado dihidroxilado (Cain y Cartwright, 1960; Groenewegen *et al.*, 1992; Haigler y Spain, 1993).

Por tanto, *K. oxytoca* 410P presenta un metabolismo muy restringido en la utilización de compuestos aromáticos.

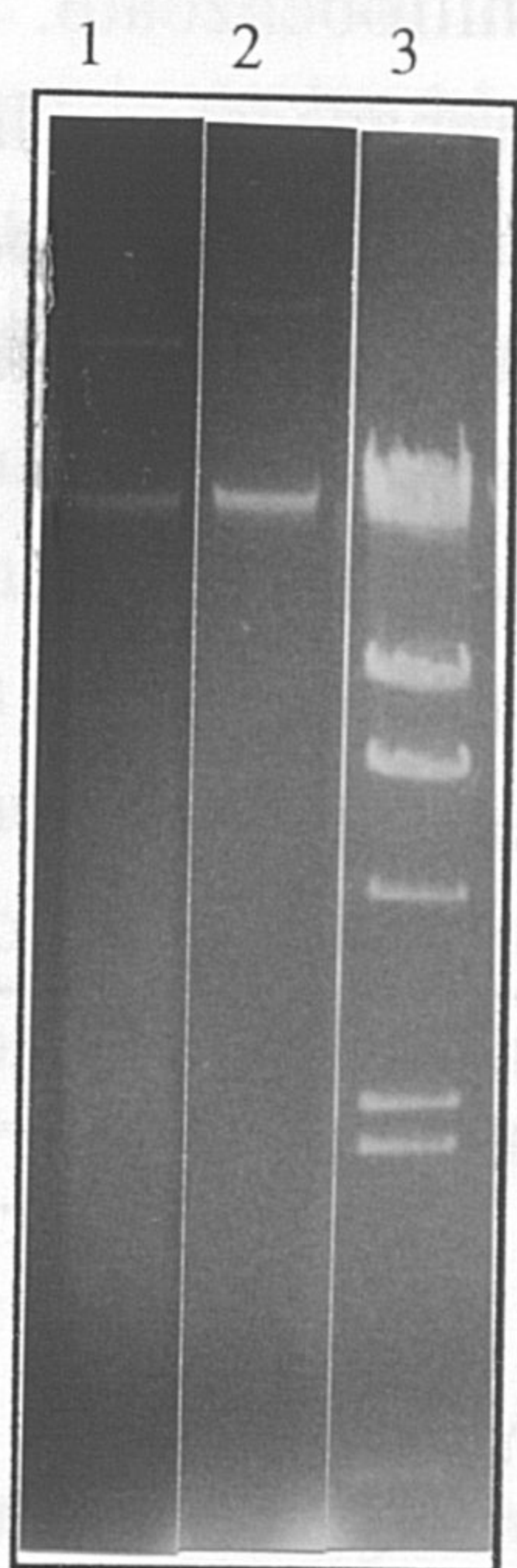
3. PRESENCIA DE UN MEGAPLASMIDO EN LA BACTERIA 410P

Desde los años 70 se han descrito numerosos casos en los que bacterias con capacidades catabólicas determinadas perdían estas capacidades espontáneamente e irreversiblemente, y que éstas eran transferibles por conjugación a otras especies (Williams, 1981). La evidencia genética de que estas capacidades están estrechamente relacionadas con la presencia de plásmidos quedó patente durante esta década (Dunn y Gunsalus, 1973; Williams y Murray, 1974), y desde entonces se han descrito numerosos casos en los que se ha demostrado que rutas catabólicas completas o partes de ellas son de codificación plasmídica (Farrell y Chakrabarty, 1979; Franz y Chakrabarty, 1987; Haas, 1983). En el caso de rutas degradativas de compuestos nitroaromáticos, y aparte de en este trabajo en el que se ha demostrado que los elementos enzimáticos de la ruta "upper" de TOL son permisivos para la oxidación de 3- y 4-nitrotolueno, sólo se ha descrito la presencia de un plásmido en el caso de la degradación de 2,4-dinitrotolueno por una cepa del género *Pseudomonas* (Suen y Spain, 1993).

En este trabajo se ha analizado la presencia de plásmidos en la cepa 410P, para lo cual se procedió a la extracción de ADN de la bacteria. Se partió de un cultivo de 25 ml de la cepa 410P en medio M8 suplementado con 10 mM de 4-nitrobenzoato que había sido incubado a 30°C con agitación durante 30 horas. La extracción de ADN se realizó según el método descrito para la extracción de megaplásmidos en el apartado

correspondiente de la sección de Materiales y Métodos. La Figura 45 muestra una fotografía de una electroforesis en un gel de agarosa de ADN procedente del cultivo. Estos análisis revelaron la presencia en las células de 410P de un megaplásmido de un tamaño superior al del plásmido TOL pWW0, y del orden de 150 Kb.

Figura 45. Extracción de ADN de megaplásmidos de *K. oxytoca* 410P.



Electroforesis en gel de agarosa 0,7% (p/v) de ADN de megaplásmidos de *K. oxytoca* 410P y *P. putida* 2440 (pWW0) extraído según el sistema descrito en Materiales y Métodos. ADN de TOL (línea 1); megaplásmido de 410P (línea 2); ADN de fago λ cortado con *Hind*III (línea 3).

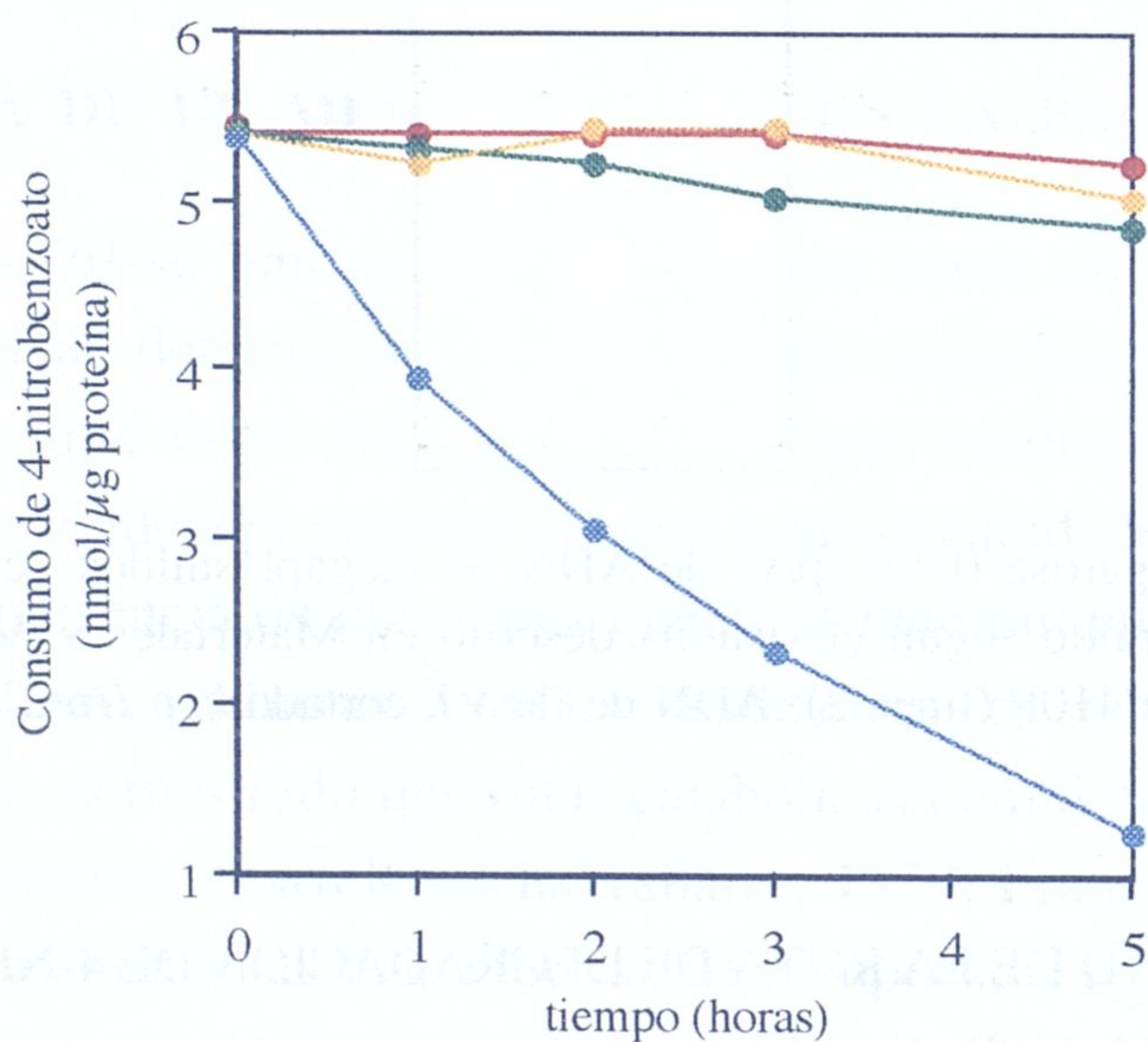
3.2. INDUCIBILIDAD DE LA RUTA DE DEGRADACION DE 4-NITROBENZOATO DE LA BACTERIA 410P

Las rutas catabólicas en general se encuentran sometidas a procesos de regulación (Nakazawa e Inouye, 1986). Se reconoce que la inducción en respuesta a la presencia de los sustratos es un mecanismo de ahorro en la síntesis de proteínas. De este modo, era de interés conocer si los genes responsables de la degradación de 4-nitrobenzoato por la cepa 410P eran inducibles o no.

La velocidad de desaparición del 4-nitrobenzoato por células precultivadas en 4-nitrobenzoato y en otras fuentes de carbono y nitrógeno indicaría la inducibilidad o no

de la ruta. Para ello se partió de células de *K. oxytoca* 410P en distintas fuentes de carbono, a saber: glucosa, un metabolito ajeno a esta ruta, ácido benzoico y ácido 3,4-dihidroxibenzoico como posibles intermediarios de ésta y 4-nitrobenzoato como sustrato de la ruta. Tras 24 horas de cultivo en medio M9 para el caso de benzoato y 3,4-dihidroxibenzoato, y medio M8 para el caso de 4-nitrobenzoato, las células se recogieron por centrifugación y se lavaron en M8. Finalmente se resuspendieron en M8 hasta alcanzar una concentración de proteína de aproximadamente 55 mg/ml y se suplementaron con 0,3 mM de 4-nitrobenzoato. A lo largo del tiempo se retiraron alícuotas de cada cultivo, y los sobrenadantes se inyectaron en el HPLC con el fin de detectar la concentración remanente del 4-nitrobenzoato en cada uno de ellos. Los resultados de estos ensayos se muestran en la Figura 46.

Figura 46. Consumo de 4-nitrobenzoato por células de *K. oxytoca* 410P precultivadas en distintas fuentes de carbono.



K. oxytoca 410P se cultivó en medio M9 con glucosa (●), benzoato (○), 3,4-dihidroxibenzoato (●) o M8 con 4-nitrobenzoato (●). Las células se lavaron en medio M8 sin fuente de carbono y se resuspendieron en este mismo medio suplementado con 0,3 mM de 4-nitrobenzoato, hasta alcanzar una concentración de proteína de 55 mg/ml. A los tiempos indicados se estimó la concentración de 4-nitrobenzoato remanente en los sobrenadantes.

4.1. UTILIZACION DE OTROS NITROBENZOATOS POR CELULAS DE 410P PRECULTIVADAS EN 4-NITROBENZOATO

La incapacidad de la cepa 410P de utilizar otros nitrobenzoatos como fuentes de carbono y/o nitrógeno se podría deber a que los nitroaromáticos ensayados no indujeran los enzimas de la ruta, y no a una imposibilidad de reconocimiento como sustratos de las proteínas degradativas que la componen.

Para ensayar esta hipótesis, células de *K. oxytoca* 410P cultivadas en 4-nitrobenzoato se incubaron en presencia de 1 mM de 2-, 3- y 4-nitrobenzoato, y 2,4- y 3,5-dinitrobenzoato. La concentración remanente de éstos compuestos en el medio se estimó a lo largo del tiempo mediante HPLC. Las células cultivadas en medio M8 con 4-nitrobenzoato se recogieron, lavaron y resuspendieron en M8 para alcanzar una densidad celular de 50 mg de proteína/ml en presencia de 1 mM de los nitroaromáticos.

En la Tabla 24 se muestran las concentraciones inicial y final de estos compuestos a las 48 horas de incubación. Como puede verse, mientras que la desaparición de 4-nitrobenzoato es total en este tiempo, en ningún caso disminuyó la concentración de los otros nitrobenzoatos. Por tanto estos compuestos no son sustrato de los enzimas de la ruta.

Tabla 24. Utilización de diversos nitrobenzoatos por *K. oxytoca* 410P cultivada en 4-nitrobenzoato.

	Concentración (mM)	
	inicial	final
2-nitrobenzoato	1	1
3-nitrobenzoato	1	1
4-nitrobenzoato	1	0
2,4-dinitrobenzoato	1	1
3,5-dinitrobenzoato	1	1

Células de *K. oxytoca* 410P (50 mg proteína/ml) precultivadas en 4-nitrobenzoato se incubaron en presencia de 1 mM de los nitrobenzoatos que se indican. Las concentraciones inicial y tras 48 horas de incubación se estimó mediante análisis en el HPLC de los sobrenadantes de los cultivos.

... la actividad de la enzima...
 ... el tiempo de incubación...
 ... la concentración de sustrato...

... los resultados obtenidos...
 ... se muestran en la tabla...
 ... donde se puede observar...

Tabla 2. Actividad de la enzima...
 en diferentes condiciones.

Condiciones	Concentración (mM)	
	Inicial	Final
1-nitrobenxato	1	0.5
3-nitrobenxato	1	0.5
4-nitrobenxato	1	0.5
2,4-dinitrobenxato	1	0.5
3,5-dinitrobenxato	1	0.5

... los datos de la tabla...
 ... indican que la actividad...
 ... de la enzima disminuye...

de los intermediarios gratuitos de la ruta ya que no son sustrato de los enzimas *xyf* (Abril *et al.*, 1989).

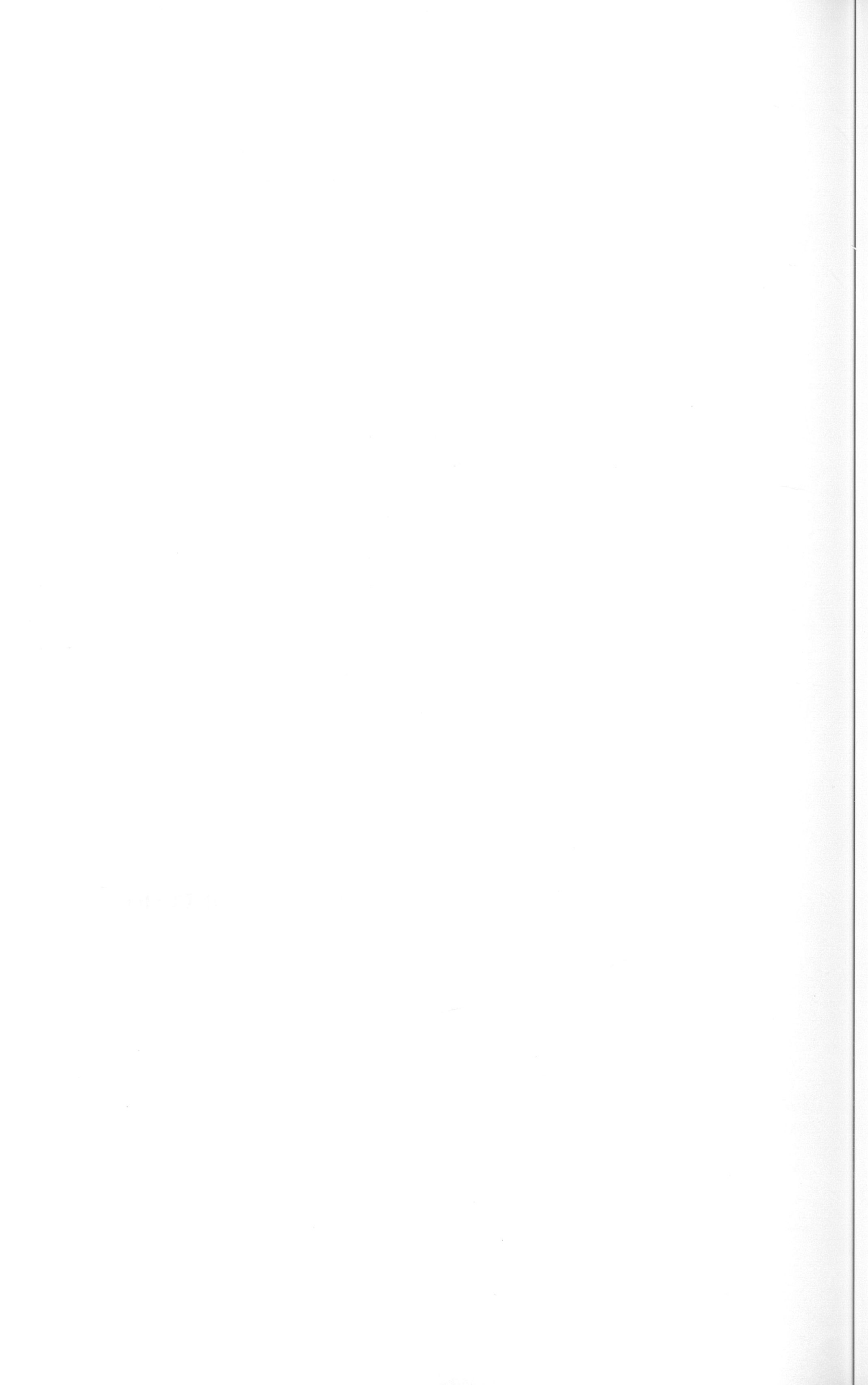
3.2.1. CONOCIMIENTO DE NITROAROMATICOS POR LOS ELEMENTOS GENETICOS ASOCIADOS Y REGULADORES DE LA RUTA "UPPER"

Los estudios sobre la especificidad de los enzimas de la ruta "upper" para la oxidación de nitrotoluenos revelaron que la tolueno monooxigenasa, la alcohol benzoico deshidrogenasa y la benzaldehído deshidrogenasa de TOL son capaces de utilizar nitrotoluenos como sustratos.

La tolueno monooxigenasa de TOL representa el cuello de botella para la degradación de los nitrotoluenos derivados del tolueno por la ruta "upper", ya que su perfil de especificidad es más restringido que el de la alcohol benzoico deshidrogenasa y la benzaldehído deshidrogenasa, según demostraron Abril *et al.* (1989). Estos estudios demostraron que existe un bloqueo a nivel de este enzima para el metabolismo de 4-nitrotolueno y que constituye el paso limitante en la velocidad de oxidación de 3- y 4-nitrotoluenos, aun cuando que ningún tolueno sustituido en la posición 2 del anillo es sustrato de la enzima (Abril *et al.*, 1989; Wubholts, 1993). Nuestros estudios sobre el perfil de especificidad de la tolueno monooxigenasa utilizaba como sustratos reveló el 3-nitrotolueno y el 4-nitrotolueno a sus correspondientes alcoholes nitrobenzoicos. Sin embargo, el 2-nitrotolueno y el 3,4-dinitrotolueno no son sustratos de éste. Estos resultados concuerdan con el estudio de Wubholts (1993) sobre la especificidad de los genes *xyf* de la ruta "upper" para la degradación de derivados del tolueno sustituidos con nitrógeno. Según este estudio, la actividad del enzima por el 3-nitrotolueno y 4-nitrotolueno es de alrededor del 50% y del 65% respectivamente, en relación con la actividad del enzima con el tolueno.

DISCUSION

Además, nuestros estudios revelaron que la tolueno monooxigenasa es capaz de oxidar además los productos resultantes de la oxidación de 3- y 4 nitrotolueno, los nitrotoluenos 3- y 4 nitrobenzoicos, hasta sus nitrobenzaldehídos correspondientes. La actividad de este enzima para catalizar la oxidación de toluenos y alcoholes benzoicos fue descrita por primera vez por Harayama *et al.* (1986), cuando analizaron los productos de distintos derivados de *P. putida* 2440 (pWWO) obtenidos por mutagénesis mutaciones, y la expresión de los enzimas de la ruta "upper" en *E. coli* portadora de algunos fragmentos de la ruta clonados bajo el control del promotor p_L del fago λ . En dicho estudio los autores demostraron que los genes *xyf/MA* que codifican para la



o-xileno, son inductores gratuitos de la ruta ya que no son sustrato de los enzimas catabólicos (Abril *et al.*, 1989).

1.1. RECONOCIMIENTO DE NITROAROMATICOS POR LOS ELEMENTOS ENZIMATICOS Y REGULADORES DE LA RUTA "UPPER"

Los estudios sobre la especificidad de los enzimas de la ruta "upper" para la oxidación de nitrotoluenos revelaron que la tolueno monooxigenasa, la alcohol bencílico deshidrogenasa y la benzaldehído deshidrogenasa de TOL son capaces de utilizar ciertos nitroaromáticos como sustratos.

La tolueno monooxigenasa de TOL representa el cuello de botella para la degradación de determinados derivados del tolueno por la ruta "upper", ya que su perfil de sustratos es más restringido que el de la alcohol bencílico deshidrogenasa y la benzaldehído deshidrogenasa, según demostraron Abril *et al.* (1989). Estos estudios revelaron que existía un bloqueo a nivel de este enzima para el metabolismo de 4-etiltolueno y que constituía el paso limitante en la velocidad de oxidación de 3- y 4-clorotolueno, amén de que ningún tolueno sustituido en la posición 2 del anillo es sustrato del enzima (Abril *et al.*, 1989; Wubbolts, 1993). Nuestros estudios sobre el perfil de nitrotoluenos que la tolueno monooxigenasa utilizaba como sustratos reveló el enzima oxidaba 3- y 4-nitrotolueno a sus correspondientes alcoholes nitrobencílicos. Por el contrario el 2-nitrotolueno y el 3,4-dinitrotolueno no son sustratos de éste. Estos resultados concuerdan con el estudio de Wubbolts (1993) sobre la especificidad de los enzimas de la ruta "upper" para la degradación de derivados del tolueno sustituidos con grupos nitro. Según este estudio, la actividad del enzima para 3-nitrotolueno y 4-nitrotolueno es de alrededor del 50% y del 65% respectivamente, en relación con la actividad del enzima con el tolueno.

Además nuestros estudios revelaron que la tolueno monooxigenasa es capaz de oxidar además los productos resultantes de la oxidación de 3- y 4-nitrotolueno, los alcoholes 3- y 4-nitrobencílicos, hasta sus nitrobenzaldehídos correspondientes. La capacidad de este enzima para catalizar la oxidación de toluenos y alcoholes bencílicos fue descrita por primera vez por Harayama *et al.* (1986), cuando analizaron los fenotipos de distintos derivados de *P. putida* 2440 (pWW0) obtenidos por mutagénesis con transposones, y la expresión de los enzimas de la ruta "upper" en *E. coli* portadora de distintos fragmentos de la ruta clonados bajo el control del promotor p_L del fago λ . En dicho estudio los autores demostraron que los genes *xylMA* que codifican para la

tolueno monooxigenasa, no sólo permitían la oxidación de tolueno a alcohol bencílico, sino que presentaban asociada una actividad alcohol bencílico deshidrogenasa que permitía la oxidación de alcohol bencílico a benzaldehído. Por tanto en la ruta "upper" de TOL existen dos actividades alcohol bencílico deshidrogenasa, la de la tolueno monooxigenasa (XylMA) y la de la alcohol bencílico deshidrogenasa (XylB). Los toluenos y alcoholes bencílicos se parecen en su estructura química, como ocurre con el sustrato y el producto de cualquier reacción. El hecho de que la tolueno monooxigenasa sea capaz de oxidar tanto un sustrato, por ejemplo el 4-nitrotolueno, como el producto de la oxidación de éste, el alcohol 4-nitrobencílico, demuestra la relajada especificidad del enzima. La tolueno monooxigenasa es un ejemplo más del amplio perfil de sustratos de algunos enzimas de TOL. El primer enzima de la ruta *meta* de este plásmido, la toluato 1,2-dioxigenasa también muestra un perfil relajado de sustratos (Lehrbach *et al.*, 1984; Reineke y Knackmuss, 1978; Wubbolts y Timmis, 1990), pero no es capaz de oxidar nitrobenzoatos (J. L. Ramos, comunicación personal).

El perfil de nitroaromáticos de la alcohol bencílico deshidrogenasa de TOL se estudió en extractos libres de *P. putida* (pWW0) cultivada en presencia de *m*-xileno. Los extractos oxidaron los alcoholes bencílicos sustituidos con grupos nitro en las posiciones 3 ó 4 del anillo, pero no sustratos como el alcohol 2-nitrobencílico o el alcohol 3,4-dinitrobencílico. Dado que la actividad estaba asociada a TOL y al crecimiento de la bacteria en presencia de un inductor de la ruta, se concluyó que el enzima responsable de la oxidación era la alcohol bencílico deshidrogenasa codificada por *xylB*. Shaw *et al.* (1992) estudiaron la especificidad de la alcohol bencílico deshidrogenasa con la proteína purificada, y confirmaron nuestros resultados sobre el perfil de nitroaromáticos del enzima. Nuestros datos mostraron que la actividad del enzima para los alcoholes 3- y 4-nitrobencílicos fue del 45% y del 25% de la actividad con el sustrato no sustituido. Shaw *et al.* (1992) propusieron que la reducida actividad del enzima con los nitroaromáticos podría deberse a que, debido al tamaño del grupo nitro, éste podría causar un impedimento estérico que dificultara la oxidación de los alcoholes 3- y 4-nitrobencílicos por el enzima. En el caso del alcohol 2-nitrobencílico, la posible formación de un enlace de hidrógeno entre un oxígeno del grupo nitro y el hidrógeno del grupo alcohol haría esta molécula resistente a la oxidación por el enzima (Shaw *et al.*, 1992).

El espectro de nitrobenzaldehídos que la benzaldehído deshidrogenasa utilizó como sustratos se determinó de igual modo en extractos libres de *P. putida* (pWW0) cultivada en presencia de *m*-xileno. Se detectó una actividad benzaldehído deshidrogenasa dependiente del cultivo de las células en presencia de este inductor que

oxidó 3- y 4-nitrobenzaldehído, pero no 2-nitrobenzaldehído ni 2,6-dinitrobenzaldehído. Los estudios de especificidad de sustrato del enzima purificado realizados por Shaw *et al.* (1992) confirmaron nuestros resultados. La actividad benzaldehído deshidrogenasa con 3 y 4-nitrobenzaldehído fue del orden de 2 veces superior que con benzaldehído. Según Shaw *et al.* (1992) la actividad benzaldehído deshidrogenasa se potencia con la electronegatividad del sustituyente del anillo, de forma que la presencia en la molécula de grupos altamente electronegativos del tipo de un átomo de flúor o un grupo nitro aumenta la V_{\max} del enzima respecto al sustrato no sustituido.

Por otro lado y en relación con la regulación de la ruta "upper", se determinó el perfil de nitroaromáticos que se comportaban como efectores del regulador XylR. Para ello se utilizó la fusión de uno de los promotores regulados por esta proteína, el promotor Pu, al gen *lacZ* desprovisto de su promotor natural. Estos ensayos demostraron que XylR reconocía como efectores 2- y 4-nitrotolueno, pero no otros nitroarenos. El hecho de que el regulador reconociera estos compuestos como efectores, suponía que el gran tamaño del grupo nitro y/o su elevada electronegatividad no fueron impedimento para la activación de la proteína.

En resumen, se puede decir que el impedimento para la transformación de nitrotoluenos por las rutas degradativas del plásmido TOL se encuentra a distintos niveles dependiendo de la posición del grupo nitro en el anillo. Así, la degradación de 4-nitrotolueno a 4-nitrobenzoato procede a través de la ruta "upper", y el metabolismo del último queda bloqueado en el primer paso de la ruta *meta* (J. L. Ramos, comunicación personal). En el caso del 3-nitrotolueno, éste y sus derivados alcohol y aldehído son sustratos de los enzimas correspondientes de la ruta "upper" pero no es reconocido por XylR, lo que supone la existencia de un punto de bloqueo a nivel del regulador para la degradación de este compuesto a través de la ruta "upper" de TOL. El 2-nitrotolueno, al igual que el *o*-xileno, se comporta como inductor gratuito de la ruta, ya que los enzimas de ésta no son capaces de oxidar este compuesto.

1.2. DESBLOQUEO DEL RECONOCIMIENTO DE NITROAROMATICOS POR XYLR

Con objeto de salvar la limitación en el reconocimiento de nitroaromáticos como efectores por XylR, se diseñó una estrategia para aislar mutantes del regulador que estimularan altos niveles de transcripción en presencia de los nitroaromáticos que no se comportaban como inductores. Para ello se realizó una mutagénesis al azar con

nitrosoguanidina en *E. coli* portando un plásmido con *xylR*; la validez de la estrategia de selección de los fenotipos deseados se demostró por la consecución del objetivo propuesto. El resultado fue por un lado el aislamiento de un mutante, XylR49, capaz de promover altos niveles de transcripción independientemente de la presencia de efectores; por otro lado el aislamiento de un mutante con especificidad de efectores alterada, XylR7, capaz de reconocer y estimular la transcripción en presencia de 3-nitrotolueno.

El estudio de la capacidad de inducción de estos mutantes tanto del promotor Ps como de Pu, así como de una amplia batería de mutantes de éste último construidos por M^a Angeles Abril de nuestro grupo de investigación, ha permitido elucidar algunos aspectos del mecanismo de activación de la transcripción por el regulador XylR, que se discuten en el apartado II de esta sección.

2. DEGRADACION DE 4-NITROBENZOATO POR *KLEBSIELLA OXYTOCA* 410P

Con objeto de una posible utilización de la ruta "upper" para la expansión de rutas degradativas de nitrobenzoatos por bacterias, se aislaron microorganismos que crecieron a expensas de 4-nitrobenzoato a partir de suelos contaminados con compuestos nitroaromáticos. De entre ellos se seleccionó la cepa 410P como la más eficiente en la degradación de este compuesto. La caracterización microbiológica de la cepa 410P asignó ésta a la especie *Klebsiella oxytoca*. Es bien conocida la ubicuidad de las bacterias del grupo de enterobacterias oportunistas a las que pertenece la cepa 410P, debido a que sus requerimientos nutricionales son escasos y a su relativamente alta resistencia a agentes externos; en concreto *Klebsiella oxytoca* está ampliamente distribuída en la naturaleza, y se encuentra en agua, suelos, sedimentos, etc. (Pumarola *et al.*, 1987).

En la bibliografía abundan los casos en los que se describe el aislamiento de microorganismos a partir de ambientes contaminados con un determinado compuesto, que son capaces de utilizar éste como fuente de carbono y energía (Stanier *et al.*, 1966); en estos medios el microorganismo o microorganismos que sean capaces de crecer a expensas del compuesto cuentan con ventaja selectiva frente a los que no lo utilizan (Dagley, 1984). En algunos casos las cepas aisladas de la naturaleza pierden, de manera transitoria o permanente, determinadas capacidades metabólicas en el laboratorio (Clarke, 1984). La estabilidad de la cepa es fundamental para su caracterización

posterior y posible utilización tanto en la descontaminación de suelos, aguas residuales, etc., como en la construcción a partir de ésta de bacterias con nuevas capacidades catabólicas. La bacteria *K. oxytoca* 410P conservó la capacidad de crecer en 4-nitrobenzoato en el laboratorio incluso después de crecer durante más de 300 generaciones en medio no selectivo del tipo LB. La cepa creció en un amplio margen de temperaturas, al menos entre 12 y 30°C.

El crecimiento de la bacteria 410P en 4-nitrobenzoato contó además con ciertas ventajas respecto a otras bacterias capaces de degradar 4-nitrobenzoato, ya que creció a altas concentraciones de 4-nitrobenzoato, al menos hasta 20 mM, mientras que otras bacterias son incapaces de crecer en este compuesto a concentraciones superiores a 5 mM (Groenewegen *et al.*, 1992). Por otro lado, Locher y colaboradores (1989) han descrito que el mantenimiento del carácter de degradación de determinados compuestos aromáticos en medio líquido requiere la adición de extracto de levadura, probablemente como vía de suministro de determinados factores de crecimiento insustituibles por soluciones de vitaminas estándar. La adición de extracto de levadura no fue necesaria para la degradación de 4-nitrobenzoato por la bacteria 410P, lo que supone una ventaja de esta cepa con vista a su posible uso industrial. El extracto de levadura se adicionó eventualmente cuando se requería una mayor densidad celular como es habitual en otros casos (Jensen y Gundersen, 1955; Spain *et al.*, 1979).

K. oxytoca 410P utiliza 4-nitrobenzoato como única fuente de carbono y nitrógeno. El hecho de que el crecimiento de esta cepa en 4-nitrobenzoato no requiera la adición de ninguna otra fuente de carbono o nitrógeno alternativa supone que este compuesto debe proporcionar todos los intermediarios metabólicos necesarios para biosíntesis de los componentes celulares, y generar mediante su catabolismo la energía esencial para la biosíntesis de estos componentes y el mantenimiento de las actividades celulares, como movimiento, transporte activo, quimiotaxis, etc. (Clarke, 1984). El crecimiento de la cepa 410P en 4-nitrobenzoato es un proceso típicamente ligado a la degradación completa de este compuesto hasta moléculas inorgánicas, lo que, desde el punto de vista práctico, es lo deseado cuando se trata de evitar su persistencia en el medio ambiente. Sin embargo, la coloración amarilla que tomaron los cultivos a lo largo del tiempo, y que se ha observado en el caso de otras bacterias capaces de degradar compuestos nitroaromáticos (Lenke y Knackmuss, 1992; Nishino y Spain, 1993; Rhys-Williams *et al.*, 1993), indicó la acumulación de ciertos metabolitos no degradables por la bacteria durante su crecimiento a expensas de 4-nitrobenzoato. La identificación de estos productos fue de utilidad para la determinación de los posibles pasos iniciales de la ruta degradativa del compuesto, junto con los ensayos de crecimiento en posibles

intermediarios de ésta, ya que frecuentemente los intermediarios de las rutas degradativas son sustratos de crecimiento (Clarke, 1984).

La degradación bacteriana de 4-nitrobenzoato se describió por primera vez en 1958 por Durham, que aisló una bacteria de la especie *Pseudomonas fluorescens* que reducía este compuesto hasta 4-aminobenzoato; la degradación posterior de éste implicaba la liberación de amonio con la formación de 4-hidroxibenzoato, que se hidroxilaba a 3,4-dihidroxibenzoato y que se catabolizaba posteriormente por una ruta *orto*. Independientemente, Cain (1958) aisló una cepa de la especie *Nocardia erythropolis* que degradaba igualmente 4-nitrobenzoato por una vía reductiva a través de los intermediarios nitroso e hidroxilamino y que, a diferencia de la ruta descrita por Durham (1958), no implicaba al 4-aminobenzoato como intermediario, aunque éste se acumulaba en el medio de cultivo de la bacteria durante el crecimiento en 4-nitrobenzoato (Cain y Cartwright, 1959a y b). También se han descrito bacterias del género *Pseudomonas* capaces de crecer en 4-nitrobenzoato con la acumulación de amonio en el medio (Haller y Finn, 1978). Más recientemente, Groenewegen *et al.* (1992) aislaron una bacteria de la especie *Comamonas acidovorans* que utilizaba 4-nitrobenzoato como fuente de carbono y nitrógeno. La ruta de degradación de este compuesto en esta bacteria implicaba igualmente la reducción del grupo nitro con la formación de los derivados nitroso- e hidroxilaminobenzoato, pero éste no se reducía hasta 4-aminobenzoato; además el 4-hidroxibenzoato no era intermediario metabólico de la ruta. En contraste, el 4-hidroxilaminobenzoato era directamente transformado en 3,4-dihidroxibenzoato con la concomitante liberación de amonio, como se ha descrito en el apartado II de la Introducción de este trabajo.

En los casos descritos en la bibliografía en los que se han determinado rutas catabólicas de compuestos nitroaromáticos, la acumulación de nitrito o amonio en los cultivos ha sido un factor importante en la determinación del modo de liberación del grupo nitro de la molécula, lo que en algunos casos se ha confirmado posteriormente por distintos ensayos de actividades enzimáticas (Cartwright y Cain, 1959b; Groenewegen *et al.*, 1992; McCormick *et al.*, 1976; Schakmann y Müller, 1991; Spain *et al.*, 1979; Spangoord *et al.*, 1991). La acumulación de amonio en los cultivos durante el crecimiento de *K. oxytoca* 410P en 4-nitrobenzoato y la ausencia de nitrito en éstos, sugería que la bacteria no liberaba directamente el grupo nitro de la molécula como ocurre en algunos casos (Bruhn *et al.*, 1987; Lenke y Knackmuss, 1992; Spangoord *et al.*, 1991), sino que éste era reducido en el anillo y posteriormente liberado en forma de amonio al medio como ocurre en otros (Cain, 1958; Cain y Cartwright 1959a; Durham, 1958; Nishino y Spain, 1993; Rhys-Williams *et al.*, 1993). Esta acumulación implicaba, al

igual que en estos casos, la reducción del grupo nitro unido al anillo aromático, y debía implicar la formación de los consiguientes intermediarios nitroso- e hidroxilaminobenzoato (Figura 47), aunque estos compuestos no se han identificado en los extractos de los cultivos de la cepa 410P en 4-nitrobenzoato.

Sin embargo, la identificación en los sobrenadantes de los cultivos de los productos de reducción del 4-nitrobenzoato, 4-aminobenzoato, 4-acetilaminobenzoato y 3-hidroxi-4-acetilaminobenzoato, apoyó que la vía reductiva era la utilizada en los primeros pasos de degradación de 4-nitrobenzoato por 410P (Figura 47). La acumulación de los productos citados, mayoritariamente el 3-hidroxi-4-acetilaminobenzoato, indicó que éstos no eran sustratos de crecimiento para la cepa, lo cual se confirmó para en caso del 4-aminobenzoato. La cantidad acumulada de estos productos, que fue mínima para el 4-aminobenzoato y máxima para el 3-hidroxi-4-acetilaminobenzoato, sugirió la existencia de una ruta no productiva paralela a la de mineralización del 4-nitrobenzoato que implicaría la acetilación del 4-aminobenzoato formado y su posterior hidroxilación en posición 3.

Debido a que, como se ha dicho anteriormente, el 4-aminobenzoato no era sustrato de crecimiento, la eliminación del nitrógeno de la molécula debía ser previa a la reducción completa hasta amino, lo cual implicaría una bifurcación de la ruta a nivel del derivado hidroxilamino. La formación del derivado dihidroxilado para la rotura del anillo por una dioxigenasa debía ser posterior o concomitante a la eliminación del nitrógeno de la molécula. Como confirmación de esto hay que decir que en caso de que fuera anterior se formaría 4-hidroxibenzoato, y sin embargo el crecimiento de la cepa 410P en este compuesto fue mucho más débil que en 4-nitrobenzoato y 3,4-dihidroxibenzoato, lo que sugirió que el 4-hidroxibenzoato no era un intermediario de la ruta, al igual que en el caso de *C. acidovorans* (Groenewegen *et al.*, 1992).

Respecto a la liberación de amonio a partir de los productos de reducción de compuestos nitroaromáticos, el mecanismo no está claro hasta el momento (Groenewegen *et al.*, 1992; Haigler y Spain, 1993), mientras que sí se conoce el mecanismo de liberación de otros grupos como carboxilo (Reiner, 1972), hidroxilo (Brilon *et al.*, 1982; Spain *et al.*, 1989) acetilo y sulfonilo (Brilon *et al.*, 1981). Ramos *et al.* (1994) han propuesto que la liberación de amonio en la ruta de degradación de 4-nitrobenzoato por la cepa 410P podría producirse por una reacción del tipo Stork. Esta reacción ocurriría durante la hidroxilación en la posición 3 del 4-hidroxilaminobenzoato, lo que originaría la formación del derivado 3-hidroxi-4-cetoxima, con la liberación espontánea de amonio al medio y la formación de 3,4-dihidroxibenzoato (Figura 47).

La acumulación de este compuesto en cultivos de *K. oxytoca* 410P incubados en condiciones de limitación de oxígeno supuso la confirmación de que el 3,4-dihidroxibenzoato era un intermediario de la ruta. Este hecho sugirió además que el 3,4-dihidroxibenzoato podría ser el sustrato directo de la dioxigenasa, presumiblemente el primer enzima de la ruta dependiente de la presencia de oxígeno, al igual que ocurre en la degradación de 4-nitrobenzoato por otras bacterias (Cain y Cartwright, 1959a; Durham, 1958; Groenewegen *et al.*, 1992; Haigler y Spain, 1993; Rhys-Williams *et al.*, 1993). Esta hipótesis está apoyada por la incapacidad de la cepa 410P de crecer tanto en catecol como en 4-nitrocatecol, lo que indicaba que en esta bacteria la degradación de los ácidos benzoicos que eran sustratos de crecimiento ocurría sin descarboxilación previa a la rotura del anillo, y sugería que la dioxigenasa (o dioxigenasas) encargada de romperlo no era una catecol dioxigenasa, sino probablemente una protocatéquico dioxigenasa. Esto requiere una comprobación mediante los ensayos de las actividades enzimáticas correspondientes.

El cultivo de la bacteria 410P en 4-nitrobenzoato originaba la acumulación en el medio de productos acetilados, como 4-acetilaminobenzoato y 3-hidroxi-4-acetilaminobenzoato. La acetilación de compuestos aromáticos portadores de grupos amino se ha observado en otros casos en los que los microorganismos llevan a cabo la reducción de grupos nitro (McCormick *et al.*, 1978; Schackmann y Müller, 1991). Parece ser que la acetilación de los aminoderivados es un sistema de protección de la bacteria frente a la elevada reactividad del grupo amino (Schackmann y Müller, 1991).

Igualmente se ha determinado la presencia del dímero 4,4'-azoxibenzoato en cultivos de 410P en 4-nitrobenzoato. La formación de este tipo de derivados se ha observado en numerosos casos en los que compuestos nitroaromáticos sufren procesos de reducción (Duque *et al.*, 1993; McCormick *et al.*, 1976 y 1978; Yamashina *et al.*, 1954). Haïdour y Ramos (1994) han demostrado que la formación de los azoxidímeros es un proceso espontáneo que tiene lugar en condiciones aeróbicas a partir del derivado hidroxilamino, y del nitroso que se forma como consecuencia de la oxidación de éste en presencia de oxígeno molecular.

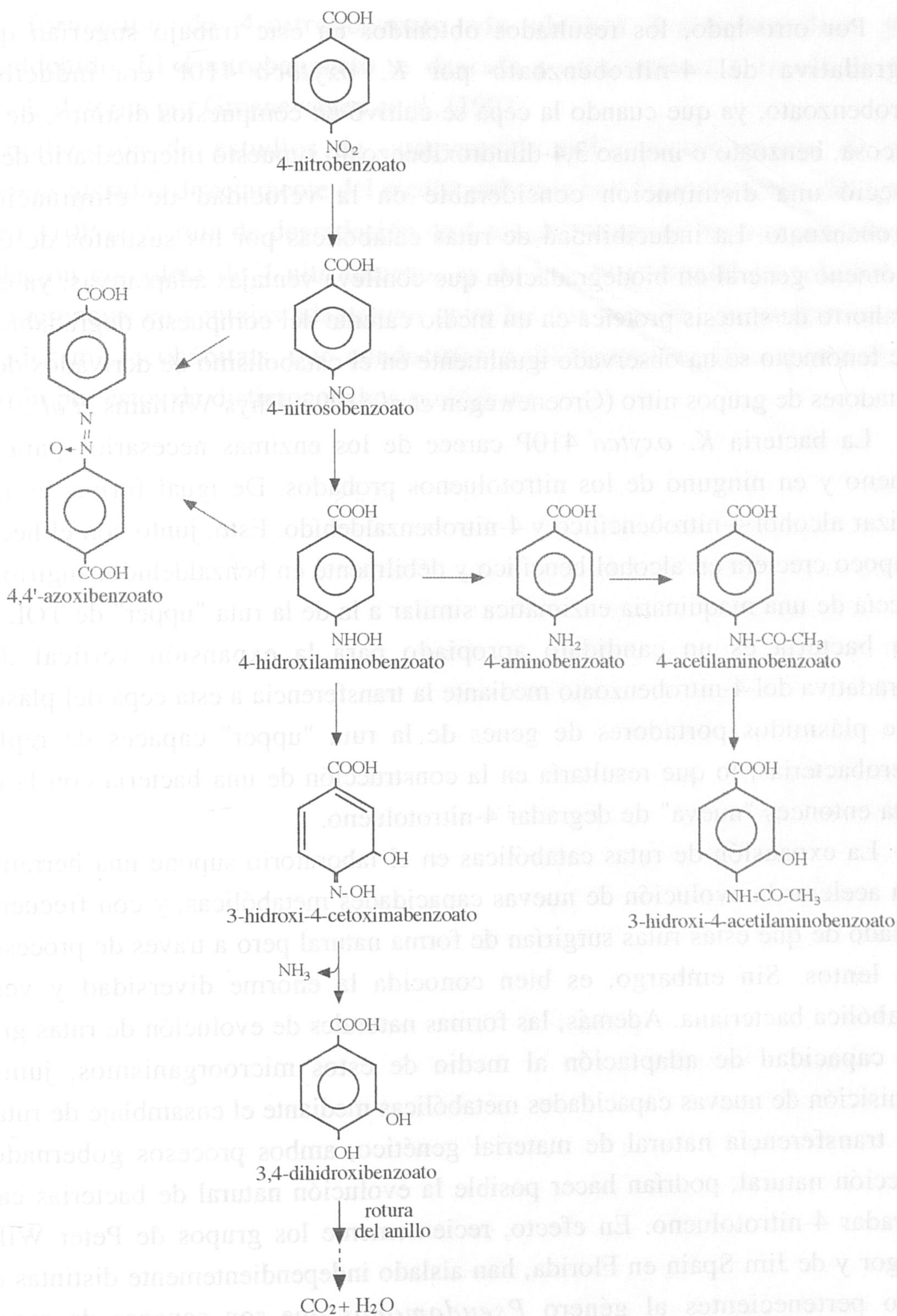


Figura 47. Ruta propuesta de degradación de 4-nitrobenzoato por *K. oxytoca* 410P. La ruta que conduce a la mineralización del compuesto se representa en color negro; las rutas no productivas se representan en color azul.

Por otro lado, los resultados obtenidos en este trabajo sugerían que la ruta degradativa del 4-nitrobenzoato por *K. oxytoca* 410P era inducible por 4-nitrobenzoato, ya que cuando la cepa se cultivó en compuestos distintos de éste como glucosa, benzoato o incluso 3,4-dihidroxibenzoato supuesto intermediario de la ruta, se apreció una disminución considerable en la velocidad de eliminación del 4-nitrobenzoato. La inducibilidad de rutas catabólicas por los sustratos de éstas es un fenómeno general en biodegradación que conlleva ventajas adaptativas, ya que supone un ahorro de síntesis proteica en un medio carente del compuesto degradable por ellas; este fenómeno se ha observado igualmente en el catabolismo de derivados del benceno portadores de grupos nitro (Groenewegen *et al.*, 1992; Rhys-Williams *et al.*, 1993).

La bacteria *K. oxytoca* 410P carece de los enzimas necesarios para crecer en tolueno y en ninguno de los nitrotoluenos probados. De igual forma, es incapaz de utilizar alcohol 4-nitrobencílico y 4-nitrobenzaldehído. Esto, junto con el hecho de que tampoco creciera en alcohol bencílico y débilmente en benzaldehído, sugirió que 410P carecía de una maquinaria enzimática similar a la de la ruta "upper" de TOL. Por tanto esta bacteria es un candidato apropiado para la expansión vertical de la ruta degradativa del 4-nitrobenzoato mediante la transferencia a esta cepa del plásmido TOL o de plásmidos portadores de genes de la ruta "upper" capaces de replicarse en enterobacterias, lo que resultaría en la construcción de una bacteria con la capacidad hasta entonces "nueva" de degradar 4-nitrotolueno.

La expansión de rutas catabólicas en el laboratorio supone una herramienta útil para acelerar la evolución de nuevas capacidades metabólicas, y con frecuencia se ha hablado de que estas rutas surgirían de forma natural pero a través de procesos mucho más lentos. Sin embargo, es bien conocida la enorme diversidad y versatilidad metabólica bacteriana. Además, las formas naturales de evolución de rutas gracias a la alta capacidad de adaptación al medio de estos microorganismos, junto con la adquisición de nuevas capacidades metabólicas mediante el ensamblaje de rutas gracias a la transferencia natural de material genético, ambos procesos gobernados por la selección natural, podrían hacer posible la evolución natural de bacterias capaces de degradar 4-nitrotolueno. En efecto, recientemente los grupos de Peter Williams en Bangor y de Jim Spain en Florida, han aislado independientemente distintas cepas del suelo pertenecientes al género *Pseudomonas* que son capaces de crecer en 4-nitrotolueno como única fuente de carbono y nitrógeno (Haigler y Spain, 1993; Rhys-Williams *et al.*, 1993). La ruta de degradación del 4-nitrotolueno en estas cepas ocurre inicialmente siguiendo una vía similar a las reacciones que componen la ruta "upper" de TOL, es decir, a través de la oxidación secuencial de la cadena alquílica del compuesto

hasta la formación de 4-nitrobenzoato vía alcohol 4-nitrobencílico y 4-nitrobenzaldehído. El 4-nitrobenzoato se degrada posteriormente a través de rutas similares a la descrita por Groenewegen *et al.*, (1992).

La realización de estudios de comparación del comportamiento de estas *Pseudomonas* aisladas directamente del medio ambiente con enterobacterias del tipo de *K. oxytoca* 410P cuya ruta de degradación de 4-nitrobenzoato se haya expandido para la degradación completa de 4-nitrotolueno, es de interés potencial en relación con posibles diferencias en ventajas adaptativas entre los dos tipos de microorganismos en determinados microhábitats, que conducirían a diferencias en las capacidades de colonización por éstos de distintos nichos ecológicos.

El estudio de la regulación de la expresión de *Pseudomonas putida* Pu y *Ps. aeruginosa* ATCC 27612 (Arroye *et al.*, 1983; Ramos *et al.*, 1987). Esta proteína pertenece a una familia de reguladores (Arroye *et al.*, 1988). Los promotores activados por el activador de la familia muestran regiones conservadas en -12/-24 que son reconocidas por el factor σ^{70} de la ARN polimerasa. Estos promotores contienen una secuencia de UASs situadas entre -100 y -200 pares de bases con respecto al sitio de inicio de la transcripción, que son los sitios de reconocimiento y unión de los factores activadores (Kustu *et al.*, 1989). El modelo de activación de estos promotores propone que el activador unido a las UASs interacciona con el holoenzima ARN polimerasa unido a la región -12/-24 mediante el doblar de la cadena de ADN, formando un complejo de ambos factores (Figura 8). Este doblar parece estar regulado por un mecanismo descrito por III (Abril *et al.*, 1991; Cannon *et al.*, 1990; Gober y O'Brien *et al.*, 1990; de Lorenzo *et al.*, 1991; Santero *et al.*, 1989).

Adicionalmente los reguladores de la familia de NtrC controlan la transcripción de genes que se expresan en respuesta a una gran variedad de estímulos ambientales (de Lorenzo, 1989). Aunque cada sistema responde a un estímulo específico, existe una notable homología en determinados dominios de las proteínas de esta familia que sugieren una similitud funcional. Alineamientos múltiples de estas proteínas revelan una alta homología en la región central que está probablemente implicada en la hidrólisis del ATP, dimerización e interacción con el factor σ^{54} (North *et al.*, 1993). En el extremo C-terminal existe un motivo α -hélice-giro- α -hélice que sugiere que estas proteínas se unen al ADN. El extremo N-terminal, cuya homología es mucho menor entre los miembros de la familia se ha propuesto que es el responsable de la recepción de la señal ambiental específica transmitida por una proteína sensora. De este modo, los sistemas de transducción de señal constan de dos proteínas, una sensora y otra receptora, formando un sistema de dos componentes.

II. EFECTO DE MUTACIONES PUNTUALES EN EL DOMINIO N-TERMINAL DE XYL R

La proteína XylR estimula la transcripción desde los promotores dependientes del factor σ^{54} de la ARN polimerasa del plásmido TOL de *Pseudomonas putida* Pu y Ps (Franklin *et al.*, 1983; Inouye *et al.*, 1983; Ramos *et al.*, 1987). Esta proteína pertenece a la familia de reguladores de NtrC (Inouye *et al.*, 1988). Los promotores activados por las proteínas de esta familia muestran regiones conservadas en -12/-24 que son reconocidas por el factor σ^{54} de la ARN polimerasa. Estos promotores contienen secuencias activadoras (UAS) situadas entre -100 y -200 pares de bases con respecto al sitio de iniciación de la transcripción, que son los sitios de reconocimiento y unión de las proteínas activadoras (Kustu *et al.*, 1989). El modelo de activación de estos promotores propone que el activador unido a las UASs interacciona con el holoenzima σ^{54} -ARN polimerasa unido a la región -12/-24 mediante el dobléz de la cadena de ADN, lo cual permite la aproximación de ambos factores (Figura 8). Este dobléz parece estar facilitado en algunos casos por IHF (Abril *et al.*, 1991; Cannon *et al.*, 1990; Gober y Shapiro, 1990; Hoover *et al.*, 1990; de Lorenzo *et al.*, 1991; Santero *et al.*, 1989).

Característicamente los reguladores de la familia de NtrC controlan la transcripción de genes que se expresan en respuesta a una gran variedad de estímulos ambientales (revisado en Gross *et al.*, 1989). Aunque cada sistema responde a un estímulo específico, existe una fuerte homología en determinados dominios de las proteínas de esta familia que reflejan una similitud funcional. Alineamientos múltiples de estas proteínas revelan una alta homología en la región central que está probablemente implicada en la hidrólisis de ATP, dimerización e interacción con el factor σ^{54} (North *et al.*, 1993). En el extremo C-terminal existe un motivo α -hélice-giro- α -hélice que sugiere que estas proteínas se unen a ADN. El extremo N-terminal, cuya homología es mucho menor entre los miembros de la familia se ha propuesto que es el responsable de la recepción de la señal ambiental específica transmitida por una proteína sensora. De este modo, los sistemas típicos de transducción de señal constan de dos proteínas, una sensora y otra receptora, y se denominan sistemas de dos componentes.

Aunque algunas proteínas sensoras como NtrB no muestran una región hidrofóbica típica, los perfiles de hidropatía de muchas de las proteínas sensoras de estos sistemas indican que son proteínas transmembrana, con un dominio N-terminal periplásmico y uno C-terminal citoplásmico de unos 250 aminoácidos que está altamente conservado. Se ha propuesto que la región N-terminal de la proteína sensora detecta el cambio ambiental y la señal se transmite al dominio C-terminal, posiblemente por una alteración topológica de la estructura protéica o por un cambio en su estado de oligomerización. La señal se transmite hasta el dominio N-terminal de la proteína reguladora (Gross *et al.*, 1989). En los sistemas NtrB/NtrC (Keener y Kustu, 1988; Ninfa y Magasanik, 1986; Weiss y Magasanik, 1988), CheA/CheY/CheB (Parkinson, 1988) y EnvZ/OmpR (Igo y Silhavy, 1988), se ha demostrado que la transmisión de la señal a nivel molecular consiste en una fosforilación. Las proteínas sensoras NtrB, CheA y EnvZ son capaces de autofosforilarse y de fosforilar a las proteínas reguladoras NtrC, CheY/CheB y OmpR respectivamente. Esto ha sugerido que la fosforilación es el mecanismo general de transferencia de la señal en estos sistemas: el extremo C-terminal de la proteína sensora es un módulo con actividad proteína-quinasa y el extremo N-terminal de la proteína reguladora es el receptor del grupo fosfato. La fosforilación y defosforilación de la proteína reguladora podría cambiar sus propiedades de unión al ADN o su habilidad para interaccionar con otras proteínas, modulando de esta manera su actividad biológica (Gross *et al.*, 1989). En el caso particular de NtrC, el regulador de la familia mejor estudiado, la fosforilación ocurre en el residuo 54 de ácido aspártico (Keener y Kustu, 1988; Ninfa y Magasanik, 1986; Weiss y Magasanik, 1988). La fosforilación estimula una actividad ATPasa de NtrC; esta actividad es la que cataliza la isomerización de los complejos cerrados del promotor con el holoenzima σ^{54} -ARN polimerasa a complejos abiertos, en los que las cadenas de ADN se desnaturalizan localmente en la zona de iniciación de la transcripción (Popham *et al.*, 1989; Sasse-Dwight y Gralla, 1988; Weiss *et al.*, 1991).

Al estudio del mecanismo de acción de este regulador y de otros de la familia han contribuido su purificación y cristalización en ocasiones, así como el aislamiento de mutantes espontáneos o por mutagénesis dirigida de residuos altamente conservados en las proteínas de la familia. En el caso de XylR la proteína no se ha purificado aún, y hasta el momento no se habían aislado mutantes que pudieran ayudar a clarificar ciertos aspectos de su mecanismo de acción. En este trabajo se han aislado y caracterizado dos mutantes de XylR que presentaron mutaciones puntuales en sus respectivos dominios N-terminales, y cuyos fenotipos conducían a una respuesta específica a un nuevo efector en el caso de XylR7, y a una respuesta constitutiva en el caso de XylR49.

El mutante XylR7 reconoció 3-nitrotolueno como efector a diferencia de XylR, y conservó la capacidad de inducir, aunque débilmente, la actividad del promotor Pu en presencia de efectores del regulador silvestre. Estas capacidades estaban relacionadas con una única mutación en el residuo 172 de la proteína que mutó de ácido glutámico a lisina. El hecho de que una mutación en el extremo N-terminal de XylR originara un cambio en el perfil de efectores sugirió que este residuo está implicado en la interacción con el efector. Como se ha mencionado anteriormente, el extremo N-terminal de las proteínas de la familia se ha propuesto, y en algunos casos se ha demostrado, que es la zona receptora de la señal específica en cada sistema (Gross *et al.*, 1989). En algunas proteínas de la familia, la homología se extiende hasta el dominio N-terminal, como en el caso de NtrC y DctD (Nixon *et al.*, 1986), y en el de OmpR y CheY (Stock *et al.*, 1990). El extremo N-terminal de XylR no guarda homología con ninguna de las proteínas de la familia excepto con DmpR con un 64% de identidad. Este regulador controla la expresión del operón para la degradación de fenol y cresoles en la cepa CF600 de *Pseudomonas*, y su activación depende, al igual que la de XylR, de la presencia en el medio de compuestos aromáticos (Shingler *et al.*, 1993). Recientemente Shingler y Moore han construido proteínas híbridas entre XylR y DmpR y han estudiado el efecto sobre la expresión del promotor activado por DmpR, Pdmp. El perfil de efectores de DmpR, incapaz de reconocer toluenos y xilenos, indujo actividad desde el promotor cuando su extremo N-terminal fue sustituido por el de XylR que sí los reconoce (Abril *et al.*, 1989). Esto sugería que el extremo N-terminal de estos dos reguladores está implicado en el reconocimiento del efector y por tanto en la especificidad de la activación de la transcripción (Shingler y Moore, 1994).

Con anterioridad a los estudios de Victoria Shingler en DmpR y del aislamiento de los mutantes descritos en este trabajo, se había sugerido que la activación de estos dos reguladores podría no implicar fosforilación, sino una interacción directa con la molécula del efector. Nuestros resultados y los del grupo de Victoria Shingler apoyan, aunque no prueban, esta hipótesis. A favor de ésta se encuentra el hecho de que el perfil de efectores de XylR, que se ha estudiado en *P. putida*, su hospedador natural, y en *E. coli*, es similar en ambos organismos, lo que sugiere que la respuesta es específica (Abril *et al.*, 1989). Por otro lado, tanto XylR como DmpR promueven la transcripción desde los promotores que activan en hospedadores distintos del natural (Abril *et al.*, 1989; Shingler y Moore, 1994).

De este modo, la unión del inductor a la proteína debe tener un efecto similar al de la fosforilación en el caso de otros reguladores de la familia anteriormente mencionados, es decir, se deben inducir cambios conformacionales en XylR que modifiquen sus

propiedades de unión al ADN y/o su habilidad para interaccionar con otras proteínas que resulte en la estimulación de la transcripción. Estudios de improntas "in vivo" (Abril *et al.*, 1991) y ensayos de ADNasa "in vitro" (de Lorenzo *et al.*, 1991) en el promotor Pu han puesto de manifiesto que XylR está unido permanentemente a sus secuencias diana en el promotor Pu, y que en presencia del efector se alteran los contactos con el ADN, como se deduce del cambio en el patrón de metilación del promotor en presencia de éste. Esto sugirió que la unión del efector podría originar una modificación estructural que altere la interacción con el ADN (Abril *et al.*, 1991), hipótesis que está apoyada por nuestros resultados.

Por tanto, el sistema inducido por XylR parece ser una excepción al mecanismo de respuesta a estímulos ambientales de un sistema típico de dos componentes, porque no parece requerir ningún elemento sensor. Los sustratos de este sistema catabólico son tóxicos para la actividad celular, aunque existan a bajas concentraciones en el ambiente. De este modo, la degradación rápida y eficiente de estos compuestos aromáticos es beneficiosa para la célula por la detoxificación de sustancias deletéreas y por la adquisición de energía metabólica. Los sustratos del sistema catabólico regulado por XylR pueden ser considerados como una señal de alarma para la célula.

En el caso de XylR49 la unión del efector no es necesaria para la estimulación de la transcripción, ya que en ausencia de éste el regulador mutante es capaz de promover altos niveles de actividad desde los promotores que induce. Esta proteína presentó una mutación en el extremo N-terminal, concretamente en el residuo 135 que mutó de ácido aspártico a asparragina. El comportamiento de XylR49 fue similar al de un mutante constitutivo de NtrC, en el que el residuo serina 160 de la proteína mutó a fenilalanina (Dixon *et al.*, 1991). Por analogía con este mutante, la mutación de XylR49 que implica que la activación de la transcripción promovida por éste sea independiente de la presencia de efector, podría tener un efecto similar en la activación de la proteína que la de NtrCS160F, cuya actividad ATPasa es independiente de fosforilación. Por otro lado, en presencia de efectores la elevada actividad desde el promotor Pu mediada por XylR49 se incrementó aún 2 veces, lo que sugirió que las interacciones con el efector no estaban bloqueadas en este mutante.

Como se ha mencionado anteriormente, la estimulación completa de la transcripción desde el promotor Pu por el regulador silvestre requiere la presencia de otras proteínas de unión a ADN, el factor σ^{54} de la ARN polimerasa e IHF, así como de las secuencias de unión de estas proteínas a Pu, que se encuentran situadas entre -12/-24 para σ^{54} (Ausubel, 1984), entre -59/-72 para IHF (Abril *et al.*, 1991; de Lorenzo *et al.*, 1991) y entre -120/-180 para XylR (Abril y Ramos, 1991 y 1993; Inouye *et al.*, 1990).

En efecto, Abril *et al.*, (1991) realizaron deleciones del promotor que se extendían desde -240 a -144 (Δ UAS1), y desde -240 a -106 (Δ UAS1 Δ UAS2); estas deleciones resultaron en una disminución de la actividad del promotor de alrededor del 90% en el caso de la primera, y de una anulación completa de actividad transcripcional en el de la segunda. Estas deleciones incluían dos secuencias situadas en orientación invertida con el motivo 5'-ATTTGANCAAATC-3', que Holtel y colaboradores (1990) propusieron como el sitio de unión de XylR. De hecho, los patrones de metilación (Abril *et al.*, 1991) y de deleciones con ADNasa (de Lorenzo *et al.*, 1991) de la región UAS sufrían cambios en presencia y ausencia del regulador, lo que demostró que ésta era la zona de unión del regulador al promotor Pu, aparentemente reconocida por dímeros de la proteína.

El estudio del efecto de estas deleciones sobre la actividad de Pu en presencia de los mutantes XylR7 y XylR49 reveló diferencias entre ambos. En el caso de XylR7, la deleción de la zona UAS1 de Pu originó una disminución en la actividad del promotor de alrededor de un 95% al igual que en el caso de XylR, lo que indicó que esta zona era necesaria para la activación de la transcripción de acuerdo con datos previos (Abril *et al.*, 1991; de Lorenzo *et al.*, 1991), y sugirió que el sitio de unión de XylR7 a Pu debía ser el mismo que el del regulador silvestre. Sin embargo, y a diferencia de XylR y XylR7, el mutante XylR49 conservó hasta un 45% de actividad en el promotor Pu con una deleción de la zona UAS1. Este mutante no estimuló la transcripción de Pu con una deleción que incluía ambas regiones UAS1 y UAS2. Estos datos sugerían que la zona UAS2 es crítica en la estimulación de la transcripción del promotor Pu por XylR49, como se ha sugerido en el caso del regulador silvestre (Abril *et al.*, 1991 y 1993). El hecho de que una mutación de G-139 a A en la región UAS2 originara una reducción de la actividad del promotor por XylR49 del 65%, mientras que la sustitución equivalente en la zona UAS1 no provocara ningún cambio sobre ésta, apoyó nuestra hipótesis y la de Abril y colaboradores. Por otro lado, la mutación de XylR49 podría favorecer la oligomerización del regulador, aunque la actividad del promotor depende de la región UAS2, ya que en ausencia de ambas zonas UAS1 y UAS2, XylR49 no estimuló la transcripción desde Pu.

La estimulación del promotor Pu por XylR requiere el factor σ^{54} (Abril *et al.*, 1991; Dixon, 1986). Esta proteína es la responsable del reconocimiento por la ARN polimerasa de regiones específicas que difieren de las reconocidas por el factor σ^{70} , más extendido en eubacterias, y que están situadas entre -12/-24 del punto de iniciación de la transcripción (Morett y Buck, 1989). Nuestros resultados confirmaron el requerimiento de NtrA para la actividad de Pu promovida por XylR, ya que en ausencia de la proteína

no se obtuvo estimulación de la transcripción desde el promotor. De igual forma, en el caso de los mutantes XylR7 y XylR49 en ausencia de NtrA no se detectó actividad transcripcional desde Pu. Se ha sugerido que la transcripción de los promotores dependientes de σ^{54} requieren un contacto físico entre el activador y la ARN polimerasa (Kustu *et al.*, 1989). La región N-terminal de la subunidad α del enzima está implicada en el ensamblaje de los monómeros que forman el corazón de esta proteína; la zona C-terminal de esta subunidad parece estar implicada en los contactos con el regulador, ya que mutantes en este dominio afectan a la respuesta del enzima a varios factores de transcripción (Igarashi *et al.*, 1992). Sin embargo, otros factores, entre los que se encuentra NtrC, no requieren la zona C-terminal de la subunidad α de la ARN polimerasa para la activación de la transcripción dependiente de σ^{54} (Lee *et al.*, 1993). Estos autores proponen que este activador contacta directamente con la subunidad σ^{54} , y que estos contactos son necesarios para la estimulación de la transcripción. Nuestros resultados son consistentes con esta propuesta, ya que demostraron que la activación transcripcional desde Pu tanto por XylR como de los reguladores mutantes XylR7 y XylR49 era absolutamente dependiente de la proteína σ^{54} .

La afinidad del complejo σ^{54} -ARN polimerasa por un promotor determinado parece determinar el requerimiento de éste por IHF. En el caso de Pu se ha demostrado el requerimiento de IHF para la estimulación máxima de la transcripción, y que esta proteína juega un papel físico en la actividad del promotor facilitando los contactos entre XylR y el complejo σ^{54} -ARN polimerasa (Abril *et al.*, 1991; de Lorenzo *et al.*, 1991; Pérez-Martín *et al.*, 1994). Se ha propuesto que los promotores dependientes de σ^{54} en cuya transcripción interviene IHF han adoptado el sistema de dobleces inducidos por éste para compensar la inestabilidad de los complejos de nucleoproteína que intervienen en la transcripción, ya que en promotores fuertes como *glnAp2* no hay sitio de unión de IHF (Collado-Vides *et al.*, 1991). En cambio sí los hay en promotores *nifH* y *nifLA* de *K. pneumoniae*, en los que la unión del holoenzima σ^{54} -ARN polimerasa es inestable (Buck y Cannon, 1989; Minchin *et al.*, 1989; Morett y Buck, 1989). Además se ha demostrado que mutaciones que incrementan la afinidad del promotor por el complejo σ^{54} -ARN polimerasa eliminan la necesidad de IHF para la estimulación máxima de la transcripción (Morett y Buck, 1989; Hoover *et al.*, 1990).

Nuestros resultados mostraron que cuando la actividad del promotor Pu se ensayó en un fondo genético deficiente en IHF, ésta disminuía hasta un 75% tanto en el caso de XylR como en el de XylR7, lo que indicaba que el regulador mutante era dependiente de la presencia de IHF para la estimulación máxima de la transcripción, al igual que el silvestre (Abril *et al.*, 1991; de Lorenzo *et al.*, 1991). En contraste, no hubo disminución

de la transcripción de Pu por XylR49 en ausencia de IHF. Recientemente se ha sugerido que el papel de IHF no es únicamente físico en la inducción de dobleces en el ADN, sino que además actúa como estimulador de la respuesta, ya que reduce la actividad basal de transcripción en condiciones de no inducción (Perez-Martín *et al.*, 1994). Los resultados obtenidos con XylR49 indicaron que este mutante era capaz de superar la barrera impuesta por IHF en ausencia de efectores.

La estimulación de la transcripción del promotor Ps por XylR es al igual que Pu dependiente del factor σ^{54} de la ARN polimerasa, el cual reconoce las secuencias consenso situadas entre -12/-24, así como de las regiones de unión del regulador en la región entre -207/-133 respecto al punto de iniciación de la transcripción (Holtel *et al.*, 1992). De igual forma que en el caso del promotor Pu, se han realizado ensayos de actividad del promotor Ps en presencia de los mutantes XylR7 y XylR49. En el caso de ambos reguladores, existieron diferencias en la estimulación de este promotor respecto a Pu, ya que XylR7 no indujo la transcripción en presencia de 3-nitrotolueno, y XylR49 no aumentó la actividad del promotor en presencia de efectores. Estudios anteriores han demostrado que existen diferencias en la activación por XylR de los promotores Pu y Ps. En primer lugar, mientras que la activación máxima de Pu requiere la proteína IHF, la activación de Ps es independiente de IHF (Abril *et al.*, 1991; de Lorenzo *et al.*, 1991; Holtel *et al.*, 1992). Por otro lado, la estimulación de la transcripción de Pu por XylR silvestre activado por efectores es 4 veces superior a la estimulación de Ps (Marqués *et al.*, 1993).

La proteína XylR unida a la región promotora Pr/Ps autorreprime su síntesis (Inouye *et al.*, 1987a; Abril *et al.*, 1989), probablemente impidiendo el acceso del complejo σ^{70} -ARN polimerasa a Pr (Marqués y Ramos, 1993). Las mutaciones en el extremo N-terminal de los reguladores XylR7 y XylR49 afectaron en distinta forma a la autorrepresión de su síntesis. Mientras que en XylR7 los niveles de autorrepresión fueron del orden de 2 veces menores respecto al regulador silvestre, XylR49 autorreprimía fuertemente su síntesis, hasta un 75% frente al 50% de XylR.

Por tanto, respecto a la activación de la transcripción por XylR49 hay que decir que a diferencia del regulador silvestre, el mutante estimuló la transcripción de los promotores Pu y Ps en ausencia de efectores. Además existieron diferencias con el regulador silvestre en relación con el requerimiento de la proteína IHF así como en la interacción de la proteína tanto con la zona UAS del promotor Pu, como con la zona de unión a la región promotora Pr/Ps. La mutación en el extremo N-terminal de XylR49 podría originar cambios en la estructura tridimensional de la proteína que se transmitieran al dominio de unión a ADN. Se ha descrito que mutaciones puntuales en el

dominio N-terminal de proteínas de la familia como VirG (Han y Winans, 1994) y OmpR (Brissette *et al.*, 1992) afectan a su capacidad de unión al ADN. De igual forma, los estudios de (Dixon *et al.*, 1991) sobre el regulador NtrC demostraron que la fosforilación de éste influye en la unión del activador al ADN. La mutación de XylR49 podría originar un incremento en la afinidad de la proteína por sus secuencias diana en el ADN, lo que podría ser la causa de que en ausencia de la región UAS1 el mutante estimule la actividad de Pu hasta alrededor del 45% al contrario que el silvestre; por otro lado estos cambios en la región promora Pr/Ps se traducirían en un aumento en la capacidad de autorreprimir su síntesis.

Respecto a XylR7 se puede decir que el regulador mutante requirió la estructura modular completa del promotor, lo que sugería que el mecanismo de activación de la transcripción de Pu por esta proteína era similar al de la proteína silvestre. De este modo, la alteración principal de XylR7 mutante parecía implicar interacciones con el efector. Sin embargo la débil autorrepresión de su síntesis en relación con XylR podría ser debida a cambios conformacionales inducidos por la mutación de XylR7 que afecten a la unión a sus dianas en el ADN, como se ha sugerido para otros reguladores de la familia (Han y Winans, 1994).

... de la reacción de oxidación de los compuestos de la serie de la *Wittig*...
 ... de la reacción de oxidación de los compuestos de la serie de la *Wittig*...
 ... de la reacción de oxidación de los compuestos de la serie de la *Wittig*...

... de la reacción de oxidación de los compuestos de la serie de la *Wittig*...
 ... de la reacción de oxidación de los compuestos de la serie de la *Wittig*...

... de la reacción de oxidación de los compuestos de la serie de la *Wittig*...
 ... de la reacción de oxidación de los compuestos de la serie de la *Wittig*...

... de la reacción de oxidación de los compuestos de la serie de la *Wittig*...
 ... de la reacción de oxidación de los compuestos de la serie de la *Wittig*...

... de la reacción de oxidación de los compuestos de la serie de la *Wittig*...
 ... de la reacción de oxidación de los compuestos de la serie de la *Wittig*...

CONCLUSIONES

... de la reacción de oxidación de los compuestos de la serie de la *Wittig*...
 ... de la reacción de oxidación de los compuestos de la serie de la *Wittig*...

Los derivados de la serie de la *Wittig*...
 ... de la reacción de oxidación de los compuestos de la serie de la *Wittig*...
 ... de la reacción de oxidación de los compuestos de la serie de la *Wittig*...
 ... de la reacción de oxidación de los compuestos de la serie de la *Wittig*...
 ... de la reacción de oxidación de los compuestos de la serie de la *Wittig*...

Faint, illegible text, possibly bleed-through from the reverse side of the page.

Handwritten text or signature.

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten extraer las conclusiones que se exponen a continuación, y que pueden dividirse en dos apartados: las correspondientes a la degradación bacteriana de compuestos nitroaromáticos y las correspondientes al efecto de mutaciones puntuales en el dominio N-terminal de XylR.

El estudio de la degradación bacteriana de compuestos nitroaromáticos permite extraer las siguientes conclusiones:

1.- La bacteria *Klebsiella oxytoca* 410P es capaz de utilizar 4-nitrobenzoato como única fuente de carbono y nitrógeno. El crecimiento de esta cepa en 4-nitrobenzoato conlleva la acumulación de amonio en el medio de cultivo, lo que indica la eliminación reductiva del grupo nitro.

2.- La incubación de la bacteria *K. oxytoca* 410P en condiciones de limitación de oxígeno conduce a la acumulación de 3,4-dihidroxibenzoato en el medio de cultivo, lo que sugiriendo que este compuesto es un intermediario de la ruta, y que es el sustrato del primer enzima dependiente de oxígeno en la ruta degradativa del 4-nitrobenzoato por la cepa 410P, presumiblemente la dioxigenasa encargada de la rotura del anillo.

3.- La ruta de degradación de 4-nitrobenzoato por la cepa *K. oxytoca* 410P es inducible por el primer sustrato de ésta, y no por el intermediario 3,4-dihidroxibenzoato, lo que indica que la expresión de los genes que codifican para los enzimas de esta ruta están sometidos a un proceso de regulación.

4.- Los enzimas de la ruta "upper" del plásmido TOL pWW0 de *Pseudomonas putida*, tolueno monooxigenasa, alcohol bencílico deshidrogenasa y benzaldehído deshidrogenasa, son capaces de utilizar como sustratos los toluenos, alcoholes bencílicos y benzaldehídos respectivamente sustituidos con grupos nitro en las posiciones 3 y 4 del anillo. La sustitución de un grupo nitro en la posición 2 o las disustituciones no son permisivas para estos enzimas. De este modo la ruta "upper" de TOL constituye un elemento versátil que puede ser utilizado en la expansión vertical de rutas bacterianas de degradación de 3- y 4-nitrobenzoato.

5.- El regulador XylR del plásmido TOL pWW0 reconoce una amplia gama de compuestos aromáticos como efectores, incluidos 2-nitrotolueno y 4-nitrotolueno; en contraste, no promueve la actividad desde el promotor Pu en presencia de 3-nitrotolueno, alcoholes nitrobencílicos o nitrobenzaldehídos, lo que sugiere que los elementos de la ruta "upper" de TOL tienen el potencial para metabolizar solamente 4-nitrotolueno.

Respecto al estudio del efecto de mutaciones puntuales en el dominio N-terminal de XylR, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1.- El mutante XylR7 es capaz de promover la transcripción desde el promotor Pu en presencia de 3-nitrotolueno, un compuesto que no es reconocido por el regulador silvestre, y retiene la capacidad de reconocer a los efectores de la proteína silvestre. Este mutante muestra una mutación puntual en la región amino terminal de la proteína, concretamente en la posición 172 que ha mutado de ácido glutámico a lisina.

2.- XylR7 conserva los requerimientos del regulador silvestre para la activación de la transcripción desde el promotor Pu, ya que ésta es dependiente de la presencia de las proteínas σ^{54} e IHF, así como de la región UAS1 de Pu. Esto supone la existencia de una estrecha relación entre el cambio aminoacídico en la cadena polipeptídica de XylR7 y la capacidad adquirida por éste para reconocer 3-nitrotolueno como efector, e indica que el residuo 172 está implicado en el reconocimiento de efectores por el regulador.

3.- El mutante XylR49 induce altos niveles de transcripción desde los promotores Pu y Ps en ausencia de efectores. Este mutante muestra una mutación puntual en la región amino terminal de la proteína, concretamente en la posición 135 que ha mutado de ácido aspártico a asparragina.

4.- La activación de la transcripción desde el promotor Pu por XylR49 es dependiente de σ^{54} .

5.- XylR49 es capaz de promover altos niveles de transcripción desde Pu en ausencia de IHF. De este modo, XylR49 es capaz de superar las restricciones impuestas por IHF, cuyo papel físico en la estimulación de la transcripción parece ser facilitar la interacción entre el regulador unido a las secuencias UAS y el complejo de la ARN-polimerasa/ σ^{54} en presencia de efectores.

6.- XylR49 estimula altos niveles de transcripción desde Pu aún en ausencia de la zona UAS1, mientras que la delección de las regiones UAS1 y UAS2 produce una anulación de la transcripción desde el promotor, lo que indica el requerimiento de la zona UAS2 para la activación por el regulador mutante.

7.- La estimulación de la transcripción desde el promotor Ps por los mutantes XylR7 y XylR49, muestra diferencias respecto al promotor Pu, ya que la actividad transcripcional de Ps inducida por ambos reguladores no se incrementa en presencia de efectores. Esto indica que, al igual que en el caso del regulador silvestre, la existencia de diferencias en la secuencia nucleotídica entre los promotores Pu y Ps se refleja en la actividad de ambos promotores inducida por los reguladores mutantes.

8.- Las mutaciones en el extremo N-terminal de XylR7 y XylR49 produce alteraciones en la capacidad de ambos reguladores de reprimir su propia síntesis, lo que sugiere que los cambios aminoacídicos en esta región de la proteína originan cambios en su capacidad de unirse a ADN y/o de interactuar con el factor σ^{54} .

The first part of the report deals with the general situation of the country and the progress of the work during the year. It is divided into two main sections: the first section deals with the general situation and the second section deals with the progress of the work.

The second part of the report deals with the results of the work during the year. It is divided into two main sections: the first section deals with the results of the work in the field of agriculture and the second section deals with the results of the work in the field of industry.

The third part of the report deals with the financial situation of the country and the progress of the work during the year. It is divided into two main sections: the first section deals with the financial situation and the second section deals with the progress of the work.

The fourth part of the report deals with the social situation of the country and the progress of the work during the year. It is divided into two main sections: the first section deals with the social situation and the second section deals with the progress of the work.

The fifth part of the report deals with the political situation of the country and the progress of the work during the year. It is divided into two main sections: the first section deals with the political situation and the second section deals with the progress of the work.

The sixth part of the report deals with the economic situation of the country and the progress of the work during the year. It is divided into two main sections: the first section deals with the economic situation and the second section deals with the progress of the work.

1. A. J. ... (1978) ...

2. ... (1979) ...

3. ... (1980) ...

4. ... (1981) ...

5. ... (1982) ...

6. ... (1983) ...

7. ... (1984) ...

8. ... (1985) ...

9. ... (1986) ...

10. ... (1987) ...

11. ... (1988) ...

12. ... (1989) ...

13. ... (1990) ...

14. ... (1991) ...

15. ... (1992) ...

16. ... (1993) ...

17. ... (1994) ...

18. ... (1995) ...

19. ... (1996) ...

20. ... (1997) ...

21. ... (1998) ...

22. ... (1999) ...

23. ... (2000) ...

24. ... (2001) ...

25. ... (2002) ...

26. ... (2003) ...

27. ... (2004) ...

28. ... (2005) ...

29. ... (2006) ...

30. ... (2007) ...

31. ... (2008) ...

32. ... (2009) ...

33. ... (2010) ...

34. ... (2011) ...

35. ... (2012) ...

36. ... (2013) ...

37. ... (2014) ...

38. ... (2015) ...

39. ... (2016) ...

40. ... (2017) ...

41. ... (2018) ...

42. ... (2019) ...

43. ... (2020) ...

44. ... (2021) ...

45. ... (2022) ...

BIBLIOGRAFIA

1. ... (1978) ...

2. ... (1979) ...

3. ... (1980) ...

4. ... (1981) ...

5. ... (1982) ...

6. ... (1983) ...

7. ... (1984) ...

8. ... (1985) ...

9. ... (1986) ...

10. ... (1987) ...

11. ... (1988) ...

12. ... (1989) ...

13. ... (1990) ...

14. ... (1991) ...

15. ... (1992) ...

16. ... (1993) ...

17. ... (1994) ...

18. ... (1995) ...

19. ... (1996) ...

20. ... (1997) ...

21. ... (1998) ...

22. ... (1999) ...

23. ... (2000) ...

24. ... (2001) ...

25. ... (2002) ...

26. ... (2003) ...

27. ... (2004) ...

28. ... (2005) ...

29. ... (2006) ...

30. ... (2007) ...

31. ... (2008) ...

32. ... (2009) ...

33. ... (2010) ...

34. ... (2011) ...

35. ... (2012) ...

36. ... (2013) ...

37. ... (2014) ...

38. ... (2015) ...

39. ... (2016) ...

40. ... (2017) ...

41. ... (2018) ...

42. ... (2019) ...

43. ... (2020) ...

44. ... (2021) ...

45. ... (2022) ...

1900

- Abril, M. A., Buck, M. y Ramos, J. L. (1991). *J. Biol. Chem.* **266**: 15832-15838.
- Abril, M. A., Michán, C., Timmis, K. N. y Ramos, J. L. (1989). *J. Bacteriol.* **171**: 6782-6790.
- Abril, M. A. y Ramos, J. L. (1993). *Mol. Gen. Genet.* **239**: 281-288.
- Amerkhanova, N. N. y Naumova, R. P. (1979). *Biol. Nauki.* **2**: 26-28.
- Ames, G. F. L. y Nikaido, K. (1985). *EMBO J.* **4**: 539-547.
- Ausubel, F. M. (1984). *Cell* **37**: 5-6.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. y Struhl, K. (1991). En "*Current protocols in molecular biology*" (Eds.: John Wiley and Sons). Nueva York, USA.
- Bachofer, R., Lingens, F. y Schäfer, W. (1975). *FEBS Lett.* **50**: 288-290.
- Bagdasarian, M. Lurz, B., Rückert, B., Franklin, F. C. H., Bagdasarian, M. M., Frey, J. y Timmis, K. N. (1981). *Gene* **16**: 237-247.
- Bartels, I. y Knackmuss, H. J. y Reineke, W. (1984). *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 500-505.
- Bayly, R. C. y Dagley, S. (1969). *Biochem. J.* **111**: 303-307.
- Benson, S. y Shapiro, J. (1978). *J. Bacteriol.* **135**: 278-180.
- Biek, D. P., y Cohen, S. N. (1986). *J. Bacteriol.* **167**: 594-603.
- Boyer, H. W. y Roulland-Dussoix, D. (1969). *J. Mol. Biol.* **41**: 459-472.

- Bradley, D. E. y Williams, P. A. (1982). *J. Gen. Microbiol.* **128**: 3019-3024.
- Brilon, C., Beckmann, W. y Knackmuss, H. J. (1981). *Appl. Environ. Microbiol.* **42**: 44-55.
- Bruhn, C., Lenke, H. y Knackmuss, H. J. (1987). *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 208-210.
- Buck, M. y Cannon, W. V. (1989). *Nucl. Acids Res.* **17**: 2597-2612.
- Buck, M., Miller, S., Drummond, M. y Dixon, R. (1986). *Nature* **320**: 374-378.
- Buncel, E. (1981). En: *"The chemistry of amino, nitroso, and nitro compounds and their derivatives"* Vol. **2**: 1225-1260. (Ed.: S. Patai). John Wiley and Sons, Chichester, Reino Unido.
- Burlage, R., Hooper, S. W. y Sayler, G. S. (1989). *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 1323-1328.
- Cain, R. B. (1958). *J. Gen. Microbiol.* **19**: 1-15.
- Cain, R. B. (1966a). *J. Gen. Microbiol.* **42**: 197-217.
- Cain, R. B. (1966b). *J. Gen. Microbiol.* **42**: 219-235.
- Cain, R. B. y Cartwright, N. J. (1960). *Nature* **185**: 868-869.
- Cannon, W. V., Kreutzer, R., Kent, H. M., Morett, E. y Buck, M. (1990). *Nucl. Acids Res.* **18**: 1693-1701.
- Cartwright, N. J. y Cain, R. B. (1959a). *Biochem. J.* **71**: 248-261.
- Cartwright, N. J. y Cain, R. B. (1959b). *Biochem. J.* **73**: 305-314.
- Casadaban, M., Chou, J. y Cohen, S. N. (1980). *J. Bacteriol.* **143**: 971-980.

- Chakrabarty, A. M., Friello, D. A. y Bopp, L. H. (1978). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**: 3109-3112.
- Chang, A. C. Y. y Cohen, S. N. (1978). *J. Bacteriol.* **134**: 1141-1156.
- Channon, H. J., Mills, G. T. y Williams, R. T. (1944). *Biochem. J.* **38**: 70-85.
- Chatterjee, D. K. y Chakrabarty, A. M. (1983). *J. Bacteriol.* **153**: 532-534.
- Clarke, P. (1984). En: "*Microbial degradation of organic compounds*" pp: 11-27. (Ed.: Gibson, D. T.). Marcel Dekker, Inc. Nueva York, USA.
- Claverie-Martín, F., y Magasanik, B. (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 1631-1635.
- Collado-Vides, J., Magasanik, B. y Gralla, J. D. (1991). *Microbiol. Rev.* **55**: 371-394.
- Cook, A. M. y Fewson, C. A. (1972). *Biochim. Biophys. Acta* **290**: 384-393.
- Crampton, M. R. (1969). *Adv. Phys. Org. Chem.* **7**: 211-257.
- Dagley, S. (1978). En: "*The Bacteria*" Vol **6**: 305-388. (Eds: Ornston, L. N. y Sokatch, J. R.). Academic Press, Nueva York, USA.
- Dagley, S. (1984). En: "*Microbial degradation of organic compounds*" pp: 1-10. (Ed.: Gibson, D. T.). Marcel Dekker, Inc. Nueva York, USA.
- Dagley, S. (1986). En: "*The Bacteria*" Vol **10**: 527-555. (Eds: Ornston, L. N. y Sokatch, J. R.). Academic Press, Nueva York, USA.
- Dagley, S. y Gibson, D. T. (1965). *Biochem. J.* **95**: 466-474.
- Delgado, A., Wubbols, M. G., Abril, M. A. y Ramos, J. L. (1992). *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 415-417.
- Dixon, R. (1984a). *J. Gen. Microbiol.* **130**: 2745-2755.

- Dixon, R. (1984b). *Nucl. Acids Res.* **12**: 7811-7830.
- Dixon, R. (1986). *Mol. Gen. Genet.* **206**: 129-136.
- Dixon, R., Eydmann, T., Henderson, N. y Austin, S. (1991). *Mol. Microbiol.* **5**: 1657-1667.
- Don, R. H., Weightman, A. J., Knackmuss, H. J. y Timmis, K. N. (1985). *J. Bacteriol.* **161**: 85-90.
- Dorn, E., Hellwig, M., Reineke, W. y Knackmuss, H. J. (1974). *Arch. Microbiol.* **99**: 61-70.
- Dorn, E. y Knackmuss, H. J. (1978). *Biochem. J.* **174**: 85-94.
- Downing, R. y Broda, P. (1979). *Mol. Gen. Genet.* **177**: 189-191.
- Duggleby, C. J., Bayley, S. A., Worsey, M. J., Williams, P. A. y Broda, P. (1977). *J. Bacteriol.* **130**: 1274-1280.
- Dunn, N. W. y Gunsalus, I. C. (1973). *J. Bacteriol.* **114**: 974-979.
- Duque, E., Haidour, A., Godoy, F. y Ramos, J. L. (1993). *J. Bacteriol.* **175**: 2278-2283.
- Durham, N. N. (1958). *Can. J. Microbiol.* **4**: 141-149.
- Erikson, D. (1941). *J. Bacteriol.* **41**: 277.
- Farrell, R. y Chakrabarty A. M. (1979). En: "*Plasmids of medical, environmental and commercial importance*" pp: 97-109. (Eds.: Timmis, K. N. y Puhler, A.). Elsevier, Amsterdam, Holanda.
- Feist, C. F. y Hegeman, G. D. (1969). *J. Bacteriol.* **100**: 1121-1123.
- Figurski, D. H. y Helinski, D. L. (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 1648-1656.

- Folsom, B. R., Chapman, P. J. y Pritchard, P. H. (1990). *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1279-1285.
- Franklin, F. C. H., Bagdasarian, M., Bagdasarian, M. M. y Timmis, K. N. (1981). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**: 7458-7462.
- Franklin, F. C. H., Lehrbach, P. R., Lurz, B., Rueckert, B., Bagdasarian, M. y Timmis, K. N. (1983). *J. Bacteriol.* **154**: 676-685.
- Franz, B. y Chakrabarty, A. M. (1987). En: "*The Bacteria*" Vol **10**: 295-323. (Eds: Ornston, L. N. y Sokatch, J. R.). Academic Press, Nueva York, USA.
- Friedman, D. I. (1988). *Cell* **55**: 545-554.
- Friello, D. A., Mylroie, J. R., Gibson, D. T., Rogers, J. E. y Chakrabarty, A. M. (1976). *J. Bacteriol.* **127**: 1217-1224.
- Funk, S. B., Roberts, D. J., Crawford, D. L. y Crawford, R. J. (1993). *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 2171-2177.
- Gallegos, M. T., Michán, C. y Ramos, J. L. (1993). *Nucl. Acids Res.* **21**: 807-810.
- Gibson, D. T., Hensley, M., Yoshioka, H. y Mabry, T. J. (1970). *Biochemistry* **9**: 1626-1630.
- Gober, J. W. y Shapiro, L. (1990). *Genes Develop.* **4**: 1494-1504.
- Gomada, M., Inouye, S., Imaishi, H. y Nakazawa, A. (1992). *Mol Gen. Genet.* **233**: 419-426.
- Goodman, S. D. y Nash, H. A. (1989). *Nature* **341**: 251-254.
- Groenewegen, P. E. J., Breeuwer, P., van Helvoort, J. M. L. M., Langenhoff, A. A. M., de Vries, F. P. and de Bont, J. A. M. (1992). *J. Gen. Microbiol.* **138**: 1599-1605.
- Gross, R., Aricò, B. y Rappuoli, R. (1989). *Mol. Microbiol.* **3**: 1661-1667.

- Haas, D. (1983). *Experientia* **39**: 1199-1213.
- Haïdour, A. y Ramos, J. L. (1994). *Appl. Environ. Microbiol.* (sometido a publicación).
- Haigler, B. E. y Spain, J. C. (1991). *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 3156-3162.
- Haigler, B. E. y Spain, J. C. (1993). *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 2239-2243.
- Hall, B. G. y Hartl., D. L. (1974). *Genetics* **76**: 391-397.
- Hallas, L. H. y Alexander, M. (1983). *Appl. Environ. Microbiol.* **45**: 1234-1241.
- Haller, H. D. y Finn, R. K. (1978). *Appl. Environ. Microbiol.* **35**: 890-896.
- Han, D. C. y Winans, S. C. (1994). *Mol. Microbiol.* **12**: 23-30.
- Harayama, S., Lehrbach, P. R. y Timmis, K. N. (1984). *J. Bacteriol.* **160**: 251-255.
- Harayama, S., Leppik, R. A., Rekik, M., Mermod, N., Lehrbach, P. R., Reineke, W. y Timmis, K. N. (1986a). *J. Bacteriol.* **167**: 455-461.
- Harayama, S., Mermod, N., Rekik, M., Lehrbach, P. R. y Timmis, K. T. (1987a). *J. Bacteriol.* **169**: 558-564.
- Harayama, S. y Rekik, M. (1989). *J. Biol. Chem.* **264**: 15328-15333.
- Harayama, S. y Rekik, M. (1990). *Mol Gen. Genet.* **221**: 113-120.
- Harayama, S., Rekik, M. y Timmis, K. N. (1986b). *Mol. Gen. Genet.* **202**: 226-234.
- Harayama, S., Rekik, M., Wasserfallen, A. y Bairoch, A. (1987b). *Mol. Gen. Genet.* **210**: 241-247.
- Harayama, S., Rekik, M., Wubbolts, M., Rose, K., Leppik, R. A. y Timmis, K. N. (1989). *J. Bacteriol.* **171**: 5084-5055.

- Harayama, S. y Timmis, K. N. (1989). En: "*Genetics of bacterial diversity*" pp: 151-174. (Eds.: Hopwood, D. A. y Chater, K. F.). Academic Press. Londres, Reino Unido.
- Hawkins, F. K. L. y Johnson, A. W. B. (1988). *Mol. Microbiol.* **2**: 331-337.
- Herrero, M., de Lorenzo, V. y Timmis, K. N. (1990). *J. Bacteriol.* **172**: 6557-6567.
- Holloway, B. W. y Morgan, A. F. (1986). *Ann. Rev. Microbiol.* **40**: 79-105.
- Holtel, A., Abril, M. A., Marqués, S., Timmis, K. N. y Ramos, J. L. (1990). *Mol. Microbiol.* **4**: 1551-1556.
- Holtel, A., Timmis, K. N. y Ramos, J. L. (1992). *Nucl. Acids Res.* **20**: 1755-1762.
- Hoover, T. R., Santero, E., Porter, S. y Kustu, S. (1990). *Cell* **63**: 11-22.
- Hsu, T. y Bartha, R. (1976). *J. Agric. Food Chem.* **24**: 118-122.
- Igarashi, K., Fujita, N. e Ishihama, A. (1992). *J. Mol. Biol.* **218**: 1-6.
- Igo, M. M. y Silhavy, T. J. (1988). *J. Bacteriol.* **170**: 5971-5973.
- Inouye, S., Gomada, M., Sangodkar, U. M. X., Nakazawa, A. y Nakazawa, T. (1990). *J. Mol. Biol.* **216**: 251-260.
- Inouye, S., Nakazawa, A. y Nakazawa, T. (1981). *J. Bacteriol.* **148**: 413-418.
- Inouye, S., Nakazawa, A. y Nakazawa, T. (1983). *J. Bacteriol.* **155**: 1192-1199.
- Inouye, S., Nakazawa, A. y Nakazawa, T. (1984). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 1688-1691.
- Inouye, S., Nakazawa, A. y Nakazawa, T. (1985). *J. Bacteriol.* **163**: 863-869.
- Inouye, S., Nakazawa, A. y Nakazawa, T. (1987a). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 5182-5186.

- Inouye, S., Nakazawa, A. y Nakazawa, T. (1987b). *J. Bacteriol.* **169**: 3587-3592.
- Inouye, S., Nakazawa, S. y Nakazawa, T. (1988). *Gene* **66**: 301-306.
- Ish-Horowicz, D. y Burke, J. F. (1981). *Nucl. Acids Res.* **9**: 2989-2998.
- Jensen, H. L. y Gundersen, K. (1955). *Nature* **175**: 341-343.
- Johnson, B. F. y Stanier, R. Y. (1971). *J. Bacteriol.* **107**: 469-475.
- Jouain, L., de la Judie, P., Bagztoux, S. y Huguet, T. (1981). *Mol. Gen. Genet.* **182**: 189-195.
- Kado, C. I. y Liu, S. T. (1981). *J. Bacteriol.* **145**: 1365-1373.
- Ke, Y., Lynn, L. G. y Durham, N. N. (1959). *J. Bacteriol.* **77**: 593-598.
- Keener, J. y Kustu, S. (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 4976-4980.
- Keith, L. Y., y Telliard, W. A. (1979). *Environ. Sci. Technol.* **13**: 416-423.
- Kessler, B., de Lorenzo, V. y Timmis, K. N. (1993). *J. Mol. Biol.* **230**: 699-703.
- Khöler, T., Harayama, S., Ramos, J. L. y Timmis, K. N. (1989). *J. Bacteriol.* **171**: 4326-4333.
- Kirk, T. K. (1984). En: "*Microbial degradation of organic compounds*" pp: 399-437. (Ed.: Gibson, D. T.). Marcel Dekker, Inc. Nueva York, USA.
- Kluyver, A. J. (1931). En: "*The chemical activities of microorganisms*". University of London Press, Londres, Reino Unido.
- Krajewska-Gryniewicz, K. y Kustu, S. (1983). *Mol. Gen. Genet.* **192**: 187-197.
- Kukor, J. J. y Olsen, R. H. (1990). *J. Bacteriol.* **172**: 4624-4630.
- Kunz, D. A. y Chapman, P. J. (1981). *J. Bacteriol.* **146**: 179-191.

Kustu, S., Santero, E., Keener, J., Popham, D. y Weiss, D. (1989). *Microbiol. Rev.* **53**: 367-376.

La, D. K. y Froines J. R. (1993) *Mutat. Res.* **301**: 79-85.

Landy, A. (1989). *Annu. Rev. Biochem.* **58**: 913-949.

Lebbens, M. R. y Williams, P. A. (1985). *J. Gen. Microbiol.* **131**: 3261-3269.

Lee, H. S., Ishihama, A. y Kustu, S. (1993). *J. Bacteriol.* **175**: 2479-2482.

Lehrbach, P. R., Zeyer, J., Reineke, W., Knackmuss, H. J. y Timmis, K. N. (1984). *J. Bacteriol.* **158**: 1025-1032.

Lenke, H. y Knackmuss, H. J. (1992). *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 2933-2937.

Locher, H. H., Thurnheer, T., Leisinger, T. y Cook, A. M. (1989). *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 492-494.

de Lorenzo, V., Herrero, M., Metzke, M. y Timmis, K. N. (1991). *EMBO J.* **10**: 1159-1167.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J. (1951). *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.

Ludwig, M. L., Weber, L. D. y Ballou, D. P. (1984). *J. Biol. Chem.* **259**: 14840-14842.

Maniatis, T., Fritsch, E. F. y Sambrook, J. (1982). En: "*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*". Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, USA.

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

Marqués, S., Holtel, A., Timmis, K. N. y Ramos, J. L. (1994). *J. Bacteriol.* **176**: 2517-2524.

- Marqués, S., Timmis, K. N. y Ramos, J. L. (1993). *Biochim. Biophys. Acta* **1216**: 227-236.
- McCormick, N. G., Cornell, J. H. y Kaplan, A. M. (1978). *Appl. Environ. Microbiol.* **35**: 945-948.
- McCormick, N. G., Feeherry, F. E. y Levinson, H. S. (1976). *Appl. Environ. Microbiol.* **31**: 949-958.
- McNeil, T., McNeil, D. y Tyler, B. (1982). *J. Bacteriol.* **150**: 1302-1313.
- Meisenheimer, J. (1902). *Ann. Chem.* **323**: 205-246.
- Mermod, N., Harayama, S. y Timmis, K. N. (1986). *Biotechnology* **4**: 321-324.
- Mermod, N., Lehrbach, P. R., Reineke, W. y Timmis, K. N. (1984). *EMBO J.* **3**: 2461-2466.
- Mermod, N., Ramos, J. L., Bairoch, A. y Timmis, K. N. (1987). *Mol. Gen. Genet.* **207**: 349-354.
- Messing, J. (1979). *Recomb. DNA Tech. Bull.* **2**: 43-48.
- Messing, J., Gronenborg, B., Müller-Hill, B. y Hofscheider, P. H. (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**: 3642-3646.
- Meulien, P., Downing, R. G. y Broda, P. (1981). *Mol. Gen. Genet.* **184**: 97-101.
- Miller, J. (1972). En: "*Experiments in molecular genetics*". Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, USA.
- Miller, J. F., Mekalanos, J. J. y Falkow, S. (1989). *Science* **243**: 916-922.
- Minchin, S. D., Austin, S. y Dixon, R. (1989). *EMBO J.* **8**: 3491-3499.
- Moore, F. W. (1949). *J. Gen. Microbiol.* **3**: 143-150.

- Morett, E. y Buck, M. (1989). *J. Mol. Biol.* **210**: 65-77.
- Murray, K., Duggleby, C. J., Sala-Trepat, J. M. y Williams, P. A. (1974). *Eur. J. Biochem.* **28**: 301-310.
- Murray, K. y Williams, P. A. (1974). *J. Bacteriol.* **117**: 1153-1157.
- Nakazawa, R. e Inouye, S. (1986). En: "*The Bacteria*" Vol **10**: 357-382. (Eds.: Sokatch, J. R. y Ornston, L. N.). Academic Press, Nueva York, USA.
- Nakazawa, T. (1978). *J. Bacteriol.* **133**: 527-535.
- Nakazawa, T. y Yokota, T. (1973). *J. Bacteriol.* **115**: 262-267.
- Nash, H. A. y Robertson, C. A. (1989). *J. Biol. Chem.* **256**: 9246-9253.
- Ngai, K. y Ornston, L. N. (1988). *J. Bacteriol.* **170**: 2412-2413.
- Ninfa, A. y Magasanik, B. (1986). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 5909-5913.
- Nishimura, A., Morita, M., Nishimura, Y., y Sugino, Y. (1990). *Nucl. Acids Res.* **18**: 6169-6166.
- Nishino, S. F. y Spain, J. C. (1993). *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 2520-2525.
- Nishizuka, Y., Ichiyama, A., Nakamura, S. y Hayaishi, O. (1962). *J. Biol. Chem.* **237**: 269-272.
- Nixon, B. T., Ronson, C. W. y Ausubel, F. M. (1986). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 7850-7854.
- North, A. K., Klose, K. E., Stedman, K. M. y Kustu, S. (1993). *J. Bacteriol.* **175**: 4267-4273.
- Nozaki, M. (1979). *Topics Curr. Chem.* **78**: 145-186.

- Nozaki, M., Kagamiyama, H. y Hayaishi, O. (1963). *Biochem. Z.* **338**: 582-590.
- Nozaki, M. (1974). En: "*Molecular Mechanism of oxygen activation*". (Ed.: Hayaishi, O.). p: 135. Academic Press, Nueva York, USA.
- Ornston, L. N. (1966a). *J. Biol. Chem.* **241**: 3795-3799.
- Ornston, L. N. (1966b). *J. Biol. Chem.* **241**: 3800-3810.
- Ornston, L. N. y Yeh, W. (1982). En: "*Biodegradation and detoxification of environmental pollutants*" pp: 105-126. (Ed.: Chakrabarty, A. M.). CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, USA.
- Pahel, G. y Tyler, B. (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**: 4544-4548.
- Parkinson, J. S. (1988). *Cell* **53**: 1-2.
- Parris, G. E. (1980). *Residue Rev.* **76**: 1-30.
- Pearson, J. (1948). *Trans. Faraday Soc.* **44**: 683-697.
- van Pée, K. H., Salcher, O. y Lingens, F. (1981). *Liebigs Ann. Chem.* **2**: 233-239.
- Perez-Martín, J., Timmis, K. N. y de Lorenzo, V. (1994). (sometido a publicación).
- Popham, D. L., Szeto, D., Keener, J. y Kustu, S. (1989). *Science* **243**: 629-635.
- Pumarola, A., Rodríguez-Torres, A., García-Rodríguez, J. A. y Piédrola-Angulo, G. (1987). En: "*Microbiología y parasitología médica*". (Ed.: Salvat). Barcelona, España.
- Que, L., Lauffer, R. B., Lynch, J. B., Murch, B. P. y Pyrz, J. W. (1987). *J. Am. Chem. Soc.* **109**: 5381-5385.
- Raistrick, H. (1949). *Nature* **163**: 553-554.

- Ramos, J. L., Delgado, A., Duque, E., Fandila, M. D., Gil, M. y Haïdour, A. (1994). En: Resúmenes del "Symposium on biodegradation of nitroaromatic compounds". Las Vegas, Nevada, USA.
- Ramos, J. L., Mermoud, N. y Timmis, K. N. (1987a). *Mol. Microbiol.* **1**: 293-300.
- Ramos, J. L., Rojo, F., Zhou, L. y Timmis, K. N. (1990) *Nucl. Acids Res.* **18**: 2149-2152.
- Ramos, J. L., Stolz, A., Reineke, W. y Timmis, K. N. (1986). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 8467-8471.
- Ramos, J. L. y Timmis, K. N. (1987). *Microbiol. Sci.* **4**: 228-236.
- Ramos, J. L., Wasserfallen, A., Rose, K. y Timmis, K. N. (1987b). *Science* **235**: 593-596.
- Ramos-González, M. I., Duque, E. y Ramos, J. L. (1991). *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 3020-3027.
- Rangnekar, V, M. (1988). *J. Bacteriol.* **170**: 1907-1912.
- Reineke, W. (1984). En "Microbial degradation of organic compounds" pp: 319-360. (Ed.: Gibson, D. T.). Marcel Dekker Inc. Nueva York, USA.
- Reineke, W., Jeenes, D. J., Williams, P. A. y Knackmuss, H. J. (1982). *J. Bacteriol.* **150**: 195-201.
- Reineke, W. y Knackmuss, H. J. (1978). *Biochim. Biophys. Acta* **542**: 412-423.
- Reineke, W. y Knackmuss, H. J. (1980). *J. Bacteriol.* **142**: 467-473.
- Reineke W. y Knackmuss, H. J. (1979). *Nature* **277**: 285-286.
- Reiner, A. M. (1972). *J. Biol. Chem.* **247**: 4960-4965.
- Reznikoff, W. S., Siegele, D. A., Cowing, D. W. y Gross, C. A. (1985). *Annu. Rev. Genet.* **19**: 355-387.

- Rhys-Williams, W., Taylor, S. C. y Williams, P. A. (1993). *J. Gen. Microbiol.* **139**: 1967-1972.
- Robertson, J. B., Spain, J. C., Haddock, J. D. y Gibson, D. T. (1992). *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 2643-2648.
- Rojo, F., Pieper, D. H., Engesser, D., Knackmuss, H. J. y Timmis, K. N. (1987). *Science* **238**: 1395-1398.
- Ronson, C. W., Nixon, T. y Ausubel, F. M. (1987). *Cell* **49**: 579-581.
- Ronson, C. W. (1988). En: "Nitrogen fixation: hundred years after" pp: 547-551 (Eds: Bothe, H., de Bruijn, F. J. y Newton, W. E.). Fischer, G. Stuttgart. Nueva York, USA.
- Rose, R. E. (1988). *Nucl. Acids Res.* **16**: 355-361.
- Rosenkranz, H. S. y Mermelstein, R. (1983). *Mutat. Res.* **114**: 217-267.
- Sala-Trepat, J. M., Murray, K. y Williams, P. A. (1972). *Eur. J. Biochem.* **28**: 347-356.
- Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A. R. (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**: 5463-5467.
- Santero, E., Hoover, T., Keener, J. y Kustu, S. (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 7346-7350.
- Sasse-Dwight, S. y Gralla, J. D. (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 8934-8938.
- Schackmann, A. y Müller, R. (1991). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 809-813.
- Schmidt, E., Bartels, I. y Knackmuss, H. J. (1985). *FEMS Microbiol. Ecol.* **31**: 391-395.
- Schmidt, E. y Knackmuss, H. J. (1980). *Biochem. J.* **192**: 339-347.
- Schmidt, S. K., Scow, K. M. y Alexander, M. (1987). *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 2617-2613.

- Shaw, J. y Harayama, S. (1990). *Eur. J. Biochem.* **191**: 705-714.
- Shaw, J. y Harayama, S. (1992a). *Eur. J. Biochem.* **209**: 51-61.
- Shaw, J., Schawer, F. y Harayama, S. (1992b). *Biochem. J.* **283**: 789-794.
- Shields, M. S., Montgomery, S. O., Chapman, P. J., Cuskey, S. M. y Pritchard, P. H. (1989). *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 1634-1629.
- Shimizu, M. y Yano, E. (1986). *Mutat. Res.* **170**: 11-22.
- Shingler, V., Bartilson, M. y Moore, T. (1993). *J. Bacteriol.* **175**: 1596-1604.
- Shingler, V., Franklin, F. C. H., Tsuda, M., Holroyd, D. y Bagdasarian, M. (1989). *J. Gen. Microbiol.* **135**: 1083-1092.
- Shingler, V. y Moore, T. (1994). *J. Bacteriol.* **176**: 1555-1560.
- Silhavy, T. J., Berman, M. L. y Enquist, L. W. (1984). En: "*Experiments with gene fusions*". Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, USA.
- Simpson, J. R. y Evans, W. C. (1953). *Biochem. J.* **55**: 24-33.
- Smock, L. A., Stoneburner, D. L. y Clark, J. R. (1976). *Water Res.* **10**: 537-543.
- Snell, F. D. y Snell, C. T. (1949). En: "*Colorimetric methods of analysis*" Vol **2**: 802-807. (Ed.: van Nostrand, D.). Nueva York, USA.
- Snyder, U. K., Thompson, J. F. y Landy, A. (1989). *Nature* **341**: 255-257.
- Spain, J. C., Wyss, O. y Gibson, D. T. (1979). *Biochem. Biophys. Res. Com.* **88**: 634-641.
- Spain, J. C., Zylstra, G. J., Blake, C. K. y Gibson, D. T. (1989). *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 2648-2656.
- Spanggord, R. J., Spain, J. C., Nishino, S. F. and Mortelmans, K. E. (1991). *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 3200-3205.

- Stanier, R. Y., Palleroni, N. J. y Doudoroff, M. (1976). *J. Gen. Microbiol.* **43**: 159-168.
- Stock, J. B., Stock, A. M. y Mottonen, J. M. (1990). *Nature* **337**: 745-749.
- Stormer, K. (1908). *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. Infek.* **20**: 282-290.
- Suen, W. y Spain, J. C. (1993). *J. Bacteriol.* **175**: 1831-1837.
- Suzuki, M., Hayakawa, T., Shaw, J. P., Reikik, M. y Harayama, S. (1991). *J. Bacteriol.* **173**: 1690-1695.
- Thayer, J. R. y Wheelis, M. L. (1976). *Arch. Microbiol.* **110**: 37-45.
- Toukdarian, A. y Kennedy, C. (1986). *EMBO J.* **5**: 399-407.
- Tsuda, M. e Iino, T. (1987). *Mol. Gen. Genet.* **210**: 270-276.
- Tsuda, M. e Iino, T. (1988). *Mol. Gen. Genet.* **213**: 72-77.
- Tsuda, M., Minegishi, K. e Iino, T. (1989). *J. Bacteriol.* **171**: 1386-1393.
- Turberville, C. y Clarke, P. (1981). *FEMS Microbiol. Lett.* **10**: 87-92.
- Valentin-Hansen, P., Albretchen, B. y Løve-Larsen, J. E. (1986). *EMBO J.* **5**: 2015-2021.
- Vieira, J. y Messing, J. (1982). *Gene* **19**: 259-268.
- Weiss, D. S., Batut, J., Klose, K. E., Keener, J. y Kustu, S. (1991). *Cell* **67**: 155-167.
- Weiss, V. y Magasanik, B. (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 8919-8923.
- Whited, G. M. y Gibson, D. T. (1991). *J. Bacteriol.* **173**: 3017-3020.
- Williams, P. A. (1981). *TIBS* **1**: 23-36.

- Williams P. A. y Murray, K. (1974). *J. Bacteriol.* **120**: 416-423.
- Williams, P. A. y Worsey, M. J. (1976). *J. Bacteriol.* **125**: 818-828.
- Won, W. D., Heckly, R. J., Glover, D. J. y Hoffsommer, J. C. (1974). *Appl. Microbiol.* **27**: 513-516.
- Worsey, M. J. y Williams, P. A. (1975). *J. Bacteriol.* **124**: 7-13.
- Worsey, M. J. y Williams, P. A. (1977). *J. Bacteriol.* **130**: 1149-1158.
- Worsey, M. J., Franklin, F. C. H. y Williams, P. A. (1978). *J. Bacteriol.* **134**: 757-764.
- Wubbolts, M. G. (1987). Memoria de Licenciatura. Universidad de Groningen. Groningen. Holanda.
- Wubbolts, M. G. (1993). Tesis Doctoral. Universidad de Groningen. Groningen. Holanda.
- Wubbolts, M. y Timmis, K. N. (1990). *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 569-571.
- Yamashina, I., Shikata, S. y Egami, F. (1954). *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **27**: 42-45.
- Yen, K. M. y Gunsalus, I. C. (1982). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 874-878.
- Zeyer, J. y Kearney, P. C. (1983). *J. Agric. Food Chem.* **31**: 304-308.
- Zeyer, J. y Kearney, P. C. (1984). *J. Agric. Food Chem.* **32**: 238-242.
- Zoller, M. J. y Smith, M. (1983). *Meth. Enzymol.* **100**: 468-500.