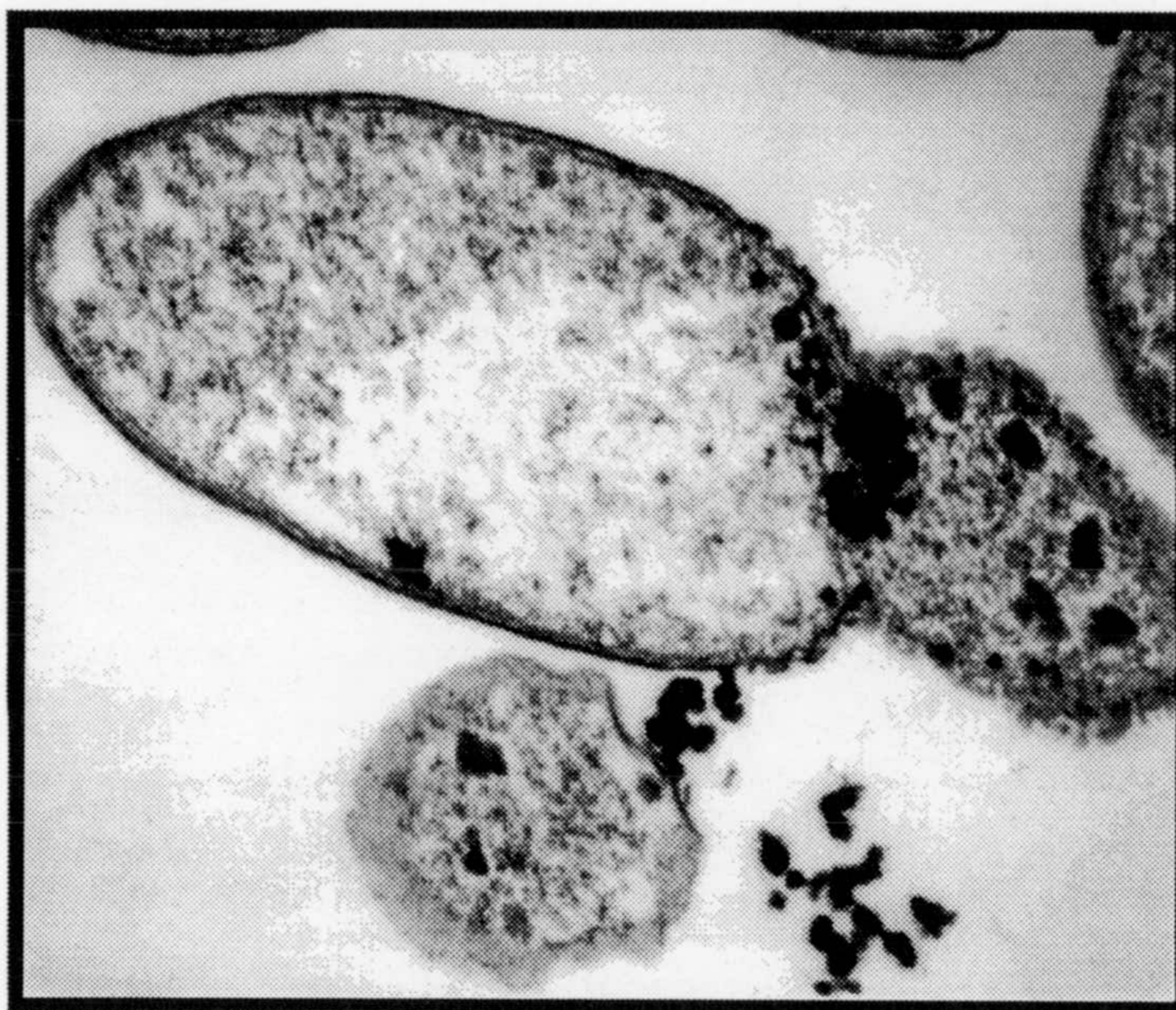


4/58

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
Nº Documento 613384818
Nº Copia 115492023

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha 19-6-97
ENTRADA NUM. 1956

**CONSTRUCCIÓN DE CEPAS DE *Pseudomonas putida* PORTADORAS
DE SISTEMAS CONDICIONALES DE CONTENCIÓN BIOLÓGICA
PARA LA ELIMINACIÓN DE CONTAMINANTES AMBIENTALES**



**M^a del Carmen Ronchel Barreno
Universidad de Granada**

1997

UNIVERSIDAD DE GRANADA
12 JUN. 1997
COMISION DE DOCTORADO

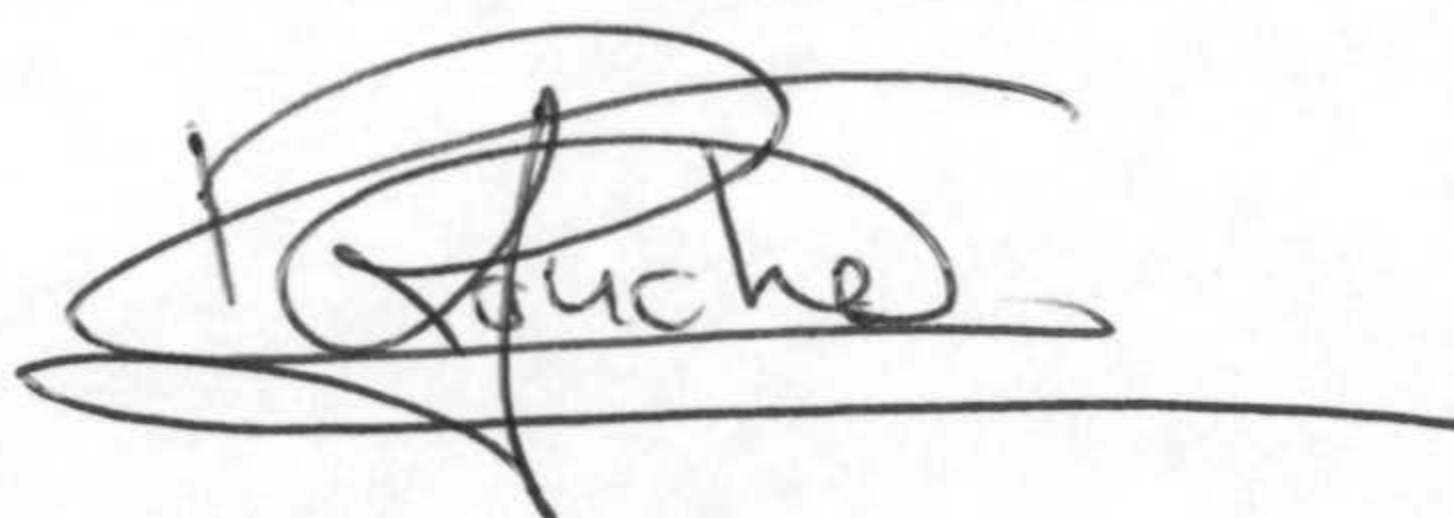
Facultad de Ciencias
UNIVERSIDAD DE GRANADA

**CONSTRUCCIÓN DE CEPAS DE *Pseudomonas putida* PORTADORAS DE
SISTEMAS CONDICIONALES DE CONTENCIÓN BIOLÓGICA PARA LA
ELIMINACIÓN DE CONTAMINANTES AMBIENTALES**

M^a del Carmen Ronchel Barreno
1997

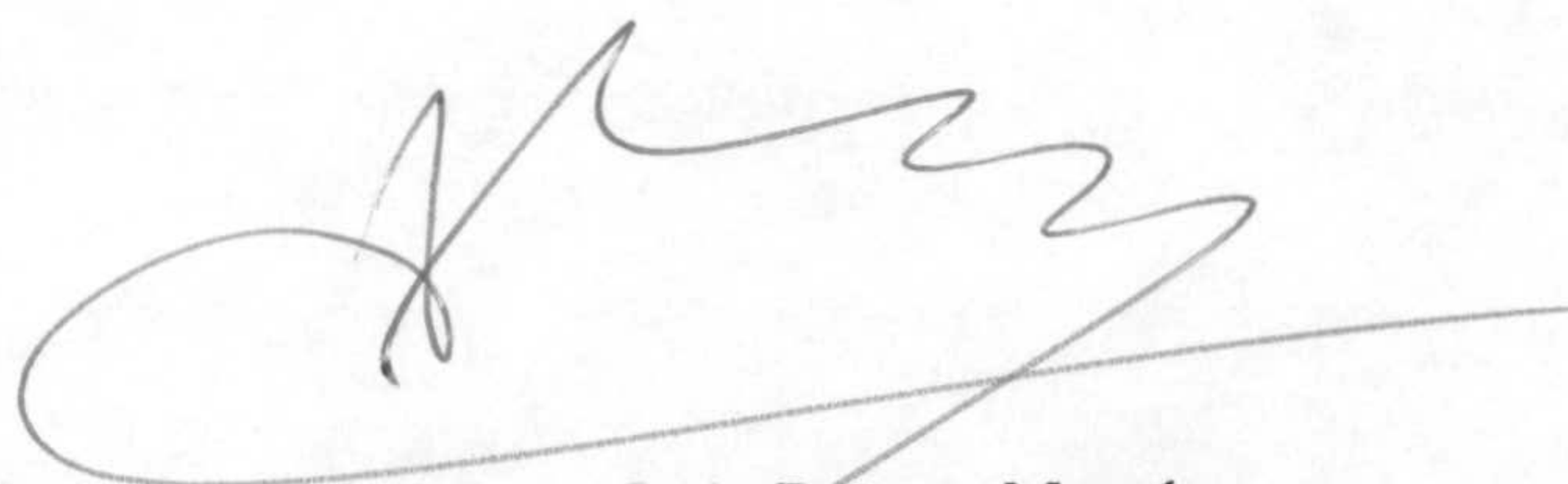
CONSTRUCCIÓN DE CEPAS DE *Pseudomonas putida* PORTADORAS DE
SISTEMAS CONDICIONALES DE CONTENCIÓN BIOLÓGICA PARA LA
ELIMINACIÓN DE CONTAMINANTES AMBIENTALES

Memoria que presenta la Licenciada en
Biología M^a del Carmen Ronchel Barreno
para aspirar al Título de Doctor

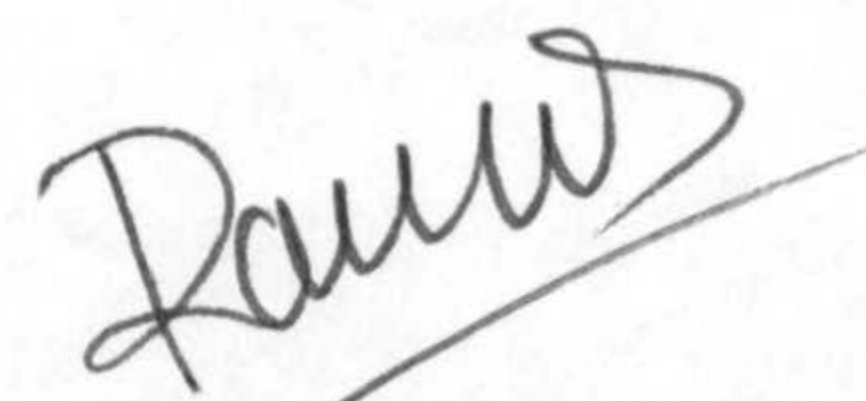


Fdo.: M^a del Carmen Ronchel Barreno

V^oB^o
Los directores



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



Fdo.: Cayo Ramos Rodríguez
Doctor en Biología

Universidad de Granada
1997

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

A Chechu
A mis padres

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

Al Dr. Juan Luis Ramos, director del grupo de Degradación de Tóxicos Orgánicos de la Estación Experimental del Zaidín, por haberme permitido formar parte de su grupo de trabajo.

A los Dres. Juan Luis Ramos y Cayo Ramos, directores de esta Tesis Doctoral, por la confianza que siempre han mostrado en mi y por todo lo que científicamente he aprendido de ellos.

A GX-Biosystem por haber financiado durante estos años mi trabajo.

A Maxi y Abraham por haber formado parte de esa "familia" tan especial y por haberme levantado el ánimo en numerosas ocasiones.

A la Dra. Silvia Marqués quiero agradecerle especialmente su gran ayuda dentro y fuera del laboratorio.

A Upe, mi primera compañera de habitación con quien he pasado tan buenos ratos y tantas tardes de "depresión".

A todos mis compañeros de laboratorio, Mati, M. Jose, Estrella, Maxi, Abraham, Upe, Chechu, Silvia, Asun, M. Trini, M. Angustias, M. Mar, M. Angeles, Lázaro, Susana, Carmina, M. Mar, Patricia, Vitor y Gilberto, por todo lo que hemos compartido durante estos años, por haber creado un ambiente agradable de trabajo en el laboratorio y por todo lo que han cuidado de mi durante estos últimos meses.

A Manolo y a Sonia, porque nunca dudaron de que sería capaz de conseguirlo. Y a Maca, Mame y Fede por la amistad y cariño que siempre me han demostrado.

Al Prof. Werner Lubitz le agradezco el haberme aceptado en su grupo de investigación durante una estancia corta en el Institute of Microbiology and Genetics de la Universidad de Viena. A Ulli Baranyi y a Holger Scholz les agradezco su ayuda en el laboratorio y su interés por hacer agradable mi estancia en Viena.

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

A Chechu, sin su ayuda y comprensión este trabajo no hubiese sido posible.

A mis padres, quienes me han apoyado siempre en todo y especialmente por el gran esfuerzo que han hecho en los últimos meses para que este trabajo pudiese terminarse.

ÍNDICE

ÍNDICE	i
ABREVIATURAS	ix
INTRODUCCIÓN	1
1. Sistemas de contención	3
1.1. Contención física	3
1.2. Contención biológica	3
1.2.1. Contención biológica "pasiva"	3
1.2.2. Contención biológica "activa"	4
2. Genes <i>matadores</i>	5
2.1. Genes de la familia <i>hok</i>	5
2.2. Nucleasas	7
2.3. Genes de bacteriófagos	8
3. Control del suicidio bacteriano	9
4. Bacterias suicidas para la eliminación de alquilbenzoatos	10
OBJETIVOS	15
MATERIALES Y MÉTODOS	19
1. Cepas bacterianas	19
2. Medios de cultivo	20
2.1. Medios ricos	20
2.2. Medios mínimos	20
2.3. Antibióticos	21
2.4. Metales pesados	22
3. Conservación de cepas bacterianas	22
4. Plásmidos	22
5. Aislamiento de ADN plasmídico	24

5.1. Método "Qiapreps"	29
5.2. Método de la lisis alcalina	29
5.3. Aislamiento del plásmido TOL pWW0	30
6. Aislamiento de ADN total	31
7. Transformación de células de <i>Escherichia coli</i>	31
7.1. Preparación de células competentes	31
7.2. Transformación	32
8. Transferencia de plásmidos por conjugación	33
9. Estabilidad de las cepas construidas	34
10. Manipulación de ADN	34
10.1. Restricción de ADN	34
10.2. Defosforilación de ADN	35
10.3. Electroforesis de ADN en geles de agarosa	35
10.4. Recuperación de fragmentos de ADN de geles de agarosa	36
10.5. Ligación de ADN	36
10.6. Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa termorresistente (PCR)	37
10.7. Secuenciación de ADN	38
11. Inducción de lisis celular en cultivos líquidos	39
11.1. Condiciones de cultivo y seguimiento de la densidad óptica	39
11.1.1. Cultivos de <i>Escherichia coli</i>	39
11.1.2. Cultivos de <i>Pseudomonas putida</i>	39
11.2. Determinación del número de células viables	40
11.3. Liberación de ácidos nucleicos	40
11.4. Liberación de proteínas y su análisis mediante electroforesis en gel de poliacrilamida	41
11.4.1. Tinción de proteína en geles de poliacrilamida	42
11.5. Eflujo de $^{86}\text{Rb}^+$	44
11.6. Visualización de la lisis celular mediante microscopía electrónica	44
12. Test de fluctuación	45

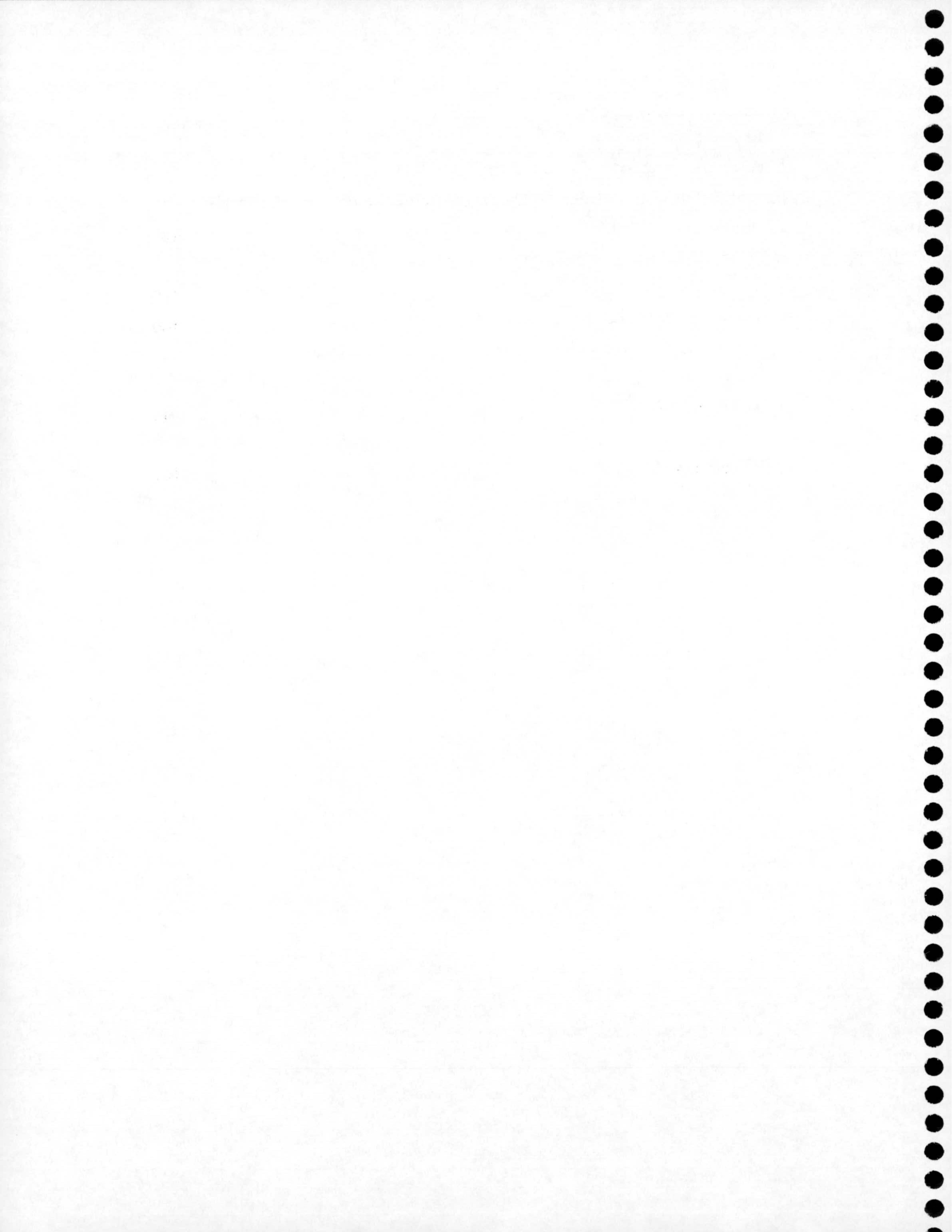
13. Experimentos en microcosmos	46
13.1. Microcosmos edáficos	46
13.1.1. Transferencia génica en microcosmos edáficos	47
13.1.2. Mineralización de <i>p</i> -metil- ¹⁴ C-benzoato en microcosmos edáficos	48
13.2. Microcosmos acuáticos	48
 RESULTADOS	 49
 I. Construcción y caracterización de un sistema activo de contención biológica para <i>Pseudomonas putida</i> asociado a la eliminación de alquilbenzoatos basado en el gen <i>gef</i> de <i>Escherichia coli</i>	 51
1. Construcción de una unidad base para el diseño del elemento <i>matador</i> de un sistema de contención	52
1.1. Construcción de una fusión P _{A1-04/03} :: <i>gef</i>	52
1.2. Clonación del elemento <i>matador</i> en un vector de transferencia	54
2. Construcción de una cepa de <i>P. putida</i> portadora del sistema activo de contención biológica basado en el gen <i>gef</i>	58
2.1. Construcción de <i>P. putida</i> receptora de mini-transposones	58
2.2. Transferencia del elemento <i>matador</i> al cromosoma de <i>P. putida</i> EEZ29	59
2.3. Construcción de las cepas control	60
3. Caracterización de las cepas contenida y control	61
3.1. Estabilidad de las cepas construidas	61
3.2. Supervivencia de las cepas en presencia y ausencia de 3MB	61
3.3. Tasa de mutación del sistema de contención biológica en <i>P. putida</i> EEZ30	63
4. Supervivencia en microcosmos edáficos de <i>P. putida</i> EEZ30 y <i>P. putida</i> EEZ32	63

4.1. Efecto de la temperatura sobre la supervivencia de <i>P. putida</i> en suelo	64
4.2. Supervivencia de <i>P. putida</i> en suelo inoculado a diferentes densidades celulares iniciales	66
4.3. Transferencia génica a <i>P. putida</i> UWC1 (pCC102) en suelo	68
4.4. Mineralización de <i>p</i> -metil- ¹⁴ C-benzoato por <i>P. putida</i> EEZ30 en suelo	75
4.5. Supervivencia de <i>P. putida</i> EEZ30 y <i>P. putida</i> EEZ32 en suelo cambisol	76
5. Supervivencia en microcosmos acuáticos de <i>P. putida</i> EEZ30 y <i>P. putida</i> EEZ32	78
II. Aislamiento y caracterización de mutantes resistentes a la acción de la proteína Gef en <i>Escherichia coli</i>	81
1. Aislamiento de mutantes de <i>E. coli</i> JM109 (pMCC22) que escapan a la lisis tras la inducción de la expresión del gen <i>gef</i>	82
2. Caracterización de los mutantes de <i>E. coli</i> JM109-1 a JM109-6 resistentes a la lisis	84
2.1. Análisis de mutaciones asociadas al plásmido pMCC22	84
2.2. Análisis de mutaciones no asociadas al plásmido pMCC22	84
III. Construcción de una cepa contenida de <i>Pseudomonas putida</i> portadora en el cromosoma de los elementos regulador y matador	87
1. Construcción de la cepa contenida <i>P. putida</i> CMC4 (pWW0)	87
2. Caracterización de las cepas contenida y control	89
2.1. Estabilidad de la inserción cromosómica	89
2.2. Tasa de mutación del sistema de contención biológica en <i>P. putida</i> CMC4 (pWW0)	89
2.3. Supervivencia de las cepas en presencia y ausencia de 3MB	89
3. Caracterización de la lisis celular en <i>P. putida</i> CMC4 (pWW0)	90

3.1. Determinación del número de células viables de <i>P. putida</i> CMC4 (pWW0) tras la expresión del gen de lisis	92
3.2. Liberación de proteínas de células de <i>P. putida</i> CMC4 (pWW0) tras la expresión del gen de lisis	92
3.3. Eflujo de $^{86}\text{Rb}^+$ desde células de <i>P. putida</i> CMC4 (pWW0) tras la expresión del gen <i>gef</i>	94
3.4. Visualización de la lisis celular mediante microscopía electrónica	96
4. Análisis de mutantes resistentes a la lisis celular	96
5. Supervivencia en microcosmos edáficos de <i>P. putida</i> CMC4 (pWW0) y <i>P. putida</i> EEZ15K-3 (pWW0)	99
5.1. Transferencia génica desde las cepas control y contenida a <i>P. putida</i> UWC1 en suelo	100
IV. Construcción y caracterización de una cepa contenida de <i>P. putida</i> portadora de dos elementos <i>matadores</i> diferentes en el cromosoma	107
1. Construcción de una unidad base para el diseño de un elemento <i>matador</i> basado en el gen <i>E</i> del fago ΦX174	108
1.1. Construcción de una fusión $\text{P}_{\text{A1-04/03}}::\text{gen } E$	108
1.2. Clonación del elemento <i>matador</i> en un vector de transferencia	111
2. Construcción y caracterización de una cepa contenida de <i>P. putida</i> basada en el gen <i>E</i> y su cepa control	115
2.1. Transferencia del elemento <i>matador</i> basado en el gen <i>E</i> al cromosoma de <i>P. putida</i> EEZ29	115
2.2. Construcción de la cepa control de <i>P. putida</i> CMC12	115
2.3. Caracterización de las cepas <i>P. putida</i> CMC12 y <i>P. putida</i> CMC13	116
2.3.1 Estabilidad de las cepas construidas	116

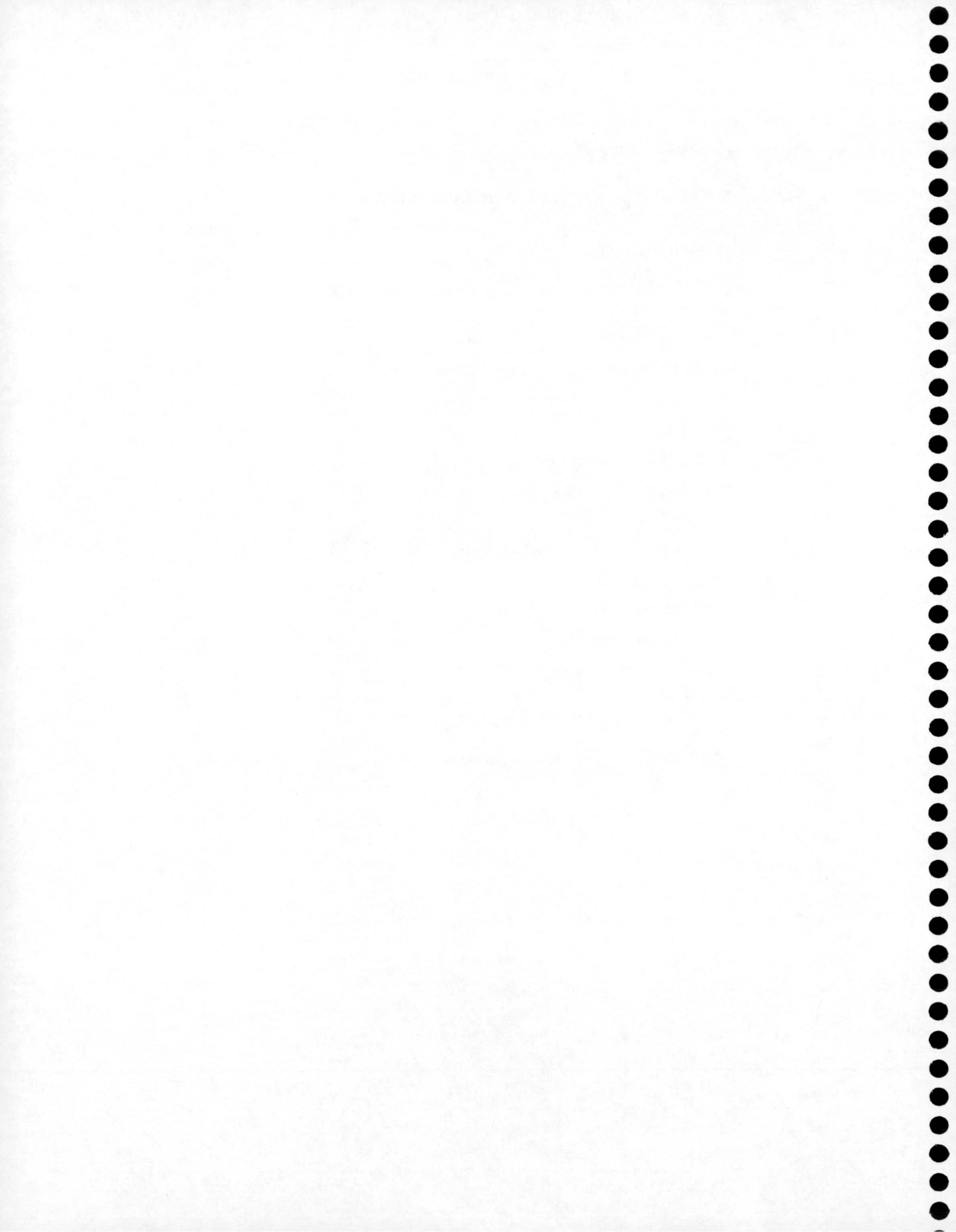
2.3.2. Supervivencia de las cepas en presencia y ausencia de 3MB	116
2.3.3. Tasa de mutación del sistema de contención biológica en <i>P. putida</i> CMC12	118
2.4. Caracterización de la lisis celular en <i>P. putida</i> CMC12	118
2.4.1. Determinación del número de células viables de <i>P. putida</i> CMC12 tras la expresión del gen de lisis	119
2.4.2. Liberación de proteínas de células de <i>P. putida</i> CMC12 tras la expresión del gen de lisis	121
2.4.3. Visualización de la lisis celular mediante microscopía electrónica	122
3. Construcción de una cepa contenida de <i>P. putida</i> portadora de un sistema activo de contención biológica con dos elementos <i>matadores</i>	122
3.1. Transferencia del elemento matador <i>badaso</i> en el gen <i>E</i> al cromosoma de <i>P. putida</i> CMC4 (pWW0)	122
3.2. Construcción de la cepa control <i>P. putida</i> CMC16	125
3.3. Caracterización de las cepas contenida <i>P. putida</i> CMC15 y su control <i>P. putida</i> CMC16	126
3.3.1. Estabilidad de las cepas construidas	126
3.3.2. Supervivencia de las cepas en presencia y en ausencia de 3MB	126
3.3.3. Tasa de mutación del sistema de contención biológica en <i>P. putida</i> CMC15	128
3.4. Supervivencia en microcosmos edáficos de <i>P. putida</i> CMC15 y <i>P. putida</i> CMC16	128
DISCUSIÓN	131
1. Sistema de contención basado en el gen <i>gef</i> y el elemento regulador en un plásmido	134

2. Análisis de las mutaciones en los elementos del sistema de contención y su utilización para la mejora del sistema de contención biológica	136
3. Caracterización de la lisis celular mediada por las proteínas Gef y E	139
4. Supervivencia de las cepas contenidas en microcosmos	139
5. Transferencia de ADN en suelo entre cepas de <i>Pseudomonas</i>	143
CONCLUSIONES	147
BIBLIOGRAFÍA	151

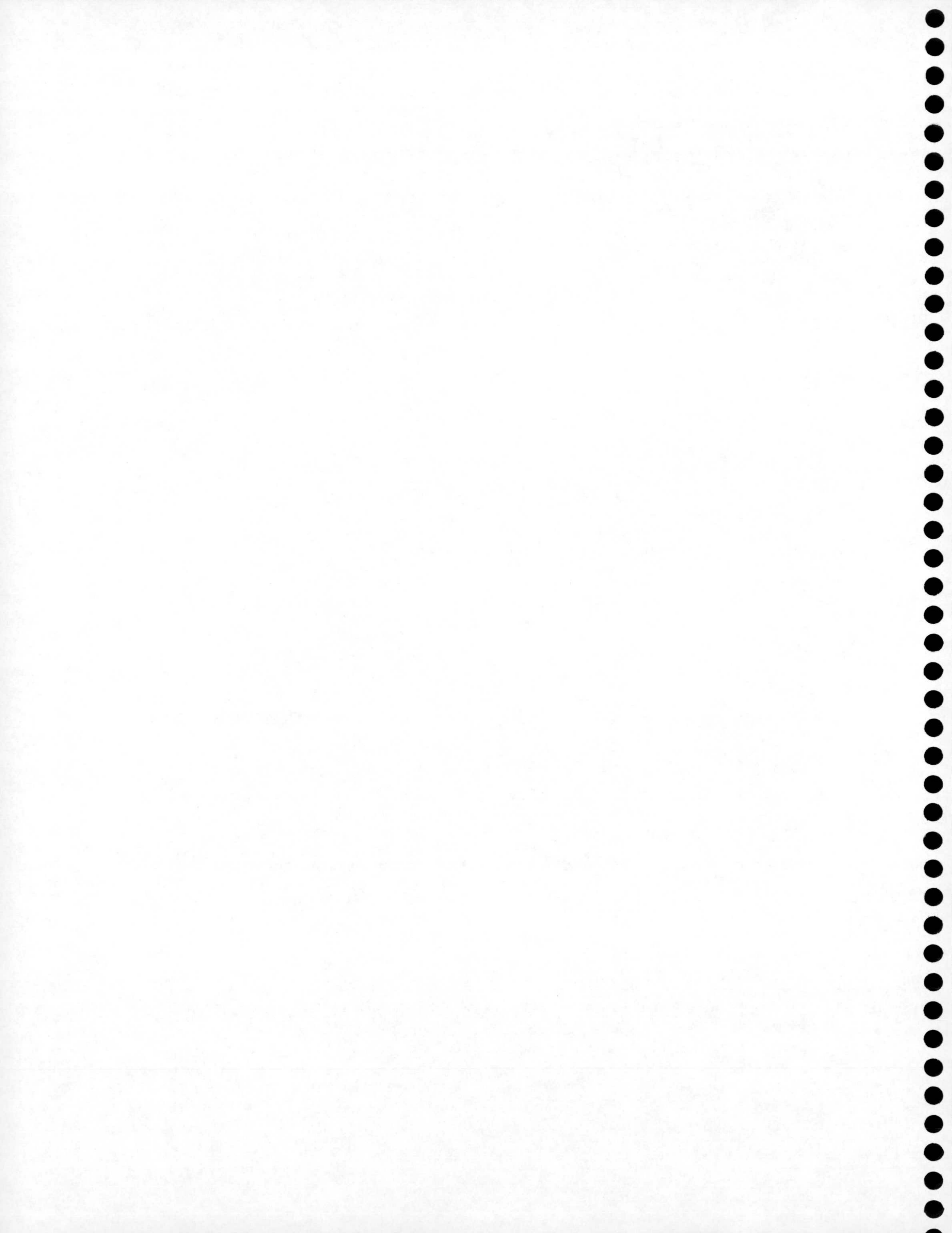


ABREVIATURAS

- Ap: ampicilina.
Bz: benzoato.
Cm: cloranfenicol.
DO₆₆₀: Densidad óptica a 660 nm.
EDTA: ácido etilendiaminotetracético.
IPTG: isopropil-β-D-tiogalactopiranosido.
Km: kanamicina.
LB: medio Luria-Bertani.
3MB: 3-metilbenzoato.
Nal: nalidíxico.
OMGs: organismo manipulado genéticamente.
pb: pares de bases.
p-OHFA: *p*-hidroxifenilacético.
SDS: laurilsulfato sódico.
Sm: estreptomicina.
Tc: tetraciclina.
Tel: telurito.
TEMED: N,N,N',N',-tetrametiletildiamino [1,2-bis(dimetilamino)]-etano.
X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido.



INTRODUCCIÓN



El vertido a la biosfera de compuestos orgánicos de síntesis ha aumentado considerablemente durante los últimos años como consecuencia de las actividades agrícola, urbana e industrial del hombre (OCDE, 1994). Muchos de los compuestos de síntesis industrial son mineralizables por los organismos vivos, es decir, son convertidos en CO₂, H₂O y formas inorgánicas. Otros, en particular los xenobióticos (compuestos que presentan estructuras o sustituyentes que raramente se encuentran en los naturales) son particularmente recalcitrantes y permanecen inalterados en la biosfera. En general, los compuestos clorados, nitroaromáticos, ésteres de nitrato, tintes, explosivos, disolventes orgánicos, etc., persisten en el medio ambiente, bien porque son tóxicos para los microorganismos, bien porque presentan estructuras químicas muy estables y resistentes al ataque biológico, o bien porque poseen elementos estructurales que no suelen encontrarse en la naturaleza. 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, constituyendo una fuente de contaminación ambiental. Por este motivo, la degradación biológica de contaminantes constituye uno de los desafíos más interesantes de investigación en biología de nuestro tiempo, en particular en todos aquellos aspectos dirigidos a mejorar y explotar las rutas biodegradativas existentes para la eliminación de contaminantes ambientales, o si esto no es posible, desarrollar experimentalmente nuevas rutas catabólicas (Ramos *et al.*, 1994). La mejora de rutas catabólicas se puede conseguir tanto a través de la explotación de los procesos genéticos naturales (conjugación, transformación y transducción), como mediante la ingeniería genética que, con su amplia oferta de herramientas moleculares, permite acelerar la evolución de rutas biodegradativas y mejorar, de esta manera, la degradación de xenobióticos recalcitrantes (Ramos *et al.*, 1994). Como ejemplos de compuestos aromáticos para los cuales se han construido rutas catabólicas *in vivo* e *in vitro* se pueden citar las de degradación de *p*-etilbenzoato y *p*-etiltolueno (Abril *et al.*, 1989; Ramos *et al.*, 1987); *p*-clorobenzoato (Reineke y Knackmuss, 1979; Rojo *et al.*, 1987); 3,5-diclorobenzoato (Lehrbach *et al.*, 1984; Ramos *et al.*, 1986); clorosalicilatos (Lehrbach *et al.*, 1984) y 2,4,6-trinitrotolueno (Duque *et al.*, 1993). Las bacterias elegidas para ser hospedadoras de dichas rutas biodegradativas modificadas fueron Pseudomonadáceas, porque éstas

constituyen los hospedadores naturales de vías degradativas que les confieren un alto potencial catabólico (Galli *et al.*, 1992).

La manipulación genética de microorganismos de interés en prácticas agrícolas ha recibido gran atención en los últimos años, en particular como agentes de control biológico, por ejemplo cepas mejoradas de *Bacillus thuringiensis* en el control de nematodos, y mejora de cepas de *Rhizobium* y de *Pseudomonas fluorescens* que estimulan el crecimiento de plantas (Schroth *et al.*, 1982; Suslow y Schroth, 1982). Hoy día asistimos a una avalancha de publicaciones que inciden en la combinación del potencial metabólico de ciertas bacterias y el efecto beneficioso de la rizosfera de la planta en el crecimiento de las bacterias. Este área se conoce como "rizorremediación" y persigue la recuperación de sitios contaminados por pequeñas concentraciones de contaminantes (Dowling *et al.*, 1994; Kartson *et al.*, 1995). *Pseudomonas fluorescens* sp. F113 es un ejemplo de microorganismo aislado de la rizosfera de la remolacha con gran potencial tanto en control biológico, como en eliminación de bifenilos policlorinados (Brazil *et al.*, 1994). Por otro lado en nuestro grupo de investigación se ha demostrado recientemente que *Pseudomonas putida* mt-2 y sus derivados son excelentes colonizadores del sistema radicular de plantas de interés agronómico (Rodríguez-Herva *et al.*, 1997; Ramos *et al.*, 1997), y que en dicho hábitat se ve favorecida la eliminación de alquilbenzoatos (C. Ramos, resultados no publicados).

Las primeras aplicaciones prácticas de organismos manipulados genéticamente (OMGs) se realizaron en el campo de la medicina (Molin *et al.*, 1993). La gran información y la experiencia que se tenía con *Escherichia coli* la convirtió en el candidato ideal como organismo hospedador de genes para la producción de hormonas y factores de crecimiento. En la actualidad varios microorganismos se están utilizando como vehículos para el desarrollo de vacunas vivas, entre ellos cepas de *Vibrio cholerae*, *E. coli* y *Bacillus subtilis* (B.I. Eisenstein, 1981; Georgiou *et al.*, 1997). Las prácticas dentro de este ámbito de la biotecnología se han realizado en condiciones de confinamiento físico que limitan la dispersión de los OMGs y además, incorporan marcadores que reducen la supervivencia de las cepas en caso de liberación accidental.

En las áreas de la biorremediación, control biológico y vacunas vivas se prevé en muchos casos la liberación de los microorganismos modificados en ambientes naturales. La posible liberación de OMGs al medio ambiente ha generado serias preocupaciones tanto en la opinión pública general, como en la comunidad de científicos, debido a los escasos conocimientos que se poseen sobre el comportamiento de los OMGs en hábitats naturales, y a la

incapacidad de predecir su comportamiento en distintos ecosistemas (Ramos *et al.*, 1995; Tiedje *et al.*, 1989).

Sería pues deseable controlar a voluntad la supervivencia de los OMGs en el medio ambiente, lo cual conlleva dotar al organismo recombinante de un sistema activo de contención biológica.

1. SISTEMAS DE CONTENCIÓN

1.1. Contención física

La supervivencia, multiplicación y dispersión de los microorganismos silvestres y recombinantes se pueden controlar fácilmente en el laboratorio fundamentalmente de forma física. Los métodos de contención física más usados son la utilización de filtros y la introducción de cambios en el medio ambiente que rodea al cultivo, tales como el aumento de temperatura y la bajada o subida del pH. Sin embargo, estos métodos son inviables en el medio ambiente y, de momento, la única vía disponible de predicción es la de dotar a las cepas, silvestres o recombinantes, de sistemas de contención biológica.

1.2. Contención biológica

Los sistemas de contención biológica asociados a OMGs deben cumplir, al menos, tres requisitos: i) los microorganismos portadores del sistema de contención biológica deben ser estables genéticamente; ii) los microorganismos deben morir rápidamente o ser inviables tras una liberación no intencionada de los mismos, o cuando su tarea en el medio ambiente haya finalizado; y, iii) se debe evitar la transferencia del material genético del OMGs a microorganismos indígenas. La contención biológica puede ser "activa" o "pasiva".

1.2.1. Contención biológica "pasiva"

Consiste en la utilización de cepas bacterianas con mutaciones en genes esenciales para la supervivencia de la cepa en ambientes naturales. La utilización de sistemas de contención "pasiva" puede dar lugar a una menor capacidad de supervivencia del microorganismo en el medio ambiente y, por tanto, su efectividad para la función a desarrollar estaría, a priori,

disminuida. Aunque esto es un serio inconveniente para cepas de interés medioambiental, en los primeros años de la biotecnología estas mutaciones se desarrollaron como vía de prevención en caso de accidente.

Roy Curtiss III, mediante técnicas de genética clásica, construyó una serie de mutantes de *Escherichia coli* debilitados en su supervivencia fuera del laboratorio. La cepa X1776 (Curtiss III *et al.*, 1977) es deficiente en la síntesis del ácido D-amino pimélico, un constituyente esencial de la pared celular, el cual no está presente en la naturaleza y cuya adición al medio de cultivo fue necesaria para que la cepa sobreviviese en el laboratorio. Además de esta mutación, la cepa X1776 poseía otras mutaciones que la hacían vulnerable a factores de estrés ambiental.

La cepa *E. coli* HB101 es una cepa *recA* diseñada para ser hospedadora de moléculas de ADN recombinantes (Boyer y Roulland-Dussoix, 1969). La mutación *recA* probablemente sea suficiente para reducir significativamente la supervivencia de la cepa en el medio ambiente, eliminando cualquier riesgo de establecimiento de la misma fuera del laboratorio (R. Simon, citado en Molin *et al.*, 1993). Esta cepa sigue usándose hoy en día en numerosos laboratorios debido a su facilidad de cultivo y transformación, y a la ausencia de plásmidos. Además, la cepa posee mutaciones cromosómicas que sirven como marcadores para su selección.

1.2.2. Contención biológica "activa"

Es fundamental que los OMGs diseñados para actuar fuera del laboratorio sean capaces de establecerse en el nicho adecuado durante cierto periodo de tiempo y mantener un tamaño de población razonable para realizar su misión, pero que una vez concluida la misma su viabilidad se reduzca de manera notable, de forma que desaparezca del nicho inicialmente colonizado. Esto puede conseguirse mediante la inducción de la expresión de genes, denominados genes *matadores* o *suicidas*, que no interfieren con el crecimiento normal de la cepa, pero que conducen a la muerte celular bajo condiciones definidas por la composición física o química del ambiente. Estos genes deben estar perfectamente regulados, mediante su asociación a un circuito de control que regule su expresión.

Los sistemas activos de contención biológica deben cumplir una serie de requisitos: i) la eficiencia de muerte debe ser elevada con la menor concentración posible de proteína matadora, ii) el gen *matador* debe actuar en un amplio espectro de bacterias, iii) el sistema suicida no debe interferir

con otras funciones del microorganismo y, iv) la tasa de mutación del sistema debe ser lo más baja posible.

2. GENES MATADORES

Los candidatos ideales para ser utilizados como genes *matadores* son aquellos genes cuyo objetivo sean funciones celulares centrales, las cuales sean universales en procariotas.

El elemento *matador* de un sistema de contención biológica debe, por un lado, ser una unidad genética de fácil clonación que actúe en una gran variedad de microorganismos; por otro lado, debe conducir a la muerte celular de forma inmediata después de la inducción de su expresión.

2.1. Genes de la familia *hok*

Esta familia está compuesta por los siguientes genes: *hok* del plásmido R1 (Gerdes *et al.*, 1985), *srnB* (Ohnishi *et al.*, 1977) y *flm* (Loh *et al.*, 1986) del plásmido F, *pnd* (Akimoto y Ohnishi, 1982) de los plásmidos R16, R64, R483 y Collb-P9 y los genes cromosómicos *relF* (Gerdes *et al.*, 1986b), *gef* (Poulsen *et al.*, 1989) y *hokA* (Pedersen and Gerdes, 1996) de *E. coli* K-12 y *hokH* del cromosoma de *Hafnia alvei* (K. Gerdes, resultados no publicados).

Los genes de esta familia codificados en plásmidos están implicados en el mantenimiento de los mismos en la cepa hospedadora a través de un mecanismo conocido como muerte post-segregacional (Gerdes *et al.*, 1986a). Sin embargo, la función de los genes cromosómicos es desconocida, si bien se sabe que no son genes esenciales para el crecimiento de *E. coli*, pues la delección de los mismos no tiene ningún efecto perjudicial (Poulsen *et al.*, 1989).

El mecanismo de muerte post-segregacional se ha estudiado extensamente en el sistema *hok/sok* del plásmido R1 (Thisted *et al.*, 1995). El sistema está formado por 3 genes: *hok* (*host killing*), *sok* (*suppression of killing*) y *mok* (*mediation of killing*). Los genes *hok* y *mok* se transcriben en un mismo ARNm denominado ARNm Hok. El producto del gen *hok* es una proteína que causa la muerte de las células; el gen *sok* codifica para un ARN antisentido complementario de la región líder del ARNm Hok; el gen *mok* se localiza corriente arriba del gen *hok* y solapa con este casi en su totalidad. No se conoce función para el producto del gen *mok*. El ARNm Hok es inactivo traduccionalmente, ya que posee en su extremo 3' una secuencia que aparee

con el sitio de unión al ribosoma del gen *mok*. La traducción del ARNm Hok es activada por el lento procesamiento del extremo 3' (Thisted *et al.*, 1994; Franch y Gerdes, 1996). El blanco del ARN antisentido codificado por *sok* es la región líder del ARNm Hok, la cual contiene el sitio de unión al ribosoma y el codon AUG de *mok*. Una vez procesado el ARNm Hok, el ARN antisentido *sok* se une a dicha región impidiendo la traducción del ARNm Hok. La traducción de *hok* está acoplada a la de *mok*, de este modo el ARN antisentido codificado por *sok* regula indirectamente la traducción de *hok* a través de *mok*. Una vez procesado el ARNm Hok, si el plásmido está presente, el ARN antisentido previene la expresión de *hok*. Dado que la vida media del ARN antisentido es muy breve (unos 30 segundos), en células en las que se ha perdido el plásmido y no hay más síntesis de ARN antisentido la cantidad del mismo disminuye rápidamente. En dichas células se lleva a cabo la traducción del ARNm Hok y se sintetiza la proteína Hok. Esta proteína se inserta en la membrana celular, el potencial de membrana se colapsa, disminuye la respiración y como consecuencia se produce la muerte celular (Gerdes *et al.*, 1986b). Mecanismos similares se han descrito para otros genes de la familia (Thisted *et al.*, 1994; Nielsen y Gerdes, 1995).

La inducción de la síntesis de Relf y Gef (dos de los genes cromosómicos de la familia) produce los mismos efectos que la inducción de la síntesis de Hok (Gerdes *et al.*, 1986b). Ambas proteínas se encontraron asociadas a la membrana celular. La inducción de la síntesis de PndA y SrnB resulta en el influjo de la enzima periplásmica RNasaI, produciéndose la degradación del ARN (Ito y Ohnishi 1983) y una permeabilización a iones Mg^{2+} (Ito y Ohnishi 1983; Sakikawa *et al.*, 1989). Como consecuencia de estos daños la morfología de las células cambia a lo que se conoce como células "fantasmas", células translúcidas en el centro y opacas en los polos (Gerdes *et al.*, 1986a). A pesar de los daños en la membrana, las células no se lisan inmediatamente después de la inducción, aunque pierden totalmente su viabilidad, lo que indica que los daños en la membrana son irreversibles (Gerdes *et al.*, 1986a; 1986b).

Todos los genes pertenecientes a la familia *hok* están regulados a nivel post-transcripcional (Bech *et al.*, 1985; Gerdes *et al.*, 1986a; 1988; Loh *et al.*, 1988; Poulsen *et al.*, 1989; Akimoto *et al.*, 1989); además, la similaridad en la organización genética, secuencia de ADN y estructura de las proteínas indican que el mecanismo de acción de todos los miembros de esta familia debe ser similar (Gerdes *et al.*, 1990).

La alta toxicidad de las proteínas de esta familia, el pequeño tamaño de las mismas (aproximadamente 52 aminoácidos), así como que su blanco sea la membrana citoplasmática, hace que los genes de esta familia sean una

fuelle de genes *matadores* para el diseño de sistemas de contención biológica que puedan ser utilizados en un amplio espectro de bacterias (Molin *et al.*, 1987). Al menos tres genes pertenecientes a esta familia se han utilizado en la construcción de sistemas de contención biológica: *hok* (Molin *et al.*, 1987), *relF* (Knudsen *et al.*, 1991) y *gef* (Contreras *et al.*, 1991).

2.2. Nucleasas

Otra forma diferente de inducción de la muerte bacteriana utilizada en contención biológica es el ataque por nucleasas a los ácidos nucleicos. De esta forma se consigue la muerte del OMGs y la destrucción del material genético, evitando la transferencia del mismo a otras bacterias. Este tipo de proteínas tienen las mismas ventajas que aquellas de la familia *hok* con respecto a la universalidad de su blanco, y añaden la ventaja de que el material genético es atacado directamente.

En este sentido los primeros ensayos se realizaron con genes que codificasen una enzima de restricción pero sin la correspondiente actividad de modificación. Stephen Cuskey utilizó el gen que codifica la enzima *EcoRI*. La actividad endonucleasa basal resultó ser demasiado elevada, produciéndose una inhibición del crecimiento celular incluso en ausencia de inducción, por lo que el sistema no se estudió en mayor detalle (citado por Molin *et al.*, 1993). Una alternativa fue la utilización de enzimas, altamente específicas, con actividad endonucleasa. De entre ellas, se han utilizado con éxito las endonucleasas de ARN y ADN sintetizadas y secretadas por *Serratia marcescens* y *Staphylococcus aureus* (Ball *et al.*, 1987; Davis *et al.*, 1977). Para su utilización en sistemas de contención la secuencia de ADN que codificaba la enzima madura se fusionó al promotor del operón de la lactosa (P_{lac}) junto a un sitio de unión al ribosoma y un sitio de iniciación de la traducción (ATG) (A. K. Bej y S. Molin, resultados no publicados). En otro sistema, la nucleasa madura de *S. marcescens* se fusionó al promotor P_L del fago lambda (Ahrenholtz, *et al.*, 1994). En todos los casos, en ausencia de inducción de la expresión de las nucleasas hubo crecimiento de las células, mientras que tras la inducción de la expresión de las nucleasas las células cesaron en su crecimiento y gran parte de la población murió.

Otro gen utilizado para evitar la transferencia de genes clonados desde los OMGs a la población de bacterias indígenas es el gen que codifica la colicina E3. El sistema consta de dos genes, el gen *colE3*, que codifica la ARNasa colicina E3, y el gen de inmunidad *immE3*, que codifica un inhibidor de la función letal, la proteína de inmunidad E3 (Díaz *et al.*, 1994). La

colicina E3 inhibe la síntesis de proteínas mediante la digestión específica del extremo 3' del ARNr 16S, produciendo de esta forma la muerte celular. Dicho extremo está conservado en todos los procariotas y en algunos eucariotas (Lasater *et al.*, 1989), lo que permite que el sistema funcione en una gran variedad de microorganismos. El sistema diseñado por Díaz *et al.* (1994) para la reducción de la transferencia lateral de ADNr consta de un módulo en el cual el gen *matador* está ligado al determinante responsable del nuevo fenotipo, mientras que el gen de inmunidad se encuentra clonado lejos de ambos, evitando de esta forma la co-transferencia del gen de muerte y del gen de inmunidad. La posible transferencia del determinante del nuevo fenotipo a un nuevo microorganismo iría acompañada de la transferencia del gen letal, pero no del gen de inmunidad, y como consecuencia el organismo receptor moriría. En este sistema, el gen *immE3* se clonó en el cromosoma de diferentes cepas de *E. coli* y *P. putida*, de forma que la proteína de inmunidad se produjese de forma constitutiva, y el gen *colE3* se clonó bajo el control del promotor P_{tac} en un plásmido de amplio espectro. El sistema funcionó en todos los casos probados, produciéndose una disminución en la frecuencia de transferencia del plásmido recombinante de 4 a 5 órdenes de magnitud.

2.3. Genes de bacteriófagos

El análisis genético de algunos mutantes del fago $\Phi X174$ identificó un único gen de lisis en el fago, denominado gen *E* (Hutchison y Sinsheimer, 1966), y se demostró que la expresión de este gen desde un plásmido era suficiente para causar la lisis bacteriana (Henrich *et al.*, 1982). El gen *E* codifica una proteína de 91 aminoácidos (Barrell *et al.*, 1976) detectable tanto en fracciones de la membrana interna como de la externa de *E. coli* (Bläsi *et al.*, 1983; Altman *et al.*, 1985; Bläsi *et al.*, 1989). Tras la síntesis, la proteína E se oligomeriza formando un tunel que atraviesa toda la envuelta celular de *E. coli* (membrana citoplasmática, espacio periplásmico y membrana externa), preferencialmente en las zonas de división celular o en las regiones polares (Witte *et al.*, 1990; Witte *et al.*, 1992; Bläsi *et al.*, 1989). En el lugar del tunel transmembrana, la membrana citoplásmica se fusiona a la membrana externa (Witte *et al.*, 1990), lo que permite que el material citoplásmico se libere al exterior, pero no así el periplásmico. Esta serie de acontecimientos conducen a la lisis celular.

Tedin *et al.*, (1995) sugirieron un posible sistema de contención basado en el gen *E*. En primer lugar comprobaron que el promotor *rrnB* P1 de

E. coli funcionaba como un sensor para condiciones de hambre y propusieron un sistema en el cual el promotor *rrnB* P1 se fusionaría al represor *cl* del fago lambda, el cual controlaría la expresión del promotor p_L en dicho fago. El sistema *cl/p_L* es operativo en la mayoría de las bacterias Gram-negativas (Murooka y Mitani, 1985; Leemans *et al.*, 1987; Davison *et al.*, 1987) y en *B. subtilis* (Breitling *et al.*, 1990). Basado en las anteriores premisas propusieron localizar el elemento de control *rrnB* P1::*cl* en el cromosoma de la cepa y el gen de *E* fusionado al promotor p_L en un plásmido. El sistema debería funcionar de manera que en condiciones de baja concentración de nutrientes, como consecuencia de una liberación accidental, disminuiría la actividad del promotor *rrnB* P1, con lo que la expresión del represor *cl* también disminuiría, de forma que daría lugar a la transcripción del gen de lisis desde el promotor p_L . El desarrollo del sistema de contención propuesto permanece en estudio.

3. CONTROL DEL SUICIDIO BACTERIANO

La clave para el diseño de un sistema de contención biológica funcional está en la regulación de la expresión del gen *matador*.

En el laboratorio, el sistema de control de la muerte bacteriana utilizado más frecuentemente se basa en la fusión de un gen *matador* al promotor del operón de la lactosa (P_{lac}), cuya expresión se reprime por la proteína LacI (Bej *et al.*, 1988). En presencia de lactosa o del análogo de la misma, isopropiltiogalactósido (IPTG), la proteína LacI se libera del promotor P_{lac} y éste se expresa libremente. Sin embargo, en el medio ambiente no sería práctico controlar la supervivencia de microorganismos liberados intencionadamente utilizando una señal química exógena. El control de la muerte celular a través de compuestos presentes en el medio ambiente, o a través de cambios en las condiciones físicas del entorno (por ejemplo temperatura, humedad, etc.), se consideraron más convenientes. Sin embargo, encontrar un sistema de expresión óptimo resulta complejo debido a varias causas: i) el promotor que regule la expresión del gen *matador* debe ser lo suficientemente activo bajo las condiciones ambientales, permitiendo la expresión del gen tanto en fase exponencial como en fase estacionaria, ii) bajo condiciones de constante variación, es difícil elegir un sistema de expresión para una condición ambiental específica. La solución estaría en diseñar un sistema de control directamente relacionado con la tarea que el microorganismo tenga que realizar en el medio ambiente, y iii) es necesario

determinar si la función *matadora* es activa bajo las condiciones ambientales y los diferentes estados fisiológicos de la célula.

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

El sistema descrito anteriormente, aunque eficiente, no podría utilizarse cuando se desea que los microorganismos persistan en el medio ambiente hasta que hayan concluido la función para la que han sido diseñados. La estrategia idónea consistiría en lo siguiente: analizar la función que debe cumplir el microorganismo en el medio ambiente, definir los cambios que deben producirse una vez terminada la función y diseñar el elemento de control que responda de forma más adecuada a estos cambios. En el apartado siguiente se ilustra esta estrategia en el ámbito de la biodegradación.

4. BACTERIAS SUICIDAS PARA LA ELIMINACIÓN DE ALQUILBENZOATOS

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

El plásmido TOL pWWO de *Pseudomonas putida* (Williams y Murray, 1974) se considera el plásmido arquetipo de degradación de tolueno y porta la información genética necesaria para la degradación de éste y otros alquilbencenos. *P. putida* (pWWO) utiliza como fuente de carbono y energía para su crecimiento tolueno, *m*- y *p*-xileno, *m*-etiltolueno y 1,2,4-trimetilbenceno (Worsey y Williams, 1975). En primer lugar los hidrocarburos aromáticos se oxidan hasta sus correspondientes ácidos carboxílicos (benzoatos) en una serie de reacciones que constituyen la denominada ruta *upper*. Posteriormente, los benzoatos se oxidan via catecol a

intermediarios del ciclo de Krebs a través de la llamada ruta *meta*. Las enzimas correspondientes a cada una de estas dos rutas están codificadas por dos operones diferentes, el *upper* y el *meta*, regulados por las proteínas XylR y XylS, respectivamente (Harayama y Timmis, 1989; Marqués y Ramos, 1993; Ramos *et al.*, 1997). El operón *meta*, uno de los más largos descritos hasta la fecha en procariotas, consta de 13 genes cuya transcripción es activada por el regulador XylS a partir del promotor P_m en presencia de benzoato o derivados sustituidos de éste.

El grupo de Degradación de Tóxicos Orgánicos de la Estación Experimental del Zaidín construyó cepas contenidas de *E. coli* que respondían a la presencia/ausencia de alquilbenzoatos. El sistema de contención biológica diseñado constó de dos elementos: un elemento *matador* y un elemento regulador de la expresión del elemento *matador* (Contreras *et al.*, 1991). El elemento *matador* se basó en el gen *gef* de *E. coli*. El gen *gef* se clonó bajo el control del promotor sintético P_{tac} . El elemento regulador, se basó en el regulador XylS2 y en una fusión del gen *lacI* de *E. coli* al promotor P_m de la ruta *meta* del plásmido TOL pWWO de *P. putida*. El regulador XylS2 es un regulador mutante en el cual el aminoácido Arg45 ha sido sustituido por una Thr. Este simple cambio de aminoácido hace que el regulador mutante reconozca efectores que no son reconocidos por la proteína silvestre XylS, entre los que se encuentran: 2-hidroxi-4-etilbenzoato, y 2- y 4-metoxibenzoato (Ramos *et al.*, 1986). Además, el regulador mutante presenta una mayor afinidad por los benzoatos, lo cual permite el control de poblaciones capaces de degradar un amplio rango de benzoatos a concentraciones micromolares (Ramos *et al.*, 1990).

El funcionamiento del sistema es el siguiente: en presencia de efectores de XylS2, por ejemplo 3-metilbenzoato (3MB), el regulador adquiere una estructura que activa la transcripción desde el promotor P_m , la proteína LacI se sintetiza y previene la expresión desde el promotor P_{lac} permitiendo la supervivencia de la célula (Fig. 1). En ausencia de 3MB no se sintetiza LacI, el promotor P_{lac} se libera, la proteína Gef se sintetiza y se produce la muerte celular.

Este trabajo de Tesis Doctoral se diseñó para transferir el sistema de contención descrito a cepas de *Pseudomonas*, y su posterior validación tanto en condiciones controladas de laboratorio como en suelos. Para ello en este trabajo se consideraron los objetivos que se describen en el siguiente apartado.

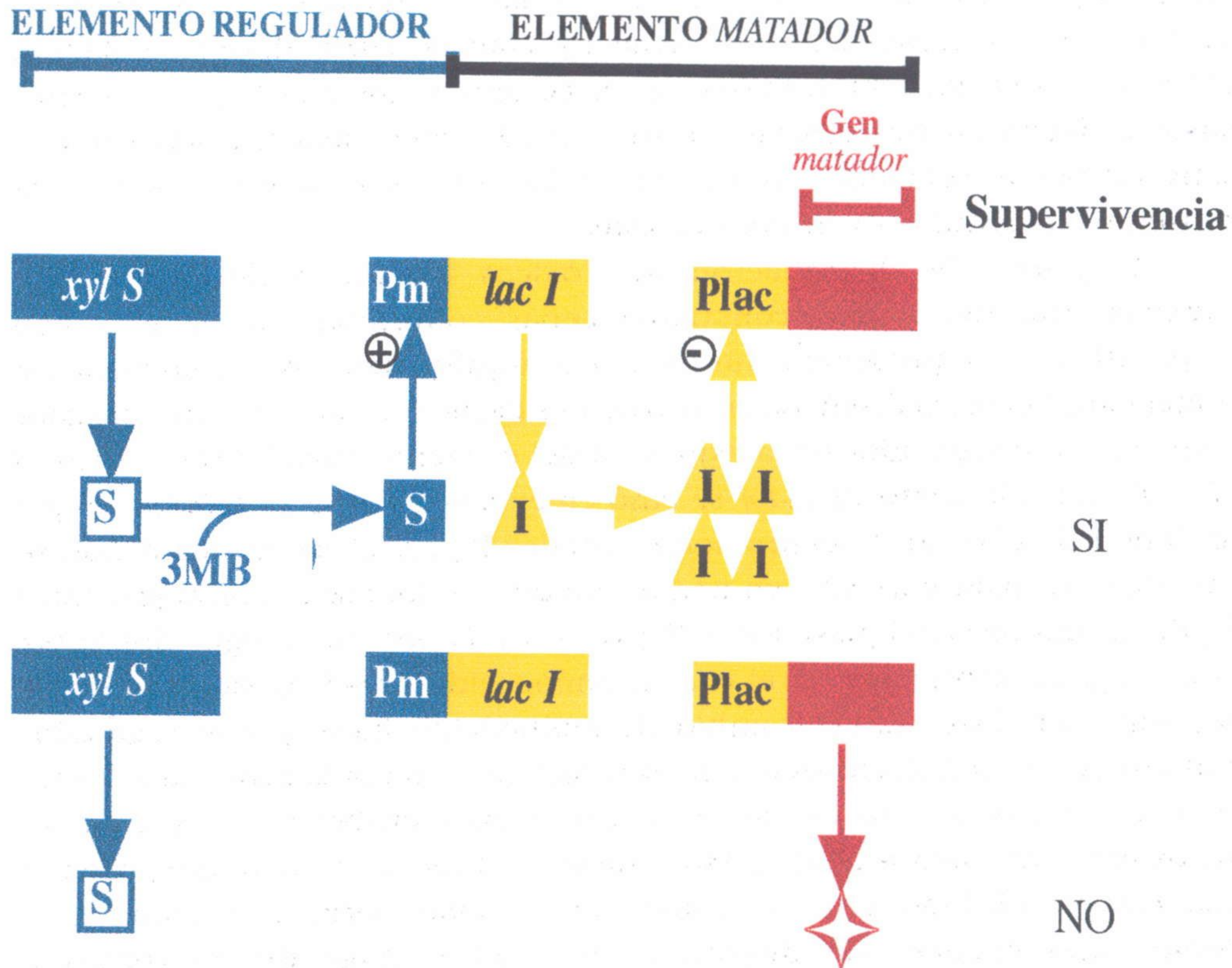
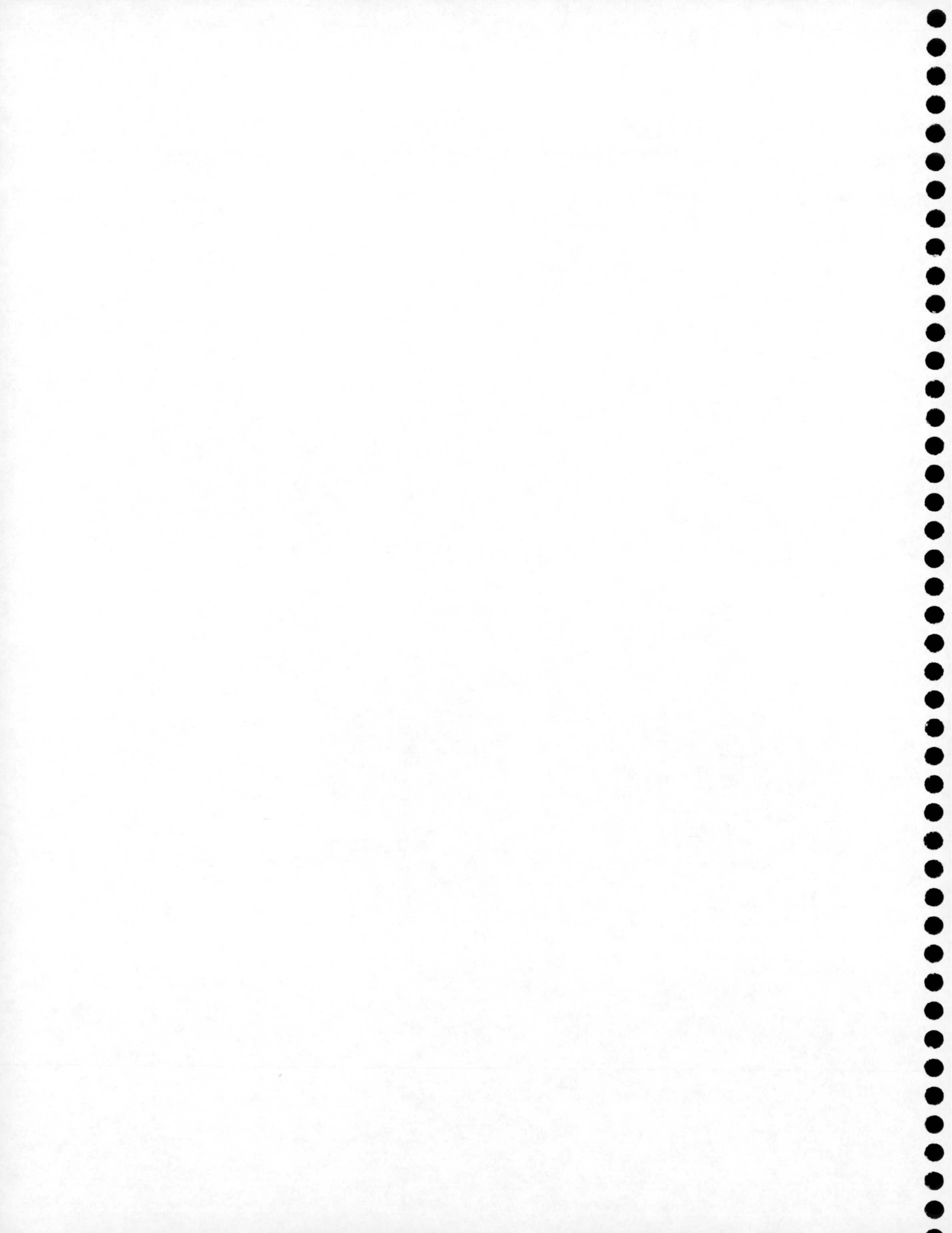


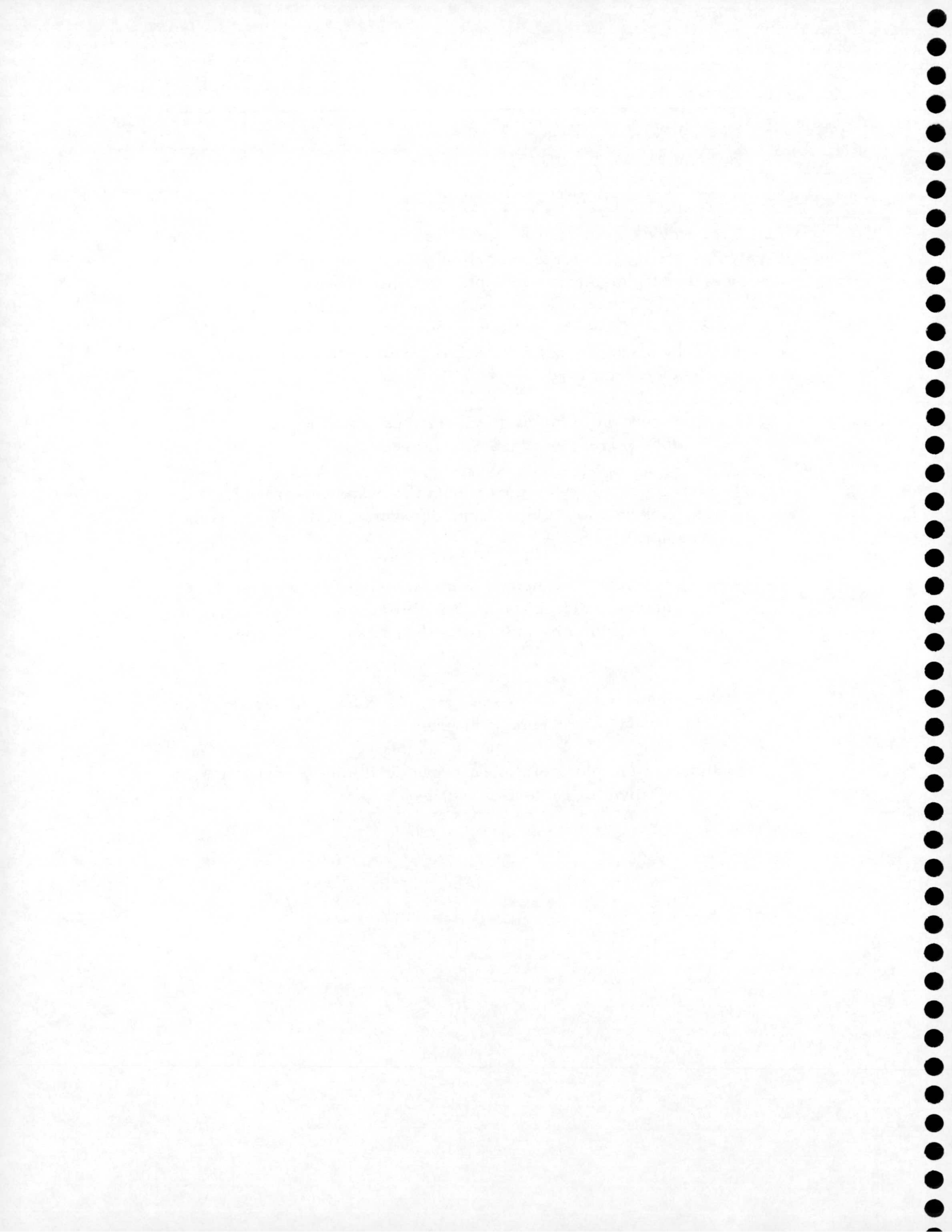
Figura 1. Sistema de contención biológica para bacterias que degradan alquilbenzoatos. El gen *xylS* se expresa constitutivamente a bajo nivel, sintetizándose un regulador inactivo, XylS (S). a) En presencia de 3-metilbenzoato (u otro efector) XylS se activa (■) y estimula la transcripción desde el promotor P_m expresándose el represor *Lacl* (Δ) que forma tetrámeros que inhiben la expresión desde el promotor P_{lac} , previniendo la expresión del gen *matador*. b) En ausencia de efector, no se sintetiza el represor *Lacl* y, en consecuencia, se expresa la proteína *matadora* (◇) y la bacteria muere.

OBJETIVOS

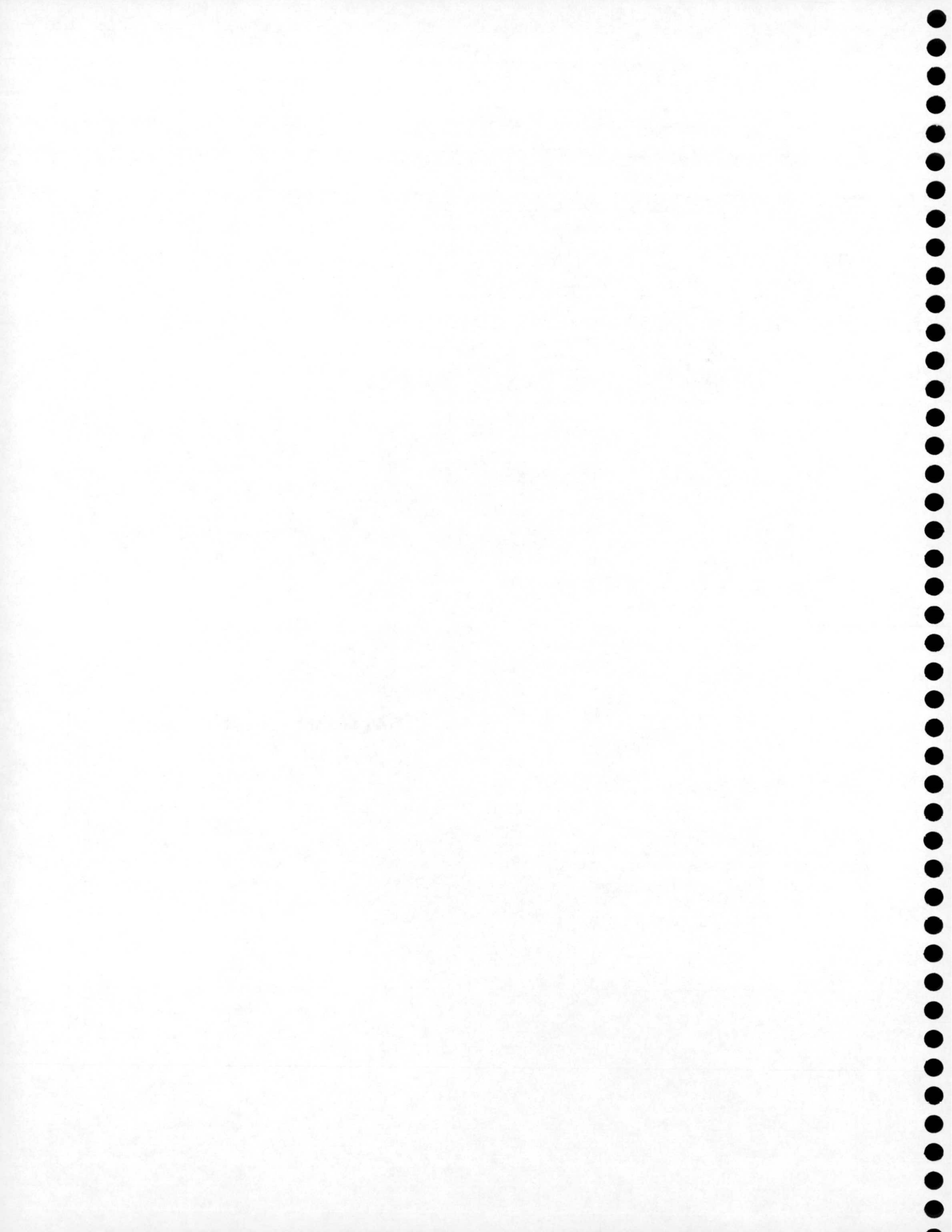


En la *Introducción* de este trabajo, se ha descrito brevemente la utilidad de los sistemas activos de contención biológica, como vía de control de poblaciones de microorganismos manipulados genéticamente que puedan ser liberados al medio ambiente. Este trabajo perseguía la construcción de cepas de *P. putida* portadoras de un sistema activo de contención biológica asociado a la eliminación de alquilbenzoatos. De este modo, se plantearon los siguientes objetivos concretos:

1. La construcción de diferentes elementos *matadores* basados en el gen *gef* de *E. coli* y en el gen *E* del fago Φ X174.
2. Clonación de los diferentes elementos *matadores* en vectores de transferencia que sirviesen como donadores universales de dichos elementos.
3. El acoplamiento de los elementos *matadores* al sistema de regulación de la ruta *meta* del plásmido TOL pWW0 con el fin de construir cepas de *P. putida* portadoras de sistemas activos de contención biológica.
4. La caracterización del proceso de lisis celular en *Pseudomonas putida* tras la inducción de la muerte.
5. Validación en microcosmos de cepas de *P. putida* portadoras de sistemas activos de contención biológica.



MATERIALES Y MÉTODOS



1. CEPAS BACTERIANAS

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

Tabla 1. Estirpes bacterianas utilizadas en este trabajo

Estirpe	Genotipo/Fenotipo	Referencia
<i>Escherichia coli</i>		
JM109	F'(traD36 proAB ⁺ lacZΔM15 lac ^M) recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi-1 Δ(lac-proAB)	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
CC118λpir	Δ(ara-leu)7697 araD139 ΔlacX74 galk galE phoA20 thi-1 rpsE rpoB argE(Am) recA1 λpir	Herrero <i>et al.</i> , 1990
HB101	F ⁻ supE44 hsdS20(r _B ⁻ m _B ⁻) recA13 ara14 proA2 lacY1 galk2 rpsL20 xyl5 mtl1	Boyer y Roulland- Dussoix, 1969
CSH36	lacI lacZ ⁺	B. Bachmann
Mv1190λpir	F'(traD36 proAB ⁺ lacZΔM15 lac ^M) thi Δ(lac-proAB) supE Δ(srl- recA) 306::Tn10 λpir	Herrero <i>et al.</i> , 1990
<i>Pseudomonas putida</i>		
KT2440	hsdMR	Franklin <i>et al.</i> , 1981
EEZ15K-3	Km ^r derivada de EEZ15	Ramos-González <i>et al.</i> , 1994
UWC1	Rif ^r derivada de KT2440	M. Day

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 estériles de nitrocelulosa o policarbonato de 0,22 μm de diámetro de poro.

2.1. Medios ricos

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

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 a una concentración final de 1,5% (p/v) y se esterilizó en el autoclave.

2.2. Medios mínimos

Para el cultivo de células en medio mínimo se utilizó una modificación del medio M9 (Maniatis *et al.*, 1982) cuya composición fue la siguiente:

Solución 10 x M9.....	100 ml
Solución A9	2,5 ml
MgSO ₄ x 7H ₂ O (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 por separado y se esterilizaron en el autoclave.

La composición de la solución 10 x M9 fue:

Na ₂ HPO ₄ x 12H 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
NaMoO 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) Glucosa: se preparó una solución concentrada al 20% (p/v), se esterilizó en el autoclave, se almacenó a 4°C y se añadió al medio a una concentración final de 0,5% (p/v).

b) Benzoato (Bz), 3-metilbenzoato (3MB) y *p*-hidroxifenilacético (*p*OHFA): se prepararon soluciones concentradas 0,5 M a pH 7,0, se esterilizaron en el autoclave, se almacenaron a temperatura ambiente y se utilizaron a una concentración final de 5 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 y esterilizada por filtración.

Para la preparación de medios sólidos se añadió bactoagar a una concentración final de 2,25% (p/v).

2.3. Antibióticos

Los antibióticos se prepararon en soluciones 1000 veces concentradas en H₂O destilada, excepto el cloranfenicol que se preparó en etanol absoluto,

y la rifampicina y la tetraciclina que se disolvieron en metanol. Las soluciones preparadas en H₂O se esterilizaron por filtración y se almacenaron a -20°C. Los antibióticos se utilizaron a las concentraciones finales indicadas en µg/ml:

Ampicilina (Ap).....	100
Cloranfenicol (Cm).....	30
Estreptomicina (Sm).....	50
Acido nalidíxico (Nal).....	10
Tetraciclina (Tc).....	10
Kanamicina (Km).....	50
Rifampicina (Rif).....	10

2.4. Metales pesados

El telurito potásico (Tel) se preparó en solución 1000 veces concentrada en H₂O destilada, se esterilizó por filtración, se almacenó a -20°C y se utilizó a una concentración final de 30 µg/ml.

3. CONSERVACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS

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

4. PLÁSMIDOS

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 *Resultados*.

Tabla 2. Plásmidos utilizados en este trabajo

Plásmido	Características	Referencia
RK600	Cm ^r ColE1 <i>oriV</i> RK2 <i>mob</i> ⁺ <i>tra</i> ⁺	Kessler <i>et al.</i> , 1992
pUC18Not	Ap ^r	Herrero <i>et al.</i> , 1990
pCC102	Km ^r <i>xyIS2</i> P _m :: <i>lacI</i>	Contreras <i>et al.</i> , 1991
pUHE 24-1	Ap ^r Cm ^r ColE1 <i>oriV</i>	H. Bujard
pUT/mini-Tn5 /Km2	Ap ^r Km ^r R6K <i>oriV</i> RP4 <i>oriT</i>	de Lorenzo <i>et al.</i> , 1990
pUT/mini-Tn5 /Tc	Ap ^r Tc ^r R6K <i>oriV</i> RP4 <i>oriT</i>	de Lorenzo <i>et al.</i> , 1990
pUT/mini-Tn5 /Tel	Ap ^r Tel ^r R6K <i>oriV</i> RP4 <i>oriT</i>	J.M. Sánchez y V. de Lorenzo, 1996
pLBJ89	Km ^r Ap ^r P _{A1-04/03} :: <i>gef</i>	Jensen <i>et al.</i> , 1993
pSM1350	Km ^r Ap ^r <i>xyIS</i> P _m :: <i>lacI</i> P _{A1-04/03} :: <i>gef</i>	S. Molin
pJB3KmD	IncP1 Km ^r Ap ^r	J.M. Blatny, 1997
pWWO	IncP9 <i>mob</i> ⁺ <i>tra</i> ⁺ <i>m</i> ⁻ , <i>p</i> -xileno ⁺ ; <i>m</i> ⁻ , <i>p</i> -toluato ⁺	Worsey y Williams, 1975

RK600: plásmido auxiliar utilizado para movilizar plásmidos *mob*⁺, *tra*⁺. Es portador del sistema de replicación ColE1 cuyo espectro de huésped se restringe a *E. coli* y, por tanto, se comporta como vector suicida en *Pseudomonas*. Por otro lado, lleva la región de transferencia de los plásmidos del grupo RK2 que permite la movilización de plásmidos *mob*⁺ a un amplio espectro de huéspedes.

pUC18Not: vector de clonación que contiene el sitio de clonación múltiple (MCS) del plásmido pUC18 flanqueado por extremos NotI. Carece del gen *rop* implicado en el control del número de copias de los plásmidos que contienen el origen de replicación ColE1, dando lugar a que esté presente en alto número de copias (100-200) por célula.

pCC102: plásmido derivado de pKT231, contiene el gen *xyIS2* y una fusión del promotor P_m del plásmido TOL pWWO de *P. putida* al gen *lacI* de *E. coli* (Figura 2).

pUHE24-1: vector desarrollado para estudiar señales de expresión bacteriana, promotores, terminadores y sistemas promotor-operador. Es un derivado de la familia de plásmidos pDS que contiene el promotor sintético, $P_{A1-04/03}$, fusionado al sitio de unión al ribosoma modificado del fago T5 (Figura 3).

pUT: plásmidos suicidas construidos a partir del vector pGP704. Estos plásmidos codifican resistencia a ampicilina, presentan el origen de replicación del plásmido R6K y su replicación es dependiente de la proteína π . Los plásmidos pertenecientes a la serie pUT portan las dos repeticiones invertidas de 19 pb del transposón Tn5. En presencia de la transposasa de Tn5, las secuencias de ADN incluidas entre dichas secuencias invertidas son transponibles. Estas secuencias transponibles se denominan mini-Tn5. Los correspondientes a mini-Tn5/Km2, mini-Tn5/Tc y mini-Tn5/Tel codifican resistencia a kanamicina, tetraciclina y telurito respectivamente (Figura 4).

pLBJ89 y pSM1350: plásmidos derivados del plásmido pUT-Km en el cual se ha clonado en el sitio de restricción *NotI* el fragmento $P_{A1-04/03}::gef$ y $xyIS P_m::lacI P_{A1-04/03}::gef$, respectivamente.

pJB3KmD: plásmido de bajo número de copias y de amplio espectro de huésped derivado de pRK2 que posee un sitio de clonación múltiple. Este plásmido codifica un péptido de 99 aminoácidos de la región amino terminal de la β -galactosidasa, que se expresa desde el promotor del operón de la lactosa, P_{lac} , y que complementa la actividad β -galactosidasa en cepas que portan la delección *lacZ* Δ M15. Este plásmido es movilizable, pero no autotransmisible.

pWWO: plásmido TOL arquetipo de *P. putida*. Codifica las rutas catabólicas para el metabolismo de tolueno, *m*-xileno y 3-metilbenzoato (Figura 5).

5. AISLAMIENTO DE ADN PLASMÍDICO

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

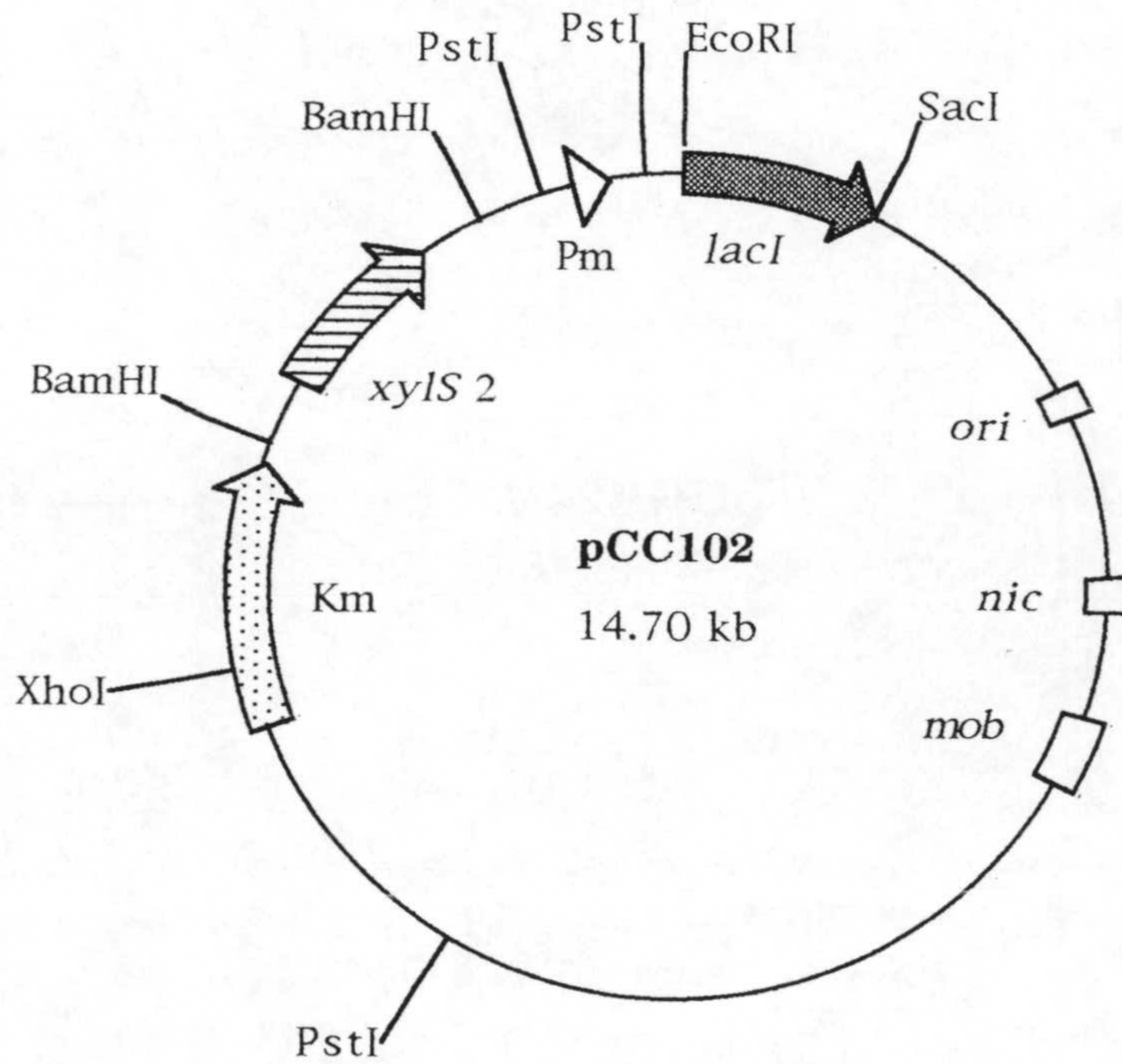


Figura 2. Esquema del plásmido pCC102

Se muestran los sitios de restricción para las enzimas indicadas, así como la localización del origen de replicación, del gen de resistencia a kanamicina (Km) y de las regiones *nic* y *mob* necesarias para la movilización del plásmido. Las flechas indican el sentido en el que se transcriben los genes.

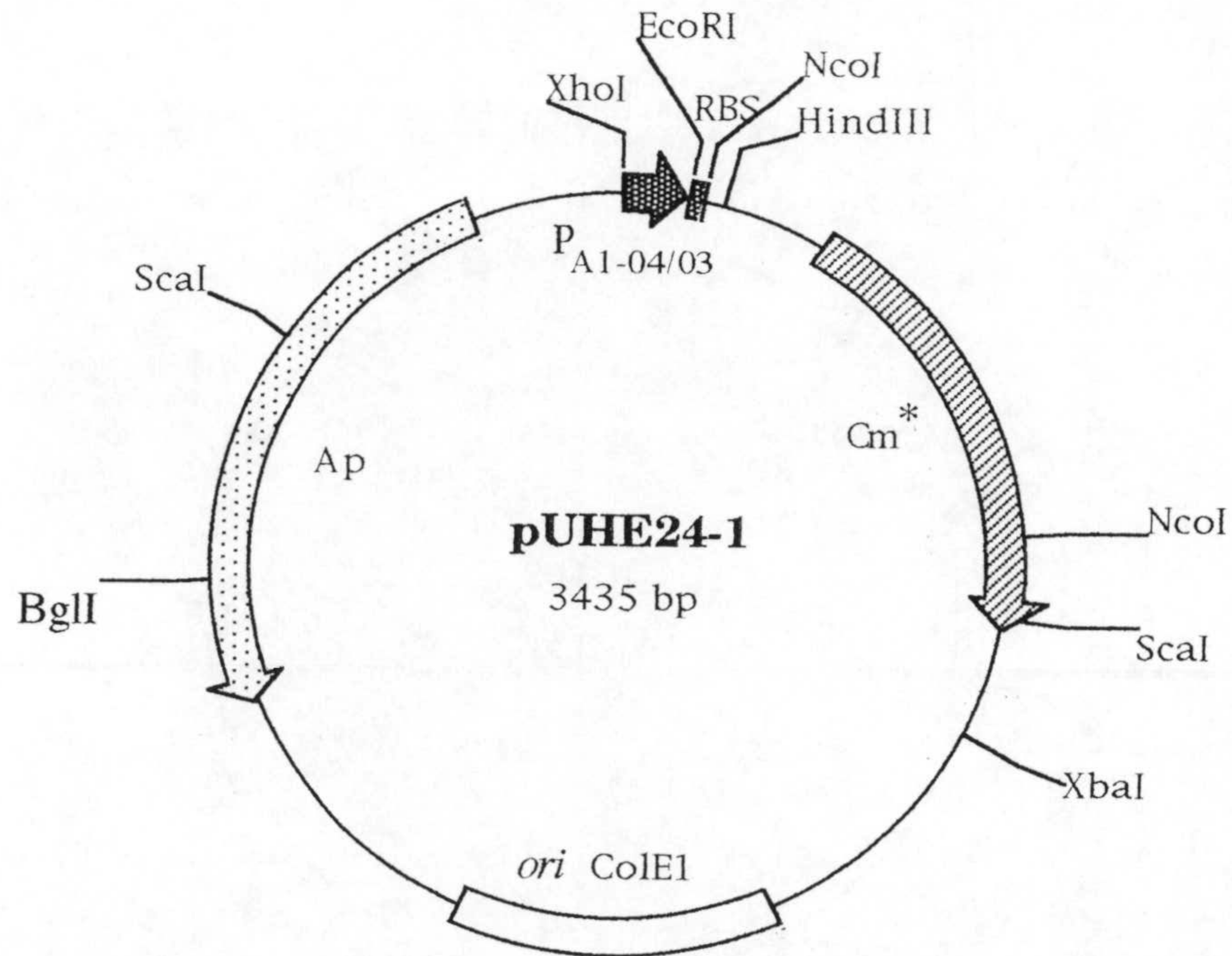


Figura 3. Esquema del plásmido pUHE24-1

Se muestran los sitios de restricción únicos y dobles para las enzimas que se indican, así como la localización del origen de replicación, los genes de resistencia a ampicilina (Ap) y cloranfenicol (Cm), el promotor sintético P_{A1-04/03} y el sitio de unión al ribosoma (RBS) en el transcrito que se originaría como consecuencia de la lectura a partir del promotor P_{A1-04/03}. Las flechas indican el sentido en el que se transcriben los genes. El gen de resistencia a cloranfenicol, aunque posee su propio sitio de unión al ribosoma, se transcribe a partir del promotor P_{A1-04/03}.

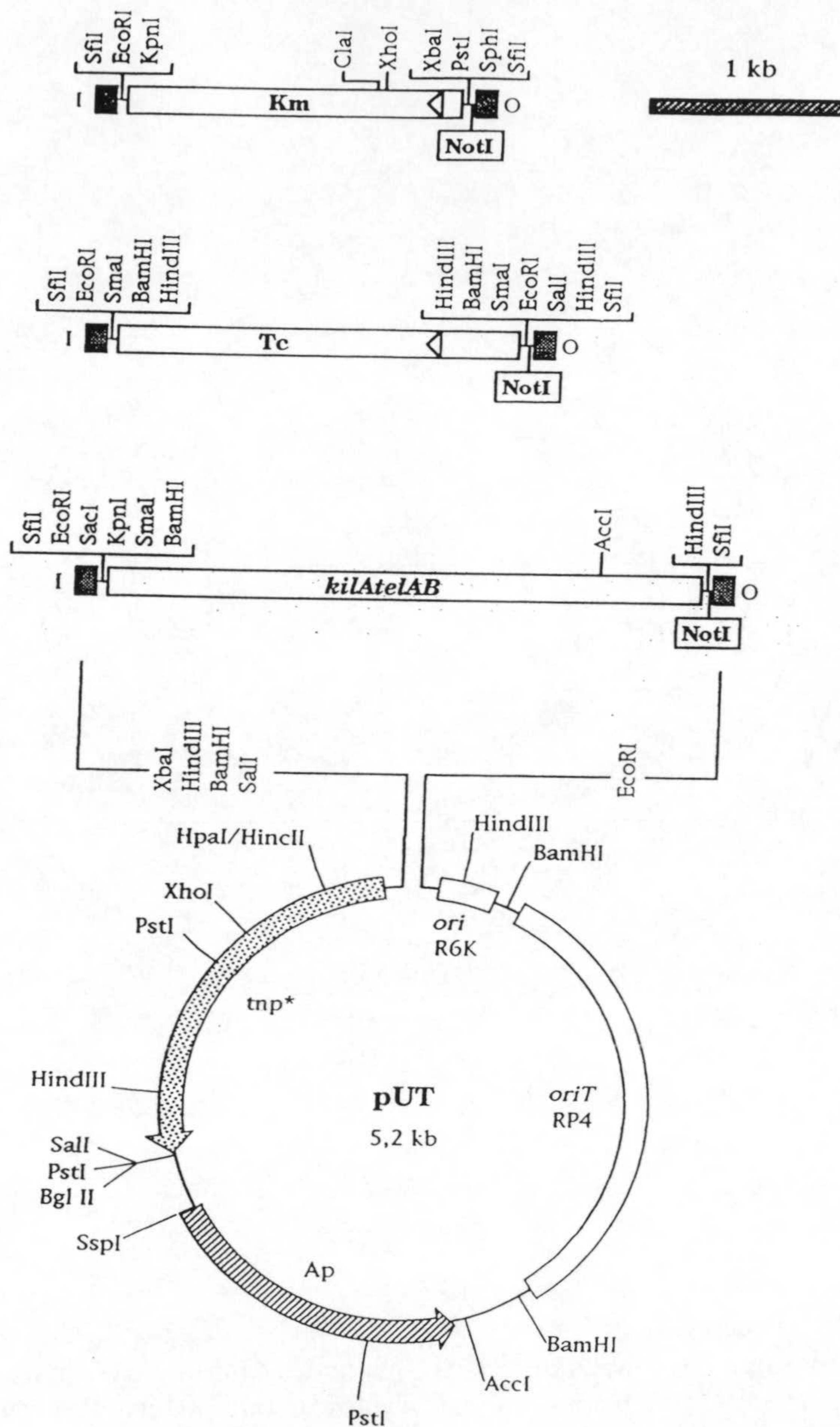


Figura 4. Esquema de la serie de plásmidos pUT.

Se indican los genes que confieren resistencia a ampicilina (Ap), kanamicina (Km), tetraciclina (Tc) y telurito (*KilAtelAB*). Los bordes I (izquierdo) y O (derecho) del mini-Tn5 se indican por recuadros sombreados. Se indican además el gen que codifica la transposasa (*tnp**), el origen de replicación (*ori R6K*) y el origen de transferencia (*ori T RP4*). El sitio *NotI* recuadrado es único tanto en el mini-transposón como en la construcción final y puede utilizarse como sitio de clonación.

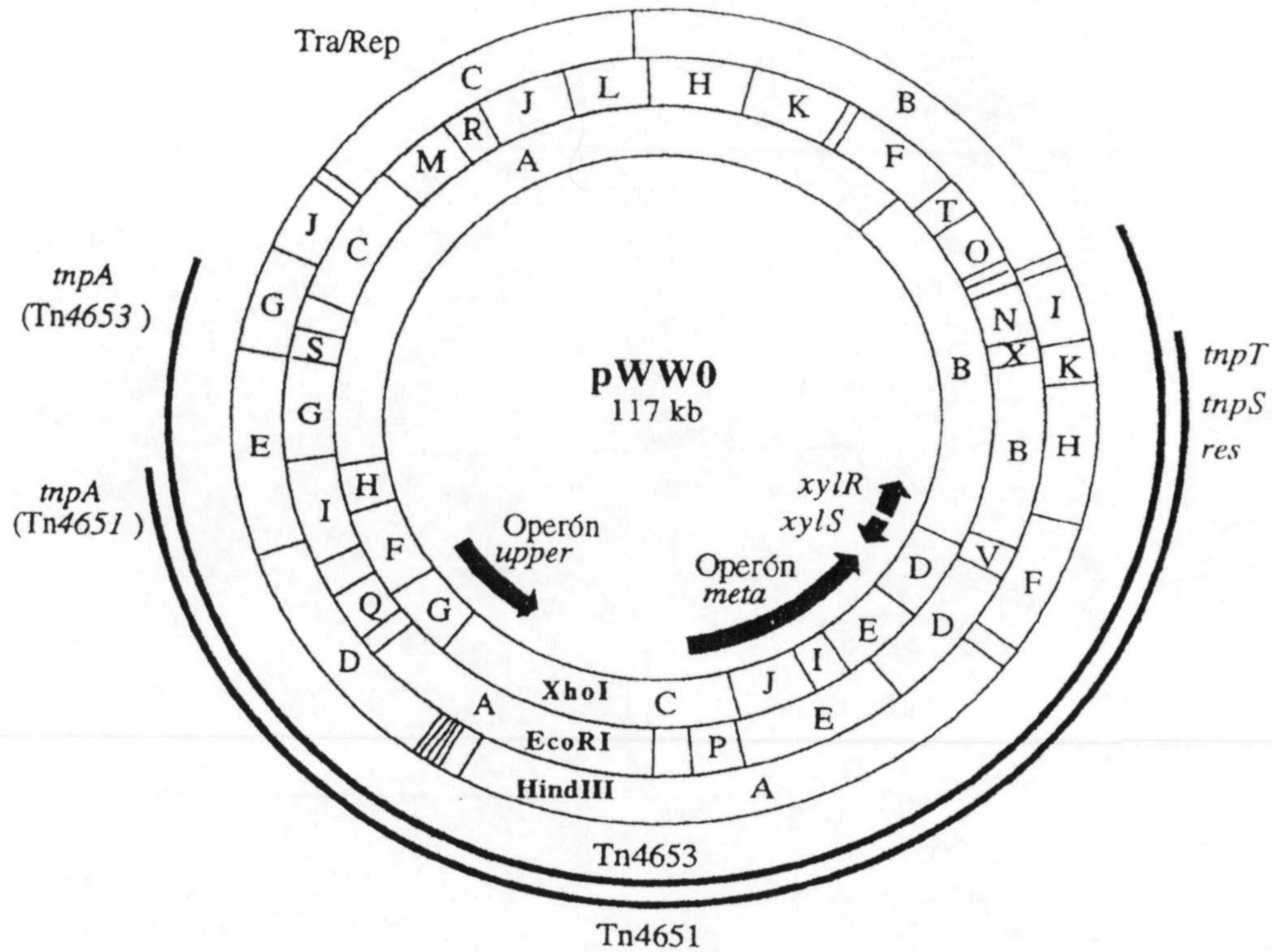


Figura 5. Esquema del plásmido TOL pWWO de *P. putida*.

Se representan los mapas de restricción del plásmido pWWO 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 los genes que codifican las transposasas (*tnpA*) específicas de cada transposón, y resolvasas (*tnpS* y *tnpT*) y el sitio *res* de Tn4651, común para ambos transposones. También se indica la posición de las regiones de transferencia (*Tra*) y replicación (*Rep*).

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. Los cultivos de cepas de *P. putida* portadoras de genes *matadores* se suplementaron con 3-metilbenzoato.

5.1. Método "Qiapreps"

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

5.2. Método de la lisis alcalina

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

Se partió de un volumen de 1,5 ml de cultivo. Las células se recogieron por centrifugación a 12000g durante 5 minutos. Tras eliminar el sobrenadante, éstas se 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, se mezcló el tubo por inversión y se incubó durante 5 minutos en un baño de hielo. El lisado se neutralizó añadiendo 150 µl de tampón acetato sódico 3M pH 4,8 y, tras mezclar el tubo por inversión, se incubó durante 5 minutos en un baño de hielo. Las proteínas, el ADN cromosómico y los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 12000g durante 5 minutos y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio. Posteriormente se añadieron 0,6 volúmenes de isopropanol frío, se incubó durante 10 minutos a -20°C y se centrifugó a 12000g durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 200 µl de acetato sódico 0,3M pH 4,8. Finalmente se añadieron 2 volúmenes de etanol frío y la mezcla se incubó a -20°C durante 30 minutos. Para precipitar el ADN se centrifugó a 12000g durante 15 minutos. El precipitado se lavó con etanol 70% (v/v) y se centrifugó a 12000g durante 5 minutos. El sedimento de ADN se dejó secar a 37°C y se resuspendió en 50 µl de TE.

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

GTE:

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

La solución se esterilizó en el autoclave y se conservó a 4°C.

Solución de lisis:

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

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

Tampón acetato sódico pH 4,8:

Acetato sódico 5 M.....	60 ml
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 8,0	10 mM
EDTA-Na ₂	1 mM

Esta solución se esterilizó en el autoclave y se almacenó a 4°C.

5.3. Aislamiento del plásmido TOL pWW0

Para la preparación de ADN del plásmido TOL pWW0 de *P. putida* se utilizó el método descrito por Kado y Liu (1981), modificado por Ramos-González *et al.*, (1991).

Se partió de un cultivo en LB de la cepa portadora del plásmido. Las células se recogieron por centrifugación a 12000g durante 2 minutos. Tras eliminar el sobrenadante, las células se resuspendieron en 400 µl de solución A y se incubaron a 4°C durante 5 minutos. A continuación se añadieron 200 µl de solución B, se agitó el tubo por inversión y se incubó durante 30-60 minutos a 55°C. Posteriormente se añadieron 0,1 volúmenes de MgCl₂ 0,1 M y se agitó el tubo por inversión. El ADN se extrajo con

1 volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico tras centrifugar la mezcla a 12000g durante 10 minutos. Este proceso se repitió tres veces. Finalmente, el ADN de la fase acuosa se precipitó por centrifugación a 12000g durante 15 minutos tras añadir dos volúmenes de etanol absoluto frío. El precipitado se lavó con 1 ml de etanol 70% (v/v) y se centrifugó a 12000g durante 5 minutos. El sedimento de ADN se dejó secar a 37°C y se resuspendió en 50 μ l de TE.

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

Solución A:

Tris-HCl	25 mM
EDTA-Na ₂ pH 8,0.....	25 mM
Sacarosa.....	20% (p/v)

Solución B:

SDS.....	2% (p/v)
NaOH.....	0,3 N

Fenol/cloroformo/alcohol isoamílico:

Se fundieron cristales de fenol a 55°C, la solución se saturó con Tris-HCl 1M, pH 8,0. Posteriormente el Tris-HCl se sustituyó por TE pH 8,0 y finalmente, se mezclaron el fenol, el cloroformo y el alcohol isoamílico en proporción 25:24:1 (v/v/v). La solución se conservó a 4°C en oscuridad.

6. AISLAMIENTO DE ADN TOTAL

Se siguió el método utilizado para el aislamiento del plásmido TOL pWW0 (apartado 5.3 de esta sección), eliminando la incubación durante 30-60 minutos a 55°C.

7. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS DE *Escherichia coli*

7.1. Preparación de células competentes

La preparación de células competentes de *E. coli* para su transformación posterior se realizó utilizando por el método de Nishimura et al., (1990).

La cepa correspondiente de *E. coli* se inoculó en 3 ml de LB suplementado con los antibióticos adecuados, y se incubó a 37°C con agitación durante 12-16 horas. Este cultivo se diluyó 100 veces en 50 ml de solución A y se incubó a 37°C con agitación hasta alcanzar la fase exponencial temprana de crecimiento ($DO_{660} = 0,5$). A partir de este momento se trabajó en frío, ya que de este modo, la eficiencia de transformación fue 10 veces superior. Las células se mantuvieron en un baño de hielo durante 10 minutos, y se recogieron por centrifugación a 12000g durante 5 minutos a 4°C. A continuación se resuspendieron cuidadosamente en 0,5 ml de solución A fría (4°C). Posteriormente se añadieron 2,5 ml de solución B fría (4°C) y la mezcla se agitó cuidadosamente. La suspensión celular se repartió en alícuotas de 150 μ l que se mantuvieron a -80°C hasta el momento de su uso.

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

Solución A: LB suplementado con:

MgSO₄ x 7H₂O.....10 mM
Glucosa.....0,2% (p/v)

Solución B: LB suplementado con:

Glicerol..... 36% (v/v)
Polyetilenglicol (PEG)-7500.....12% (p/v)
MgSO₄ x 7H₂O.....12 mM

7.2. Transformación

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

Una alícuota de la suspensión celular, mantenida a -80°C, se transfirió a un baño de hielo y se añadieron 0,1-1 μ g de ADN. La mezcla se incubó primero en un baño de hielo durante 30-45 minutos, a continuación a 42°C durante 1 minuto y finalmente en un baño de hielo durante 1-2 minutos. Posteriormente se añadió 1 ml de LB y las células se incubaron durante 1 hora a 30°C con agitación para permitir la expresión de el(los) gen(es) de resistencia a antibiótico(s) codificado(s) por el plásmido introducido. Las células que habían adquirido el plásmido, y por tanto la resistencia al(los)

antibiótico(s), se seleccionaron sembrando alícuotas de 50-200 μ l de la suspensión celular en placas de LB sólido suplementado con el(los) antibiótico(s) adecuado(s). Las placas se incubaron a 30°C hasta la aparición de colonias, generalmente durante 16-24 horas.

8. TRANSFERENCIA DE PLÁSMIDOS POR CONJUGACIÓN

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

Los plásmidos autotransmisibles, como es el caso del plásmido TOL pWW0 (Benson y Shapiro, 1978; Bradley y Williams, 1982), se transfirieron mediante *conjugación bipartita* (Herrero *et al.*, 1990), en los que participaron únicamente las cepas donadora y receptora del plásmido de interés.

La movilización a *P. putida* de los plásmidos con un origen de transferencia *oriT* del plásmido RP4 se realizó mediante *conjugación tripartita* (de Lorenzo y Timmis, 1994) en la que participaron la cepa de *E. coli* donadora (portadora del plásmido a movilizar), la cepa de *P. putida* receptora y la cepa auxiliar de *E. coli* HB101(RK600). El plásmido RK600 determina funciones de transferencia pero no se replica en *Pseudomonas*.

Se partió de cultivos incubados a 30°C con agitación durante 12-16 horas de las cepas donadora y receptora del plásmido en cuestión así como de la cepa portadora del plásmido auxiliar, cuando era necesaria. Se recogieron aproximadamente 10^8 células de cada cultivo mediante centrifugación a 12000g durante 2 minutos, y el sedimento se lavó con 1 ml de tampón 1 x M9. Posteriormente las células se mezclaron y se recogieron por centrifugación a 12000g durante 2 minutos. A continuación se suspendieron en 50 μ l de tampón 1 x M9 y se depositaron 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 6-8 horas. El medio LB se suplementó con 3MB cuando se utilizó como cepa receptora *P. putida* portadora de un gen *matador*. Transcurrido este tiempo el filtro con las células se transfirió a un tubo con 5 ml de tampón 1 x M9, y las células se suspendieron por agitación. A partir de esta suspensión se hicieron diluciones seriadas en el mismo tampón y se sembraron placas de medio selectivo para los transconjugantes; éstos 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 la selección de las cepas donadora, receptora, y auxiliar en su caso, con objeto de realizar el conteo del número de bacterias totales iniciales presentes en el cruzamiento. La frecuencia de transconjugantes se expresó como el número de transconjugantes en función del número de receptores.

9. ESTABILIDAD DE LAS CEPAS CONSTRUIDAS

Para comprobar la estabilidad del plásmido pCC102 y de las inserciones de los diferentes mini-transposones en el cromosoma de las cepas contenidas y sus controles, éstas se cultivaron en medio líquido LB con 15 mM de 3MB con o sin antibióticos. Cada 7-8 generaciones los cultivos se diluyeron en medio fresco hasta una DO_{660} de 0,03, el proceso se repitió hasta que se alcanzaron unas 50 generaciones en total. En ese momento se sembraron diluciones de los distintos cultivos en medio LB con 5 mM de 3MB como única fuente de carbono, suplementado o no con los antibióticos adecuados.

10. MANIPULACIÓN DE ADN

10.1. Restricción de ADN

Las digestiones de ADN con enzimas de restricción se realizaron en las condiciones óptimas para cada enzima fijadas por el fabricante. Las reacciones contenían habitualmente 0,5-5 μ g de ADN; 0,1 volúmenes del tampón de restricción correspondiente suministrado por la casa comercial, diez veces concentrado; y 0,5-5 unidades del enzima de restricción, en volúmenes finales de 10-40 μ l completados con H_2O o TE. Las digestiones se llevaron a cabo incubando las mezclas de reacción durante 2 horas a la temperatura indicada por el fabricante.

10.2. Defosforilación de ADN

Tras añadir 0,1 volúmenes de acetato sódico 3M pH 7,0 el ADN digerido por enzimas de restricción se sometió a una extracción con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (tal como se describió en el apartado 5.3 de esta sección). El sedimento de ADN se resuspendió en 90 μ l de Tris-HCl 10 mM pH 8,3, se añadieron 10 μ l de tampón de defosforilación (Boehringer Mannheim, ref. 1243284) y una unidad de fosfatasa alcalina de intestino de ternera (Boehringer Mannheim, ref. 713023). La mezcla se incubó durante 30 minutos a 37°C y posteriormente se detuvo la reacción incubando la mezcla a 56°C durante 30 minutos tras añadir una solución de SDS al 0,5% (p/v), EDTA 5 mM pH 8,0 y 100 μ g/ml de proteinasa K (Boehringer Mannheim, ref. 100144). Tras dejar enfriar la mezcla a temperatura ambiente durante 15 minutos se realizó una extracción de proteínas con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico y el ADN de la fase acuosa se precipitó como se describió anteriormente.

10.3. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Se llevó a cabo según Sambrook *et al.* (1989), utilizando geles de agarosa preparados en tampón TAE.

El ADN del plásmido TOL pWW0 se separó en geles de agarosa al 0,7 % (p/v) en tampón TAE. Los fragmentos de ADN menores de 500 pb se separaron en geles de agarosa al 1,5% (p/v). En el resto de los casos los geles de agarosa se prepararon al 0,8 % (p/v) en TAE. Por cada 5 μ l de muestra a analizar se añadió 1 μ l de tampón de carga, y la mezcla se depositó en un pocillo del gel, sumergido en una cubeta con el mismo tampón. La separación se realizó por electroforesis horizontal a un voltaje de 5-10 V/cm.

Para la visualizar el ADN los geles se tiñeron por inmersión en una solución de bromuro de etidio (10 μ 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 los fragmentos de ADN se estimó por interpolación en curvas logarítmicas del tamaño de cada fragmento frente a su movilidad relativa, utilizando como patrón los fragmentos del ADN del fago λ cortado con los enzimas *Hind*III, *Hind*III/*Eco*RI, *Bst*EII o el marcador de peso molecular VIII (Boehringer Mannheim, ref. 1336045).

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

Tampón de carga:

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

Tampón TAE :

Tris-Base.....	4,84 g
Acido acético glacial.....	1,14 ml
EDTA-Na ₂ 0,5M, pH 8,0.....	2 ml
H ₂ O.....	hasta 1 l

Este tampón se preparó a partir de una solución 50 veces concentrada esterilizada en el autoclave.

Los marcadores de peso molecular se prepararon de la siguiente forma: se cortaron 80 µl de ADN de fago λ (250 µg/ml) con 1,5 unidades/µg ADN de los enzimas *Hind*III, *Eco*RI o *Bst*EII. Una vez digerido el ADN, la mezcla se incubó a 80°C para separar las regiones *cos* de λ, posteriormente se añadieron 80 µl de tampón de carga y se completó el volumen hasta 400 µl con TE. La concentración final de ADN en la solución fue de 50 µg/ml.

10.4. Recuperación de fragmentos de ADN de geles de agarosa

Una vez identificado el fragmento de ADN que se deseaba recuperar, como se describe en el apartado anterior, se cortó el trozo de agarosa del gel que contenía el fragmento con ayuda de un bisturí. El ADN se separó de la agarosa utilizando el sistema comercial "Prep-A-Gene" (Bio-Rad, ref. 732-6010), según las instrucciones del fabricante. La recuperación de fragmentos de ADN menores de 500 pb se realizó mediante electroelución (Maniatis *et al.*, 1982).

10.5. Ligación de ADN

Los fragmentos de ADN que se deseaban ligar se mezclaron en una proporción vector:inserto de 1:3. La reacción se llevó a cabo añadiendo 0,1 volúmenes de tampón de ligación (Boehringer Mannheim, ref. 1243292)

y 1 unidad de ADN-ligasa del fago T4 (Boehringer Mannheim, ref. 481220) en un volumen final de 10-15 μ l completado con H₂O o TE. La mezcla de reacción se incubó a 8-12°C durante 12-24 horas.

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

Este método se utilizó para la amplificación del gen *E* a partir del ADN comercial del fago Φ X174 (Promega, ref. D1531) y para la amplificación de fragmentos de ADN del cromosoma de *P. putida*. Los cebadores utilizados se muestran en la Tabla 3.

La reacción de amplificación contenía:

ADN molde.....	0,05-1 μ g
Cebador.....	50-100 pmoles
Tampón Taq ADN-polimerasa (10 x)	10 μ l
dNTPs.....	0,1-0,2 mM de cada uno
ADN-polimerasa Taq.....	5 U
H ₂ O.....	hasta 100 μ l

La amplificación del gen *E* del fago Φ X174 se realizó como se detalla a continuación: se mezcló el ADN molde, los cebadores y la mitad del H₂O. A continuación se añadió una gota de aceite mineral (Sigma, ref. 400-5) y se incubó a 95°C durante 5 minutos para desnaturalizar el ADN molde. Posteriormente se añadió el resto de la mezcla de reacción. Para facilitar las primeras extensiones y la hibridación de los cebadores, que poseían parte de secuencia no complementaria con el ADN molde, se empleó un programa con condiciones relajadas que consistía en 5 ciclos de 1 minuto a 40°C y 1 minuto a 72°C. Posteriormente se empleó un programa con condiciones más estrictas que consistía en 20 ciclos de 1 minuto a 91°C, 1 minuto a 50°C y 1 minuto a 72°C. Finalmente, y para completar la extensión, se empleó un ciclo de 10 minutos a 72°C. Los fragmentos resultantes se digirieron con las enzimas de restricción adecuadas para su posterior clonación.

Para la amplificación de fragmentos de ADN a partir del cromosoma de *P. putida* las condiciones fueron las siguientes: se mezcló ADN molde, cebadores y la mitad del H₂O y se incubó a 72°C durante 10 minutos. A continuación se añadió el resto de la mezcla de reacción y se empleó un programa que consistía en 5 ciclos de 1 minuto a 91°C, 1 minuto a 40°C y

1 minuto a 72°C. Posteriormente se realizaron 30 ciclos de 1 minuto a 91°C, 1 minuto a 45°C y 1 minuto a 72°C y finalmente un ciclo de 10 minutos a 72°C.

Tabla 3. Cebadores utilizados para la amplificación y/o la secuenciación de ADN

Nombre	Secuencia (5'→3')	Localización
OCM2	TCATTATCTTAAGCTTACGTTTTTT ACCTTTAGA	Corriente abajo del extremo 3' del gen <i>E</i>
OCM3	TTCTAGATAAGCTTGAATTCCTCGT GCTCGTCGCTGCGTT	Corriente arriba del extremo 5' del gen <i>E</i>
OCM6	GTTTCTGGCCATGGTACGCTGGACTT TGTG	Corriente arriba del extremo 5' del gen <i>E</i>
OCM7	CTGAACAAATCCAGATGG	+139 a +157 (pUHE24-1)
OCM9	AACCGGACGCTCGACGCC	+203 a +221 (gen <i>E</i>)
OCM10	CTTTTCTCGTTACCAGCGCCGCC	+107 a + 130 (gen <i>gef</i>)
OCM13	CTCGAGAAAATTTATC	-63 a - 48 (pUHE24-1)
OCM14	TTACTCGGATTCGTAAG	+185 a 202 (gen <i>gef</i>)
OCM15	TCACTCCTTCTGCACGTA	+312 a +330 (gen <i>E</i>)

Los números en la localización de cada oligonucleótido representan las posiciones de las bases con respecto al punto de iniciación de la transcripción del promotor P_{A1-04/03}.

10.7. Secuenciación de ADN

La secuenciación de las construcciones de nueva creación y los fragmentos de ADN amplificados por PCR se llevó a cabo por el servicio de secuenciación automática del Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra utilizando un aparato Applied Biosystems (modelo 373 STRECHT). El método de secuenciación fue el comercializado por Perkin Elmer, ABI PRISM™ Dye Terminator con AmpliTaq® ADN Polymerase (ref. 402122), basado en la utilización de dideoxinucleótidos con cromóforos fluorescentes

de acuerdo con el protocolo proporcionado por la compañía. Los cebadores utilizados se muestran en la Tabla 3.

11. INDUCCIÓN DE LISIS CELULAR EN CULTIVOS LÍQUIDOS

La expresión de los genes líticos utilizados en este trabajo (*gef* de *E. coli* y gen *E* del fago Φ X174) se realizó en todos los casos desde el promotor modificado $P_{A1-04/03}$. Dicho promotor está regulado negativamente por la proteína LacI, la cual se inactiva mediante su unión al análogo de lactosa isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG).

11.1. Condiciones de cultivo y seguimiento de la densidad óptica

11.1.1. Cultivos de *Escherichia coli*

La cepa bacteriana se cultivó a 37°C con agitación durante 10-14 horas en medio LB suplementado con los antibióticos adecuados. Este cultivo se diluyó en el mismo medio hasta una densidad óptica a 660 nm (DO_{660}) entre 0,02 y 0,04. Posteriormente el cultivo se incubó a la misma temperatura hasta alcanzar una DO_{660} entre 0,2 y 0,3. En este momento el cultivo se dividió en dos fracciones alícuotas y a una de ellas se le añadió 10 mM de IPTG, la otra se utilizó como cultivo control. Periódicamente se siguió el incremento o la disminución de la DO_{660} de los cultivos hasta que el cultivo control alcanzaba la fase estacionaria de crecimiento (DO_{660} aproximadamente 1).

11.1.2. Cultivos de *Pseudomonas putida*

La cepa bacteriana se cultivó a 30°C con agitación durante 10-14 horas en medio mínimo con 15 mM de 3MB como única fuente de carbono y suplementado con los antibióticos adecuados. Este cultivo se diluyó en el mismo medio hasta una DO_{660} entre 0,03 y 0,06. Posteriormente el cultivo se incubó a la misma temperatura hasta alcanzar una DO_{660} entre 0,2 y 0,4. En este momento el cultivo se dividió en tres fracciones alícuotas y las células se recogieron mediante centrifugación a 12000g y 15°C durante 15 minutos. Las células se lavaron 2 veces en tampón 1 x M9 y finalmente se resuspendieron en uno de los medios que se indican a continuación,

suplementados con los antibióticos adecuados: medio mínimo con 15 mM de 3MB como única fuente de carbono y medio mínimo con 0,5% (p/v) de glucosa como única fuente de carbono suplementado con 5 mM de IPTG. Periódicamente se siguió el incremento o la disminución de la DO_{660} de los cultivos así como el número de células viables, hasta que el cultivo control (medio mínimo con 3MB como única fuente de carbono) alcanzaba la fase estacionaria de crecimiento (DO_{660} aproximadamente 1 y $2-5 \times 10^7$ células/ml).

11.2. Determinación del número de células viables

Se define como célula viable aquella capaz de formar colonia en medio LB sólido suplementado con 5 mM de 3MB. El número de células viables de un cultivo de *P. putida* se determinó sembrando muestras del mismo en cajas de Petri que contenían LB sólido suplementado con 5 mM de 3MB y los antibióticos adecuados. Se realizaron las diluciones adecuadas para obtener entre 100 y 200 colonias por caja. Tras incubar durante 12-24 horas a 30°C, se contó el número de colonias aparecidas. Para cada determinación se sembraron 2-3 cajas de Petri y se calculó el valor medio.

11.3. Liberación de ácidos nucleicos

La liberación de ácidos nucleicos a partir de células incubadas en presencia de IPTG, como se describe en los apartados 11.1.1 y 11.1.2 de esta sección, se analizó como se describe a continuación. Periódicamente se tomaron alícuotas de 100-500 μ l de cultivo y las células junto con los restos celulares se recogieron mediante centrifugación a 12000g durante 2 minutos. Posteriormente se realizó una extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico tal como se describe en el apartado 5.3 de esta sección. A continuación los ácidos nucleicos se precipitaron con acetato sódico 3 M y etanol absoluto frío como se describe en el apartado 5.2 de esta sección. Finalmente los ácidos nucleicos se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (p/v) (apartado 10.3 de esta sección).

11.4. Liberación de proteínas y su análisis mediante electroforesis en gel de poliacrilamida

La liberación de proteínas a partir de células incubadas en presencia de IPTG, como se describe en los apartados 11.1.1 y 11.1.2 de esta sección, se analizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de lauril sulfato sódico (SDS) (Laemmli, 1970), utilizando el sistema "Mini-Protean II" (Bio-Rad) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Periódicamente se tomaron alícuotas de 1,5 ml de cultivo y las células junto con los restos celulares se recogieron mediante centrifugación a 12000g durante 2 minutos. A 750 μ l del sobrenadante se añadió la misma cantidad de 10% (v/v) de ácido tricloroacético (TCA) y la mezcla se incubó a 4°C durante 12-15 horas. Posteriormente la mezcla se centrifugó a 15000g y 4°C durante 20 minutos. Tras eliminar el sobrenadante el precipitado se resuspendió en 10-25 μ l de tampón de carga. Tanto las proteínas marcadoras como las muestras a analizar se desnaturalizaron mediante incubación a 100°C durante 4 minutos.

Los geles de separación y empaquetamiento, de 0,75 mm de grosor, se prepararon a una concentración de acrilamida/bisacrilamida del 11% (p/v) y 4% (p/v), respectivamente, como se indica en la Tabla 4.

Como marcador de peso molecular se utilizó el suministrado por Amersham (RPN 756) que contiene las proteínas indicadas en la Tabla 5.

Tabla 4. Composición de los geles de separación y empaquetamiento

	Gel separador	Gel concentrador
Acrilamida 29,2% (p/v)/Bisacrilamida 0,8% (p/v)	1,85 ml	330,0 μ l
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	1,25 ml	—
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	—	626 μ l
SDS 20% (p/v)	25 μ l	12,5 μ l
N,N,N',N'-Tetrametiletitenldiamina (TEMED)	5 μ l	3 μ l
Persulfato amónico 20% (p/v)	40 μ l	40 μ l
H ₂ O	1,80 ml	1,5 ml

Tabla 5. Proteínas utilizadas como marcador de peso molecular

Proteína	Peso molecular (kDa)
Miosina de músculo de conejo	200,0
Fosforilasa b de músculo de conejo	97,4
Seroalbúmina bovina	69,0
Ovoalbúmina de gallina	46,0
Anhidrasa carbónica bovina	30,0
Inhibidor de tripsinógeno de semilla de soja	21,5
Lisozima de huevo de gallina	14,3

El gel se sumergió en tampón de electrodo y la separación electroforética se realizó a temperatura ambiente a 15 mA.

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

Tampón de carga:

Tris-HCl pH 6,8.....	62 mM
Glicerol.....	10% (v/v)
SDS.....	1% (p/v)
2-mercaptoetanol.....	1% (v/v)
Azul de bromofenol.....	0,5‰ (p/v)

Tampón de electrodo:

Tris-HCl pH 8,3.....	25 mM
Glicina.....	192 mM
SDS.....	0,1 % (p/v)

11.4.1. Tinción de proteína en geles de poliacrilamida

Las proteínas separadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida se visualizaron mediante tinción con nitrato de plata. En primer lugar se sumergió el gel durante 30-60 minutos en 250 ml de solución de fijación y posteriormente se transfirió a 250 ml de solución de incubación donde se mantuvo durante 30-60 minutos. A continuación el gel

se lavó 3 veces en 250 ml de H₂O desionizada durante 5 minutos y posteriormente se sumergió en 250 ml de solución de nitrato de plata donde se mantuvo durante 20 minutos. El gel se transfirió a 100 ml de solución reveladora donde se mantuvo durante 1 minuto y seguidamente a 200 ml de la misma solución donde se mantuvo durante 3-7 minutos. La reacción se detuvo manteniendo el gel durante 10 minutos en solución de parada. Todo el proceso se realizó a temperatura ambiente y una vez finalizado, el gel se transfirió a papel Whatman 3MM por adherencia y se cubrió con papel de plástico transparente. El gel se secó al vacío en un secador de geles Bio-Rad (modelo 583) a 50°C durante 2-3 horas.

La composición de las soluciones utilizadas en este proceso, preparadas con H₂O desionizada, fue la siguiente:

Solución de fijación:

Etanol.....	300 ml
Acido acético.....	100 ml
H ₂ O	hasta 1 l

Solución de incubación:

Etanol.....	75 ml
Acetato sódico.....	17 g
Glutaraldehído (25% p/v).....	1,25 ml
Na ₂ S ₂ O ₃ x 5 H ₂ O.....	0.5 g
H ₂ O	hasta 250 ml

Solución de nitrato de plata:

AgNO ₃	0,5 g
Formaldehído (37% p/v).....	50 µl
H ₂ O.....	hasta 250 ml

Solución reveladora:

Na ₂ CO ₃	7,5 g
Formaldehído (37% p/v).....	30 µl
H ₂ O.....	hasta 300 ml

Cuando el pH de la solución fue superior a 11,5 éste se ajustó hasta 11,5 con NaHCO₃.

Solución de parada:

Glicina.....	2,5 g
H ₂ O.....	hasta 250 ml

Todas las soluciones, excepto la de fijación, son de preparación extemporánea.

11.5. Eflujo de $^{86}\text{Rb}^+$

La cepa de *P. putida* en cuestión se cultivó a 30°C con agitación durante 10-14 horas en medio mínimo con 15 mM de 3MB como única fuente de carbono y suplementado con los antibióticos adecuados. Este cultivo se diluyó en 40 ml del mismo medio hasta una DO_{660} entre 0,03 y 0,05 y se incubó a la misma temperatura hasta alcanzar una DO_{660} entre 0,1 y 0,2. A continuación se tomó una alícuota de 20 ml de cultivo a la que se añadieron 10 μl de $^{86}\text{RbCl}$ (1 mCi/ml). La mezcla se incubó a 30°C durante 60 minutos. El resto del cultivo se utilizó como control para el seguimiento del incremento o la disminución de DO_{660} . Posteriormente los cultivos se dividieron en dos fracciones alícuotas de 10 ml cada una. Las células se recogieron mediante centrifugación a 12000g y 14°C durante 10 minutos. Tras lavar las células con 10 ml de tampón 1 x M9, se resuspendieron en uno de los medios que se indican a continuación, suplementados con los antibióticos adecuados: medio mínimo con 15 mM de 3MB como única fuente de carbono y medio mínimo con 0,5% (p/v) de glucosa como única fuente de carbono suplementado con 5 mM de IPTG. Periódicamente se tomaron alícuotas de 200 μl de cultivo y las células junto con los restos celulares se recogieron por centrifugación a 12000g y a temperatura ambiente durante 2 minutos. Los sobrenadantes y las células, resuspendidas en 200 μl de tampón 1 x M9, se mantuvieron a -20°C durante 15-20 horas. Las muestras se mezclaron con 500 μl de líquido de centelleo y se determinó el número de cuentas por minuto utilizando un contador de centelleo PACKARD modelo 1.500-TRI-CARB.

11.6. Visualización de la lisis celular mediante microscopía electrónica

Se partió de células de *P. putida* incubadas en presencia de IPTG, como se describe en el apartado 11.1.2 de esta sección. Tras 90 y 180 minutos de incubación en presencia de IPTG se tomó una alícuota de 15 ml de cultivo y las células junto con los restos celulares se recogieron por centrifugación a 400g y 4°C durante 10 minutos. Las muestras se fijaron con una mezcla de formaldehído al 1% (v/v) y glutaraldehído al 2% (v/v) en tampón cacodilato 0.1 M, pH 7.4, durante 1 hora a 4°C. Posteriormente se lavaron en este mismo

tampón y se post-fijaron con tetróxido de osmio al 2% (v/v) y ferrocianuro potásico al 1.5% (v/v), durante 1 hora. Se volvieron a lavar con tampón y se contrastaron en bloque con acetato de uranilo al 1% (v/v) en agua durante una hora, Se deshidrataron en gradientes de etanol y un último paso en óxido de propileno. A continuación se infiltraron durante una hora en óxido de propileno más resina 1:1 y se dejaron en resina pura toda la noche. Se polimerizaron en una estufa a 60°C durante 12 horas. Los bloques se cortaron en secciones ultrafinas de 500 Å aproximadamente y se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Finalmente se observaron al microscopio electrónico de transmisión en los Servicios Técnicos de la Univeridad de Granada.

12. TEST DE FLUCTUACION

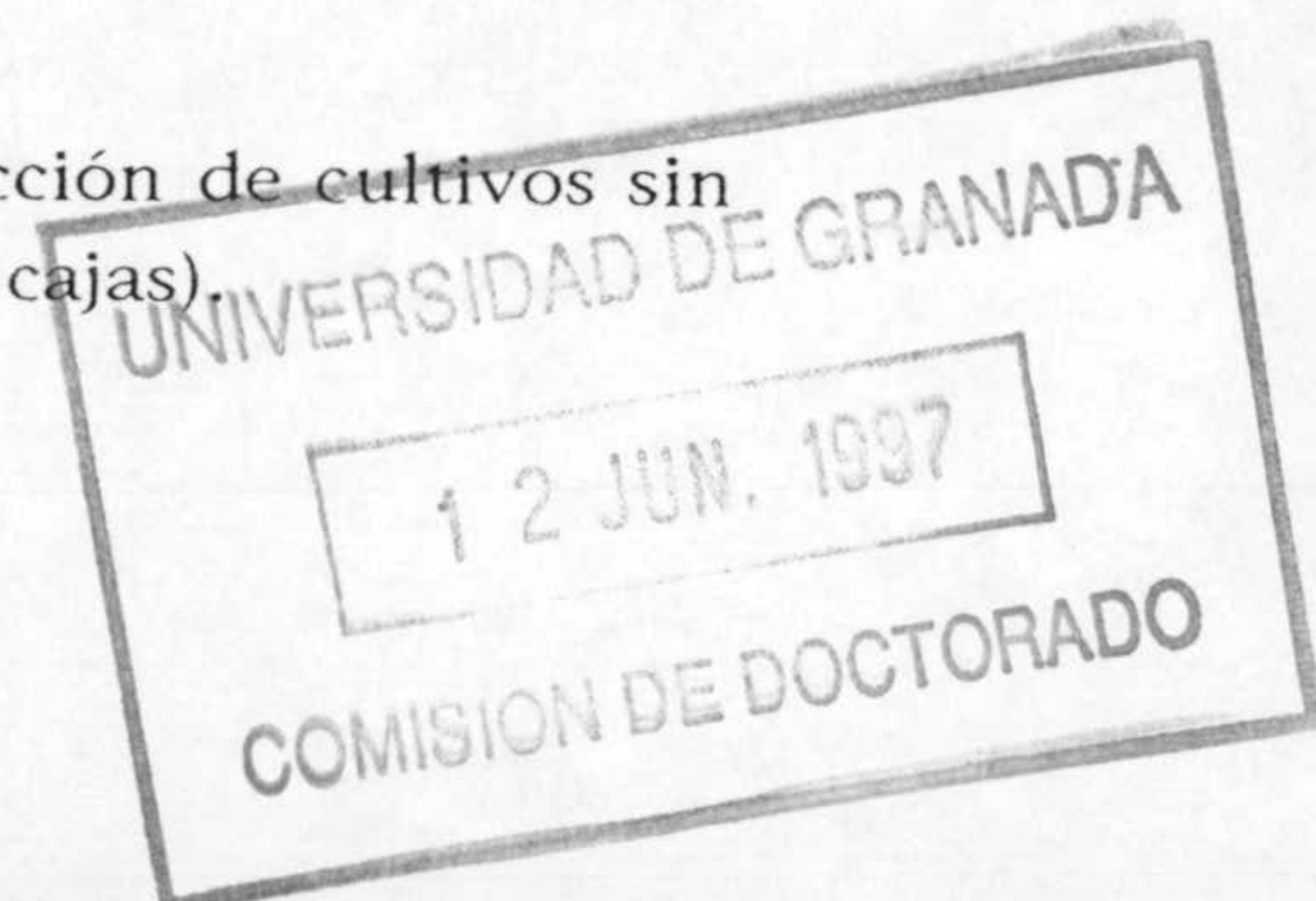
La frecuencia de aparición de mutantes resistentes a la lisis celular se calculó mediante una modificación del método descrito por Luria y Delbrück (1943).

La cepa bacteriana se cultivó a 30°C con agitación durante 10-14 horas en medio mínimo con 15 mM de 3MB como única fuente de carbono y suplementado con los antibióticos adecuados. Este cultivo se diluyó en el mismo medio hasta una DO_{660} entre 0,03-0,06. Posteriormente el cultivo se incubó a la misma temperatura hasta alcanzar una DO_{660} entre 0,2 y 0,3. A partir de ese cultivo se realizaron diluciones seriadas en el mismo medio hasta aproximadamente 100 células/ml. De este cultivo se tomaron 18 alícuotas de 200 μ l cada una y se incubaron a 30°C con agitación durante 24-30 horas. De cada cultivo se tomó una alícuota de 100 μ l y se sembraron en placas de medio mínimo con 0,5% (p/v) de glucosa como única fuente de carbono suplementado con 2 mM de IPTG y los antibióticos adecuados. Para el recuento del número total de células se sembraron diluciones seriadas de 3 de los cultivos en placas de medio mínimo con 5 mM de 3MB como única fuente de carbono suplementado con los antibióticos adecuados.

La frecuencia de mutación por célula y por generación se calculó según la siguiente fórmula:

$$R = - (\ln 2 / N) \times \ln P_0$$

donde N es el número total de células y P_0 la fracción de cultivos sin mutantes (Número de cajas sin colonias/número total de cajas).



13. EXPERIMENTOS EN MICROCOSMOS

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

13.1. Microcosmos edáficos

Se utilizaron dos tipos de suelos de marga arenosos cuyas características físico-químicas se describen en la Tabla 6.

Las características granulométricas de estos suelos se muestran en la Tabla 7.

Tabla 6. Características físico-químicas

Tipo	Materia orgánica	Relación C/N	CaCO ₃ (% p/p)	pH	Cultivo de procedencia
Cambisol	0,63	10,2	20,4	7,5	Olivo
Fluvisol	2,3	10,1	6,4	8,0	Chirimoyo

Tabla 7. Características granulométricas

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

Los suelos se tamizaron antes de su utilización a través de una criba metálica de 4 mm. Cuando fue necesario los suelos se esterilizaron en el autoclave a vapor fluyente a 120°C durante 1 hora, tres veces consecutivas,

esperando entre cada esterilización aproximadamente 24 horas para permitir el enfriamiento del suelo y la germinación de esporas, si las hubiese (Ciafardini y Marotta, 1989).

Se llenaron recipientes de cristal con 70-90 g de suelo y, en los casos indicados el suelo se suplementó con 0,1% (p/p) de 3MB, salvo que se especifique otra cantidad. El inóculo se preparó como se indica a continuación: células cultivadas durante 10-12 horas a 30°C con agitación en medio mínimo suplementado con 15 mM de 3MB como única fuente de carbono y suplementado con los antibióticos adecuados, se recogieron por centrifugación a 12000 g y 15°C durante 15 minutos. Las células se lavaron una vez con tampón 1 x M9 y posteriormente se resuspendieron en el mismo tampón a una concentración de aproximadamente 10^8 células/ml. Se añadió 1 ml de esta suspensión celular a cada uno de los microcosmos y las células se mezclaron con el suelo con la ayuda de una varilla de vidrio estéril. Los microcosmos se mantuvieron tapados a temperatura ambiente, salvo que se especifique lo contrario. Periódicamente se tomaron alícuotas de 10 g de suelo, se suspendieron en 90 ml de tampón 1 x M9 y se mantuvieron a 200 rpm y 30°C durante 30-60 minutos. A continuación se hicieron diluciones seriadas y las bacterias se sembraron en placas de medio selectivo. La primera muestra (indicada como "muestra a tiempo=0") se tomó 2 horas después de la inoculación. La toma de muestras se prolongó durante al menos 1 mes.

13.1.1. Transferencia génica en microcosmos edáficos

La movilización en microcosmos edáficos del plásmido TOL pWW0 así como de los marcadores de resistencia a antibióticos integrados en el cromosoma de *P. putida* se realizó como se describe a continuación.

Como cepa receptora se utilizó *P. putida* UWC1 o *P. putida* UWC1 (pCC102), dependiendo de la cepa donadora utilizada. Se prepararon inóculos de las cepas donadora y receptora y los microcosmos se inocularon por separado con cada una de las cepas. La inoculación del suelo y la toma de muestras se realizó como se describió en el apartado 13.1 de esta sección. Periódicamente se sembraron diluciones seriadas en cajas de Petri de medio selectivo para seleccionar donadores, receptores y transconjugantes.

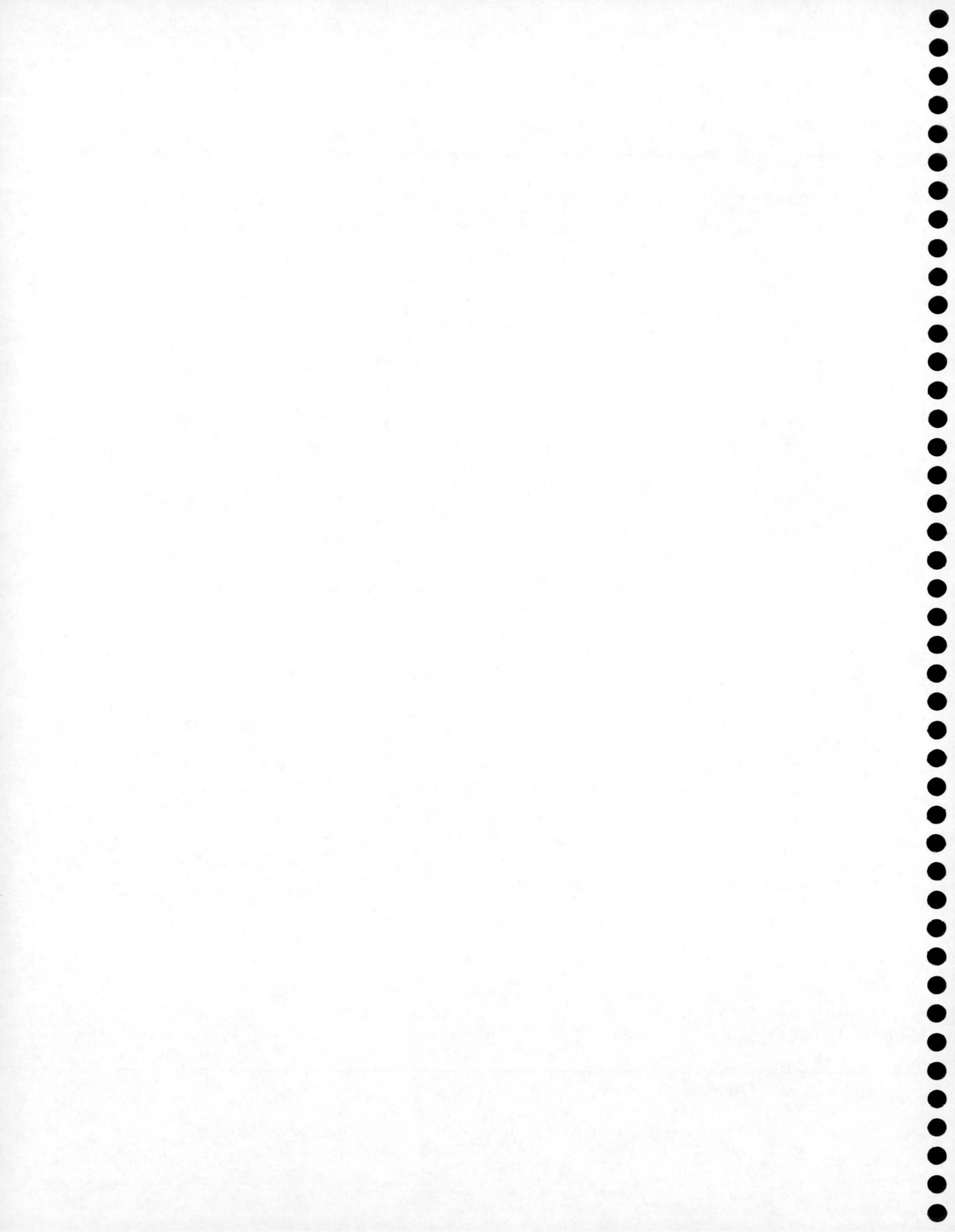
13.1.2. Mineralización de p-metil-¹⁴C-benzoato en microcosmos edáficos

Setenta g de suelo fluvisol estéril se colocaron en recipientes herméticos de cristal de 1 kg de capacidad. La preparación del inóculo y la inoculación del suelo se realizó como se explica en el apartado 13.1 de esta sección. A continuación se añadió p-metil-¹⁴C-benzoato (5 μ Ci de actividad total) mezclado con p-metilbenzoato frío para alcanzar una actividad específica de 0,5 μ Ci/ μ mol. El ¹⁴CO₂ generado se fijó en 20 ml de etanolamina contenidos en un vaso de precipitado introducido en el recipiente antes de cerrarlo herméticamente. Periódicamente se retiró 1 ml de la solución de etanolamina, se le añadieron 5 ml de líquido de centelleo y se determinó el número de cuentas por minuto utilizando un contador de centelleo PACKARD modelo 1.500-TRI-CARB.

13.2. Microcosmos acuáticos

Se utilizaron muestras de agua del río Maitena tomadas en Güejar Sierra (Granada) y del Océano Atlántico tomadas en El Rompido (Huelva). Los inóculos se prepararon como se explica en el apartado 13.1. Se llenaron recipientes de cristal con 20 ml del agua, se suplementaron o no con 5 mM de 3MB y se inocularon con la cepa en cuestión para alcanzar una densidad celular inicial de 10⁴-10⁸ células/ml. Los microcosmos se incubaron a 20°C con agitación constante (180 rpm) en un incubador termostatzado Gallemkamp. Periódicamente se hicieron diluciones seriadas a partir de los microcosmos y se realizaron conteos de las cepas introducidas en cajas de Petri de medio selectivo.

RESULTADOS



I. CONSTRUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN SISTEMA ACTIVO DE CONTENCIÓN BIOLÓGICA PARA *Pseudomonas putida* ASOCIADO A LA ELIMINACIÓN DE ALQUILBENZOATOS BASADO EN EL GEN *gef* DE *Escherichia coli*

Como se ha descrito en la *Introducción*, la construcción de un sistema activo de contención biológica asociado a la degradación de alquilbenzoatos debe constar de dos elementos: uno *matador* y otro regulador. El elemento *matador* de un sistema idóneo de contención debe, por un lado, ser una unidad genética de fácil clonación que actúe en una gran variedad de microorganismos; por otro lado, debe conducir a la muerte celular, preferiblemente de forma inmediata, después de la inducción del sistema. Los genes pertenecientes a la familia *hok* cumplen todos estos requisitos. Son genes pequeños, disponibles en gran variedad de vectores y mini-transposones, los cuales son funcionales en un amplio abanico de bacterias Gram negativas y algunas Gram positivas como *Bacillus subtilis* (Molin *et al.*, 1987). Estos genes codifican proteínas de bajo peso molecular, con un alto nivel de toxicidad, incluso a baja concentración. Se ha estudiado el mecanismo de acción de algunas proteínas de esta familia, entre ellas Hok, RelF, PndA y SrnB. Se sabe que dichas proteínas se insertan en la membrana citoplásmica produciendo el colapso en el potencial de membrana (Gerdes *et al.*, 1986b), pérdida de iones Mg^{2+} (Ito y Ohnishi, 1983; Sakikawa *et al.*, 1989) y liberación al citoplasma de la ARNasa periplásmica, donde degrada indiscriminadamente ARN (Ito y Ohnishi, 1983). Debido a la similaridad del gen *gef* con *hok* y *relF*, el mecanismo por el cual la expresión de dicho gen causa la muerte celular se postula que es el mismo (Poulsen *et al.*, 1989).

El elemento regulador debe controlar de manera eficaz la expresión del elemento *matador*. El sistema de regulación utilizado en esta sección del trabajo, está localizado en el plásmido pCC102 (Fig. 2) y se basa en el sistema de regulación de degradación de alquilbenzoatos de la ruta *meta* del plásmido TOL pWW0 de *Pseudomonas putida*. El sistema consta del regulador *xyIS2* y de una fusión del gen *lacI* de *E. coli* al promotor P_m de dicha ruta (Contreras *et al.*, 1991).

1. Construcción de una unidad base para el diseño del elemento *matador* de un sistema de contención

1.1. Construcción de una fusión $P_{A1-04/03}::gef$

Contreras *et al.* (1991) desarrollaron un sistema de contención para la degradación de aromáticos, el cual era funcional en *E. coli*. El elemento *matador* de dicho sistema consistió en una fusión del gen *gef* de *E. coli* al promotor P_{lac} en el plásmido pHB101. En este apartado se describe la construcción de un elemento *matador* basado en el mismo gen, fusionado a un promotor sintético denominado $P_{A1-04/03}$ (Lanzer y Bujard, 1988) reprimible por la proteína LacI, y las construcciones posteriores para la inserción de dicho elemento en el cromosoma de distintas bacterias Gram negativas, como es el caso de *P. putida*.

El promotor $P_{A1-04/03}$ se eligió para estas construcciones debido a que el nivel de represión ejercido por la proteína LacI sobre dicho promotor es 7 veces superior al que se produce sobre el promotor natural P_{lac} . Además, la fuerza del promotor sintético tras la inducción con IPTG, es unas 7 veces superior a la del promotor P_{lac} (H. Bujard).

El plásmido pUHE24-1 se utilizó para generar la fusión $P_{A1-04/03}::gef$ como se describe a continuación. El gen *gef* se obtuvo a partir del plásmido pLBJ89 (Jensen *et al.*, 1993) como un fragmento *EcoRI-HindIII* de 188 pb, en dicho fragmento se localizó el sitio de unión al ribosoma del gen *gef*. Este fragmento se ligó entre los sitios *EcoRI* y *HindIII* del plásmido pUHE24-1, y la mezcla de ligación se transformó en la cepa *E. coli* JM109, portadora del gen *lacI^{q1}*. Se seleccionaron transformantes resistentes a Ap y se comprobó que el plásmido llevaba la fusión $P_{A1-04/03}::gef$. Dicha construcción se denominó pMCC22 (Fig. 6).

Con objeto de verificar la funcionalidad del elemento *matador* de manera rápida, la eficiencia del sistema de contención se ensayó en *E. coli* JM109 tanto en medio sólido como en medio líquido. Para la comprobación en medio sólido, la cepa de *E. coli* JM109 (pMCC22) se estrió en medio LB suplementado con Ap (marcador del plásmido) en presencia o ausencia de 2mM de IPTG. En presencia de IPTG el represor LacI se libera del operador, de esta manera, la transcripción a partir del promotor se desreprime conduciendo a la síntesis de la proteína Gef, y como consecuencia, a la muerte celular. El comportamiento de *E. coli* JM109 (pMCC22) fue el esperado: formó colonias en ausencia de IPTG pero en presencia de éste no se observó crecimiento.

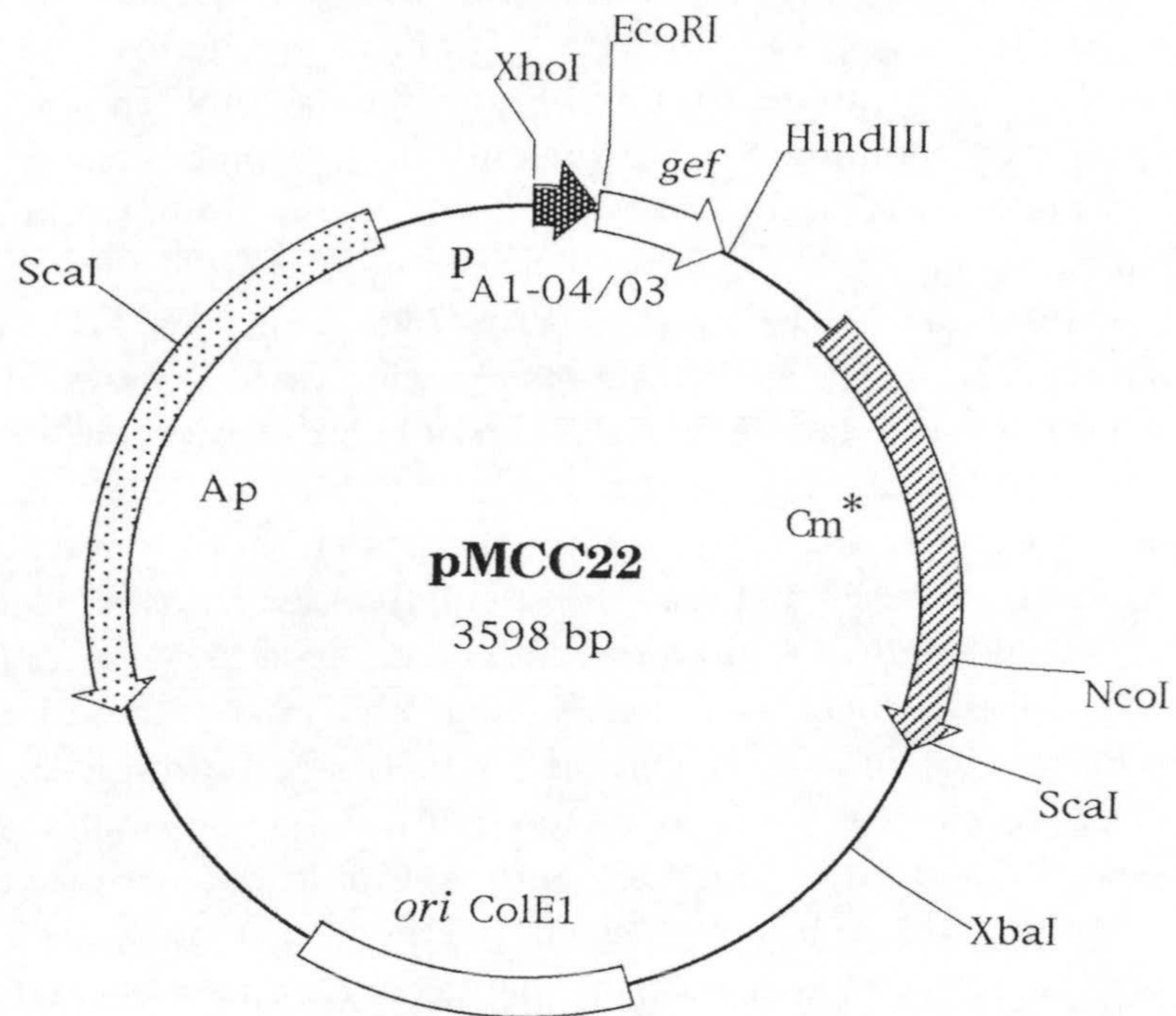


Figura 6. Esquema del plásmido pMCC22

Se muestran los sitios de corte de las enzimas de restricción indicadas, así como la localización del origen de replicación (*ori ColE1*), el promotor sintético P_{A1-04/03}, el gen *gef* y los genes de resistencia a ampicilina (*Ap*) y cloranfenicol (*Cm*). Las flechas indican el sentido en el que se transcriben los genes. Debido a que el gen *gef* y el gen de resistencia a cloranfenicol se transcriben a partir del mismo promotor, esta resistencia no puede ser utilizada para la selección de este plásmido.

La eficiencia del sistema en medio líquido se comprobó determinando el crecimiento de la cepa *E. coli* JM109 (pMCC22) en medio LB suplementado con Ap (marcador del plásmido) en presencia o ausencia de IPTG, tal y como se describe en el apartado 11.1.1 de *Materiales y Métodos*. Como cepa control se usó *E. coli* JM109 (pUHE24-1). Se iniciaron cultivos de ambas cepas en medio LB suplementado con Ap, y cuando la turbidez de éstos alcanzó una DO_{660} de alrededor de 0,3, se dividieron en dos fracciones alícuotas, a una de las cuales se le añadió 10 mM de IPTG. La DO_{660} de los cultivos de *E. coli* JM109 (pUHE24-1) aumentó, tanto en presencia como en ausencia de IPTG (Fig. 7). Sin embargo, el comportamiento de la cepa contenida fue distinto. En ausencia de IPTG la DO_{660} aumentó de forma similar a la cepa control, pero en presencia de IPTG hubo una disminución en la turbidez del cultivo hasta alcanzar una DO_{660} de 0,10 a las 7 horas después de la adición del análogo de la lactosa (Fig. 7). Esta disminución de la DO_{660} podría deberse a la pérdida de viabilidad de las células tras la inducción con IPTG.

En otros sistemas de lisis se describió la liberación de ácidos nucleicos (Kloos *et al.*, 1994) y de proteínas (Witte y Lubitz, 1989) tras la expresión de los genes de lisis. Por este motivo, los cultivos de *E. coli* JM109 (pMCC22) en medio LB suplementado con Ap e IPTG se analizaron con respecto a la liberación de ácidos nucleicos y proteínas. Los resultados obtenidos se presentan en la Figuras 8 y 9. Tras 90 minutos en presencia de IPTG se detectó liberación al medio tanto de ácidos nucleicos como de proteínas. La liberación de ácidos nucleicos continuó durante aproximadamente 4 horas, pero a partir de ese momento se observó degradación de los mismos, probablemente como consecuencia de la acción de las nucleasas liberadas por las células lisadas. La liberación de proteínas continuó de manera progresiva con el tiempo.

Estos resultados sugieren que la fusión $P_{A1-04/03}::gef$ fue funcional en *E. coli*, y por ello el plásmido pMCC22 se utilizó como base para el desarrollo del elemento *matador* para *P. putida*.

1.2. Clonación del elemento *matador* en un vector de transferencia

Para la transferencia del elemento *matador* a un mini-transposón que pudiese utilizarse como donador universal de dicho elemento, la fusión $P_{A1-04/03}::gef$ se clonó en el plásmido pUT-Tc, el cual contiene un mini-Tn 5 que codifica resistencia a tetraciclina (de Lorenzo *et al.*, 1990). La clonación se realizó como se describe a continuación (Fig. 10). El plásmido pMCC22 se

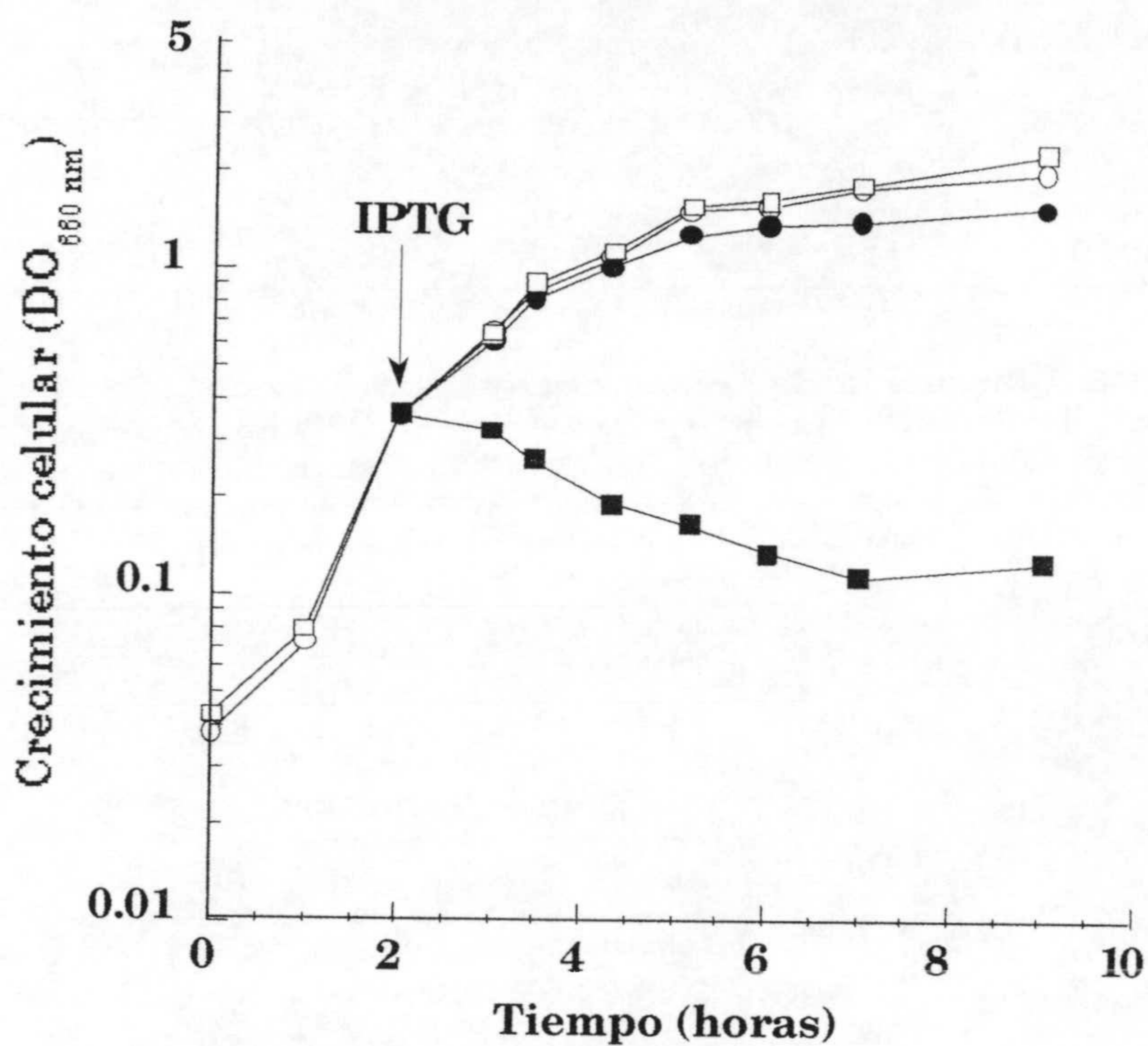


Figura 7. Crecimiento de *E. coli* JM109 (pMCC22) y *E. coli* JM109 (pUHE24-1) en presencia y ausencia de IPTG

E. coli JM109 (pMCC22) (cuadrados) y *E. coli* JM109 (pUHE24-1) (círculos) se cultivaron en medio líquido LB-Ap hasta alcanzar una DO₆₆₀ de 0,3. En ese momento, cada cultivo se dividió en dos fracciones alícuotas, a una de ellas se le añadió 10 mM de IPTG (símbolos cerrados) y la otra se mantuvo como control (símbolos abiertos). A los tiempos indicados se determinó la DO₆₆₀.

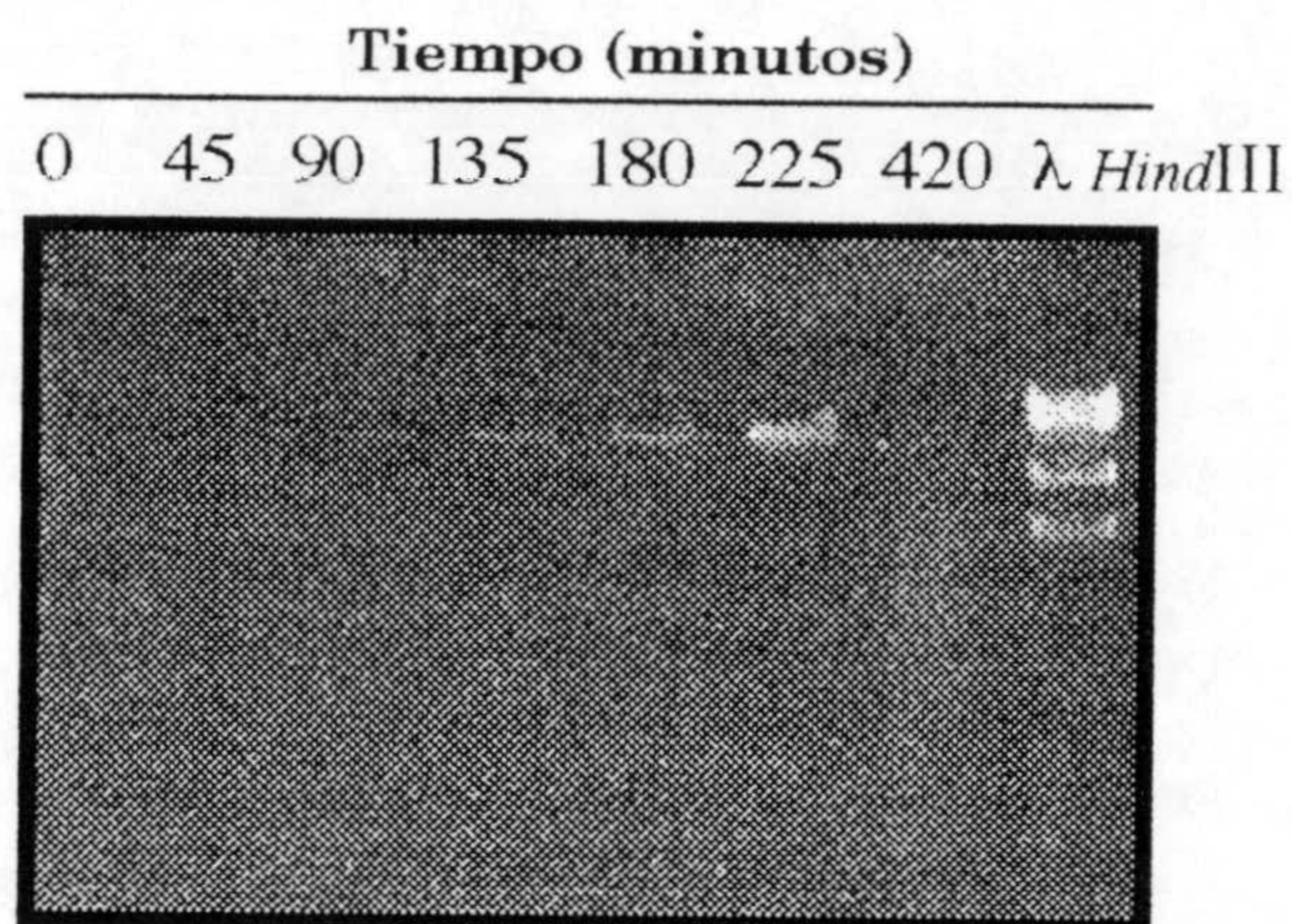


Figura 8. Liberación de ácidos nucleicos de *E. coli* JM109 (pMCC22) tras la inducción de la expresión del gen de lisis en presencia de IPTG

Se partió de células de *E. coli* JM109 (pMCC22) cultivadas tal y como se describe en la leyenda de la Figura 7. La visualización de los ácidos nucleicos liberados se realizó en geles de agarosa tal y como se describe en el apartado 10.3 de *Materiales y Métodos*.

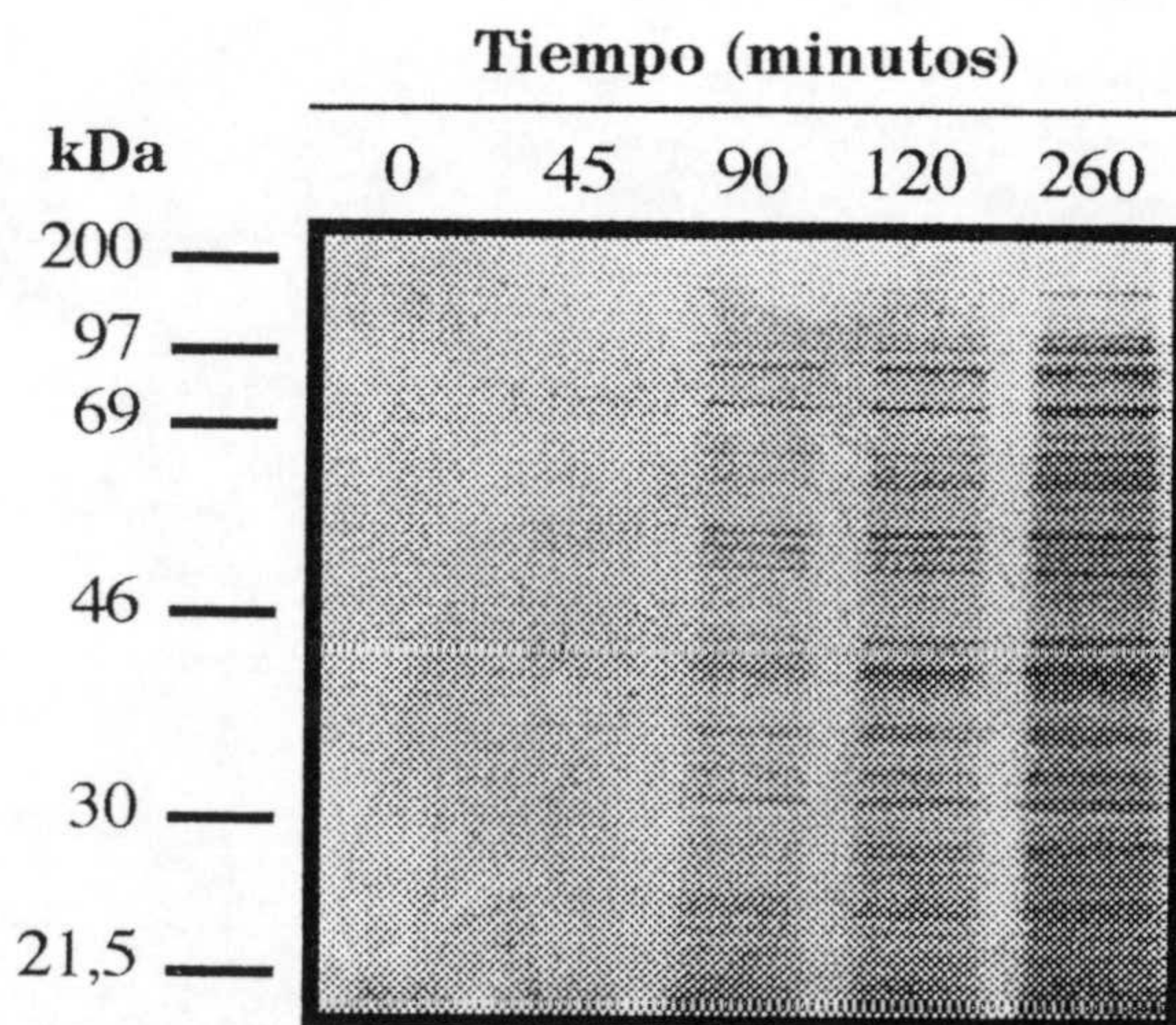


Figura 9. Liberación de proteínas de *E. coli* JM109 (pMCC22) tras la inducción de la expresión del gen de lisis con IPTG

Se partió de células de *E. coli* JM109 (pMCC22) cultivadas como se describe en la leyenda de la Figura 7. Los sobrenadantes se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS. Las proteínas se visualizaron mediante tinción con nitrato de plata, tal y como se describe en el apartado 11.4 de *Materiales y Métodos*.

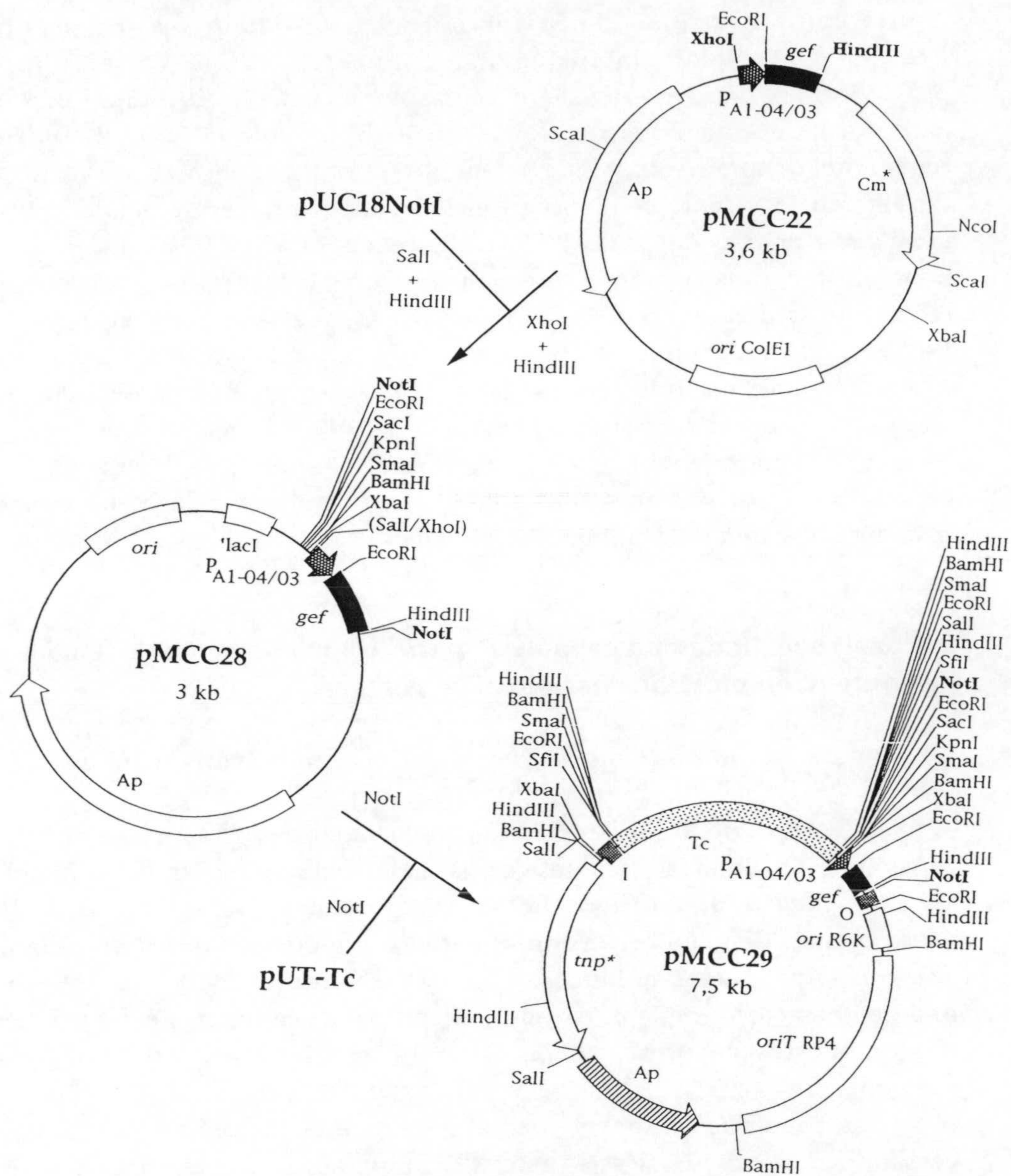


Figura 10. Construcción de los plásmidos pMCC28 y pMCC29

La construcción de los plásmidos se detalla en el texto. Se indican los genes que confieren resistencia a ampicilina (Ap) y tetraciclina (Tc) y la fusión P_{A1-04/03}::*gef* a lo largo de las construcciones. En la construcción pMCC29 se indican los sitios de corte para varias enzimas de restricción. Los bordes del mini-Tn 5 se indican por las letras I (izquierdo) y O (derecho). Se indican además el gen que codifica la transposasa (*tnp**), el origen de replicación (*ori* R6K) y el origen de transferencia (*ori*^T RP4).

digirió con las enzimas de restricción *Xho*I y *Hind*III, y el fragmento de 278 pb conteniendo la fusión $P_{A1-04/03}::gef$ se clonó en el plásmido pUC18Not previamente digerido con las enzimas *Sal*I y *Hind*III. Como cepa receptora de esta construcción se utilizó *E. coli* JM109. El plásmido resultante, denominado pMCC28 (Fig. 10), se digirió con *Not*I, y el fragmento de 290 pb resultante se clonó en el sitio único *Not*I del plásmido pUT-Tc, localizado dentro del mini-Tn5 (de Lorenzo *et al.*, 1990). La mezcla de ligación se transformó en la cepa *E. coli* Mv1190 λ pir y el plásmido resultante se denominó pMCC29 (Fig. 10). Al igual que en el caso de *E. coli* JM109 (pMCC22), con estas dos cepas se comprobó la eficiencia del elemento *matador* en medio sólido como se describió anteriormente. El resultado fue el esperado, las cepas crecieron en ausencia de IPTG y no en su presencia.

El plásmido movilizable pMCC29, que sólo puede replicarse en fondos genéticos con la proteína PIR, constituye la unidad básica del elemento *matador* del sistema de contención biológica.

2. Construcción de una cepa de *P. putida* portadora del sistema activo de contención biológica basado en el gen *gef*

2.1. Construcción de *P. putida* receptora de mini-transposones

El control de la expresión del gen *matador* descrito anteriormente, en cepas de *E. coli* portadoras del gen *lacI*, se realizó mediante la adición de IPTG al medio de cultivo. En el medio ambiente, el control de la supervivencia de microorganismos liberados intencionadamente, mediante la adición de productos químicos, es inviable, tanto desde el punto de vista práctico como económico. Así pues, el control de la muerte celular a través de compuestos ya presentes en el medio ambiente es la estrategia más conveniente.

Las bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* poseen una gran versatilidad metabólica y son capaces de mineralizar una amplia variedad de compuestos aromáticos. Esta característica permitió construir una cepa de *P. putida* portadora de un elemento regulador que controlase la expresión del gen *matador*. Se eligió el plásmido pCC102 (Contreras *et al.*, 1991), que contiene el gen *xyIS2* y una fusión del promotor P_m al gen *lacI*. De este modo se asoció la degradación de alquilbenzoatos a un sistema activo de contención biológica (Fig. 1). Este plásmido se transfirió a *P. putida* KT2440 (pWWO). La transferencia del plásmido pCC102 a la cepa *P. putida* (pWWO) se realizó mediante conjugación tripartita como se describe en el apartado 8

de *Materiales y Métodos*. Como cepas donadora y auxiliar se utilizaron *E. coli* CSH36 (pCC102) y *E. coli* HB101 (RK600), respectivamente. Los transconjugantes de *P. putida* (pWW0) se seleccionaron en medio mínimo M9 con 5 mM de 3MB como única fuente de carbono y suplementado con Km (pCC102 porta un gen de resistencia a Km). La frecuencia de transconjugantes fue del orden de 10^{-3} transconjugantes por receptor. Se eligió uno de ellos, al que se denominó *P. putida* EEZ29. Esta cepa se utilizó como cepa receptora de los diferentes minitransposones, portadores o no de elementos *matadores*, utilizados en este trabajo.

2.2. Transferencia del elemento *matador* al cromosoma de *P. putida* EEZ29

La transferencia del elemento *matador* al cromosoma de *P. putida* EEZ29 se realizó mediante conjugación tripartita entre *P. putida* EEZ29 como cepa receptora, *E. coli* Mv1190 λ pir (pMCC29) como cepa donadora y *E. coli* HB101 (RK600) como cepa auxiliar. Los transconjugantes, seleccionados en medio mínimo M9 con 5 mM de 3MB como única fuente de carbono y suplementado con Km y Tc (la Tc selecciona el mini-Tn5 portador del elemento *matador*), aparecieron con una frecuencia de 1×10^{-5} transconjugantes por receptor. De los transconjugantes Km^r Tc^r obtenidos se seleccionaron 20 al azar para su posterior caracterización. Ésta se realizó como se describe a continuación:

- La eficiencia del sistema activo de contención biológica se comprobó en los siguientes medios sólidos suplementados con Km y Tc: medio mínimo M9 con 5 mM de 3MB como única fuente de carbono y medio mínimo M9 con 0,5% (p/v) de glucosa como única fuente de carbono suplementado con 2 mM de IPTG. Se esperaba que los transconjugantes portadores del elemento *matador* formasen colonias en el medio con 3MB pero no en el medio con glucosa e IPTG. Los 20 transconjugantes seleccionados mostraron el fenotipo esperado.

- El mini-Tn5::P_{A1-04/03}::gef en *P. putida* EEZ29 se podía haber integrado tanto en el cromosoma como en los plásmidos pCC102 o pWW0. De los 20 transconjugantes se aisló plásmido pCC102 y éste se transformó en *E. coli* CSH36. En ningún caso aparecieron transformantes resistentes simultáneamente a Km y Tc, lo que indicó que el elemento *matador* no se había integrado en el plásmido pCC102.

- Para determinar si el mini-transposón se integró en el cromosoma o en el plásmido pWW0, se realizó una conjugación de cada uno de los

20 clones con *P. putida* UWC1 (pCC102) como cepa receptora. Se seleccionó la transferencia del plásmido pWW0 (crecimiento en 3MB) y/o del marcador de resistencia a Tc. Los transconjugantes se seleccionaron en los siguientes medios sólidos suplementados con Km y Rif: medio mínimo M9 con 5 mM de 3MB como única fuente de carbono y medio mínimo M9 con 5 mM de 3MB como única fuente de carbono suplementado con Tc. Mientras que la transferencia del plásmido pWW0 ocurrió con una frecuencia del orden de 10^{-1} transconjugantes por receptor, la frecuencia de movilización del marcador de Tc fue en todos los casos inferior a 10^{-6} transconjugantes por receptor. Dado que Ramos-González *et al.*, (1994) describieron que el plásmido TOL pWW0 es capaz de movilizar marcadores cromosómicos desde una cepa hospedadora a otra receptora con una frecuencia que varió entre 1×10^{-4} a 1×10^{-8} transconjugantes por receptor, en función de la localización del marcador en el cromosoma del hospedador, un clon cuyo marcador de resistencia a tetraciclina se transfirió a una tasa inferior a 1×10^{-8} transconjugantes por receptor se eligió como cepa contenida biológicamente. Este clon se denominó *P. putida* EEZ30, y constituye la cepa contenida biológicamente para posteriores estudios.

2.3. Construcción de las cepas control

Para la construcción de las cepas control, es decir, cepas no portadoras del sistema activo de contención biológica pero con la inserción del mini-Tn5/Tc, se realizó una conjugación tripartita entre *P. putida* EEZ29 como cepa receptora y *E. coli* Mv1190 λ pir (pUT-Tc) como cepa donadora, usando como cepa auxiliar *E. coli* HB101 (RK600). Los transconjugantes, seleccionados en medio mínimo M9 con 5 mM de 3MB como única fuente de carbono y suplementado con Km y Tc, aparecieron con una frecuencia de 4×10^{-5} transconjugantes por receptor. Mediante una serie de conjugaciones entre los diferentes transconjugantes seleccionados y *P. putida* UWC1 se seleccionaron dos tipos de clones: uno en el que el marcador de resistencia a Tc se localizó en el cromosoma en una región de baja frecuencia de movilización (menor de 1×10^{-7} transconjugantes por receptor), este clon se denominó *P. putida* EEZ31; y otro clon que portaba la inserción del mini-Tn5/Tc en el plásmido pWW0, ya que la capacidad de utilizar 3MB y la resistencia a Tc se co-transferieron con la misma frecuencia. Este clon se denominó *P. putida* EEZ32.

3. Caracterización de las cepas contenida y control

3.1. Estabilidad de las cepas construidas

La estabilidad del plásmido pCC102 y de las inserciones de los diferentes mini-transposones en las cepas *P. putida* EEZ30, *P. putida* EEZ31 y *P. putida* EEZ32 se realizó como se describe en el apartado 9 de *Materiales y Métodos*. Las diluciones se sembraron en medio LB con 5 mM de 3MB como única fuente de carbono, suplementado o no con Km y/o Tc. El número de unidades formadoras de colonias fue similar en los cuatro medios, independientemente de que las células se hubiesen cultivado en presencia o ausencia del antibiótico. Estos resultados sugirieron que en estas cepas tanto el mini-Tn5/Tc, con o sin el elemento *matador*, como el plásmido pCC102 fueron mantenidos establemente en ausencia de presión selectiva.

3.2. Supervivencia de las cepas en presencia y ausencia de 3MB

Estos ensayos se realizaron para determinar el comportamiento de las cepas *P. putida* EEZ30, *P. putida* EEZ31 y *P. putida* EEZ32, tanto en ausencia de 3MB como en presencia de IPTG en condiciones estándar de cultivo en el laboratorio.

P. putida EEZ30, *P. putida* EEZ31 y *P. putida* EEZ32 se cultivaron durante 10-12 horas en medio mínimo M9 con 15 mM de 3MB, como única fuente de carbono, suplementado con Km y Tc. Las células se recogieron por centrifugación y se lavaron 2 veces en tampón 1 x M9. Las células se resuspendieron en medio mínimo M9 suplementado con Km y Tc para alcanzar una turbidez inicial de 0,02 a 660nm. El cultivo se dividió en tres fracciones alícuotas que se suplementaron con: 15 mM de 3MB como única fuente de carbono, con 0,5% (p/v) de glucosa como única fuente de carbono o con 0,5% (p/v) de glucosa como única fuente de carbono más 2 mM de IPTG. A lo largo del tiempo se determinó la turbidez de los cultivos. El comportamiento de las cepas control, *P. putida* EEZ31 (Fig. 11A) y *P. putida* EEZ32 (Fig. 11B), fue similar. En los medios con glucosa como única fuente de carbono hubo una fase de latencia de 2-3 horas, posteriormente la turbidez de los cultivos aumentó hasta alcanzar una DO_{660} de alrededor de 3 a las 21 horas de iniciado el ensayo. En presencia de 3MB como única fuente de carbono, los cultivos crecieron de forma exponencial durante las 10 primeras horas y posteriormente el crecimiento fue lineal, alcanzando a

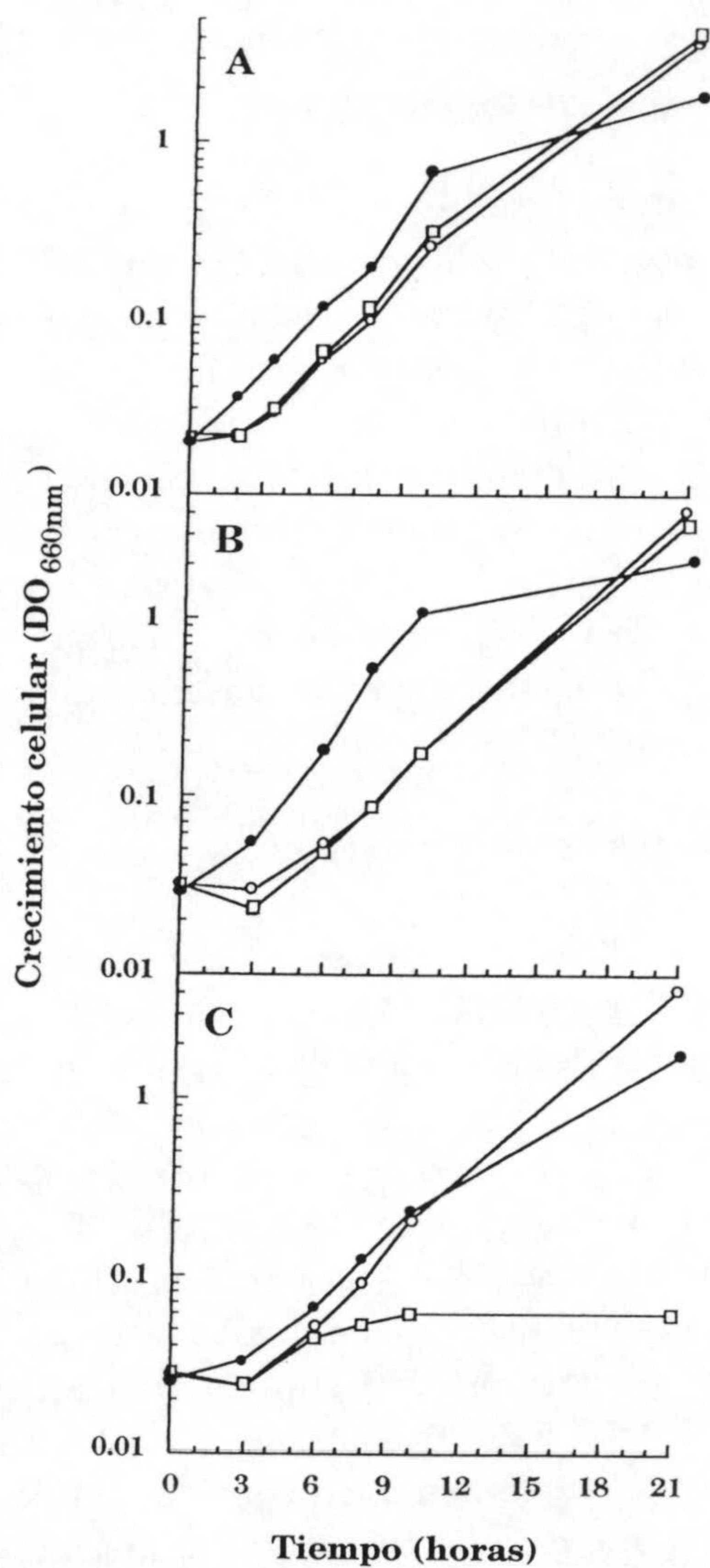


Figura 11. Crecimiento en medio líquido de cepas de *P. putida* portando o no un sistema de contención biológica

El crecimiento de *P. putida* EEZ31 (A), *P. putida* EEZ32 (B) y *P. putida* EEZ30 (C) se determinó en medio mínimo M9 con Km y Tc a los que se añadió 0,5% (p/v) de glucosa (círculos abiertos); 0,5% (p/v) de glucosa y 2 mM de IPTG (cuadrados abiertos); o, 15 mM de 3MB (círculos cerrados).

las 21 horas de iniciado el ensayo una DO_{660} de alrededor de 2. El comportamiento de *P. putida* EEZ30 (Fig. 11C) en medio con glucosa y en medio con 3MB fue similar al de las cepas control. Sin embargo, en medio con glucosa e IPTG la turbidez del cultivo aumentó hasta alcanzar niveles de DO_{660} de 0,06 durante las 8 primeras horas y posteriormente se mantuvo en este nivel hasta el final del experimento, indicando que el sistema de contención biológica fue funcional en *P. putida*.

3.3. Tasa de mutación del sistema de contención biológica en *P. putida* EEZ30

La tasa de mutación por célula y por generación de la cepa *P. putida* EEZ30 se estimó como "escape" a la muerte tras la inducción de la expresión del gen *matador*, y para ello se utilizó una modificación del método descrito por Luria y Delbrück (1943), tal como se describe en el apartado 12 de *Materiales y Métodos*. La tasa de mutación del sistema de contención en *P. putida* EEZ30 fue del orden de 10^{-6} - 10^{-7} por célula y por generación. Esta tasa de mutación fue de 1 a 2 órdenes de magnitud inferior que las descritas cuando el elemento *matador* se localizó en un plásmido (Knudsen y Karlström, 1991; Contreras *et al.*, 1991).

4. Supervivencia en microcosmos edáficos de *P. putida* EEZ30 y *P. putida* EEZ32

Una vez probada la funcionalidad del sistema de contención biológica en condiciones estándar de laboratorio, se estudió el comportamiento de las cepas contenida y control en microcosmos edáficos. Salvo que se especifique lo contrario, todos los experimentos que se detallan a continuación se realizaron en un suelo fluvisol, cuyas características se recogen en las Tablas 6 y 7 de *Materiales y Métodos*. En los casos indicados los microcosmos fueron suplementados con una concentración inicial de 3MB de 0,1% (p/p), ya que concentraciones mayores del aromático afectaban negativamente la supervivencia de *P. putida* en suelo (Ramos *et al.*, 1991). La preparación de los inóculos y la toma de muestras se realizó como se describe en el apartado 13 de *Materiales y Métodos*.

4.1. Efecto de la temperatura sobre la supervivencia de *P. putida* en suelo

Ramos *et al.* (1991) pusieron de manifiesto que la supervivencia de *P. putida* en suelos estaba afectada por la temperatura de incubación de los mismos. Con objeto de establecer la temperatura óptima para estos ensayos se analizó la supervivencia de las cepas *P. putida* EEZ30 y *P. putida* EEZ32 en microcosmos edáficos suplementados con 0,1% (p/p) de 3MB e incubados a 12°, 18°, 30° y 37°C con oscilación de $\pm 2^\circ\text{C}$. Los microcosmos edáficos se inocularon con células de las cepas mencionadas para alcanzar una densidad celular inicial del orden de 10^6 UFC/g de suelo. Se obtuvieron resultados similares para la cepa portadora del sistema de contención (Fig. 12A) y para la cepa control (Fig. 12B), lo cual indica que, en relación con la temperatura de incubación de las muestras, la presencia en el cromosoma de las bacterias del elemento *matador* no es el factor determinante de la supervivencia de las cepas en suelos suplementados con 3MB. A 30°C el número de bacterias aumentó hasta 2×10^8 UFC/g de suelo en el primer día, disminuyendo de manera continua hasta 1×10^3 UFC/g de suelo después de 30 días. A 37°C el número de bacterias aumentó hasta 4×10^7 UFC/g de suelo en los primeros días y disminuyó progresivamente hasta alrededor de 10^2 UFC/g de suelo después de 30 días. A 12°C el número de bacterias disminuyó desde el primer día hasta alcanzar 1×10^5 UFC/g de suelo después de 1 mes. A 18°C el número de bacterias aumentó 2 órdenes de magnitud durante los 3 primeros días y después de 1 mes el número de bacterias fue similar al número de bacterias iniciales, aproximadamente 2×10^6 UFC/g de suelo.

Para comprobar si la introducción en el suelo de la cepa contenida producía cambios en el sistema de contención que diesen lugar a la aparición de mutantes resistentes a la muerte, 25-50 colonias de cada una de las muestras tomadas se sembraron en medio mínimo M9 con 0,5% (p/v) de glucosa como única fuente de carbono suplementado con 2 mM de IPTG, Km y Tc; y posteriormente en medio mínimo M9 con 5 mM de 3MB como única fuente de carbono suplementado con Km y Tc. Se observó que las bacterias formaron colonias en el segundo medio, pero no en el primero. Estos resultados se tomaron como evidencia de que el sistema de contención biológica no se alteró por la introducción de las bacterias en el suelo. En las muestras de todos los microcosmos que se describen a continuación el comportamiento fue el mismo, por lo que este dato se omitirá en el resto de los ensayos.

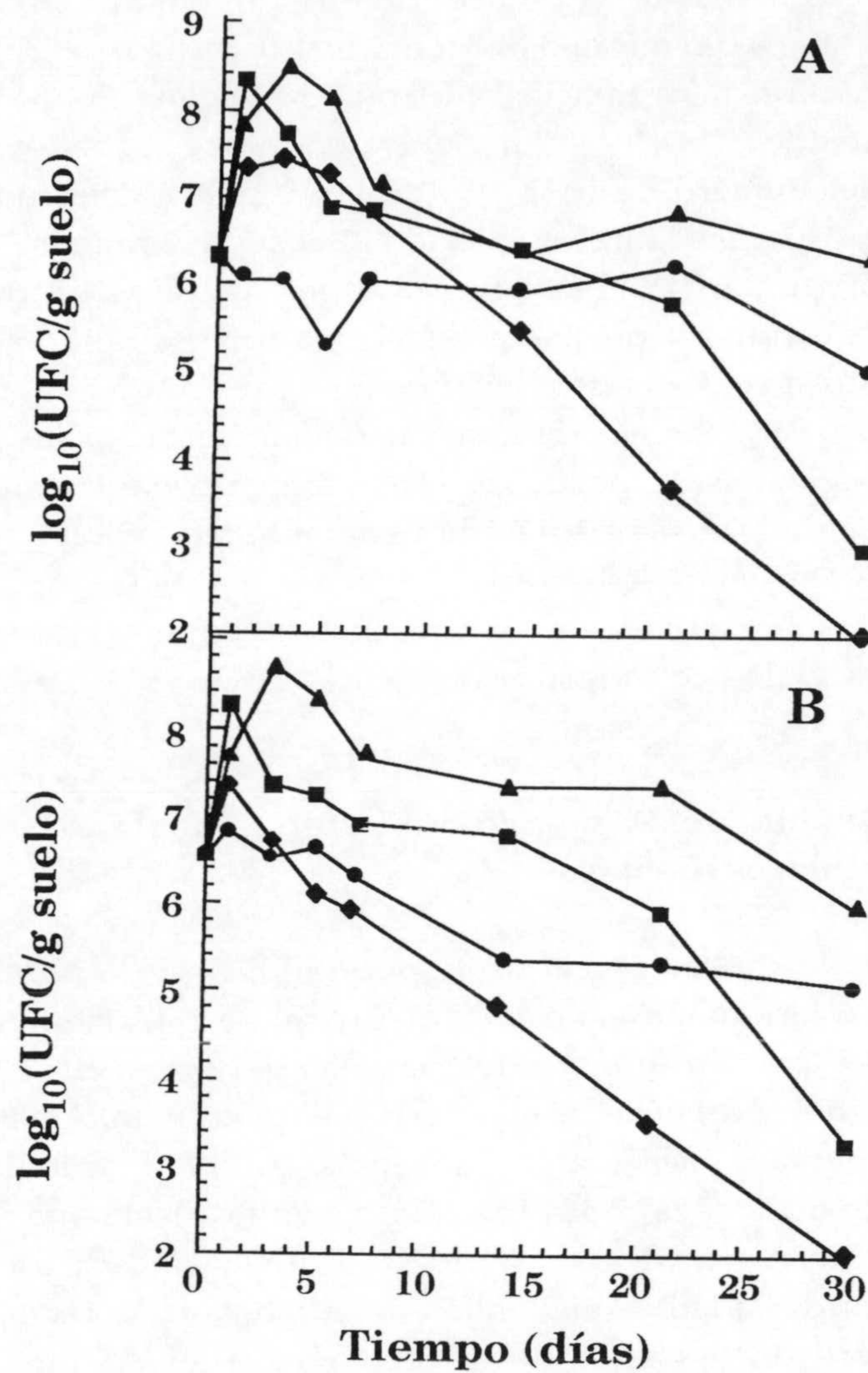


Figura 12. Efecto de la temperatura sobre la supervivencia de *P. putida* EEZ30 y *P. putida* EEZ32 en suelo fluvisol

Alrededor de 10^6 UFC/g de suelo de *P. putida* EEZ30 (A) o *P. putida* EEZ32 (B) se introdujeron en 90 g de suelo fluvisol suplementado con 0,1% (p/p) de 3MB. Los microcosmos se mantuvieron a 12°C (círculos), 18°C (triángulos), 30°C (cuadrados) y 37°C (rombos).

El efecto de la temperatura y de la introducción de las cepas de *P. putida* sobre la población de bacterias indígenas del suelo se evaluó mediante conteos de bacterias capaces de formar colonias en los siguientes medios: medio LB, medio mínimo M9 con 5 mM de benzoato (Bz) como única fuente de carbono y medio mínimo M9 con 5 mM de ácido *p*-hidroxifenilacético (*p*OHFA) como única fuente de carbono. A 12°C hubo un aumento del número de bacterias de las 3 poblaciones analizadas, de forma que a los 30 días de haber iniciado el ensayo el número de UFC/g de suelo fue del orden de 10^8 (Tabla 8). En los microcosmos incubados a otras temperaturas el número de bacterias se mantuvo similar a los valores iniciales. De estos resultados se concluyó que la introducción en el suelo de *P. putida*, con o sin sistema de contención, no afectó a las poblaciones bacterianas analizadas. A partir de este momento, se consideró sólo la población capaz de formar colonias en medio mínimo M9 con *p*-OHFA como indicador de la población de bacterias indígenas del suelo.

En base a los resultados arriba reseñados, en ensayos posteriores la incubación de los microcosmos se realizó a $18 \pm 2^\circ\text{C}$.

4.2. Supervivencia de *P. putida* en suelo inoculado a diferentes densidades celulares iniciales

Se analizó la supervivencia de *P. putida* EEZ30 y *P. putida* EEZ32 en microcosmos, suplementados o no, con 0,1% (p/p) de 3MB, mantenidos a $18 \pm 2^\circ\text{C}$ e inoculados con un número de bacterias del orden de 10^4 UFC/g de suelo y de 10^8 UFC/g de suelo. El comportamiento de *P. putida* EEZ30 estuvo influenciado por la presencia o ausencia de 3MB, mientras que el comportamiento de la cepa control no se vió significativamente afectado por la presencia o ausencia del aromático. En suelo sin adición de 3MB e inoculado a una densidad celular inicial de alrededor de 4×10^4 UFC/g de suelo, el número de bacterias de la cepa no contenida biológicamente, *P. putida* EEZ32, permaneció relativamente constante a lo largo del ensayo (Fig. 13A). En contraste, el número de bacterias de la cepa *P. putida* EEZ30 disminuyó desde el momento de la inoculación, de forma que después de 1 mes, el número de bacterias fue del orden de 10^2 UFC/g de suelo (Fig. 13C). En suelos sin adición de 3MB, cuando la densidad celular inicial fue del orden de 10^8 UFC/g de suelo se observó una disminución en el número de UFC de ambas cepas, siendo más marcado en el caso de la cepa con el sistema de contención. El número de bacterias de *P. putida* EEZ30 después

Tabla 8. Efecto de la introducción de *P. putida* EEZ30 y *P. putida* EEZ32 a distintas temperaturas sobre la población de bacterias indígenas del suelo.

Los microcosmos se inocularon con *P. putida* EEZ30 (A) o *P. putida* EEZ32 (B) y la población de bacterias indígenas del suelo se estimó mediante conteo de bacterias capaces de crecer en medio LB y medio mínimo con Bz o pOHFA como única fuente de carbono. Los valores se expresan como el \log_{10} del número de UFC/g de suelo.

A

Medio	12°C		30°C		37°C		18 ± 2° C	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
LB	6,69	8,37	6,69	6,96	6,69	7,0	6,69	7,02
Bz	6,47	8,40	6,47	6,53	6,47	6,0	6,47	6,73
pOHFA	6,90	8,07	6,90	7,16	6,90	7,0	6,90	7,38

B

Medio	12°C		30°C		37°C		18 ± 2° C	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
LB	6,69	8,51	6,69	7,06	6,69	7,17	6,69	7,13
Bz	6,47	8,37	6,47	6,69	6,47	6,00	6,47	6,68
pOHFA	6,90	7,44	6,90	7,23	6,90	6,95	6,90	7,35

de 1 mes fue 8×10^4 UFC/ g suelo (Fig. 13D), mientras que el número de bacterias de *P. putida* EEZ32 fue del orden de 10^6 UFC/g de suelo (Fig. 13B).

En suelos suplementados con 3MB el comportamiento de ambas cepas fue similar. En microcosmos inoculados a una densidad celular inicial de 4×10^4 UFC/g de suelo, el número de bacterias de ambas cepas aumentó hasta 10^7 - 10^8 UFC/g de suelo tras una semana de incubación. Posteriormente el número de UFC/g de suelo disminuyó progresivamente hasta 1×10^6 UFC/g de suelo al final del ensayo (Fig. 13A y 13C). Cuando la densidad celular inicial fue 10^8 UFC/g de suelo el número de bacterias de ambas cepas aumentó durante los primeros días hasta alcanzar 5×10^8 UFC/g de suelo y posteriormente disminuyó a lo largo de todo el ensayo hasta alcanzar alrededor de 6×10^6 UFC/g de suelo al final del ensayo (Fig. 13B y 13D).

El efecto que ejerció la introducción de las cepas recombinantes a distintas densidades celulares sobre la supervivencia de la población de bacterias indígenas del suelo, se evaluó determinando el número de bacterias capaces de formar colonias en medio mínimo M9 con 5 mM de pOHFA como única fuente de carbono. Durante los 30 días que duró el ensayo el número de bacterias se mantuvo relativamente constante entre 5×10^6 y 5×10^7 UFC/g de suelo (Tabla 9), independientemente del número de células de *P. putida* EEZ30 y *P. putida* EEZ32 que se introdujeran en el suelo y de la presencia o ausencia de 3MB.

4.3. Transferencia génica a *P. putida* UWC1 (pCC102) en suelo

El plásmido TOL pWWO y sus derivados recombinantes se transfieren y replican establemente en bacterias del género *Pseudomonas* pertenecientes al grupo I de ARNr, entre las que cabe mencionar *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, etc, así como a algunas enterobacterias, entre ellas, *E. coli* y *Erwinia chrysanthemi* (Ramos-González et al., 1991). En suelos, el nivel de transferencia de dicho plásmido está limitado no sólo por el espectro de huésped sino también por la densidad celular y una serie de factores abióticos tales como temperatura, naturaleza del suelo y presencia de contaminantes que puedan afectar a la supervivencia tanto del donador como del receptor (Duque, 1994).

Los ensayos que se describen a continuación se diseñaron para estudiar si el plásmido TOL pWWO se transfería desde las cepas recombinantes a otras cepas en suelo, y si al moverse co-transfería, y a

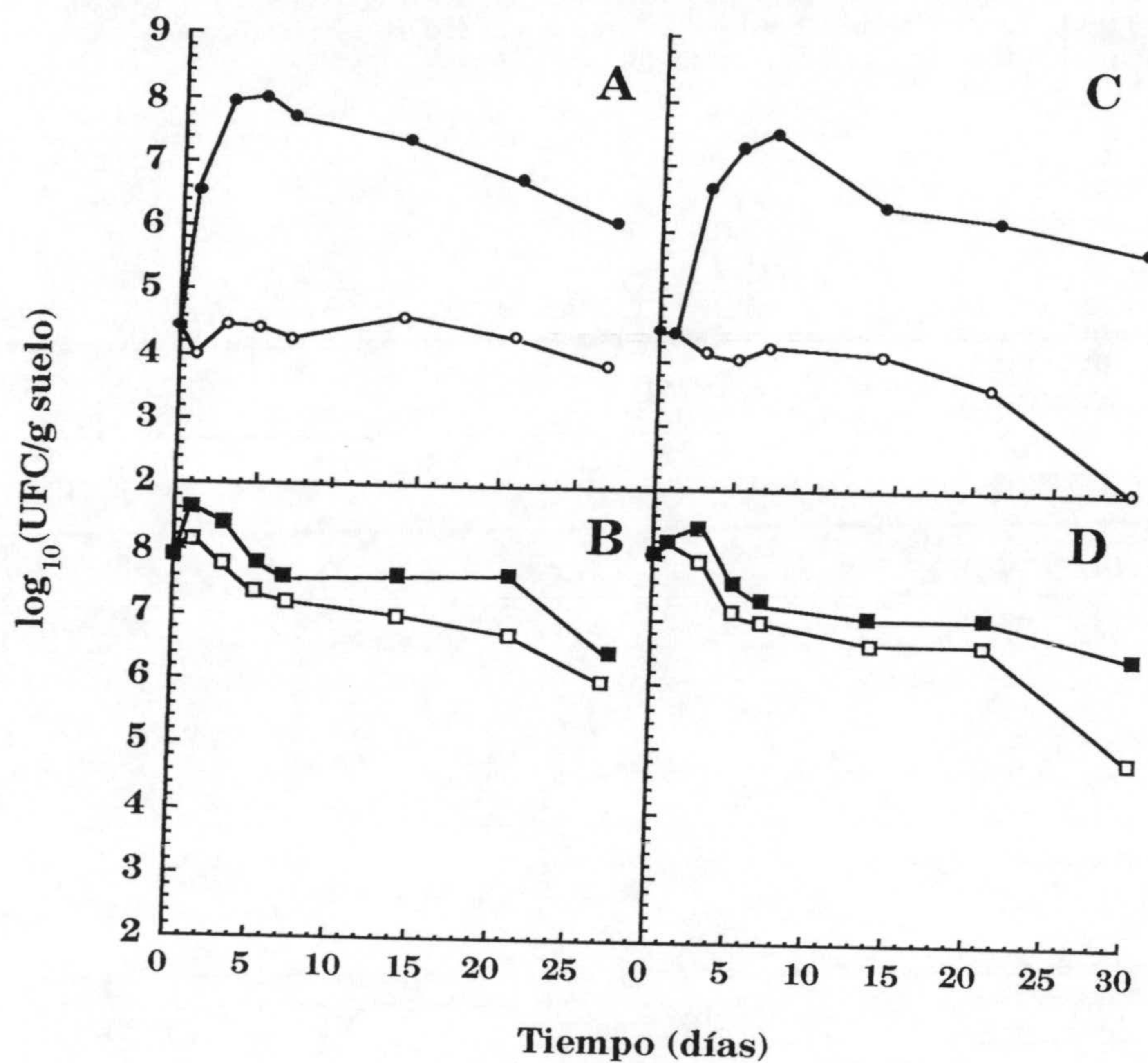


Figura 13. Efecto de la densidad celular sobre la supervivencia de *P. putida* EEZ30 y *P. putida* EEZ32 en suelo fluvisol

Noventa gramos de suelo suplementados (símbolos cerrados) o no (símbolos abiertos) con 0,1% (p/p) de 3MB se inocularon con diferentes densidades celulares iniciales de *P. putida* EEZ32 (A y B) o *P. putida* EEZ30 (C y D). Las densidades iniciales fueron: 4×10^4 UFC/g de suelo (A y C) y 1×10^8 UFC/g de suelo (B y D).

Tabla 9. Efecto de la introducción de *P. putida* EEZ30 y *P. putida* EEZ32 a distintas densidades celulares sobre la población de bacterias indígenas capaces de utilizar pOHFA como única fuente de carbono

La población de bacterias capaces de utilizar pOHFA como única fuente de carbono se determinó en suelos en los que se introdujeron 4×10^4 o 1×10^8 UFC/g de suelo de *P. putida* EEZ30 (A) o de *P. putida* EEZ32 (B). Los valores se expresan como el \log_{10} del número de UFC/g de suelo.

A

Bacterias iniciales de <i>P. putida</i> EEZ30	-3MB		+3MB	
	Inicial	Final	Inicial	Final
4×10^4	6,34	7,10	6,34	7,69
1×10^8	6,34	7,14	6,34	7,60

B

Bacterias iniciales de <i>P. putida</i> EEZ32	-3MB		+3MB	
	Inicial	Final	Inicial	Final
4×10^4	6,49	6,61	6,49	7,63
1×10^8	6,49	7,14	6,49	7,75

que frecuencia, el marcador de resistencia a Tc, con o sin elemento *matador*. Los microcosmos edáficos se suplementaron o no con 0,1% (p/p) de 3MB y se incubaron a $18 \pm 2^\circ\text{C}$. Como cepa receptora se utilizó *P. putida* UWC1 (pCC102) y como donadoras *P. putida* EEZ30 y *P. putida* EEZ32 (portadora de el plásmido TOL pWW0-Tc). Las cepas se introdujeron en el suelo a una densidad celular inicial del orden de 10^7 UFC/g de suelo de manera independiente, para evitar la formación de puentes de transferencia previos a la introducción de las bacterias en el suelo. Como control se realizaron ensayos en los cuales las bacterias donadoras y receptoras se introdujeron en distintos microcosmos y a densidades celulares similares. Los transconjugantes se seleccionaron en los siguientes medios: la transferencia del plásmido pWW0 se seleccionó en medio mínimo M9 con 5 mM de 3MB suplementado con Rif y Km; y la co-transferencia del marcador de resistencia a Tc se realizó en el mismo medio pero suplementado con Tc. Los resultados obtenidos se presentan en las Figuras 14 y 15.

En suelos sin adición de 3MB e inoculados con la cepa sin el sistema de contención biológica, *P. putida* EEZ32, como cepa donadora, y *P. putida* UWC1 (pCC102) como cepa receptora, el número de donadores y receptores permaneció relativamente constante durante los 30 días que duró el ensayo (Fig. 14A). A las 72 horas, el número de transconjugantes en medio mínimo M9 con 5 mM de 3MB con Rif y Km suplementado o no con Tc, fue del orden de 10^2 UFC/g de suelo, siendo la mayor densidad celular de transconjugantes alcanzada de alrededor de 1×10^3 UFC/g de suelo veinte días después de iniciado el ensayo. A lo largo del ensayo se observó oscilaciones en el número de transconjugantes y después de 30 días de incubación éstos fueron indetectables (Fig. 14A).

Cuando las mismas cepas se introdujeron en suelo suplementado con 3MB, el número de células de *P. putida* EEZ32 aumentó hasta alcanzar 6×10^8 UFC/g de suelo en los 3 primeros días, disminuyendo posteriormente hasta 5×10^7 UFC/g de suelo (Fig. 14B). Por el contrario, la cepa receptora permaneció al mismo nivel al que había sido inoculada durante los 30 días que duró el ensayo. A las 24 horas el número de transconjugantes en medio mínimo M9 con 5 mM de 3MB como única fuente de carbono con Rif, Km y suplementado o no con Tc, fue del orden de 10^4 UFC/g de suelo y la mayor densidad celular de transconjugantes alcanzada fue del orden de 10^5 UFC/g de suelo al tercer día. Posteriormente el número de transconjugantes disminuyó progresivamente hasta alcanzar 2×10^4 UFC/g de suelo al final del ensayo (Fig. 14B).

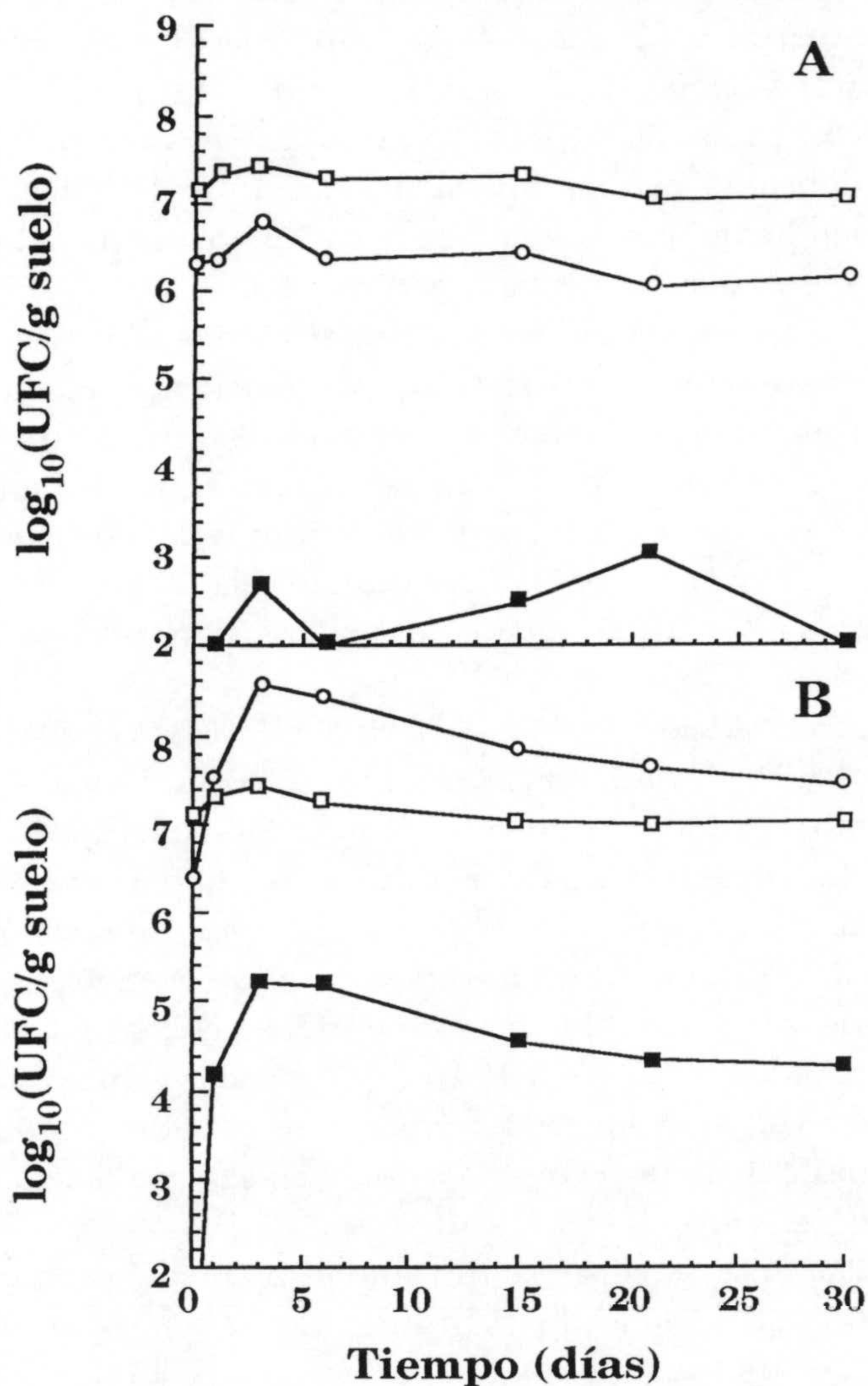


Figura 14. Transferencia génica de *P. putida* EEZ32 a *P. putida* UWC1 (pCC102) en suelo fluvisol

Noventa gramos de suelo fluvisol sin 3MB (A) o con 0,1% (p/p) de 3MB (B) se inocularon con una densidad celular inicial del orden de 10^6 - 10^7 UFC/g de suelo de la cepa donadora *P. putida* EEZ32 (círculos) y la cepa receptora *P. putida* UWC1 (pCC102) (cuadrados). Los transconjugantes fueron *P. putida* UWC1 (pCC102, pWW0-Tc) (cuadrados cerrados).

La co-transferencia del carácter fenotípico de utilización de 3MB y de resistencia a Tc confirman que en *P. putida* EEZ32 el plásmido TOL pWW0 es el portador del marcador de resistencia a Tc.

Se realizó otra serie de ensayos en suelo utilizando la cepa contenida biológicamente *P. putida* EEZ30 como cepa donadora y *P. putida* UWC1 (pCC102) como cepa receptora. El comportamiento de la cepa receptora fue similar tanto en ausencia (Fig 15A) como en presencia de 3MB (Fig. 15B). El número de bacterias aumentó durante los 3 primeros días y disminuyó posteriormente, lo cual fue mas notorio en ausencia de 3MB. En suelos no suplementados con 3MB el número de UFC de *P. putida* EEZ30 disminuyó constantemente a lo largo de todo el ensayo hasta alcanzar 5×10^3 UFC/g de suelo al final del ensayo (Fig 15A). En el suelo suplementado con 3MB el número de UFC/g de suelo de *P. putida* EEZ30 aumentó hasta alcanzar 6×10^8 UFC/g de suelo después de 5 días y disminuyó posteriormente hasta alcanzar alrededor de 1×10^7 UFC/g de suelo después de 30 días de incubación (Fig. 15B). El número de transconjugantes que recibieron el plásmido pWW0 siguió un perfil similar al descrito anteriormente con la cepa control, esto es, el número de transconjugantes/g de suelo no superó el valor de 1×10^3 UFC/g de suelo en ausencia de 3MB, mientras que en presencia del aromático el número se incrementó hasta valores de alrededor de 1×10^6 UFC/g de suelo. Sin embargo, en los microcosmos en los que *P. putida* EEZ30 fue la cepa donadora no se detectó ningún transconjugante capaz de crecer en medio mínimo M9 con 5 mM de 3MB suplementado con Rif, Km y Tc, indicando que en suelo, el plásmido pWW0 no movilizó, o lo hizo a muy baja frecuencia, el marcador cromosómico de resistencia a Tc portando la fusión $P_{Al-04/03}::gef$.

En los ensayos anteriores se evaluó el efecto que la introducción conjunta de *P. putida* UWC1 (pCC102) y *P. putida* EEZ30 ejercía sobre la población de bacterias indígenas del suelo. Para ello se determinó en cada una de las muestras el número de bacterias capaces de crecer en medio mínimo M9 con 5 mM de pOHFA como única fuente de carbono. El número de bacterias permaneció relativamente constante en el tiempo alrededor de los valores iniciales, 7×10^6 UFC/g de suelo (Tabla 10). Por tanto, la introducción de dos cepas conjuntamente en el suelo no afectó a la supervivencia de las bacterias capaces de degradar pOHFA.

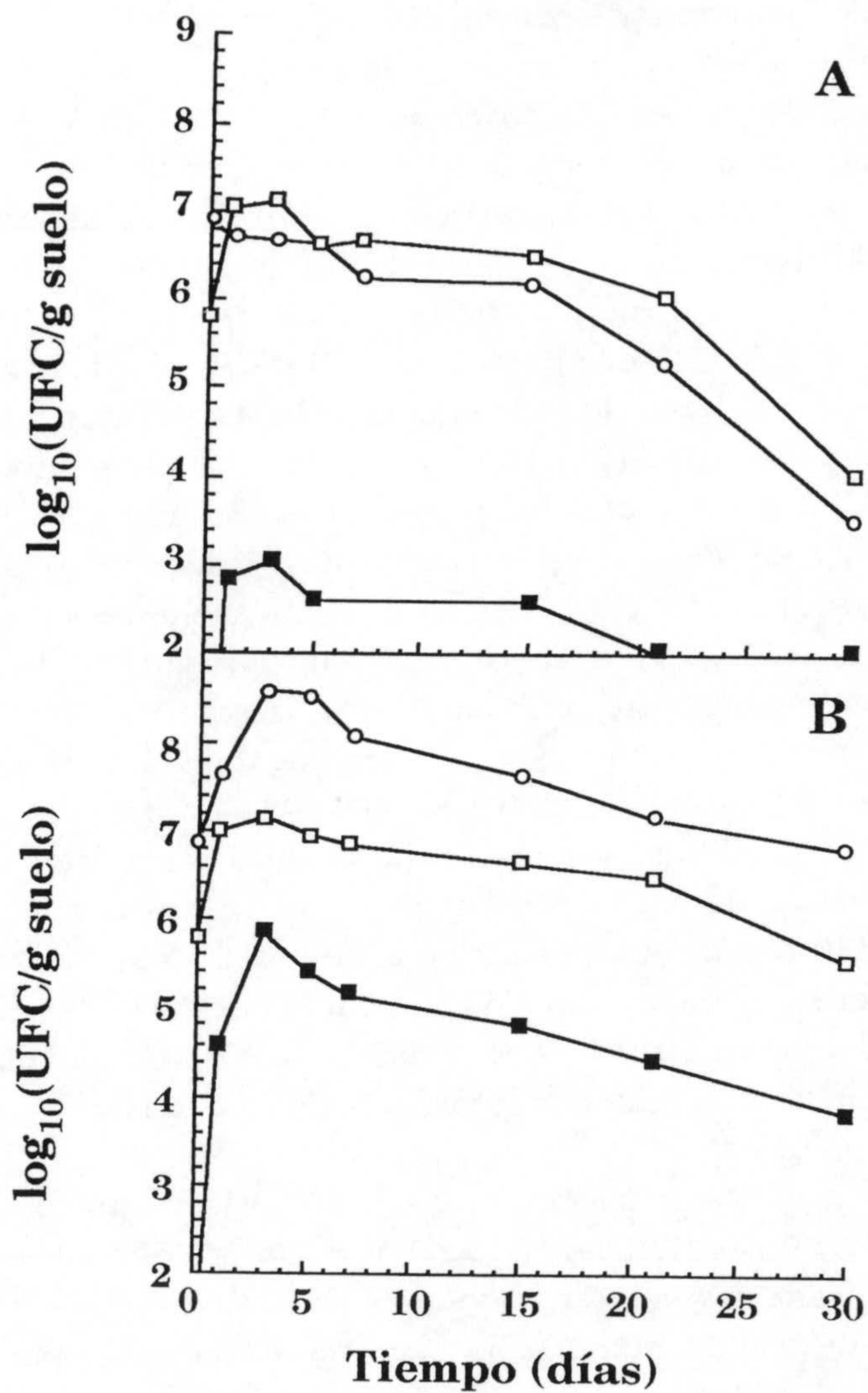


Figura 15. Transferencia génica de *P. putida* EEZ30 a *P. putida* UWC1 (pCC102) en suelo fluvisol

Las condiciones fueron las detalladas en la leyenda de la Figura 14, excepto que la cepa donadora fue *P. putida* EEZ30 (círculos), la cepa receptora fue *P. putida* UWC1 (pCC102) (cuadrados) y los transconjugantes fueron *P. putida* UWC1 (pCC102, pWW0) (cuadrados cerrados).

Tabla 10. Efecto de la introducción de *P. putida* EEZ30 y *P. putida* UWC1 (pCC102) sobre la población de bacterias indígenas capaces de utilizar *p*OHFA como única fuente de carbono

Las condiciones fueron las detalladas en la leyenda de la Figura 14. En las tomas de muestras indicadas se determinó la población de bacterias indígenas capaces de formar colonias en medio mínimo M9 con *p*OHFA como única fuente de carbono. Los valores se expresan como el \log_{10} del número de UFC/g de suelo.

Muestra (días)	-3MB	+3MB
0	6,93	6,93
7	6,66	6,67
14	6,88	6,90
21	6,81	6,76
30	6,70	6,72

4.4. Mineralización de *p*-metil- ^{14}C -benzoato por *P. putida* EEZ30 en suelo

Los resultados de los apartados anteriores sugerían que el sistema de contención biológica fue funcional en suelos, lo cual indicaba que el regulador XylS2 inducía la expresión desde el promotor P_m . Para confirmar esta hipótesis se estudió la mineralización en suelo de *p*-metil- ^{14}C -benzoato como desprendimiento de $^{14}\text{CO}_2$.

Para evitar interferencias con microorganismos indígenas del suelo capaces de mineralizar *p*-metilbenzoato estos ensayos se realizaron en suelos estériles. En suelo estéril, sin inocular con *P. putida* EEZ30, no se

detectó desprendimiento de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de *p*-metil- ^{14}C -benzoato durante el ensayo. Esto sugiere que el *p*-metil- ^{14}C -benzoato no se descarboxila espontáneamente tras su introducción en el suelo (Figura 16).

La cepa contenida *P. putida* EEZ30 se introdujo en el suelo a una densidad celular inicial del orden de 10^6 UFC/g de suelo. El suelo se suplementó con *p*-metil- ^{14}C -benzoato para alcanzar una actividad específica de $0,5 \mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ y una concentración de 0,01% (p/p). Tanto las bacterias como el compuesto radiactivo se mezclaron homogéneamente. La cantidad de $^{14}\text{CO}_2$ liberada se recogió como se describe en el apartado 13.1.2 de *Materiales y Métodos*. El desprendimiento de $^{14}\text{CO}_2$ fue lineal a lo largo del ensayo (Figura 16). Estos resultados sugieren el mantenimiento en estado metabólico activo de la cepa contenida biológicamente tras su introducción en suelos.

4.5. Supervivencia de *P. putida* EEZ30 y *P. putida* EEZ32 en suelo cambisol

Estos ensayos se realizaron para determinar la capacidad de supervivencia de las cepas en un suelo relativamente pobre en materia orgánica. Las características de este suelo se recogen en las Tablas 6 y 7 de *Materiales y Métodos*. Las cepas se inocularon a una densidad celular inicial de 10^6 UFC/g de suelo. Los microcosmos se suplementaron o no con 0,1% (p/p) de 3MB y se incubaron a $18 \pm 2^\circ\text{C}$.

En los suelos suplementados con 3MB el número de bacterias de ambas cepas aumentó durante los tres primeros días, disminuyendo posteriormente (Fig 17). En el caso de la cepa contenida biológicamente, *P. putida* EEZ30, el número de UFC aumentó hasta alcanzar 4×10^7 por g de suelo y disminuyó posteriormente hasta 8×10^5 UFC/g de suelo después de 30 días. El número de bacterias de la cepa sin el sistema de contención biológica, *P. putida* EEZ32, también aumentó hasta alcanzar 6×10^8 UFC/g de suelo y disminuyó ligeramente hasta 1×10^7 UFC/g de suelo al finalizar el experimento.

En suelos sin adición de 3MB, el número de UFC/g de suelo de *P. putida* EEZ30 disminuyó inmediatamente después de la inoculación, de manera que a las 24 horas de iniciado el ensayo, el número de UFC/g de suelo fue 2 órdenes de magnitud inferior (Fig. 17). Posteriormente el número se mantuvo relativamente constante durante una semana y, finalmente, se produjo una disminución progresiva con el tiempo, de forma que a los 30 días de iniciado el ensayo, el número de UFC/g de suelo estaba

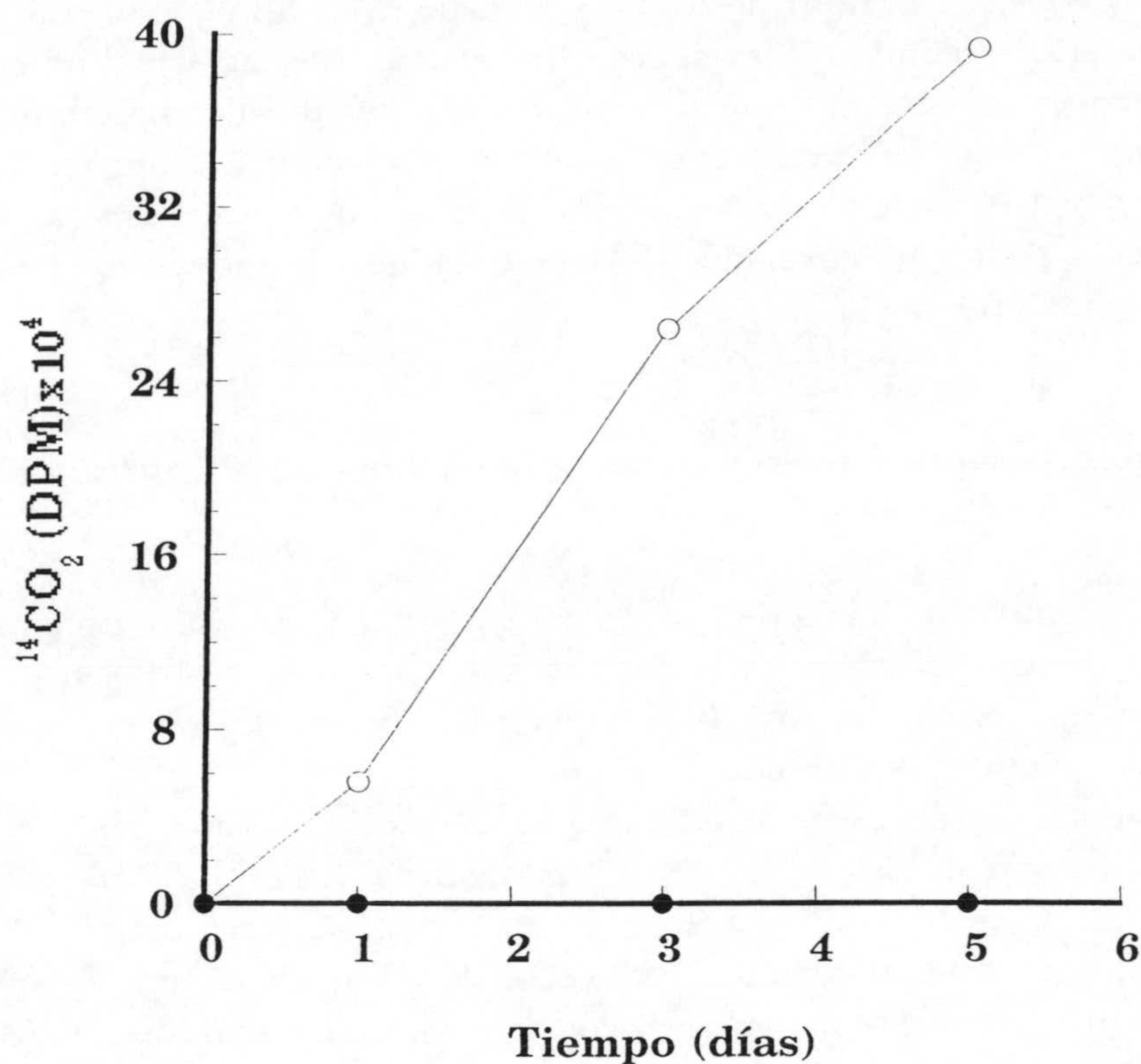


Figura 16. Desprendimiento de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de *p*-metil- ^{14}C -benzoato por *P. putida* EEZ30

Setenta g de suelo fluvisol estéril se colocaron en recipientes herméticos de 1 kg de capacidad y se inocularon (círculos abiertos) o no (círculos cerrados) con *P. putida* EEZ30 para alcanzar una densidad inicial del orden de 10^6 UFC/g de suelo. El suelo se suplementó con 0,01% (p/p) de *p*-metil- ^{14}C -benzoato (0,5 mCi/mmol) y el $^{14}\text{CO}_2$ desprendido se recogió en 20 ml de etanolamina. A los tiempos indicados se tomó 1 ml de la solución de etanolamina y se determinó el número de cuentas por minuto como se describe en el apartado 13.1.2 de *Materiales y Métodos*.

por debajo de nuestro límite de detección (1×10^2 UFC/g de suelo). El número de UFC/g de suelo de la cepa control, *P. putida* EEZ32, fue de alrededor de 5×10^6 UFC/g de suelo durante las dos primeras semanas y, luego disminuyó bruscamente, de forma que a los 30 días de iniciado el ensayo el número de bacterias fue del orden de 10^4 UFC/g de suelo.

También se evaluó en este tipo de suelo el efecto de la introducción de las bacterias recombinantes sobre la población de bacterias indígenas del suelo capaces de crecer en medio mínimo M9 con *pOHFA* como única fuente de carbono. El número de bacterias de esta población se mantuvo alrededor de 1×10^7 UFC/g de suelo durante los 30 días que duró el ensayo, tanto en presencia como en ausencia de 3MB e independientemente de la cepa introducida (Tabla 11).

5. Supervivencia en microcosmos acuáticos de *P. putida* EEZ30 y *P. putida* EEZ32

El comportamiento de las cepas contenida y control en microcosmos acuáticos se analizó utilizando dos tipos de aguas diferentes: aguas cristalinas del río Maitenas (Güejar Sierra, Granada) y aguas saladas del Océano Atlántico (El Rompido, Huelva).

Veinte mililitros de agua suplementados o no con 5 mM de 3MB se inocularon con alrededor de 10^6 UFC/ml de agua de la cepa correspondiente. Las muestras se incubaron a 20°C y 180 rpm en un incubador orbital. En general, se observó que las distintas cepas de *P. putida* no fueron capaces de establecerse en microcosmos acuáticos de agua dulce, siendo este efecto más acusado en microcosmos sin adición de 3MB (Tabla 12). En agua de mar el número de UFC/ml de agua disminuyó hasta niveles por debajo de nuestro límite de detección tras una semana de incubación independientemente de la cepa utilizada y del suplemento con 3MB (datos no mostrados).

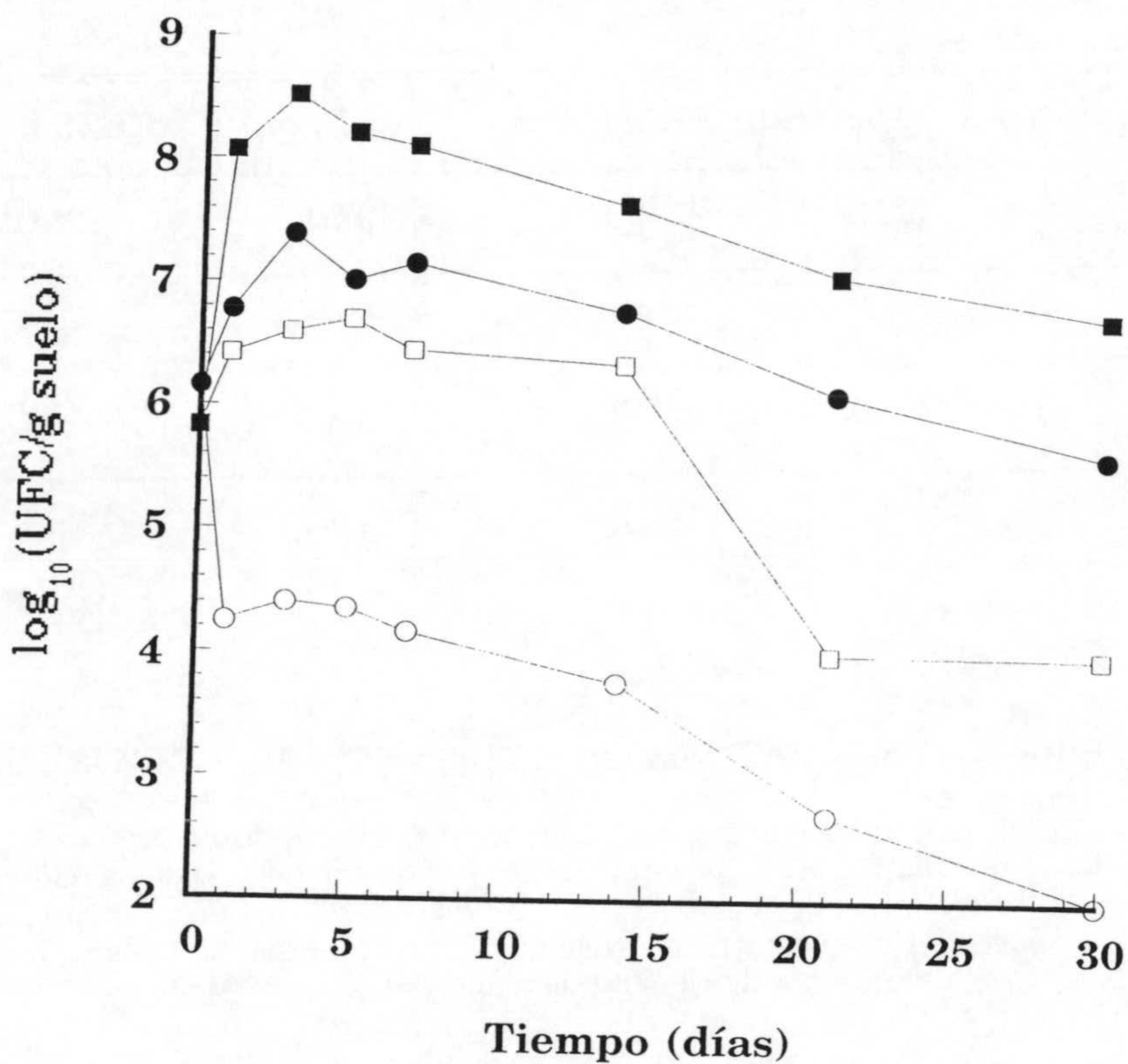


Figura 17. Supervivencia de *P. putida* en suelo cambisol

Alrededor de 10^6 UFC/g de suelo de *P. putida* EEZ30 (círculos) o *P. putida* EEZ32 (cuadrados) se inocularon en 90 g de suelo cambisol suplementado (símbolos cerrados) o no (símbolos abiertos) con 0,1% (p/p) de 3MB. A los tiempos indicados se determinó el número de UFC/g de suelo en medio selectivo.

Tabla 11. Efecto de la introducción de *P. putida* EEZ30 y *P. putida* EEZ32 sobre la población de bacterias indígenas de un suelo cambisol capaces de utilizar pOHFA como única fuente de carbono

Las condiciones fueron las detalladas en la leyenda de la Figura 17, excepto que se determinó el número de UFC/g de suelo de bacterias capaces de utilizar pOHFA como única fuente de carbono. Los valores se expresan como el \log_{10} del número de UFC/g de suelo.

Muestra (días)	<i>P. putida</i> EEZ30		<i>P. putida</i> EEZ32	
	-3MB	+3MB	-3MB	+3MB
0	6,65	6,65	6,65	6,65
30	6,69	6,98	6,38	6,97

Tabla 12. Supervivencia de *P. putida* EEZ30 y *P. putida* EEZ32 en agua del río Maitena

Veinte mililitros de agua del río Maitena suplementados o no con 3MB se inocularon con *P. putida* EEZ30 o *P. putida* EEZ32 para alcanzar una densidad celular inicial de 1×10^6 UFC/ml de agua. Tras 15 días de incubación se determinó el número de bacterias capaces de crecer en medio selectivo. Los números iniciales y finales se expresan como \log_{10} del número de UFC/ml de agua.

Cepa	-3MB		+3MB	
	Inicial	Final	Inicial	Final
<i>P. putida</i> EEZ32	6,0	3,0	6,0	4,8
<i>P. putida</i> EEZ30	6,0	1,8	6,0	4,2

II. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES RESISTENTES A LA ACCIÓN DE LA PROTEÍNA Gef EN *Escherichia coli*

Los sistemas de contención biológica no escapan a la premisa universal de todo sistema génico: la aparición de mutantes. De hecho, tanto en cepas de *E. coli* como de *P. putida* portando un sistema de contención, siempre se produce la aparición de una subpoblación celular que escapa a la inducción de la muerte celular (Molin *et al.*, 1993). El fenotipo de resistencia podría explicarse por la aparición de varios tipos de mutaciones: mutaciones en el gen *matador* que rinden un producto génico inactivo, mutaciones que resultan en la ausencia de la expresión del gen *matador* (LacI superrepressor o mutaciones en el promotor) o mutaciones que, sin afectar directamente a los elementos del sistema de contención biológica, eviten la muerte celular inducida por la proteína *matadora*.

En relación con la última posibilidad, hasta la fecha se ha aislado y caracterizado únicamente un mutante resistente a la acción de la proteína Gef (Gef^R) en una cepa de *E. coli* portando un sistema de contención biológica basado en el gen *gef*. El fenotipo de resistencia de este mutante, que presenta una alteración estructural en la membrana plásmatica, se debe a la aparición de al menos dos mutaciones cromosómicas independientes (Poulsen *et al.*, 1992). La aparición de mutaciones asociadas directamente al gen *gef* o a la expresión del mismo, se produce con una frecuencia de aproximadamente 10^{-6} por célula y por generación (Contreras *et al.*, 1991). Sin embargo, la naturaleza molecular de este tipo de mutaciones no se ha analizado hasta la fecha.

En este capítulo se describe el aislamiento y la caracterización de mutantes de una cepa de *E. coli* portadora de un sistema de contención biológica basado en el gen *gef*, que escapan a la muerte celular. Con objeto de facilitar la identificación de mutaciones asociadas directamente al elemento *matador*, se partió de una cepa de *E. coli* JM109, portadora de la fusión P_{A1-04/03}::*gef* en el plásmido pMCC22 (Figura 6).

1. Aislamiento de mutantes de *E. coli* JM109 (pMCC22) que escapan a la lisis tras la inducción de la expresión del gen *gef*

La cepa contenida *E. coli* JM109 (pMCC22) y la cepa control *E. coli* JM109 (pUEH24-1) se inocularon en medio LB suplementado con Ap. Cuando los cultivos alcanzaron una DO_{660} de aproximadamente 0,3, cada uno de ellos se dividió en dos fracciones alícuotas, y a una de ellas se añadió 10 mM de IPTG, con objeto de liberar la proteína LacI del promotor $P_{A1-04/03}$ y permitir la expresión del gen *gef*.

En ausencia de IPTG, tanto la DO_{660} del cultivo de la cepa control como la del cultivo de la cepa contenida aumentó progresivamente durante las 24 horas que duró el ensayo (Fig. 18). En presencia de IPTG, la DO_{660} del cultivo de la cepa control aumentó de forma similar a la del cultivo de esta cepa en ausencia de IPTG. Sin embargo, la turbidez del cultivo de la cepa contenida disminuyó progresivamente tras la adición de IPTG hasta alcanzar una DO_{660} de 0,1 tras 7 horas en presencia del inductor (Fig. 18). Aproximadamente 8 horas después de la adición de IPTG, la DO_{660} de este cultivo comenzó a aumentar hasta alcanzar un valor de 2,5 quince horas más tarde (Fig. 18). Este aumento en la DO_{660} del cultivo de la cepa contenida podría deberse bien al crecimiento de mutantes en alguno de los elementos del sistema de contención, o bien al crecimiento de células que tras haber perdido el plásmido portador del elemento *matador*, crecerían si la ampicilina adicionada al medio de cultivo se hubiese inactivado.

Para discernir entre estas dos posibilidades se sembraron diluciones seriadas a partir del cultivo de *E. coli* JM109 (pMCC22) con IPTG en medio LB y medio LB suplementado con ampicilina. Mientras que en medio LB se detectaron 1×10^9 CFU/ml, el número de células capaces de crecer en medio LB suplementado con Ap fue un orden de magnitud inferior. Este resultado sugiere la pérdida de la resistencia a Ap, asociada a la pérdida del plásmido pMCC22, en un 10% de la población celular. El 100% de las colonias aisladas en medio LB suplementado con Ap crecieron también en medio LB suplementado con Ap e IPTG, sugiriendo que el resto de las células presentes en el cultivo eran mutantes resistentes a la acción lítica de la proteína Gef.

Con el objeto de aislar mutaciones independientes, 6 colonias diferentes de *E. coli* JM109 (pMCC22) se inocularon en medio LB suplementado con Ap e IPTG. Tras 24 horas de incubación se realizaron diluciones seriadas a partir de estos cultivos en medio LB suplementado con Ap e IPTG. De cada uno de los cultivos se seleccionó una colonia capaz de

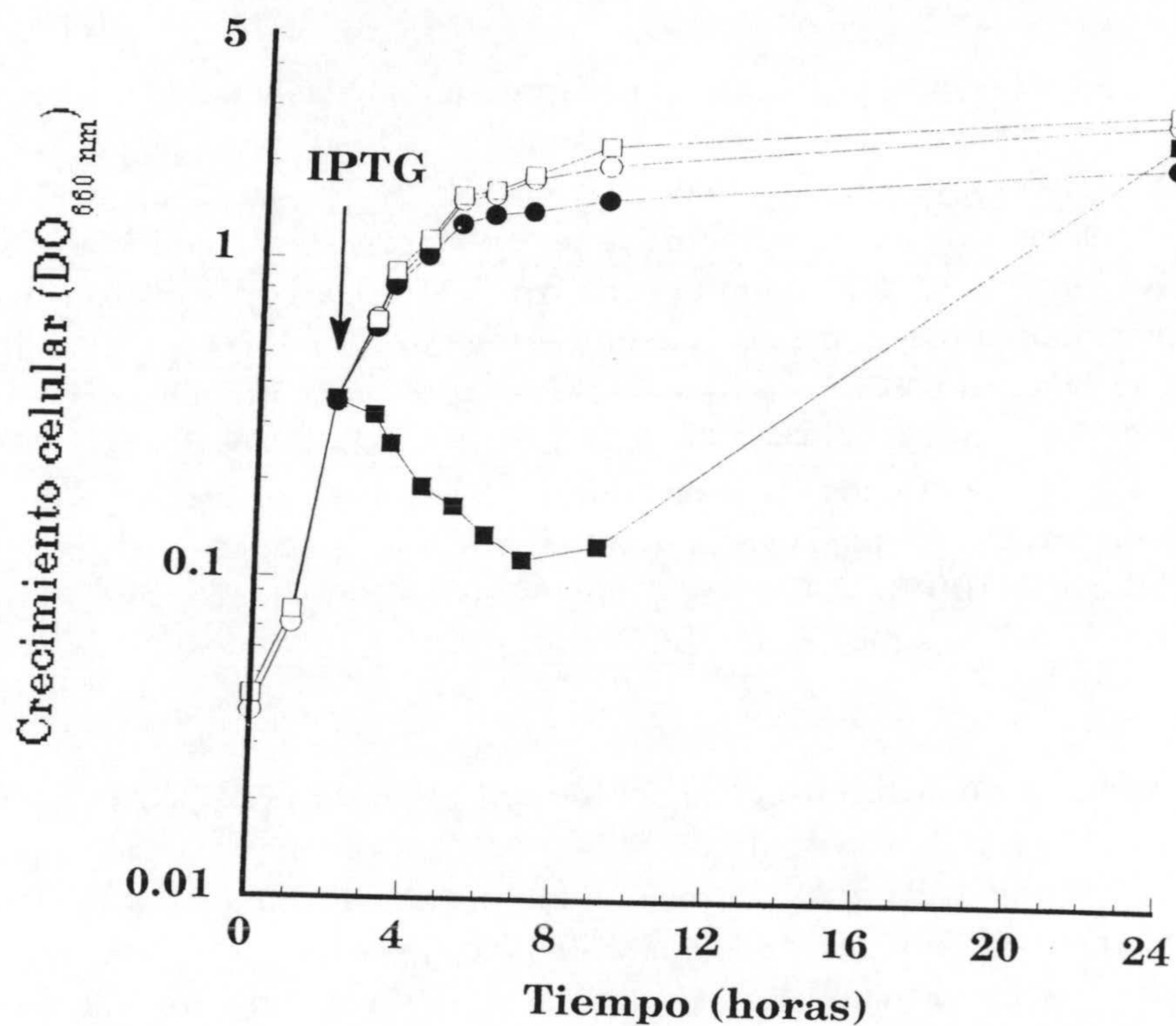


Figura 18. Crecimiento de *E. coli* JM109 (pMCC22) y *E. coli* JM109 (pUHE24-1) en presencia y ausencia de IPTG

E. coli JM109 (pMCC22) (cuadrados) y *E. coli* JM109 (pUHE24-1) (círculos) se cultivaron en medio líquido LB-Ap hasta alcanzar una DO₆₆₀ de 0,3. En ese momento, cada cultivo se dividió en dos fracciones alícuotas, a una de ellas se le añadió IPTG para alcanzar una concentración final de 10 mM (símbolos cerrados) y la otra se utilizó como control (símbolos abiertos). A los tiempos indicados se determinó la DO₆₆₀ de los cultivos.

crecer en dicho medio para su posterior caracterización. Las cepas seleccionadas se denominaron de JM109-1 a JM109-6.

2. Caracterización de los mutantes de *E. coli* JM109-1 a JM109-6 resistentes a la lisis

Con el objeto de identificar las mutaciones asociadas directamente al elemento *matador*, se aisló ADN plasmídico de cada uno de los 6 mutantes seleccionados y se transformó en *E. coli* JM109.

Los transformantes obtenidos se replicaron en medio LB suplementado con Ap y medio LB suplementado con Ap e IPTG. Las cepas transformadas con los plásmidos procedentes de los mutantes *E. coli* JM109-3 y *E. coli* JM109-4, denominados pMCC22-3 y pMCC22-4 respectivamente, crecieron en medio con IPTG, lo que sugería que la mutación estaba asociada al plásmido pMCC22. El resto de los transformantes crecieron en medio sin IPTG, pero no en su presencia, lo que sugería que la mutación presente en las cepas *E. coli* JM109-1, JM109-2, JM109-5 y JM109-6 se localizaba en un replicón distinto al del plásmido pMCC22.

2.1. Análisis de mutaciones asociadas al plásmido pMCC22

Con objeto de analizar las mutaciones responsables del fenotipo Gef^R de las cepas *E. coli* JM109-3 y *E. coli* JM109-4 se aisló ADN plasmídico de dichas cepas, y la fusión P_{A1-04/03}::*gef* se amplificó mediante PCR, tal y como se describe en el apartado 10.6 de *Materiales y Métodos*, usando los oligonucleótidos OCM13 y OCM14. La secuenciación de los fragmentos de ADN resultantes reveló que tanto en el plásmido pMCC22-3 como en el plásmido pMCC22-4 se había producido una deleción de 32 pb en la región promotor/operador, la cual incluía la caja -10 y el sitio de iniciación de la transcripción (+1) (Fig.19).

2.2. Análisis de mutaciones no asociadas al plásmido pMCC22

En principio, se dislumbraron dos tipos diferentes de mutaciones que sin estar asociadas al plásmido pMCC22 podrían ser responsables del fenotipo Gef^R de las cepas *E. coli* JM109-1, JM109-2, JM109-5 y JM109-6:

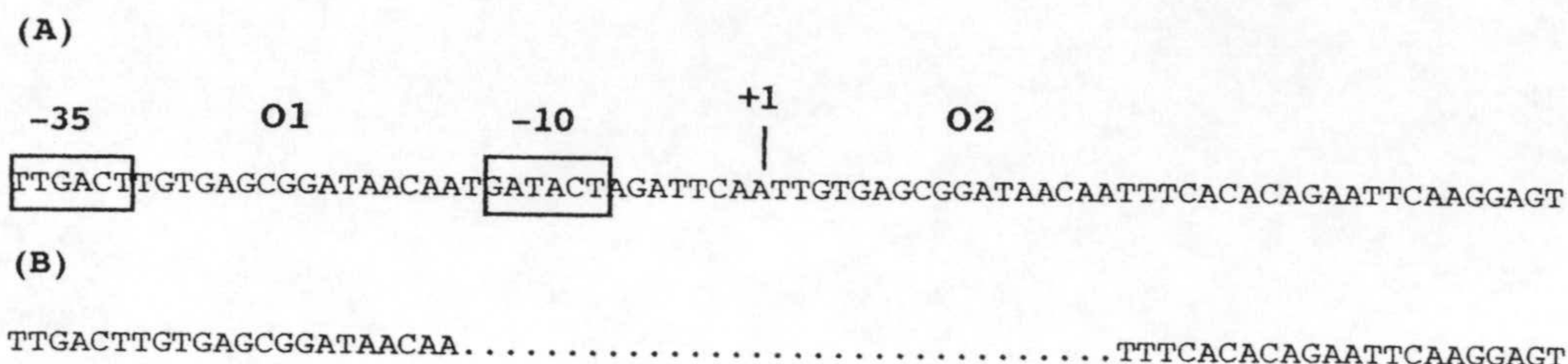


Figura 19. Esquema de la región promotor/operador del promotor $P_{A1-04/03}$ en la cepa *E. coli* JM109 (pUHE24-1) y en los mutantes *E. coli* JM109-3 y *E. coli* JM109-4

Se indica el punto de iniciación de la transcripción (+1) y las cajas -35 y -10 del promotor $P_{A1-04/03}$. Las secuencias en rojo (O1 y O2) indican los dos operadores presentes en el promotor. (A) secuencia silvestre del promotor, (B) secuencia de la región promotor/operador en los mutantes *E. coli* JM109 (pMCC22-3) y *E. coli* JM109 (pMCC22-4).

i) mutaciones en el gen *lacI* que condujesen a la síntesis de una proteína $LacI^S$, ii) mutaciones cromosómicas en un locus diferente a *lacI*.

Para distinguir entre estas opciones, se prepararon células competentes de las 4 cepas mencionadas, y se transformaron con el plásmido pJB3KmD. Este plásmido codifica un péptido de 99 aminoácidos de la región amino terminal de la β -galactosidasa, que se expresa desde el promotor del operón de la lactosa, P_{lac} , y que complementa la actividad β -galactosidasa en cepas que portan la delección *lacZ* Δ M15. Cepas de *E. coli* JM109 transformadas con este plásmido adquieren una coloración azul en medio sólido LB suplementado con IPTG y X-gal. Sin embargo si la cepa de *E. coli* JM109 transformada portase una proteína $LacI^S$, las colonias serían de color blanco, ya que la proteína $LacI^S$ se uniría al operador no permitiendo la transcripción del péptido de 99 aminoácidos y, como consecuencia, la cepa carecería de actividad β -galactosidasa.

Las cepas *E. coli* JM109-1, JM109-2, JM109-5 y JM109-6 transformadas con el plásmido pJB3KmD resultaron ser de color blanco en

Resultados

medio sólido LB suplementado con Ap, Km, IPTG y X-gal, indicando que en todas ellas el fenotipo Gef^R se debe a una mutación en el gen *lacI* que conduce a la síntesis de una proteína LacI^S.

III. CONSTRUCCIÓN DE UNA CEPA CONTENIDA DE *Pseudomonas putida* PORTADORA EN EL CROMOSOMA DE LOS ELEMENTOS REGULADOR Y MATADOR

El aislamiento y caracterización de los mutantes, descritos en el capítulo anterior, reveló la existencia de al menos dos tipos de mutaciones que conducen a "escape" en el sistema de contención: mutaciones en el gen *lacI* responsables de la síntesis de superrepresores ($LacI^S$), y deleciones localizadas en el promotor $P_{A1-04/03}$.

Como se describió en el capítulo I de esta sección, el sistema de contención biológica presente en la cepa *P. putida* EEZ30, se inactiva con una frecuencia de alrededor de 10^{-6} por célula y por generación. El elemento regulador de este sistema de contención está compuesto por el gen *xyIS2* y la fusión $P_m::lacI$, y se localiza en el plásmido pCC102, un derivado del plásmido pKT231 (Contreras *et al.*, 1991). Dado que el número de copias de este plásmido en *Pseudomonas putida* se ha estimado en 15-20 copias por célula (Bagdasarian *et al.*, 1981), *P. putida* EEZ30 debe contener un número de copias equivalente del gen *lacI*. Con el objeto de disminuir la dosis de *lacI* y, en consecuencia, la probabilidad de que apareciesen mutantes $LacI^S$, se decidió construir una cepa contenida de *P. putida* portadora de una sola copia del gen *lacI*. Para ello, y como se describe en este capítulo, el elemento regulador se integró junto con el elemento *matador* en el cromosoma de *P. putida* KT2440.

En el capítulo siguiente, se describirá la estrategia seguida con el fin de disminuir la frecuencia de aparición de mutantes Gef^R con mutaciones en el promotor $P_{A1-04/03}$.

1. Construcción de la cepa contenida *P. putida* CMC4 (pWW0)

El grupo del Profesor Søren Molin, de la Universidad Técnica de Dinamarca, con el que este grupo de investigación ha colaborado estrechamente en los últimos 6 años vía proyectos europeos, construyó el plásmido pSM1350, el cual contenía los componentes del elemento regulador y del *matador* (el gen *xyIS*, la fusión $P_m::lacI$ y la fusión $P_{A1-04/03}::gef$) clonados en el mini-transposón (mini-Tn5/Km) presente en dicho plásmido.

La inserción en el cromosoma de *P. putida* del mini-Tn5/Km que contiene el gen *xylS*, y las fusiones $P_m::lacI$ y $P_{A1-04/03}::gef$ se realizó mediante conjugación tripartita entre *P. putida* KT2440 como cepa receptora, *E. coli* CC118 λ *pir* (pSM1350) como cepa donadora y *E. coli* HB101 (RK600) como cepa auxiliar. Los transconjugantes, seleccionados en medio mínimo M9 con 5 mM de Bz como única fuente de carbono y suplementado con Km y 5 mM de 3MB, aparecieron con una frecuencia del orden de 10^{-7} transconjugantes por receptor. El 3MB se utilizó como inductor gratuito de XylS, ya que al carecer la cepa del plásmido pWW0, ésta no puede utilizar 3MB como fuente de carbono.

La eficiencia del sistema de contención integrado en el cromosoma de *P. putida* se ensayó en primer lugar en medio sólido. Para ello los transconjugantes se estriaron en dos medios diferentes: medio mínimo M9 con 5 mM de Bz como única fuente de carbono y suplementado con Km y 5 mM de 3MB, y medio mínimo M9 con 0,5% (p/v) de glucosa como única fuente de carbono y suplementado con Km y 2 mM de IPTG. Los transconjugantes con el elemento *matador*/regulador integrado en el cromosoma no formaron colonias en medio con glucosa e IPTG y sí en medio con Bz. De todos los transconjugantes con este comportamiento se seleccionó uno al azar como nueva cepa contenida y se denominó *P. putida* CMC4.

Con el objeto de transferir el plásmido TOL pWW0 a la nueva cepa se realizó una conjugación bipartita entre *P. putida* CMC4 como cepa receptora y *P. putida* KT2440 (pWW0) como cepa donadora. Los transconjugantes, seleccionados en medio mínimo M9 con 5 mM de 3MB como única fuente de carbono suplementado con Km, aparecieron con una frecuencia de 8×10^{-1} por receptor. Entre los transconjugantes se seleccionó uno al azar al que se denominó *P. putida* CMC4 (pWW0).

La frecuencia de movilización del mini-Tn5/Km por el plásmido TOL pWW0 se estimó como se describe a continuación. Se realizó una conjugación bipartita utilizando como cepa receptora *P. putida* UWC1 y como cepa donadora *P. putida* CMC4 (pWW0). La frecuencia de aparición de transconjugantes de *P. putida* UWC1 que habían recibido el plásmido TOL pWW0 fue de 2×10^{-1} transconjugantes por receptor. Mientras que la frecuencia de transconjugantes de *P. putida* UWC1 capaces de crecer en medio mínimo M9 con 5 mM de 3MB como única fuente de carbono suplementado con Rif y Km fue inferior a 4×10^{-7} transconjugantes por receptor. Estos resultados sugerían que el marcador cromosómico de resistencia a Km en *P. putida* CMC4 (pWW0) se había integrado en un lugar de baja movilización.

Como cepa control de la cepa contenida *P. putida* CMC4 (pWW0) se utilizó la cepa *P. putida* EEZ15K-3 (pWW0) (Ramos-González *et al.*, 1994). Dicha cepa posee un mini-Tn5/Km insertado en el cromosoma. Dicho mini-transposón se movilizó con una frecuencia inferior a 1 en 10^8 transconjugantes por receptor.

2. Caracterización de las cepas contenida y control

2.1. Estabilidad de la inserción cromosómica

La estabilidad del marcador cromosómico, mini-Tn5/Km, en *P. putida* CMC4 (pWW0) se ensayó como se describió en el apartado 9 de *Materiales y Métodos*. También en este caso, la inserción cromosómica fue estable, ya que tras cultivar la cepa durante 50 generaciones en ausencia de Km no se detectó pérdida del marcador de resistencia al antibiótico.

En la cepa control Ramos-González *et al* (1994) habían demostrado que la inserción del mini-Tn5/Km era estable en su localización física en el cromosoma.

2.2. Tasa de mutación del sistema de contención biológica en *P. putida* CMC4 (pWW0)

La tasa de mutación por célula y por generación de la cepa *P. putida* CMC4 (pWW0) se estimó utilizando una modificación del método descrito por Luria y Delbück (1943), tal y como se describe en el apartado 12 de *Materiales y Métodos*.

Después de la incubación, aparecieron colonias en 17 de las 18 cajas, y el número total de células fue de 2×10^7 UFC/ml de cultivo. Según estos datos la tasa de mutación del sistema de contención de *P. putida* CMC4 (pWW0) fue del orden de 10^{-7} - 10^{-8} por célula y por generación. Esta tasa supone una disminución de 1 orden de magnitud, respecto al sistema de contención descrito en el capítulo I de la sección *Resultados*.

2.3. Supervivencia de las cepas en presencia y ausencia de 3MB

Estos ensayos se realizaron para determinar el comportamiento de las cepas contenida, *P. putida* CMC4 (pWW0), y control, *P. putida* EEZ15K-3

(pWW0), tras la inducción de la expresión del gen *matador*, tanto en presencia como en ausencia de 3MB en condiciones estándar de cultivo en el laboratorio.

Se partió de un preinóculo de cada una de las cepas en medio mínimo M9 con 15 mM de 3MB como única fuente de carbono suplementado con Km. Las células se recogieron por centrifugación, se lavaron 2 veces en tampón 1 x M9 y se resuspendieron en medio mínimo M9 suplementado con Km para alcanzar una turbidez inicial de 0.02 a 660nm. El cultivo se dividió en tres fracciones alícuotas que se suplementaron con: 15 mM de 3MB como única fuente de carbono, con 0,5% (p/v) de glucosa como única fuente de carbono o con 0,5% (p/v) de glucosa como única fuente de carbono más 2 mM de IPTG, respectivamente. A lo largo del tiempo se determinó la turbidez de los cultivos. La turbidez de los cultivos de la cepa no contenida biológicamente, *P. putida* EEZ15K-3 (pWW0), aumentó en los tres medios de forma similar (Fig. 20A). Sin embargo, el comportamiento de la cepa contenida, *P. putida* CMC4 (pWW0), fue diferente en presencia y en ausencia de 3MB (Fig. 20B). En presencia de 3MB la turbidez del cultivo aumentó de forma similar a la del cultivo de la cepa no contenida. En presencia de glucosa e IPTG no se observó variación en la turbidez del cultivo durante las 22 horas que duró el ensayo. En el medio con glucosa, se observó una fase de latencia de 3 horas, probablemente como consecuencia del cambio de medio, posteriormente la DO_{660} aumentó de manera que a las 9 horas de iniciado el ensayo la turbidez del cultivo fue de 0,2 y a partir de este momento se mantuvo constante hasta el final del ensayo.

3. Caracterización de la lisis celular en *P. putida* CMC4 (pWW0)

El mecanismo de lisis celular tras la inducción de la expresión de genes de la familia *gef* se ha estudiado en detalle en *E. coli*. Tras la síntesis de las proteínas de esta familia se produce el colapso del potencial de membrana y una disminución en el consumo de oxígeno (Gerdes *et al.*, 1986b), además tiene lugar un influjo de la enzima periplásmica RNasal y un incremento en la permeabilidad de la membrana a iones Mg^{2+} (Ito y Ohnishi, 1983). Aunque se ha descrito que algunos de los genes pertenecientes a esta familia son funcionales en *Pseudomonas*, hasta la fecha el proceso de lisis celular en este microorganismo no se ha caracterizado. En los apartados siguientes de este trabajo se presentan los ensayos realizados para caracterizar la lisis celular en *P. putida* CMC4 (pWW0) tras la inducción de la expresión del gen *gef*.

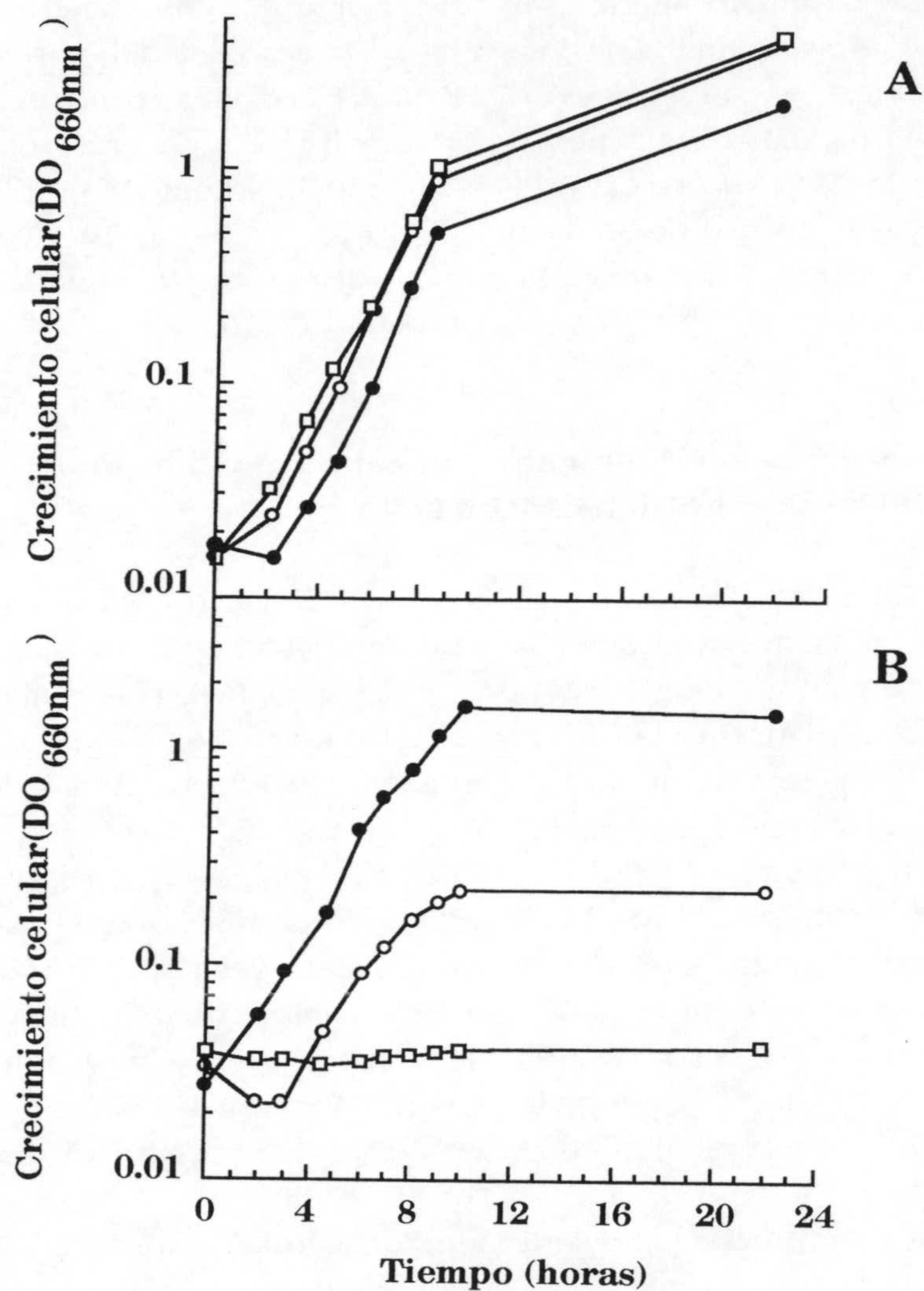


Figura 20. Crecimiento en medio líquido de cepas de *P. putida* portando o no un sistema de contención biológica en el cromosoma

El crecimiento de *P. putida* EEZ15K-3 (pWW0) (A) y *P. putida* CMC4 (pWW0) (B) se determinó en medio mínimo M9 con Km a los que se añadió: 0,5% (p/v) de glucosa (círculos abiertos); 0,5% (p/v) de glucosa y 2 mM de IPTG (cuadrados abiertos); y, 15 mM de 3MB (círculos cerrados).

Para la realización de todos los ensayos que se describen a continuación se partió de un preinóculo de la cepa *P. putida* CMC4 (pWW0) cultivado en medio mínimo M9 con 15 mM de 3MB como única fuente de carbono suplementado con Km. Cuando la turbidez del cultivo alcanzó una DO_{660} de 0,2, el cultivo se dividió en dos fracciones alícuotas. Las células de cada una de ellas se recogieron por centrifugación, se lavaron dos veces en tampón 1 x M9 y se resuspendieron en medio mínimo M9 suplementado con Km, una con 15 mM de 3MB como única fuente de carbono y otra con 0,5% (p/v) de glucosa como única fuente de carbono suplementado con 5 mM de IPTG.

3.1. Determinación del número de células viables de *P. putida* CMC4 (pWW0) tras la expresión del gen de lisis

Este ensayo se realizó para determinar si tras la expresión del gen *matador* se producía un descenso en el número de células viables. El ensayo se realizó en condiciones estándar, y periódicamente se tomaron muestras para determinar tanto la turbidez de los cultivos como el número de células viables. Éstas se determinaron sembrado diluciones seriadas de los cultivos en cajas de medio LB con 5 mM de 3MB suplementado con Km.

En presencia de 3MB el número de células viables aumentó desde 1×10^6 hasta 2×10^7 UFC/ml a las 7 horas de iniciado el ensayo (Fig. 21A). Del mismo modo la DO_{660} del cultivo aumentó desde una turbidez inicial de 0,16 hasta un valor próximo a 2 en ese mismo periodo de tiempo (Fig. 21A). En presencia de glucosa e IPTG, el número de células viables disminuyó desde 5×10^6 hasta 1×10^3 a las 7 horas después de la adición del inductor (Fig. 21B). En este medio la turbidez del cultivo permaneció inalterada (Fig. 21B).

La disminución en el número de células viables en presencia de glucosa e IPTG indica que, como era de esperar, la expresión del gen *matador* en *P. putida* conduce a la muerte celular.

3.2. Liberación de proteínas de células de *P. putida* CMC4 (pWW0) tras la expresión del gen de lisis

Con objeto de determinar si tras la expresión del gen de lisis se producía la liberación de proteínas al medio, sobrenadantes de los cultivos

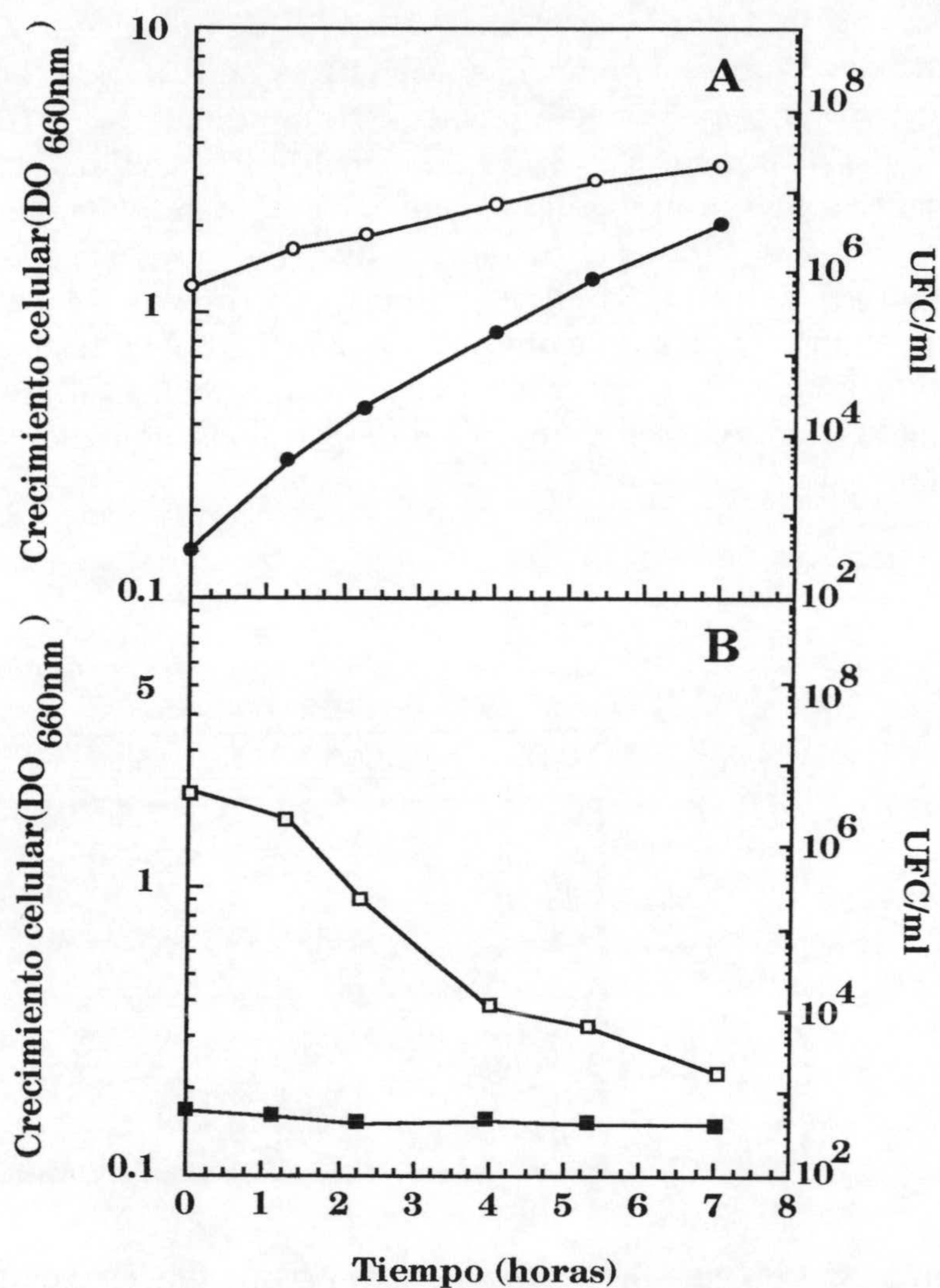


Figura 21. Conteo de células viables tras la expresión del gen de lisis en *P. putida* CMC4 (pWW0)

Células de *P. putida* CMC4 (pWW0) cultivadas en medio mínimo M9 con 3MB y Km hasta alcanzar una DO₆₆₀ de 0,2-0,3, se recogieron por centrifugación, se lavaron en tampón 1 x M9 y se dividieron en dos fracciones alícuotas, una con 15 mM de 3MB y Km (A) y otra con 0,5% (p/v) de glucosa como única fuente de carbono suplementada con 5 mM de IPTG y Km (B). A los tiempos indicados se determinó la DO₆₆₀ (símbolos cerrados) y el número de células viables de los cultivos (símbolos abiertos).

en los que se había inducido la expresión de la proteína Gef se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS como se describe en el apartado 11.4 de *Materiales y Métodos*. Como control se usaron sobrenadantes de cultivos de *P. putida* CMC4 (pWW0) sin inducir. Una hora y media después de la adición de IPTG se observó la aparición de proteínas en el medio de cultivo. La cantidad total de proteína aumentó con el tiempo como se dedujo de la intensidad de las bandas en los geles (Fig. 22). Este resultado indica que tras la inducción de la expresión del gen *gef* en los cultivos de *P. putida* CMC4 (pWW0), se produce liberación de proteínas al medio como consecuencia de la lisis celular. En los sobrenadantes de los cultivos en los que no se había inducido la expresión del gen *gef* no se observó liberación de proteínas al medio de cultivo (datos no mostrados).

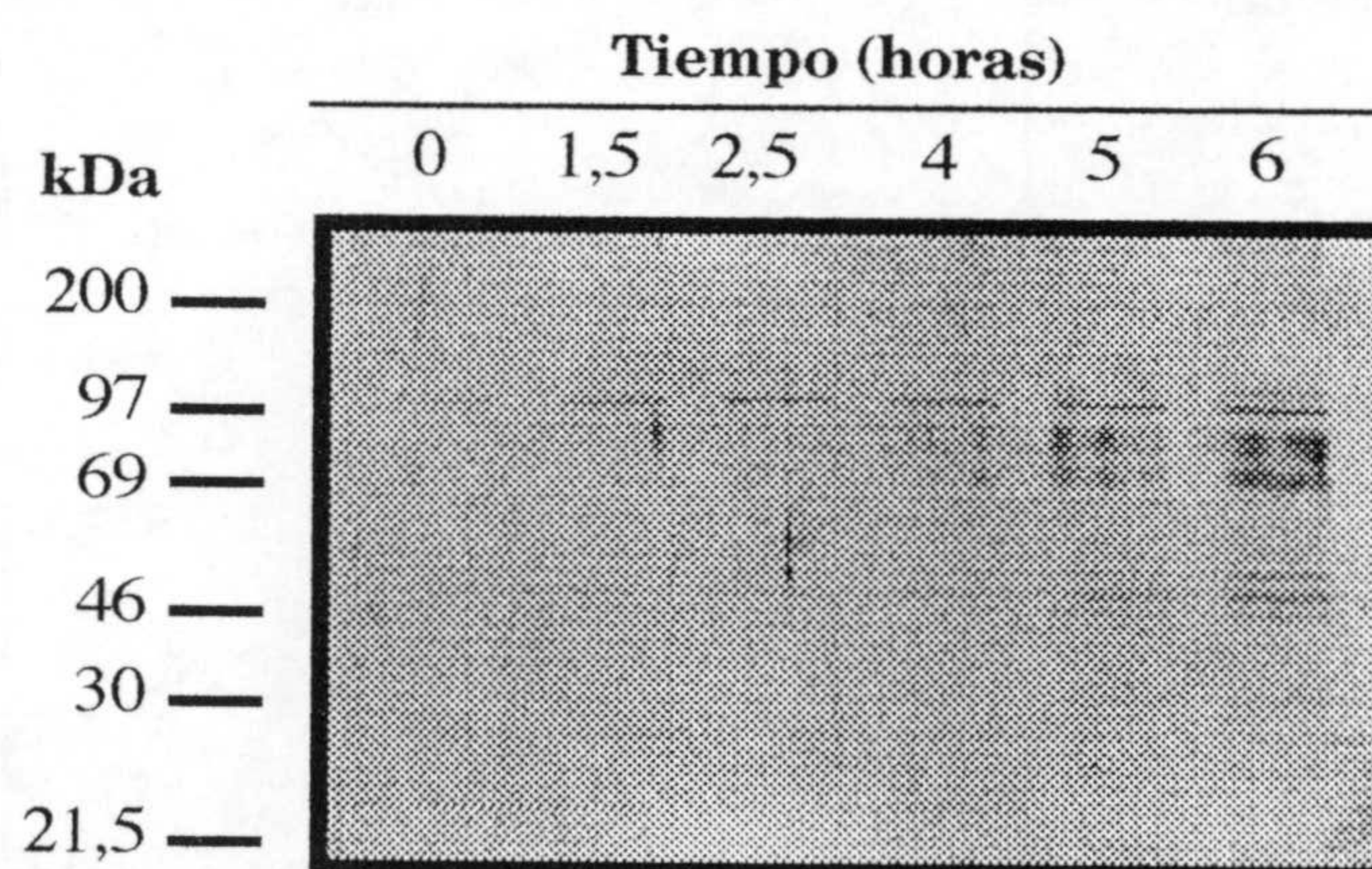


Figura 22. Liberación de proteínas de *P. putida* CMC4 (pWW0) tras la expresión del gen *matador*

La expresión del gen *matador* en *P. putida* CMC4 (pWW0) se realizó como se describe en la leyenda de la Figura 21. Tras separar las células por centrifugación, los sobrenadantes se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS y se visualizaron con nitrato de plata, tal y como se describe en *Materiales y Métodos*.

3.3. Eflujo de $^{86}\text{Rb}^+$ desde células de *P. putida* CMC4 (pWW0) tras la expresión del gen *gef*

Como consecuencia de la desestabilización de la membrana celular debida a la inserción de porinas, se produce pérdida de iones potasio desde el citoplasma celular (Witte *et al.*, 1989). El transporte y eflujo de iones potasio se suele analizar estudiando el transporte y el eflujo de $^{86}\text{Rb}^+$, el cual es transportado al citoplasma celular y extruido de él por el mismo transportador que el potasio (Lester 1958; Bhattacharyya *et al.*, 1971; Lombardi *et al.*, 1973). El eflujo de $^{86}\text{Rb}^+$ tras la adición de IPTG a un cultivo de *P. putida* CMC4 (pWW0) se analizó como se describe en el apartado 11.5 de *Materiales y Métodos*. *P. putida* CMC4 (pWW0) se cultivó en presencia de $^{86}\text{Rb}^+$ durante 1 hora, posteriormente las células se lavaron en tampon 1 x M9 y se resuspendieron en medio mínimo M9 con 3MB suplementado con Km o medio mínimo M9 con glucosa suplementado con IPTG y Km. La radiactividad remanente en las células se determinó 2 y 3 horas después de la adición del inductor (Tabla 13). En ambos casos se observó liberación de $^{86}\text{Rb}^+$, sin embargo, en presencia de IPTG el eflujo de $^{86}\text{Rb}^+$ fue superior. Estos datos sugirieren que, al igual que en otros sistemas de lisis, tras la expresión del gen de *matador* en *P. putida* CMC4 (pWW0) se produce una desestabilización de la membrana como consecuencia de la integración de la proteína Gef en la misma.

3.4. Visualización de la lisis celular mediante microscopía electrónica

Células de *P. putida* CMC4 (pWW0) transferidas a un medio con IPTG se analizaron mediante microscopía electrónica de transmisión como se describe en el apartado 11.6 de *Materiales y Métodos*. Las muestras de *P. putida* CMC4 (pWW0) se tomaron antes de añadir el IPTG y 1,5 y 3 horas después de la adición del inductor (Fig. 23). Al inicio del ensayo las células, al microscopio electrónico de transmisión, aparecieron de color oscuro, a este tipo de células las denominaremos células de morfología "normal". Sin embargo, después de la inducción de la expresión del gen de lisis aparecieron células transparentes, como consecuencia del vaciado del material citoplasmático, estas células son denominadas células "fantasmas". El porcentaje de células de uno y otro tipo se determinó contando el número de cada una de ellas en 5 microfotografías, dividiendo por el número de células totales y multiplicando por 100.

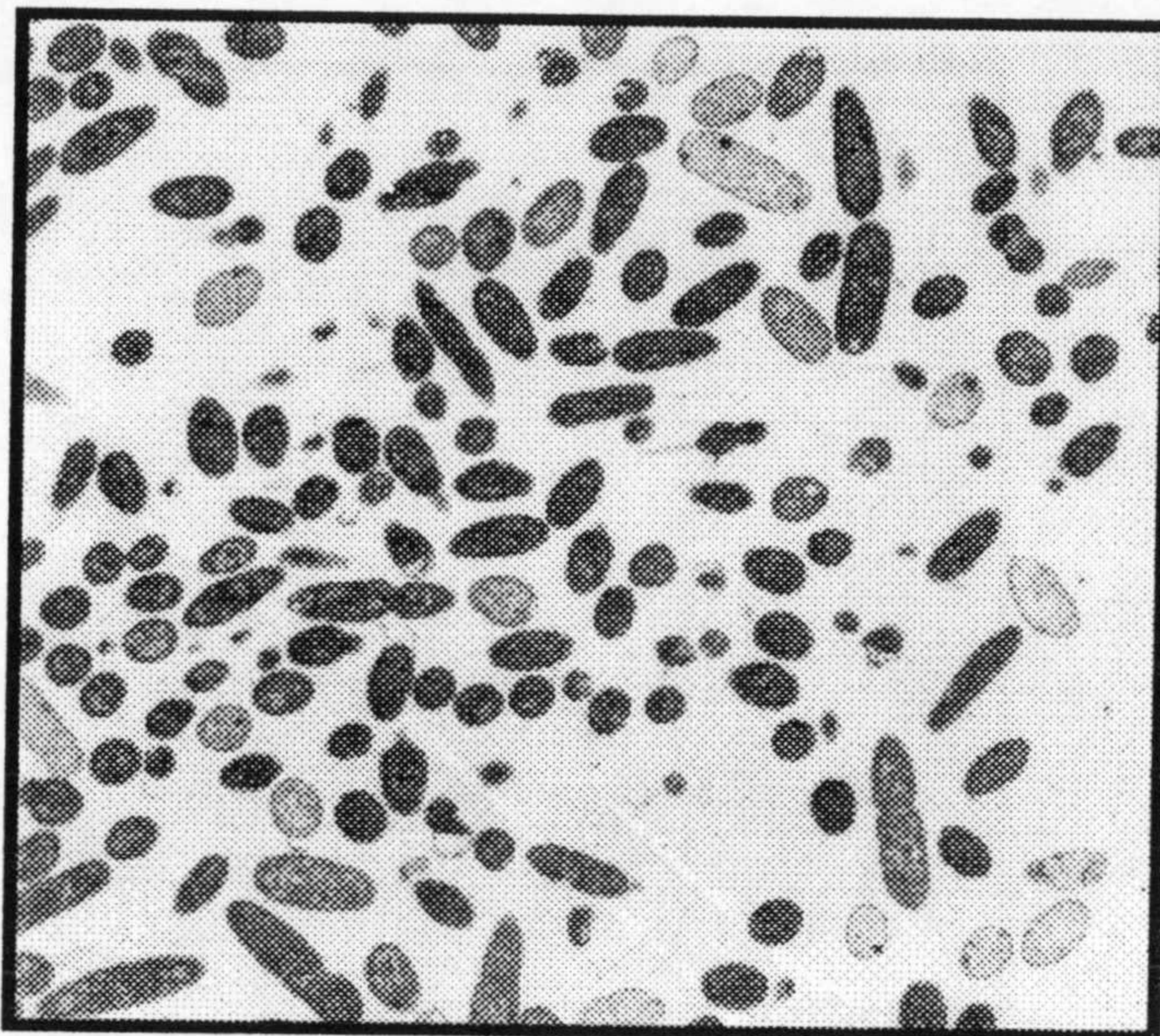
Tabla 13. Eflujo de $^{86}\text{Rb}^+$ desde *P. putida* CMC4 (pWW0) tras la adición de IPTG al medio

La expresión del gen *matador* en *P. putida* CMC4 (pWW0) se realizó como se describe en la leyenda de la Figura 21, pero 60 minutos antes de la inducción se añadió $^{86}\text{RbCl}$ al medio. A los tiempos indicados se recogieron las células por centrifugación, se resuspendieron en 200 ml de tampón 1 x M9, se mezclaron con 500 ml de líquido de centelleo y se determinó el número de cuentas por minuto de los cultivos. La cantidad de $^{86}\text{Rb}^+$ retenido se expresa como el % de la cantidad inicial.

Tiempo (horas)	% $^{86}\text{Rb}^+$ retenido	
	Medio	
	3MB	Glucosa + IPTG
0	100	100
2	17	3
3	15	2

Antes de la inducción de la expresión del gen *gef* se observó que el 92% de las células presentaban una morfología normal (Fig. 23A), mientras que a los 90 minutos de la adición del inductor el número de células "fantasmas" era el 60% del total y a las 3 horas el número ascendió hasta el 80% del total (Fig. 23B). En la Figura 24 se muestra en detalle una célula 90 minutos después de la inducción de la expresión del gen *gef*. Como puede observarse la membrana presenta numerosas discontinuidades que hacen que la viabilidad de la célula no sea posible.

A



B

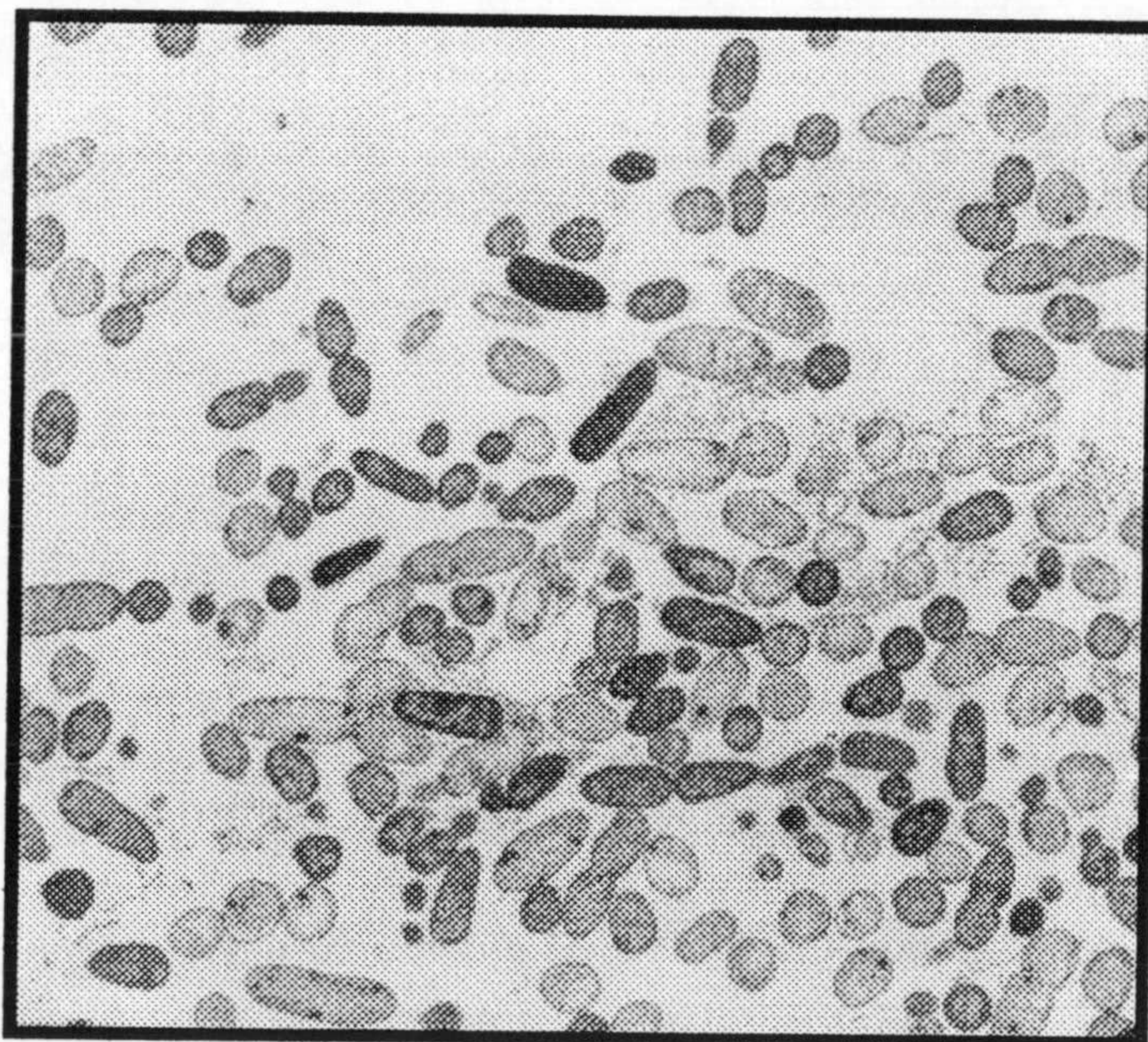


Figura 23 Micrografía electrónica de transmisión de un cultivo de *P. putida* CMC4 (pWW0) sin inducir (A) y 3 horas después de la expresión del gen *gef* (B).

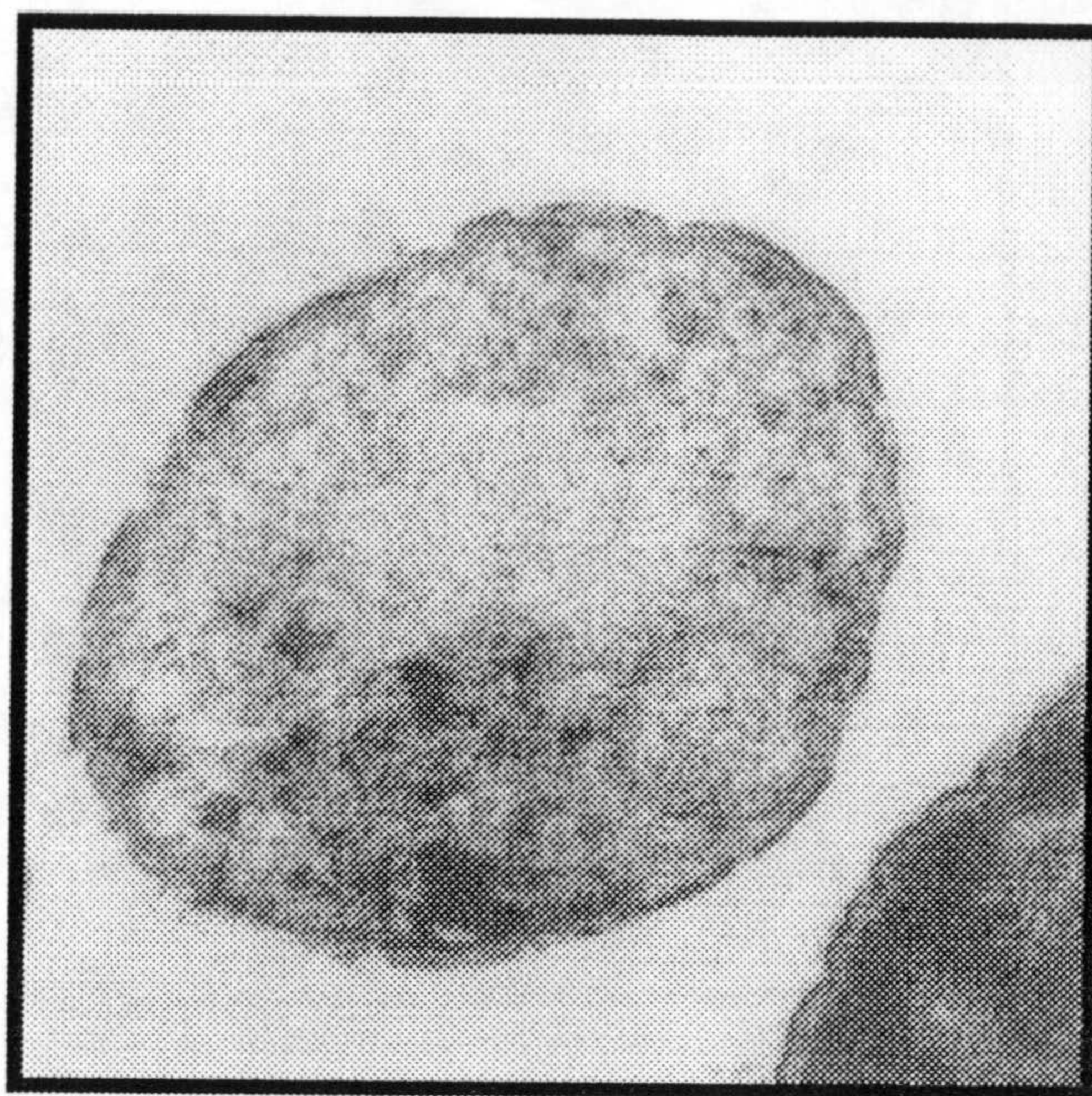


Figura 24. Célula de *P. putida* CMC4 (pWW0) después de 90 minutos de la inducción de la expresión del *gef*.

4. Análisis de mutantes resistentes a la lisis celular

Al igual que ocurría con las células de *E. coli* portando un sistema de contención, también en los cultivos de *P. putida* CMC4 (pWW0) en glucosa con IPTG apareció una población de células resistentes a la lisis. Con objeto de estudiar la naturaleza de estas mutaciones en *P. putida* CMC4 (pWW0), se eligieron al azar 7 colonias diferentes de dicha cepa y se inocularon en medio mínimo M9 con 0,5% (p/v) de glucosa suplementado con Km y 2 mM de IPTG. Tras incubación prolongada (>24 horas) se observó un incremento en la turbidez celular. En ese momento se realizaron diluciones seriadas que se sembraron en el mismo medio y se seleccionó una colonia "resistente a la lisis" de cada cultivo para su posterior caracterización. Las cepas seleccionadas se denominaron de *P. putida* CMC4-1 a *P. putida* CMC4-7 .

Ya que la selección de las colonias resistentes a la lisis se realizó en presencia de Km, se descartó la pérdida del mini-transposón como causa de la resistencia a la lisis. En primer lugar se analizó si la/s mutación/es presente/s en cada una de las cepas se encontraba/n asociada/s a la fusión $P_{A1-04/03}::gef$. Para ello se aisló ADN total de cada cepa y la fusión se amplificó mediante PCR utilizando los oligonucleótidos OCM13 y OCM14 y el ADN total de cada cepa como ADN molde. Estos oligonucleótidos son complementarios al extremo 5' del promotor $P_{A1-04/03}$ (OCM13) o al extremo 3' del gen *gef* (OCM14). El fragmento de ADN amplificado (264 pb) se secuenció usando los cebadores OCM13 y OCM14. *P. putida* CMC4-2, CMC4-3 y CMC4-7 presentaron una deleción de 33 pb en la región del operador-promotor, la cual incluía la caja -10 del promotor $P_{A1-04/03}$ y el punto de iniciación de la transcripción del gen *gef* (Fig. 25). *P. putida* CMC4-6 presentó una deleción de 34 pb en la región del operador-promotor, desde la posición +2 hasta la +35 (Fig. 25). En *P. putida* CMC4-1, CMC4-4 y CMC4-5 no apareció ninguna mutación en el fragmento analizado.

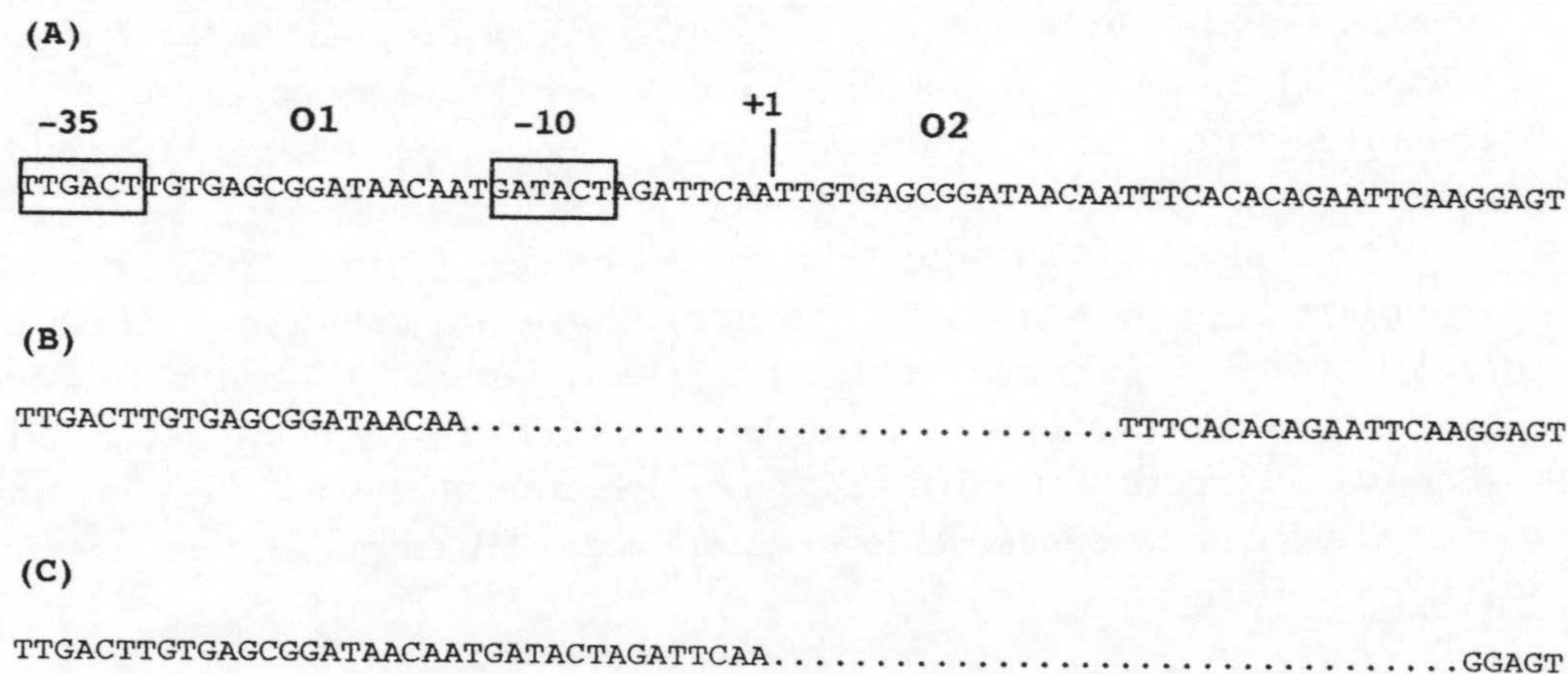


Figura 25. Secuencias promotor-operador de $P_{A1-04/03}$ en *P. putida* CMC4 (pWW0) y de algunos mutantes en dicha región

Se indica el punto de iniciación de la transcripción (+1) y las cajas -35 y -10 del promotor $P_{A1-04/03}$. La secuencia en rojo (O1 y O2) indican los dos operadores presentes en el promotor. (A) secuencia silvestre del promotor, (B) secuencia de *P. putida* CMC4-2, CMC4-3 y CMC4-7, y (C) secuencia de *P. putida* CMC4-6.

5. Supervivencia en microcosmos edáficos de *P. putida* CMC4 (pWW0) y *P. putida* EEZ15K-3 (pWW0)

La supervivencia de las cepas *P. putida* CMC4 (pWW0) y *P. putida* EEZ15K-3 (pWW0) se analizó en microcosmos edáficos suplementados o no con 0,1% (p/p) de 3MB, mantenidos a temperatura ambiente ($18 \pm 2^\circ\text{C}$) e inoculados con un número de bacterias del orden de 5×10^5 UFC/g de suelo. El suelo utilizado fue el fluvisol descrito en las Tablas 6 y 7 de *Materiales y Métodos*. En presencia de 3MB el comportamiento de ambas cepas fue similar. El número de bacterias aumentó durante los primeros 5 días hasta alcanzar alrededor de 10^9 UFC/g de suelo y posteriormente disminuyó progresivamente hasta aproximadamente 10^7 UFC/g de suelo después de 30 días (Fig. 26A y 26B). En ausencia de 3MB el número de bacterias de la cepa no contenida, *P. putida* EEZ15K-3 (pWW0), aumentó hasta aproximadamente 10^7 UFC/g de suelo durante los 5 primeros días, posteriormente se mantuvo relativamente constante a 10^6 UFC/g de suelo durante 15 días y luego disminuyó hasta alcanzar 5×10^4 UFC/g de suelo al final del ensayo (Fig. 26A). En ausencia de 3MB el número de UFC de la cepa *P. putida* CMC4 (pWW0) aumentó ligeramente en las primeras 24 horas, posteriormente disminuyó hasta 1×10^5 UFC/g de suelo a los 7 días de iniciado el ensayo, manteniéndose a este nivel hasta el día 21. A partir de este día se observó una disminución en el número de células hasta alcanzar 8×10^2 UFC/g de suelo a los 30 días (Fig. 26B).

Se evaluó el efecto que la introducción de *P. putida* CMC4 (pWW0) y *P. putida* EEZ15K-3 (pWW0) ejercían sobre la población de bacterias indígenas del suelo capaz de crecer en medio mínimo M9 con pOHFA como única fuente de carbono. El número de bacterias de esta población se mantuvo alrededor de 6×10^6 UFC/g de suelo durante los 30 días que duró el ensayo tanto en presencia como en ausencia de 3MB e independientemente de la cepa introducida (Tabla 14).

5.1. Transferencia génica desde las cepas control y contenida a *P. putida* UWC1 en suelo

Los ensayos de transferencia del plásmido pWW0 y de los mini-transposones insertados en el cromosoma de *P. putida* CMC4 (pWW0) y *P. putida* EEZ15K-3 (pWW0) se realizaron en condiciones estándar tal y como se describió en el apartado 13.1.1 de *Materiales y Métodos*. Como cepa

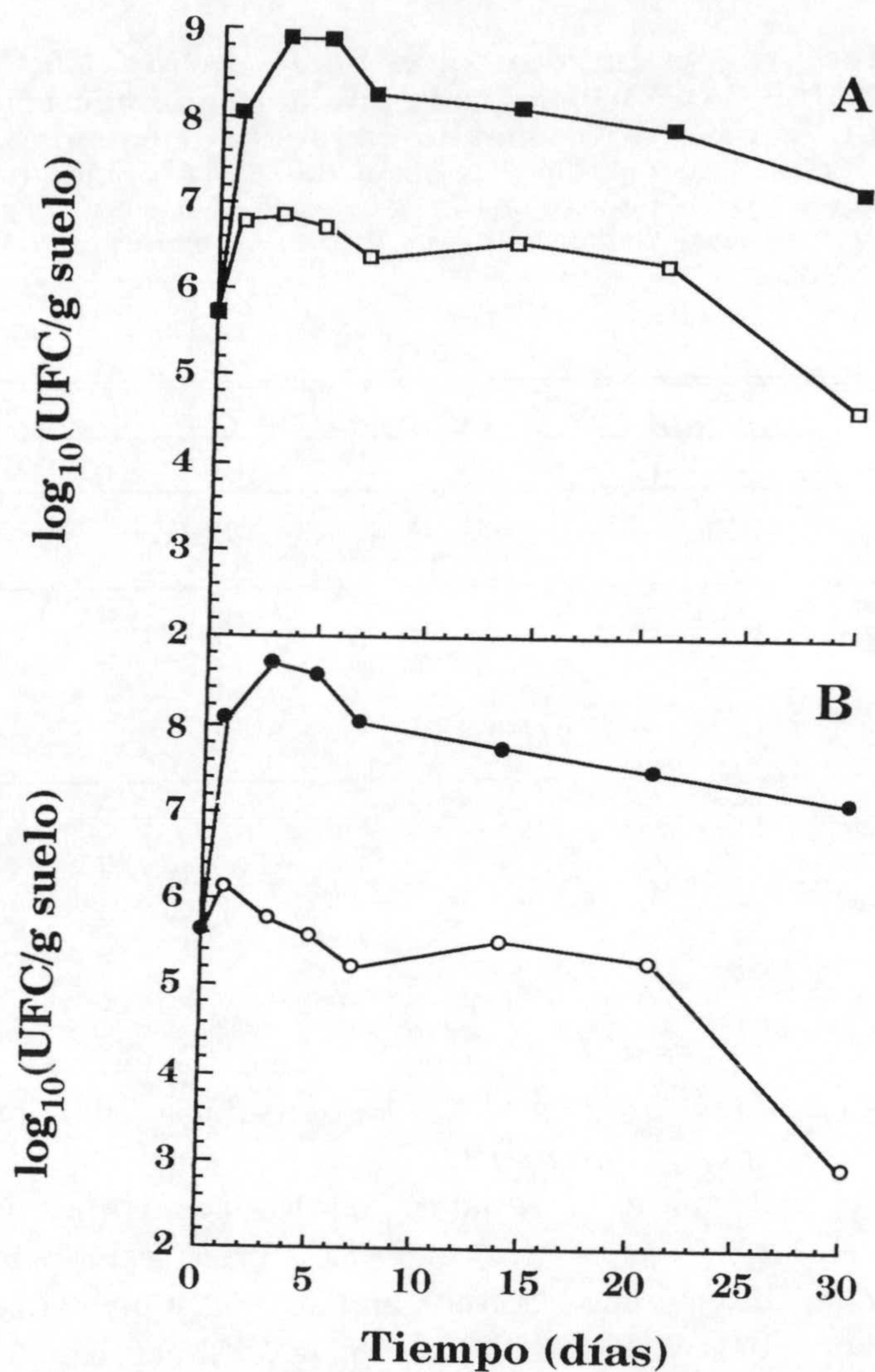


Figura 26. Supervivencia de *P. putida* CMC4 (pWW0) y *P. putida* EEZ15K-3 (pWW0) en suelo

Alrededor de 5×10^5 UFC/g de suelo de *P. putida* CMC4 (pWW0) (círculos) o *P. putida* EEZ15K-3 (pWW0) (cuadrados) se inocularon en 90 g de suelo suplementados (símbolos cerrados) o no (símbolos abiertos) con 0,1% (p/p) de 3MB. A los tiempos indicados se determinó el número de UFC/g de suelo en medio selectivo.

Tabla 14. Efecto de la introducción de *P. putida* CMC4 (pWW0) y *P. putida* EEZ15K-3 (pWW0) sobre la población de bacterias indígenas capaces de utilizar pOHFA como única fuente de carbono

Las condiciones fueron como las detalladas en la leyenda de la Figura 26, excepto que se determinó el número de UFC/g de suelo de bacterias capaces de utilizar pOHFA como única fuente de carbono. Los valores se expresan como el log₁₀ del número de UFC/g de suelo.

Muestra (días)	<i>P. putida</i> CMC4 (pWW0)		<i>P. putida</i> EEZ15K-3 (pWW0)	
	-3MB	+3MB	-3MB	+3MB
0	6,79	6,79	6,73	6,73
30	6,91	7,06	6,90	6,99

receptora se utilizó *P. putida* UWC1 y como donadoras *P. putida* CMC4 (pWW0) o *P. putida* EEZ15K-3 (pWW0). La densidad celular inicial fue del orden de 10⁶ UFC/g de suelo para las cepas donadoras y de alrededor de 10⁴ UFC/g de suelo para la cepa receptora. Los transconjugantes se seleccionaron en los siguientes medios: la transferencia del plásmido pWW0 se seleccionó en medio mínimo M9 con 5 mM de 3MB suplementado con Rif; y la co-transferencia del marcador de resistencia a Km se realizó en el mismo medio pero suplementado con Km.

En suelos no suplementados con 3MB e inoculados con la cepa no contenida biológicamente, *P. putida* EEZ15K-3 (pWW0) actuando como cepa donadora, el número de donadores permaneció relativamente constante durante los 30 días que duró el ensayo (Fig. 27A). El número de receptores aumentó hasta alcanzar alrededor de 10⁶ UFC/g de suelo y permaneció en este nivel hasta el final del ensayo tanto en presencia como en ausencia de 3MB. A las 24 horas, el número de receptores que habían adquirido el plásmido TOL pWW0 fue del orden de 10² UFC/g de suelo, después de 15 días

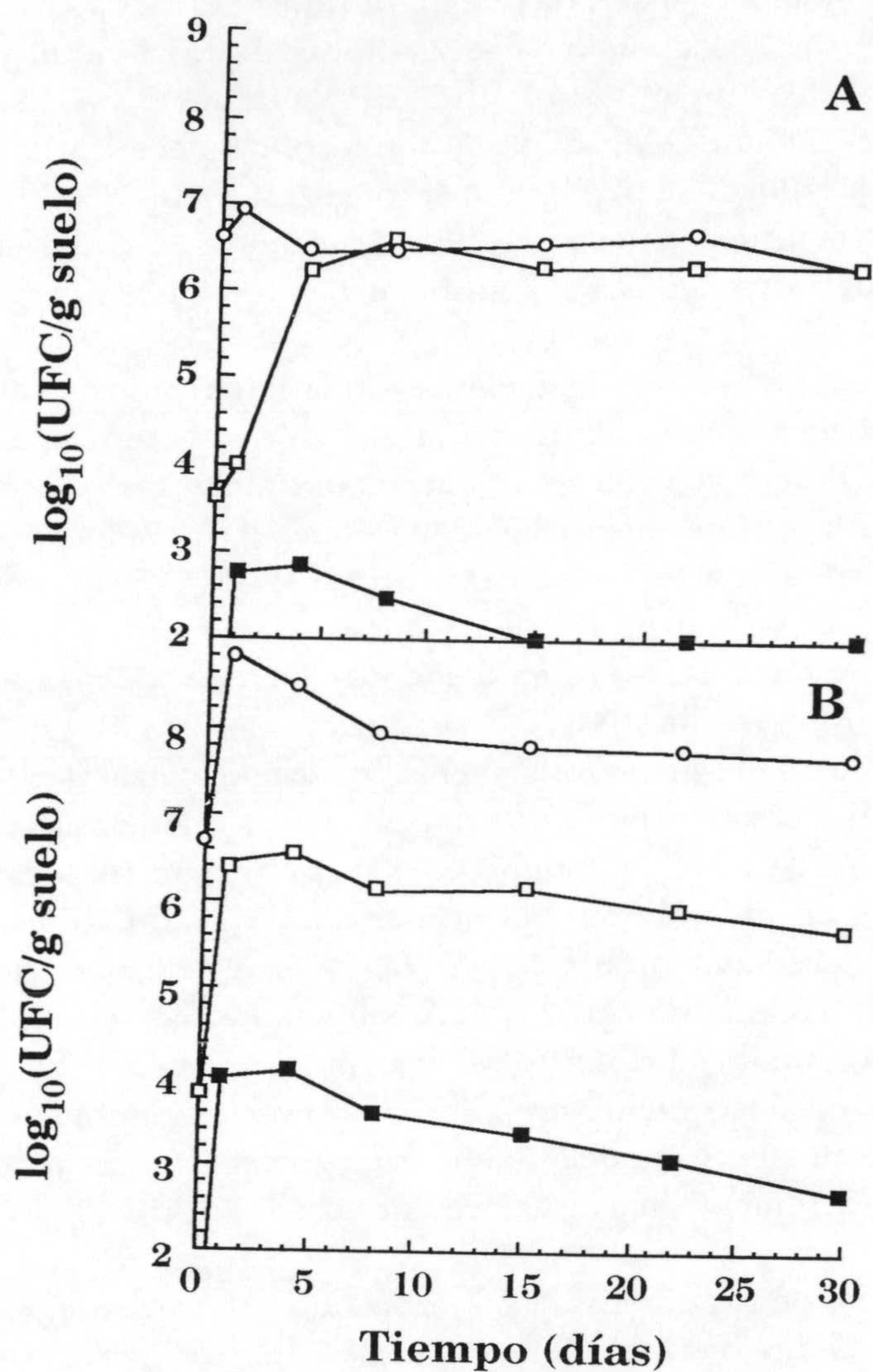


Figura 27. Transferencia g3nica de *P. putida* EEZ15K-3 (pWW0) a *P. putida* UWC1 en suelo fluvisol

La cepa donadora fue *P. putida* EEZ15K-3 (pWW0) (c3rculos), la cepa receptora fue *P. putida* UWC1 (cuadrados) y los transconjugantes fueron *P. putida* UWC1 (pWW0) (cuadrados cerrados). Los ensayos se realizaron en suelo fluvisol sin 3MB (A) o con 0,1% (p/p) de 3MB (B).

de incubación el número de estos transconjugantes disminuyó por debajo de nuestro límite de detección (Fig. 27A). En suelos suplementados con 3MB, el número de bacterias de *P. putida* EEZ15K-3 (pWW0) aumentó hasta 8×10^8 UFC/g de suelo a las 24 horas de iniciado el experimento, posteriormente disminuyó hasta 1×10^8 UFC/g de suelo y se mantuvo en ese nivel hasta el final del ensayo. El número de receptores que habían adquirido el plásmido TOL pWW0 aumentó hasta 1×10^4 UFC/g de suelo a las 24 horas y se mantuvo en ese nivel los 4 primeros días del ensayo, luego disminuyó progresivamente hasta alcanzar 6×10^2 UFC/g de suelo a los 30 días (Fig. 27B).

Se realizó otra serie de ensayos en microcosmos usando la cepa contenida biológicamente *P. putida* CMC4 (pWW0) como cepa donadora y *P. putida* UWC1 como cepa receptora. El comportamiento de la cepa receptora fue similar tanto en ausencia (Fig. 28A) como en presencia de 3MB (Fig. 28B). El número de bacterias aumentó durante los 3 primeros días hasta alcanzar alrededor de 10^6 UFC/g de suelo y se mantuvo relativamente constante en ese nivel hasta el final del ensayo. En suelos no suplementados con 3MB el número de UFC de *P. putida* CMC4 (pWW0) disminuyó progresivamente a lo largo de todo el ensayo hasta alcanzar 4×10^4 UFC/g de suelo al final del ensayo (Fig. 28A). En el suelo suplementado con 3MB el número de UFC/g de suelo de *P. putida* CMC4 (pWW0) aumentó hasta alcanzar 5×10^8 UFC/g de suelo durante el primer día y disminuyó posteriormente hasta alcanzar alrededor de 6×10^6 UFC/g de suelo después de 30 días de incubación (Fig. 28B). El número de transconjugantes con el plásmido pWW0 siguió un perfil similar al descrito anteriormente con la cepa control, esto es, el número de transconjugantes/g de suelo no superó el valor de 1×10^3 UFC/g de suelo en ausencia de 3MB, mientras que en presencia del aromático el número se incrementó hasta valores de alrededor de 6×10^3 UFC/g de suelo.

En ninguno de los dos ensayos se detectaron transconjugantes capaces de crecer en medio con Km, lo cual indicó que el plásmido pWW0 no movilizó, o lo hizo a muy baja frecuencia, el marcador cromosómico de resistencia a Km (portando o no sistema de contención).

Asimismo se evaluó el efecto de la introducción conjunta de *P. putida* UWC1 y *P. putida* CMC4 (pWW0) sobre la población de bacterias indígenas del suelo. Para ello se determinó en cada toma de muestra el número de bacterias capaces de crecer en medio mínimo M9 con 5 mM de pOHFA como única fuente de carbono. El número de bacterias permaneció relativamente constante alrededor de los valores iniciales, 6×10^6 UFC/g de suelo

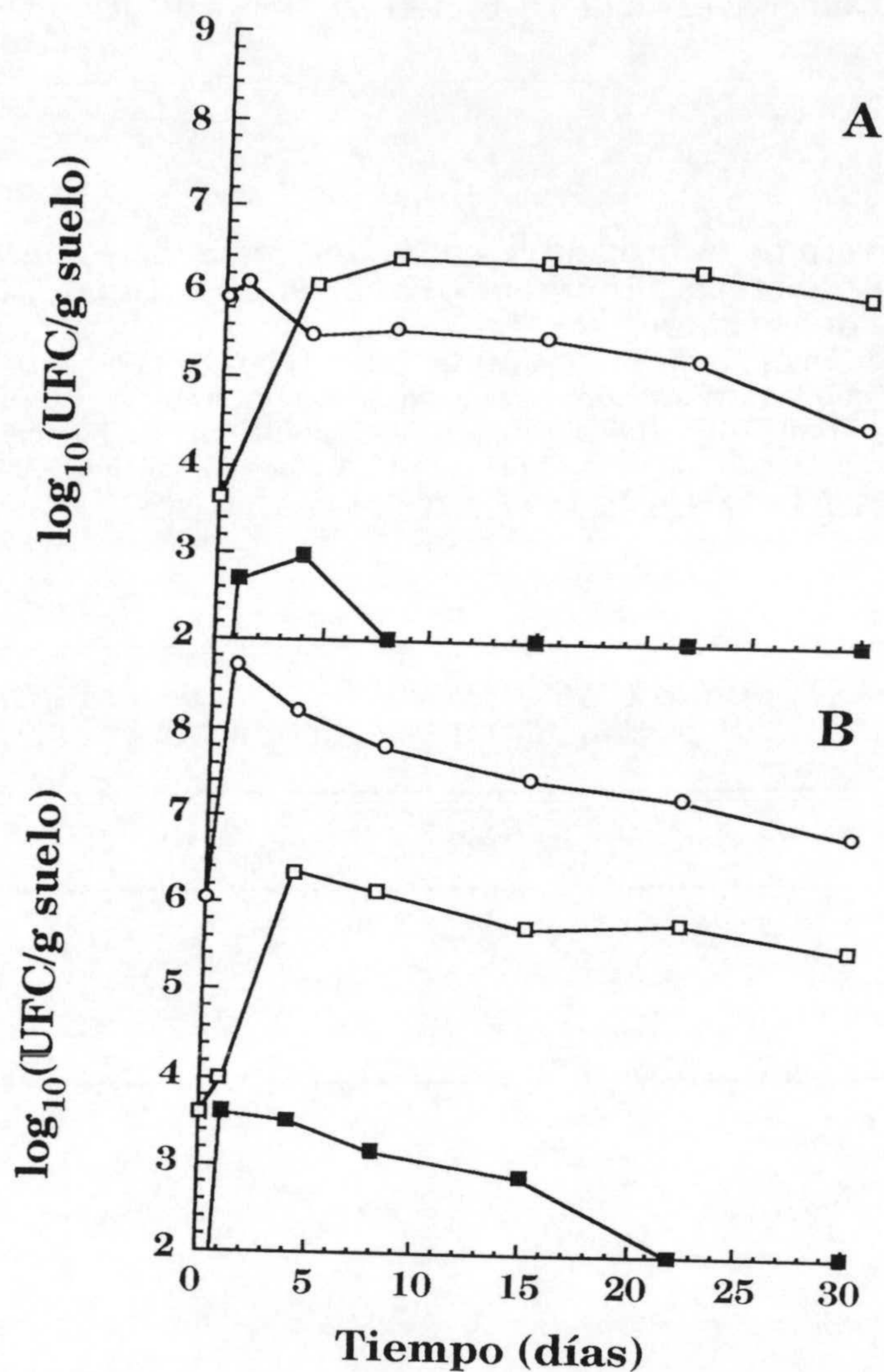


Figura 28. Transferencia génica de *P. putida* CMC4 (pWW0) a *P. putida* UWC1 en suelo fluvisol

Las condiciones fueron las detalladas en la leyenda de la Figura 27. La cepa donadora fue *P. putida* CMC4 (pWW0) (círculos), la cepa receptora fue *P. putida* UWC1 (cuadrados) y los transconjugantes fueron *P. putida* UWC1 (pWW0) (cuadrados cerrados).

(Tabla 15). Por tanto, la introducción de dos cepas conjuntamente en el suelo no afectó a la supervivencia de las bacterias capaces de degradar *p*OHFA.

Tabla 15. Efecto de la introducción de dos cepas de *P. putida* sobre la población de bacterias indígenas capaces de utilizar *p*OHFA como única fuente de carbono

Las condiciones fueron las detalladas en la leyenda de la Figura 27, excepto que se determinó cómo la introducción simultánea de *P. putida* UWC1 y *P. putida* EEZ15K-3 (*p*WW0) o *P. putida* CMC4 (*p*WW0) afectó a la población de bacterias capaces de formar colonias en medio mínimo M9 con *p*OHFA como única fuente de carbono. Los valores se expresan como el \log_{10} del número de UFC/g de suelo.

Muestra (días)	<i>P. putida</i> CMC4 (<i>p</i> WW0) <i>P. putida</i> UWC1		<i>P. putida</i> EEZ15K-3 (<i>p</i> WW0) <i>P. putida</i> UWC1	
	-3MB	+3MB	-3MB	+3MB
0	6,78	6,78	6,80	6,80
30	6,68	6,89	6,82	6,83

IV. CONSTRUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA CEPA CONTENIDA DE *P. putida* PORTADORA DE DOS ELEMENTOS MATADORES DIFERENTES EN EL CROMOSOMA

En el capítulo II de esta sección, se describió la aparición de mutaciones en la región del promotor $P_{A1-04/03}$ que condujeron a un fenotipo Gef^R . Con objeto de disminuir el número de tales mutantes en el sistema de contención se consideraron dos alternativas posibles: una, la utilización de otro sistema distinto al $P_{A1-04/03}/lacI$ como vía de control de la expresión del gen *matador*, y otra, consistente en la duplicación del elemento de muerte $P_{A1-04/03}::gen\ matador$. Puesto que no se disponía de un par represor/promotor con garantías de funcionamiento en *Pseudomonas*, se consideró la segunda alternativa como la estrategia más adecuada.

Para la duplicación del elemento *matador* se consideró la utilización de un gen *matador* distinto al gen *gef*, para así evitar la posible recombinación homóloga entre dos elementos *matadores* idénticos (Knudsen y Karlström, 1991). Como segundo gen *matador* se eligió el gen *E* del fago $\Phi X174$, el cual se había sugerido que era funcional en *Pseudomonas* (Kloos et al., 1994). La expresión de este gen en *E. coli*, el hospedador natural del fago $\Phi X174$, determina un polipéptido de 91 aminoácidos que se inserta en las membranas interna y externa de la bacteria produciendo un tunel transmembrana (Witte et al., 1990), que desencadena toda una serie de acontecimientos que conducen a la lisis celular (Witte et al., 1989).

En este capítulo se describe la construcción de una cepa de *P. putida* contenida biológicamente basada en el gen *E*, y la posterior transferencia del nuevo elemento *matador* a *P. putida* CMC4 (pWW0). Esta cepa, descrita en el capítulo III de *Resultados*, porta un elemento *matador* basado en el gen *gef* de *E. coli* e integrado en el cromosoma junto con el elemento regulador. La construcción de esta cepa supuso una mejora con respecto a la cepa inicial *P. putida* EEZ30 en base a la disminución del número de copias del gen *lacI*. Con la integración del nuevo elemento *matador* basado en el gen *E* en la cepa *P. putida* CMC4 (pWW0) se obtuvo una cepa de *P. putida* con el elemento regulador y dos elementos *matadores* integrados en el cromosoma, combinándose de esta forma las dos estrategias descritas en el capítulo II de *Resultados* para disminuir la aparición de cepas Gef^R .

1. Construcción de una unidad base para el diseño de un elemento *matador* basado en el gen *E* del fago Φ X174

1.1. Construcción de una fusión $P_{A1-04/03}::$ gen *E*

La expresión del gen *E* en *E. coli* está limitada por el bajo nivel de traducción que se obtiene a partir del sitio de unión al ribosoma presente de forma natural en dicho gen (Bläsi *et al.*, 1990). Por este motivo se decidió clonar el gen *E* en el plásmido pUHE24-1 manteniendo el sitio de unión al ribosoma asociado al transcrito que se originaría desde $P_{A1-04/03}$.

La fusión del gen *E* del fago Φ X174 al promotor sintético $P_{A1-04/03}$ se realizó como se describe a continuación. El codón de iniciación de la transcripción (ATG) localizado corrientes abajo del promotor $P_{A1-04/03}$ en el plásmido pUHE24-1 coincide con un sitio de restricción para la enzima *Nco*I. Dicho plásmido contiene otro sitio adicional de corte para esta enzima de restricción en la posición 814, localizada dentro del gen *cat* (resistencia a cloranfenicol) (Fig. 3). Con objeto de facilitar la clonación del gen *E* corriente abajo del promotor $P_{A1-04/03}$, se decidió eliminar este segundo sitio *Nco*I. Para ello el plásmido pUHE24-1 se digirió parcialmente con dicha enzima y posteriormente se rellenaron los extremos cohesivos resultantes con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa y los cuatro dNTPs. Tras análisis de los plásmidos resultantes por digestión con *Nco*I y *Bgl*II se seleccionó un clon que había perdido el sitio *Nco*I en la posición 814. El plásmido generado se denominó pMCC26 (Fig. 29).

Por otro lado, el gen *E* se amplificó mediante PCR utilizando los oligonucleótidos OCM6 y OCM2 y, como molde, el ADN comercial del fago Φ X174. El oligonucleótido OCM6 se diseñó de tal forma que contenía 20 pb complementarias al extremo 5' del gen *E* y una extensión no homóloga de 10 pb con un sitio de restricción para la enzima *Nco*I. El oligonucleótido OCM2 se diseñó de tal forma que contenía 18 pb complementarias al extremo 3' del gen *E* y una extensión no homóloga de 16 pb con un sitio de restricción para la enzima *Hind*III. El fragmento de ADN amplificado se digirió con las enzimas *Nco*I y *Hind*III y el fragmento de 302 pb resultante se clonó en el plásmido pMCC26 previamente digerido con las mismas enzimas. La mezcla de ligación se transformó en *E. coli* JM109 y el plásmido resultante se denominó pMCC27 (Fig. 30).

La eficiencia del nuevo elemento *matador* en *E. coli* JM109 (pMCC27) se ensayó en medio LB sólido suplementado con Ap, en presencia y en ausencia de 2 mM IPTG. Las bacterias portadoras del sistema de contención

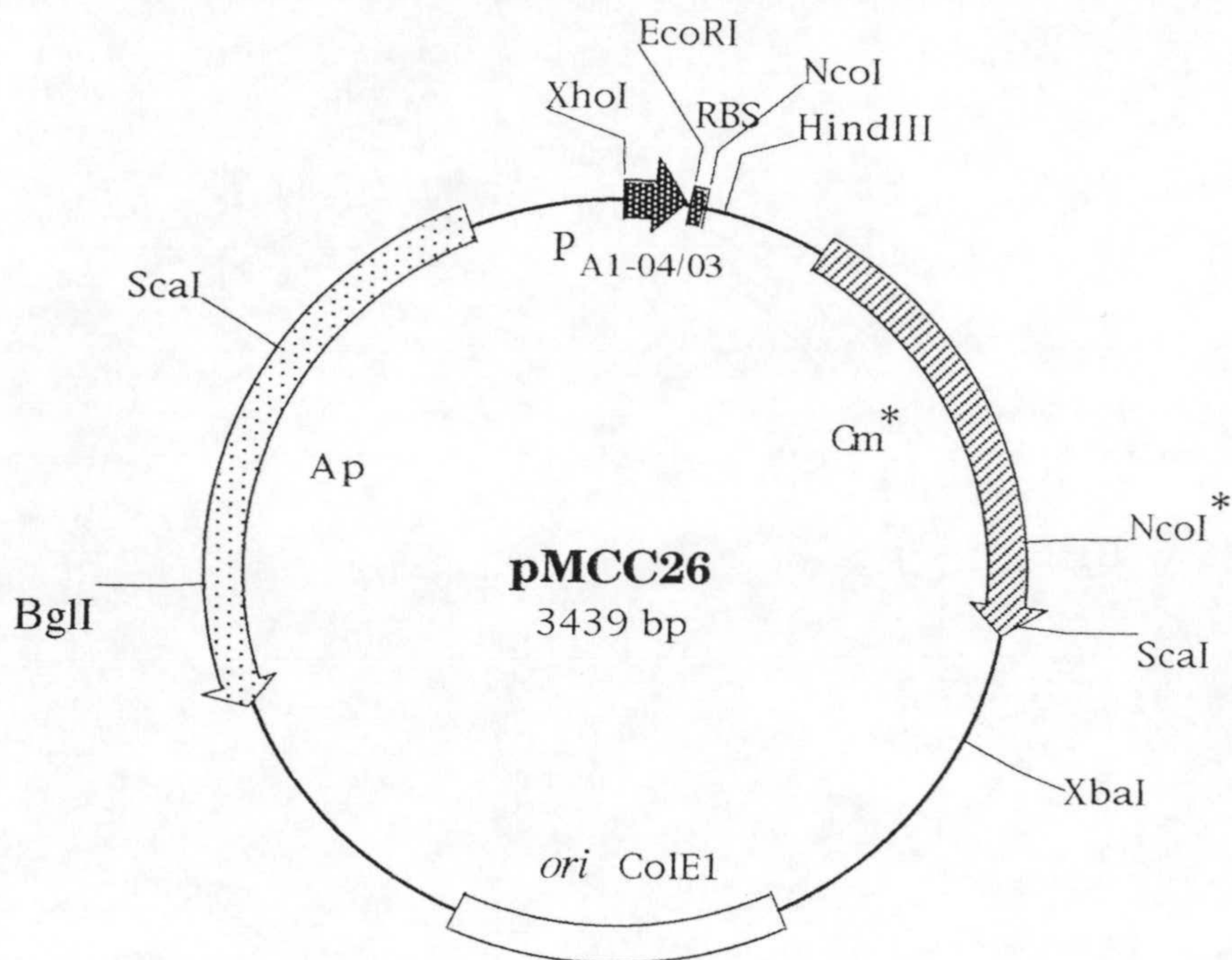


Figura 29. Esquema del plásmido pMCC26

Se muestran los sitios de restricción para las enzimas indicadas, así como la localización del origen de replicación, el promotor sintético P_{AI-04/03}, el gen de resistencia a ampicilina (Ap) y el sitio de unión al ribosoma (RBS) en el transcrito que se originaría como consecuencia de la lectura del promotor P_{AI-04/03}. Las flechas indican el sentido en el que se transcriben los genes. NcoI* indica el sitio de restricción NcoI eliminado de pUHE24-1 como se describe en el texto, y Cm* el gen de resistencia a cloranfenicol que se inactiva como consecuencia de la eliminación del sitio NcoI.

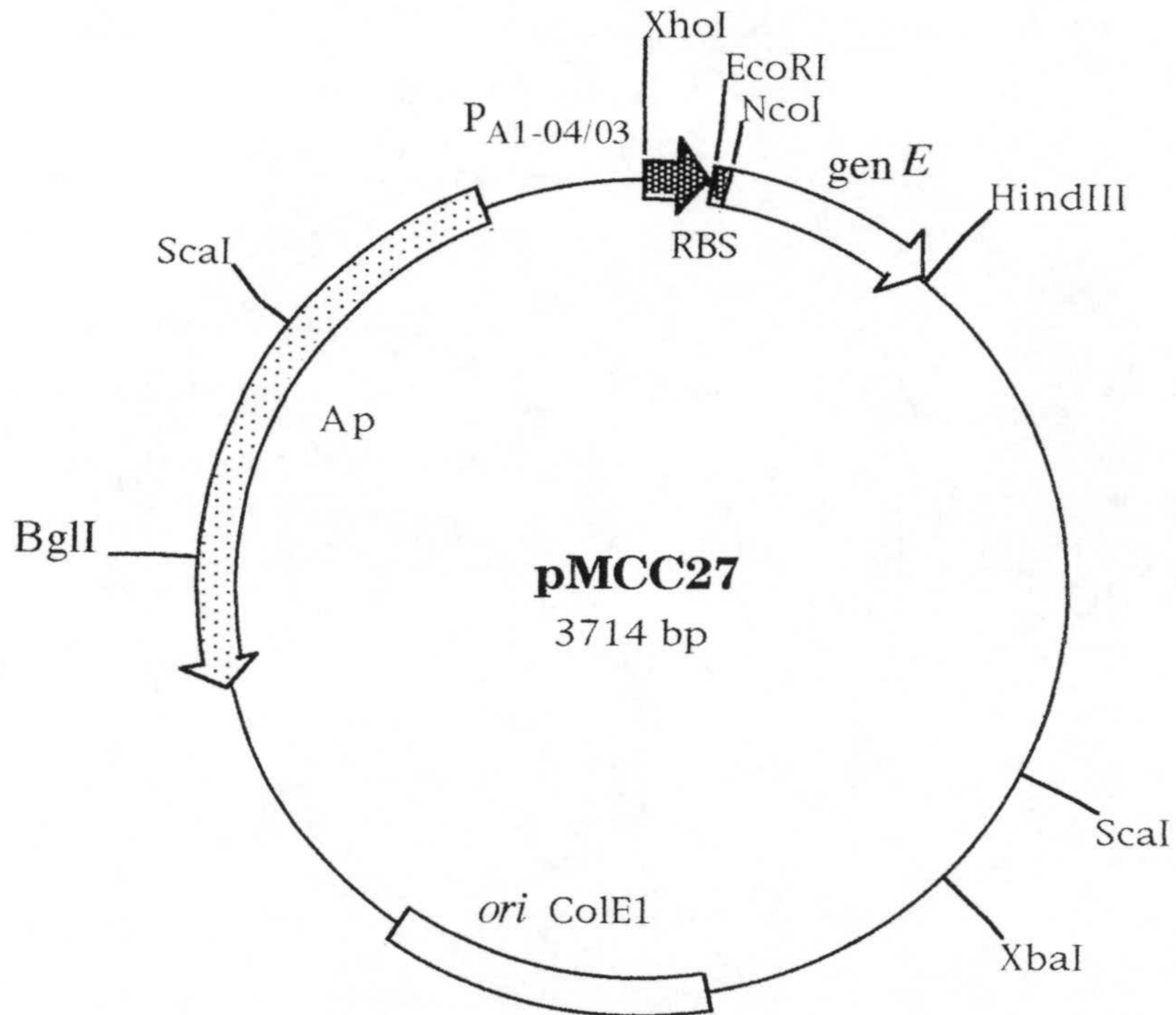


Figura 30. Esquema del plásmido pMCC27

Se muestran los sitios de restricción para las enzimas indicadas, así como la localización del origen de replicación, el promotor sintético P_{AI-04/03}, el gen *E*, el gen de resistencia a ampicilina (Ap) y el sitio de unión al ribosoma (RBS) en el transcrito que se originaría como consecuencia de la lectura de P_{AI-04/03}. Las flechas indican el sentido en el que se transcriben los genes.

sobrevivieron en ausencia de IPTG, pero no en su presencia, indicando que el nuevo elemento *matador* era funcional en *E. coli*.

La eficiencia del sistema se comprobó también en medio líquido cultivando las células en medio LB suplementado con Ap en presencia y en ausencia de IPTG, tal como se describe en el apartado 11.1.1 de *Materiales y Métodos*. Como cepa control se utilizó *E. coli* JM109 (pUHE24-1). Ambas cepas se cultivaron en medio LB suplementado con Ap hasta que la turbidez del cultivo alcanzó una DO_{660} de 0,3. En ese momento los cultivos se dividieron en dos fracciones alícuotas, y a una de ellas se le añadió IPTG para alcanzar una concentración de 10 mM. El comportamiento de los cultivos de la cepa control, *E. coli* JM109 (pUHE24-1), fue similar en presencia y en ausencia de IPTG, la turbidez de ambos cultivos aumentó hasta alcanzar una DO_{660} de 1,5 después de 7 horas de crecimiento (Fig. 31). Sin embargo, el comportamiento de los cultivos de la cepa contenida fue dependiente de la presencia o ausencia de IPTG. En ausencia de IPTG la DO_{660} del cultivo aumentó de forma similar al de la cepa control, sin embargo, en presencia de IPTG la turbidez del cultivo disminuyó desde el momento de la adición hasta alcanzar un valor de DO_{660} de 0,05 después de 5 horas (Fig. 31).

Tras la expresión del gen *E* en *E. coli*, y como consecuencia de la lisis celular, puede detectarse liberación al medio de cultivo de componentes citoplasmáticos, entre ellos ácidos nucleicos (Witte *et al.*, 1989). Los sobrenadantes de los cultivos de *E. coli* JM109 (pMCC27) y de *E. coli* JM109 (pUEH24-1) se analizaron a distintos tiempos tras la adición del IPTG. Se observó que a los 45 minutos después de la inducción de la expresión del gen *E* en *E. coli* JM109 (pMCC27) se detectó liberación al medio de ácidos nucleicos (Fig. 32). Transcurridos 135 minutos desde la adición del inductor se observó degradación del ácido nucleico liberado, debido probablemente a la liberación de nucleasas. En los sobrenadantes del cultivo de la cepa control, *E. coli* JM109 (pUHE24-1), no se detectó liberación de ácidos nucleicos (datos no mostrados).

1.2. Clonación del elemento *matador* en un vector de transferencia

Para la transferencia del elemento *matador* al cromosoma de *P. putida* se clonó la fusión $P_{A1-04/03}::\text{gen } E$ en el plásmido pUT-Tel, que contiene un mini-Tn5 que codifica resistencia a telurito (Fig. 33). El plásmido pMCC27 se digirió con las enzimas de restricción *Xho*I y *Hind*III y, el fragmento de

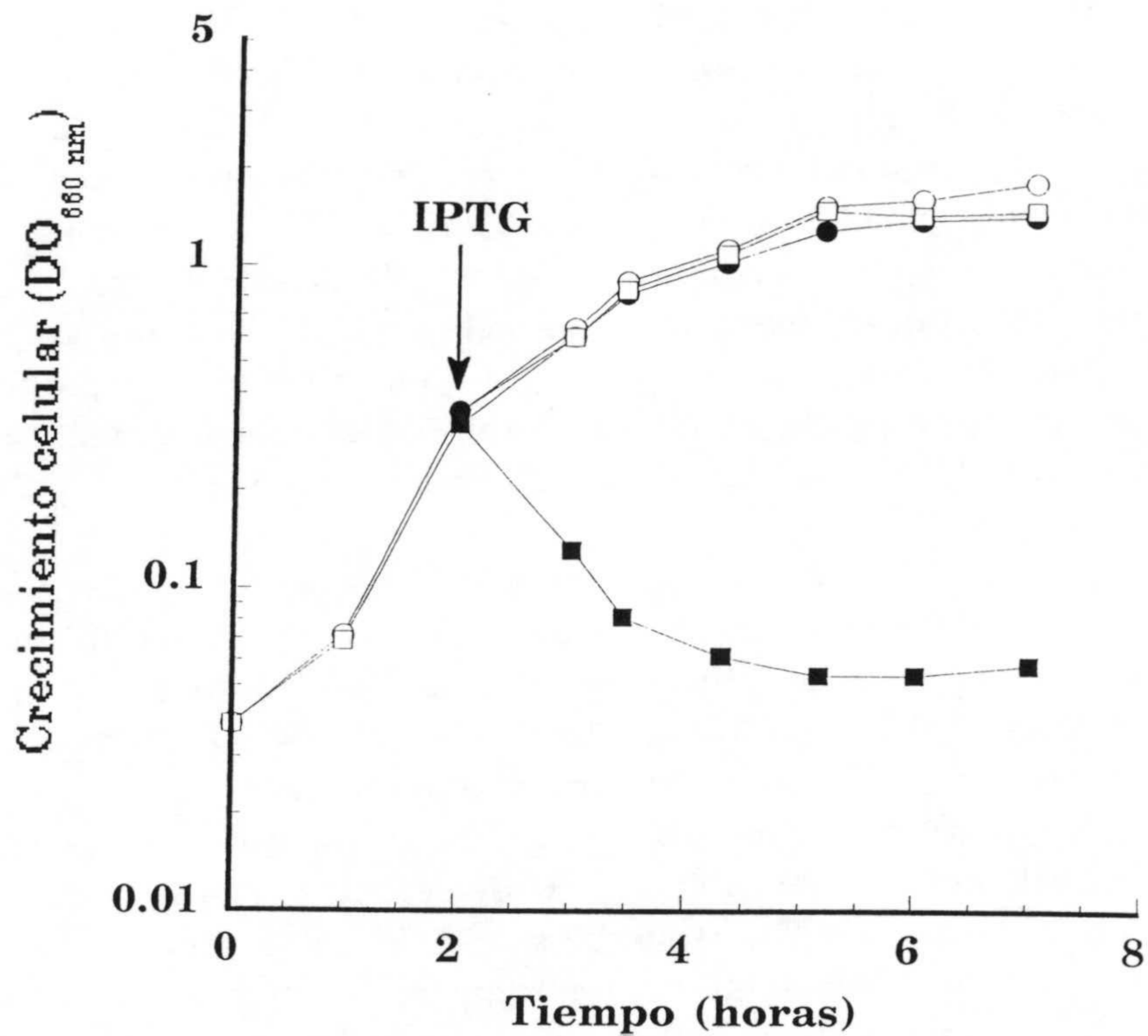


Figura 31. Crecimiento de *E. coli* JM109 (pMCC27) y *E. coli* JM109 (pUHE24-1) en presencia y ausencia de IPTG

E. coli JM109 (pMCC27) (cuadrados) y *E. coli* JM109 (pUHE24-1) (círculos) se cultivaron en medio líquido LB-Ap. La flecha indica el momento en que cada cultivo se dividió en dos fracciones alícuotas, a una de las cuales se le añadió 10 mM de IPTG (símbolos cerrados) y la otra se mantuvo como control (símbolos abiertos).

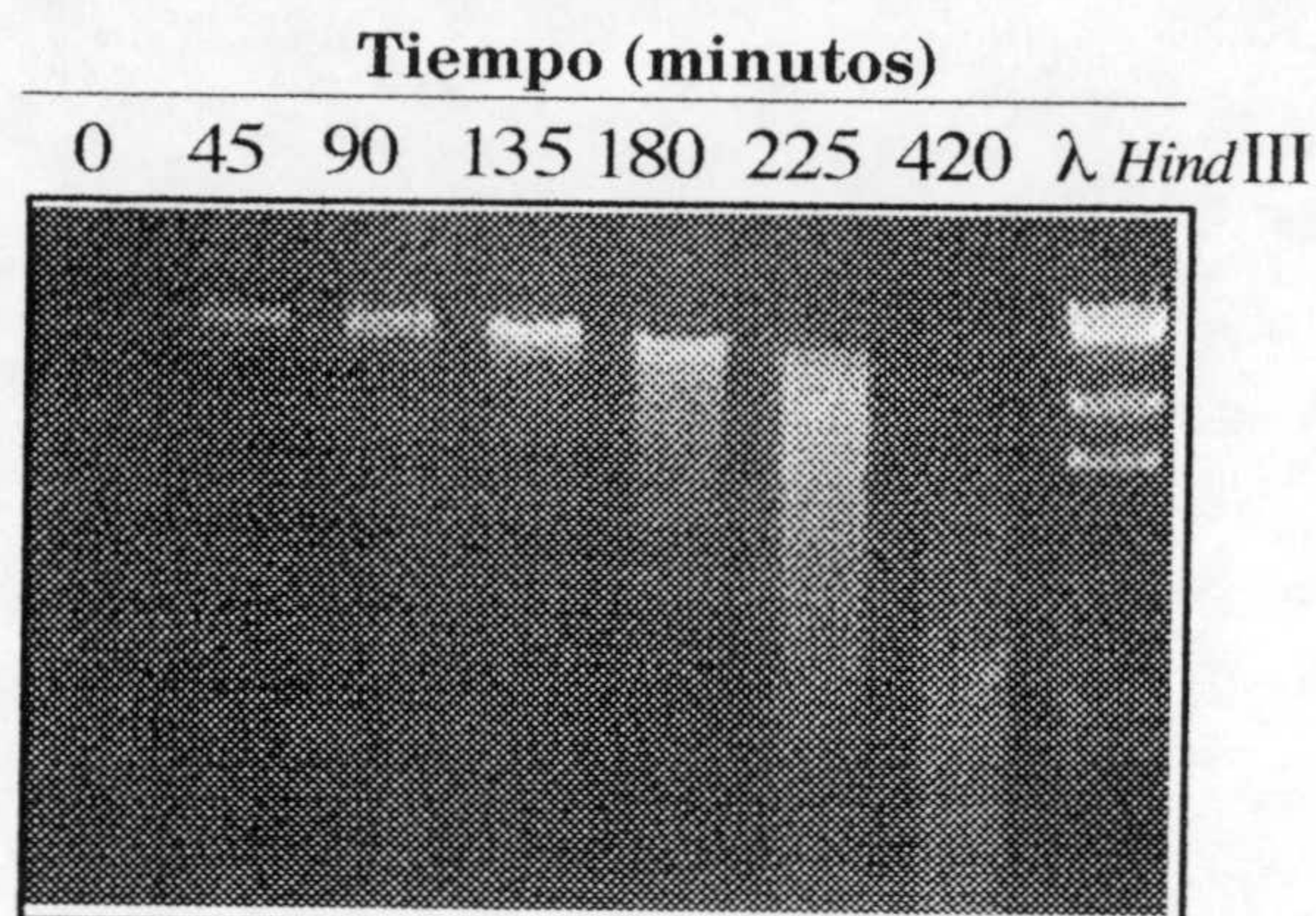


Figura 32. Liberación de ácidos nucleicos de *E. coli* JM109 (pMCC27) tras la expresión del gen *E* en presencia de IPTG

Se partió de células de *E. coli* JM109 (pMCC27) cultivadas como se describe en la leyenda de la Figura 31. La visualización de los ácidos nucleicos liberados se realizó en geles de agarosa como se describe en el apartado 11.3 de *Materiales y Métodos*.

418 pb resultante, que contenía la fusión $P_{A1-04/03}::\text{gen } E$, se clonó en el plásmido pUC18Not previamente digerido con las enzimas *Sall* y *HindIII*.

Como cepa receptora de esta construcción se utilizó *E. coli* JM109 y al plásmido resultante se denominó pMCC30 (Fig. 33). Tras digerir pMCC30 con *NotI*, el fragmento de 430 pb resultante se clonó en el sitio único *NotI* del plásmido pUT-Tel, localizado dentro del mini-Tn5. La mezcla de ligación se transformó en la cepa de *E. coli* Mv1190 λ *pir* y al plásmido resultante se denominó pMCC31 (Fig. 33).

La eficiencia del sistema en *E. coli* JM109 (pMCC30) y *E. coli* Mv1190 λ *pir* (pMCC31) se comprobó en medio sólido LB suplementado con los antibióticos adecuados en presencia y ausencia de 2 mM de IPTG. El resultado fue el esperado, las cepas crecieron en ausencia de IPTG y no en su presencia.

El plásmido suicida pMCC31 constituye la unidad básica del nuevo elemento *matador* del sistema de contención biológica.

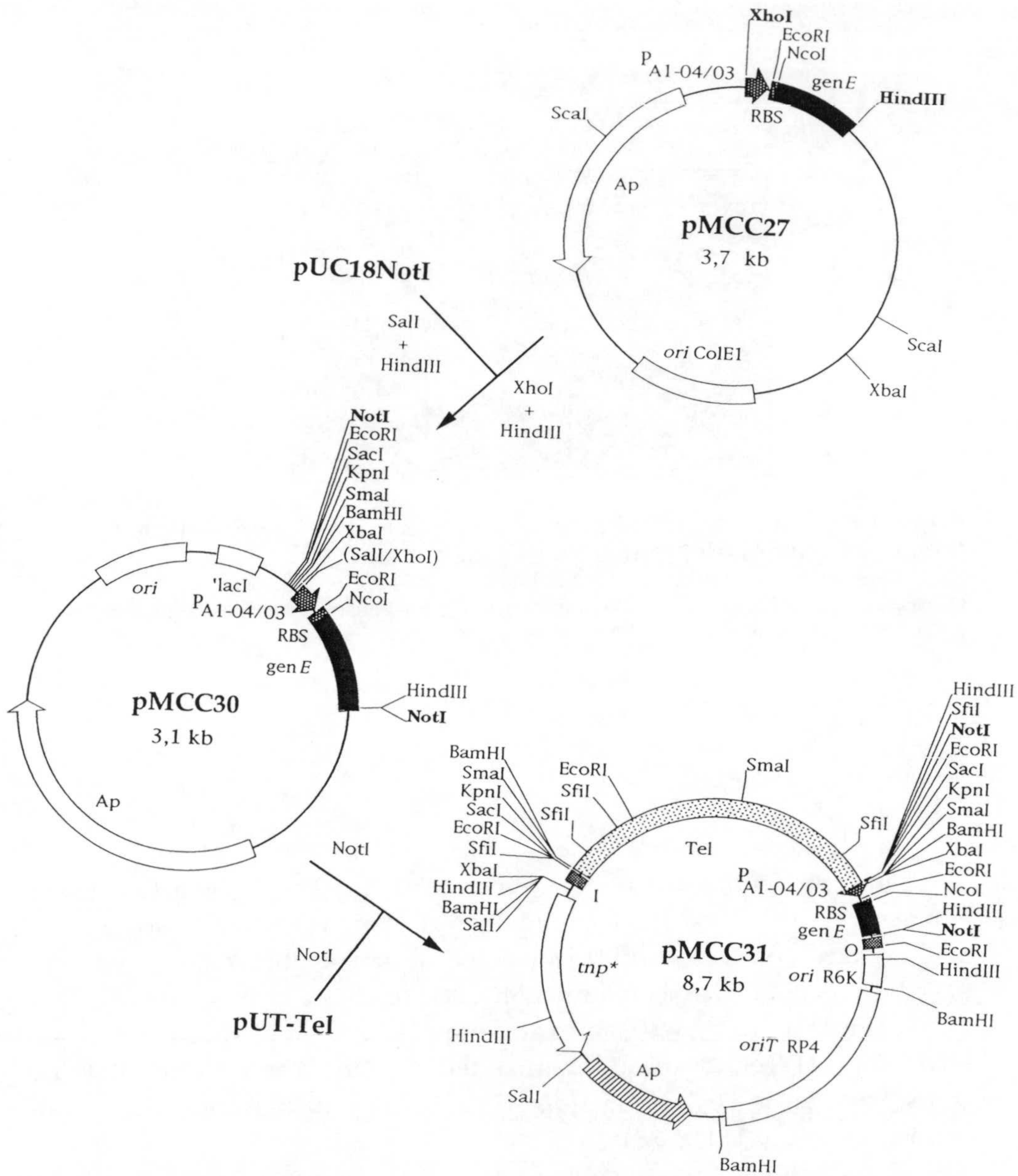


Figura 33. Construcción de los plásmidos pMCC30 y pMCC31

La construcción de los plásmidos se detalla en el texto. Se indican los genes que confieren resistencia a ampicilina (Ap) y telurito (Tel), y la fusión P_{A1-04/03}::genE a lo largo de las construcciones. En la construcción final, pMCC31, se indican los sitios de corte para distintas enzimas de restricción. Los bordes del mini-Tn5 se indican por las letras I (izquierdo) y O (derecho). Se indican además el gen que codifica la transposasa (*tnp**), el origen de replicación (*oriR6K*) y el origen de transferencia (*oriT RP4*).

2. Construcción y caracterización de una cepa contenida de *P. putida* basada en el gen *E* y su cepa control

2.1. Transferencia del elemento *matador* basado en el gen *E* al cromosoma de *P. putida* EEZ29

La transferencia del nuevo elemento *matador* al cromosoma de *P. putida* se realizó mediante conjugación tripartita entre *P. putida* EEZ29 (*P. putida* KT2440 portadora de los plásmidos pWW0 y pCC102) como cepa receptora, *E. coli* Mv1190 λ pir (pMCC31) como cepa donadora y *E. coli* HB101 (RK600) como cepa auxiliar. Los transconjugantes, seleccionados en medio mínimo M9 con 5 mM de 3MB como única fuente de carbono suplementado con Km y Tel (selecciona el mini-Tn5 portador del elemento *matador*), aparecieron con una frecuencia de 8×10^{-7} por receptor.

La eficiencia del nuevo sistema activo de contención biológica en *P. putida* se ensayó en primer lugar en medio sólido. Para ello los transconjugantes se estriaron en dos medios diferentes: medio mínimo M9 con 5 mM de 3MB como única fuente de carbono suplementado con Km y Tel, y medio mínimo M9 con 0,5% (p/v) de glucosa como única fuente de carbono suplementado con Km, Tel y 2 mM de IPTG. Los transconjugantes portadores del elemento *matador*, no formaron colonias en medio con glucosa e IPTG y sí en medio con 3MB. De todos los transconjugantes con este comportamiento se seleccionó uno al azar como nueva cepa contenida a la que se denominó *P. putida* CMC12.

La inserción del elemento *matador* P_{A1-04/03}::gen *E* se localizó en el cromosoma bacteriano en un sitio de baja frecuencia de movilización, como se dedujo de los siguientes hechos: a) no se observó co-transferencia del marcador de resistencia a Km presente en el plásmido pCC102 y el marcador de resistencia a telurito; b) la frecuencia de co-transferencia del plásmido TOL pWW0 y del marcador de resistencia a telurito fue inferior a 1×10^{-8} transconjugantes por receptor.

2.2. Construcción de la cepa control de *P. putida* CMC12

Para la construcción de una cepa control de *P. putida* CMC12, es decir, una cepa no portadora del sistema activo de contención biológica pero con la inserción del mini-Tn5/Tel en el cromosoma, se realizó una conjugación tripartita entre *P. putida* EEZ29 como cepa receptora, *E. coli* CC118 λ pir (pUT-Tel) como cepa donadora y *E. coli* HB101 (RK600) como cepa auxiliar.

La conjugación y la selección de los transconjugantes se realizó del mismo modo que para la cepa contenida. Los transconjugantes aparecieron a una frecuencia del orden de 10^{-6} transconjugantes por receptor. Se seleccionó al azar uno de estos transconjugantes al que se denominó *P. putida* CMC13.

La inserción del mini-Tn5/Tel se localizó en el cromosoma bacteriano en un sitio de baja movilización como se dedujo de los siguientes hechos: a) no se detectó co-transferencia del marcador de resistencia a Km presente en el plásmido pCC102 y del marcador de resistencia a telurito; b) la frecuencia de co-transferencia del plásmido TOL pWW0 y del marcador de resistencia a telurito fue inferior a 7×10^{-7} transconjugantes por receptor.

2.3. Caracterización de las cepas *P. putida* CMC12 y *P. putida* CMC13

2.3.1. Estabilidad de las cepas construidas

La estabilidad del marcador cromosómico, mini-Tn5/Tel, y del plásmido pCC102 se ensayó cultivando las cepas durante 50 generaciones en ausencia de presión selectiva, como se describe en el apartado 9 de *Materiales y Métodos*. Tanto la inserción cromosómica del mini-Tn5/Tel::P_{AI-04/03}::gen *E* como el plásmido pCC102 fueron estable en ambas cepas, ya que en ningún caso se detectó la pérdida de los marcadores de resistencia a los antibióticos, tras cultivar las cepas durante 50 generaciones en ausencia de Tel y Km.

2.3.2. Supervivencia de las cepas en presencia y ausencia de 3MB

Estos ensayos se realizaron para determinar el comportamiento de las cepas contenida, *P. putida* CMC12, y control, *P. putida* CMC13, tanto en presencia como en ausencia de 3MB en condiciones estándar de cultivo en el laboratorio.

P. putida CMC12 y *P. putida* CMC13 se cultivaron durante 10-12 horas en medio mínimo M9 con 15 mM de 3MB como única fuente de carbono suplementado con Km y Tel. Las células se recogieron por centrifugación y se lavaron 2 veces en tampón 1 x M9. Éstas se resuspendieron en medio mínimo M9 suplementado con Km y Tel para alcanzar una turbidez inicial de 0,02 a 660nm. El cultivo se dividió en dos fracciones alícuotas que se suplementaron con: 15 mM de 3MB como única fuente de carbono o con

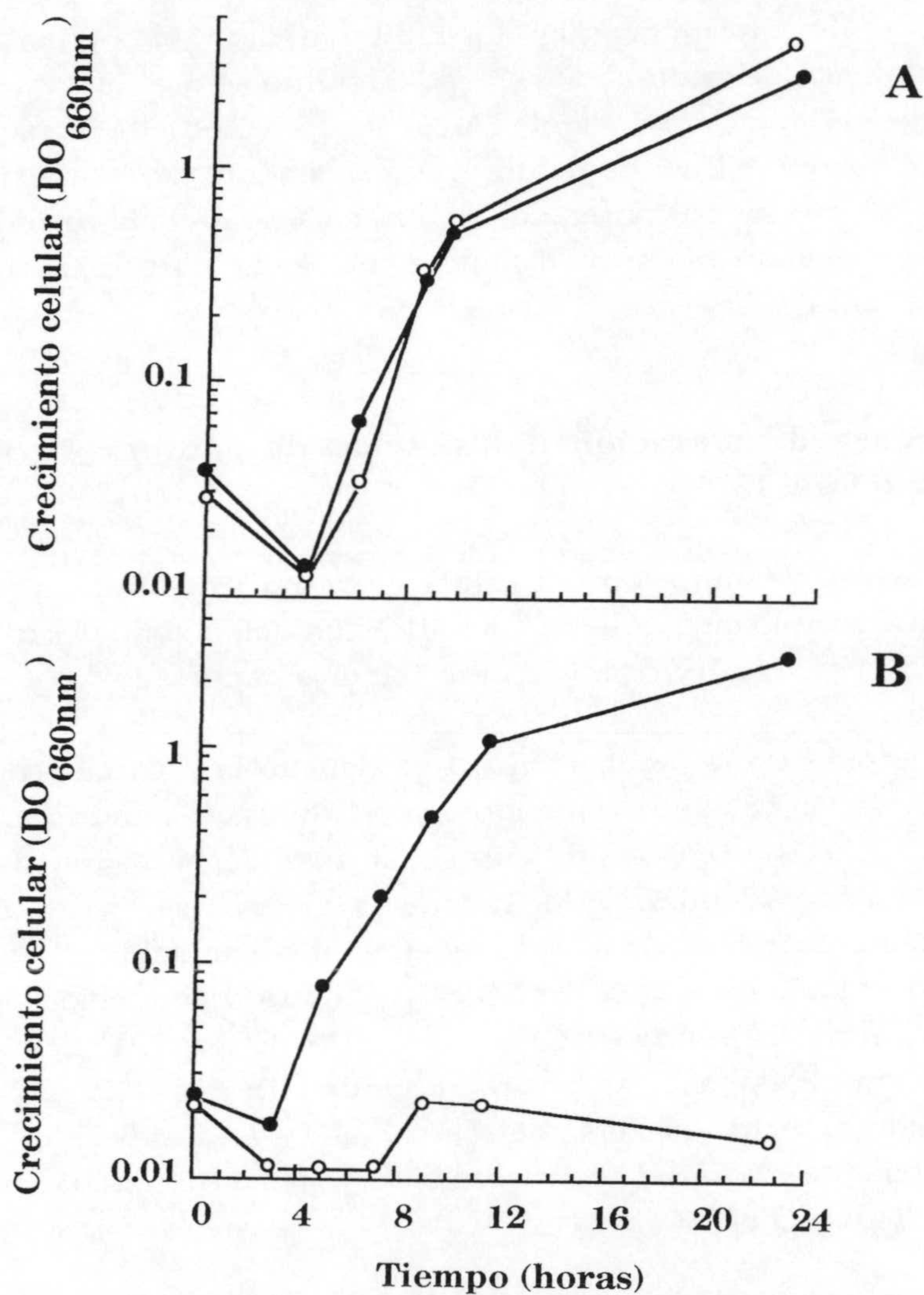


Figura 34. Crecimiento en medio líquido de cepas de *P. putida* portando o no un sistema de contención biológica

El crecimiento de *P. putida* CMC13 (A) y *P. putida* CMC12 (B) se determinó en medio mínimo M9 con Km y Tel a los que se añadió 0,5% (p/v) de glucosa (círculos abiertos) o 15 mM de 3MB (círculos cerrados).

0,5% (p/v) de glucosa como única fuente de carbono. A lo largo del tiempo se determinó la turbidez de los cultivos. Tras un periodo de latencia de 4 horas, la turbidez del cultivo de *P. putida* CMC13 aumentó en los dos medios de forma similar (Fig. 34A). Sin embargo, el comportamiento de la cepa contenida, *P. putida* CMC12, fue diferente en presencia y en ausencia de 3MB (Fig. 34B). En presencia de 3MB, tras un periodo de latencia de 3 horas, la turbidez del cultivo aumentó progresivamente de forma similar a la del cultivo de la cepa no contenida. En ausencia de 3MB, la turbidez del cultivo se mantuvo relativamente constante a una DO_{660} entre 0,01 y 0,02 hasta el final del ensayo.

2.3.3. Tasa de mutación del sistema de contención biológica en *P. putida* CMC12

La tasa de mutación por célula y por generación de la cepa *P. putida* CMC12 se calculó mediante una modificación del método descrito por Luria y Delbück (1943), tal y como se describe en el apartado 12 de *Materiales y Métodos*.

Después de la incubación, no se detectó la aparición de colonias en ninguna de las 18 cajas. Teniendo en cuenta que el número total de células fue de $1,5 \times 10^7$ UFC/ml de cultivo, la tasa de mutación del sistema de contención de *P. putida* CMC12 fue inferior a 10^{-8} por célula y por generación. Asumiendo que después de la incubación, hubiese aparecido al menos 1 colonia en una de las 18 cajas, la tasa de mutación del sistema de contención de *P. putida* CMC12 sería del orden de 10^{-9} por célula y por generación. Esta tasa supondría una disminución de 1-2 órdenes de magnitud, respecto al sistema de contención en *P. putida* CMC4 (pWW0) y de 2-3 órdenes de magnitud con respecto del sistema de contención presente en la cepa *P. putida* EEZ30.

2.4. Caracterización de la lisis celular en *P. putida* CMC12

El mecanismo de lisis celular en *E. coli* tras la inducción de la expresión del gen *E* ha sido estudiado en detalle a nivel bioquímico (Witte *et al.*, 1989), inmunológico (Bläsi *et al.*, 1989) y genético (Maratea *et al.*, 1985). La proteína E forma un tunel a través de las dos membranas celulares y en ese punto se produce la fusión de ambas membranas, lo que no permite la salida al medio de componentes periplásmicos, pero sí citoplásmicos (Witte

et al., 1990). Tras la inducción de la expresión del gen *E* en *E. coli* se produce un colapso en el potencial de membrana y una liberación de componentes citoplasmáticos al medio de cultivo, tales como iones, proteínas y ácidos nucleicos. En los apartados siguientes de este trabajo se presentan los experimentos realizados para caracterizar la lisis celular en *P. putida* CMC12 tras la inducción de la expresión del gen *E*.

Para la realización de todos los ensayos que se describen a continuación se partió de un preinóculo de la cepa *P. putida* CMC12 en medio mínimo M9 con 15 mM de 3MB como única fuente de carbono suplementado con Km y Tel. Cuando la turbidez del cultivo alcanzó un nivel de DO_{660} de 0,2, el cultivo se dividió en dos fracciones alícuotas. Las células de cada una de ellas se recogieron por centrifugación, se lavaron dos veces en tampón 1 x M9 y se resuspendieron en medio mínimo M9 suplementado con Km y Tel, una con 15 mM de 3MB como única fuente de carbono y otra con 0,5% (p/v) de glucosa como única fuente de carbono suplementado con 5 mM de IPTG.

2.4.1. Determinación del número de células viables de *P. putida* CMC12 tras la expresión del gen de lisis

Este ensayo se realizó para determinar si tras la expresión del gen *E* se producía un descenso en el número de células viables. Tras la transferencia de las células de *P. putida* CMC12 cultivadas en medio mínimo M9 con 3MB, a medio mínimo M9 con 3MB o medio mínimo M9 con glucosa e IPTG, se retiraron periódicamente muestras para determinar tanto la turbidez de los cultivos como el número de células viables. Éstas se determinaron sembrando diluciones de los cultivos en cajas de medio LB con 5 mM de 3MB suplementado con Km y Tel. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 35.

En presencia de 3MB el número de células viables de *P. putida* CMC12 aumentó desde 3×10^6 hasta 3×10^7 UFC/ml a las 24 horas después de comenzar el ensayo. Lo mismo ocurrió con la DO_{660} que aumentó desde 0,15 hasta 2,5 en ese mismo periodo de tiempo (Fig. 35A). En presencia de glucosa e IPTG, el número de células viables disminuyó desde 3×10^6 hasta 1×10^3 UFC/ml a las 24 horas después de la adición del IPTG (Fig. 35B). En este medio la DO_{660} disminuyó ligeramente desde 0,15 hasta 0,11 en el mismo periodo de tiempo. La disminución en el número de células viables en presencia de glucosa e IPTG indica que la expresión del gen *E* en *P. putida* conduce a la muerte celular.

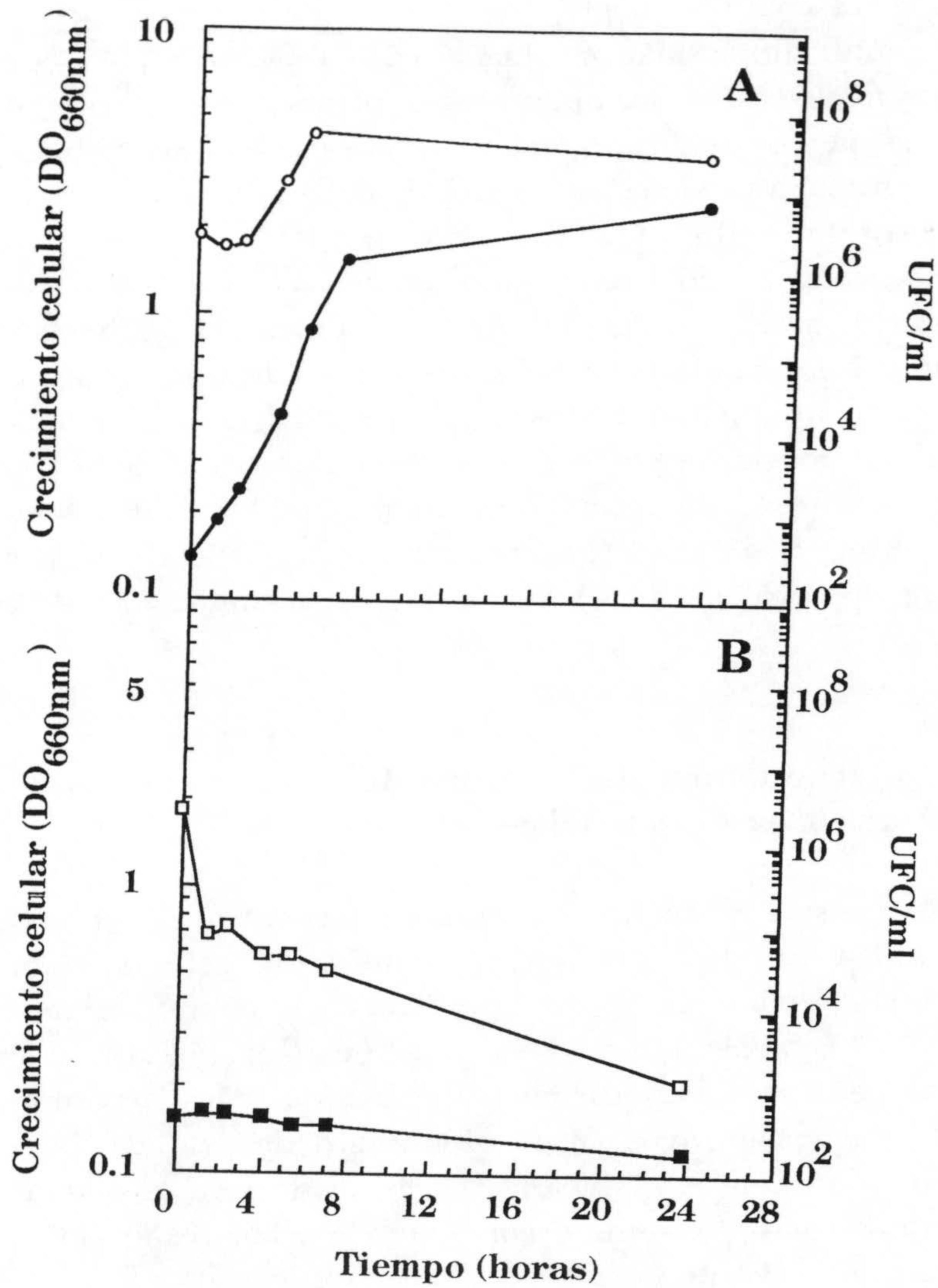


Figura 35. Conteo de células viables tras la expresión del gen de lisis en *P. putida* CMC12

Se cultivó *P. putida* CMC12 en medio mínimo M9 con 15 mM de 3MB como única fuente de carbono suplementado con Km y Tel hasta alcanzar una DO₆₆₀ de 0,2-0,3. En ese momento las células se recogieron por centrifugación, se lavaron en tampón 1 x M9 y se dividieron en dos fracciones alícuotas, una como la inicial (A) y otra con 0,5% (p/v) de glucosa como única fuente de carbono suplementado con 5 mM de IPTG, Km y Tel (B). A los tiempos indicados se determinó la DO₆₆₀ (símbolos cerrados) y el número de células viables de los cultivos (símbolos abiertos).

2.4.2. Liberación de proteínas de células de *P. putida* CMC12 tras la expresión del gen de lisis

Con objeto de determinar si tras la expresión del gen de lisis se producía la liberación de proteínas al medio de cultivo, se analizaron los sobrenadantes de los cultivos inducidos mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS como se describe en el apartado 11.4 de *Materiales y Métodos*. Como control se usaron sobrenadantes de cultivos de *P. putida* CMC12 sin inducir. Una hora y media después de la adición de IPTG se observó la aparición de proteínas en el medio de cultivo (Fig. 36). La toma de muestras continuó hasta 6 horas después de la adición del inductor, y la liberación de proteínas fue en aumento durante dicho periodo de tiempo. Este resultado indica que tras la inducción de la expresión del gen *E* en los cultivos de *P. putida* CMC12, se produce liberación de proteínas al medio como consecuencia de la lisis celular. En los sobrenadantes de los cultivos en los que no se había inducido la expresión del gen *E* no se observó liberación de proteínas al medio de cultivo (datos no mostrados).

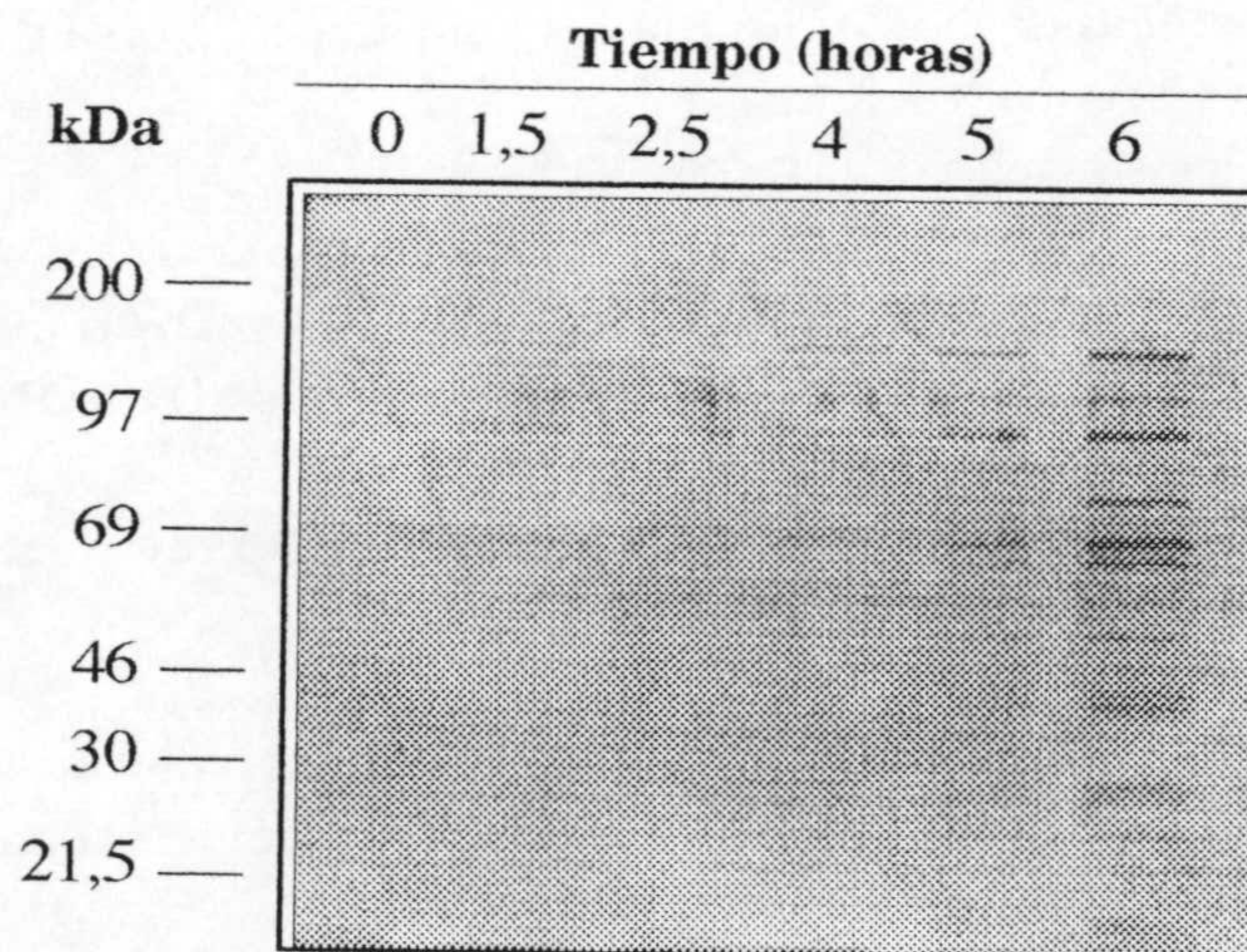


Figura 36. Liberación de proteínas de *P. putida* CMC12 tras la expresión del gen *E*

Las células de *P. putida* CMC12 se indujeron como se describe en la leyenda de la Figura 35. Los sobrenadantes se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS y se visualizaron con nitrato de plata, tal y como se describe en *Materiales y Métodos*.

2.4.3. Visualización de la lisis celular mediante microscopía electrónica

Células de *P. putida* CMC12 que se habían transferido a medio de cultivo con IPTG se analizaron mediante microscopía electrónica de transmisión como se describe en el apartado 11.6 de *Materiales y Métodos*. Las muestras de *P. putida* CMC12 se tomaron a diferentes tiempos después de la adición del inductor, lo cual aseguraba la presencia de células en diferentes estados de lisis celular. Al igual que se describió en el apartado 3.4 del capítulo III de *Resultados*, se determinó el porcentaje de células normales y fantasmas a distintos tiempos contando el número de cada una de ellas en 5 microfotografías, dividiendo por el número de células totales y multiplicando por 100.

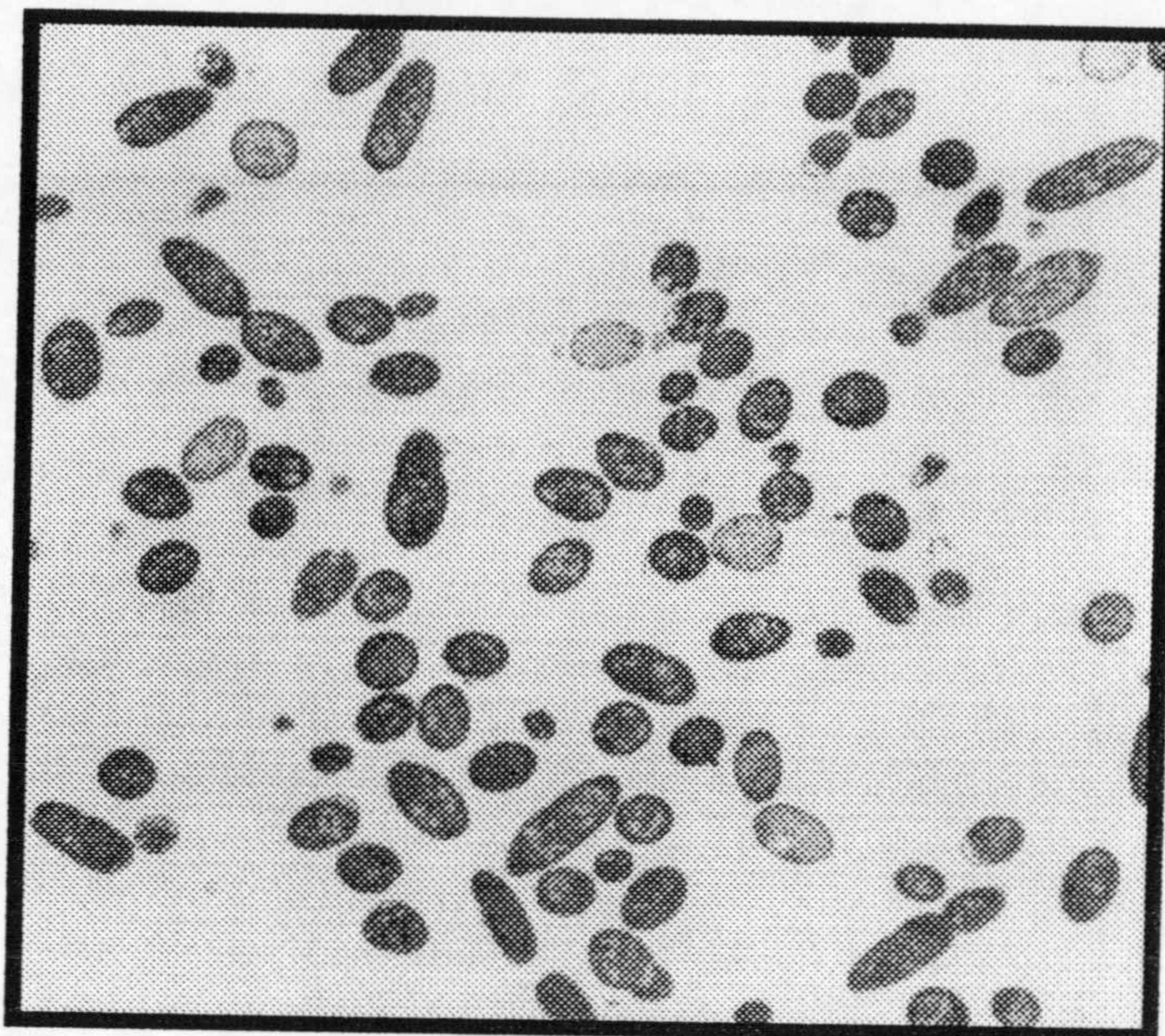
En el momento de la inducción de la expresión del gen *E* el 92% de las células presentaban una morfología normal (Fig. 37A). A la hora y media después de la adición del inductor el 60% del total de las células estaban lisadas, presentando el aspecto de células fantasmas. A las 3 horas el número de células fantasmas ascendió hasta el 80% del total (Fig. 37B). En la Figura 38 se muestra una célula fantasma a las tres horas después de la inducción de la expresión del gen *E*. Como puede observarse, la membrana presentó numerosas discontinuidades que hacen que la viabilidad de la célula no sea posible.

3. Construcción de una cepa contenida de *P. putida* portadora de un sistema activo de contención biológica con dos elementos *matadores*

3.1. Transferencia del elemento *matador* basado en el gen *E* al cromosoma de *P. putida* CMC4 (pWW0)

Una vez comprobado que el gen *E* fue funcional en *Pseudomonas*, el elemento *matador* basado en dicho gen se transfirió a la cepa *P. putida* CMC4 (pWW0), la cual poseía los elementos regulador y *matador* insertados en el cromosoma (Capítulo III), obteniéndose así una cepa contenida biológicamente con dos elementos *matadores*. La transferencia del elemento *matador* basado en el gen *E* al cromosoma de *P. putida* CMC4 (pWW0) se realizó mediante conjugación tripartita entre *P. putida* CMC4 (pWW0) como cepa receptora, *E. coli* Mv1190 λ *pir* (pMCC31) como cepa donadora y *E. coli* HB101 (RK600) como cepa auxiliar. Los transconjugantes se seleccionaron en medio mínimo M9 con 5 mM de 3MB como única fuente de carbono

A



B

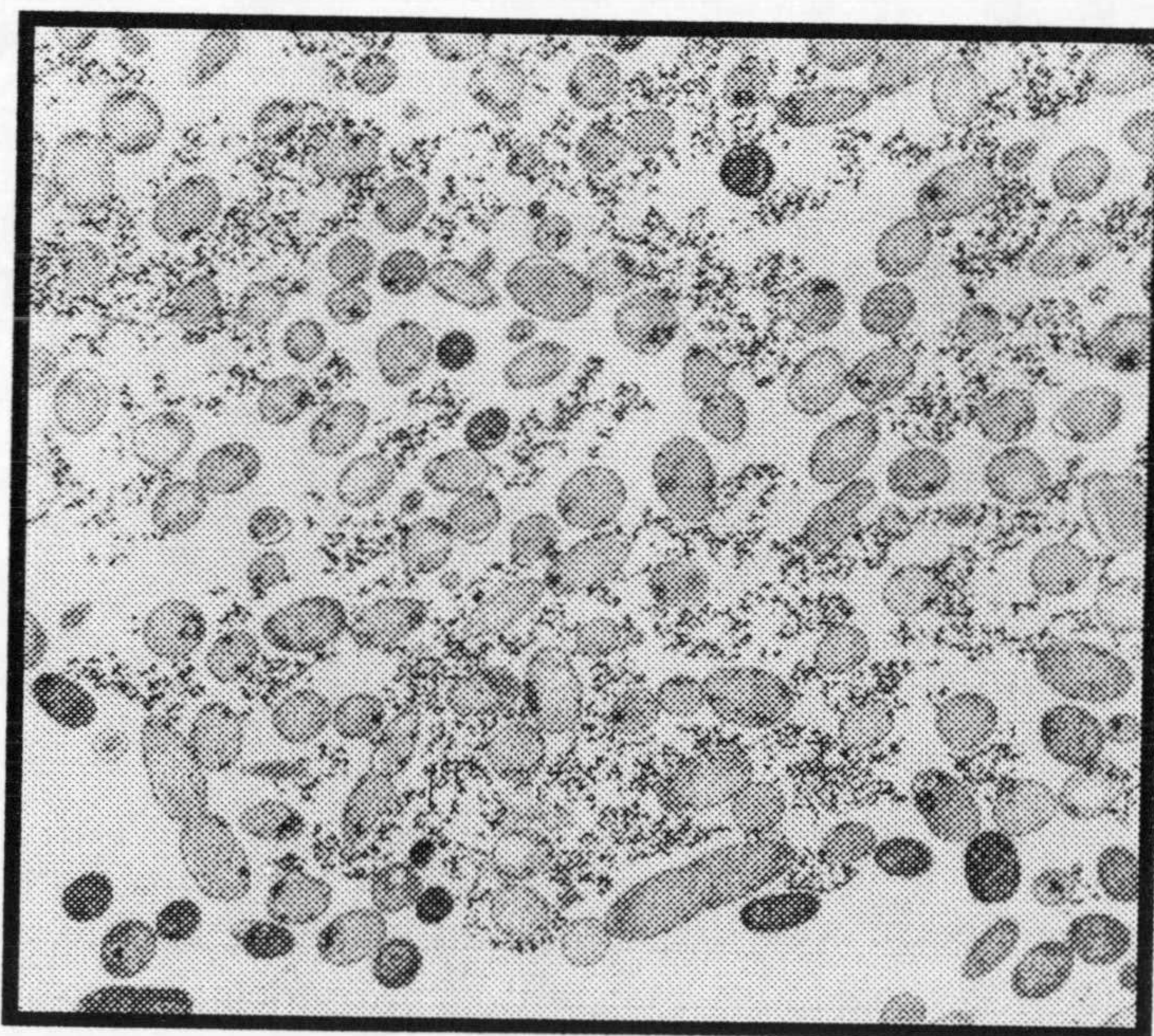


Figura 37. Micrografía electrónica de transmisión (4000X) de un cultivo de *P. putida* CMC12 sin inducir (A) y 3 horas después de la expresión del gen *E* (B).

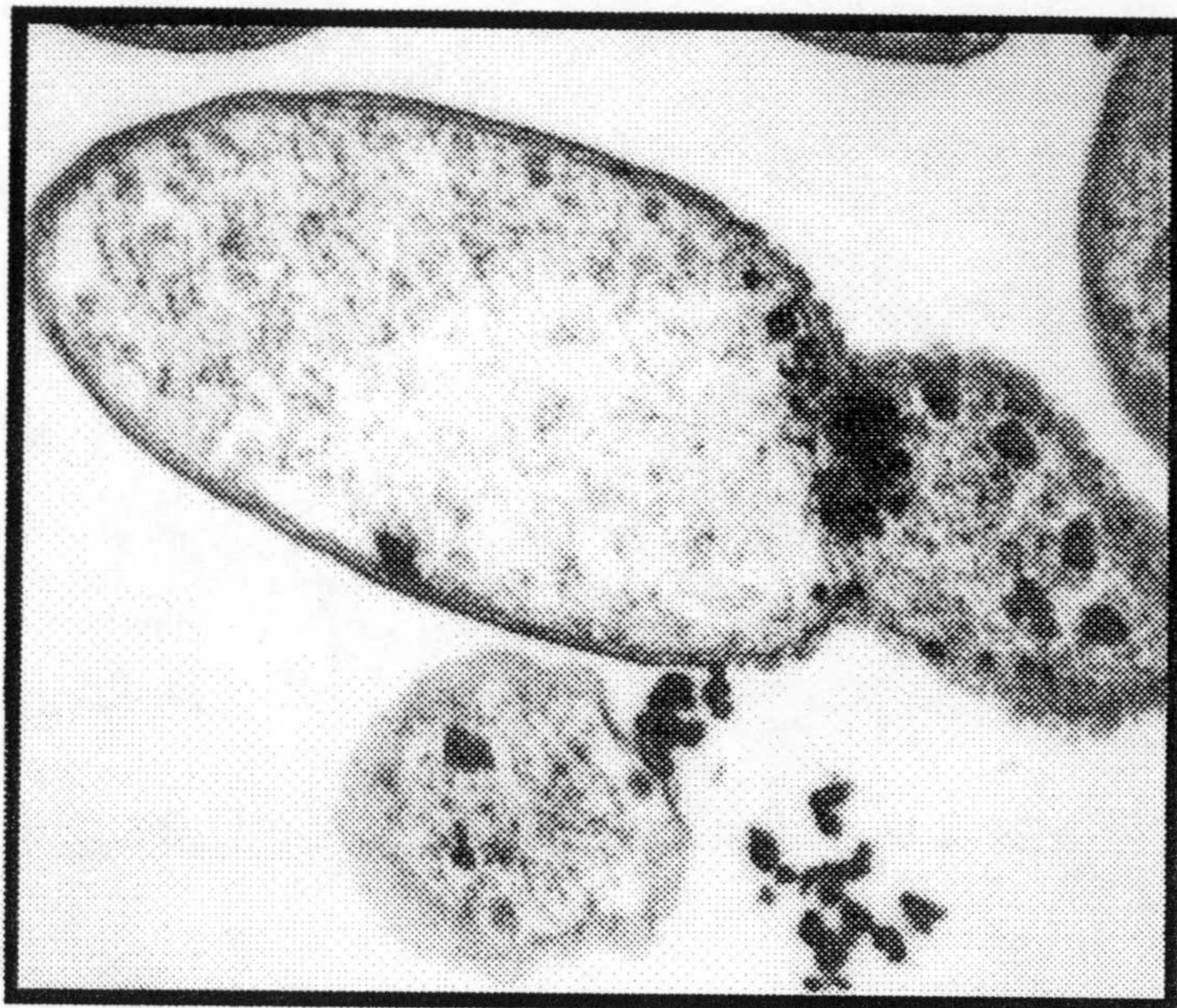


Figura 38. Micrografía electrónica de transmisión (40000X) de una célula de *P. putida* CMC12 después de 3 horas de la inducción de la expresión del *gef gef*.

suplementado con Km y Tel (selecciona el mini-Tn5 portador del elemento *matador*) y aparecieron con una frecuencia de 10^{-7} transconjugantes por receptor.

La eficiencia del nuevo sistema activo de contención biológica en *P. putida* no se pudo comprobar en medio sólido, ya que la cepa receptora poseía un elemento *matador* y, por tanto, la ausencia de crecimiento en medio mínimo con 0,5% (p/v) de glucosa como única fuente de carbono y suplementado con 2 mM de IPTG, no indicaría la integración del nuevo elemento *matador* en la cepa. De los transconjugantes Tel^r obtenidos, se seleccionó uno al azar al que se denominó *P. putida* CMC15. Para comprobar

que, en efecto, esta cepa poseía los dos elementos *matadores*, se aisló ADN total de la cepa y las fusiones $P_{A1-04/03}::gef$ y $P_{A1-04/03}::gen E$ se amplificaron por PCR utilizando los oligonucleótidos OCM13-OCM14 y OCM13-OCM15, respectivamente. En ambos casos se obtuvo un fragmento de ADN del tamaño esperado, el cual se secuenció usando los mismos oligonucleótidos. La secuencia de ambas fusiones fue la correcta.

La integración del mini-Tn5/Tel:: $P_{A1-04/03}::gen E$ en el cromosoma de la cepa y no en el plásmido pWW0 se comprobó mediante conjugación bipartita entre *P. putida* CMC15 como cepa donadora y *P. putida* UWC1 (pCC102) como cepa receptora, como se ha descrito anteriormente. La ausencia de co-transferencia de la capacidad de crecer en 3MB y del marcador de resistencia a telurito confirmó la inserción de este marcador en el cromosoma de *P. putida* CMC15, en un lugar de baja movilización por el plásmido TOL pWW0 (del orden de 1×10^{-7} transconjugantes por receptor).

3.2. Construcción de la cepa control *P. putida* CMC16

Para la construcción de una cepa control de *P. putida* CMC15, es decir, una cepa no portadora del sistema activo de contención biológica pero con la inserción del mini-Tn5/Tel en el cromosoma, se realizó una conjugación tripartita entre *P. putida* EEZ15K-3 (pWW0) como cepa receptora, *E. coli* CC118 λ *pir* (pUT-Tel) como cepa donadora y *E. coli* HB101 (RK600) como cepa auxiliar. La conjugación y la selección de los transconjugantes se realizó de igual manera que para la cepa contenida. Los transconjugantes aparecieron a una frecuencia de 10^{-6} transconjugantes por receptor. Como fue de esperar, todos los transconjugantes formaron colonias en medio mínimo M9 con 0,5% (p/v) de glucosa como única fuente de carbono suplementado con Km, Tel y 2 mM de IPTG así como en medio mínimo M9 con 5 mM de 3MB como única fuente de carbono suplementado con Km y Tel. Se seleccionó al azar uno de estos transconjugantes al que se denominó *P. putida* CMC16.

La inserción del mini-Tn5/Tel se localizó en el cromosoma bacteriano en un sitio de baja movilización como se dedujo del hecho de que la frecuencia de co-transferencia de la capacidad de crecer en 3MB y del marcador de resistencia a telurito fuese del orden de 6×10^{-7} transconjugantes por receptor.

3.3. Caracterización de las cepas contenida *P. putida* CMC15 y su control *P. putida* CMC16

3.3.1. Estabilidad de las cepas construidas

La estabilidad del marcador cromosómico de resistencia a telurito en *P. putida* CMC15 y *P. putida* CMC16 se ensayó como se describe en el apartado 9 de *Materiales y Métodos*. La inserción cromosómica portadora del mini-Tn5/Tel fue estable en dichas cepas, ya que tras cultivar las cepas durante 50 generaciones en ausencia de Tel, no se detectó pérdida del marcador cromosómico.

3.3.2. Supervivencia de las cepas en presencia y en ausencia de 3MB

Estos ensayos se realizaron para determinar el comportamiento de las cepas contenida y control tanto en presencia como en ausencia de 3MB en condiciones estándar de cultivo en el laboratorio.

Las células se cultivaron durante 10-12 horas en medio mínimo M9 con 15 mM de 3MB suplementado con Km y Tel. Las células se recogieron por centrifugación y se lavaron 2 veces en tampón 1 x M9. Éstas se resuspendieron en medio mínimo M9 suplementado con Km y Tel para alcanzar una turbidez inicial de 0,02 a 660nm. El cultivo se dividió en dos fracciones alícuotas que se suplementaron con: 15 mM de 3MB como única fuente de carbono o con 0,5% (p/v) de glucosa como única fuente de carbono. A lo largo del tiempo se determinó la turbidez de los cultivos. Tras un periodo de latencia de 5 horas, la cepa no contenida biológicamente, *P. putida* CMC16, creció en los dos medios de forma similar (Fig. 39A). Sin embargo, el comportamiento de la cepa contenida, *P. putida* CMC15, fue diferente en presencia y en ausencia de 3MB (Fig. 39B). En presencia de 3MB, la DO_{660} aumentó constantemente de forma similar a la cepa no contenida. Sin embargo, en ausencia de 3MB la turbidez del cultivo disminuyó hasta alcanzar una DO_{660} de 0,01, 5 horas después de la inducción de la expresión de los genes *matadores*, posteriormente aumentó hasta el nivel de turbidez al que había sido inoculado y se mantuvo relativamente constante a ese nivel hasta el final del ensayo. La turbidez del cultivo no aumentó incluso 52 horas después de iniciado el ensayo.

Estos resultados sugieren que se había obtenido una cepa mejorada respecto de *P. putida* CMC4 (pWW0), ya que esta nueva cepa para su crecimiento en ausencia de 3MB.

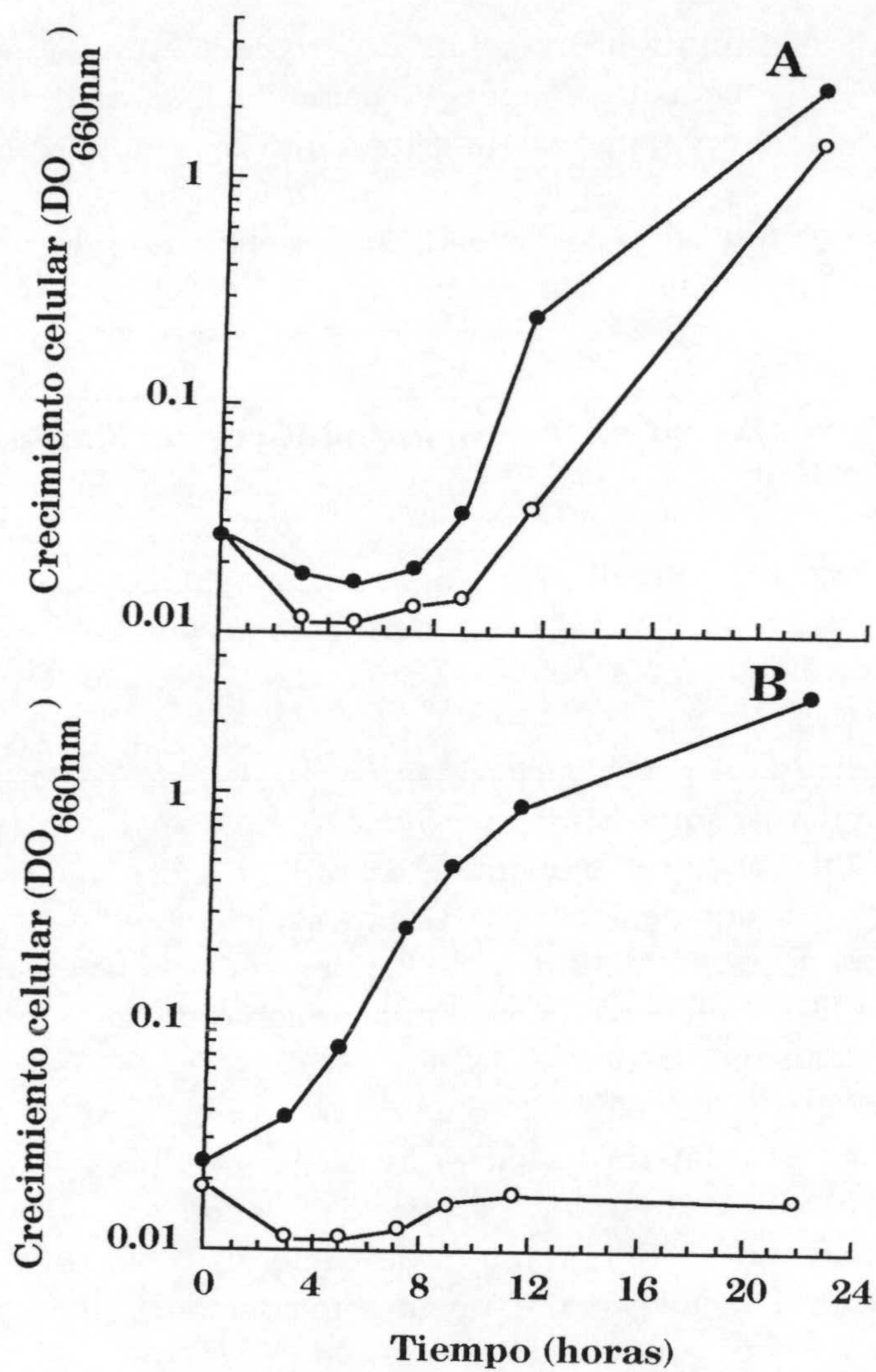


Figura 39. Crecimiento en medio líquido de cepas de *P. putida* portando o no un sistema de contención biológica

El crecimiento de *P. putida* CMC16 (A) y *P. putida* CMC15 (B) se determinó en medio mínimo M9 con Km y Tel a los que se añadió 0,5% (p/v) de glucosa (círculos abiertos) o 15 mM de 3MB (círculos cerrados).

3.3.3. Tasa de mutación del sistema de contención biológica en *P. putida* CMC15

La tasa de mutación por célula y por generación de la cepa *P. putida* CMC15 se calculó mediante una modificación del método descrito por Luria y Delbück (1943), tal y como se describe en el apartado 12 de *Materiales y Métodos*.

La tasa de mutación del sistema de contención de *P. putida* CMC15 fue inferior a 10^{-8} por célula y por generación.

3.4. Supervivencia en microcosmos edáficos de *P. putida* CMC15 y *P. putida* CMC16

Estos ensayos se realizaron en suelo fluvisol, cuyas características se recogen en las Tablas 6 y 7 de *Materiales y Métodos*. La preparación de los inóculos y la toma de muestras se realizó como se describe en el apartado 13 de *Materiales y Métodos*.

Se analizó la supervivencia de las cepas *P. putida* CMC15 y *P. putida* CMC16 en microcosmos suplementados o no con 0,1% (p/p) de 3MB, mantenidos a temperatura ambiente ($18 \pm 2^\circ \text{C}$) e inoculados con un número de bacterias del orden de 5×10^5 UFC/g de suelo.

En presencia de 3MB el comportamiento de ambas cepas fue similar (Fig. 40A y 40B). El número de bacterias aumentó durante los tres primeros días hasta alcanzar alrededor de 8×10^7 UFC/g de suelo para la cepa *P. putida* CMC16 y 4×10^7 UFC/g de suelo para la cepa *P. putida* CMC15. Posteriormente el número de bacterias disminuyó progresivamente hasta alrededor de 10^6 UFC/g de suelo después de 30 días.

En ausencia de 3MB el número de bacterias de la cepa no contenida, *P. putida* CMC16, se mantuvo relativamente constante alrededor de 1×10^6 UFC/g de suelo durante todo el ensayo (Fig. 40A). Sin embargo, el comportamiento de la cepa contenida, *P. putida* CMC15, fue ligeramente diferente (Fig. 40B). El número de bacterias se mantuvo relativamente constante durante los primeros 15 días y, posteriormente disminuyó hasta alcanzar 5×10^4 UFC/g de suelo al final del ensayo.

Se evaluó el efecto de la introducción de *P. putida* CMC15 y *P. putida* CMC16 sobre la población de bacterias indígenas del suelo capaz de crecer en medio mínimo M9 con pOHFA como única fuente de carbono. El número de bacterias de esta población se mantuvo alrededor de 3×10^6 UFC/g de suelo

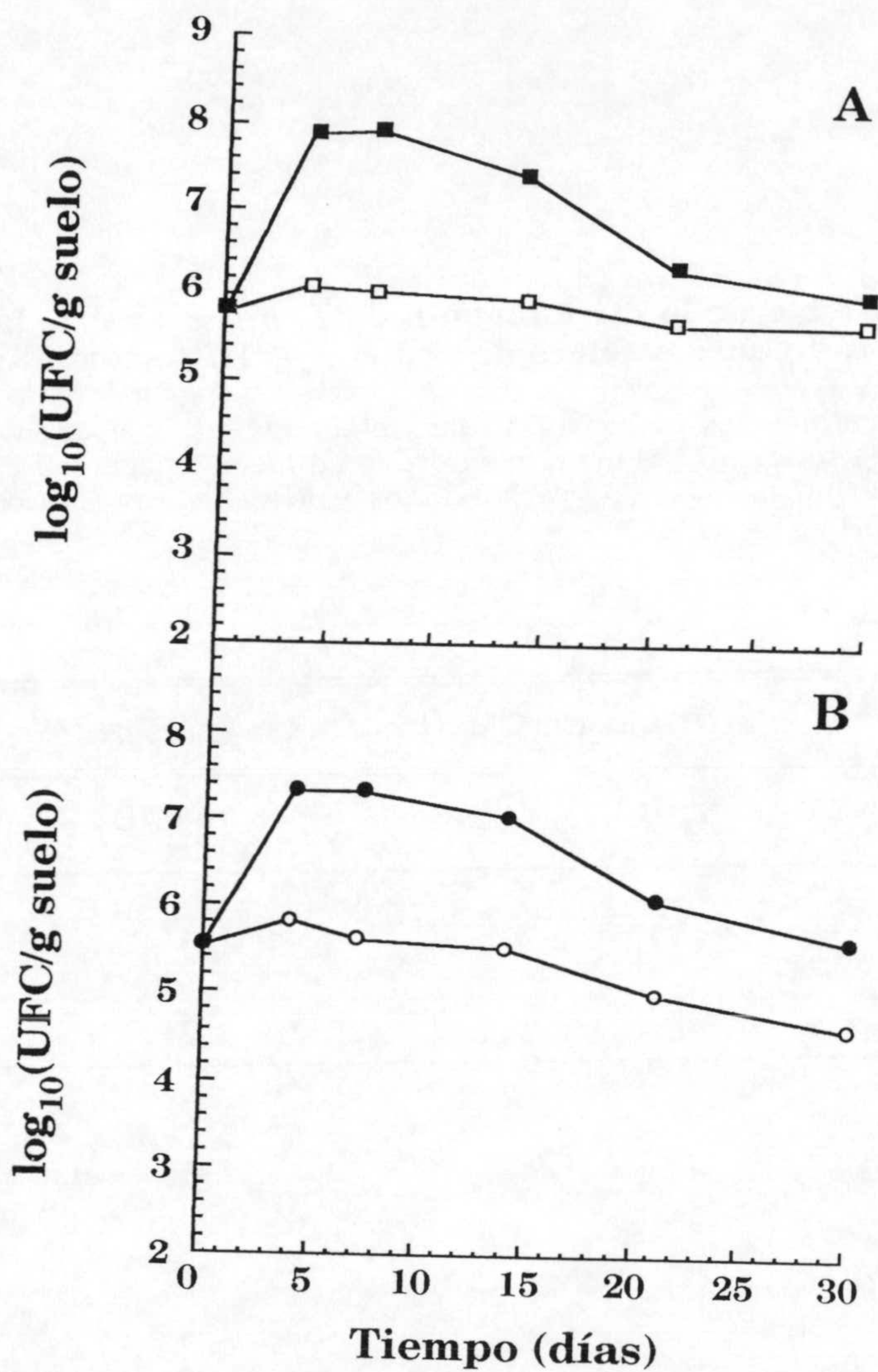


Figura 40. Supervivencia de *P. putida* en suelo

Alrededor de 5×10^5 UFC/g de suelo de *P. putida* CMC16 (cuadrados) o *P. putida* CMC15 (círculos) se inocularon en 90 g de suelo suplementados (símbolos cerrados) o no (símbolos abiertos) con 0,1% de 3MB. A los tiempos indicados se determinó el número de UFC/g de suelo en medio selectivo.

durante los 30 días que duró el ensayo tanto en presencia como en ausencia de 3MB e independientemente de la cepa introducida (Tabla 16).

Tabla 16. Efecto de la introducción de *P. putida* sobre la población de bacterias indígenas capaces de utilizar pOHFA como única fuente de carbono

Las condiciones fueron como las detalladas en la leyenda de la Figura 40, excepto que se determinó el número de UFC/g de suelo de bacterias capaces de utilizar pOHFA como única fuente de carbono. Los valores se expresan como el \log_{10} del número de UFC/g de suelo.

Tiempo (días)	<i>P. putida</i> CMC15		<i>P. putida</i> CMC16	
	-3MB	+3MB	-3MB	+3MB
0	6,70	6,70	6,51	6,51
30	6,10	6,49	6,27	6,66

DISCUSIÓN



La manipulación genética de bacterias no patógenas del género *Pseudomonas*, cuyo hábitat es el suelo y la rizosfera de plantas, ha suscitado un considerable interés en los últimos años debido, fundamentalmente, al hecho de que la bacteria mejor estudiada en el laboratorio, *E. coli*, no puede expresar adecuadamente muchos determinantes genéticos en determinados hábitats como suelos agrícolas, plantas de tratamiento de aguas residuales, etc.

La degradación biológica de contaminantes, conocida como biorremediación, conlleva varias ventajas frente a los métodos tradicionales físico-químicos: i) no suele generar de manera secundaria compuestos recalcitrantes tóxicos, ii) tiene bajo coste económico, iii) puede emplearse en tratamientos *in situ* y *ex situ* y, iv) es versátil, permitiendo la degradación simultánea de compuestos con diferentes estructuras y sustituyentes. Sin embargo, muchos compuestos químicos son recalcitrantes y su degradación requiere la manipulación de rutas existentes de manera que, alterándolas o combinándolas de una manera juiciosa, se pueda incrementar la degradación de tóxicos ambientales. En este sentido, la manipulación y construcción de nuevas cepas del género *Pseudomonas* es un área en plena expansión, como se ha mencionado anteriormente en la *Introducción*. Sin embargo, la posible utilización de cepas manipuladas genéticamente en ambientes naturales, requiere primero un estudio detallado de su comportamiento y funcionamiento. El comportamiento y funcionamiento de los organismos modificados genéticamente (OMGs) se ha estudiado en condiciones controladas mediante el uso de microcosmos, como vía de alcanzar conclusiones sobre su comportamiento y funcionamiento en ecosistemas naturales. Sin embargo, la evaluación final de esta tecnología requiere el seguimiento de los OMGs en condiciones naturales mediante la realización de ensayos controlados de campo. La posible liberación de OMGs al medio ambiente ha generado serias preocupaciones debido a los limitados conocimientos que se poseen sobre la supervivencia y funcionamiento de éstos en hábitats naturales (Ramos *et al.*, 1995), así como a los posibles riesgos asociados a la transferencia del ADN recombinante a otros microorganismos del suelo.

Con objeto de incrementar la capacidad de predicción del comportamiento de OMGs, se ha propuesto la utilización de sistemas activos de contención biológica. Esto es, proveer a los microorganismos que se deseen liberar con un sistema de control de su supervivencia, de forma que, idealmente, una vez terminada la función para la que han sido diseñados, por

ejemplo, degradación de xenobióticos, control de plagas, vacunas vivas, etc, se produzca la expresión de genes que conduzcan a la muerte celular.

En este trabajo se ha construido y evaluado un sistema modelo de contención biológica para la degradación de alquilbenzoatos en *Pseudomonas* basado en dos genes *matadores* diferentes, el gen *gef* de *E. coli* y el gen *E* del fago Φ X174.

1. Sistema de contención basado en el gen *gef* y el elemento regulador en un plásmido

Contreras *et al.* (1991) describieron un sistema modelo de contención biológica en *E. coli* basado en el gen *gef*, asociado a la eliminación de alquilbenzoatos. El sistema consta de dos elementos, uno regulador y otro *matador*. El elemento regulador está formado por la proteína reguladora *xyIS* y la fusión del promotor P_m al gen *lacI*. Para la construcción del elemento *matador* el gen *gef* se fusionó al promotor sintético P_{tac} . El funcionamiento del sistema se explicó en el apartado 4 de la *Introducción*. En el sistema original utilizado por Contreras *et al.* (1991) aparecieron colonias resistentes a la expresión/acción del gen *gef* (Gef^R) con una frecuencia del orden de 10^{-6} por célula y por generación. En un sistema análogo, Knudsen y Karlström (1991) analizaron los factores que aumentaban la supervivencia en *E. coli* después de la inducción de la expresión del gen *relF*, el cual es homólogo del gen *gef*. Estos autores sugirieron que, los factores que limitaban la muerte fueron: i) la tasa de mutación del sistema y, ii) el nivel basal de expresión subletal del gen *matador*. En relación con la primera posibilidad, las mutaciones del sistema pueden estar localizadas tanto en el gen *matador* o en su sistema de expresión, como en el blanco de estas proteínas. En relación con la segunda opción, si la célula lleva un gen *matador* regulable que no está totalmente reprimido bajo condiciones de no inducción, el nivel basal de expresión de dicho gen puede afectar negativamente al crecimiento, si dicho nivel no es suficiente para causar la muerte celular. En estas condiciones, las mutaciones que impidan la expresión del gen *matador* aumentarán la tasa de crecimiento de dichos mutantes con respecto al resto de la población y, con el tiempo, la población bacteriana se enriquecerá en mutantes resistentes a la muerte. Por tanto, en sistemas de contención de este tipo, la expresión basal del gen *matador* debe ser lo más baja posible.

El promotor P_{tac} no presenta un buen nivel de regulación. Por tanto, la represión defectuosa del gen *matador* puede producir una selección de

mutantes que hayan perdido la función suicida. Por este motivo, al utilizar el sistema de contención descrito por Contreras *et al.* (1991) en *Pseudomonas*, se pensó sustituir el promotor P_{tac} por un promotor con una regulación mucho más estricta. El promotor elegido fue el promotor sintético $P_{A1-04/03}$ (Lanzer y Bujard, 1988). En dicho promotor el nivel de represión ejercido por la proteína LacI es más de 100 veces superior al que se produce sobre el promotor P_{tac} . Además, el nivel de expresión desde dicho promotor tras la inducción con IPTG, es el doble que desde el promotor P_{tac} (H. Bujard, comunicación personal).

La eficiencia del elemento *matador* $P_{A1-04/03}::gef$ se probó en la cepa *E. coli* JM109, portadora de dicha fusión en el plásmido pMCC22 (Fig. 6). El comportamiento de la cepa tras la inducción del sistema de contención, demostró que el sistema funcionó según lo diseñado (Fig. 7). La inducción del sistema con IPTG resultó en una disminución de la turbidez del cultivo, mientras que las células crecieron en ausencia del inductor. Estos resultados están en consonancia con los obtenidos por otros autores como Klemm *et al.* (1995); Molin *et al.* (1987); Bej *et al.* (1992); Knudsen *et al.* (1995) quienes utilizaron distintos genes de la familia *hok* en *E. coli* y, en todos los casos, se produjo una disminución en la densidad óptica y/o en el número de células viables de los cultivos. La disminución de la turbidez y del número de células viables del cultivo tras la adición de IPTG (la señal de inducción de muerte) se debía a lisis celular, como se comprobó en este estudio mediante ensayos de liberación de ácidos nucleicos y de proteínas al medio de cultivo.

El elemento *matador* $P_{A1-04/03}::gef$ se transfirió al cromosoma de la cepa *P. putida* KT2440 utilizando un transposón mini-Tn5/Tc, via conjugación. Esta cepa portaba los plásmidos TOL pWW0 y pCC102, en el último de los cuales se localizó el elemento regulador formado por la fusión $P_m::lacI$ y el regulador *xyIS2* (Contreras *et al.*, 1991). *P. putida* KT2440 ($pWW0, pCC102::mini-Tn5/Tc::P_{A1-04/03}::gef$) (*P. putida* EEZ30) funcionó en pruebas de laboratorio según lo diseñado (Fig. 11). Las células crecieron en presencia de 3MB y no en su ausencia. En ausencia de 3MB y presencia de glucosa la DO_{660} del cultivo aumentó debido a la aparición de mutantes resistentes a la lisis, como se demostró posteriormente. En esta cepa la tasa de aparición de mutantes resistentes a la lisis fue del orden de 10^{-6} - 10^{-7} por célula y por generación. Resultados similares fueron obtenidos por Jensen *et al.* (1993).

2. Análisis de las mutaciones en los elementos del sistema de contención y su utilización para la mejora del sistema de contención biológica

Se han descrito varios sistemas activos de contención biológica basados fundamentalmente en genes letales de *E. coli*. Estos sistemas se han diseñado en respuesta a deficiencia de triptófano (Molin *et al.*, 1987), presencia/ausencia de IPTG (Bej *et al.*, 1988) o degradación de compuestos xenobióticos (Contreras *et al.*, 1991). También se ha usado en sistemas de contención el gen *sacB* de *Bacillus subtilis* el cual responde a la presencia/ausencia de sacarosa (Recorbet *et al.*, 1993). Sin embargo, el inconveniente de esos sistemas de contención fue la aparición de mutantes resistentes a la lisis: una fracción de la población bacteriana (10^{-3} - 10^{-6}) se escapa del "suicidio", incluso en las condiciones óptimas de los ensayos en el laboratorio.

El problema de las mutaciones en los sistema de contención biológica se ha estudiado extensamente en *E. coli* (Atlas *et al.*, 1989; Bej *et al.*, 1988; Knudsen y Karlström, 1991; Molin *et al.*, 1987). El fenotipo de resistencia podría explicarse por la aparición de varios tipos de mutaciones: mutaciones en el gen *matador* o en su sistema de expresión, o mutaciones que, sin afectar directamente a los elementos del sistema de contención biológica, eviten la muerte celular producida por la proteína *matadora* (Poulsen *et al.*, 1992).

Las mutaciones en el gen *matador* son fáciles de identificar, ya que mediante la transferencia del elemento *matador* a un nuevo hospedador se comprueba si tiene lugar la inducción de la muerte como consecuencia de la expresión del gen *matador* tras la inducción del sistema. Se ha observado que cuando el gen *matador* se encuentra en un plásmido, las mutaciones más frecuentes son deleciones que inactivan el gen, y son la causa principal de supervivencia después de la inducción del sistema (Molin *et al.*, 1993). En estos casos se han realizado ensayos de test de fluctuación para calcular la tasa de mutación de genes de la familia *hok*, y el resultado fue una tasa de aparición de mutantes del orden de 10^{-6} por célula y por generación (Knudsen y Karlström, 1991).

El estudio de las células Gef^R, en nuestro sistema de contención, se realizó en *E. coli* JM109 (pMCC22). Aparecieron dos tipos de mutaciones del sistema: mutaciones en el gen *lacI* que generaron una proteína LacI superrepresora (LacI^S) y mutaciones en la región del promotor que impidieron la expresión del gen *matador*.

El gen *lacI* regula la transcripción del operón *lac* de *E. coli* (Wanner *et al.*, 1977). El gen consta de 1080 pb que codifican una proteína (Gilbert y

Müler-Hill 1966) de 360 aminoácidos. Numerosas mutaciones en el gen *lacI* generan fenotipos $LacI^S$ (Kleina y Miller 1990; Markiewicz *et al.*, 1994), dichas mutaciones son mutaciones dominantes. Por tanto, una disminución en el número de copias del gen *lacI* disminuiría la probabilidad de mutaciones en dicho gen y, por tanto, en el sistema. Jensen *et al.* (1993) sugirieron que en cultivos de *P. putida* en medio mínimo con 3MB como única fuente de carbono, portando un sistema de contención para la degradación de alquilbenzoatos en el cual el gen *lacI* estaba situado en un plásmido, existía un exceso de represor $LacI$, ya que la adición de IPTG a dicho medio de cultivo no inducía la expresión del gen *matador*. Por tanto, una mejora del sistema de control implicaría la inserción del elemento regulador en el cromosoma de la cepa contenida. Así se disminuiría el número de copias de *lacI* y, en consecuencia, se disminuiría la probabilidad de la aparición de mutantes $LacI^S$ y el exceso de $LacI$ sugerido por Jensen *et al.* (1993). En base a estos resultados, el elemento regulador *xylS*, $P_m::lacI$ se insertó en el cromosoma de *P. putida* KT2440, disminuyendo así el número de copias del gen *lacI*. La cepa resultante se denominó *P. putida* CMC4 (pWW0), la cual poseía el elemento regulador y el *matador* integrados en el cromosoma dentro de un transposón, mini-Tn5/Km. Los ensayos en el laboratorio de dicha cepa revelaron que era mejor que la cepa *P. putida* EEZ30, no sólo en cuanto a que se produce la muerte celular con mayor eficiencia, sino también en cuanto a que la tasa de mutación del sistema de contención fue de 1 a 2 órdenes de magnitud inferior.

Las mutaciones en el promotor $P_{A1-04/03}$ fueron deleciones producidas como consecuencia de una recombinación entre las dos repeticiones directas formadas por las dos regiones operadoras presentes en dicho promotor (Fig. 19). La recombinación entre cualquier par de repeticiones directas escinde el material existente entre ellas, la región intermedia es escindida en forma de un círculo de ADN que la célula pierde (Lewin, 1989). Como solución al problema de dichas mutaciones se decidió duplicar el elemento *matador*, para ello se construyó una cepa con dos elementos *matadores* diferentes insertados en el cromosoma. Para la duplicación del elemento *matador* se construyó la fusión $P_{A1-04/03}::gen E$. La eficiencia de este nuevo elemento *matador* se ensayó en *E. coli* JM109 (Fig. 31). El comportamiento de la cepa tras la inducción de la expresión del gen *E* con IPTG demostró que la cepa funcionó según lo diseñado. Tras la adición de IPTG se produjo una disminución de la turbidez del cultivo, mientras que las células crecían en ausencia del inductor. Esta disminución de turbidez del cultivo tras la adición del inductor se debía a lisis celular, como se comprobó mediante la

liberación de ácidos nucleicos al medio de cultivo. El ADN liberado mediante este sistema es muy inestable y comenzó a degradarse rápidamente (Fig. 32), lo cual es un dato favorable para la utilización de este gen en sistemas de contención biológica, ya que la muerte celular va seguida de la destrucción de la información genética. Estos datos están en consonancia con los obtenidos por Kloos *et al.* (1994) quienes estudiaron la capacidad de transformación del ADN liberado de células de *E. coli* y *P. stutzeri* mediante un sistema de lisis basado en el gen *E*, en comparación con el liberado desde esas mismas cepas por un sistema de lisis basado en los genes *S*, *R* y *Rz* del fago λ . Según estos autores, la vida media del ADN liberado por el sistema de lisis formado por el gen *E* es menor de 1 hora y, por tanto, no es útil para estudios de transformación.

El funcionamiento del nuevo elemento *matador* se comprobó en *P. putida* KT2440, en la cepa denominada *P. putida* CMC12. Una vez comprobada su eficiencia, dicho elemento se integró en el cromosoma de *P. putida* CMC4 (pWW0), originándose la cepa *P. putida* CMC15, la cual contiene un sistema de contención para la degradación de alquilbenzoatos formado por dos elementos *matadores* distintos integrados en el cromosoma. Ambas cepas, en pruebas de laboratorio, se comportaron según lo diseñado. Las células crecieron en presencia de 3MB y no en su ausencia (Fig. 34 y 39), y el número de células viables disminuyó tras la inducción de la expresión del gen *matador* (Fig. 35). Por otro lado, se consiguió disminuir el número de células mutantes, la tasa de mutación de los sistemas de contención basados en el gen *E* fue del orden de 10^{-9} por célula y por generación. La duplicación del elemento *matador* no se tradujo en el producto de las dos tasas de mutación. Esto se podría explicar si el límite de la tasa de mutación estuviese marcado por la frecuencia de mutación de un tercer elemento que regule a ambos elementos *matadores*. Datos similares fueron obtenidos por Jensen *et al.* (1993) y Knudsen *et al.* (1995) quienes, tras construir un sistema de contención basado en la duplicación de dos genes *matadores*, sólo alcanzaron una tasa de mutación de 10^{-8} por célula y por generación, en lugar de la esperada de 10^{-12} por célula y por generación, como correspondería a la duplicación de un elemento *matador* con una tasa de mutación de 10^{-6} por célula y por generación. La tasa de mutación de un sistema con dos elementos *matadores* podría estar por debajo de los límites obtenidos en este y otros trabajos si los dos elementos *matadores* no estuviesen regulados por el mismo elemento regulador. La menor tasa de mutación detectada en la cepa *P. putida* CMC12 con respecto a la cepa *P. putida* EEZ30 podría deberse a la menor cantidad de proteína E necesaria para producir la lisis celular.

3. Caracterización de la lisis celular mediada por la proteína Gef y E

Como se ha mencionado anteriormente en este trabajo de Tesis Doctoral, hasta la fecha no se había caracterizado fisiológicamente el proceso de lisis inducido tanto por el gen *gef* como por el gen *E* en *Pseudomonas*. Los parámetros investigados (liberación de proteínas e iones al medio de cultivo y morfología celular) sugirieron que todas las alteraciones ocurren simultáneamente. La liberación de proteínas e iones al medio de cultivo indica una alteración en la membrana celular, como se pudo comprobar mediante microscopía electrónica. Aunque en este estudio no se abordó si las proteínas liberadas eran de origen periplásmico o citoplásmico, el hecho que el patrón de proteínas liberadas fuese similar con los dos genes utilizados sugiere que el mecanismo de lisis en *Pseudomonas* debe ser similar con ambos genes. Por otro lado, la liberación de iones desde el citoplasma celular produce un ambiente de baja fuerza iónica, en el cual muchas enzimas dejarían de funcionar, lo cual contribuiría a la pérdida de viabilidad celular. Las fotografías al microscopio electrónico demostraron que antes de la expresión del gen *matador* las células muestran una ultraestructura típica de la familia *Pseudomonadaceae*: células de morfología bien marcada, bacilar o circular, con las membranas interna y externa próximas, y con abundancia de ribosomas en el citoplasma. Sin embargo, después de la expresión del gen *matador*, las células aparecen deformes y gran parte aparecieron como bacterias fantasmas. Las membranas presentaron discontinuidades (Fig. 24 y 38) debido, probablemente, a la inserción de las proteínas Gef o E. De los datos obtenidos mediante liberación de proteínas, de iones y de las fotografías al microscopio electrónico se sugiere que la expresión de los genes *gef* y *E* en *P. putida* conduce a una desestabilización en la membrana celular.

4. Supervivencia de las cepas contenidas en microcosmos

La eficacia de un microorganismo manipulado genéticamente para la eliminación de compuestos químicos en el medio ambiente, depende tanto de su supervivencia y capacidad de permanencia en ecosistemas naturales, como de la expresión y funcionamiento de las rutas catabólicas. Una vez construido un microorganismo contenido biológicamente deben realizarse ensayos que permitan evaluar la supervivencia de éstos en diferentes

ecosistemas, su potencial para eliminar los contaminantes para los que se diseñó y la funcionalidad del sistema de contención en las condiciones que prevalecen en el medio ambiente. Además, es interesante evaluar como ciertos factores, bióticos o abióticos, inciden en su supervivencia y funcionamiento en condiciones medio ambientales. Una buena cantidad de información al respecto se puede obtener con ensayos de microcosmos. Aunque si bien éstos sólo representan un paso sobre los ensayos estándar de laboratorio, ya que no considera la dimensión medio ambiental plena, estos ensayos *per se* representan una aproximación válida que aporta información sobre el comportamiento en condiciones controladas en el hábitat donde se realizaría la posible liberación del microorganismo.

Existen muchos diseños de microcosmos, la complejidad de los mismos varia desde unos pocos gramos en un recipiente (Jaffee *et al.*, 1992) hasta un gran espacio donde pueden controlarse algunas variables ambientales (Gile *et al.*, 1982; Gillett y Gile, 1976). El diseño de un microcosmos puede afectar significativamente a la capacidad del microorganismo recombinante para sobrevivir en el suelo. Los microcosmos presentados en este trabajo se podrían clasificar como suelo desorganizado (suelo tamizado). Angle *et al.* (1995) demostraron que en este tipo de microcosmos la disminución del tamaño de la población de *P. aureofaciens* 3732 RN-L11 fue mayor que en suelos intactos, donde los resultados obtenidos fueron similares a los obtenidos en ensayos de campo. La destrucción de agregados, por un tamizado del suelo o por secado, altera el suelo, de forma que limita la supervivencia de bacterias. Richaume *et al.* (1992) han demostrado que la estructura del suelo es crítica para simular la capacidad de un microorganismo modificado genéticamente para sobrevivir en el medio ambiente.

En este estudio y con el objeto de estandarizar los microcosmos, se estudió el comportamiento de *P. putida* EEZ30 y *P. putida* EEZ32 en distintas condiciones. En nuestra serie de ensayos se observó que las cepas marcadas sobrevivieron mejor en suelos ricos en materia orgánica que en suelos pobres en materia orgánica. Así, la cepa *P. putida* EEZ32 no se pudo establecer en un suelo cambisol pobre en materia orgánica en ausencia de 3MB (Fig. 17), en contraste con la mejor supervivencia en un suelo fluvisol. Estos datos están en consonancia con los de Ramos *et al.* (1991) quienes evaluaron la supervivencia de *P. putida* EEZ15 portando o no el plásmido recombinante pWWO-EB62 en distintos suelos de la zona de Granada y demostraron que la supervivencia de las cepas fue mejor en suelos ricos en materia orgánica.

La temperatura de incubación de los suelos es un factor que afecta a la persistencia de la bacteria en los mismos. *P. putida* EEZ30 y *P. putida* EEZ32 sobrevivieron mejor a 12-20°C que a altas temperaturas (30-37°C). Este comportamiento es similar al observado con la cepa parental *P. putida* KT2440 sin marcador alguno (Ramos *et al.*, 1991). Nuestras observaciones están también en concordancia con los datos de Höfte *et al.* (1992) sobre el comportamiento en suelos de *P. aeruginosa* marcada o no con ADN recombinante, quienes demostraron que el comportamiento de la cepa con respecto a la temperatura es independiente de la incorporación o no de ADN recombinante. La síntesis dependiente de temperatura de enzimas y reguladores, así como la termosensibilidad de éstos, pueden ser factores que afecten a la mineralización de polucionantes en condiciones medio ambientales. A este respecto, se ha de mencionar que la expresión del gen *xyIS* en *P. putida* no ocurre a temperaturas elevadas (Ramos *et al.*, 1988).

La cepa *P. putida* mt-2 fue aislada en Japón a partir de enriquecimientos de suelos de jardín con 3MB (Assinder y Williams, 1990). Probablemente, esto explique la incapacidad de esta cepa para establecerse en microcosmos acuáticos y, por extensión, la incapacidad de cepas derivadas suyas para establecerse en dichos nichos.

La cepa contenida *P. putida* EEZ30, fue funcional en suelos suplementados con 3MB, como se puso de manifiesto mediante ensayos de mineralización de *p*-metil-¹⁴C-benzoato (Fig. 16). En dicho ensayo se observó desprendimiento de ¹⁴CO₂ a partir del aromático marcado, lo cual demostró que las rutas catabólicas de TOL fueron funcionales en bacterias introducidas en suelos. Estos resultados están en consonancia con los publicados por Delgado *et al.* (1992) y Duque *et al.* (1993) sobre la funcionalidad *in situ* de cepas derivadas de *Pseudomonas* B13, un degradador de cloroaromáticos y *P. putida* KT2440, la cual degrada una amplia batería de alquilaromáticos. En la misma dirección se encuentran los ensayos de otros laboratorios sobre mineralización en suelos de trichoroetileno, cloroaromáticos y otros contaminantes. Por tanto, se ha de hacer notar que las cepas de laboratorio son funcionales una vez se introducen en su hábitat natural.

Es crítico que la información genética introducida en los OMGs se mantenga establemente. En las cepas construidas en este estudio, el plásmido TOL pWW0 y el plásmido pCC102 portador del elemento regulador, así como las inserciones cromosómicas de los mini-transposones con o sin elementos *matadores*, fueron muy estables cuando las bacterias se introdujeron en

suelo, tanto en presencia como en ausencia de 3MB, ya que el 100% de las bacterias recuperadas fueron capaces de crecer en medio con 3MB como única fuente de carbono suplementado con sus respectivos antibióticos. Además, después de su introducción en el suelo, las cepas contenidas biológicamente mantuvieron funcional su sistema activo de contención biológica, como se dedujo del hecho de la ausencia de crecimiento en medio con glucosa suplementado con IPTG. La alta estabilidad de las cepas utilizadas en este trabajo está en consonancia con los resultados de Drahos *et al.* (1986) y los del grupo de Lindow (Lindow *et al.*, 1989; Lindow *et al.*, 1992) quienes demostraron que la multiplicación de *Pseudomonas aureofaciens* marcadas con los genes *lacZY* de *E. coli* o con los genes *ice* en suelos era similar a la de la cepa parental no marcada. En esta línea se encuentran también los resultados de los grupos de F. O'Gara (Dowling *et al.*, 1992) y de W. Werstrate (Höfte *et al.*, 1992) quienes demostraron que cepas de *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas aeruginosa*, marcadas con los genes *bph* para la degradación de bifenilos y los genes *lacZY* para la asimilación de lactosa, se multiplicaron y conservaron sus capacidades competitivas a un nivel similar al de las cepas parentales en microcosmos edáficos con y sin contaminantes. No obstante, se ha de hacer notar que se ha observado inestabilidad del plásmido TOL o sus rutas catabólicas en determinadas condiciones de cultivo, en particular cuando se utiliza benzoato como única fuente de carbono, ya que el aromático se asimila preferentemente a través de la vía cromosómica *ortho* (Keshavaraz *et al.*, 1985; Duetz *et al.*, 1991). Asimismo, el plásmido TOL es inestable en *Pseudomonas* sp. B13 y en *Erwinia chrysanthemi* EEZ28 (Jeenes *et al.*, 1982; Ramos-González *et al.*, 1991), donde se produce la escisión de un fragmento de unas 40 Kb como consecuencia de una recombinación homóloga entre dos repeticiones directas de aproximadamente 1.3 Kb (Williams, 1996; Duetz *et al.*, 1991; Meulien *et al.*, 1981). Hay que señalar que en presencia de 3MB, el número de UFC de las cepas contenidas y no contenidas fue similar en suelo, lo que indica que la presencia del sistema de contención no produce ningún efecto beneficioso o perjudicial en la supervivencia de las cepas. Este hecho se ha observado también con otras *Pseudomonas* recombinantes (Höfte *et al.*, 1990; Ramos *et al.*, 1991) y con *Rhizobium* (Beringer y Bartch, 1988). Estos resultados sugieren de manera global que las cepas recombinantes, en general, se comportan como sus parentales respectivos, y que los riesgos asociados a la liberación de un OMGs no van más allá de los que se asumirían liberando las cepas parentales.

En todos los ensayos de microcosmos realizados, la población de bacterias indígenas capaces de degradar *p*OHFA permaneció relativamente constante en el mismo nivel durante todo el ensayo. Probablemente, después de la introducción de las bacterias recombinantes en el suelo, éstas se localizan en espacios más abiertos que la población indígena. Debido a esta localización, las bacterias introducidas pueden estar más expuestas a factores responsables de su declive, tales como depredación por protozoos o falta de humedad.

En la serie de ensayos en microcosmos realizados en este estudio con distintas cepas contenidas biológicamente, el número de bacterias en los microcosmos sin 3MB no comenzó a disminuir hasta varios días después de la inoculación. Esta supervivencia inicial se puede deber al tiempo necesario para degradar la reserva interna de moléculas de LaCl, debido a que las bacterias se cultivaron en presencia de 3MB. Además, en el suelo las cepas se encuentran en un estado metabólico basal, el cual puede influir en el funcionamiento de las proteínas Gef o E, las cuales parecen requerir de un estado metabólico activo, necesario para que estas proteínas ejerzan su función (Witte *et al.*, 1991). La proteína E parece ejercer su función de manera más eficiente durante la división celular. Si este fuese el caso también para la proteína Gef, el hecho de que en el suelo las bacterias se dividan más lentamente podría explicar el retardo en la muerte.

5. Transferencia de ADN en suelo entre cepas de *Pseudomonas*

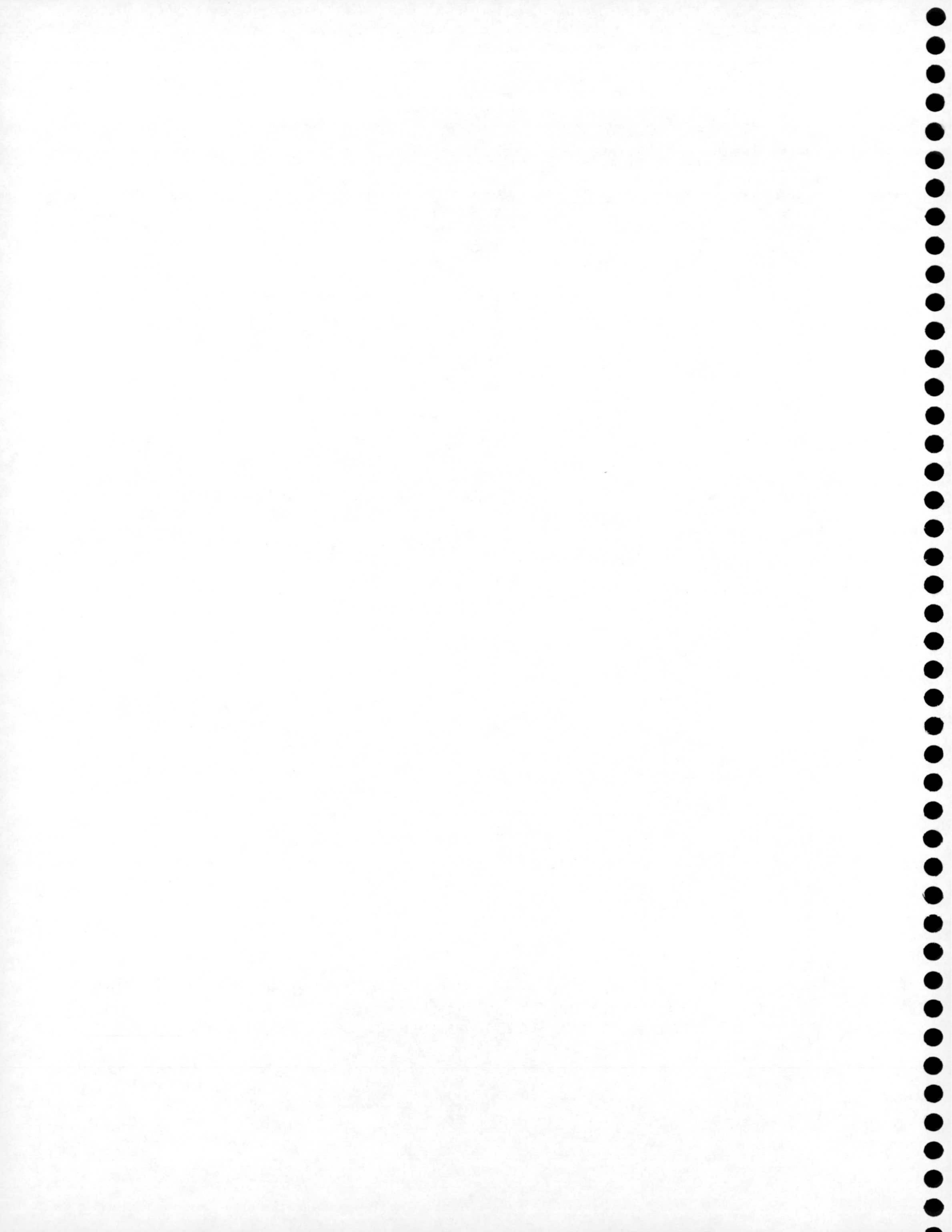
Los plásmidos catabólicos codifican la información para la mineralización de un gran número de compuestos aromáticos como tolueno y *m*- y *p*-xileno (Williams, 1981); *o*-xileno (Galli *et al.*, 1992); alcanfor (Rheinwald *et al.*, 1973); naftaleno (Dunn y Gunsalus, 1973); salicilato (Chakrabarty *et al.*, 1973) etc. El plásmido TOL pWW0, de 115 kilobases, se considera el plásmido arquetipo de los plásmidos TOL y es el más estudiado de los plásmidos catabólicos de *Pseudomonas* (Assinder y Williams, 1990). Este plásmido es autotransferible (Williams y Murray, 1974; Wong y Dunn, 1974). Distintos grupos (Benson y Shapiro, 1978; Bradley y Williams, 1982; Nakazawa, 1978 y Ramos-González *et al.*, 1991) demostraron que el plásmido TOL se transfería con alta frecuencia a distintas estirpes de *P. putida*, así como a otras bacterias del género *Pseudomonas* pertenecientes al grupo I de ARN ribosómico. El espectro de huésped del plásmido TOL es relativamente restringido y, además de en estas bacterias, se ha encontrado que sólo se

replica en ciertas enterobacteriáceas como *Escherichia coli* (Jacoby *et al.*, 1978; Ramos-González *et al.*, 1991) y *Erwinia chrysanthemi* (Ramos-González *et al.*, 1991).

La conjugación es uno de los mecanismos más eficientes de transferencia génica en suelos (Trevors *et al.*, 1987). En suelos y microcosmos acuáticos se ha demostrado la transferencia intragenérica de plásmidos entre bacterias como *E. coli*, *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp. y *Streptomyces* spp. (van Elsas *et al.*, 1988 y 1990; Stozky *et al.*, 1990; Clewlow *et al.*, 1990; Höfte *et al.*, 1990; McClure *et al.*, 1989; Morrison *et al.*, 1978; Trevors y Oddie 1986; Weinberg y Stozky 1972; Nüblein *et al.*, 1992), así como la transferencia intergenérica (Murooka *et al.*, 1981; Trevors *et al.*, 1987), aunque ésta ocurre con menor frecuencia (Ramos-González *et al.*, 1991). La transferencia intraespecífica entre cepas de *P. putida* en suelo está influenciada por la tasa de supervivencia de las cepas donadora y receptora, por el tamaño inicial del inóculo y por la presencia de compuestos químicos que puedan ser tóxicos para las cepas donadora o receptora (Ramos-González *et al.*, 1991). La transferencia del plásmido TOL pWW0 o pWW0-Tc, en el laboratorio, entre las cepas modificadas genéticamente descritas en este trabajo y *P. putida* UWC1 (pCC102) fue del orden de $1 \cdot 10^{-1}$ transconjugantes por receptor y la co-transferencia de los marcadores de resistencia a antibióticos por el plásmido TOL pWW0 fue en todos los casos del orden de 10^{-7} - 10^{-8} transconjugantes por receptor. Los ensayos de transferencia en suelo entre esas mismas cepas demostraron que la transferencia del plásmido TOL pWW0 ocurre a un nivel menor que el observado en el laboratorio, y en ningún caso se detectó transferencia de elementos cromosómicos. Estos resultados sugieren que la inserción cromosómica del sistema de contención biológica limita su transferencia a otros microorganismos y, aunque los sistemas de contención se pueden diseñar para disminuir su transferencia (Díaz *et al.*, 1994), este carácter no es absolutamente necesario cuando los elementos del sistema de contención se insertan en el cromosoma.

Sirva de corolario de esta Tesis Doctoral reseñar que los sistemas activos de contención biológica proveen una vía efectiva para el control de la supervivencia de microorganismos diseñados para realizar su función en condiciones medio ambientales, y que esto se ha demostrado recientemente en ensayos de campo realizados en el grupo de investigación de Degradación de Tóxicos Orgánicos de la Estación Experimental de Zaidín con la cepa contenida biológicamente desarrollada en este estudio, *P. putida* CMC4 (pWW0) (Molina *et al.*, 1997).

CONCLUSIONES

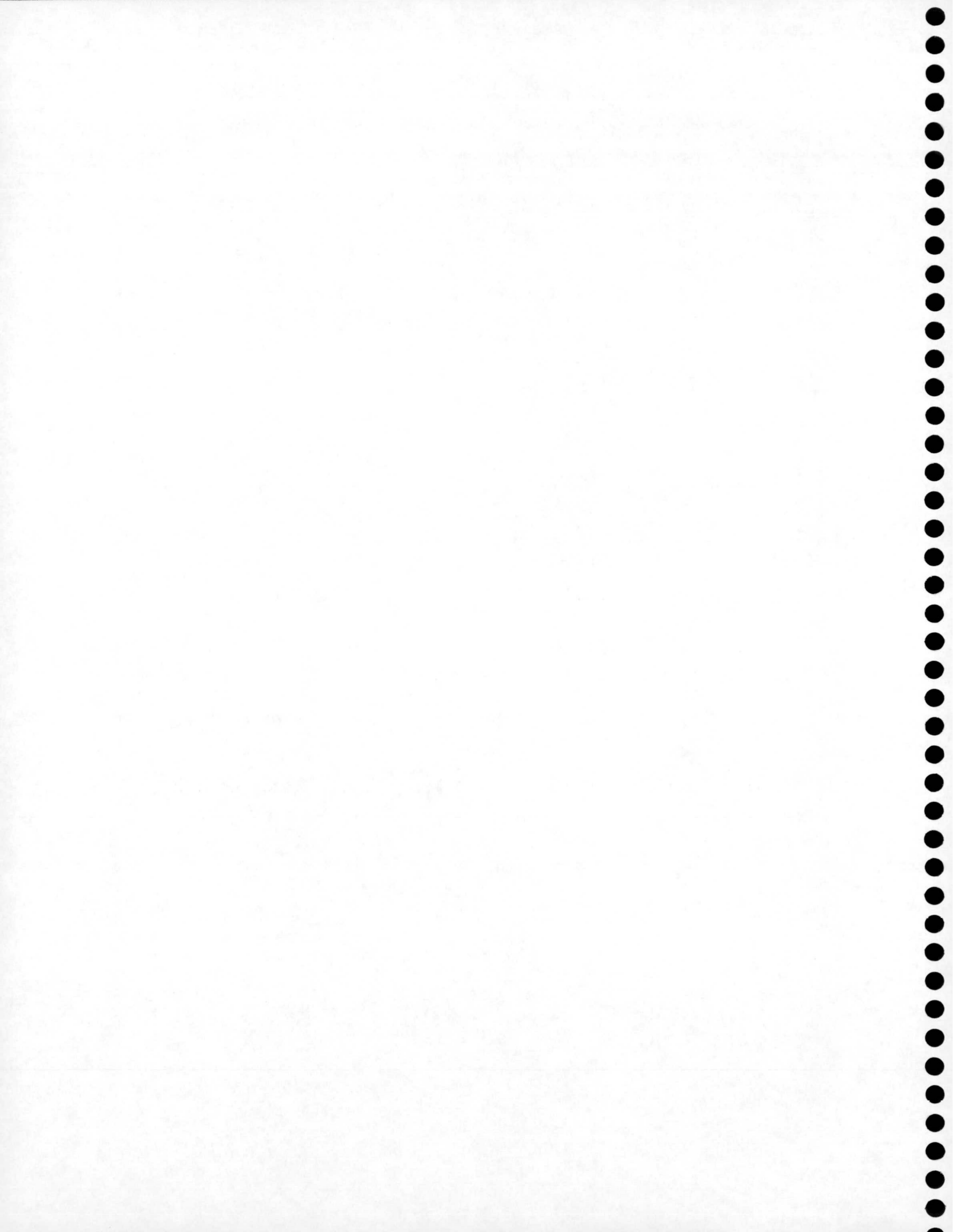


Los resultados obtenidos en este trabajo permiten extraer las conclusiones que se exponen a continuación:

1. Los genes *gef* de *E. coli* y *E* del fago Φ X174 son funcionales tanto en *E. coli* como en *Pseudomonas putida*, siendo de utilidad en el diseño de sistemas activos de contención biológica condicional. La expresión de los genes *gef* y *E* en *Pseudomonas putida* produce la desestabilización en la membrana celular, conduciendo a la formación de poros distinguibles al microscopio electrónico.
2. La expresión de los genes *gef* y *E* en *Pseudomonas putida* se puede controlar a través de un sistema en cascada que responda a la presencia/ausencia de una señal química. En este trabajo, 3MB vía el sistema de control $P_m/xyIS$ de la ruta *meta* del plásmido TOL de *P. putida*.
3. El sistema activo de contención biológica descrito en este trabajo no confiere ninguna desventaja al hospedador en cuanto a su supervivencia, en suelo o en el laboratorio, salvo cuando el medio no se suplementó con 3MB, condición en la cual se indujo la muerte celular.
4. La integración de los elementos del sistema de contención (regulador y *matador*) en el cromosoma de la cepa hospedadora, así como la duplicación del elemento *matador*, disminuye la tasa de mutación del sistema a valores del orden de 10^{-8} - 10^{-9} por célula y por generación.
5. Los elementos del sistema activo de contención biológica se mantienen establemente en el hospedador en ausencia de presión selectiva, tanto en pruebas de laboratorio, como en ensayos de microcosmos edáficos.

6. Las bacterias portadoras del sistema activo de contención biológica se mantienen funcionales en suelo suplementado con 3MB, como se demostró en ensayos de mineralización con *p*-metil-¹⁴C-benzoato.
7. Se detectó transferencia en suelo del plásmido TOL pWW0 desde las cepas contenidas biológicamente y sus controles a otras cepas de *Pseudomonas*, pero en ningún caso se detectó transferencia de los elementos del sistema activo de contención biológica.
8. La introducción de cepas de *P. putida* contenidas biológicamente en suelos no estériles no se tradujo en una alteración de la población indígena del suelo, cuando ésta se cuantificó como la población de bacterias capaces de degradar *p*-hidroxifenilacético.

BIBLIOGRAFÍA



- Abril, M.A., C. Michán, K. N. Timmis, y J. L. Ramos.** 1989. Regulator and enzyme specificities of the TOL plasmid-encoded upper pathway for degradation of aromatic hydrocarbons and expansion of the substrate range of the pathway. *J.Bacteriol.* **171**:6782-6790.
- Ahrenholtz, I., M. G. Lorenz, y W. Wackernagel.** 1994. A conditional suicide system in *Escherichia coli* based on the intracellular degradation of DNA. *Appl.Environ.Microbiol.* **60**:3746-3751.
- Akimoto, S. y Y. Ohnishi.** 1982. R483 and F plasmid genes promoting RNA degradation: comparative restriction mapping. *Microbiol.Immunol.* **26**:779-793.
- Akimoto, S., K. Sakikawa, T. Ono, y Y. Ohnishi.** 1989. Transcriptional regulation of F plasmid gene *srrB*: rifampicin-promoted *in vitro* readthrough of a terminator in the leader region. *Mol.Microbiol.* **3**:787-796.
- Altman, E., K. D. Young, J. Garret, R. Altman, y R. Young.** 1985. Subcellular location of lethal lysis proteins of bacteriophages lambda and PhiX174. *J.Virol.* **53**:1008-1011.
- Angle, J.S., M. A. Levin, J. V. Gagliardi, y M. S. McIntosh.** 1995. Validation of microcosms for examining the survival of *Pseudomonas aureofaciens* (*lacZY*) in soil. *Appl.Environ.Microbiol.* **61**:2835-2839.
- Assinder, S.J. y P. A. Williams.** 1990. The TOL plasmids: determinants of the catabolism of toluene and the xylenes. *Adv.Microb.Physiol.* **31**:1-70.
- Atlas, R.M., A. K. Bej, R. J. Steffan, y M. H. Perlin.** 1989. Approaches for monitoring and containing genetically engineered microorganisms released into the environment. *Hazard.Waste Hazard.Mater* **6**:135-144.
- Bagdasarian, M., B. Lurz, B. Rückert, F. C. H. Franklin, M. M. Bagdasarian, J. Frey, y K. N. Timmis.** 1981. Specific purpose plasmid cloning vectors. II. Broad host range, high copy number, RSF-1010-derived vector, and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. *Gene* **16**:237-247.

- Ball, T.K., P. N. Saurugger, y M. J. Benedik.** 1987. The extracellular nuclease gene of *Serratia marcescens* and its secretion from *Escherichia coli*. *Gene* **57**:183-192.
- Barrell, B.G., G. M. Air, y C. A. Hutchison,III.** 1976. Overlapping genes in bacteriophage PhiX174. *Nature* **264**:34-41.
- Bech, F.W., S. T. Jørgensen, B. Diderichsen, y O. Karlstrom.** 1985. Sequence of the *relB* transcription unit from *Escherichia coli* and identification of the *relB* gene. *EMBO J.* **4**:1059-1066.
- Bej, A.K., M. H. Perlin, y R. M. Atlas.** 1988. Model suicide vector for containment of genetically engineered microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:2472-2477.
- Bej, A.K., S. Molin, y R. M. Atlas.** 1992. Maintenance and killing efficiency of conditional lethal constructs in *Pseudomonas putida*. *Journal of Industrial Microbiology* **10**:79-85.
- Benson, S. y J. Shapiro.** 1978. TOL is a Broad-host-range plasmid. *J. Bacteriol.* **135**:278-280.
- Beringer, J.E. y J. M. Barch.** 1988. , p.29-46. En: M. Sussman, C.H. Collins, F.A. Skinner, and D.E. Stewart-Tull (ed.), *The release of genetically-engineered microorganisms*, Academic Press, Londres.
- Bhattacharyya, P., W. Epstein, y S. Silver.** 1971. Valinomycin-induced uptake of potassium in membrane vesicles from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**:1488-1492.
- Bläsi, U., K. Nam, W. Lubitz, y R. Young.** 1990. Translational efficiency of X174 lysis gene *E* is unaffected by upstream translation of the overlapping gene *D* reading frame. *J. Bacteriol.* **172**:5617-5623.
- Bläsi, U., R. Geisen, W. Lubitz, B. Henrich, y R. Plapp.** 1983. Localization of the bacteriophage PhiX174 lysis gene product in the cell envelope of *Escherichia coli*, p.205-210. En: R. Hakenbeck, J.V. Höltje, and H. Labischinski (ed.), *Target of Penicillin*, de Gruyter, Berlin, New York.

- Bläsi, U., R. P. Linke, y W. Lubitz.** 1989. Evidence for membrane-bound oligomerization of bacteriophage X174 lysis protein E. *J.Biol.Chem.* **264**:4552-4558.
- Boyer, H.B. y D. Roulland-Dussoix.** 1969. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J.Mol.Biol.* **41**:459-472.
- Bradley, D.E. y P. A. Williams.** 1982. The TOL plasmid is naturally derepressed for transfer. *J.Gen.Microbiol.* **128**:3019-3024.
- Brazil, G.M., L. Kenefick, M. Callanan, A. Haro, V. de Lorenzo, F. O'Gara, y D. N. Dowling.** 1994. Expanding the metabolic functions of a rhizosphere competent pseudomonad to degrade biphenyl: characterisation of *Pseudomonas fluorescens* F113pcb in non sterile soil microcosms. *Appl.Environ.Microbiol.*
- Breitling, R., A. V. Sorokin, y D. Behnke.** 1990. Temperature-inducible gene expression in *Bacillus subtilis* mediated by the cI857-encoded repressor of bacteriophage lambda. *Gene* **93**:35-40.
- Chakrabarty, A.M., G. Chou, y I. C. Gunsalus.** 1973. Genetic regulation of octane dissimilation plasmid in *Pseudomonas*. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **70**:1137-1140.
- Ciafardini, G. y B. Marotta.** 1989. . *Appl.Environ.Microbiol.* **55**:1273-1278.
- Clewell, L.J., N. Cresswell, y E. M. H. Wellington.** 1990. Mathematical model of plasmid transfer between strains of streptomycetes in soil microcosms. *Appl.Environ.Microbiol.* **56**:3139-3145.
- Contreras, A., S. Molin, y J. L. Ramos.** 1991. Conditional-suicide containment system for bacteria which mineralize aromatics. *Appl.Environ.Microbiol.* **57**:1504-1508.
- Curtiss, R.,III, R. M. Inoue, D. Pereira, J. C. Hsu, L. Alexander, y L. Rock.** 1977. Construction and use of safer bacterial host strains for recombinant DNA research, p.99-111. En: W.A. Scott and R. Werner (ed.), *Molecular Cloning of Recombinant DNA*, New York: Academic.

- Davis, A.** 1977. Nuclease B. A possible precursor of nuclease A, an extracellular nuclease of *Staphylococcus aureus*. *J.Biol.Chem.* **18**:6544-6553.
- Davison, J., M. Heusterspreute, N. Chevalier, y F. Brunel.** 1987. A phage shift fusion system for the regulation of foreign gene expression by lambda repressor in Gram-negative bacteria. *Gene* **60**:227-235.
- de Lorenzo, V. y K. N. Timmis.** 1994. Analysis and construction of stable phenotypes in Gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. *Methods Enzymol.* **235**:386-405.
- de Lorenzo, V., M. Herrero, U. Jakubzik, y K. N. Timmis.** 1990. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in Gram-negative eubacteria. *J.Bacteriol.* **172**:6568-6572.
- Delgado, A., E. Duque, y J. L. Ramos.** 1992. Behavior in agricultural soil of a recombinant *Pseudomonas* bacterium that simultaneously degrades alkyl- and haloaromatics. *Microb.Releases* **1**:23-28.
- Díaz, E., M. Munthali, V. de Lorenzo, y K. N. Timmis.** 1994. Universal barrier to lateral spread of specific genes among microorganisms. *Mol.Microbiol.* **13**:855-861.
- Dowling, D.N. y F. O'Gara.** 1994. Genetic manipulation of ecologically adapted *Pseudomonas* strains for PCB degradation, p.1-8. En: Current topics in molecular genetics , *Life Sci. Adv.*,
- Dowling, D.N., B. Boesten, D. J. O'Sullivan, P. Stephens, J. Morris, y F. O'Gara.** 1992. Genetically modified plant-microbe interacting strains for potential release into the rhizosphere, p.408-414. En: E. Galli, S. Silver, and B. Withold (ed.), *Pseudomonas*. Molecular biology and biotechnology, American Society for Microbiology, Washington DC.
- Drahos, D.J., B. C. Hemming, y S. McPearson.** 1986. . *Bio/technology* **4**:439-443.
- Duetz, W.A., M. K. Winson, J. G. van Andel, y P. A. Williams.** 1991. Mathematical analysis of catabolic function loss in a population of

- Pseudomonas putida* mt-2 during non-limited growth on benzoate. J.Gen.Microbiol. **137**:1363-1368.
- Dunn, N.W. y I. C. Gunsalus.** 1973. Transmissible plasmid coding early enzymes of naphthalene oxidation in *Pseudomonas putida*. J.Bacteriol. **114**:974-979.
- Duque, E.** 1994. Comportamiento en microcosmos agrícolas de microorganismos manipulados genéticamente. Tesis Doctoral
- Duque, E., A. Haidour, F. Godoy, y J. L. Ramos.** 1993. Construction of a *Pseudomonas* hybrid strain that mineralizes 2,4,6-trinitrotoluene. J.Bacteriol. **175**:2278-2283.
- Eisenstein, B.I.** 1981. Phase variation of type 1 fimbriae in *Escherichia coli* is under transcriptional control. Science **214**:337-339.
- Franch, T. y K. Gerdes.** 1996. Programmed cell death in bacteria: translational repression by mRNA end-pairing. Mol.Microbiol. **21**:1049-1060.
- Franklin, F.C.H., M. Bagdasarian, M. M. Bagdasarian, y K. N. Timmis.** 1981. Molecular and functional analysis of the TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida* and cloning of genes for the entire regulated aromatic ring meta cleavage pathway. Proc.Natl.Acad.Sci.USA **78**:7458-7462.
- Galli, E., P. Barbieri, y G. Bestetti.** 1992. Potential of Pseudomonads in the degradation of methylbenzenes, p.268-276. En: E. Galli, S. Silver, and B. Withold (ed.), *Pseudomonas. Molecular biology and biotechnology*, American Society for Microbiology, Washington DC.
- Galli, E., S. Silver, y B. Withold.** 1992. *Pseudomonas: Molecular biology and biotechnology*, American Society for Microbiology, Washington DC.
- Georgiou, G., C. Stathopoulos, P. S. Daugherty, A. R. Nayak, B. L. Iverson, y R. Curtiss,III.** 1997. Display of heterologous proteins on the surface of microorganisms: from the screening of combinatorial libraries to live recombinant vaccines. Nature Biotech. **15**:29-34.

- Gerdes, K., F. W. Bech, S. T. Jørgensen, A. Løbner-Olesen, P. B. Rasmussen, T. Atlung, L. Boe, O. Karlstrom, S. Molin, y K. von Meyenburg.** 1986. Mechanism of postsegregational killing by the *hok* gene product of the *parB* system of plasmid R1 and its homology with the *relF* gene product of the *E. coli relB* operon. EMBO J. **5**:2023-2029.
- Gerdes, K., J. E. L. Larsen, y S. Molin.** 1985. Stable inheritance of plasmid R1 requires two different loci. J.Bacteriol. **161**:292-298.
- Gerdes, K., K. Helin, O. W. Christensen, y A. Løbner-Olesen.** 1988. Translational control and differential RNA decay are key elements regulating postsegregational expression of the killer protein encoded by the *parB* locus of plasmid R1. J.Mol.Biol. **203**:119-129.
- Gerdes, K., L. K. Poulsen, T. Thisted, A. K. Nielsen, J. Martinussen, y P. H. Andreassen.** 1990. The *hok* killer gene family in Gram-negative bacteria. The New Biologist **2**:946-956.
- Gerdes, K., P. B. Rasmussen, y S. Molin.** 1986. Unique type of plasmid maintenance: postsegregational killing of plasmid-free cells. Proc.Natl.Acad.Sci.USA **83**:3116-3120.
- Gilbert, W. y B. Müller-Hill.** 1966. Isolation of the *lac* repressor. Proc.Natl.Acad.Sci.USA **56**:1891.
- Gile, J.D., J. C. Collins, y J. W. Gillett.** 1982. Fate and impact of selected wood preservatives in a terrestrial model ecosystem. J.Agric.Food Chem. **30**:295-301.
- Gillett, J.W. y J. D. Gile.** 1976. Pesticide fate in terrestrial laboratory ecosystems. Int.J.Environ.Stud. **10**:15-22.
- Harayama, S. y K. N. Timmis.** 1989. , p.151-174. En: Genetics of bacterial diversity, Academic Press, New York.
- Henrich, B., W. Lubitz, y R. Plapp.** 1982. Lysis of *Escherichia coli* by induction of cloned *PhiX174* genes. Mol.Gen.Genet. **185**:493-497.
- Herrero, M., V. de Lorenzo, y K. N. Timmis.** 1990. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and

- stable chromosomal insertion of foreign genes in Gram-negative bacteria .
J.Bacteriol. **172**:6557-6567.
- Höfte, M., M. Mergeay, y W. Verstrate.** 1990. Marking the rhizopseudomonas strain 7NSK2 with a Mu d(*lac*) element for ecological studies. Appl.Environ.Microbiol. **56**:1046-1052.
- Hutchison, C.A.,III y R. L. Sinsheimer.** 1966. The process of infection with bacteriophage PhiX174. Mutations in a PhiX174 lysis gene. J.Mol.Biol. **18**:429-447.
- Ito, R. y Y. Ohnishi.** 1983. The roles of RNA polymerase and RNAaseI in stable RNA degradation in *Escherichia coli* carrying the *srnB* gene. Biochem.Biophys.Acta **739**:27-34.
- Jacoby, G.A., J. E. Rogers, A. E. Jacob, y R. W. Hedges.** 1978. Transposition of *Pseudomonas* toluene-degrading genes and expression in *Escherichia coli*. Nature **274**:179-180.
- Jaffee, B., R. Phillips, A. Muldoon, y M. Mangel.** 1992. Density-dependent host-pathogen dynamics in soil microcosms. Ecology **73**:495-506.
- Jeenes, D.J., W. Reineke, H. J. Knackmuss, y P. A. Williams.** 1982. TOL plasmid pWW0 in constructed halobenzoate-degrading *Pseudomonas* strains: enzyme regulation and DNA structure. J.Bacteriol. **150**:180-187.
- Jensen, L.B., J. L. Ramos, Z. Kaneva, y S. Molin.** 1993. A substrate-dependent biological containment system for *Pseudomonas putida* based on the *Escherichia coli* *gef* gene. Appl.Environ.Microbiol. **59**:3713-3717.
- Kado, C.I. y S. T. Liu.** 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmid. J.Bacteriol. **145**:1365-1373.
- Keshavaraz, T.M., D. Lilly, y P. H. Clarke.** 1985. . J.Gen.Microbiol. **131**:1193-1203.
- Kessler, B., V. de Lorenzo, y K. N. Timmis.** 1992. A general system to integrate *lacZ* fusions into the cromosomes of gram-negative eubacteria: regulation of the Pm promoter of the TOL plasmid studied with all controlling elements in monocopy. Mol.Gen.Genet. **233**:293-301.

- Kleina, L. y J. H. Miller.** 1990. Genetic studies of the *lac* repressor. XIII. Extensive amino acid replacements generated by use of natural and synthetic nonsense suppressors. *J.Mol.Biol.* **212**:295-318.
- Klemm, P., L. B. Jensen, y S. Molin.** 1995. A stochastic killing system for biological containment of *Escherichia coli*. *Appl.Environ.Microbiol.* **61**:481-486.
- Kloos, D.-U., M. Strätz, A. Güttler, R. J. Steffan, y K. N. Timmis.** 1994. Inducible cell lysis system for the study of natural transformation and environmental fate of DNA released by cell death. *J.Bacteriol.* **176**:7352-7361.
- Knudsen, S., P. Saadbye, L. H. Hansen, A. Collier, B. L. Jacobsen, J. Schlundt, y O. H. Karlström.** 1995. Development and testing of improved suicide functions for biological containment of bacteria. *Appl.Environ.Microbiol.* **61**:985-991.
- Knudsen, S.M. y O. H. Karlström.** 1991. Development of efficient suicide mechanisms for biological containment of bacteria. *Appl.Environ.Microbiol.* **57**:85-92.
- Laemmli, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- Lanzer, M. y H. Bujard.** 1988. Promoters largely determine the efficiency of repressor action. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **85**:8973-8977.
- Lasater, L.S., P. A. Cann, y D. G. Glitz.** 1989. Localization of the site of cleavage of ribosomal RNA by colicin E3. *J.Biol.Chem.* **264**:21798-21805.
- Leemans, R., E. Remaut, y W. Fiers.** 1987. A broad-host-range expression vector based on the p_L promoter of coliphage lambda: regulated synthesis of human interleukin 2 in *Erwinia* and *Serratia* species. *J.Bacteriol.* **169**:1899-1904.
- Lehrbach, P.R., J. Zeyer, W. Reineke, H. J. Knackmuss, y K. N. Timmis.** 1984. Enzyme recruitment *in vitro*: use of cloned genes to extend the range

- of haloaromatics degraded by *Pseudomonas* sp. strain B13. *J.Bacteriol.* **158**:1025-1032.
- Lester, G.** 1958. Requirement for potassium by bacteria. *J.Bacteriol.* **75**:426-428.
- Lewin, B.** 1989. Elementos genéticos móviles en bacterias, p.638-654. In *Genes*, Reverté S.A., Barcelona.
- Lindow, S.E.** 1992. Environmental release of Pseudomonads: potential benefits and risks, p.399-407. In E. Galli, S. Silver, and B. Withold (ed.), *Pseudomonas. Molecular biology and biotechnology*, American Society for Microbiology, Washinton DC.
- Lindow, S.E., N. J. Panopoulus, y B. L. McFarland.** 1989. Genetics engineering of bacteria from managed and natural habitats. *Science* **244**:1300-1307.
- Loh, S.M., A. Ray, D. S. Cram, L. E. O'Gorman, y R. A. Skurray.** 1986. Location of a second partitioning region (ParL) on the F plasmid. *FEMS Microbiology Letters.* **37**:179-182.
- Loh, S.M., D. S. Cram, y R. A. Skurray.** 1988. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of a third function (Flm) involved in F-plasmid maintenance. *Gene* **66**:259-268.
- Lombardi, F.J., J. P. Reeves, y H. R. Kaback.** 1973. Mechanisms of active transport in isolated bacterial membrane vesicles. XIII. Valinomycin-induced rubidium transport. *J.Biol.Chem.* **248**:3551-3565.
- Luria, S.E. y M. Delbrück.** 1943. Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics* **28**:491-511.
- Maniatis, T., E. F. Fritsch, y J. Sambrook.** 1982. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Maratea, D., K. Young, y R. Young.** 1985. Deletion and fusion analysis of the phage X174 lysis gene E. *Gene* **40**:39-46.

- Markiewicz, P., L. G. Kleina, C. Cruz, S. Ehret, y J. H. Miller.** 1994. Genetic studies of the *lac* repressor. XIV. Analysis of 4000 altered *Escherichia coli lac* repressors reveals essential and non-essential residues, as well as "spacers" which do not require a specific sequence. *J.Mol.Biol.* **240**:421-433.
- Marqués, S. y J. L. Ramos.** 1993. Transcriptional control of the *Pseudomonas putida* TOL plasmid catabolic pathways. *Mol.Microbiol.* **9**:923-929.
- McClure, N.C., A. J. Weightman, y J. C. Fry.** 1989. Survival of *Pseudomonas putida* UWC1 containing cloned catabolic genes in a model activated-sludge unit. *Appl.Environ.Microbiol.* **55**:2627-2634.
- Meulien, P., R. G. Downing, y P. Broda.** 1981. Excision of the 40Kb segment of the TOL plasmid from *Pseudomonas putida* mt-2 involves direct repeats. *Mol.Gen.Genet.* **184**:97-101.
- Molin, S., L. Boe, L. B. Jensen, C. S. Kristensen, M. Givsk, J. L. Ramos, y A. K. Bej.** 1993. Suicidal genetic elements and their use in biological containment of bacteria. *Annu.Rev.Microbiol* **47**:139-166.
- Molin, S., P. Klemm, L. K. Poulsen, H. Biehl, K. Gerdes, y P. Andersson.** 1987. Conditional suicide system for containment of bacteria and plasmids. *Bio/technology* **5**:1315-1318.
- Morrison, W.D., R. V. Miller, y G. S. Sayler.** 1978. Frequency of F116-mediated transduction of *Pseudomonas aeruginosa* in a freshwater environment. *Appl.Environ.Microbiol.* **44**:1395-1403.
- Murooka, Y. y I. Mitani.** 1985. Efficient expression of a promoter controlled gene: tyem promoters of lambda pR y pL functional in enteric bacteria. *J.Biotechnol.* **2**:303-316.
- Murooka, Y., N. Takizawa, y T. Harada.** 1981. Introduction of bacteriophage Mu into bacteria of various genera y intergeneric gene transfer by RP4::Mu. *J.Bacteriol.* **145**:358-368.

- Nakazawa, T.** 1978. TOL plasmid in *Pseudomonas aeruginosa* PAO: thermosensitivity of self-maintenance y inhibition of host cell growth. *J.Bacteriol.* **133**:527-535.
- Nielsen, A.K. y K. Gerdes.** 1995. Mechanism of post-segregational killing by *hok*-homologue *pnd* of plasmid R483: two translational control elements in the *pnd* mRNA. *J.Mol.Biol.* **249**:270-282.
- Nishimura, A., M. Morita, Y. Nishimura, y Y. Sugino.** 1990. A rapid y highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucl.Acids Res.* **18**:6169.
- OCDE,** 1994. "Biotechnology for a clean environment: prevention, detection y remediation". OCDE Press, Paris
- Ohnishi, Y., H. Iguma, T. Ono, H. Nagaishi, y A. J. Clark.** 1977. Genetic mapping of the F plasmid gene that promotes degradation of stable ribonucleic acid in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* **132**:784-789.
- Pedersen, K. y K. Gerdes.** 1996. Cloning y analysis of *hokA*, the third *hok*-homologue of the *Escherichia coli* chromosome, Proceeding,
- Poulsen, L.K., N. W. Larsen, S. Molin, y P. Yersson.** 1989. A family of genes encoding a cell-killing function may be conserved in all Gram-negative bacteria. *Mol.Microbiol.* **3**:1463-1472.
- Poulsen, L.K., N. W. Larsen, S. Molin, y P. Yersson.** 1992. Analysis of an *Escherichia coli* mutant strain resistant to the cell-killing function encoded by the *gef* gene family. *Mol.Microbiol.* **6**:895-905.
- Ramos, J.L., A. Stolz, W. Reineke, y K. N. Timmis.** 1986. Altered effector specificities in regulators of gene expression: TOL plasmid *xyIS* mutants y their use to engineer expansion of the range of aromatics degraded by bacteria. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **83**:8467-8471.
- Ramos, J.L., A. Wasserfallen, K. Rose, y K. N. Timmis.** 1987. Redesigning metabolic routes: manipulation of TOL plasmid pathway for catabolism of alkylbenzoates. *Science* **235**:593-596.

- Ramos, J.L., C. Michán, F. Rojo, D. Dwyer, y K. N. Timmis.** 1990. Signal-regulator interactions. Genetic analysis of the effector binding site of *xyIS*, the benzoate-activated positive regulator of *Pseudomonas* TOL plasmid *meta*-cleavage pathway operon. *J.Mol.Biol.* **211**:373-382.
- Ramos, J.L., E. Díaz, D. Dowling, V. de Lorenzo, S. Molin, F. O'Gara, C. Ramos, y K. N. Timmis.** 1994. The behavior of bacteria designed for biodegradation. *Bio/technology* **12**:1349-1356.
- Ramos, J.L., E. Duque, y M. I. Ramos-González.** 1991. Survival in soils of an herbicide-resistant *Pseudomonas putida* strain bearing a recombinant TOL plasmid. *Appl.Environ.Microbiol.* **57**:260-266.
- Ramos, J.L., M. González-Carrero, y K. N. Timmis.** 1988. Broad-host range expression vectors containing manipulated *meta*-cleavage pathway regulatory elements of the TOL plasmid. *FEBS Lett.* **226**:241-246.
- Ramos, J.L., P. Yersson, L. B. Jensen, C. Ramos, M. C. Ronchel, E. Díaz, K. N. Timmis, y S. Molin.** 1995. Suicide Microbes on the loose. *Bio/technology* **13**:35-37.
- Ramos-González, M.I., E. Duque, y J. L. Ramos.** 1991. Conjugational transfer of recombinant DNA in cultures y in soils: host range of *Pseudomonas putida* TOL plasmid. *Appl.Environ.Microbiol.* **57**:3020-3027.
- Ramos-González, M.I., M. A. Ramos-Díaz, y J. L. Ramos.** 1994. Chromosomal gene capture mediated by the *Pseudomonas putida* TOL catabolic plasmid. *J.Bacteriol.* **176**:4635-4641.
- Recorbet, G., C. Robert, A. Givaudan, B. Kudla, P. Normy, y G. Faurie.** 1993. Conditional suicide system of *Escherichia coli* released into soil that uses the *Bacillus subtilis sacB* gene. *Appl.Environ.Microbiol.* **59**:1361-1366.
- Reineke, W. y H. J. Knackmuss.** 1979. Construction of haloaromatics utilising bacteria. *Nature* **277**:385-386.
- Rheinwald, J.G., A. M. Chakrabarty, y I. C. Gunsalus.** 1973. A transmissible plasmid controlling camphor oxidation in *Pseudomonas putida*. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **70**:885-889.

- Richaume, A., E. Smit, G. Faurie, y J. van Elsas.** 1992. Influence of soil type on the transfer of plasmid RP4p from *Pseudomonas fluorescens* to introduced recipient y to indigenous bacteria. FEMS Microbiol.Ecol. **168**:123-129.
- Rojo, F., D. H. Pieper, D. Engesser, H. J. Knackmuss, y K. N. Timmis.** 1987. Assemblage of *ortho* cleavage route for simultaneous degradation of chloro- y methylaromatics. Science **238**:1395-1398.
- Sakikawa, T., S. Akimoto, y Y. Ohnishi.** 1989. The *pnd* gene in *E. coli* plasmid R16: Nucleotide sequence y gene expression leading to Mg²⁺ release y stable RNA degradation. Biochem.Biophys.Acta **1007**:158-166.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, y T. Maniatis.** 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Schroth, M.N. y J. G. Hancock.** 1982. Disease-suppressive soil y root-colonizing bacteria. Science **216**:1376-1381.
- Suslow, T.V. y M. N. Schroth.** 1982. Rhizobacteria of sugar beets: effects of seed application y root colonization on yield . Phytopathology **72**:199-206.
- Tedin, K., A. Witte, G. Reisinger, W. Lubitz, y U. Bläsi.** 1995. Evaluation of the *E. coli* ribosomal *rrnB* P1 promoter y phage-derived lysis genes for the use in a biological containment system: A concept study. J.Biotechnol. **39**:137-148.
- Thisted, T., A. K. Nielsen, y K. Gerdes.** 1994. Mechanism of post-segregational killing: translation of Hok, SrnB y Pnd mRNAs of plasmids R1, F y R483 is activated by 3'-processing. EMBO J. **13**:1950-1959.
- Thisted, T., N. S. Sørensen, y K. Gerdes.** 1995. Mechanism of post-segregational killing: secondary structure analysis of the entire Hok mRNA from plasmid R1 suggests a fold-back structure that prevents translation y antisense RNA binding. J.Mol.Biol. **247**:859-873.
- Tiedje, J.M., R. K. Colwell, Y. L. Grossmann, R. E. Hodson, R. E. Lenski, R. N. Mack, y P. J. Regal.** 1989. The planned introduction of genetically

- engineered microorganisms: ecological considerations y recommendations. *Ecology* **70**:298-315.
- Trevors, J.T. y K. M. Oddie.** 1986. R-plasmid transfer in soil y water. *Can.J.Microbiol.* **32**:1610-1613.
- Trevors, J.T., T. Barkay, y A. W. Bourquin.** 1987. Gene transfer among bacteria in soil y aquatic environments: a review. *Can.J.Microbiol.* **33**:191-198.
- Wanner, B.L., R. Kodaira, y F. C. Neidhardt.** 1977. Physiological regulation of a decontrolled *lac* operon. *J.Bacteriol.* **130**:212-222.
- Weinberg, S.R. y G. Stotzky.** 1972. Conjugation y genetic recombination of *Escherichia coli* in soil. *Soil Biol.Biochem.* **4**:171-180.
- Williams, P.A.** 1981. Catabolic plasmids. *TIBS* **6**:23-26.
- Williams, P.A. y K. Murray.** 1974. Metabolism of benzoates y methylbenzoates by *Pseudomonas putida (arvilla)* mt-2: evidence for the existence of a TOL plasmid. *J.Bacteriol.* **120**:416-423.
- Witte, A. y W. Lubitz.** 1989. Biochemical characterization of X174-protein-E-mediated lysis of *Escherichia coli*. *Eur.J.Biochem.* **180**:393-398.
- Witte, A., F. Narendja, W. Säckl, M. Eckerstorfer, M. Szostak, U. Bläsi, G. Halfmann, y W. Lubitz.** 1991. Multifunctional safety vector systems for DNA cloning, controlled expression of fusion genes, y simplified preparation of vector DNA y recombinant gene products. *Advances in Mol.Gen.* **3**:219-239.
- Witte, A., G. Wanner, M. Sulzner, y W. Lubitz.** 1992. Dynamics of PhiX174 protein E-mediated lysis of *Escherichia coli*. *Arch.Microbiol.* **157**:381-388.
- Witte, A., G. Wanner, U. Bläsi, G. Halfmann, M. Szostak, y W. Lubitz.** 1990. Endogenous transmembrane tunnel formation mediated by X174 lysis protein E. *J.Bacteriol.* **172**:4109-4114.

Wong, C.L. y N. W. Dunn. 1974. Transmissible plasmid coding for the degradation of benzoate y m-toluate in *Pseudomonas arvilla* mt-2. Genet.Res. **23**:227-232.

Worsey, M.J. y P. A. Williams. 1975. Metalolism of toluene y xylenes by *Pseudomonas putida* (*arvilla*) mt-2: evidence for a new function of the TOL plasmid. J.Bacteriol. **124**:7-13.

Yanish-Perron, C., J. Viera, y J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors y host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 y pUC19 vectors. Gene **33**:103-109.



UNIVERSIDAD DE GRANADA
12 JUN. 1997
COMISION DE DOCTORADO



Biblioteca Universitaria de Granada



01053030