

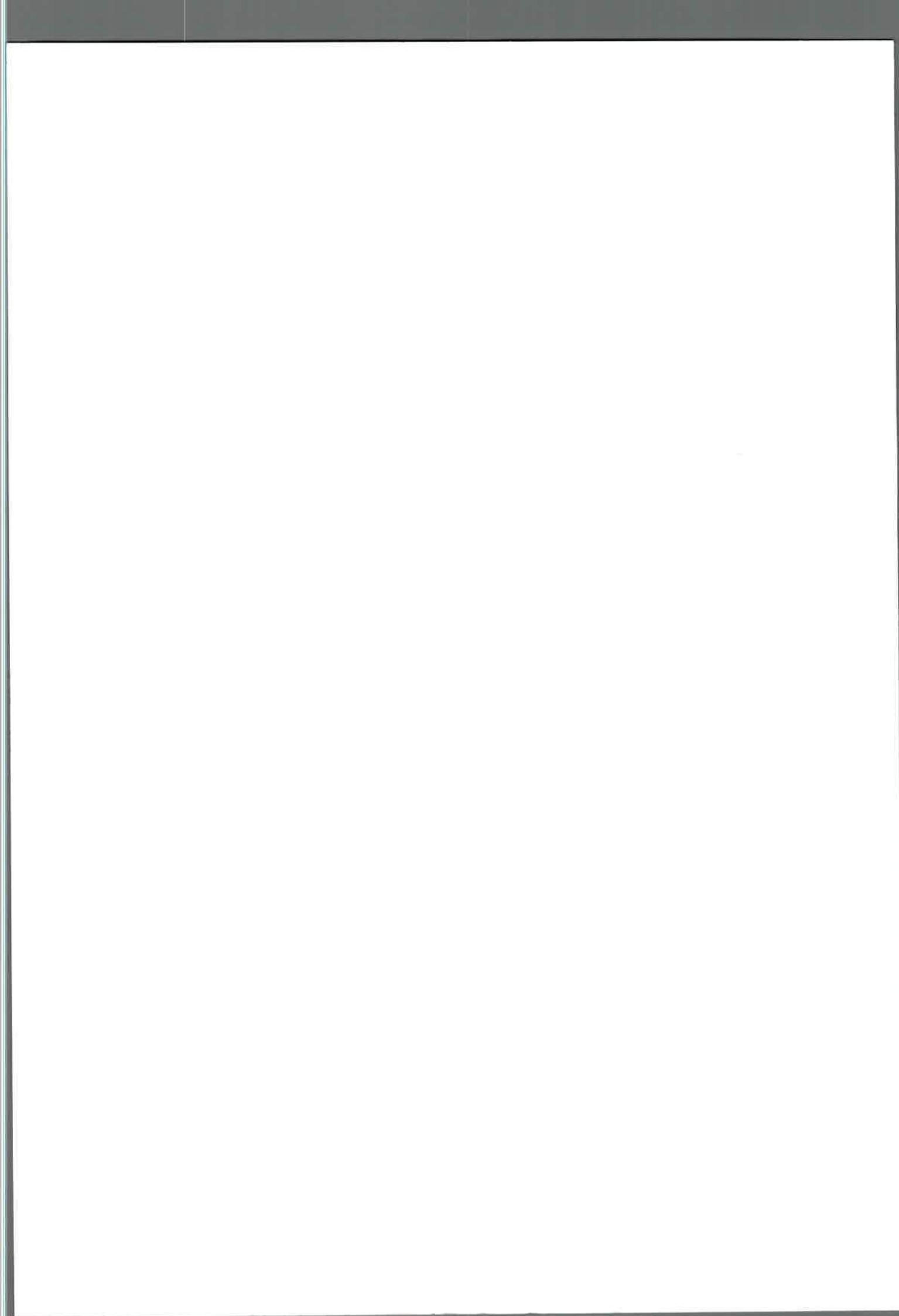
BOERIS, PAOLA S  
Respuesta de pseudom

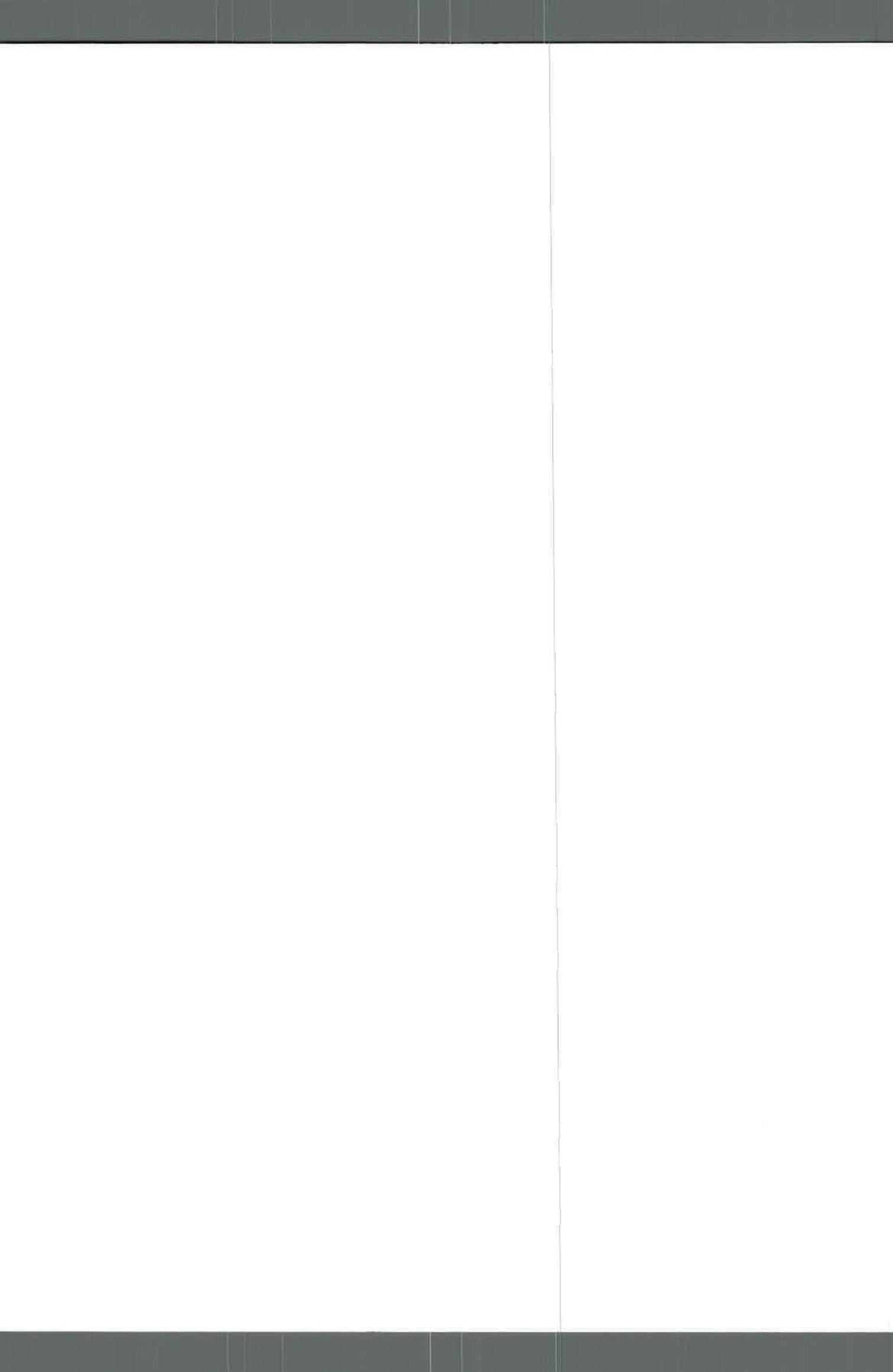
2011

71253

71253

MFN:
Clasif:
T-783





[A mi familia]

[A Mariano]

1000

71253



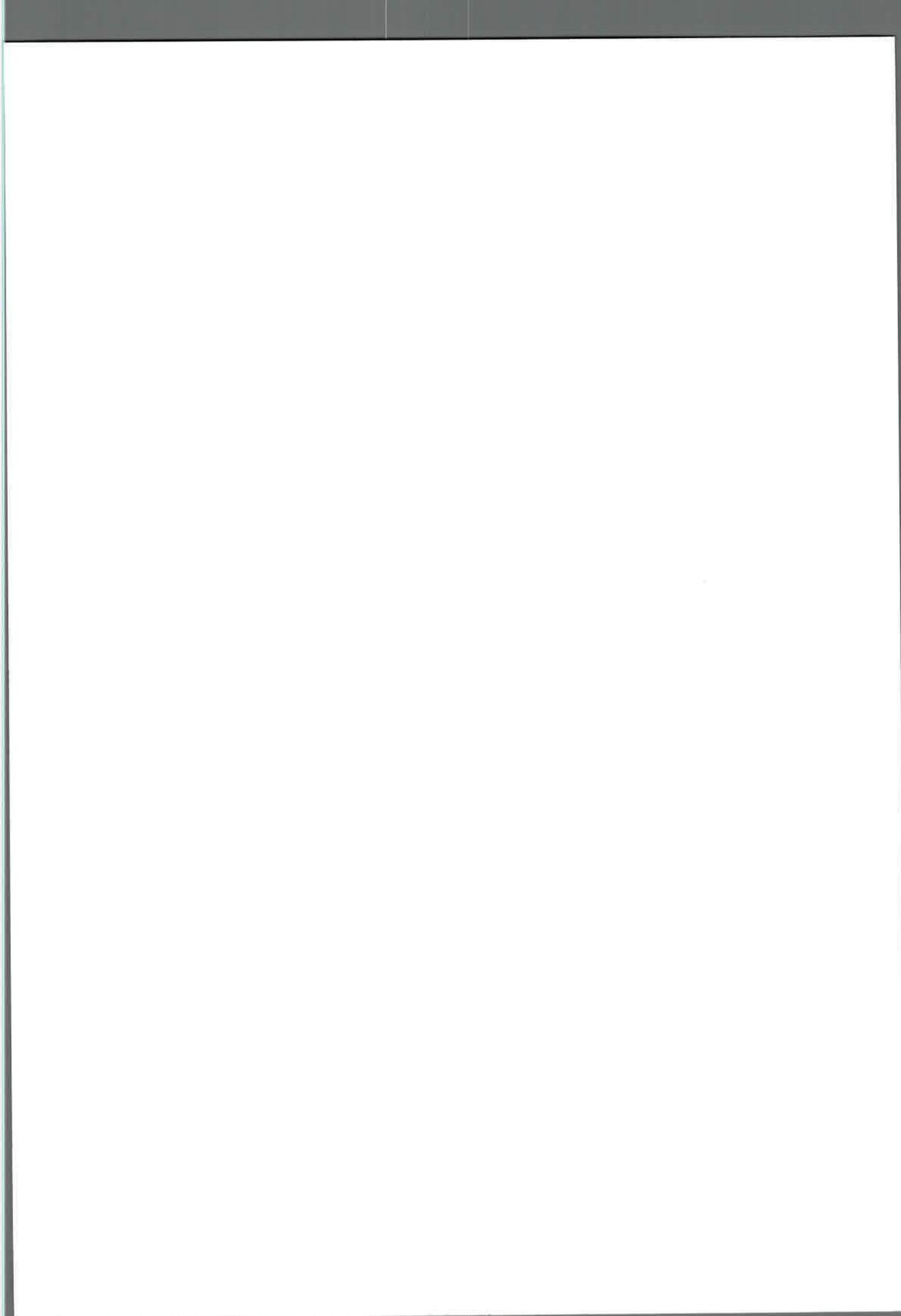
Universidad Nacional de Río Cuarto  
Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas  
y Naturales  
Departamento de Biología Molecular

"RESPUESTA DE *Pseudomonas* FRENTE AL  
ESTRÉS OCASIONADO POR DETERGENTES  
CATIÓNICOS Y SU RELACIÓN CON LA  
CAPACIDAD DE BIODEGRADAR ESTOS  
COMPUESTOS"

**Tesis Doctoral**

Paola S. Boeris

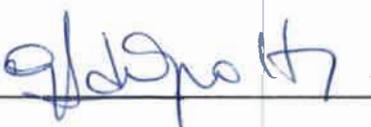
2011



Trabajo presentado por la microbióloga Paola S. Boeris para optar al grado de Doctora en Ciencias Biológicas por la Universidad Nacional de Río Cuarto.

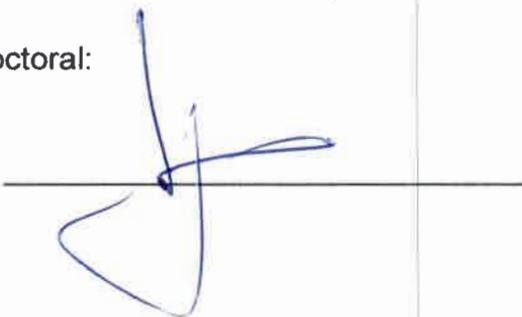
Directora de la Tesis Doctoral:

Dra. Gloria I. Lucchesi



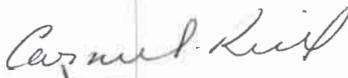
Co-Director de la Tesis Doctoral:

Dr. Mario A. Salvano



Miembros del Jurado:

Dra. Carmen Sánchez de Rivas, UBA.



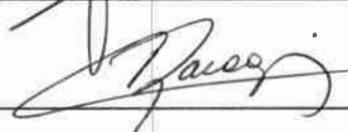
---

Dra. Eleonora García Véscovi, UNR.



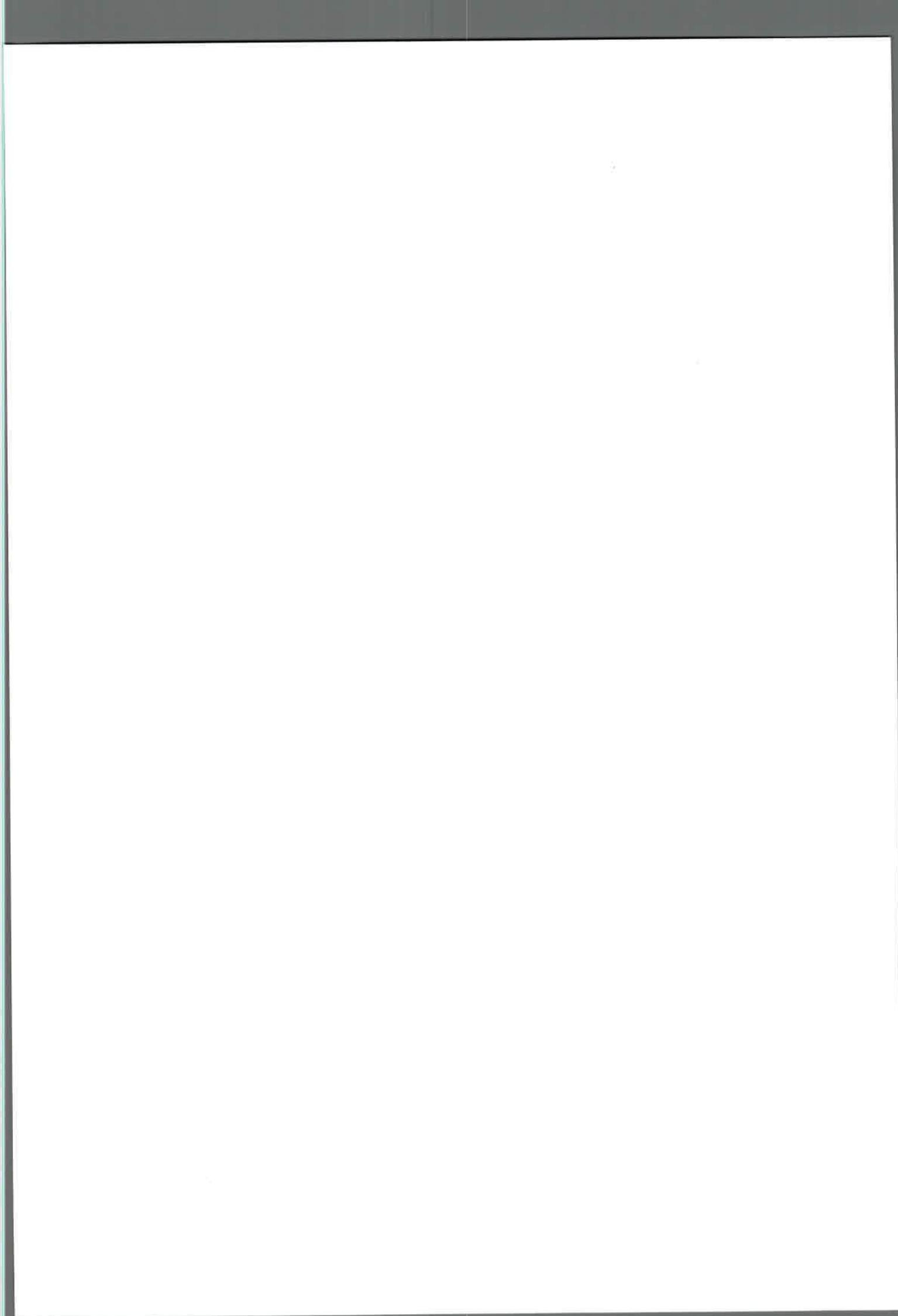
---

Dra. Graciela Racagni, UNRC.



---

Río Cuarto, 19 de Diciembre de 2011



La realización de este trabajo me ha permitido culminar una etapa más y en sus páginas he plasmado los resultados de varios años de trabajo. Sin embargo, no son solo resultados los que obtuve en estos años... Con el tiempo aprendí que el trabajo en el "lab" exige paciencia y dedicación; que un día podés saltar de alegría porque obtuviste el resultado tan deseado y al otro no porque los "bichos no crecieron" y hay que empezar de cero; que de nada sirve "pipetear" si nadie sabe lo que hacés y porque lo hacés.

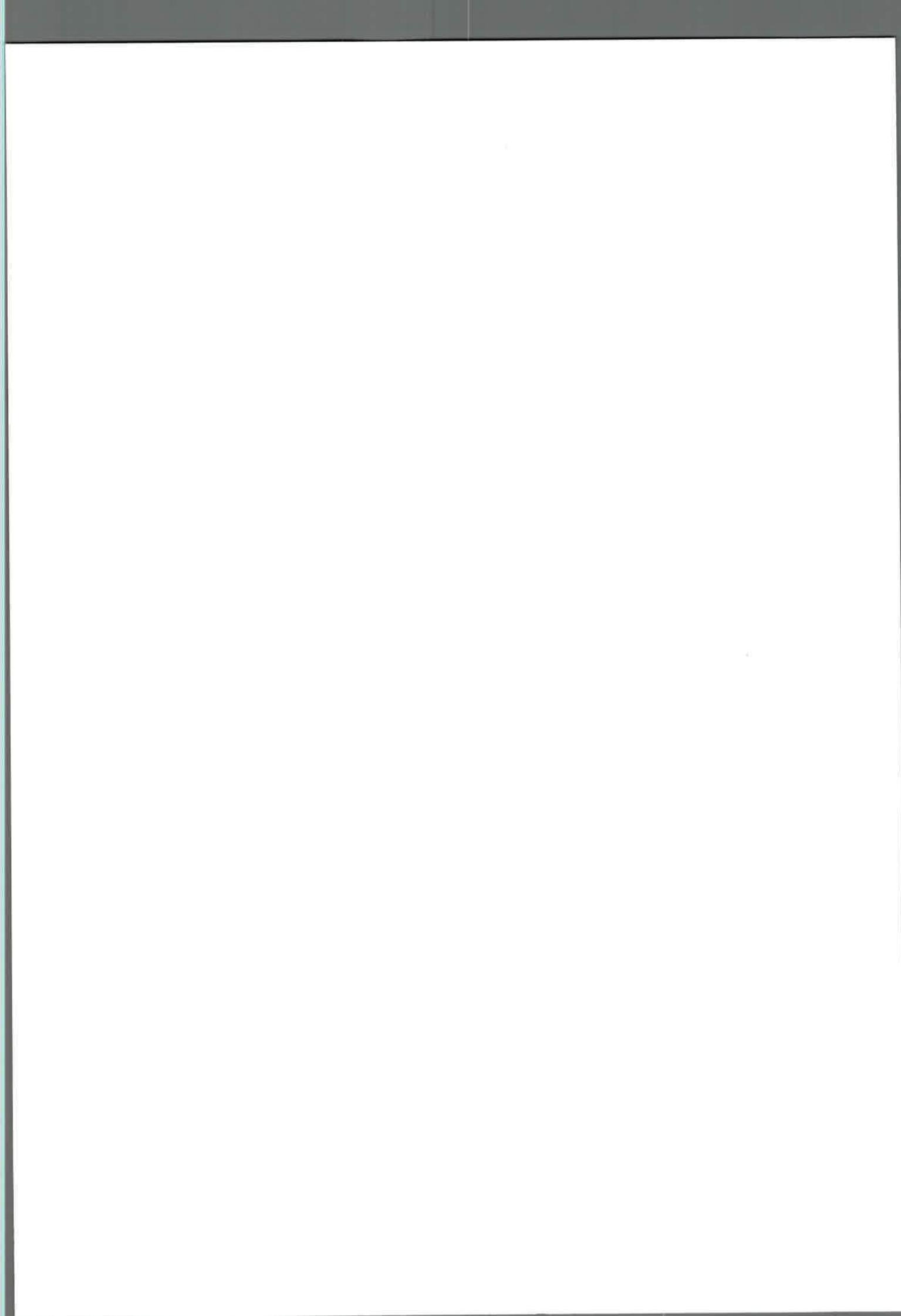
Los recuerdos de viajes y congresos, de días de buena y mala suerte, de largas charlas mate de por medio, de la música fuerte a última hora del día, de chistes nerds, de momentos compartidos y otras tantas cosas más que no pueden ser plasmadas en papel también forman parte de esta tesis.

A aquellas personas que laboralmente o afectuosamente, me acompañaron, me escucharon, me ayudaron, me aconsejaron y recorrieron conmigo este camino les agradezco de corazón.

Gloria, en 2003 comencé a formar parte del laboratorio 5, dirigiste mi tesis de grado y no te libraste de mí. Luego de dos intentos fallidos (lágrimas de por medio) la beca salió y me acompañaste hasta ahora. Gracias por haber sido mi directora, por discutir tantas veces los resultados obtenidos y ayudarme a encontrar el porqué de los mismos, por las correcciones y por las tantas veces que escuchaste mis seminarios, defensas de informes y presentaciones a congresos una semana antes de la fecha correspondiente.

Mario, también vos formas parte de mis años vividos dentro del lab 5, me ayudaste cuando no sabía cómo seguir y aprendí que no era tan dramático como creía. Gracias por colaborar en la dirección de mi tesis y por la paciencia en escuchar, desde el principio, mi relato: "cuando el bicho se expone a TDTMA, cardio disminuye, PG y PA incrementan... cuando crece con el detergente los PL totales incrementan... la adición de aluminio provoca incremento de PC... PC actúa como reservorio temporario del ion..."

Carmen, Eleonora Kelly, gracias por aceptar ser jurados de mi tesis, por los valiosos aportes que cada una me brindó, por leer y corregir



los informes anuales y el borrador de tesis, por asistir a las reuniones y por la excelente y afectuosa predisposición para conmigo.

Liffu, Fer, Gi, Gastón, Gonzalo y Romi, pero que lindo que es compartir (o haber compartido) con ustedes las horas dentro del 5!!!. Cuantos almuerzos, mates, criollitos, risas, música, chistes, favores, catarsis, resultados, discusiones, desacuerdos, volver a empezar, nervios, alegrías y momentos compartidos e inolvidables. Gracias por ser mis compañeros y amigos, por ser como son y por formar parte de la hermosa cotidianidad de mi vida.

Pao, Marina, Julia y Lisandro. Cuánto tiempo ha pasado ya, no?, como fueron cambiando las cosas, como fuimos creciendo y como cada uno eligió su camino. Ustedes ya pasaron por esto y ahora me toca a mí vivirlo y agradecerles a ustedes. Gracias por ayudarme con mis primeros pasos en la biología molecular y en la bioinformática y por compartir viajes, cursos, congresos, altibajos, mates y cenas imposibles de olvidar.

Diego y Lucas, futuros colegas dentro de poco!!!. Gracias por los útiles consejos, por el tiempo brindado para discutir cambios de protocolos para los benditos PCRs, cortes con enzimas y ligaciones, por los mates y charlas compartidas a última hora de la tarde y durante los fines en los cuales asistimos al lab.

Mariela, Miguel B. y Dani, gracias por su invaluable ayuda durante el desarrollo de mi trabajo. Dani! gracias por tus consejos al momento de decidir irme un par de meses.

Miguel A., gracias por recordarme 500 veces los papeles que tenía que presentar, por recordarme que debía votar y por la inmensa paciencia en responder las veces que fuera necesario como se hacía tal o cual cosa.

Isabel, Otto y Christian, mi querida gente de México!. Gracias por aceptarme en su grupo de trabajo, por ayudarme, enseñarme y

acompañarme durante mi estancia, gracias por el afecto brindado y por hacerme sentir una más del grupo. Espero que las vueltas de la vida nos vuelvan a encontrar.

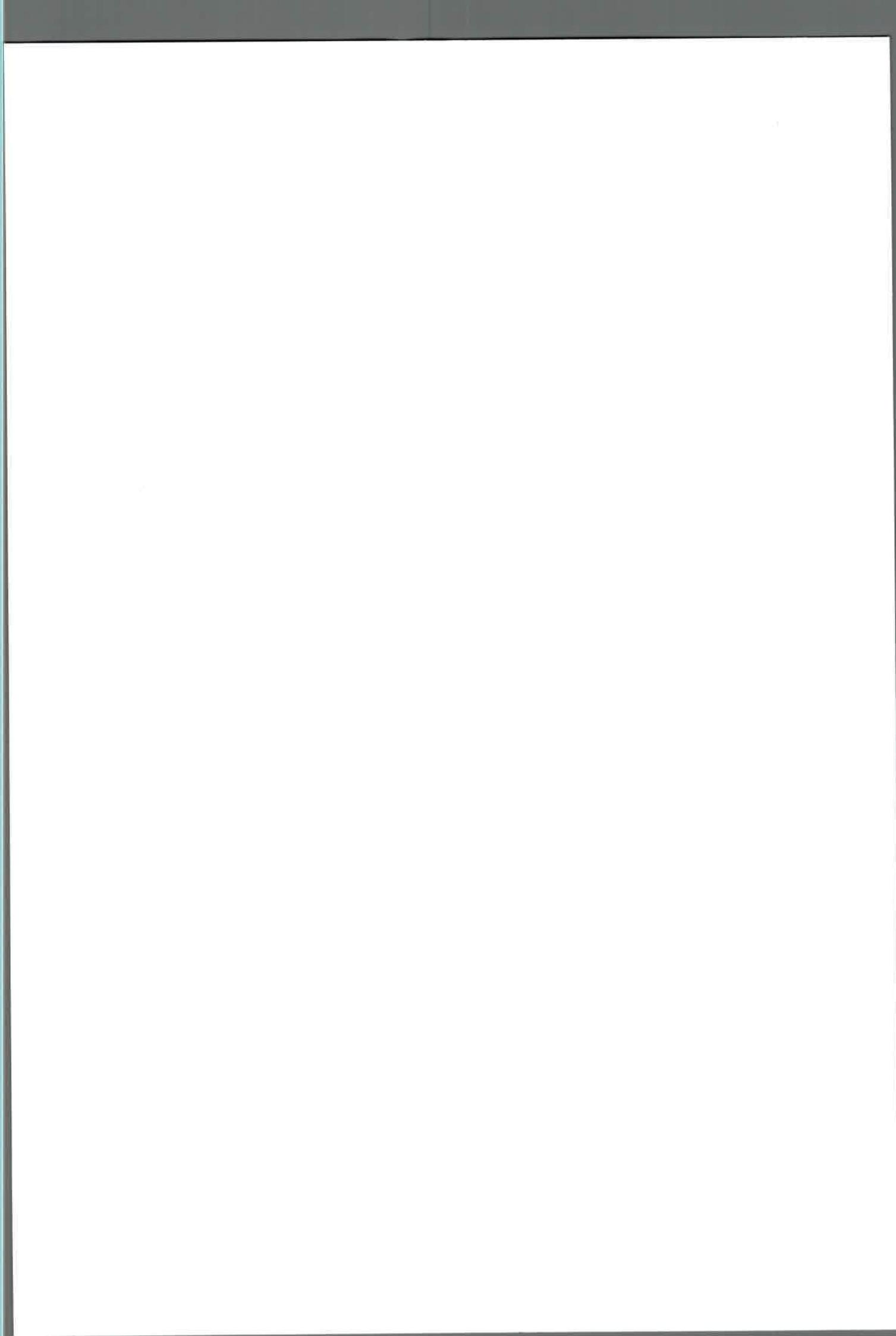
Diana y Miguel (Dianilla y Miguelunch), amiga urugubolimexicana y amigo mexicano que lindo fue haber compartido 5 meses con ustedes. Gracias por haber hecho que mi estancia sea inolvidable, gracias porque nunca me sentí sola, por mostrarme lugares hermosos de ese país. Espero cruzarme nuevamente con ustedes!!!

Papi, tios, Fla, Gusti, Iván, Dani, Nati, Franco, Rodri y Lucas, mi adorada familia!. Gracias por acompañarme y apoyarme siempre en mis decisiones, por recordar que trabajo con una bacteria que come un detergente, por estar en todas las etapas de mi vida. Los quiero mucho!

Mariano, llegaste a mi vida y compartiste conmigo la mitad de este camino. Gracias mi amor por levantarme el ánimo las veces que volvía frustrada del lab, por siempre tener una hermosa sonrisa para regalarme, por escucharme y permitirme ausentarme durante horas frente a la computadora, gracias por entender y aceptar los tiempos en los cuales mi cabeza solo pensaba en el lab, las mutantes y el último informe. Gracias amor de mi alma!

Rafa, Cele, María y Meli, hemos compartido muchos momentos inolvidables!! Compartimos tantas risas y anécdotas, horas de docencia, María: tantas salidas en tus tres meses viviendo en casa! que lindo!!!!. Les agradezco por estar a mi lado y me hace muy feliz que formen parte de mi vida.

Noe, Romi, Pepa, Lauri, Vero y Nati, amigas queridas!!!! Nos conocimos durante las cursadas de Micro!!! Como pasa el tiempo, no? Y sin embargo nuestra amistad sigue tan intacta! Gracias por las horas compartidas (aunque hoy en día sean esporádicas), por la inmensidad de horas de charlas tan alegres, por los amigos invisibles, por los mates, las salidas y la felicidad, buena onda y tranquilidad que cada una de ustedes me brinda.

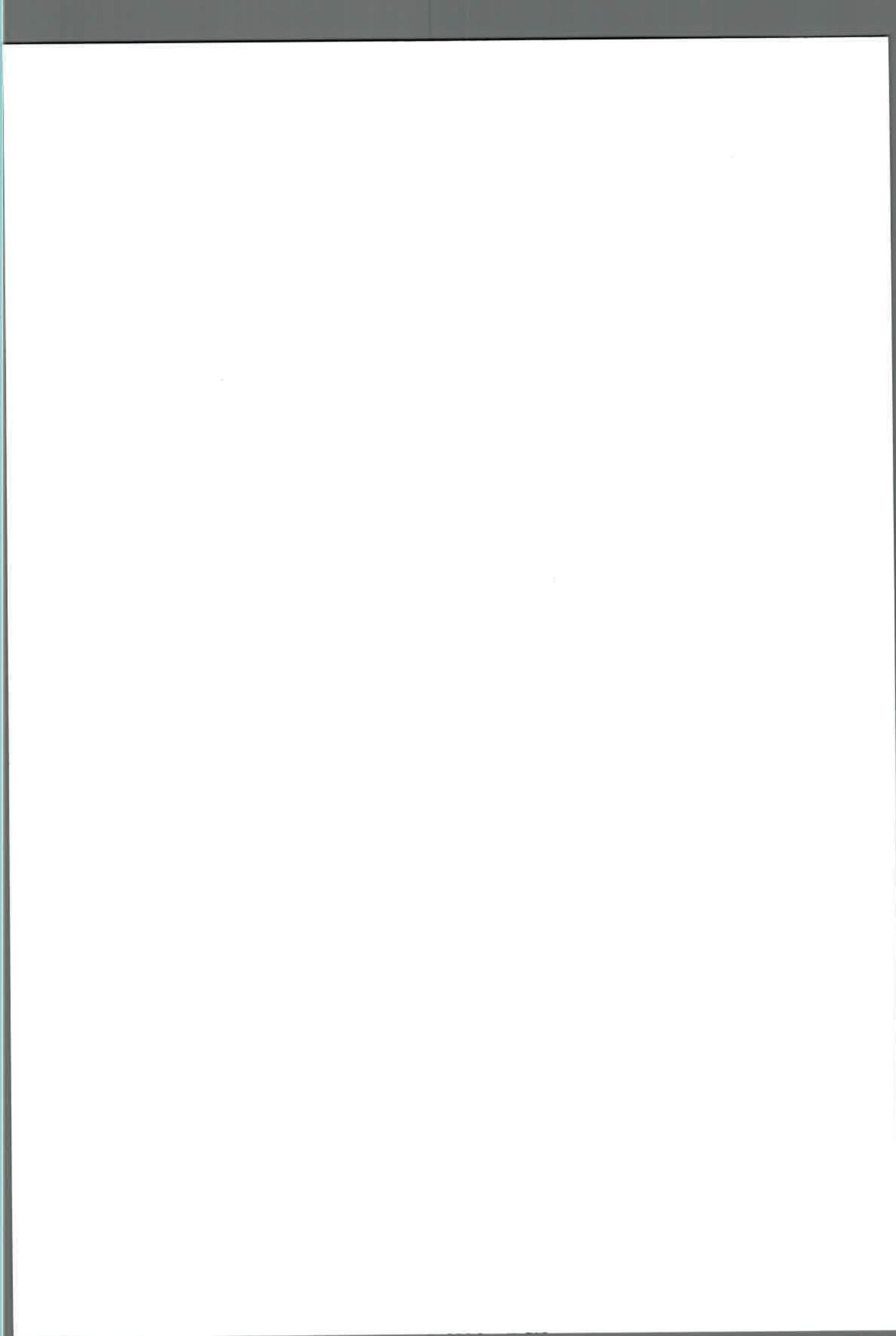


Pablo, amigo intiano!!! Gracias por tener siempre un oído para escuchar, un consejo para dar, un chiste que contar, anécdotas que recordar. Gracias por aceptarme en tu casa cada vez que un curso o congreso me llevó para tus pagos!!!

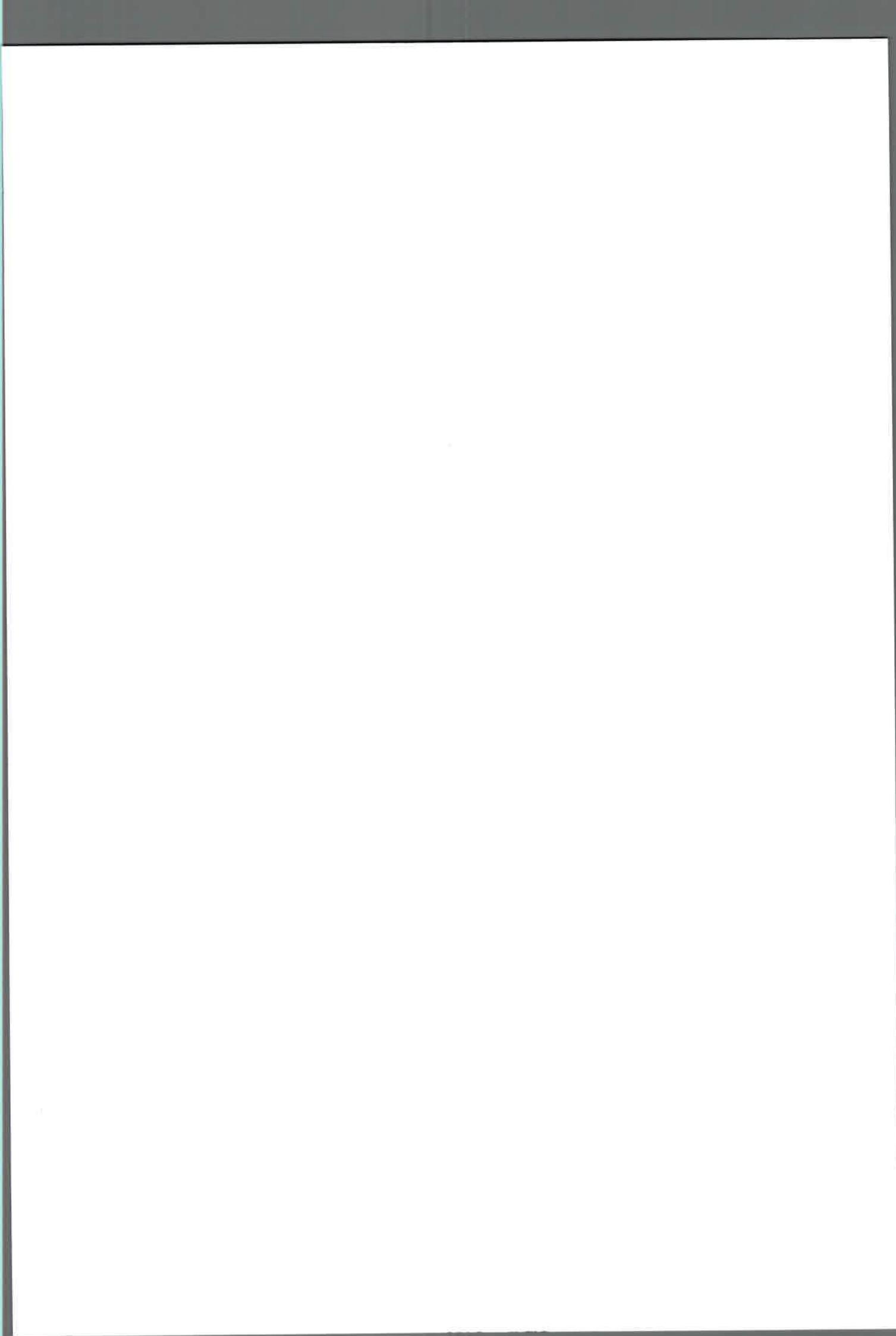
Maru, Marina, Marinita, Andru y Ricardo, amigos de la vida!!! Que lindo que es tenerlos en mi vida! Gracias por los tantos años de amistad, las tantas reuniones y salidas, los tantos recuerdos, los tantos momentos, las tantas alegrías y tristezas. Gracias por compartir conmigo este camino.

Y a todas aquellas personas con las que compartí congresos, cursos, viajes, ciclos de seminarios, horas de docencia, charlas en el pasillo del departamento de BM, muchas gracias.

Loli.



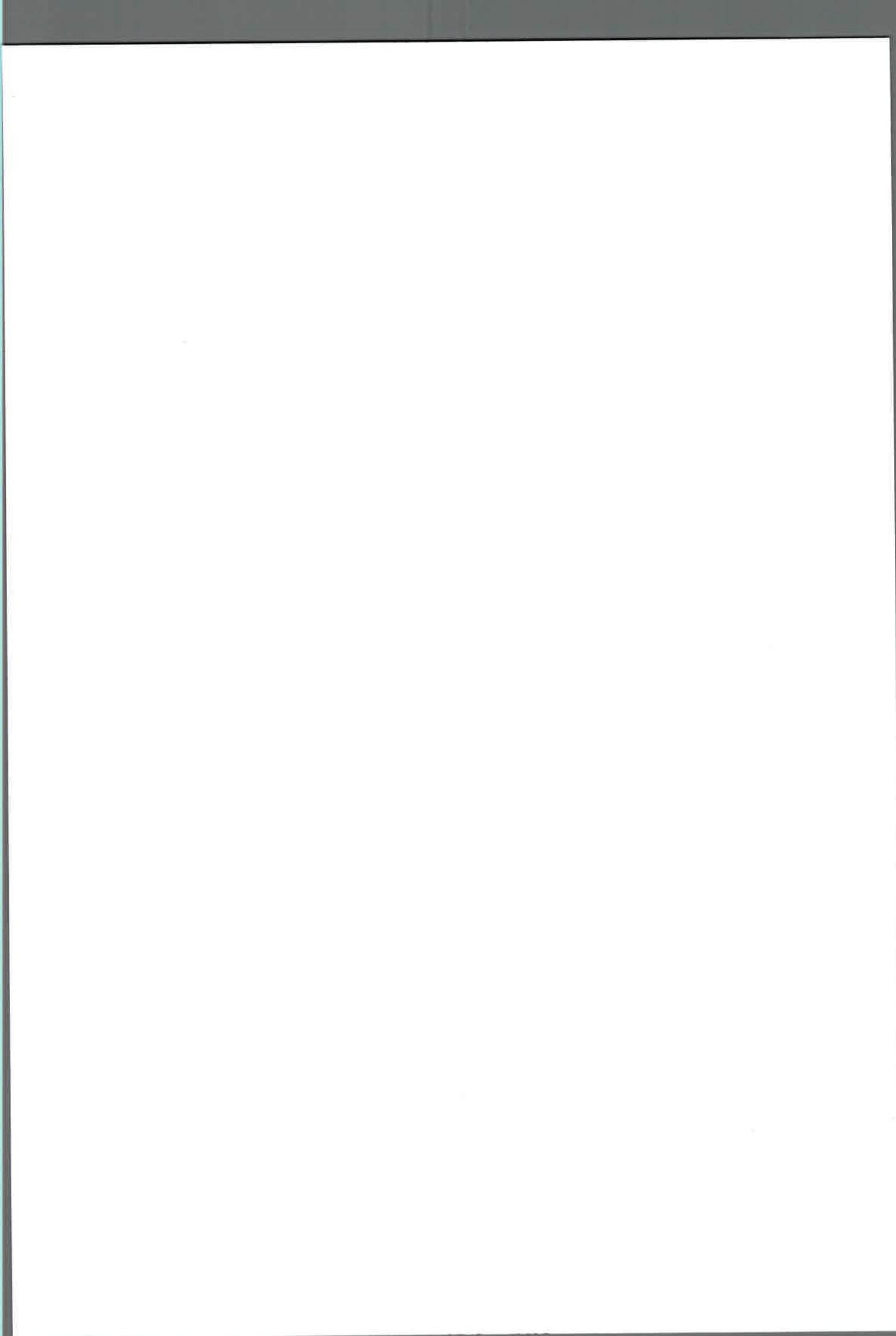
<b>1. Resumen / Abstract</b> .....	1
<b>2. Introducción</b>	
2.1. Características generales del Género <i>Pseudomonas</i> .....	5
2.2. Contaminación ambiental.....	6
2.2.1. Contaminantes químicos.....	7
2.2.1.1. Contaminación y efectos tóxicos de los compuestos de amonio cuaternario sintéticos.....	7
2.2.2. Metales tóxicos.....	10
2.2.2.1. Aluminio como contaminante y agente tóxico de células bacterianas.....	10
2.3. Remediación ambiental.....	11
2.3.1. Biorremediación de QACs.....	12
2.3.2. Descontaminación de metales tóxicos.....	13
2.4. Mecanismos de resistencia bacteriana a QACs y aluminio.....	14
2.5. Composición general de las membranas de bacterias Gram negativas.....	16
2.6. Implicancia de los fosfolípidos en la resistencia bacteriana ante diversas situaciones de estrés.....	17
2.7. Biosíntesis de fosfolípidos en bacterias.....	21
2.8. Antecedentes Específicos y Objetivos.....	24
2.8.1. Objetivo general.....	25
2.8.2. Objetivos específicos.....	25
<b>3. Materiales y Métodos</b>	
3.1. Medios de cultivo.....	26
3.2. Conservación y mantenimiento de las cepas.....	26
3.3. Microorganismos y condiciones de cultivo.....	26
3.4. Recuento de células viables.....	29
3.5. Cinética de muerte.....	29
3.6. Estimulación de células de <i>P. putida</i> a TDTMA y a Al <sup>+3</sup> .....	29
3.7. Ensayo de incorporación de [metil- <sup>14</sup> C]-colina en <i>P. putida</i> A ATCC12633.....	30
3.8. Extracción de polifosfatos (poliP).....	30
3.9. Análisis de fosfolípidos (PL).....	30
3.9.1. Extracción de fosfolípidos.....	30
3.9.2. Cromatografía en placa delgada (TLC).....	31
3.9.3. Revelado de cromatogramas.....	31
3.9.4. Cuantificación de PL.....	32
3.9.5. Obtención de PL marcados radiactivamente.....	33
3.9.6. Análisis y cuantificación de PL por HPLC.....	33
3.10. Determinación de proteínas.....	33
3.11. Determinación de actividades enzimáticas.....	33
3.11.1. Fosfatidilcolina sintasa (PCS).....	33
3.11.2. Fosfolípido <i>N</i> -metiltransferasa (PMT).....	34
3.11.3. Fosfolipasa D (PLD).....	35



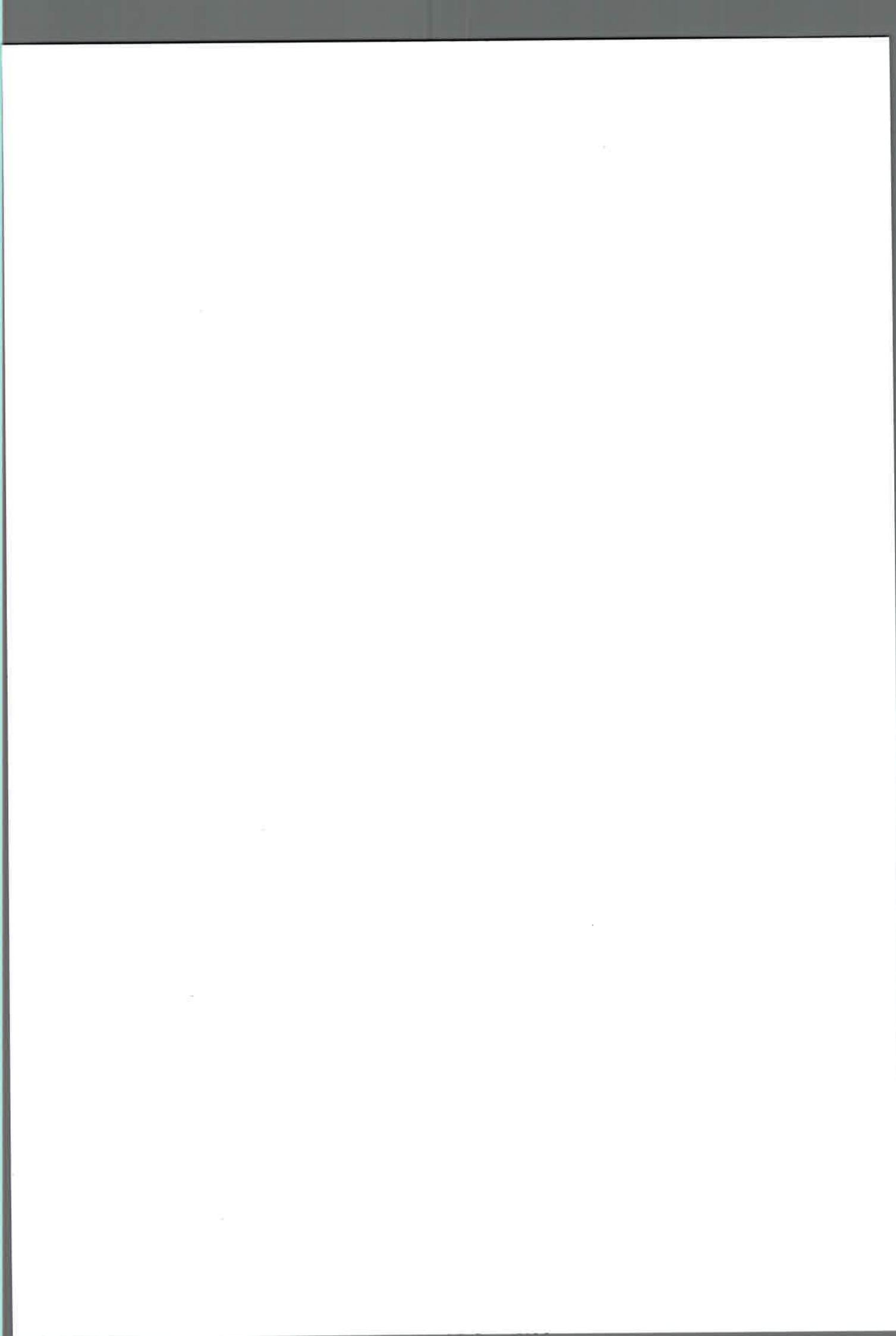
3.12. Detección de Al <sup>3+</sup> en extractos libres de células y en membranas celulares.....	36
3.13. Tinción de células con 10 N-nonil naranja de acridina (NAO).....	36
3.14. Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	37
3.15. Manipulación de ADN.....	37
3.16. Ligación de fragmentos de ADN a vectores.....	40
3.17. Preparación de células competentes de <i>E. coli</i> .....	40
3.18. Transformación de <i>E. coli</i> .....	41
3.19. Búsqueda, clonación y secuenciamiento de genes de interés.....	41
3.19.1. Genes homólogos a fosfatidilcolina sintasa ( <i>pcs</i> ) en <i>P. putida</i> .....	41
3.19.2. Gen homólogo a <i>cardiolipina sintasa (cls)</i> en <i>P. putida</i> .....	42
3.20. Expresión de PP0731 y PP4677.....	42
3.21. Mutagénesis de genes homólogos a <i>pcs</i> y a <i>cls</i> en <i>P. putida</i> A ATCC 12633.....	43
3.21.1. Obtención de mutantes de <i>P. putida</i> A ATCC 12633 afectadas en la síntesis de PC.....	44
3.21.2. Obtención de mutantes de <i>P. putida</i> A ATCC 12633 afectadas en el gen homólogo a <i>cls</i> .....	45
3.22. Electroporación de plásmidos en <i>P. putida</i> A ATCC 12633 y selección de dobles recombinantes...	46
3.23. Corroboración de <i>P. putida</i> A ATCC 12633 mutante.....	48
3.23.1. Confirmación de la mutación insercional en los genes homólogos a los <i>orfs pp0731</i> y <i>pp4677</i> .....	48
3.23.2. Confirmación de la mutación delecional del gen homólogo a <i>cls</i> .....	49
3.24. Complementación de <i>P. putida</i> PB01 ( <i>pcs::aacC</i> ) y de <i>P. putida</i> GP01 ( <i>cls</i> homólogo $\Delta$ <i>aacC</i> ).....	49
3.25. Alineamientos de secuencias y construcción de árboles filogenéticos.....	50
3.26. Números de Acceso a la secuencias de nucleótidos de <i>pcs</i> .....	50

#### 4. Resultados y Discusión

<b>4.1. Sección I: Respuesta de <i>P. putida</i> A ATCC 12633 frente al estrés ocasionado por TDTMA y su relación con los fosfolípidos aniónicos.....</b>	<b>51</b>
4.1.1. Determinación de la Actividad Fosfolipasa D (PLD) en células de <i>P. putida</i> A ATCC 12633 estimuladas con TDTMA.....	52
4.1.2. Búsqueda en <i>P. putida</i> KT2440 de genes homólogos a los miembros de la superfamilia de las PLD.....	53
4.1.3. Amplificación y secuenciamiento del <i>orf pp5364</i> de <i>P. putida</i> KT 2440.....	55
4.1.4. Obtención de mutantes de <i>P. putida</i> A ATCC 12633 afectadas en el gen homólogo a <i>cls</i> .....	56
4.1.5. Caracterización fisiológica de <i>P. putida</i> GP01.....	57
4.1.6. Análisis fosfolipídico de <i>P. putida</i> A ATCC 12633 salvaje y mutante en condiciones no estresantes de crecimiento.....	58
4.1.7. Análisis fosfolipídico de <i>P. putida</i> GP01 en condiciones estresantes de crecimiento.....	63
4.1.8. Actividad fosfolipasa D (PLD) en <i>P. putida</i> A ATCC 12633 salvaje y mutante.....	65
4.1.9. Análisis de ORFs de <i>P. putida</i> KT2440 candidatos a codificar una segunda CLs.....	66
<b>4.2. Sección II: Participación de fosfatidilcolina en la respuesta de <i>P. putida</i> A ATCC 12633 frente al estrés ocasionado por TDTMA y Al<sup>3+</sup>.....</b>	<b>68</b>
4.2.1. Composición fosfolipídica de células de <i>P. putida</i> A ATCC 12633 crecida con TDTMA como única fuente de C y N.....	68
4.2.2. Análisis estructural de células de <i>P. putida</i> A ATCC 12633.....	70
4.2.3. Efecto del aluminio sobre la composición de fosfolípidos de <i>P. putida</i> A ATCC 12633.....	74



4.2.4. Determinación de las actividades enzimáticas involucradas en la biosíntesis de PC en <i>P. putida</i> A ATCC 12633.....	78
4.2.5. Incorporación de colina a PC.....	80
4.2.6. Determinación de actividad PCS y PMT en <i>P. putida</i> KT2440.....	84
4.2.7. Búsqueda de ORFs homólogos a PCS en <i>P. putida</i> KT2440.....	85
4.2.8. Expresión de PP0731 y PP4677 de <i>P. putida</i> KT2440.....	89
4.2.9. Obtención de mutantes de <i>P. putida</i> A ATCC 12633 en los genes homólogos a <i>pp0731</i> y <i>pp4677</i> .....	90
4.2.10. Perfil fosfolipídico de <i>P. putida</i> PB01 y <i>P. putida</i> PB02.....	91
4.2.11. Complementación de <i>P. putida</i> PB01.....	94
4.2.12. Caracterización fisiológica de <i>P. putida</i> PB01.....	95
4.2.13. Efecto del aluminio en la sobrevivencia de <i>P. putida</i> PB01.....	96
4.2.14. Detección de Al <sup>+3</sup> en membrana de <i>P. putida</i> salvaje y mutante.....	97
<b>5. Conclusiones.....</b>	<b>99</b>
<b>6. Perspectivas.....</b>	<b>102</b>
<b>7. Bibliografía.....</b>	<b>105</b>
<b>8. Trabajos científicos publicados.....</b>	<b>115</b>



## Índice de Tablas y Figuras.

### Introducción

Figura 2.1: Clasificación general de los detergentes sintéticos.....	8
Figura 2.2: Esquema representativo de la envoltura celular de bacterias Gram negativas.....	16
Figura 2.3: Vía de biosíntesis de PL en bacterias.....	22

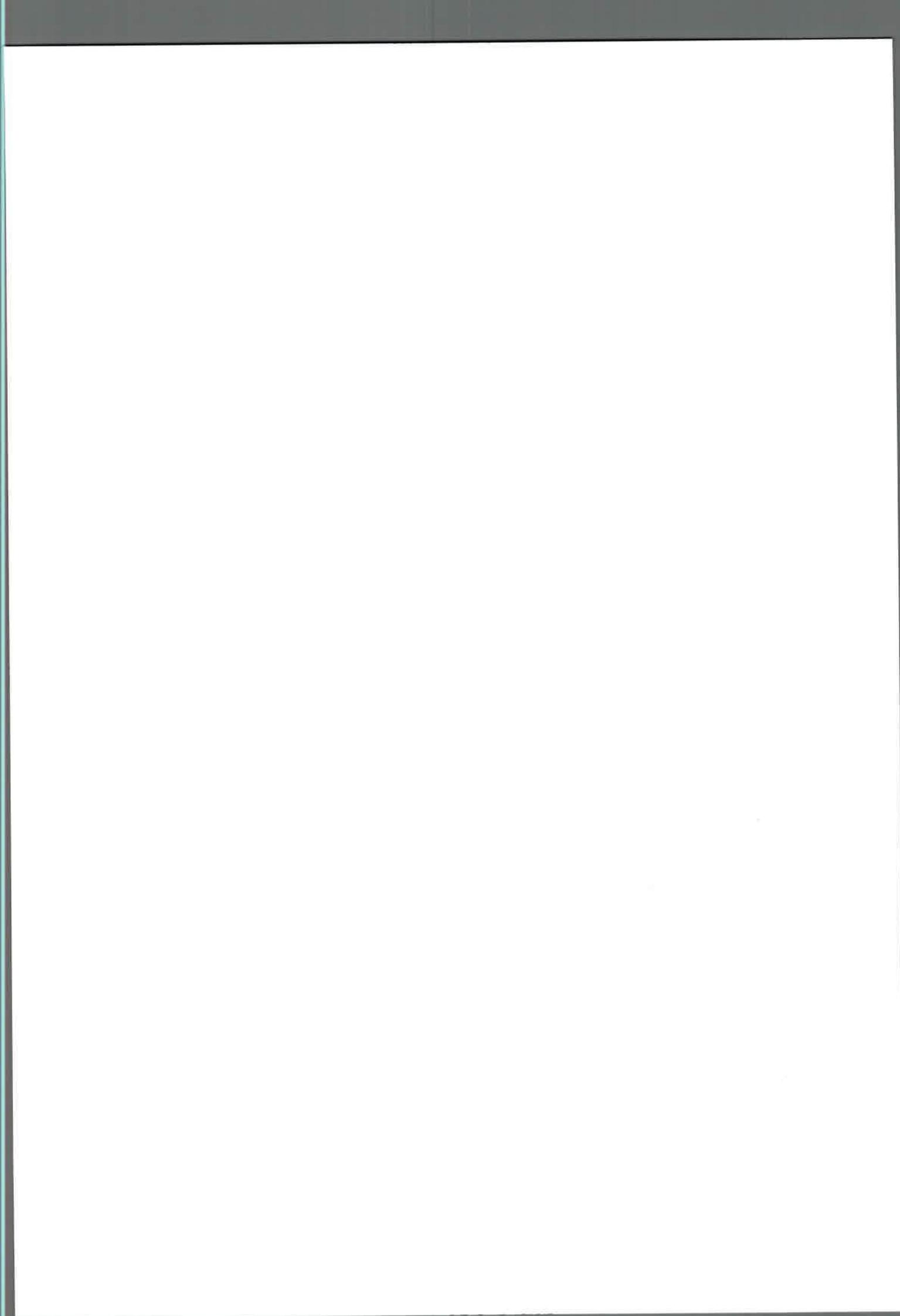
### Materiales y Métodos

Tabla 3.1: Cepas bacterianas y plásmidos usados en este estudio.....	28
Tabla 3.2: Oligonucleótidos usados en este estudio.....	39
Figura 3.1: Esquema del sistema de expresión usado, pET9a- <i>E. coli</i> BL21 (DE3)/pLysS.....	43
Figura 3.2: Mapa circular de pKNG101 y Esquema del mecanismo de doble recombinación homóloga.....	47
Figura 3.3: Esquema representativo del genoma de <i>P. putida</i> A ATCC 12633 y de sus mutantes isogénicas: <i>P. putida</i> PB01 y <i>P. putida</i> PB02.....	48
Figura 3.4: Esquema representativo del genoma de <i>P. putida</i> A ATCC 12633 y de su mutante derivada: <i>P. putida</i> GP01.....	49

### Resultados y Discusión

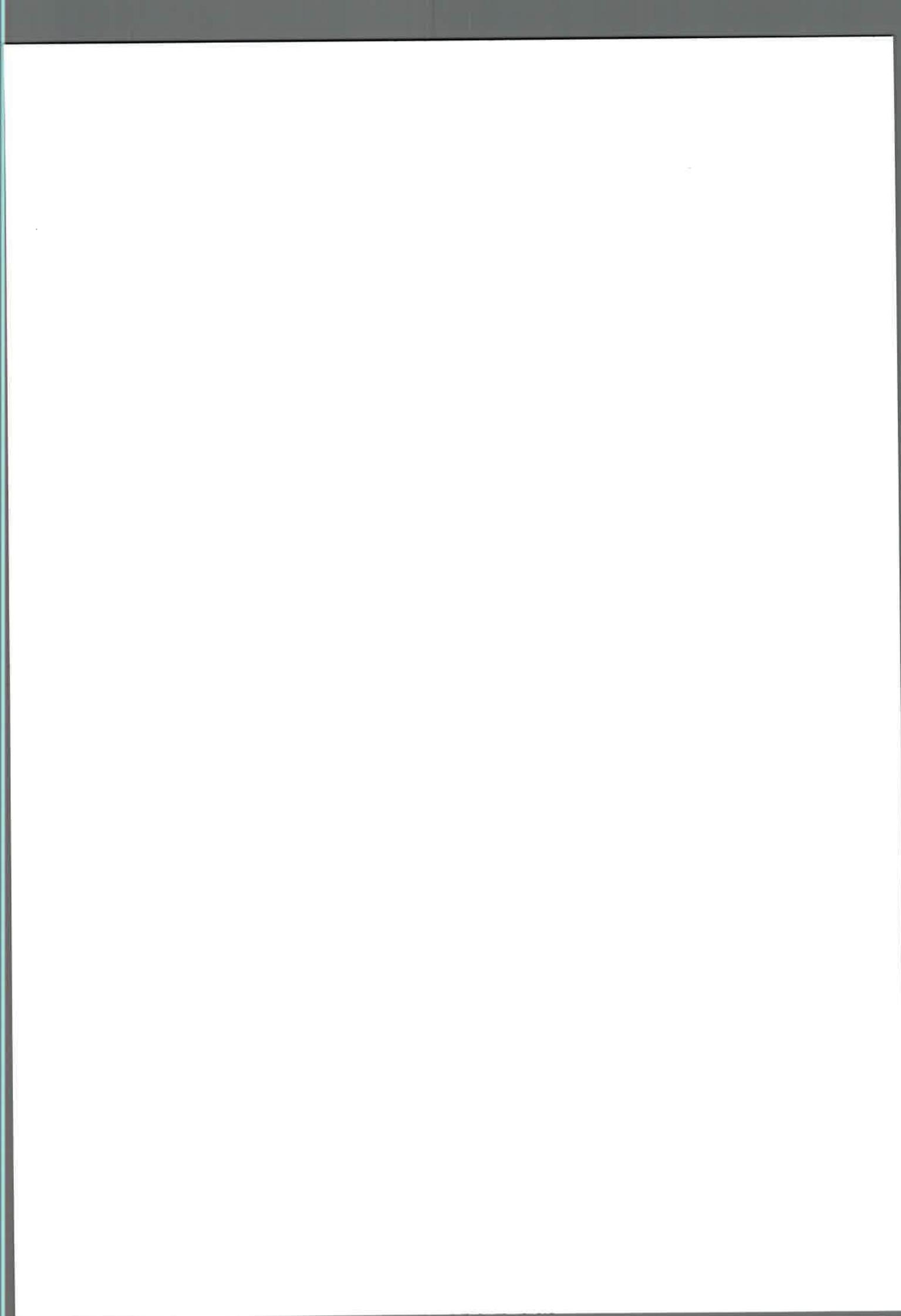
#### Sección I: Respuesta de *P. putida* A ATCC 12633 frente al estrés ocasionado por TDTMA y su relación con los fosfolípidos aniónicos

Figura 4.1.1: Efecto de TDTMA sobre la actividad PLD.....	53
Tabla 4.1.1: ORFs de <i>P. putida</i> KT2440 homólogos a miembros de la superfamilia de las PLD.....	54
Figura 4.1.2: Secuencia completa del gen <i>pp5364</i> ( <i>cardiolipina sintasa</i> ) de <i>P. putida</i> KT2440.....	55
Figura 4.1.3: Reacción de PCR para confirmar la inserción del gen de resistencia a gentamicina en <i>P. putida</i> GP01.....	57
Figura 4.1.4: Crecimiento de <i>P. putida</i> A ATCC 12633 y de <i>P. putida</i> GP01 en: medio rico LB o en HPI-BSM en presencia de fuentes preferenciales de carbono y nitrógeno.....	58
Tabla 4.1.2: Composición fosfolipídica de <i>P. putida</i> salvaje y mutante crecidas en medio LB.....	59
Tabla 4.1.3: Composición fosfolipídica de <i>P. putida</i> A ATCC 12633 salvaje y mutante crecida en HPI-BSM con glucosa y NH <sub>4</sub> Cl.....	60
Figura 4.1.5: Visualización de CL en membranas.....	61
Tabla 4.1.4: Composición fosfolipídica de <i>P. putida</i> salvaje y mutante en diferentes etapas del crecimiento bacteriano.....	62
Figura 4.1.6: Patrón fosfolipídico de <i>P. putida</i> A ATCC 12633 y <i>P. putida</i> GP01.....	63
Tabla 4.1.5: Composición de fosfolípidos de <i>P. putida</i> GP01 crecidas en HPI-BSM-Glucosa/NH <sub>4</sub> Cl expuestas o no a TDTMA.....	64
Tabla 4.1.6: Actividad PLD en <i>P. putida</i> A ATCC 12633 salvaje y mutante.....	65
Figura 4.1.7: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de diferentes ORFs de <i>P. putida</i> KT2440 homólogos a CLs.....	66
Tabla 4.1.7: Comparación de F413, PP0892 y PP3264.....	67



**Sección II: Participación de fosfatidilcolina en la respuesta de *P. putida* A ATCC 12633 frente al estrés ocasionado por TDTMA y Al<sup>+3</sup>**

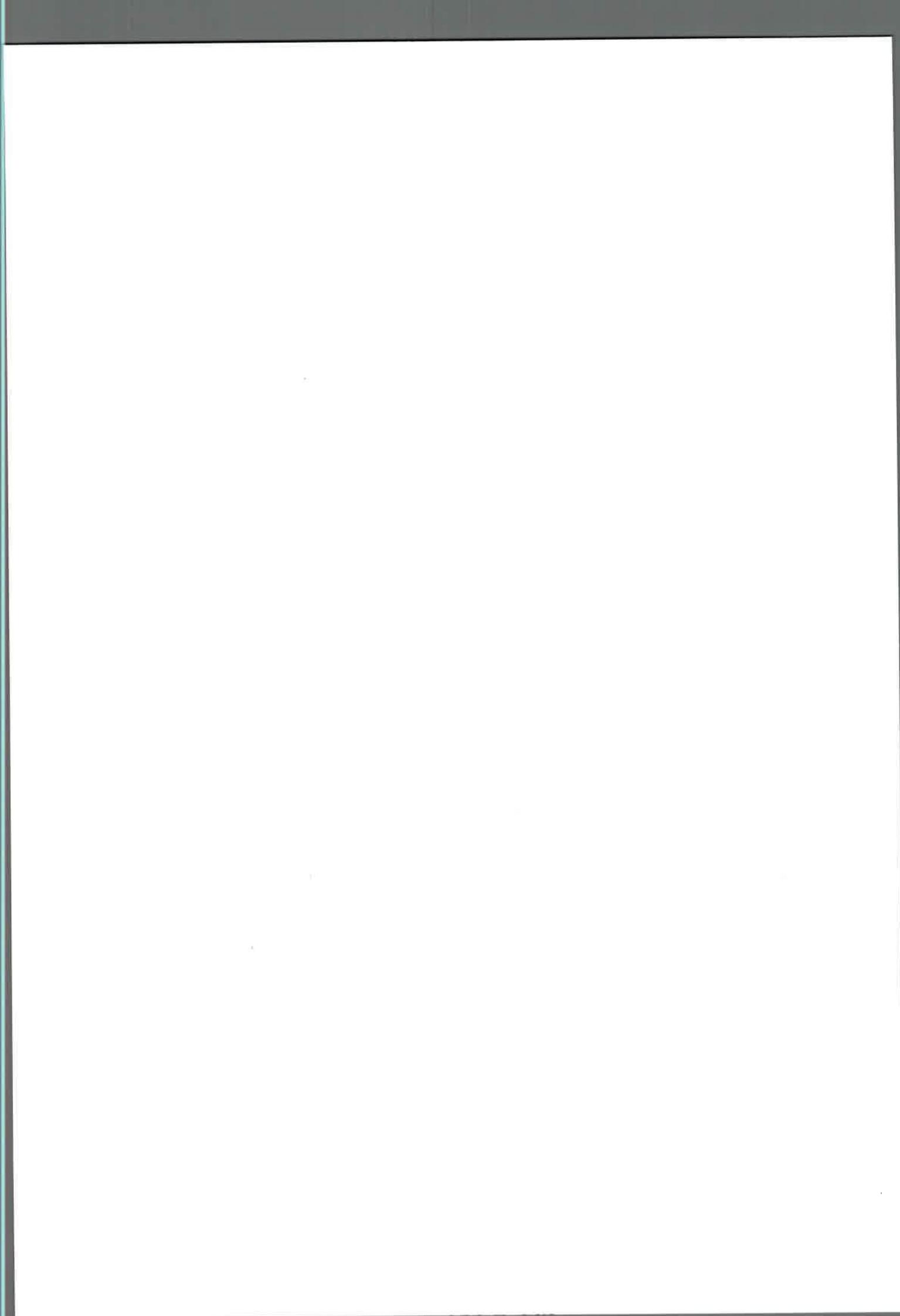
Tabla 4.2.1: Fosfolípidos totales de <i>P. putida</i> A ATCC 12633 crecida con diferentes fuentes de Carbono y/o Nitrógeno.....	68
Tabla 4.2.2: Composición fosfolipídica de <i>P. putida</i> A ATCC 12633 crecida en presencia de glucosa y NH <sub>4</sub> Cl o TDTMA.....	70
Figura 4.2.1: Microscopia electrónica de transmisión (TEM).....	71
Figura 4.2.2: Vesículas de <i>P. putida</i> A ATCC 12633 vistas por microscopia electrónica de transmisión (TEM).....	73
Tabla 4.2.3: Composición de PL de <i>P. putida</i> A ATCC 12633 crecida con TDTMA y expuesta o no a Al <sup>+3</sup> .....	76
Tabla 4.2.4: Composición de PL de <i>P. putida</i> A ATCC 12633 crecida con fuentes preferenciales de C y N, expuesta o no a Al <sup>+3</sup> .....	77
Tabla 4.2.5: Efecto del Al <sup>+3</sup> sobre la actividad fosfatidilcolina sintasa de <i>P. putida</i> A ATCC 12633....	79
Figura 4.2.3: Incorporación de colina en <i>P. putida</i> A ATCC 12633.....	80
Figura 4.2.4: Incorporación de colina en células de <i>P. putida</i> A ATCC12633 crecida en diferentes condiciones nutricionales.....	81
Figura 4.2.5: Marcaje de PL de <i>P. putida</i> A ATCC 12633.....	82
Tabla 4.2.6: Efecto del Al <sup>+3</sup> sobre la producción de PC en células crecidas con TDTMA en presencia o ausencia de colina exógena.....	83
Figura 4.2.6: Determinación de actividad PCS en <i>P. putida</i> KT2440.....	84
Figura 4.2.7: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de diferentes CDP-alcohol fosfatidil transferasas.....	86
Figura 4.2.8: Árbol filogenético de PCS, PSsAll y sus homólogos.....	87
Figura 4.2.9: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de diferentes CDP-alcohol fosfatidil transferasas.....	88
Figura 4.2.10: Expresión de PP0731 y PP4677.....	89
Figura 4.2.11: Secuencia nucleotídica completa de los genes <i>pp0731</i> y <i>pp4677</i> de <i>P. putida</i> KT2440.....	90
Figura 4.2.12: Patrón fosfolipídico de <i>P. putida</i> A ATCC 12633, <i>P. putida</i> PB01 y <i>P. putida</i> PB02....	91
Figura 4.2.13: Perfil fosfolipídico de <i>P. putida</i> PB01 complementada.....	94
Figura 4.2.14: Crecimiento de <i>P. putida</i> A ATCC 12633 y de <i>P. putida</i> PB01 en medio rico LB o en HPI-BSM en presencia de fuentes preferenciales de carbono y nitrógeno.....	95
Tabla 4.2.7: Recuento de células viables de <i>P. putida</i> salvaje y mutante.....	96
Figura 4.2.15: Detección de Al <sup>+3</sup> en membranas.....	97

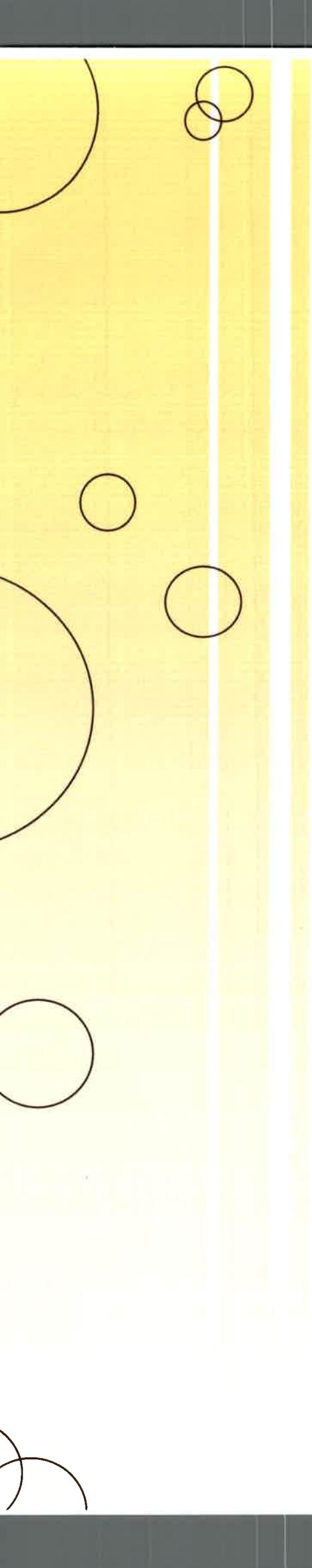


**% p/v**: porcentaje peso en volumen.  
**% v/v**: porcentaje volumen en volumen.  
**μM**: micromolar.  
**μCi**: microCurie.  
**μF**: micro Faraday.  
**μgr**: microgramo.  
**μm**: micrómetros.  
**<sup>14</sup>C**: carbono radiactivo.  
**aacC1**: gen codificante para la resistencia a Gm.  
**ADN**: ácido desoxirribonucleico.  
**AE**: actividad específica.  
**Al o Al<sup>3+</sup>**: aluminio.  
**Amp**: ampicilina.  
**Amp<sup>R</sup>**: ampicilina resistente.  
**aph(3)-IIa**: gen codificante para la resistencia a Km.  
**C**: carbono.  
**Cb**: carbenicilina.  
**Cb<sup>R</sup>**: carbenicilina resistente.  
**CL**: cardiolipina.  
**Cm**: cloranfenicol.  
**Cm<sup>R</sup>**: cloranfenicol resistente.  
**CLs**: cardiolipina sintasa.  
**c/s**: gen para cardiolipina sintasa.  
**cm**: centímetro.  
**DMPE**: dimetilfosfatidiletanolamina  
**DO**: densidad óptica.  
**Gbq**: Giga Beckerel.  
**Gm**: gentamicina.  
**Gm<sup>r</sup>**: gentamicina resistente.  
**h o hs**: hora u horas.  
**HPi-BSM**: Medio salino basal de alto contenido en fosfato.  
**HPLC**: cromatografía líquida de alta precisión.  
**IPTG**: isopropilo-β-D tiogalactosido.  
**Kb**: kilo base/s.

**Km**: kanamicina.  
**Km<sup>R</sup>**: kanamicina resistente.  
**kV**: kilo voltios.  
**l**: litro.  
**LacZ**: promotor inducible por IPTG.  
**LB**: medio rico Luria-Broth.  
**LPE**: lisofosfatidiletanolamina.  
**M**: molar.  
**mg**: miligramo.  
**min**: minuto.  
**ml**: mililitro.  
**mM**: milimolar.  
**mm**: milímetros.  
**mM**: milimolar.  
**mmol**: milimol.  
**MMPE**: monometilfosfatidiletanolamina.  
**N**: nitrógeno.  
**N**: normal.  
**NAO**: 10 N-nonil naranja de acridina.  
**nCi**: nanoCurie.  
**ngr**: nanogramo.  
**nm**: nanómetros.  
**nM**: nanomolar.  
**ORF/s u orf/s**: open reading frame (marco de lectura abierto).  
**PA**: ácido fosfatídico.  
**pb**: pares de bases.  
**PC**: fosfatidilcolina.  
**PCR**: Reacción en Cadena de la Polimerasa.  
**PCS o pcs**: fosfatidilcolina sintasa.  
**PE**: fosfatidiletanolamina.  
**PG**: fosfatidilglicerol.  
**PGsA**: fosfatidilglicerol sintasa.  
**pgsA**: gen para fosfatidilglicerol sintasa.  
**Pi**: fósforo inorgánico.  
**PL**: fosfolípidos.

**PLD**: Fosfolipasa D.  
**pmoles**: picomoles.  
**PMT**: fosfolípido N-metil transferasa.  
**poliP**: polifosfatos.  
**prot**: proteína/s.  
**PS**: fosfatidilserina.  
**PSsAI**: fosfatidilserina sintasa, clase I.  
**pssAI**: gen para fosfatidilserina sintasa, clase I.  
**PSsAII**: fosfatidilserina sintasa, clase II.  
**pssAII**: gen para fosfatidilserina sintasa, clase II.  
**QACs**: compuestos de amonio cuaternario (Quaternary Ammonium Compounds).  
**rpm**: revoluciones por minuto.  
**sacB**: gen que codifica para la levanosacarasa.  
**Sac<sup>s</sup>**: sacarosa sensible.  
**Sac<sup>R</sup>**: sacarosa resistente.  
**SAM**: S-adenosil metionina.  
**Sm**: estreptomycin.  
**Sm<sup>R</sup>**: estreptomycin resistente.  
**Sm<sup>s</sup>**: estreptomycin sensible.  
**TAE**: Buffer Tris-Acetato-EDTA.  
**TCA**: tricloroacético.  
**TDTMA**: tetradeciltrimetilamonio.  
**TEM**: Microscopía electrónica de transmisión.  
**TLC**: cromatografía en capa delgada.  
**Tm**: temperatura de fusión (melting).  
**TY**: medio rico tripton/extracto de levadura.  
**U**: unidades de enzima.  
**ufc**: unidades formadoras de colonias.  
**UV**: luz ultra violeta.  
**X-Gal**: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido.





1

[R E S U M E N]

[A B S T R A C T]

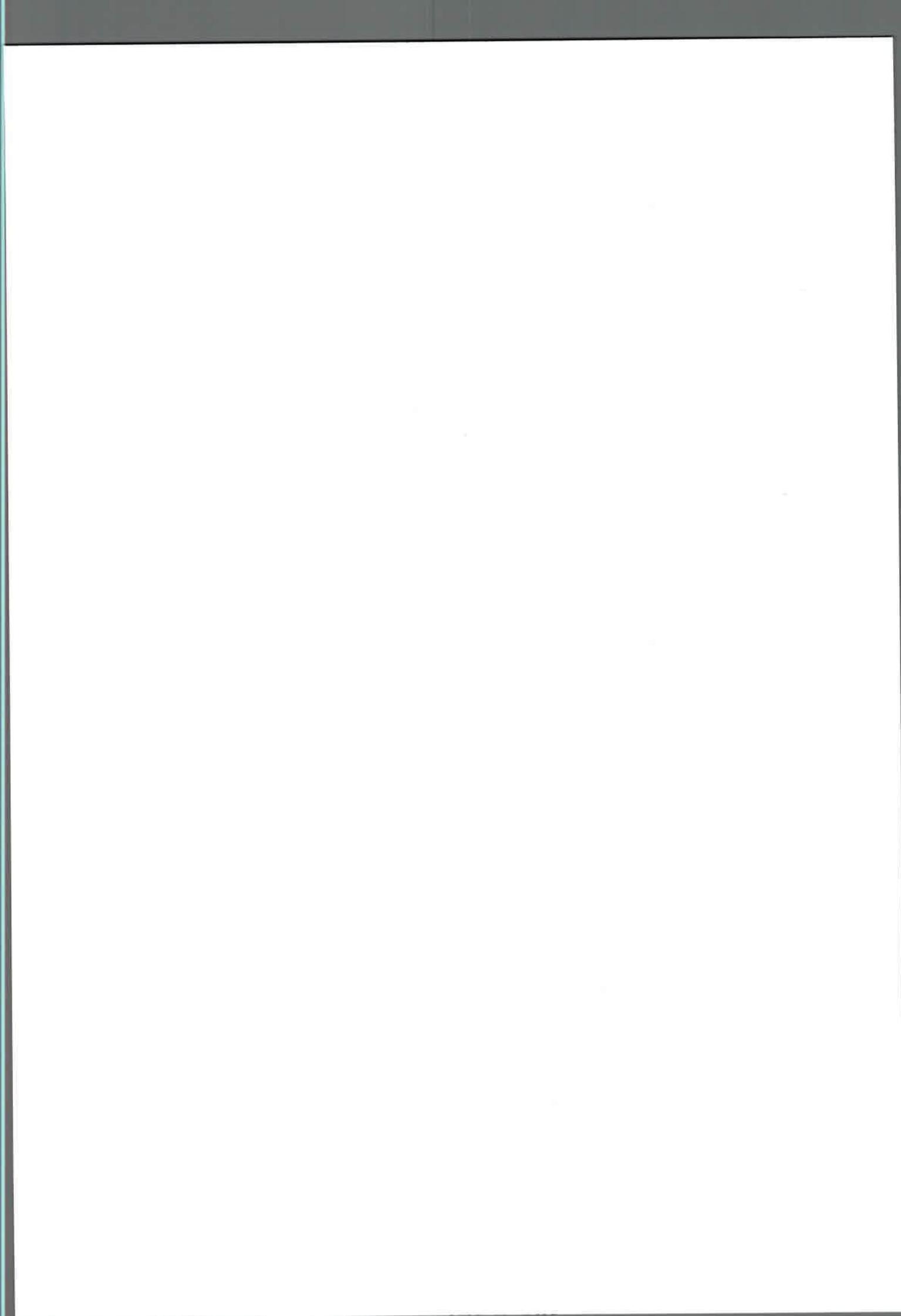


En este trabajo de tesis se analizaron los mecanismos adaptativos que le permiten a *Pseudomonas putida* A ATCC 12633 contrarrestar el daño ocasionado por agentes que perturban la integridad de su membrana. Particularmente se estudiaron los cambios a nivel de fosfolípidos y las actividades enzimáticas involucradas en la respuesta de *P. putida* A ATCC 12633 frente al estrés ocasionado por la presencia del detergente catiónico sintético Br-tetradeciltrimetilamonio (TDTMA) y la del metal tóxico aluminio ( $Al^{+3}$ ).

En células de *P. putida* A ATCC 12633 expuestas a TDTMA durante cortos periodos de tiempo, el contenido de cardiolipina disminuyó un 60 %, mientras que los niveles de fosfatidilglicerol y ácido fosfatídico incrementaron con valores superiores al 100 %, respecto a lo detectado en células no expuestas al detergente. En células crecidas con TDTMA como única fuente de carbono y nitrógeno, los cambios más significativos fueron también aumento de ácido fosfatídico y fosfatidilglicerol, pero el contenido de cardiolipina no se modificó. Estos resultados permitieron implicar a los fosfolípidos aniónicos en la respuesta bacteriana a TDTMA, utilizando principalmente ácido fosfatídico para neutralizar la alta densidad de carga positiva presente en la molécula del surfactante. La actividad fosfolipasa D (PLD) detectada en células de *P. putida* A ATCC 12633 crecidas con fuentes preferenciales de carbono y nitrógeno, sumada al incremento de esta actividad enzimática que se detectó cuando las células se enfrentaron a TDTMA, permitieron proponer que esta enzima es la responsable de catalizar la hidrólisis de cardiolipina generando, de manera rápida y eficaz, parte de los aumentos de fosfatidilglicerol y ácido fosfatídico necesarios para contrarrestar el daño inicial ocasionado por el detergente.

La obtención y caracterización de una cepa mutante de *P. putida* A ATCC 12633 afectada en el gen homólogo a *cardiolipina sintasa (cls)* (*P. putida* GP01) mostró una distribución y un contenido de cardiolipina semejante a lo detectado en su cepa parental, indicando que en *P. putida* A ATCC 12633 existe un gen adicional responsable de codificar una *cls* o bien que, en esta cepa, cardiolipina es sintetizada a través de otra enzima que guarda cierta homología con CLs, como es el caso de la fosfatidilserina sintasa clase I. Adicionalmente, la caracterización de la cepa mutante *P. putida* GP01 mostró ausencia de actividad PLD, lo que llevó a concluir que la mutación generada en el gen homólogo a *cls* afectó una actividad PLD, si bien no es posible descartar, hasta el momento, que dicho gen codifique para una actividad dual PLD / CLs.

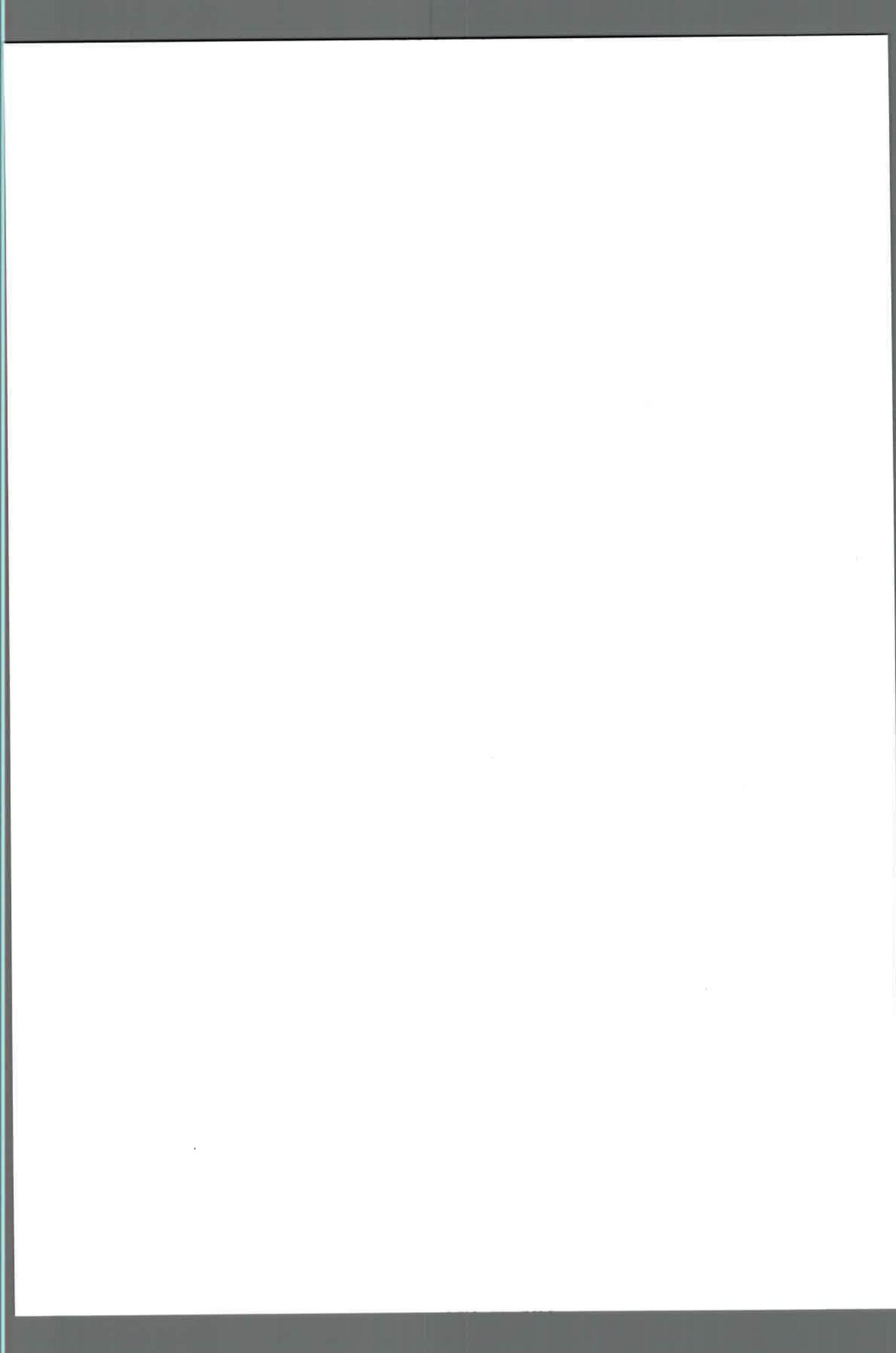
El análisis por microscopía electrónica de transmisión de la integridad de la membrana celular de *P. putida* A ATCC 12633 crecida con TDTMA como única fuente de carbono, nitrógeno y energía, mostró que la presencia del detergente no produce alteraciones en la integridad de la misma, si bien se detectan la presencia de estructuras intracelulares (pseudovacúolas) y la liberación de vesículas de membrana al medio. Por otro



lado, el análisis del contenido de fosfolípidos en esta condición nutricional mostró, en esta cepa, un notorio incremento en el contenido de fosfolípidos totales, lo cual refleja distintas estrategias llevadas a cabo por el microorganismo para sobrevivir en presencia del surfactante. Posiblemente el incremento de fosfolípidos totales lleve a una menor adsorción de TDTMA a la membrana celular y la liberación de vesículas a la excreción de compuestos no deseados de su metabolismo.

Durante el crecimiento de *P. putida* A ATCC 12633 con TDTMA como única fuente de carbono, nitrógeno y energía, la adición de  $Al^{3+}$  al medio, necesario para lograr la completa mineralización de TDTMA, provocó, entre otros cambios, un incremento en el contenido de fosfatidilcolina. Extractos libres de células provenientes de *P. putida* A ATCC 12633 crecida en presencia de fuentes preferenciales de carbono y nitrógeno o con TDTMA permitieron identificar que en esta cepa, la síntesis de fosfatidilcolina se lleva a cabo a través de la vía de la fosfatidilcolina sintasa (PCS) y que esta actividad enzimática es independiente de la adición de colina exógena y activada por la presencia de  $Al^{3+}$ . Se identificó, mediante la expresión y la obtención de una cepa mutante, que el gen de *P. putida* A ATCC 12633 homólogo al *orf pp0731* de *P. putida* KT2440 y al gen *pcs* de *Sinorhizobium meliloti*, es el responsable de codificar para fosfatidilcolina sintasa en esta cepa.

Por otro lado se demostró, mediante ensayos de viabilidad celular y fluorescencia, que la cepa de *P. putida* A ATCC 12633 mutante en *pcs* y carente de fosfatidilcolina en su membrana, es mucho más sensible que su cepa parental cuando se expone a  $Al^{3+}$  y contiene menor cantidad del catión unido a sus membranas, comportamiento revertido por ensayos de complementación con el gen *pcs*. En conjunto, estos resultados corroboran la hipótesis de que fosfatidilcolina participa en la respuesta bacteriana al  $Al^{3+}$  actuando como en reservorio temporario del ión. El mecanismo propuesto implica la formación, en la membrana de *P. putida* A ATCC 12633, de complejos  $Al^{3+}$ -fosfatidilcolina los cuales, por un lado, disminuyen el contenido de  $Al^{3+}$  libre que puede ser tóxico para el microorganismo y, por otro, mantienen disponible  $Al^{3+}$  para cuando *P. putida* A ATCC 12366 necesite utilizarlo para disminuir los niveles inhibitorios de trimetilamina intracelular que se producen como consecuencia del metabolismo de TDTMA y lograr así la completa mineralización del detergente.

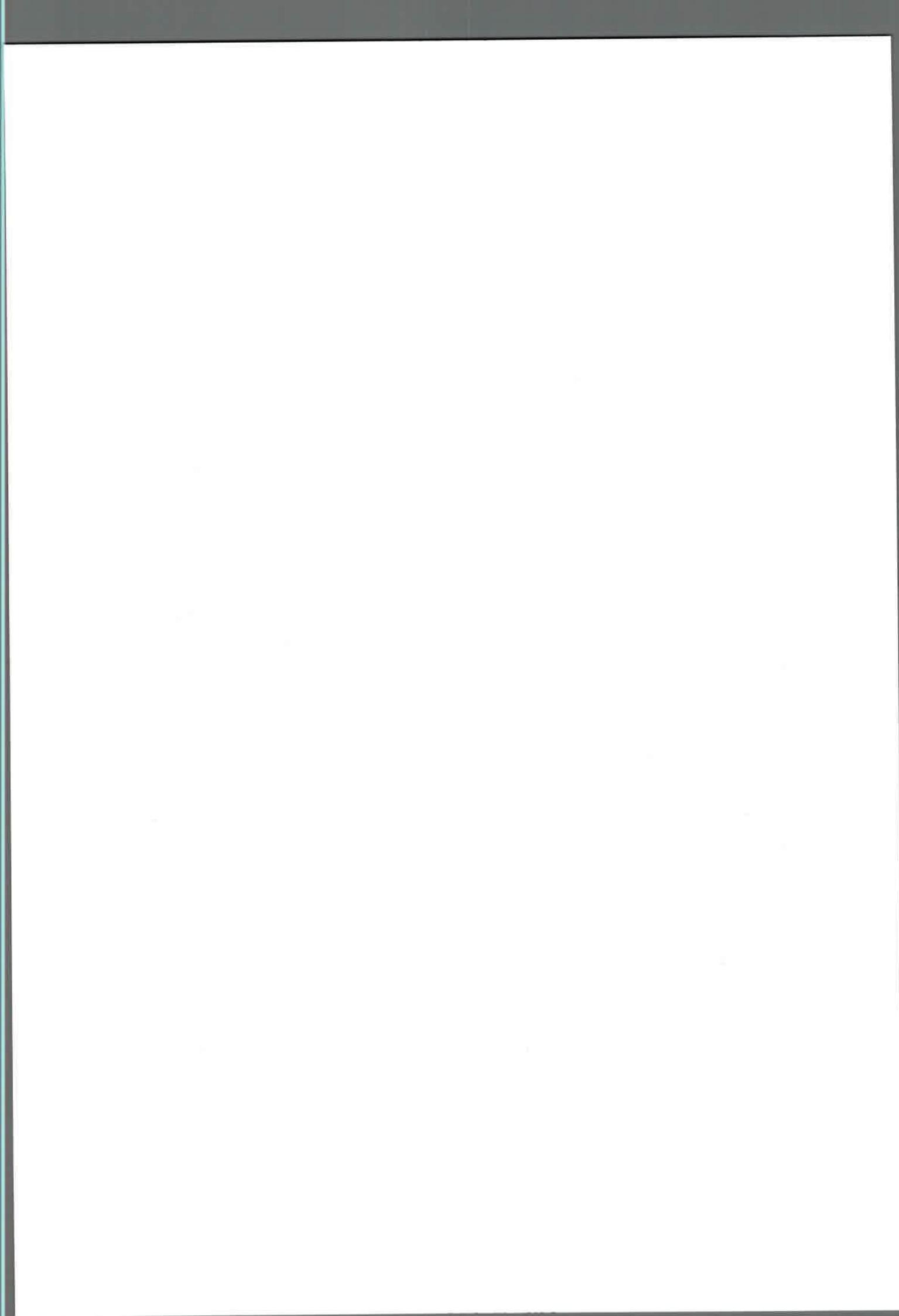


In this thesis work, the adaptive mechanisms that allow *Pseudomonas putida* A ATCC 12633 to counteract the damage caused by agents that alter the integrity of its membrane were analyzed. In particular, the changes at the level of phospholipids and enzymatic activities involved in the response of *P. putida* A ATCC 12633 exposed to stress produced by the presence of the quaternary ammonium compound tetradecyltrimethylammonium bromide (TTAB) and the toxic metal aluminum ( $Al^{3+}$ ) were studied.

In the short-term response of *P. putida* A ATCC 12633 to TTAB, the most significant change detected was an increase in phosphatidic acid and phosphatidylglycerol levels and, accompanying these changes, the amount of cardiolipin decreased. In cells grown with TTAB the most significant change detected was also an increase in phosphatidic acid and phosphatidylglycerol levels, but the level of cardiolipin did not change considerably. These modifications indicated that these phospholipids are involved in cellular responses to TTAB, utilizing phosphatidic acid principally to neutralize the high positive charge density given for the ammonium quaternary moiety from TTAB. Phospholipase D activity detected in *P. putida* A ATCC 12633 cells grown in a basal salt medium with glucose and  $NH_4Cl$  as the carbon and nitrogen source and the increase of this enzymatic activity detected in cells exposed to TTAB, allowed us to propose that the turnover of CL might be an efficient method to replenish phosphatidylglycerol and phosphatidic acid pools, through the action of a phospholipase D-hydrolyzing CL.

The construction and characterization of a *P. putida* A ATCC 12633 mutant strain affected in the cardiolipin synthase-homologous (*cls*-homologous) gene showed that in this mutant strain (*P. putida* GP01) the content and distribution of cardiolipin was similar to that observed in the parental strain, indicating that either in *P. putida* A ATCC 12633 there are an additional gene for encoding a CLs, or that cardiolipin could be synthesized by another enzyme that shows homology with CLs, such as phosphatidylserine synthase class I. Additionally, the absence of PLD activity in *P. putida* GP01 allows us to infer that the mutation in the *cls*-homologous gene affect a PLD activity. However, so far, we can not exclude that this gene encodes a dual activity PLD / CLs.

Analysis by transmission electron microscopy of cell membrane integrity of *P. putida* A ATCC 12633 grown with TDTMA as sole source of carbon, nitrogen and energy, showed that the presence of surfactant does not cause alterations in membrane integrity, but were detect the presence of intracellular structures (pseudovacuoles) and extracellular membrane vesicles release to the environment. On the other hand, analysis of total phospholipids content in this strain grown with TDTMA showed marked increase, reflecting different strategies undertaken by the microorganism to survive in the presence of surfactant.



Possibly, the increase in total phospholipids leads to a lower TTAB adsorption to the cell membrane and the release of vesicles allows the excretion of undesired compounds from the metabolism of surfactant.

In *P. putida* A ATCC 12633 cells growing with TTAB, the addition of  $Al^{3+}$  in the culture medium necessary to achieve complete mineralization of TTAB, produced an increase in phosphatidylcholine content. Cell-free extracts obtained from cells grown with glucose and  $NH_4Cl$  or with TTAB, allowed us to identify that in this organism the phosphatidylcholine synthesis occurs exclusively via the phosphatidylcholine synthase (PCS) pathway and that this enzymatic activity is independent of exogenous addition of choline and was activated by the presence of  $Al^{3+}$ . The gene from *P. putida* A ATCC 12633 homologous to *orf pp0731* from *P. putida* KT2440 and to *pcs* gene from *Sinorhizobium meliloti*, was cloned and expressed and the PCS activity was detected in cell-free extracts, indicating that this ORF encodes a functional PCS enzyme. The *P. putida* A ATCC 12633 *pcs* homologue was also disrupted to generate the corresponding mutant. The *pcs*-deficient mutant did not have detectable levels of phosphatidylcholine and is much more sensitive than the wild-type strain when was challenged with  $Al^{3+}$ . The mutation was successfully complemented and the phenotype was reverted. These results support that phosphatidylcholine is involved in the response of *P. putida* A ATCC 12633 to  $Al^{3+}$  and acts as a temporary reservoir for available ions through the formation of  $Al^{3+}$ : phosphatidylcholine complexes. These complexes reduce the free toxic  $Al^{3+}$  and permit that, in the presence of TTAB and  $Al^{3+}$ , *P. putida* A ATCC 12633 can obtain the ion necessary to achieve the total oxidation of the physiologically relevant quaternary ammonium compounds TTAB as sources of carbon, nitrogen and energy.





2

[ I N T R O D U C C I Ó N ]

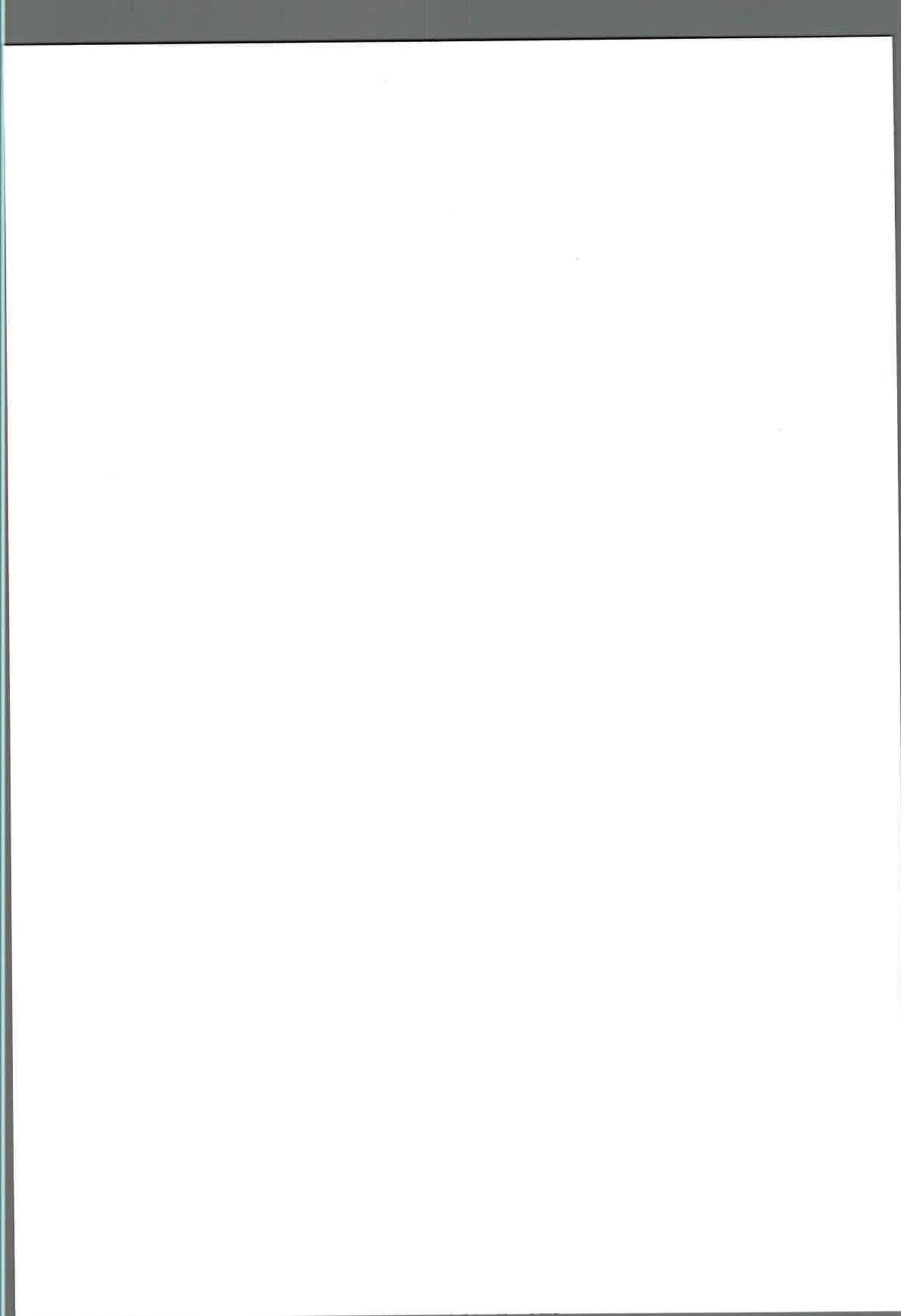


## 2.1. Características generales del Género *Pseudomonas*.

Las bacterias del género *Pseudomonas* pertenecen a la familia *Pseudomonadaceae*, clasificada dentro de la clase de las  $\gamma$ -proteobacterias (Palleroni, 1992). Son bacilos rectos o ligeramente curvos, Gram negativos, móviles por flagelación polar, no esporulados, quimiorganotrofos, aeróbicos estrictos, crecen a pH neutro y a temperaturas dentro del rango de la mesofilia (Brook y Madigan, 1993). Los miembros de este género incluyen tanto bacterias inocuas como patógenos oportunistas para plantas y animales, incluido el hombre, entre los que se destacan *Pseudomonas syringae* y *Pseudomonas aeruginosa* (Brook y Madigan, 1993).

Las pseudomonas son bacterias ubicuas, que presentan requerimientos nutricionales muy sencillos lo que les brinda gran versatilidad metabólica y les permite utilizar una amplia gama de compuestos naturales y artificiales como fuentes de carbono, nitrógeno y energía, y consecuentemente, colonizar un amplio rango de nichos ecológicos. Numerosas especies de *Pseudomonas* han sido aisladas desde rizósferas de plantas y ambientes acuáticos, como así también de suelos limpios o de suelos contaminados por productos xenobióticos y biogénicos (Timmis, 2002). Otra característica destacable de los miembros del género es su gran plasticidad genética (Clarke y Richmond, 1975, Clarke, 1982), lo que permite que ciertas cepas de *Pseudomonas* sean tolerantes o resistentes a agentes nocivos presentes en el ambiente, incluyendo antibióticos, desinfectantes, detergentes, metales tóxicos y solventes orgánicos (Appanna *et al.*, 1996, Ramos *et al.*, 1997, Pinkart y White, 1997, Hamel y Appanna, 2003, Martins dos Santos *et al.*, 2004, Boeris *et al.*, 2007).

Debido a su amplia versatilidad metabólica, a su inocuidad y a su capacidad de responder a una gran variedad de condiciones adversas del medio ambiente, ciertos miembros del género *Pseudomonas* son utilizados en diversos procesos biotecnológicos (Nelson *et al.*, 2002). Dentro de estas especies, *Pseudomonas putida* tiene potenciales aplicaciones en los procesos de biorremediación de sitios contaminados (Timmis *et al.*, 1994, Dejonghe *et al.*, 2001), en el mejoramiento de la producción de combustibles fósiles (Galan *et al.*, 2000), en la biocatálisis de productos químicos (Schmid *et al.*, 2001), en la producción de bioplásticos (Olivera *et al.*, 2001) y en el uso como agente de biocontrol y promotor del crecimiento de plantas (Walsh *et al.*, 2001). En adición a estas aplicaciones, diferentes autores han demostrado que, en *P. putida*, es posible la expresión de genes heterólogos, entre ellos, aquellos relacionados a la degradación de compuestos tóxicos (Ramos *et al.*, 1987, Cases y de Lorenzo, 1998, Gilbert *et al.*, 2003). Como resultado de estas características se considera a *P. putida* un microorganismo clave en la aplicación de procesos de remediación.

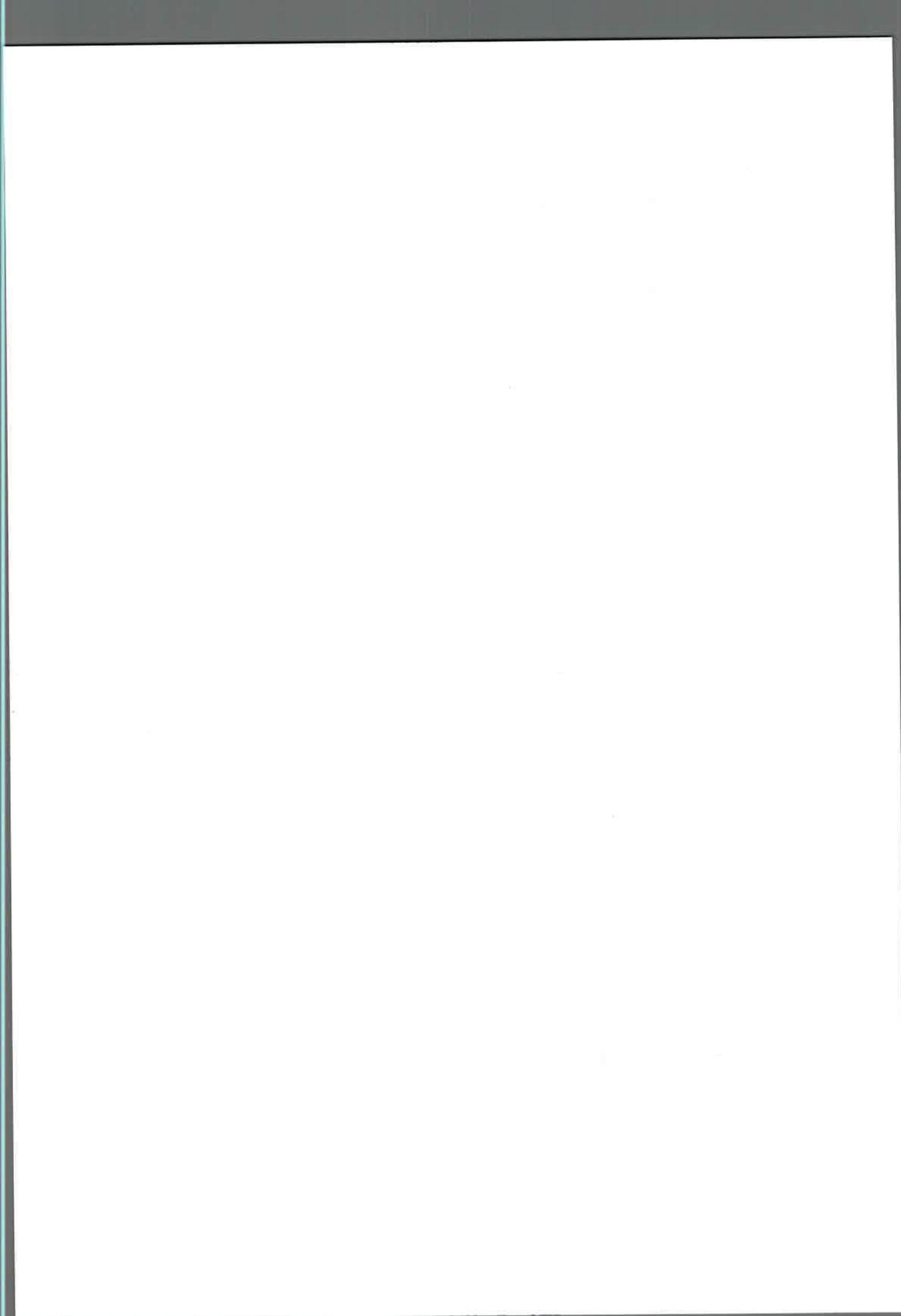


En los últimos años se ha secuenciado el genoma de diferentes cepas de *Pseudomonas*: *P. aeruginosa* PAO1 (Stover *et al.*, 2000), *P. putida* KT2440 (Nelson *et al.*, 2002), *P. entomophila* (Vodovar *et al.*, 2006), *P. fluorescens* Pf-5 (<http://pseudomonas-fluorescens.org/>). Estas bacterias presentan en promedio 5500 genes en sus genomas, la mitad de ellos sin función conocida.

El genoma de *P. putida* KT2440 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, AE015451) exhibe características semejantes a los genomas de bacterias terrestres, acuáticas y risosféricas. *P. putida* KT2440, carece de plásmidos y presenta un solo cromosoma circular de aproximadamente 6,18 Mb, con un contenido de G+C del 61 %. Su genoma muestra una similitud del 85 % con la secuencia genómica descrita para el patógeno oportunista *P. aeruginosa* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, NC\_002516). Sin embargo, los determinantes de la virulencia de este microorganismo patógeno, tales como exotoxina A, elastasas, exolipasas, fosfolipasa C, proteasas alcalinas y sistemas de síntesis de ramnolípidos, están ausentes en *P. putida* KT2440 (Nelson *et al.*, 2002). El análisis del genoma de *P. putida* KT2440 ha revelado además la existencia de, al menos, 18 genes que codifican para dioxigenasas, 15 para monooxigenasas, 80 para oxidorreductasas, 51 para hipotéticas hidrolasas y más de 62 posibles transferasas. Posiblemente, la existencia de algunos de estos genes se relacione con la adquisición de elementos genéticos móviles, ya que se ha observado que *P. putida* KT2440 presenta 82 genes que codifican para transposasas y algunos genes involucrados en el metabolismo y transporte de diversas sustancias están flanqueados por secuencias de inserción. También posee genes cuyos productos le confieren resistencia y le permiten crecer bajo condiciones ambientales adversas, tales como los sistemas de eflujo del tipo ABC (ATP-binding cassette), sistemas de eflujo pertenecientes a la familia de los RND (resistant-nodulation-cell division) y sistemas de exclusión de ácido fusárico (Nelson *et al.*, 2002, Vuilleumier y Pagni, 2002). En conjunto, la alta diversidad de proteínas codificadas, la presencia de secuencias de inserción, de secuencias repetidas y de elementos genéticos móviles son indicativos de su gran versatilidad metabólica y de su capacidad de responder a variadas situaciones de estrés adversas del medio.

## 2.2. Contaminación ambiental.

En las últimas décadas el accionar inadecuado del hombre ha llevado a graves y variados problemas ecológicos, entre los que se destaca la contaminación ambiental. Se denomina contaminación a la alteración nociva del estado natural de un medio como consecuencia de la introducción de un agente (físico, químico o biológico) totalmente ajeno



a ese medio, causando inestabilidad, desorden, daño o malestar en un ecosistema, en el medio físico o en un ser vivo. Las fuentes de contaminación se dividen en dos grandes grupos: naturales y antropogénicas. Las primeras, como su nombre lo indica, están dadas por diversas manifestaciones de la naturaleza, tales como: emisión de gases o cenizas durante las erupciones volcánicas, incendios forestales, erosión de suelos, lavado de sustancias tóxicas a partir de las crecientes de los ríos, inundaciones o terremotos. Las fuentes de contaminación antropogénica se originan a partir de los diferentes procesos productivos del hombre, destacándose las actividades industriales (frigoríficos, mataderos y curtiembres, actividad minera y petrolera), comerciales (envolturas y empaques), agrícolas (agroquímicos), domiciliarias (envases, restos de jardinería) y fuentes móviles (gases de la combustión de vehículos) (Atlas y Bartha, 2001).

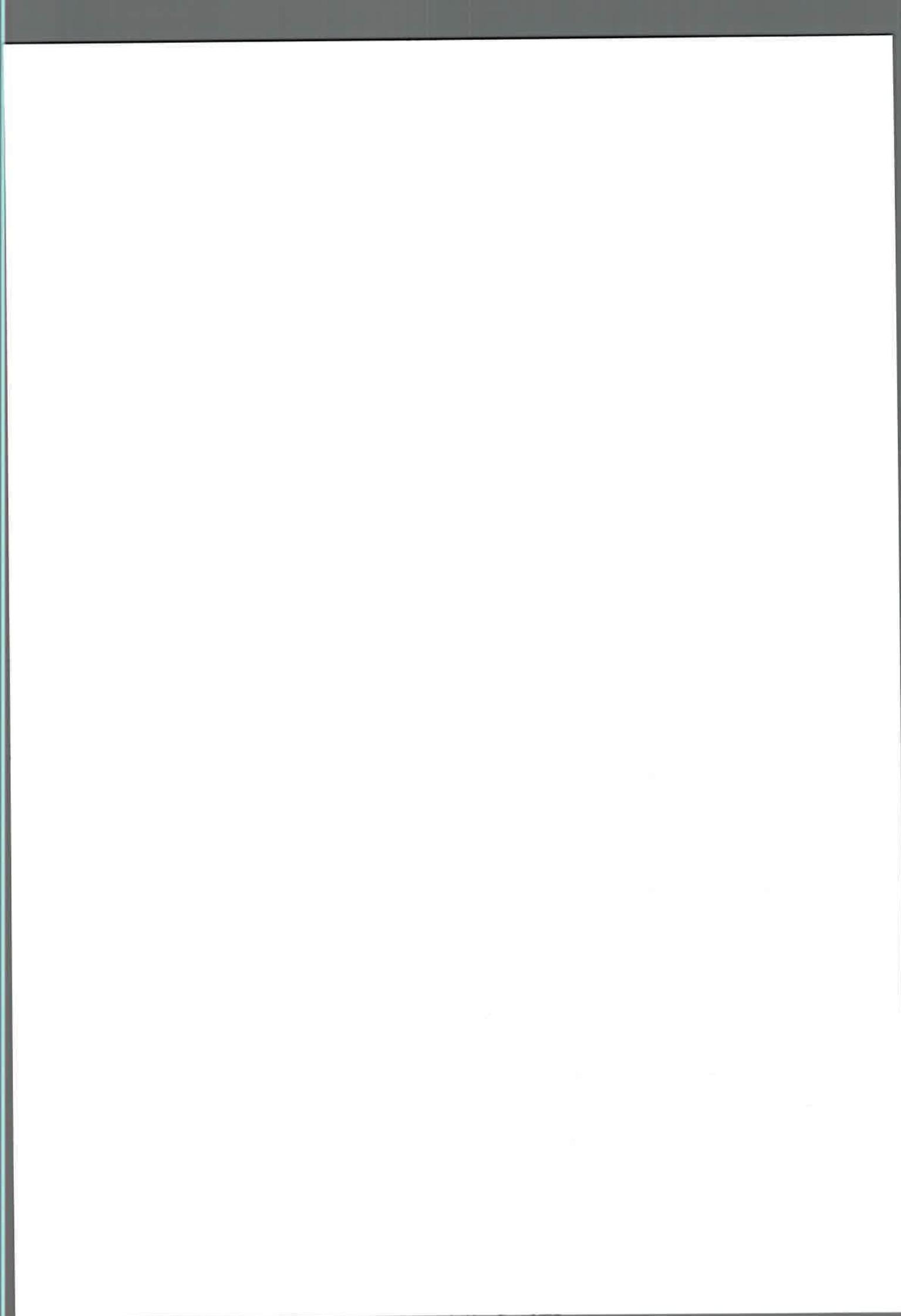
### 2.2.1. Contaminantes químicos.

Los contaminantes químicos han sido clasificados en dos grandes grupos: **xenobióticos** y **biogénicos** (Atlas y Bartha, 2001). Los compuestos **xenobióticos** presentan una estructura química que difiere considerablemente de la de los compuestos orgánicos naturales, en particular por la presencia de sustituyentes en sus moléculas (grupos halógenos y nitrogenados). Muchos de estos compuestos, tales como refrigerantes, disolventes, bifenoles policlorados (PCB), plásticos, detergentes, explosivos, plaguicidas, entre otros, o productos derivados del metabolismo de los mismos, son resistentes (recalcitrantes) a la biodegradación, lo que deriva en problemas ecológicos graves.

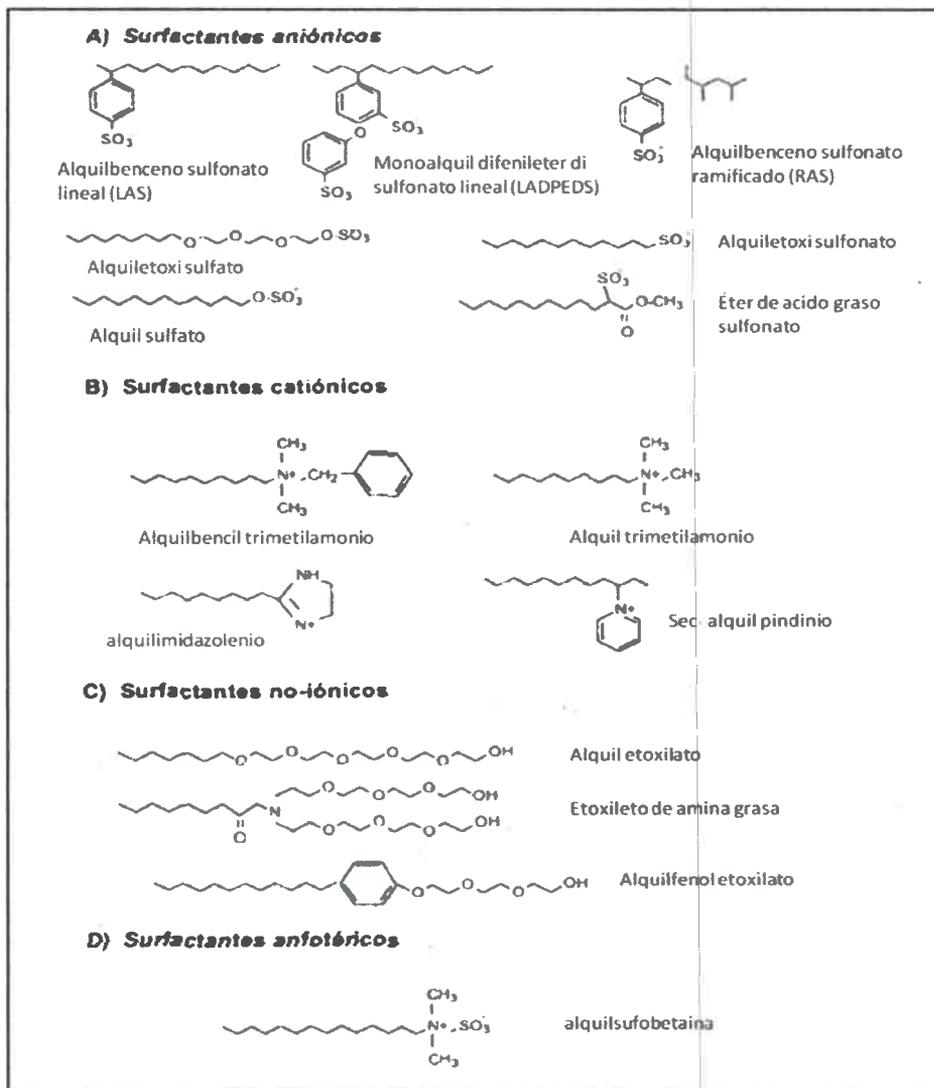
A diferencia de los xenobióticos, los contaminantes **biogénicos**, también llamados biodegradables, presentan una estructura química semejante a la de los compuestos naturales, lo que facilita su remoción por medio de organismos capaces de utilizarlos como fuentes de carbono, nitrógeno y energía, mineralizándolos completamente hasta  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  y compuestos inorgánicos (Brook y Madigan, 1993). Los compuestos biogénicos, en la mayoría de los casos, son degradados rápidamente. Sin embargo, algunos de estos compuestos pueden resultar recalcitrantes, debido a que la velocidad de entrada a los ecosistemas es mayor que la velocidad de remoción de los mismos (Games *et al.*, 1982).

#### 2.2.1.1. Contaminación y efectos tóxicos de los compuestos de amonio cuaternario sintéticos.

Entre los contaminantes ambientales biogénicos se destacan los detergentes sintéticos. En la **Figura 2.1** se muestra, de manera simplificada, la clasificación general de los mismos. Los compuestos de amonio cuaternario sintéticos, QACs (del inglés, Quaternary



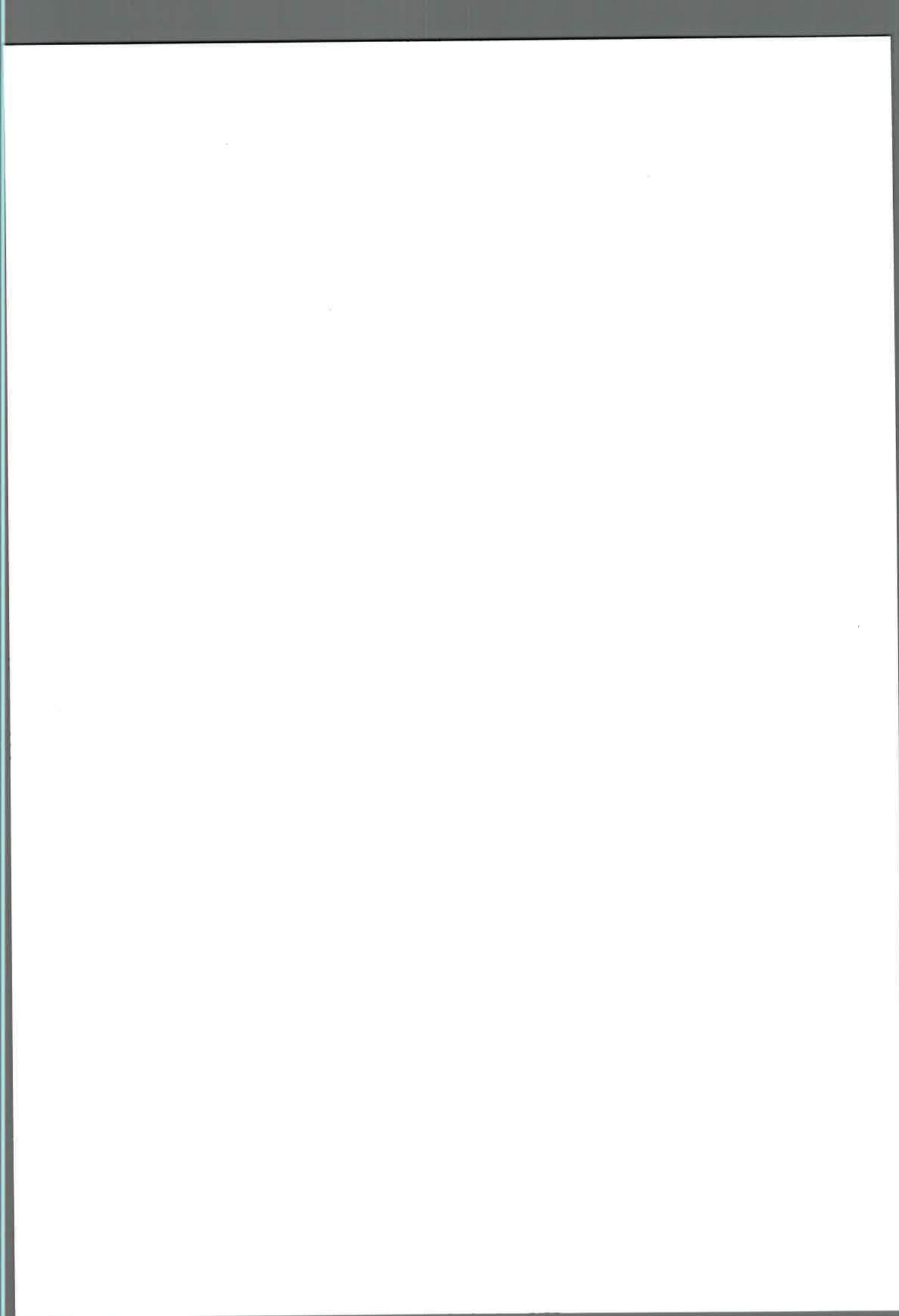
Ammonium Compounds) son detergentes catiónicos, en los cuales las cuatro valencias del átomo de nitrógeno están ocupadas por un grupo alquilo de complejidad variable.



**Figura 2.1:** Clasificación general de los detergentes sintéticos (Campos-García, 2001).

Como características destacables de los QACs pueden citarse: su solubilidad en agua y alcohol, sus propiedades tensioactivas y su amplio uso en la industria, formando parte de agentes antiestáticos, emulsificantes, enjuagues para el cabello, cosméticos, aditivos para colorantes y detergentes sintéticos. Por sus propiedades fungicidas y bactericidas se utilizan en productos de limpieza domésticos y para desinfección en plantas procesadoras de carne y alimentos, lecherías e industrias relacionadas (McDonell y Russell, 1999, Gilbert y Moore, 2005, Zhao y Sum, 2007).

El consumo anual a nivel mundial de QACs en el año 2004 ha sido reportado en 500.000 toneladas y se espera que en años posteriores alcance o exceda las 700.000



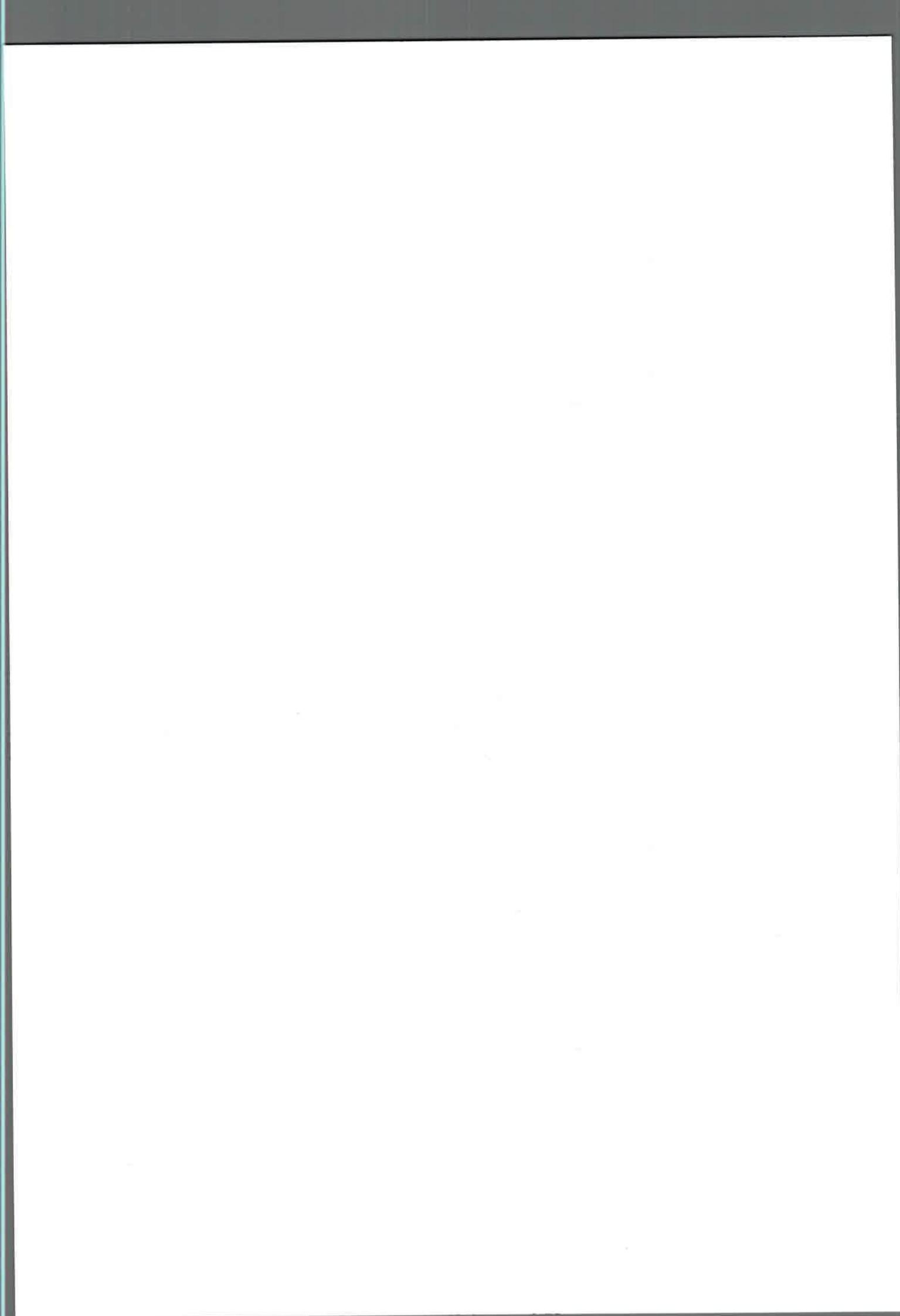
toneladas (CESIO, 2004). Alrededor del 75 % de los QACs que se utilizan anualmente se liberan en las plantas de tratamiento de efluentes, mientras que el resto se vierte directamente al ambiente en niveles que ponen en peligro el tratamiento biológico y los sistemas ambientales. Como resultado de ello, son contaminantes ubicuos que se han encontrado en aguas residuales, en efluentes industriales, en efluentes de las lavanderías de hospitales, efluentes tratados, aguas superficiales y sedimentos acuáticos (Kummerer *et al.*, 1997, Ferrer y Furlong, 2002, Ding y Liao, 2001, Merino *et al.*, 2003, Clara *et al.*, 2007, Kreuzinger *et al.*, 2007, Martínez-Carballo *et al.*, 2007). Los datos muestran que un efluente de origen doméstico contiene alrededor de 1 mg/l de QACs, mientras que los efluentes industriales contienen tenores superiores a 20 mg/l (Games *et al.*, 1982).

En general, la presencia de QACs en el ambiente causa problemas ecológicos importantes, que incluyen: I) formación de espuma que inhibe los procesos de depuración natural (o artificial), concentra las impurezas y puede diseminar virus o bacterias; II) aumento del contenido de fosfatos en la cuenca hídrica, procedente de los polifosfatos que se utilizan en combinación con los detergentes sintéticos. Ello favorece la eutroficación de los lagos (transparencia reducida), crecimiento de biomasa, déficit de oxígeno en capas profundas, aparición de algas, cambio de coloración verde a marrón y el desarrollo de plancton en los ríos.

Como se mencionó anteriormente, los QACs son utilizados como agentes fungicidas y bactericidas (McDonell y Russell, 1999, Gilbert y Moore, 2005, Zhao y Sum, 2007). Se ha observado que el espectro de actividad de estos compuestos es elevado frente a bacterias y hongos, pero es escaso frente a virus y esporas (McDonell y Russell, 1999). Estos surfactantes tienen la habilidad de dañar membranas celulares y desnaturalizar proteínas. Actuando como agentes bactericidas, McDonell y Russell (1999) proponen el siguiente mecanismo de acción de los QACs sobre la célula bacteriana:

- 1) Adsorción y penetración del agente a la pared celular.
- 2) Interacción con proteínas o lípidos de la membrana plasmática, seguido de la desorganización de la misma.
- 3) Pérdida de material intracelular.
- 4) Degradación de proteínas y ácidos nucleicos.
- 5) Lisis de la pared celular causada por enzimas autolíticas.
- 6) Muerte celular.

Así, la acción bactericida de los QACs está centrada en la disrupción física y en la solubilización de la pared y membrana celular bacteriana. Sin embargo, diferentes autores han descrito que, especialmente las bacterias Gram negativas, presentan resistencia tanto



intrínseca como adquirida a estos compuestos (Russell *et al.*, 1986, Jones *et al.*, 1989, Langsrud y Sundheim, 1997).

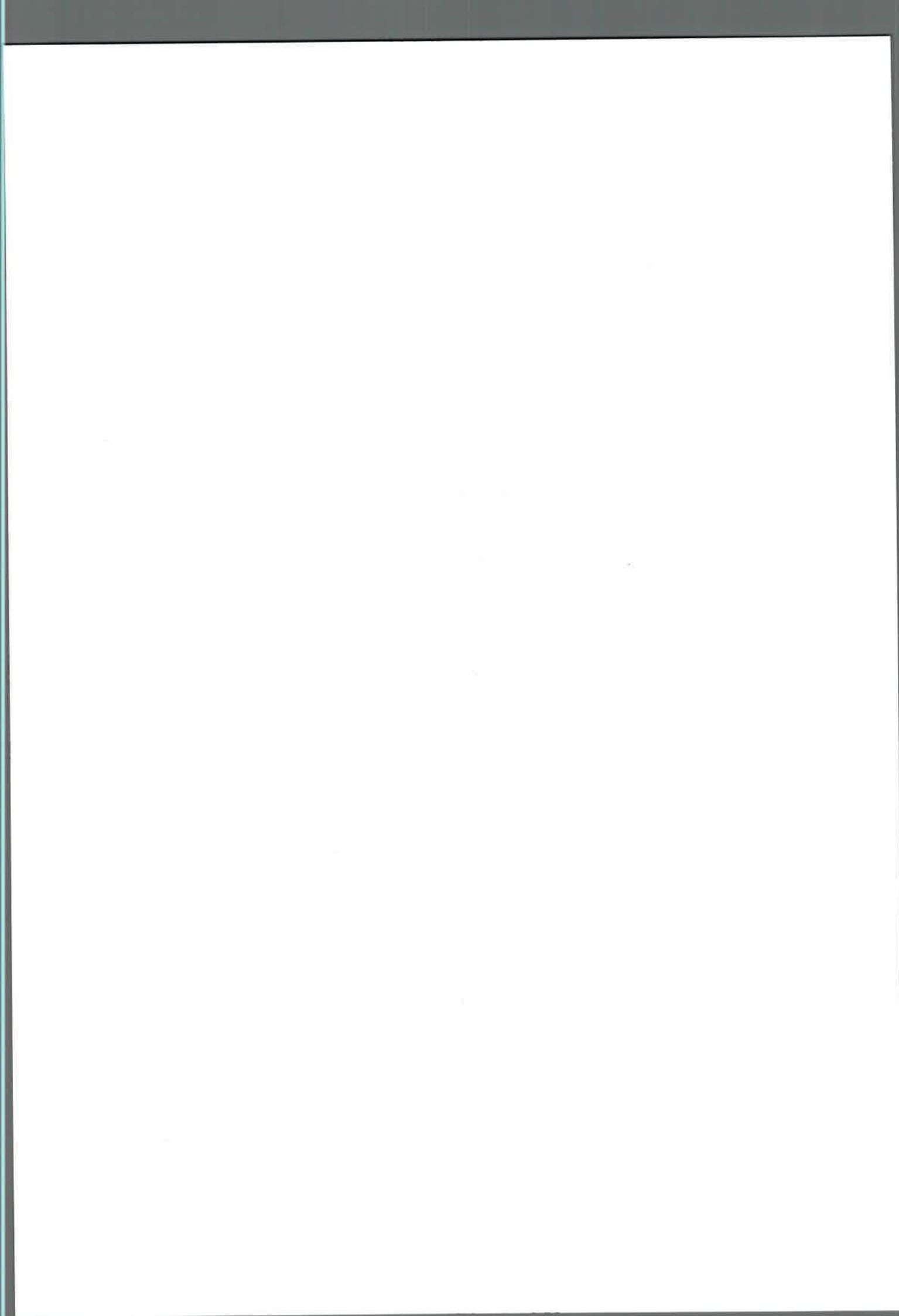
## 2.2.2. Metales tóxicos.

Otro tipo de contaminantes ambientales lo constituye los metales tóxicos. Los metales son especies químicas no degradables, los cuales se incorporan rápidamente a los sedimentos y representan una importante forma de contaminación antropogénica. Los principales metales tóxicos que se encuentran dispersos en cualquier medio son mercurio, cadmio, plomo, cobre, cinc, estaño, cromo, vanadio, bismuto y aluminio (Vullo, 2003).

### 2.2.2.1. Aluminio como contaminante y agente tóxico de células bacterianas.

El aluminio es un ión que se encuentra en forma insoluble en cantidades abundantes en los ecosistemas, pero la actividad antropogénica ha aumentado su biodisponibilidad (Garcidueñas Piña y Cervantes, 1996 y citas incluidas). La biodisponibilidad de una sustancia es una medida de su potencial para interactuar con los sistemas biológicos y causar una respuesta (Exley y Birchall, 1992). La biodisponibilidad del aluminio en suelos y sus concentraciones en agua son relativamente bajas debido a su adsorción a las superficies minerales, a su asociación con materia orgánica y a su insolubilidad por los complejos que forma a pH cercanos a la neutralidad. En la actualidad, el aluminio, es reconocido como un serio contaminante relacionado con la acidificación de suelos y aguas, es un elemento tóxico para plantas, animales y el hombre (Exley y Birchall, 1992, Garcidueñas Piña y Cervantes, 1996). La solubilidad y las especies iónicas de aluminio presentes en el medio son fuertemente dependientes del pH del mismo. Así, las especies iónicas que se encuentran entre pH 3 y 7 son:  $Al^{+3}$ ,  $Al(OH)^{+2}$ ,  $Al(OH)^{+2}$  y  $Al(OH)^{-4}$  (Macdonald y Martin, 1988, Garcidueñas Piña y Cervantes, 1996).

Respecto a los efectos tóxicos del  $Al^{+3}$  sobre los seres vivos, en general se ha planteado que su acción directa ocurre a través del bloqueo de las actividades biológicas, uniéndose a las enzimas involucradas en procesos metabólicos o bien uniéndose a los sustratos de estas enzimas (Macdonald y Martin, 1988, Lemire *et al.*, 2010). Guida y col. (1991) demostraron que el metabolismo de hierro en *E. coli* se ve severamente afectado por la presencia de aluminio. Debido que tanto el hierro como el aluminio pueden presentarse como cationes trivalentes, el aluminio puede rápidamente sustituir al Fe, ingresando a la célula bacteriana a través de los transportadores específicos para Fe (Davis *et al.*, 1971). La sustitución de Fe por Al, lleva a la pérdida de funciones enzimáticas dependientes de ese catión (Zatta *et al.*, 2003, Middaugh *et al.*, 2005) y a la generación de un ambiente



extremadamente oxidativo (Exley, 2004, Beriault *et al.*, 2007). Por otro lado, Guzzo y col. (1991) observaron que en *E. coli*, el aluminio es capaz de inducir la expresión del gen que codifica para la flagelina (*fliC*) perturbando, de esta manera, la motilidad celular.

En cepas de *Rhizobium*, se ha descrito que el aluminio puede unirse al ADN afectando los eventos de replicación (Johnson y Wood, 1990) y que es capaz de inhibir la expresión de los genes involucrados en los procesos de nodulación (Brady *et al.*, 1993).

En adición a los efectos ocasionados en células bacterianas, diversos efectos han sido reportados en células animales y vegetales. Tal es el caso de la unión a las cabezas polares de los fosfolípidos de membranas, con la consiguiente alteración de las interacciones lípidos-proteínas (Suhayda y Haug, 1986). Alternativamente, el aluminio puede disminuir las cargas negativas de los fosfolípidos o de los residuos aminoacídicos de las proteínas de membranas afectando el potencial de membrana (Kinraide *et al.*, 1992).

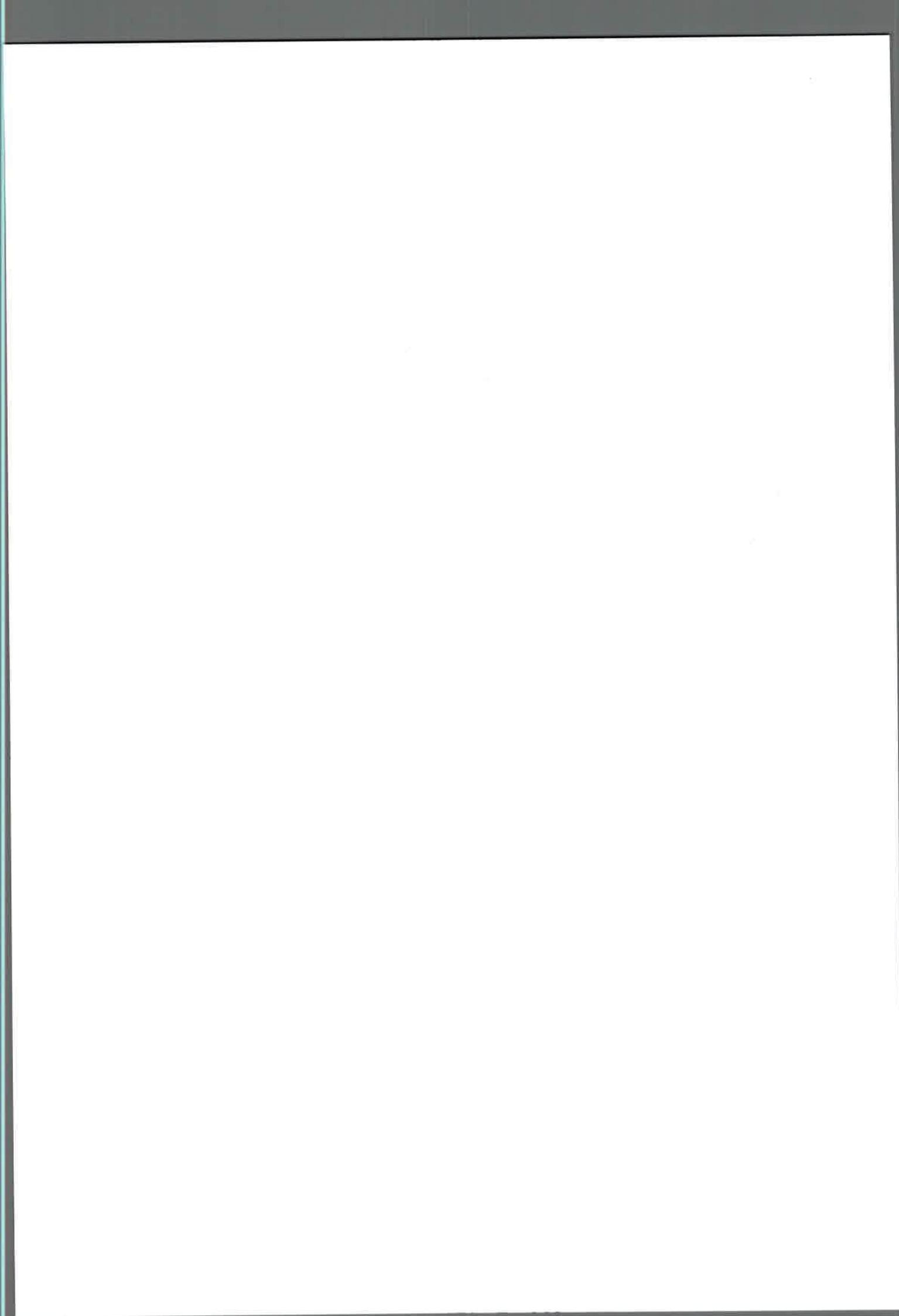
### 2.3. Remediación ambiental.

El carácter depurador del medio ambiente (biodegradación natural) es limitado y ha llevado al desarrollo de tecnologías orientadas a la limpieza del ecosistema y a la prevención de su deterioro. La aplicación de esta tecnología incluye la utilización de métodos químicos, físicos o biológicos. En todos los casos el fin que se persigue es el de alterar la composición del contaminante reduciendo su toxicidad, su movilidad o su concentración en el ambiente (Atlas y Bartha, 2001).

Dependiendo de las características del contaminante, entre los métodos químicos o físicos podemos citar, entre otros a:

- Landfilling o relleno de seguridad: es una instalación donde los residuos o contaminantes son dispuestos y almacenados bajo condiciones de control, evitando su contacto y migración al ambiente (Vasudevan *et al.*, 2003).
- Adsorción del contaminante a diferentes matrices, como por ejemplo carbón activado, resinas de amberlita o adsorbentes naturales (corteza de árboles, quitina y arcilla) (Gandhi *et al.*, 2010, El-Said *et al.*, 2010).
- Incineración (Atlas y Bartha, 2001).
- Extracciones por solventes (Atlas y Bartha, 2001).

Los métodos biológicos incluyen el uso de organismos con el propósito de degradar, transformar o remover compuestos tóxicos. En general, los métodos biológicos resultan más económicos que los físico-químicos, son más efectivos y ambientalmente aceptables. Para que el proceso sea eficaz, los productos finales deben ser inocuos y no deben tener efectos



secundarios adversos (Atlas y Bartha, 2001). La estrategia biológica a utilizar depende de las actividades catabólicas de los organismos y, por consiguiente, de su capacidad para utilizar los contaminantes como fuente de alimento y energía (Atlas y Bartha, 2001). Para el caso particular de los metales tóxicos, los cuales no pueden ser catabolizados, la utilización de métodos biológicos depende de la capacidad de ciertos organismos de poder acumular o transformar (cambio del estado de oxidación) dichos metales (Vullo, 2003).

De acuerdo al tipo de organismo utilizado, los métodos biológicos se clasifican en:

**Fitorremediación:** proceso en el que se utilizan plantas para remover, transferir, estabilizar, acumular y/o destruir contaminantes (orgánicos e inorgánicos) en suelos, lodos y sedimentos (Suresh y Ravishankar, 2004).

**Rizorremediación:** es llevada a cabo por los microorganismos que rodean las raíces de las plantas. Las sustancias excretadas naturalmente por las raíces suministran nutrientes para los microorganismos, facilitando la remoción de los contaminantes (Leigh, 2006).

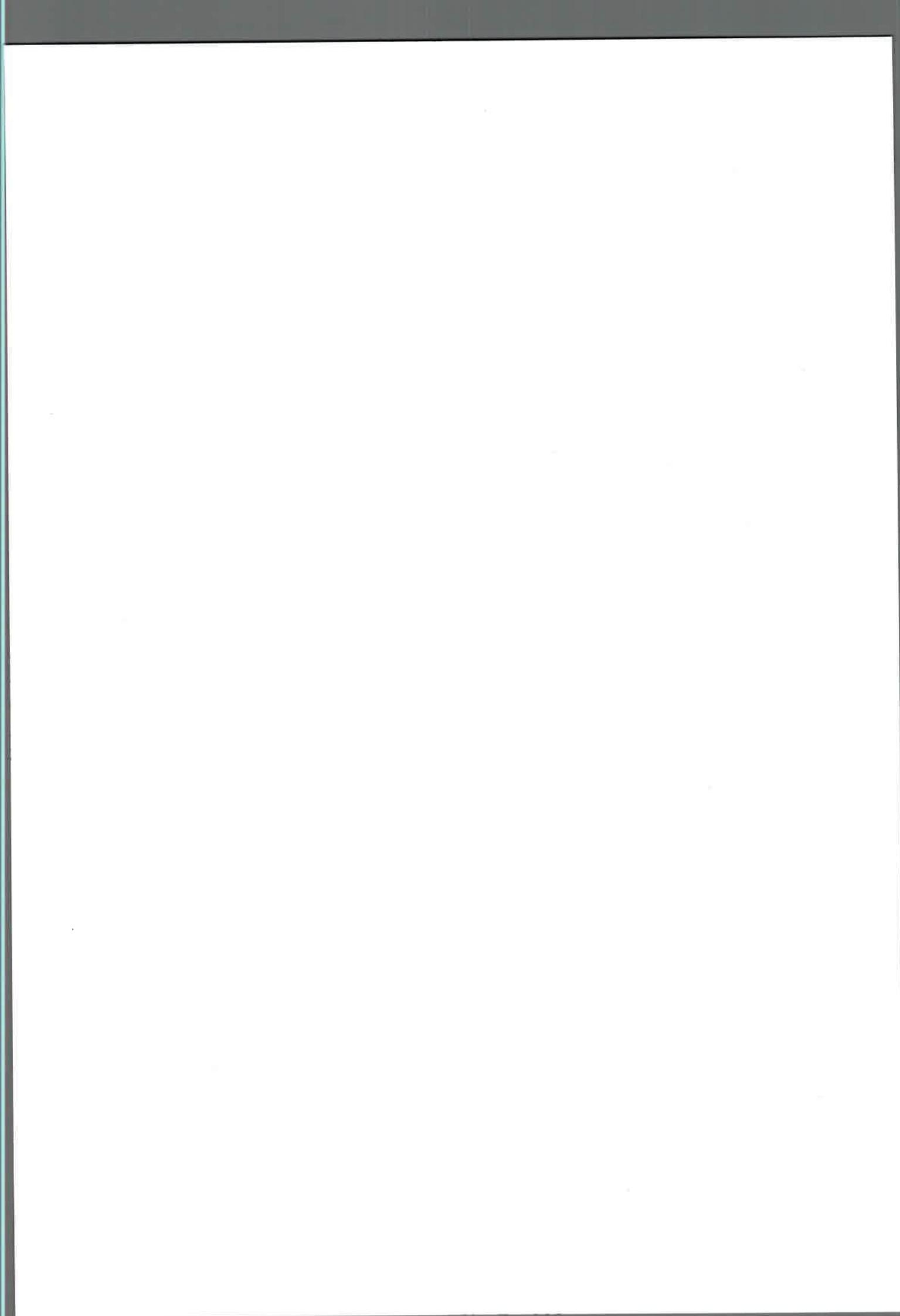
**Vermirremediación:** es una metodología relativamente nueva donde se utilizan gusanos para descontaminar un sitio contaminado (Bianchi *et al.*, 2010).

**Micorremediación:** es una técnica de remediación en la cual se emplean hongos para descontaminar suelos. Durante los procesos de descomposición, los hongos son capaces de degradar celulosa y consecuentemente, a aquellos contaminantes ambientales cuya estructura química es semejante a la estructura de la pared celular de células vegetales (Harbhajan, 2006).

**Biorremediación:** se refiere al uso de microorganismos en los procesos de descontaminación (Atlas y Bartha, 2001), aunque algunos autores generalizan el término de biorremediación para todos aquellos procesos, incluyendo los anteriormente citados, que utilicen organismos vivos para descontaminar.

### 2.3.1. Biorremediación de QACs.

Si bien los QACs liberados al ambiente pueden ser removidos por biodegradación y adsorción en plantas de tratamientos de agua, su biodegradabilidad es limitada dada la actividad antimicrobiana que poseen, lo que da origen a mineralizaciones parciales que resultan en la formación de compuestos recalcitrantes (Games *et al.*, 1982, van Ginkel, 1991, Nishiyama *et al.*, 1995). La máxima degradación de los QACs presentes en el medio se logra a diferentes tiempos, el cual varía desde una hora a un mes dependiendo de la concentración QACs, su estructura, y la presencia de microorganismos resistentes y con capacidad de degradar los mismos (Boethling *et al.*, 1994). Así, *Pseudomonas sp.* BERT, una cepa aislada de lodos activados, es capaz de utilizar alquil aminas de 3 a 18 átomos de



carbono como fuente de carbono, nitrógeno y energía (van Ginkel *et al.*, 2008). Sin embargo, ha sido descrito, en general, que la degradación de QACs se logra principalmente por utilización de consorcios de microorganismos (van Ginkel, 1991, van Ginkel *et al.*, 1995, Kroon y van Ginkel, 2001). El deciltrimetilamonio puede ser degradado completamente por un cultivo mixto de *Xanthomonas sp.* y *Pseudomonas sp.* (Dean-Raymond y Alexander, 1977). La mineralización completa del cloruro de dodecildimetilamonio se obtiene con un consorcio bacteriano formado por *Burkholderia cepacia* y *Stenotrophomonas maltophilia* aisladas de lodos activados (Kroon y van Ginkel, 2001). Una cepa de *Pseudomonas sp.* B1, aislada de lodos activados, crece bien con cloruro de hexadeciltrimetilamonio, usando este compuesto como fuente de carbono y energía. Sin embargo, *Pseudomonas sp.* B1 no puede utilizar la trimetilamina producto del metabolismo del hexadeciltrimetilamonio (van Ginkel *et al.*, 1992). Lo mismo ocurre con dodecildimetilamonio, cuya mineralización es obtenida por la utilización de un cultivo de dos microorganismos, *Burkholderia cepacia* y *Stenotrophomonas maltophilia* (Kroon y van Ginkel, 2001).

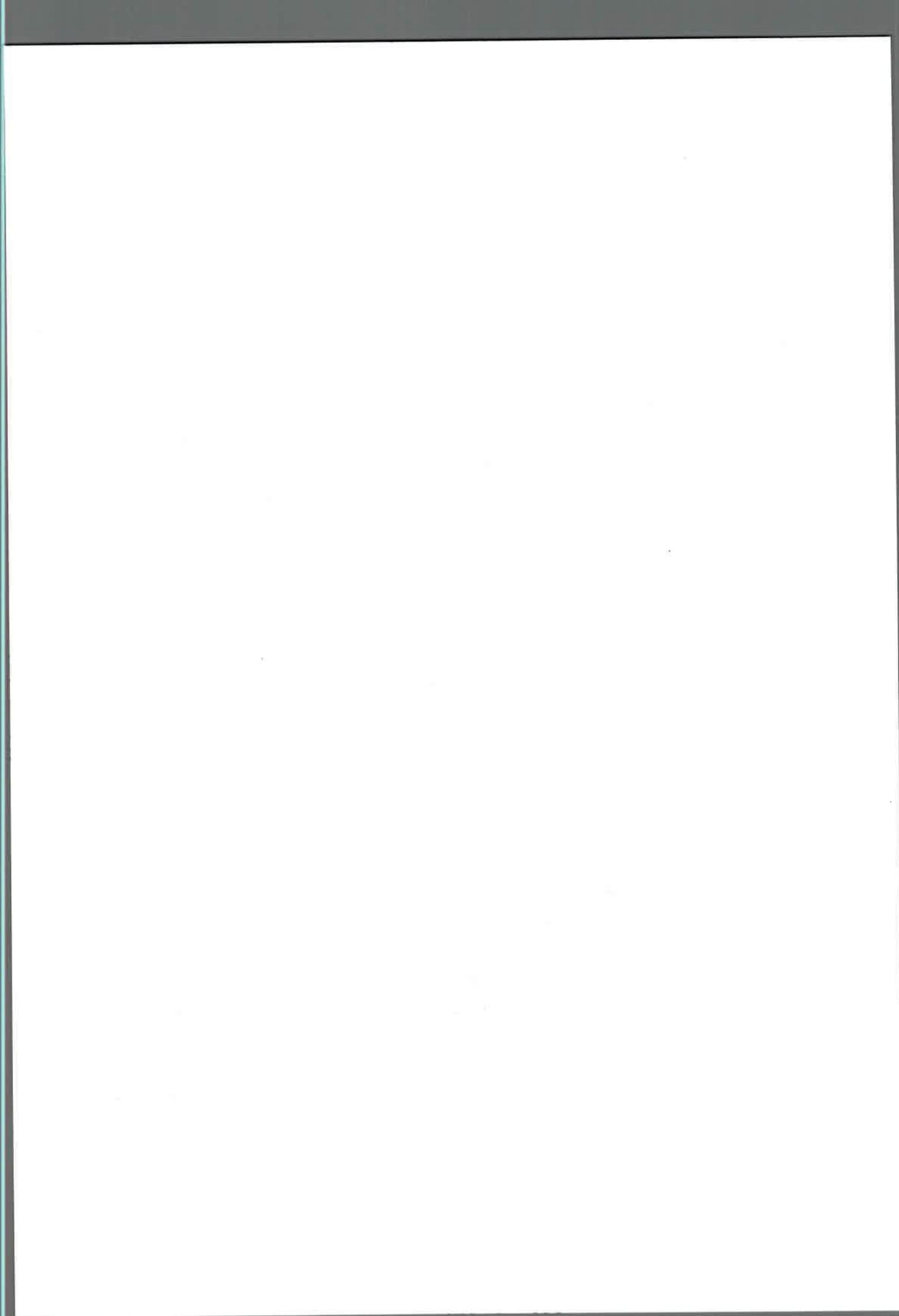
### 2.3.2. Descontaminación de metales tóxicos.

De acuerdo al estado de oxidación que presente el metal, el microorganismo puede realizar dos tipos de transformaciones: **biolixiviación e inmovilización**. Durante la biolixiviación el metal pasa de un estado insoluble inicial (presente en una fase sólida, como por ejemplo suelo, generalmente asociados a sulfuros u óxidos metálicos) a un estado soluble final en fase acuosa. En cambio, la inmovilización corresponde al pasaje del metal de un estado soluble inicial a un estado insoluble final en fase sólida (Vullo, 2003).

La **biolixiviación** no solo resulta una estrategia eficaz para la remoción y/o recuperación de metales tóxicos, también es aprovechable en los procesos de biominería. Por acción microbiana, es posible la extracción de los metales presentes en los minerales, como es el caso de la obtención de cobre por intermedio de *Thiobacillus ferroxidans* y *Thiobacillus thiooxidans* (Madigan *et al.*, 2000).

Desde el punto de vista de la biorremediación, el biolixiviado puede utilizarse dentro de la perspectiva de la hidrometalurgia, recuperando metales a partir de materiales sólidos contaminados. Bacterias del género *Thiobacillus* resultaron eficaces para la recuperación de cobre, níquel, zinc y cadmio (Brombacher *et al.*, 1998, Madigan *et al.*, 2000). Algunos hongos como *Trichoderma harzianum*, pueden solubilizar  $MnO_2$ ,  $Fe_2O_3$  y zinc metálico mediante la liberación de agentes quelantes (Vullo, 2003).

Entre los procesos de **inmovilización** de metales se encuentran:



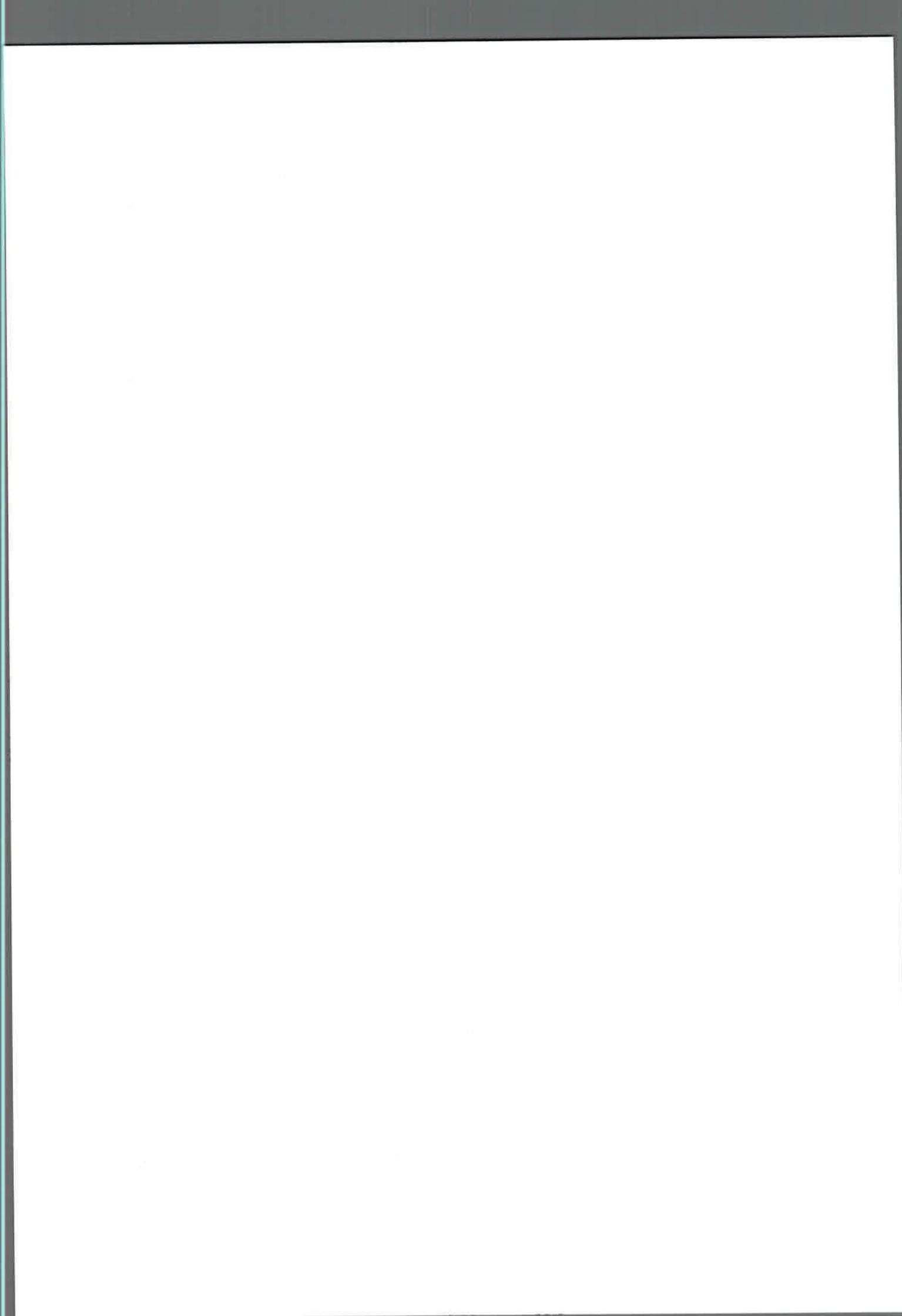
**Bioacumulación:** donde el organismo internaliza el metal presente en el medio con gasto de energía. Dentro del citoplasma, el metal puede ser secuestrado por metaloproteínas o bien, ser compartimentalizado dentro de una vacuola (micorremediación o fitorremediación) (Lovley, 2000). Para el caso de microorganismos, puede citarse la bioacumulación de uranio en el citoplasma de *P. aeruginosa* (Wang *et al.*, 1997).

**Biomíneralización:** en la cual los microorganismos son capaces de precipitar metales en forma de carbonatos, hidróxidos, sulfuros o fosfatos. Esto se lleva a cabo a través de acción enzimática o bien, expulsando el metal presente en el citoplasma hacia el exterior celular en contracorriente a un flujo de  $H^+$ . Esto produce una alcalinización localizada sobre la superficie celular externa, lo que favorece a la precipitación del metal (Visca *et al.*, 1992, Gadd, 2000, Lovley, 2000, Sharma *et al.*, 2000). Ejemplo de ello es la biomíneralización de CdS, llevada a cabo por *Klebsiella planticola* y *P. aeruginosa* (Wang *et al.*, 1997, Sharma *et al.*, 2000). También ha sido demostrado que *P. fluorescens* es capaz de crecer en presencia de múltiples metales tales como  $Al^{+3}$ ,  $Fe^{+3}$ ,  $Zn^{+2}$  y  $Ca^{+2}$ . Durante la exposición por largos periodos de tiempo, se observó que estos metales son inmovilizados y secretados fuera de la célula en asociación con oxalato y fosfatidiletanolamina (PE) formando un residuo insoluble (Appanna *et al.*, 1996, Hamel y Appanna, 2003).

**Biosorción:** donde los microorganismos son utilizados como biosorbentes. Los fenómenos de biosorción se caracterizan por la retención del metal mediante una interacción físico-química del metal con ligandos externos pertenecientes a la superficie celular, tales como grupos carboxilos, aminos, hidroxilos, fosfatos y sulfhidrilos. (Martin, 1986, Vullo, 2003, Prado Acosta *et al.*, 2005, Allievi *et al.*, 2011). Una de las principales ventajas de este proceso es que no se requiere de una biomasa metabólicamente activa lo que disminuye considerablemente los costos (McEldowney, 2000, Arica *et al.*, 2001, Bréant *et al.*, 2002, Lebeau *et al.*, 2002). Entre otros, ha sido demostrado que biomasas metabólicamente activas o no de *Paenibacillus polymyxa*, *P. stutzeri*, *Bacillus sphaericus* y *B. thuringiensis* son capaces de bioadsorber diferentes metales tóxicos (Prado Acosta *et al.*, 2005, Oh *et al.*, 2009, Allievi *et al.*, 2011).

#### 2.4. Mecanismos de resistencia bacteriana a QACs y aluminio.

Los microorganismos llevan a cabo diversas estrategias para adaptarse a crecer ante situaciones medioambientales desfavorables. Diferentes autores han demostrado que, particularmente las bacterias Gram negativas, presentan resistencia tanto intrínseca como adquirida a los QACs (Russell *et al.*, 1986, Szumala y Pernak, 1986, Jones *et al.*, 1989, Langsrud y Sundheim, 1997). La resistencia intrínseca está mediada, en gran medida, por la





membrana externa, la cual previene la entrada del detergente actuando como una barrera impermeable, función asociada a la presencia del lipopolisacárido y porinas (Nikaido, 1985, 1989, McDonell y Rusell, 1999). También ha sido observado que los microorganismos pueden adaptarse a los QACs a través de la exposición repetida a estos compuestos, lo que deriva en un incremento de la resistencia a los mismos (Versteeg y Shorter, 1992, Méchin *et al.*, 1999, Nagai *et al.*, 2003, McBain *et al.*, 2004, Simoes *et al.*, 2006). Entre las distintas respuestas a QACs detectadas en células bacterianas, pueden citarse: cambios morfológicos relacionados a la pérdida de movilidad, presencia de material extracelular difuso rodeando a la célula constituido por glicoproteínas, glicolípidos y expolisacáridos (slime) y formación de colonias más pequeñas (Hoffmann *et al.*, 1973, Langsrud *et al.*, 2003), presencia de bombas de eflujo que contribuyen a la exclusión de estos y otros compuestos orgánicos (Paulsen *et al.*, 1996, To *et al.*, 2002, Nagai *et al.*, 2003) y modificaciones a nivel de los fosfolípidos de membrana (Guerin-Méchin *et al.*, 1999, Loughlin *et al.*, 2002, Boeris *et al.*, 2007). Si bien se describen diferentes estudios, el mecanismo de resistencia bacteriana a QACs parece ser un fenómeno múltiple y complejo, aún desconocido.

La exposición a metales tóxicos selecciona y mantiene variantes microbianas capaces de crecer en presencia de los mismos. Dentro de estas variantes, existen microorganismos resistentes y tolerantes a los metales. Los resistentes se caracterizan por poseer mecanismos de detoxificación codificados genéticamente, inducidos por la presencia del metal (Silver y Misra, 1988). En cambio, los tolerantes son indiferentes a la presencia o ausencia de metal. En los procesos de decontaminación ambos tipos de microorganismos son igualmente importantes.

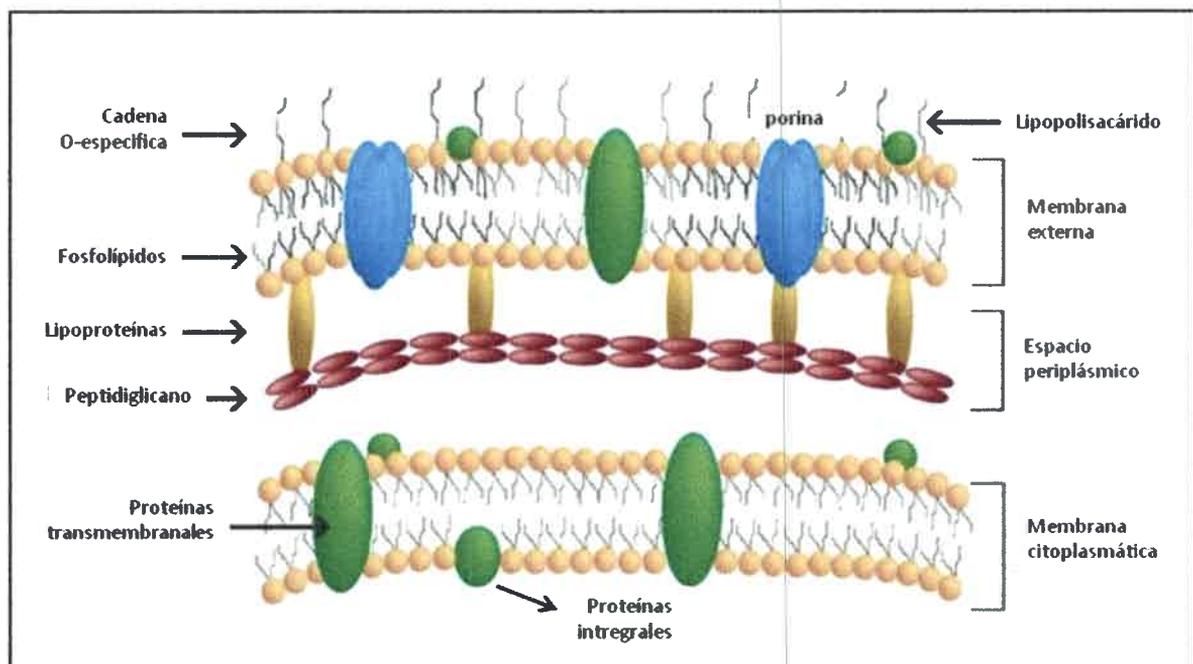
Los mecanismos que les permiten a las bacterias sobreponerse a los efectos nocivos de metales tóxicos involucran principalmente: a) diferentes componentes celulares que capturan a los iones, neutralizando su toxicidad, b) enzimas que modifican el estado redox de los metales o metaloides, convirtiéndolos en formas menos tóxicas, y c) transportadores de la membrana que expulsan las especies nocivas del citoplasma celular (Silver, 1998, Anderson *et al.*, 1992, Cervantes *et al.*, 2006). Para el caso particular del aluminio, han sido descritos varios mecanismos de resistencia, entre los cuales podemos citar: eliminación a través de bombas de eflujo, quelación intra y extracelular involucrando ácidos orgánicos, proteínas y lípidos, unión a diferentes componentes de la membrana o pared celular (fosfolípidos, proteínas, peptidoglicanos, lipopolisacáridos) (Garcidueñas Piña y Cervantes, 1996).



## 2.5. Composición general de las membranas de bacterias Gram negativas.

La envoltura celular de las bacterias Gram negativas es una matriz constituida por una membrana interna o citoplasmática, una pared celular delgada de peptidoglicano, que rodea a la anterior, y una membrana externa compuesta por fosfolípidos (PL) y lipopolisacáridos (LPS) (Brook y Madigan, 1993). En esta matriz se insertan diversas enzimas y proteínas de transporte. Las proteínas pueden estar localizadas en la periferia (proteínas periféricas), en el espacio periplásmico (proteínas o lipoproteínas periplásmicas), incluidas en las membranas (proteínas integrales) o atravesándola completamente (proteínas transmembranales) (Brook y Madigan, 1993). Los PL estabilizan las estructuras proteicas, colaborando al plegamiento, a la inserción de las mismas en la membrana y a su funcionalidad (Denich *et al.*, 2003).

La **Figura 2.2** esquematiza la estructura de la envoltura de las bacterias Gram negativas.



**Figura 2.2:** Esquema representativo de la envoltura celular de bacterias Gram negativas.

La composición de las membranas generalmente es asimétrica (Denich *et al.*, 2003).

La membrana externa es una bicapa conformada por LPS, PL y relativamente pocas proteínas y constituye una eficiente barrera permeable. Algunas bacterias Gram-negativas pueden presentar una capa superficial (capa S o S-layer) de proteínas o glicoproteínas que se autoensamblan rodeando la superficie bacteriana y constituyen la parte más externa de la



envoltura celular. La capa S permite la adherencia celular, estabiliza la membrana y actúa como barrera impermeable para ciertas enzimas líticas (Sleytr *et al.*, 1993).

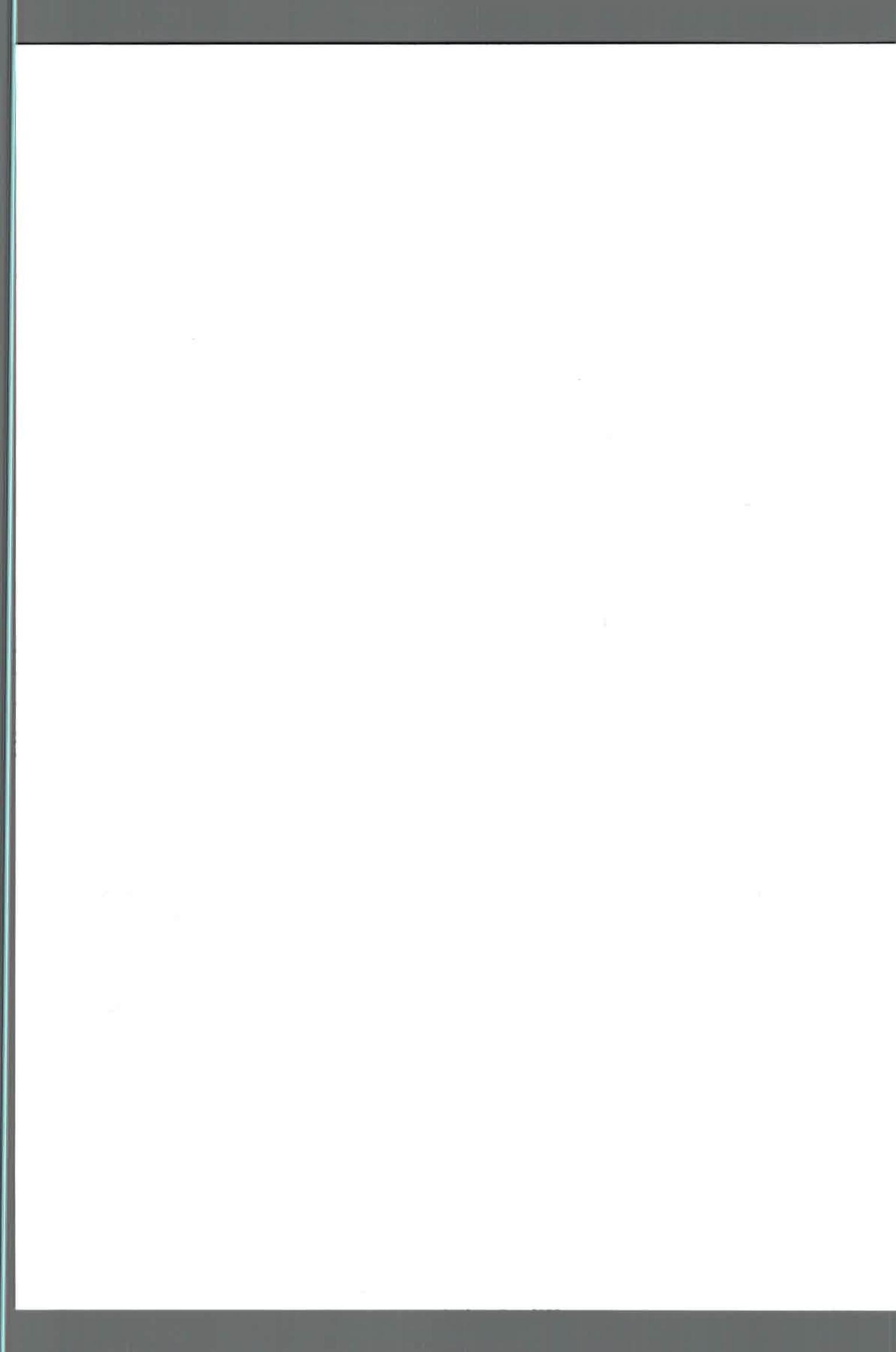
A diferencia de la membrana externa, la membrana citoplasmática es una típica bicapa constituida por cantidades aproximadamente iguales de PL y proteínas y es la encargada principalmente de regular la entrada y salida de metabolitos (Brook y Madigan, 1993). A su vez, la composición lipídica de las monocapas de estas membranas varía en composición y distribución (Rothman y Lenard, 1977, Finean y Michell, 1981). Las membranas, externa e interna, de la mayoría de las bacterias están compuestas principalmente por PL zwitteriónicos y una pequeña proporción de PL aniónicos (Romantsov *et al.*, 2009). Los miembros del género *Pseudomonas* contiene tres PL principales: fosfatidiletanolamina (PE), cardiolipina (CL) y fosfatidilglicerol (PG) (Schweizer, 2004) y como ácidos grasos predominantes se encuentran: ácido palmitoleico (*cis*- $\Delta^9$ -16:1), ácido vaccénico (*cis*- $\Delta^{11}$ -18:1) y C17:ciclopropano (ácido *cis*-9,10-metilenehexadecanoico) (Ramos, *et al.*, 1997; Schweizer, 2004).

## **2.6. Implicancia de los fosfolípidos en la resistencia bacteriana ante diversas situaciones de estrés.**

La membrana bacteriana constituye el primer punto de contacto entre el microorganismo y el medio ambiente. La composición de la misma, dada por el tipo y la cantidad de PL individuales, frecuentemente define la integridad y estabilidad de la célula. Por tal motivo, las bacterias han desarrollado diferentes mecanismos que le permiten modificar la composición de sus PL de membrana en respuesta a la acción de agentes que perturben esta integridad y compensar así el daño ocasionado.

Los PL representan una de las moléculas de las membranas celulares que mejores se adaptan a situaciones desfavorables. Pequeños cambios en su estructura pueden alterar el empaquetamiento de las bicapas celulares y, en consecuencia, modificar su fluidez y/o las interacciones lípidos-proteínas (Denich *et al.*, 2003). En general, los mecanismos de adaptación bacteriana que involucran cambios a nivel de PL incluyen: modificaciones de ciertos ácidos grasos y cambios en el nivel de las cabezas polares de PL (Jones *et al.*, 1989, Sakagami *et al.*, 1989, López *et al.*, 1998, Mechin *et al.*, 1999, Guerin-Méchin *et al.*, 1999, Loughlin *et al.*, 2002, Machado *et al.*, 2004, Boeris *et al.*, 2007).

Los cambios a nivel de ácidos grasos de PL o "Adaptación Homeoviscosa" (Sinensky, 1974) representan los mecanismos mejor estudiados y dilucidados de la respuesta bacteriana ante condiciones ambientales desfavorables. Las tres principales modificaciones descritas son: incremento de ácidos grasos saturados, isomerización



*cis*→*trans* y ciclopropanación (Grogan y Cronan, 1997, Chang *et al.*, 2000, Cronan, 2002). Estos cambios modifican la fluidez de la membrana, evitando la entrada del agente tóxico al espacio intracelular. Así, por ejemplo, la conversión de ácidos grasos *cis*→*trans* resulta en un incremento de la rigidez de la membrana de manera rápida y eficaz. Esta conversión se lleva a cabo por una directa isomerización mediada por la *cis*→*trans* isomerasa (Cti), enzima descrita en un gran número de microorganismos (Holtwick *et al.*, 1997, Ramos *et al.*, 1997, Junker y Ramos, 1999, von Wallbrunn *et al.*, 2002, Bernal *et al.*, 2007).

Los cambios a nivel de grupos o cabezas polares de los PL bacterianos en respuesta a condiciones ambientales desfavorables, el efecto que ocasionan estos cambios en la membrana celular y los mecanismos implicados en el recambio de los mismos son menos conocidos. En bacterias ha sido descrito que el contenido de cada PL varía de acuerdo con la fase de crecimiento en la que se encuentre el microorganismo. Así por ejemplo, PG es más abundante en fase exponencial de crecimiento, mientras que CL se acumula durante la fase estacionaria (Ramos *et al.*, 1997, Bernal *et al.*, 2007). En diferentes microorganismos expuestos a situaciones de estrés, tales como la presencia de solventes, altas o bajas temperaturas, concentraciones salinas elevadas y presencia de QACs, se ha observado incremento en los niveles de PL totales (Russel *et al.*, 1986, Sakagami *et al.*, 1989, Nieboer *et al.*, 1993, Pinkart y White, 1997, Fang *et al.*, 2000, Villasuso *et al.*, 2005, Medeot *et al.*, 2007, Ghosh *et al.*, 2008). En células de *P. aeruginosa* resistentes al QAC cloruro de benzalconio (BC) ha sido descrito que el aumento de PL totales detectados cuando el microorganismo es expuesto al QAC se acompaña con incremento en los niveles de lípidos ácidos y neutros. En conjunto, estas modificaciones llevan a una menor adsorción de BC a la membrana celular, respecto a lo que se detecta para la cepa sensible al QAC y, consecuentemente, permiten la sobrevivencia de *P. aeruginosa* cuando BC está presente en el medio (Sakagami *et al.*, 1989).

Con respecto al contenido y recambio de PL específicos, varios autores han puesto de manifiesto la importancia en el contenido de los PL aniónicos: PA, PG y CL en varios microorganismos expuestos a condiciones estresantes, tales como la presencia de solventes, QACs, la exposición a altas temperaturas, a concentraciones salinas elevadas o a valores bajos de pH (López *et al.*, 1998, Correa *et al.*, 1999, Matsumoto, 2001, von Wallbrunn *et al.*, 2002, Catucci *et al.*, 2004, López *et al.*, 2006, Bernal *et al.*, 2007, Boeris *et al.*, 2007, Ghosh *et al.*, 2008). Generalmente, la respuesta consiste en el aumento del contenido de estos PL.

*P. putida* DOT T1 es una bacteria tolerante a tolueno, capaz de crecer en presencia de altas concentraciones de este solvente (Ramos *et al.*, 1995). Los principales cambios que



se han detectado en respuesta a la presencia de tolueno involucran incremento en los niveles de CL e isomerización *cis*→*trans* (Ramos *et al.*, 1997, Junker y Ramos, 1999). Mutantes de *P. putida* DOT T1 afectadas en el gen cardiolipina sintasa (*cls*), presentan cantidades trazas de CL en su membrana y niveles incrementados de PG (precursor inmediato de CL). Respecto a la cepa salvaje, la cepa mutante presenta un menor tamaño celular, una disminución en la fluidez de la membrana y una sensibilidad incrementada al tolueno y a ciertos antibióticos (cloranfenicol y tetraciclina) (Bernal *et al.*, 2007). Esta sensibilidad fue atribuida a un incorrecto funcionamiento de una bomba de eflujo del tipo RND (Resistencia-Nodulación-División celular), sistema de exclusión que ha sido asociado al eflujo de solventes y de antibióticos (Koronakis *et al.*, 2000, Avila-Sakar *et al.*, 2001, Murakami *et al.*, 2002). Se conoce que CL cumple un papel muy importante en el ensamblaje y funcionalidad de ciertas proteínas de membrana (Kusters *et al.*, 1991, Klompenburg *et al.*, 1998, Bogdanov *et al.*, 2002, Zhang *et al.*, 2002, Pfeiffer *et al.*, 2003). Por ello, ha sido planteado que, posiblemente, la ausencia de CL en *P. putida* DOT T1 no permita el correcto ensamblaje de la bomba RND a la membrana y, en consecuencia, su funcionalidad se encuentre alterada (Bernal *et al.*, 2007).

*Bacillus subtilis*, una bacteria tolerante a la alta salinidad, responde al estrés hiperosmótico con un incremento en el contenido de CL a expensas de PG (López *et al.*, 1998). En condiciones no estresantes de crecimiento, mutantes de *B. subtilis* carentes de CL en su membrana, presentan niveles incrementados de PG. En presencia de 1,5 M de NaCl y respecto a lo observado en la cepa salvaje, la cepa mutante muestra una fase de latencia extendida y menor crecimiento final (López *et al.*, 2006). Cuando estos autores analizaron el perfil fosfolipídico de la mutante expuesta a NaCl, respecto a células mutantes no expuestas, observaron un incremento en los niveles de PG. Por otro lado, estos mismos autores analizaron el comportamiento de una mutante de *B. subtilis* condicional para el gen fosfatidilglicerol sintasa (*pgsA*). Sin la inducción del gen *pgsA*, la cepa carece de PG y CL en su membrana. La ausencia de estos PL muestra una correlación directa con la disminución de la viabilidad celular en condiciones no estresantes de crecimiento durante largos periodos de tiempo y con la osmoresistencia del microorganismo (López *et al.*, 2006).

Cepas de *E. coli* mutantes nulas para CLs mostraron, de manera semejante a lo descrito para *P. putida* DOT T1 (Bernal *et al.*, 2007), niveles basales de CL y niveles incrementados de PG en su membrana (Tropp, 1997). En condiciones no estresantes de crecimiento y respecto a lo detectado en la cepa salvaje, la mutante manifiesta una fase de latencia extendida, un suave incremento en el tiempo de generación y una densidad final de crecimiento menor, además de una mayor sensibilidad a la novibiocina (Tropp *et al.*, 1995).

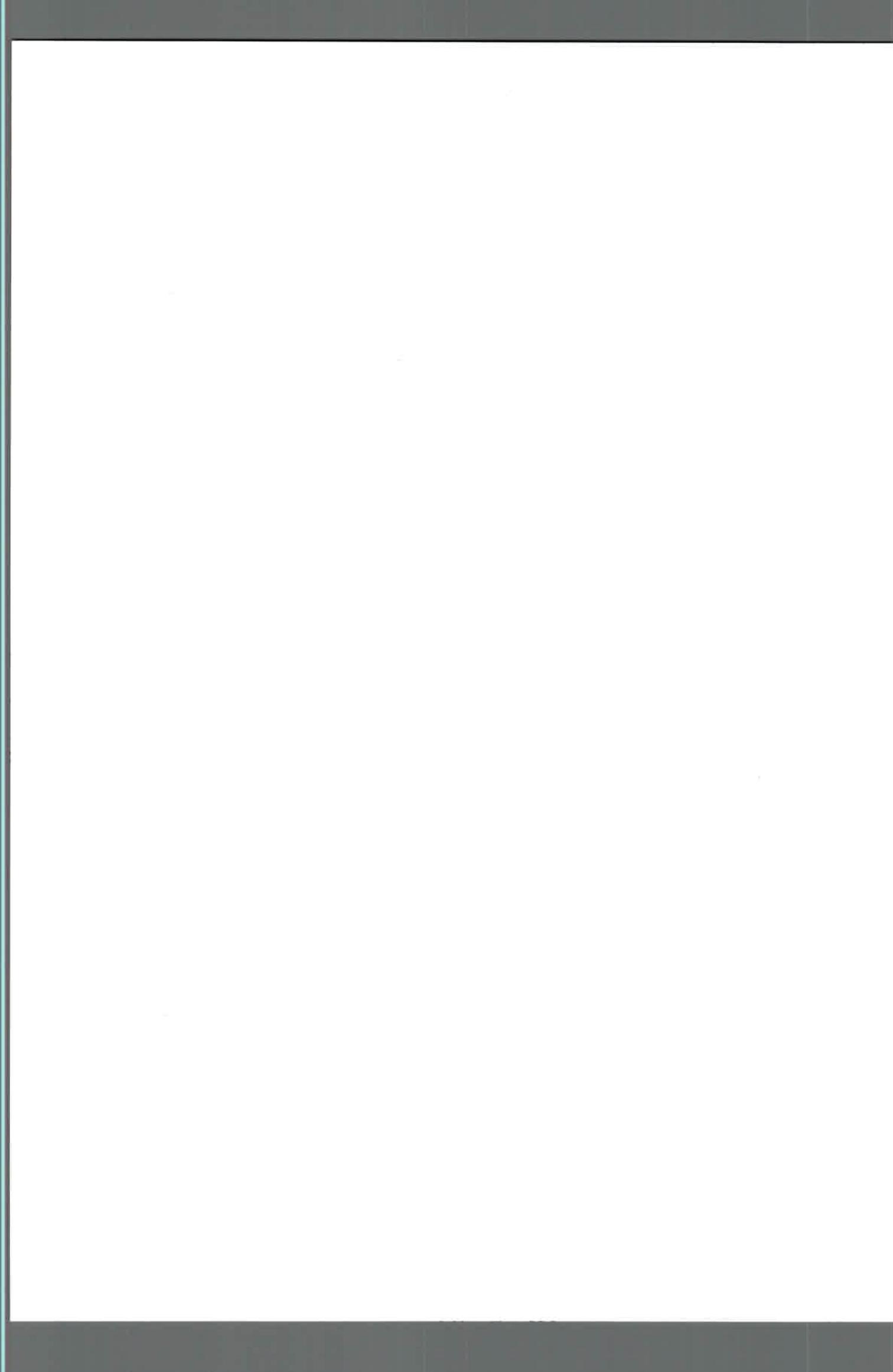


Otros autores han demostrado que mutantes de *E. coli* nulas para el gen fosfatidilglicerol sintasa (*pgsA*) presentan en su membrana cantidades trazas de PG y CL y niveles incrementados de ácido fosfatídico (PA). Estas mutantes sólo fueron viables en medio rico y fueron incapaces de crecer en medios salinos, en condiciones hiposmóticas o a altas temperaturas (40°), indicando la importancia de estos PL en la sobrevivencia del microorganismo (Kikuchi *et al.*, 2000).

Estos antecedentes, en su conjunto, sugieren que CL participa en la respuesta primaria de ciertos microorganismos expuestos a diferentes situaciones de estrés (López *et al.*, 1998, Tropp, 1997, Kikuchi *et al.*, 2000, López *et al.*, 2006, Bernal *et al.*, 2007). Por otro lado, el hecho de que mutantes afectadas en la síntesis de CL contengan niveles incrementados de PG en su membranas (Tropp, 1997, López *et al.*, 2006, Bernal *et al.*, 2007) y que la cantidad de este PL incremente aún más cuando estas mutantes son expuestas a condiciones desfavorables (López *et al.*, 2006), permite plantear que, posiblemente, PG reemplace a CL en algunas de sus funciones (López *et al.*, 2006, Bernal *et al.*, 2007) subsanando, de esta manera, la carencia de CL. Con respecto a ello, Matsumoto (2001), ha propuesto un papel fisiológico dual para los PL aniónicos, en el cual estos PL podrían sustituirse unos por otros, permitiendo llevar a cabo ciertas funciones celulares.

Los PL también han sido implicados en los mecanismos de resistencia bacteriana a metales tóxicos. Ha sido demostrado que *P. fluorescens* es capaz de crecer en presencia de múltiples metales tales como  $Al^{+3}$ ,  $Fe^{+3}$ ,  $Zn^{+2}$  y  $Ca^{+2}$ . Durante la exposición por largos periodos de tiempo, se observó que estos metales son inmovilizados y secretados fuera de la célula en asociación con oxalato y PE formando un residuo insoluble (Appanna *et al.*, 1996, Hamel y Appanna, 2003). Martin (1986), demostró que la unión del  $Al^{+3}$  a superficies celulares se lleva a cabo mediante interacciones electrostáticas con los sitios aniónicos de la superficie de la membrana, principalmente con grupos carboxilatos y grupos fosfatos de fosfolípidos. Utilizando liposomas de fosfatidilcolina (PC), fosfatidilinositol (PI), fosfoinositidos (PPI) y fosfatidilserina (PS), ha sido demostrado que el  $Al^{+3}$  puede interaccionar con estos fosfolípidos (MacKinnon *et al.*, 2004, 2006) y que, tanto “*in vitro*” como “*in vivo*”, la interacción del  $Al^{+3}$ , u otros cationes trivalentes, con estos fosfolípidos provoca cambios en las propiedades físicas de membranas, tal como el incremento de rigidez de las mismas (Verstraeten *et al.*, 1997, 2003).

En adición al recambio de PL de membranas detectado en microorganismos expuestos a condiciones desfavorables, varios autores han descrito la liberación de vesículas de membrana externa (MVs), ofreciendo a la célula un efectivo mecanismo para la

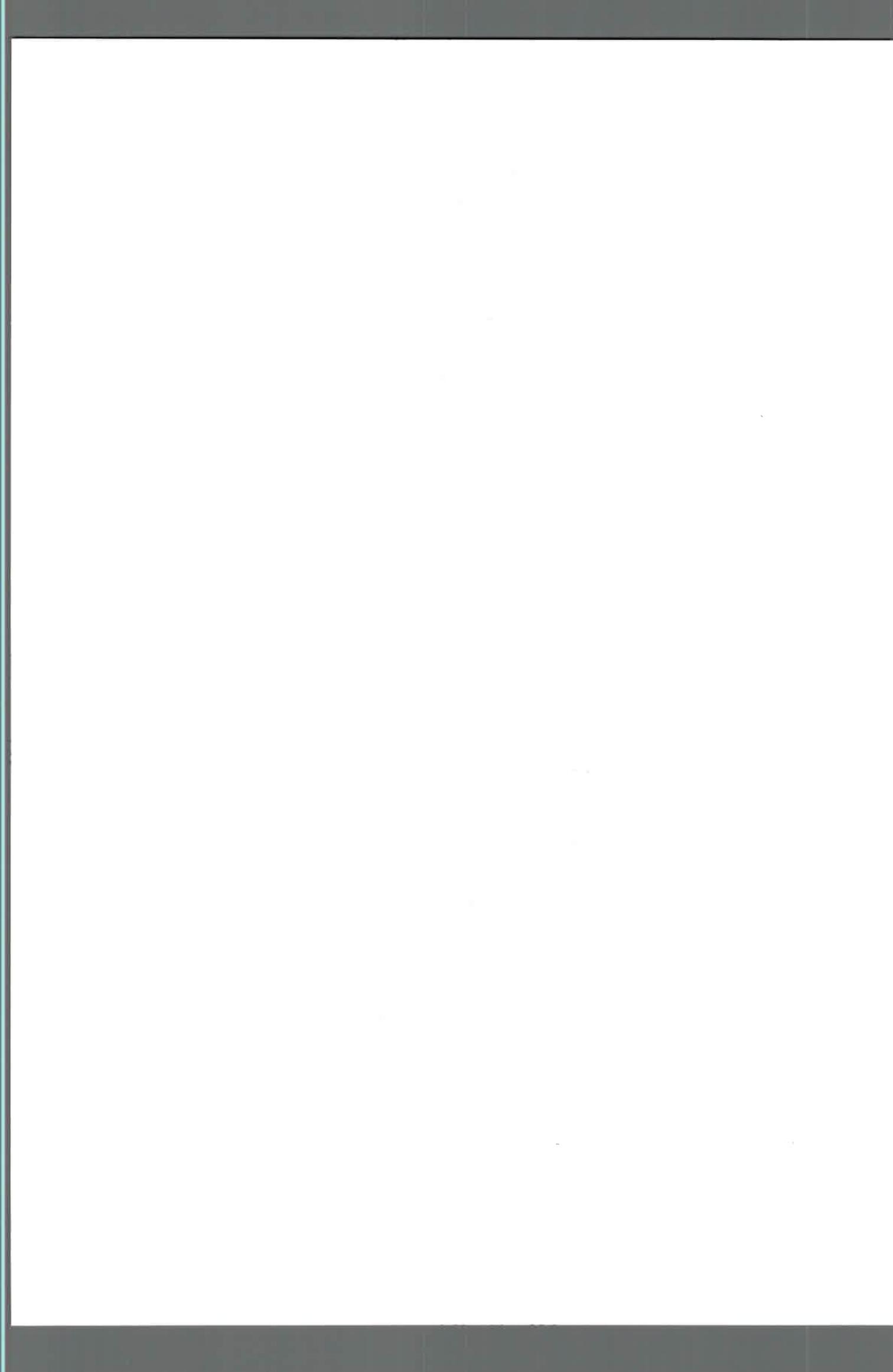


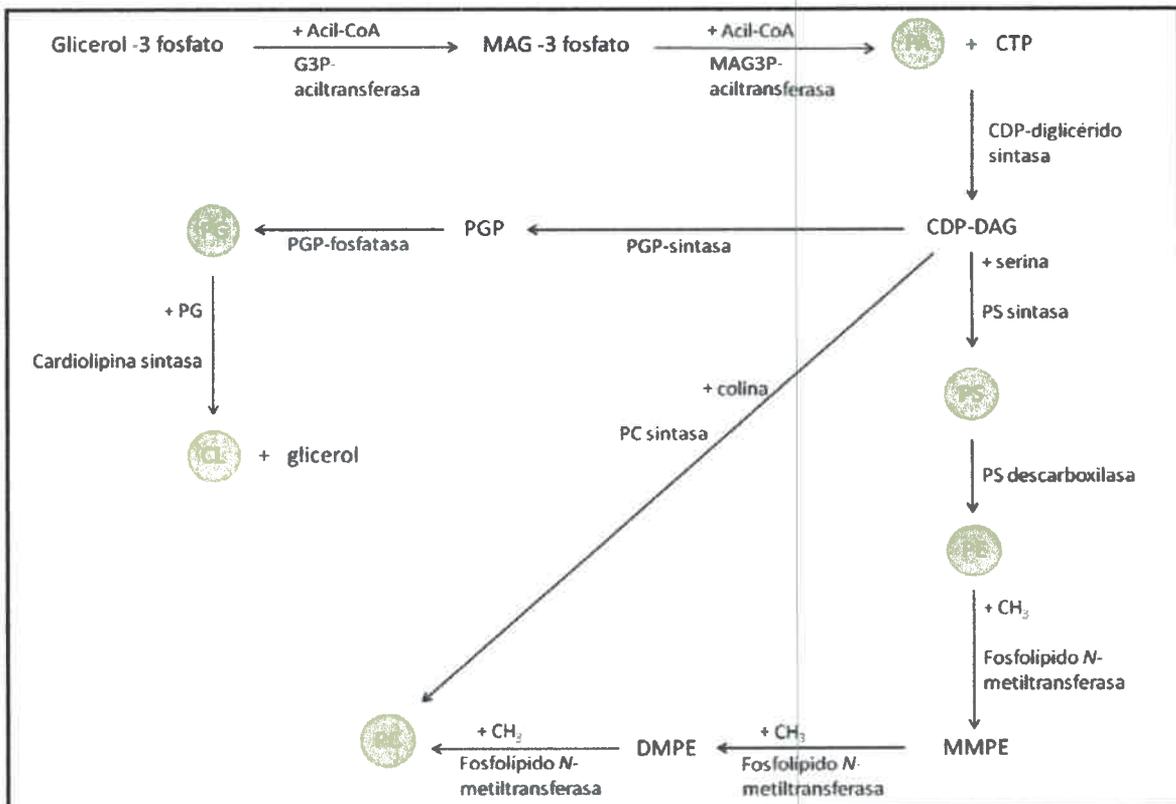
remoción de compuestos no deseados y/o modificación de la envoltura celular cuando el remodelamiento de la membrana no es ventajoso (McBroom y Kuehn, 2007). Las MVs generalmente están constituidas por PL, LPS, proteínas de membrana y componentes del periplasma (Tashiro *et al.*, 2011) y pueden transportar en su interior una amplia diversidad de moléculas, tales como: proteínas mal plegadas, compuestos tóxicos, enzimas digestivas, factores de virulencia y material genético (Mc Broom y Kuehn, 2007). Este último permite la transmisión de genes relacionado a la resistencia y al metabolismo de diversos compuestos (Kolling *et al.*, 1999, Yaron *et al.*, 2000). La liberación de MVs conteniendo tolueno en su interior ha sido descrita en la cepa tolerante a tolueno, *P. putida* IH-2000 (Kobayashi *et al.*, 2000). En *P. aeruginosa* se ha determinado que las MVs son responsables de transportar factores de virulencia (Ellis y Kuehn, 2010), moléculas del quórum-sensing (Mashburn y Whitely, 2005) o componentes del biofilm (Schooling y Beveridge, 2005). Tashiro y col. (2011) han analizado la composición fosfolipídica de las vesículas liberadas por *P. aeruginosa* creciendo en medio rico LB hasta principio de fase estacionaria. Ellos observaron que el perfil fosfolipídico de MVs es semejante al determinado en la membrana externa del microorganismo, detectándose principalmente PE, PG y PC. Sin embargo, las vesículas se caracterizaron por un alto contenido de PG y de ácido esteárico, lo que provoca una disminución de la fluidez de la membrana, necesaria para la correcta curvatura de las vesículas (Mashburn-Warren *et al.*, 2008).

## 2.7. Biosíntesis de fosfolípidos en bacterias.

El metabolismo de lípidos bacterianos ha sido intensamente estudiado utilizando como organismos modelos a *E. coli* y *B. subtilis*. Ambos microorganismos poseen como lípidos mayoritarios: PE, PG y CL (Rock *et al.*, 1996). En adición a estos PL, ha sido descrito que, particularmente las bacterias Gram negativas, pueden contener PC en su membrana (Sohlenkamp *et al.*, 2003).

La **Figura 2.3** muestra un esquema de las vías de biosíntesis de novo de PL descrita en bacterias Gram positivas y Gram negativas (Raetz y Dowhan, 1990, Wilderman *et al.*, 2002, Sohlenkamp *et al.*, 2003 y citas incluidas, Martínez-Morales, *et al.*, 2003).





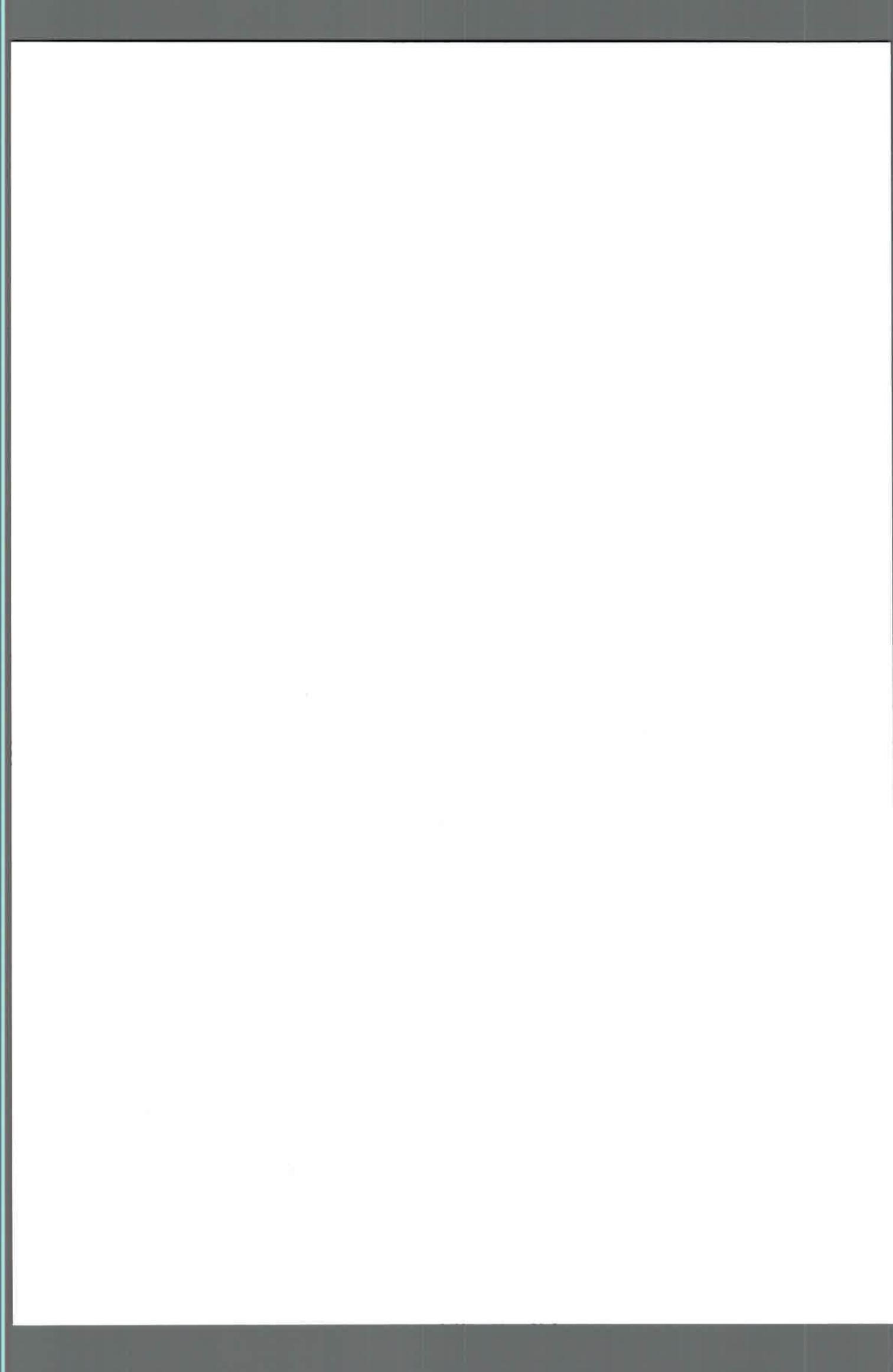
**Figura 2.3:** Vía de biosíntesis de PL en bacterias.

PL tales como PS y los derivados metilados de PE (monometilfosfatidiletanolamina (MMPE) y dimetilfosfatidiletanolamina (DMPE)) actúan generalmente como intermediarios de la biosíntesis PC y raramente se encuentran formando parte de las membranas bacterianas (Tomabene 1973, van Golde *et al.*, 1975, Sohlenkamp *et al.*, 2003)

PE generalmente cumple un papel estructural y ha sido asociado a la movilidad y quimiotaxis celular (Shi *et al.*, 1993).

Como se describió anteriormente, los PL aniónicos (PG, CL y PA) juegan roles muy importantes en microorganismos expuestos a situaciones de estrés, sin embargo no es el único papel que se les asigna. El correcto funcionamiento de ciertas funciones celulares han sido asociadas a CL y PG, tal es el caso de la formación del septo de división celular e inicio de replicación de ADN (Xia y Dowhan, 1995, Renner y Weibel, 2011), el ensamblaje y posicionamiento de proteínas de membrana, la funcionalidad de bombas de eflujo (Bernal *et al.*, 2007, Renner y Weibel, 2011) y la translocación de proteínas de membrana externa (Kusters *et al.*, 1991).

PC es un fosfolípido poco común en células procariontas. Se ha sugerido que, probablemente, sólo un poco más del 10 % de las bacterias contienen PC en su membrana (Sohlenkamp *et al.*, 2003). Para el caso de bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno, PC ha sido asociado a la correcta formación de nódulos fijadores de nitrógeno y al óptimo



funcionamiento de los mismos. En bacterias patógenas se cree que este PL estaría involucrado en la interacción con la célula eucariota, actuando posiblemente como factor de virulencia (Sohlenkamp *et al.*, 2003, Daiyasu *et al.*, 2005, Comerci *et al.*, 2006, Wessel *et al.*, 2006, Conover *et al.*, 2008). Diferentes autores han demostrado, además, la importancia de PC en bacterias expuestas a situaciones de estrés, como por ejemplo, altas temperaturas, baja tensión de O<sub>2</sub>, concentraciones salinas elevadas y presencia de ácido acético (Russell, 1992, Tang y Hollingsworth, 1998, Hanada *et al.*, 2001, Medeot *et al.*, 2007).

La síntesis de PC puede llevarse a cabo por diferentes vías. En bacterias Gram negativas, se han descrito dos caminos principales (**Figura 2.3**). Uno de ellos involucra la sucesiva metilación de PE por medio de una o varias fosfolípido *N*-metiltransferasas (PMT) dependientes de S-adenosil metionina (SAM) (Rock *et al.*, 1996). El otro camino es el de la fosfatidilcolina sintasa (PCS), donde PC es sintetizada a partir de la condensación de CDP-diacilglicerol con colina, reacción catalizada por la PCS (de Rudder *et al.*, 1997, 1999, Sohlenkamp *et al.*, 2000). Estas vías de biosíntesis de novo han sido descritas, entre otros, en *P. aeruginosa*, *S. meliloti* y *Rhizobium leguminosarum* (Sohlenkamp *et al.*, 2000, López-Lara y Geiger, 2001, Wilderman *et al.*, 2002, López-Lara *et al.*, 2003, Martínez-Morales *et al.*, 2003).

En algunos microorganismos, además de estos glicerofosfolípidos, ha sido descrita la presencia de otros lípidos y algunos de ellos son específicos de bacterias. Por ejemplo, *Staphylococcus aureus* (Nahaie *et al.*, 1984), *B. subtilis* (Op den Kamp *et al.*, 1969), *Bacillus anthracis* (Samant *et al.*, 2009), *Listeria monocytogenes* (Fischer y Leopold, 1999), *Micobacterium tuberculosis* y *Clostridium perfringens* (Roy e Ibba, 2008) contienen *O*-amioacil fosfogliceroles derivados de PG, donde un residuo aminoacídico es esterificado en la posición *sn*-3 del glicerol de PG. Los aminoácidos más comúnmente hallados en este tipo de lípidos son lisina, ornitina y alanina. Estas modificaciones eliminan la carga neta negativa dada por la molécula de PG incrementando la resistencia del microorganismo contra agentes bacterianos catiónicos (Goldfine, 1982). También ha sido observado, aunque en raras ocasiones, la presencia de esfingolípidos y fosfatidilinositol en membranas de procariontas, tales como *Bacteriodes melaninogenicus*, *Mycobacteria sp.* y *B. japonicum* (White *et al.*, 1969, Goren, 1984, Tang y Hollingsworth, 1998, Jackson, *et al.*, 2000). En condiciones limitantes de fósforo, ciertos microorganismos son capaces de sintetizar lípidos sin fósforos, tales como glicolípidos, sulfolípidos y lípidos de ornitina o betaina (López-Lara *et al.*, 2003).



## 2.8. Antecedentes Específicos y Objetivos.

En nuestro laboratorio demostramos que un cultivo puro de *P. putida* A ATCC 12633 es capaz de tolerar y crecer en presencia de altas concentraciones (50 mg/l) del compuesto de amonio cuaternario sintético tetradeciltrimetilamonio (TDTMA) (Liffourrena *et al.*, 2008). Cuando se estudió el metabolismo de TDTMA en *P. putida* A ATCC 12633 se demostró que el paso inicial de su catabolismo involucra la ruptura de la unión C-N del detergente, reacción catalizada por una actividad TDTMA-monooxigenasa, que genera tetradecanal y trimetilamina (TMA) (Liffourrena *et al.*, 2008, 2009). La TMA producida fue utilizada por *P. putida* A ATCC 12633 como fuente de nitrógeno y también acumulada intracelularmente, afectando el crecimiento bacteriano y, con ello, la degradación total del detergente. Este efecto negativo fue contrarrestado por la adición al medio de 0,1 mM  $\text{AlCl}_3$ . El  $\text{Al}^{+3}$ , actuando como un ácido de Lewis, secuestró la TMA intracelular a través de la formación de un complejo TMA- $\text{Al}^{+3}$ . La formación de este complejo permite reanudar el crecimiento bacteriano y, en consecuencia, la total utilización y degradación del detergente (Liffourrena *et al.*, 2008).

Entre los parámetros que podrían estar relacionados con los mecanismos que le permiten a *P. putida* A ATCC 12633 crecer en presencia del detergente, se estudiaron los cambios a nivel de PL de membrana cuando la cepa fue expuesta durante cortos periodos de tiempo a TDTMA. Para ello células de *P. putida* A ATCC 12633 fueron crecidas con glucosa y  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (fuentes preferenciales) hasta  $\text{DO}_{660}$  de 0,8. En ese momento las células fueron enfrentadas o no a TDTMA durante 15 min y a continuación se analizó la composición de PL. El nivel de PL totales no presentó diferencias significativas respecto a lo detectado en células no tratadas, sin embargo, sí se observaron cambios a nivel de PL individuales. De las especies de PL identificadas, el nivel de CL disminuyó aproximadamente un 60 %, respecto a lo detectado en células no expuestas al detergente, mientras que PG y PA aumentaron 120 % y 130 %, respectivamente. Estas mismas modificaciones fueron detectadas en células adaptadas a crecer a concentraciones crecientes del biocida (mayores a la CIM=150 mg/l) e, interesantemente, cuando las células fueran desadaptadas, los niveles de estos fosfolípidos retornaron a valores similares a los detectados en ausencia del detergente. Estos resultados permitieron concluir que estos PL aniónicos están involucrados en la respuesta de *P. putida* A ATCC 12633 al QAC, utilizando principalmente PA para neutralizar la alta carga positiva de la molécula de TDTMA (Boeris *et al.*, 2007).



En base a lo expuesto se plantearon los siguientes objetivos para el presente trabajo de tesis:

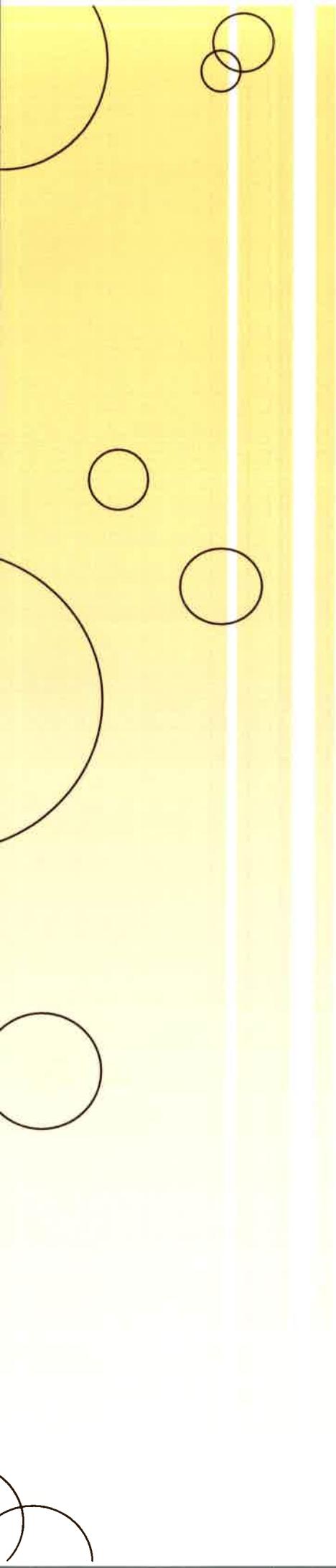
### 2.8.1. Objetivo general.

Conocer la respuesta de *P. putida* frente al estímulo producido por compuestos de amonio cuaternarios sintéticos a nivel de los fosfolípidos y de diversas actividades fosfolipasas. Se pretende contribuir al conocimiento del proceso de adaptación de esta cepa para utilizarla como vehículo en los procesos de decontaminación de detergentes catiónicos presentes en los ecosistemas naturales.

### 2.8.2. Objetivos específicos.

- a) Identificar las enzimas de *P. putida* A ATCC 12633 involucradas en la biosíntesis de novo de fosfolípidos que jueguen un papel importante en la respuesta a TDTMA y/o  $Al^{+3}$ .
- b) Identificar el o los tipos de fosfolipasas que pueden estar involucradas en los cambios en la concentración de fosfolípidos específicos cuando *P. putida* A ATCC 12633 se enfrenta a TDTMA.
- c) Clonar los genes de interés de *P. putida* A ATCC 12633 responsables de codificar para enzimas claves de la biosíntesis de novo de fosfolípidos involucradas en la respuesta a TDTMA y/o  $Al^{+3}$ , en particular los implicados en la síntesis de cardiolipina y fosfatidilcolina.
- d) Obtener mutantes afectadas en la síntesis de cardiolipina y fosfatidilcolina y caracterizar las mismas frente al estrés ocasionado por TDTMA y/o  $Al^{+3}$ .





3

[M A T E R I A L E S  
Y M É T O D O S]



### 3.1. Medios de cultivo.

**Medio nutritivo Luria-Broth (LB):** Medio líquido que contiene triptona 1 %, extracto de levadura 0,5 %, NaCl 0,5 % (Sambrook *et al.*, 1989).

**Medio nutritivo LB sólido:** Medio de idéntica composición que el anterior con el agregado de 1,8-2 % de Agar.

**Medio triptona-extracto de levadura (TY):** Medio complejo que contiene triptona 0,5 %, extracto de levadura 0,3 %. Al momento de usar se adiciona  $\text{CaCl}_2$  4,5 mM (Beringer, 1974).

**Medio salino de alto contenido en fosfato (HPi-BSM):** NaCl 8,5 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  22 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  17 mM y  $\text{MgSO}_4$  0,8 mM, pH 7,4. Para evitar precipitaciones salinas, se mezclan iguales volúmenes de  $\text{MgSO}_4$  con el resto del medio de cultivo en el momento de su utilización (Lucchesi *et al.*, 1989). A este medio basal se le agrega las fuentes de carbono y nitrógeno estériles necesarias.

### 3.2. Conservación y mantenimiento de las cepas.

Las cepas bacterianas fueron conservadas de la siguiente manera: a 0,85 ml de un cultivo líquido en LB crecido durante 10-12 hs se le agregan 0,15 ml de glicerol 87 % estéril, se mezcla, se enfría a  $-20^\circ\text{C}$  y luego se conserva a  $-80^\circ\text{C}$ . Para recuperar la cepa, se raspa la superficie con un palillo estéril y se estría una placa de LB (Sambrook *et al.*, 1989). Las cepas bacterianas fueron mantenidas en medio LB sólido por repiques quincenales.

### 3.3. Microorganismos y condiciones de cultivo.

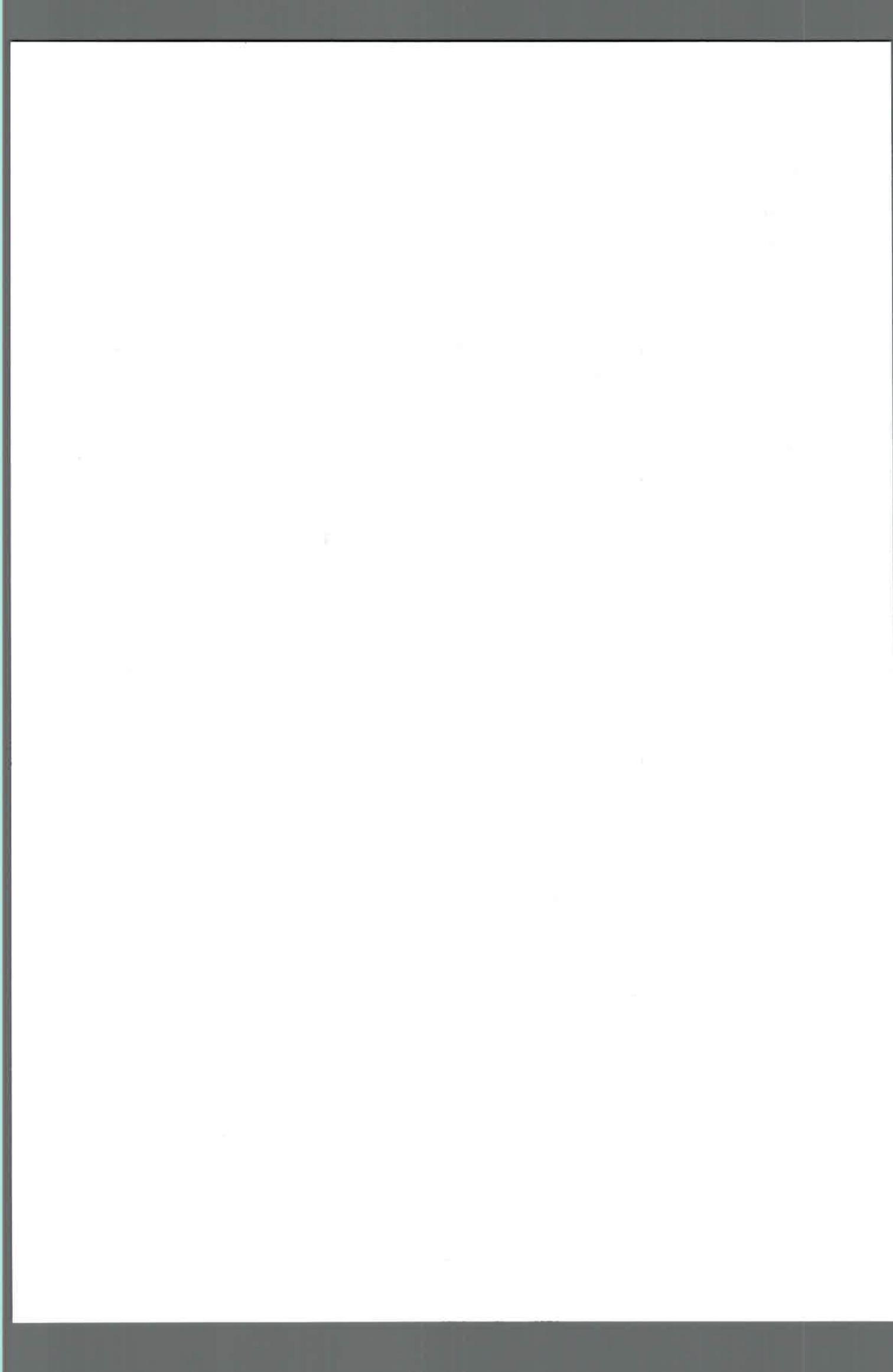
Las cepas bacterianas y los plásmidos usados en este estudio se detallan en la **Tabla 3.1.**

- *P. putida* A ATCC 12633 y *P. putida* KT2440 y sus mutantes derivadas se hicieron crecer a  $30^\circ\text{C}$  en medio rico LB o en HPi-BSM con la adición de glucosa 20 mM y  $\text{NH}_4\text{Cl}$  18 mM como fuente de C y N, respectivamente, o con TDTMA 150  $\mu\text{M}$  (50 mg/l) como única fuente de C y N.

- Las diferentes cepas de *E. coli* fueron crecidas a  $37^\circ\text{C}$  en medio rico LB.

- *Sinorhizobium meliloti* 1021 se hizo crecer a  $30^\circ\text{C}$  en medio complejo TY.

Para favorecer la oxigenación de los cultivos líquidos se mantuvo una relación 1/10 entre el volumen del medio de cultivo y el volumen del frasco Erlenmeyer. Los cultivos, en

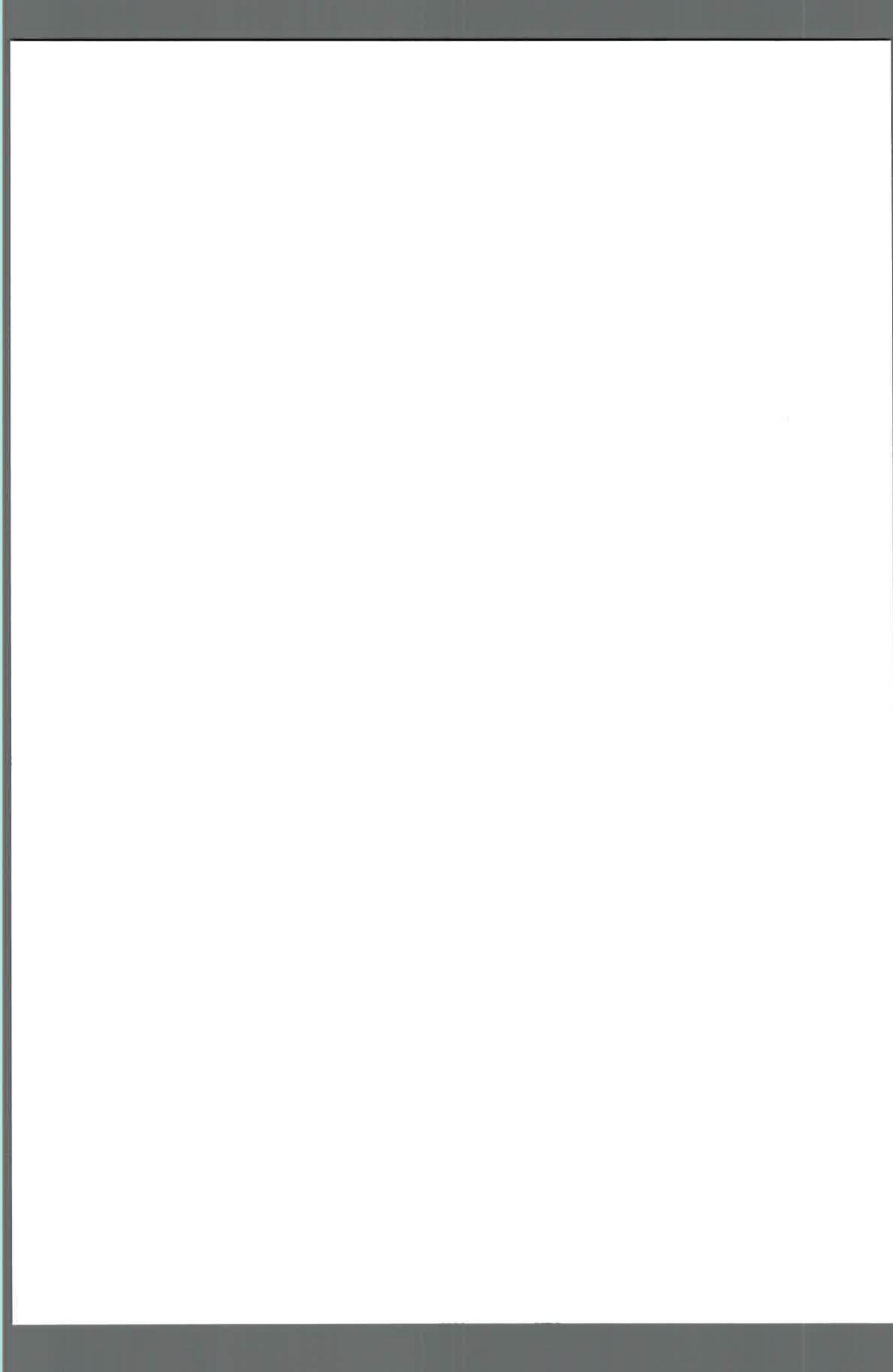


general, se iniciaron con el agregado de un inóculo al 1 % v/v, el que se hizo crecer previamente en medio rico LB o en medio complejo TY, con agitación durante 12 hs.

Cuando fue necesario, los siguientes antibióticos fueron adicionados al medio de cultivo con las siguientes concentraciones: para *P. putida*, gentamicina (Gm) 120 µg/ml, estreptomycin (Sm) 100 µg/ml, kanamicina (Km) 75 µg/ml. Para *E. coli*, Km 50 µg/ml, Gm 100 µg/ml, Sm 50 µg/ml, carbenicilina (Cb) 100 µg/ml, cloranfenicol 20 µg/ml (Cm), Ampicilina (Amp) 150 µg/ml.

**Tabla 3.1:** Cepas bacterianas y plásmidos usados en este estudio.

Cepas o plásmidos	Características relevantes	Referencias
<b>Cepas</b>		
<i>P. putida</i>		
KT2440	Cepa salvaje secuenciada.	Nelson <i>et al.</i> , 2002.
A ATCC 12633	Cepa salvaje de estudio, de colección.	Palleroni, 1992.
GP01	Mutante deletional de <i>P. putida</i> A ATCC12633 afectada en el gen homólogo a <i>cls</i> ( <i>cls</i> homólogoΔ <i>aacC1</i> , Gm <sup>R</sup> ).	Este estudio.
PB01	Mutante insercional de <i>P. putida</i> A ATCC12633, afectada en el gen homólogo a <i>pcs</i> ( <i>pp0731</i> ) ( <i>pcs::aacC1</i> , Gm <sup>R</sup> ).	Este estudio.
PB02	Mutante insercional de <i>P. putida</i> A ATCC12633, afectada en el gen homólogo al orf <i>pp4677</i> ( <i>pp4677</i> homólogo:: <i>aph(3')-IIa</i> , Km <sup>R</sup> )	Este estudio.
GP01/pGL01	<i>P. putida</i> GP01 complementada con el gen homólogo a <i>cls</i> clonado en pBBR1MCS-2 (Gm <sup>R</sup> y Km <sup>R</sup> ).	Este estudio.
GP01/pBBR1MCS-2	<i>P. putida</i> GP01 complementada con pBBR1MCS-2 vacío (Gm <sup>R</sup> y Km <sup>R</sup> ).	Este estudio.
PB01/pPB24	<i>P. putida</i> PB01 complementada con <i>pcs</i> clonado en pBBR1MCS-2 (Gm <sup>R</sup> y Km <sup>R</sup> ).	Este estudio.
PB01/pBBR1MCS-2	<i>P. putida</i> PB01 complementada con pBBR1MCS-2 vacío (Gm <sup>R</sup> y Km <sup>R</sup> ).	Este estudio.
<i>E. coli</i>		
DH5α	Cepa de clonado <i>recA1</i> , Φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> .	Hanahan, 1983.
BL21(DE3)/pLysS	Cepa de clonado para expresión. <i>hsdS</i> <sub>B</sub> ( <i>r</i> <sub>B</sub> <sup>-</sup> <i>m</i> <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) gal λ (DE3) pLysS (Cm <sup>R</sup> ).	Studier <i>et al.</i> , 1990.
<i>E. coli</i> BL21/pTB2559	Cepa llevando el gen <i>pcs</i> de <i>S. meliloti</i> ligado al plásmido de expresión pET9a (Km <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> ).	Sohlenkamp <i>et al.</i> , 2000.
<i>E. coli</i> BL21/pPB03A	Cepa llevando el orf <i>pp0731</i> ligado al plásmido de expresión pET9a (Km <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> ).	Este estudio.
<i>E. coli</i> BL21/pPB04A	Cepa llevando el orf <i>pp4677</i> ligado al plásmido de expresión pET9a (Km <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> ).	Este estudio.
<i>E. coli</i> BL21/pET9a	Cepa llevando el plásmido pET9a vacío (Km <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> ).	Sohlenkamp <i>et al.</i> , 2000.
<i>E. coli</i> BL21/pTB2084	Cepa llevando el gen <i>pmt</i> de <i>S. meliloti</i> ligado al plásmido de expresión pET9a (Cb <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> ).	de Rudder <i>et al.</i> , 2000.
<i>S. meliloti</i>		
1021	SU47, str-21.	Meade <i>et al.</i> , 1982.



**Tabla 3.1:** Continuación.

Plásmidos		
pCR <sup>®</sup> 2.1-TOPO	Vector de clonado (Km <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> ).	Invitrogene
pGem <sup>®</sup> T Easy	Vector de clonado (Amp <sup>R</sup> ).	Promega
pUC18	Vector de clonado (Amp <sup>R</sup> ).	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985.
pK18 <i>mob</i>	Vector de clonado, oriColE1 Mob <sup>+</sup> lacZ <sup>+</sup> (Km <sup>R</sup> ).	Schafer <i>et al.</i> , 1994.
pG18 <i>mob</i>	Vector de clonado, oriColE1 Mob <sup>+</sup> lacZ <sup>+</sup> (Gm <sup>R</sup> ).	Kirchner y Tauch, 2003.
pBBR1MCS-5	Vector de clonado de amplio rango de huésped, Tra <sup>-</sup> Mob <sup>-</sup> (Gm <sup>R</sup> ).	Kobach <i>et al.</i> , 1995.
pBBR1MCS-2	Vector de clonado de amplio rango de huésped, Tra <sup>-</sup> Mob <sup>-</sup> (Km <sup>R</sup> ).	Kobach <i>et al.</i> , 1995.
pET9a	Vector de expresión (Km <sup>R</sup> ).	Studier <i>et al.</i> , 1990.
pKNG101	Vector suicida, Sac <sup>®</sup> Tra <sup>-</sup> Mob <sup>+</sup> oriR6K (Sm <sup>R</sup> ).	Kaniga, <i>et al.</i> , 1991.
pPB03	pCR <sup>®</sup> 2.1-TOPO conteniendo un fragmento de 0,6 Kb correspondiente al <i>orf pp0731</i> de <i>P. putida</i> KT2440 (Km <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> ).	Este estudio.
pPB04	pCR <sup>®</sup> 2.1-TOPO conteniendo un fragmento de 0,8 Kb correspondiente al <i>orf pp4677</i> de <i>P. putida</i> KT2440 (Km <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> ).	Este estudio.
pPB03A	pET9a conteniendo un fragmento de 0,6 Kb correspondiente al <i>orf pp0731</i> de <i>P. putida</i> KT2440, flanqueado por <i>NdeI/BamHI</i> (Km <sup>R</sup> ).	Este estudio.
pPB04A	pET9a conteniendo un fragmento de 0,8 Kb correspondiente al <i>orf pp4677</i> de <i>P. putida</i> KT2440, flanqueado por <i>NdeI/BamHI</i> (Km <sup>R</sup> ).	Este estudio.
pPB05	pCR <sup>®</sup> 2.1-TOPO conteniendo un fragmento de 1,8 Kb correspondiente al gen <i>cls</i> ( <i>pp5364</i> ) de <i>P. putida</i> KT2440 (Km <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> ).	Este estudio.
pPB07	pUC18 conteniendo un fragmento de 1,8 Kb correspondiente al gen <i>cls</i> ( <i>pp5364</i> ) de <i>P. putida</i> KT2440, flanqueado por <i>BamHI/SalI</i> (Amp <sup>R</sup> ).	Este estudio.
pPB08	pUC18 conteniendo un fragmento de 1,8 Kb correspondiente al constructo <i>BamHI-clsΔaacC1-SalI</i> (Amp <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> ).	Este estudio.
pPB09	pKNG101 conteniendo un fragmento de 1,8 Kb correspondiente al constructo <i>BamHI-clsΔaacC1-SalI</i> (Sm <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> ).	Este estudio.
pPB12	pCR <sup>®</sup> 2.1-TOPO conteniendo un fragmento de 1,8 Kb correspondiente al gen de <i>P. putida</i> A ATCC 12633 homólogo a <i>cls</i> (Km <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> ).	Este estudio.
pPB13	pK18 <i>mob</i> conteniendo un fragmento de 0,6 Kb correspondiente al <i>orf pp0731</i> de <i>P. putida</i> KT2440, flanqueado por <i>BamHI/SalI</i> (Km <sup>R</sup> ).	Este estudio.
pPB14	pG18 <i>mob</i> conteniendo un fragmento de 0,8 Kb correspondiente al <i>orf pp4677</i> de <i>P. putida</i> KT2440, flanqueado por <i>BamHI</i> (Gm <sup>R</sup> ).	Este estudio.
pPB15	pK18 <i>mob</i> conteniendo un fragmento de 1,2 kb correspondiente al constructo <i>BamHI-pp0731::aacC1-SalI</i> (Km <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> ).	Este estudio.
pPB16	pG18 <i>mob</i> conteniendo un fragmento de 1,8 kb correspondiente al constructo <i>BamHI-pp4677::aph(3)-Ila-BamHI</i> (Gm <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> ).	Este estudio.
pPB21	pKNG101 conteniendo un fragmento de 1,2 kb correspondiente al constructo <i>BamHI-pp0731::aacC1-SalI</i> (Sm <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> ).	Este estudio.
pPB20	pKNG101 conteniendo un fragmento de 1,8 kb correspondiente al constructo <i>BamHI-pp4677::aph(3)-Ila-BamHI</i> (Sm <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> ).	Este estudio.
pPB22	pGem <sup>®</sup> T Easy conteniendo un fragmento de 0,6 Kb correspondiente al gen de <i>P. putida</i> A ATCC 12633 homólogo al <i>orf pp0731</i> (Amp <sup>R</sup> ).	Este estudio.
pPB23	pGem <sup>®</sup> T Easy conteniendo un fragmento de 0,8 Kb correspondiente al gen de <i>P. putida</i> A ATCC 12633 homólogo al <i>orf pp4677</i> (Amp <sup>R</sup> ).	Este estudio.
pPB24	pBBRCS-2 conteniendo un fragmento de 0,6 Kb correspondiente al gen de <i>P. putida</i> A ATCC 12633 homólogo al <i>orf pp0731</i> , flanqueado por <i>BamHI</i> (Km <sup>R</sup> ).	Este estudio.



### 3.4. Recuento de células viables.

El recuento de unidades formadoras de colonias (ufc), de células de *P. putida* A ATCC 12633 y de sus mutantes derivadas expuestas o no a diferentes situaciones de estrés, se llevó a cabo de acuerdo a la técnica de la microgota (Spencer y Ragout, 2001). Básicamente, se tomaron muestras de 10  $\mu$ l de las condiciones ensayadas y se realizaron diluciones seriadas con buffer fosfato estéril. Cada una de las diluciones obtenidas se sembró en medio LB sólido. Cada placa se dividió en cuatro campos y, en cada uno de ellos, se sembraron tres gotas de 20  $\mu$ l de cada una de las diluciones seriadas. Las placas se incubaron durante 24 hs en estufa, a 30° C y posteriormente se realizó el recuento de ufc.

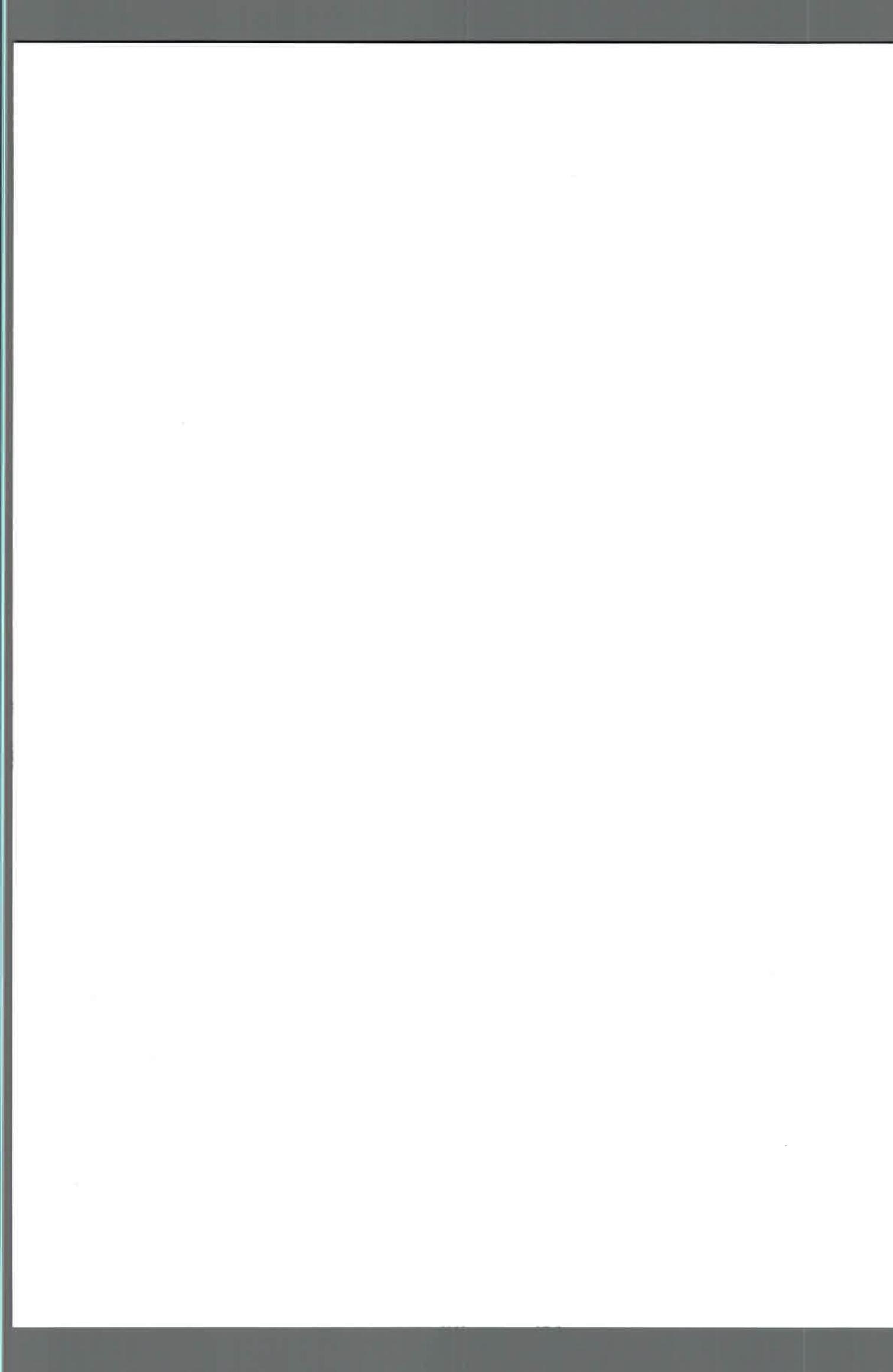
### 3.5. Cinética de muerte.

Las diferentes cepas se hicieron crecer en HPi-BSM con la adición de glucosa y NH<sub>4</sub>Cl hasta final de fase logarítmica (DO<sub>660</sub>=0,8). En ese momento, cada uno de los cultivos se dividió en 3 partes iguales. Una parte, se mantuvo como cultivo control y a los restantes se les adicionó 50 mg/l de TDTMA o 0,1 mM de AlCl<sub>3</sub>. Luego de 15 min de exposición, se tomaron alícuotas de los diferentes cultivos y se realizó al recuento de células viables, como se detalló anteriormente.

### 3.6. Estimulación de células de *P. putida* a TDTMA y a Al<sup>3+</sup>.

Para los ensayos de estimulación con TDTMA, las cepas bacterianas se hicieron crecer en HPi-BSM con la adición de glucosa y NH<sub>4</sub>Cl hasta final de fase exponencial (DO<sub>660</sub>=0,8). En ese momento se expusieron o no a 50 mg/l de TDTMA. 15 min post-exposición al surfactante, el cultivo se cosechó por centrifugación a 8000 rpm por 5 min, y el precipitado obtenido fue sometido a extracción y análisis de fosfolípidos (apartado 3.9).

Para el estímulo con Al<sup>3+</sup>, las cepas bacterianas se hicieron crecer en HPi-BSM con glucosa y NH<sub>4</sub>Cl o con TDTMA como única fuente de C y N hasta final de fase logarítmica (DO<sub>660</sub>=0,8 o 0,4 respectivamente). En ese momento las células fueron expuestas o no a AlCl<sub>3</sub> 0,1 mM, durante periodos variables de tiempo. Posteriormente, el cultivo fue cosechado y procesado para determinar los cambios en la composición fosfolípida (apartado 3.9).



### 3.7. Ensayo de incorporación de [metil-<sup>14</sup>C]-colina en *P. putida* A ATCC12633.

*P. putida* A ATCC 12633 se hizo crecer en HPI-BSM con TDTMA o TDTMA y colina 100  $\mu$ M hasta DO<sub>660</sub> de 0,3. En ese momento se les adicionó 1  $\mu$ Ci/ml de [metil-<sup>14</sup>C]-colina (2,07 Gbq/mmol, New England nuclear). Se tomaron alícuotas de 100  $\mu$ l a los tiempos: 0; 0,5; 4, 8 y 12 hs. De las diferentes alícuotas, 25  $\mu$ l se utilizaron para medir la radiactividad total en contador de centelleo líquido (Beckman LS 60001 C; Fullerton, CA, USA). Los 75  $\mu$ l restantes se centrifugaron 5 min a máxima velocidad. Se tomaron 25  $\mu$ l del sobrenadante y el precipitado, que contiene las células, fue resuspendido en 25  $\mu$ l de agua. En ambas fracciones se determinó la radiactividad en contador de centelleo.

### 3.8. Extracción de polifosfatos (poliP).

La extracción de poliP se llevó a cabo a partir de células de *P. putida* A ATCC 12633 crecidas en HPI-BSM con la adición de glucosa/ NH<sub>4</sub>Cl o TDTMA como única fuente de C y N. Básicamente, 5 ml de cultivo fueron cosechados a 10000 rpm durante 10 min en frío. El precipitado obtenido fue resuspendido en 5 ml de la solución de lavado (NaCl 0,145 M, NaF 1 mM) y centrifugado nuevamente a 10000 rpm durante 10 min a 4°C. El precipitado obtenido se resuspendió en 2,5 ml de solución de NaOCl (NaF 1 mM en NaOCl), se agitó durante 1 h a temperatura ambiente y se centrifugó a 17000 rpm durante 15 min a 4°C. El pellet obtenido fue lavado, en idénticas condiciones a las anteriores, con una solución que contiene: NaCl 1,5 M, NaF 1 mM, EDTA 5 mM, pH 4,6. Por último, el precipitado se lavó con NaCl 0,154 M, pH 7 y se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenadante obtenido fue usado para la determinación de poliP.

La cuantificación de los mismos se llevó a cabo, previa hidrólisis de los poliP, según Fiske y SubbaRow (1925).

Hidrólisis: Se adicionó a un volumen conocido de poliP: HCl 12 N en relación 9:1, se incubó 20 min a 100° C.

### 3.9. Análisis de fosfolípidos (PL).

**3.9.1. Extracción de fosfolípidos:** Se siguió la metodología descrita por Bligh y Dyer (1959). Básicamente, 45 mg de peso seco de células de *P. putida* A ATCC 12633 salvaje o mutantes, crecidas en diferentes condiciones nutricionales según corresponda, fueron resuspendidas en 1 ml de agua bidestilada y 3,75 ml de una solución de cloroformo/metanol (1:2 v/v), se agitó en agitador magnético durante 2 hs a temperatura ambiente y se centrifugó a 8000 rpm durante 15 min. El precipitado obtenido se sometió a una segunda



extracción mediante la adición de 4,75 ml de una mezcla de cloroformo/metanol/HCl 0,2 N (1:2:0,8 v/v), se agitó durante 10 min en vortex y luego se centrifugó a 8000 rpm durante 15 min. El precipitado se descartó. A la mezcla de los sobrenadantes de la primera y segunda extracción se les agregó 2,5 ml de cloroformo y 2,5 ml de agua bidestilada, se agitó en vortex durante 5 min y se centrifugó nuevamente, a baja velocidad, para acelerar la separación de las fases. Se extrajo la fase inferior (clorofórmica) donde se encuentran los PL totales.

Las muestras se secaron bajo atmósfera de nitrógeno y se resuspendieron en un volumen mínimo de cloroformo.

**3.9.2. Cromatografía en placa delgada (TLC):** Los PL se resolvieron por cromatografía en capa delgada (TLC) utilizando placas de sílica gel (Analtech, 200 microns). Los cromatogramas monodireccionales se desarrollaron utilizando como mezcla de solventes: cloroformo/metanol/agua (65:25:4, v/v) (Edman y Ericson, 1987). Cuando fue necesario los PL se resolvieron en cromatogramas bidireccionales, utilizando como mezcla solventes cloroformo/metanol/agua (15:6:1, v/v) para la primera dimensión y cloroformo/metanol/ácido acético glacial (13:5:2, v/v) para la segunda dimensión (de Rudder *et al.*, 1997).

Las cámaras se saturaron con la mezcla de solventes durante 1 h. Las muestras se sembraron en gota a 1 cm de la parte inferior de la placa y se dejaron correr hasta 0,5 cm de la parte superior de la misma.

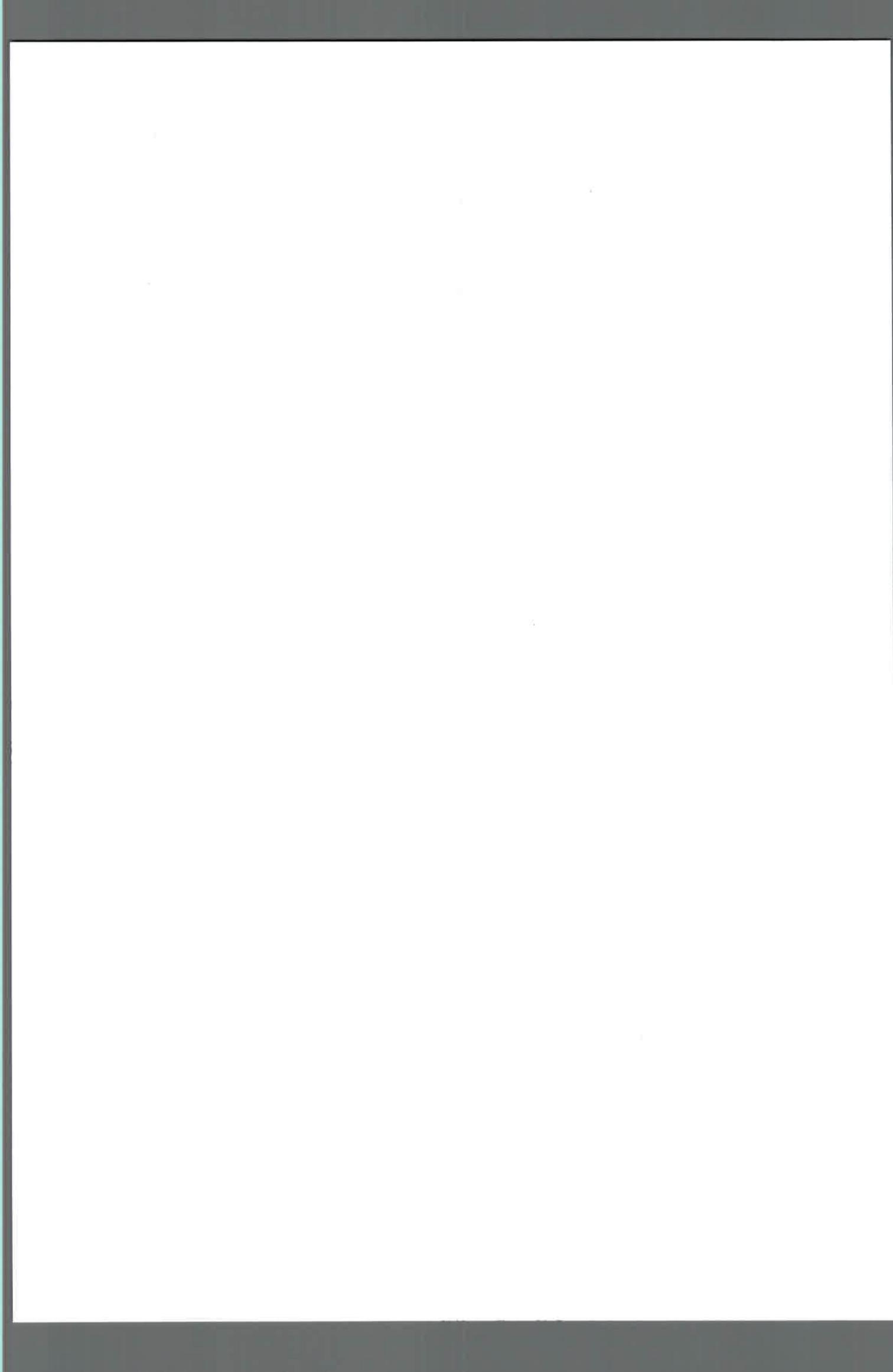
**3.9.3. Revelado de cromatogramas:** El revelado de los cromatogramas se llevó a cabo según las técnicas de tinción que a continuación se detallan. Los PL se identificaron por comparación de sus R<sub>f</sub> con los testigos correspondientes (Sigma Chemical Co., USA).

Tinción con vapores de yodo (Marinetti, 1986): El fundamento de la técnica se basa en la unión transitoria de las moléculas de yodo a los dobles enlaces de las cadenas carbonadas de los ácidos grasos de los PL. La aparición de manchas amarillo-pardo es reacción positiva a la presencia de lípidos.

Las placas se colocaron en atmósfera saturada con vapores de yodo, durante 15 min aproximadamente.

Tinción de ninhidrina (Marinetti, 1986): Los PL que contienen grupos aminos libres dan reacción positiva, la que se visualiza por la aparición de manchas color rosa-violáceo. Una vez pulverizada la placa con la mezcla de reacción, el cromatograma se expone durante 5 a 10 min a 110 °C.

Solución de pulverización: 0,2 % (p/v) de ninhidrina en acetona.



Los PL marcados radiactivamente fueron identificados por autorradiografía, utilizando placas radiográficas (Agfa-Gevaert film, Mortsel, Belsium. Kodak, Medical X-ray film, MXG Plus).

**3.9.4. Cuantificación de PL:** Para muestras no radiactivas la cuantificación de PL se llevó a cabo según Fiske y SubbaRow (1925) con ligeras modificaciones realizadas en el laboratorio. Las fases clorofórmicas obtenidas como se detalló anteriormente (apartado 3.9.1), se secaron bajo atmósfera de nitrógeno, se resuspendieron en un volumen mínimo de cloroformo y fueron utilizadas para la cuantificación de PL totales. Para ello, se tomaron volúmenes conocidos de cada una de las muestras, se secaron en estufa, se les adicionó 100 µl de ácido perclórico (70 %) y se realizó la correspondiente mineralización, a 180° C en placa calefactora durante 20 min bajo campana de extracción de gases. Posteriormente se agregaron 800 µl de agua bidestilada y se agitaron en vortex. Por último se adicionaron 150 µl de solución reductora, preparada en el momento y 150 µl de solución sulfomolibdica y se agitaron nuevamente. Se dejaron reposar 35 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se determinó la absorbancia a 660nm.

Para la cuantificación de PL particulares, se rasparon las áreas identificadas en las cromatoplasmas y se procedió, como se describió anteriormente, a partir del agregado de 100 µl de ácido perclórico.

Las concentraciones de PL totales y particulares se obtuvieron por extrapolación utilizando una curva de calibración realizada previamente.

El material de vidrio utilizado se lavó previamente con agua destilada y bidestilada repetidas veces. Los diferentes reactivos utilizados se prepararon con agua bidestilada.

Preparación de reactivos:

Solución reductora: Pictol 1 % (p/v) y bisulfito de sodio 3 % (p/v).

Solución sulfomolibdica: 25 mg de molibdato de amonio disueltos en 250 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 N, completando volumen final (1 l) con agua bidestilada.

Para PL marcados radiactivamente, la cuantificación se realizó por medio de Phosphor-Imager (Storm 820, Molecular Dynamics), posterior a la exposición de la TLC correspondiente sobre placas sensibles a <sup>14</sup>C. El software integrado del equipo analiza la mancha o spot correspondiente a cada PL y le asigna un valor arbitrario de acuerdo a la intensidad del spot. Cuando fue necesario, los diferentes PL identificados, fueron extraídos desde la sílica, resuspendidos en 2 ml de líquido centelleo (Hisafe 2, PerkinElmer) y cuantificados en contador de centelleo líquido (Beckman LS 60001 C; Fullerton, CA, USA).

**3.9.5. Obtención de PL marcados radiactivamente:** Células de *P. putida* A ATCC 12366, sus mutantes derivadas y diferentes cepas de *E. coli* (Tabla 3.1), fueron crecidas en medio rico LB hasta alcanzar una turbidez de 0,2-0,3 determinada por absorbancia a 660 nm. En ese momento, se tomaron alícuotas de 1 ml de cada uno de ellos y se les adicionó 1  $\mu\text{Ci/ml}$  de [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]-acetato (60 mCi/mmol, 2,26 Gbq/mmol, New England Nuclear) o 1  $\mu\text{Ci/ml}$  de [metil- $^{14}\text{C}$ ]-colina (55 mCi/mmol, 2,07 Gbq/mmol, New England Nuclear), según corresponda (de Rudder *et al.*, 1997, Sohlenkamp *et al.*, 2000). Los cultivos se incubaron durante 2 hs y se procedió a la extracción, identificación y cuantificación de PL según lo descrito anteriormente (apartado 3.9).

**3.9.6. Análisis y cuantificación de PL por HPLC:** La identificación y cuantificación de PL se llevó a cabo por cromatografía líquida de alta precisión (HPLC) (Water 1525 binary HPLC pump), acoplada a un detector UV (Varian 2550 variable  $\lambda$  detector), siguiendo, básicamente, la metodología descrita por Carelli *et al.*, (1997) con ligeras modificaciones realizadas en nuestro laboratorio. La separación de los diferentes PL se llevó a cabo a temperatura ambiente, utilizando una columna de sílica gel (Beckman Ultrasil) de 4,6 mm x 25 cm (10  $\mu\text{m}$ ). Los PL fueron eluidos utilizando como fase móvil hexano:iso-propanol:buffer acetato 25 mM pH 5.8 (7:8:1 v/v), a un flujo de 2 ml/min y detectados a 206 nm. Los PL estándares y las muestras fueron resuspendidas en fase móvil y se inyectaron 20  $\mu\text{l}$ . La determinación cuantitativa de los PL se realizó en base a curvas de calibración previamente realizadas con los estándares correspondientes.

### 3.10. Determinación de proteínas.

La concentración de proteínas fue determinada por el método de Dulley y Grieve (1975) o por el método de Bradford (1976). En ambos casos se utilizó albúmina de suero bovino como estándar.

### 3.11. Determinación de actividades enzimáticas.

#### 3.11.1. Fosfatidilcolina sintasa (PCS):

Obtención de extractos libres de células: Las diferentes cepas de *P. putida* o *E. coli* BL21 fueron crecidas en medio rico LB o en HPI-BSM con la adición de glucosa y  $\text{NH}_4\text{Cl}$  o TDTMA como única fuente de C y N hasta final de fase exponencial. Cuando fue necesario, *P. putida* A ATCC 12633 fue expuesta, o no, durante cortos períodos de tiempo a  $\text{Al}^{+3}$ . Las células fueron cosechadas (8000 rpm, 10 min), lavadas, resuspendidas en buffer Tris-HCl 20 mM pH 8 y sonicadas (3 ciclos de 1 min a 20000 Mhz). Posteriormente las muestras fueron



centrifugadas a 20000 rpm durante 30 min y el sobrenadante obtenido fue usado como fuente enzimática. Cuando fue necesario los extractos libres de células, provenientes de *P. putida* A ATCC 12633 expuesta al  $Al^{3+}$ , fueron dializados a 4°C contra buffer HCl-Tris 10 mM, pH 8.

**Determinación enzimática:** La determinación de la actividad PCS se llevó a cabo según describen Sohlenkamp *et al.*, (2000). La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 50  $\mu$ l, 1 mg/ml de proteínas, buffer Tris-HCl 50 mM pH 8,  $MnCl_2$  10 mM, CDP-diacilglicerol (CDP-DAG) 343  $\mu$ M, tritón X-100 0,2 % (p/v) y [metil- $^{14}C$ ]-colina 100  $\mu$ M (55 mCi/mmol) o colina 100  $\mu$ M. La reacción se inició con la adición de colina. Luego de 15 ó 60 min de incubación a 30°C en baño de agua, la reacción se detuvo por el agregado de 188  $\mu$ l de metanol/cloroformo (2:1 v/v). A continuación se adicionó 63  $\mu$ l de cloroformo y 63  $\mu$ l de agua, se agitó vigorosamente en vortex y se extrajo la fase inferior (clorofórmica). Esta fase se sometió a un segundo paso de lavado con 100  $\mu$ l de agua. La fase clorofórmica obtenida finalmente se secó bajo atmósfera de nitrógeno y el producto de reacción, PC, fue identificado por cromatografía en capa delgada monodireccional, desarrollada en: n-propanol:ácido propiónico:cloroformo:H<sub>2</sub>O (3:2:2:1, v/v) (Higgins, 1987).

En muestras no radiactivas, PC, fue detectado por HPLC, según lo descrito en (apartado 3.9.6).

### 3.11.2. Fosfolípido *N*-metiltransferasa (PMT):

**Obtención de extractos libres de células:** la obtención de extractos enzimáticos se llevó a cabo a partir de células de *P. putida* A ATCC 12633, *P. putida* KT2440 y *E. coli* BL21/pTB2084 (Tabla 3.1) crecidas en medio rico LB hasta final de fase exponencial. Las células fueron cosechadas (8000 rpm, 10 min), lavadas, resuspendidas en buffer Tris-HCl 100  $\mu$ M pH 9,5 y sonicadas (3 ciclos de 1 min a 20000 Mhz). Las muestras sonicadas fueron centrifugadas (20000 rpm, 30 min) y el sobrenadante obtenido fue usado como fuente enzimática.

**Determinación enzimática:** Para la determinación de la actividad PMT se siguió la metodología descrita en de Rudder *et al.*, (1997). La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 180  $\mu$ l, 0,8 mg prot/ml, 125 nCi [metil- $^{14}C$ ]-SAM (S-adenosil metionina) y buffer Tris-HCl 100  $\mu$ M pH 9,5. La mezcla se incubó durante 15 min a 30°C en baño de agua. La reacción se detuvo por el agregado de 180  $\mu$ l de ácido tricloroacético (TCA) frío 20 % (p/v), se incubó 10 min en hielo para favorecer la precipitación y se centrifugó 5 min a 8000 rpm. El precipitado obtenido fue disuelto en 60  $\mu$ l de Tris base 1 M y neutralizado por el agregado de 40  $\mu$ l de TCA 20 % (p/v). La extracción de PL se llevó a cabo según Bligh y



Dyer (1959), la fase clorofórmica obtenida se secó bajo atmósfera de nitrógeno y los productos de la reacción: monometilfosfatidiletanolamina (MMPE), dimetilfosfatidiletanolamina (DMPE) o PC, fueron identificados por cromatografía en capa delgada monodireccional, desarrollada en: *n*-propanol:ácido propiónico:cloroformo:H<sub>2</sub>O (3:2:2:1 v/v) (Higgins, 1987).

### 3.11.3. Fosfolipasa D (PLD):

Obtención de extractos libres de células: Se utilizaron como fuentes enzimáticas extractos obtenidos a partir de células *P. putida* A ATCC 12366, *P. putida* GP01 y *P. putida* GP01/pGL01 (Tabla 3.1) crecidas en HPi-BSM con la adición de glucosa y NH<sub>4</sub>Cl hasta final de fase exponencial. Las células fueron cosechadas (8000 rpm, 10 min), lavadas, resuspendidas en solución fisiológica y sonicadas (3 ciclos de 1 min a 20000 Mhz). Los extractos obtenidos fueron centrifugados a 20000 rpm durante 30 min y los sobrenadantes usados como fuente enzimática.

Determinación enzimática: La determinación de la actividad PLD se llevó a cabo según describen Cole y Proulx (1975), con ligeras modificaciones realizadas en nuestro laboratorio. Básicamente, la mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 500 µl, 2 mg/ml de proteínas, buffer fosfato de sodio 0,1 M pH 7, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, ATP 2,8 mM, cardiolipina 1 µM (Sigma Chemical Co., USA). La reacción se inició con la adición de cardiolipina. Luego de 60 min de incubación a 30°C en agitación, la reacción se detuvo por el agregado de 1,75 ml de metanol/cloroformo (2:1 v/v). La extracción de PL se llevó a cabo según Bligh y Dyer (1959) (apartado 2.9.1), la fase clorofórmica obtenida se secó bajo atmósfera de nitrógeno y los productos de la reacción: PG o PA, fueron identificados por cromatografía en capa delgada monodireccional, desarrollada en: cloroformo:metanol:H<sub>2</sub>O (65:25:4) (Edman y Ericson, 1987). La cuantificación de los diferentes PL identificados se llevó a cabo según Fiske y SubbaRow (1925) (apartado 3.9.4).

Para la determinación de actividad PLD *in vivo*, se utilizó la propiedad particular de la PLD de transfosfatidilar 1-butanol u etanol. Para ello, células de *P. putida* A ATCC 12633 crecidas en HPi-BSM con glucosa y NH<sub>4</sub>Cl hasta final de fase logarítmica, fueron cosechadas, lavadas y resuspendidas en 1 ml de solución fisiológica e incubadas, durante 2 hs, con [<sup>32</sup>P]-Pi (AE=100 µCi / 250 mg de peso húmedo). Posteriormente se adicionó etanol al 1 % durante 5 min. Pasado este tiempo, las células fueron estimuladas con TDTMA durante 5 y 15 min. La reacción se detuvo por el agregado de 3,75 ml de cloroformo/metanol (1:2, v/v). Los lípidos fueron extraídos, el fosfatidilalcohol fue separado por cromatografía en TLC, utilizando como sistemas de solvente acetato de etilo/*iso*-octano/ácido acético/agua

(12:2:3:10 v/v), detectado por autorradiografía, extraído de la sílica y determinado en contador de centelleo líquido (Beckman LS 60001, Fullerton, CA. USA) (apartado 3.9.4).

### 3.12. Detección de $Al^{+3}$ en extractos libres de células y en membranas celulares.

La detección de  $Al^{+3}$  se llevó a cabo usando el fluorocromo 2',3,4',5,7-pentahidroxiflavona (reactivo de Morin, Sigma Chemical Co., USA). Este fluorocromo tiene la particularidad de unirse al aluminio, formando un complejo  $Al^{+3}$ -Morin fluorescente (Browne *et al.*, 1990). Básicamente, alícuotas de los extractos libres de células dializados o no, provenientes de células de *P. putida* A ATCC 12633, *P. putida* PB01 y *P. putida* PB01/pPB24 (Tabla 3.1) y obtenidos según se describe en (apartado 3.11.1), fueron incubados con 0,3 mM de Morin por 30 min. La fluorescencia del complejo  $Al^{+3}$ -Morin se determinó por espectrofluorometría (Fluoromax-3 spectrophotometer (Jobin Yvon Inc)) utilizando longitudes de onda de excitación y emisión de 440 y 520, respectivamente (Liffourrena *et al.*, 2008). La concentración de  $Al^{+3}$  se determinó en base a curvas de calibración previamente realizadas.

Para la detección de  $Al^{+3}$  unido a la membrana celular, las diferentes cepas se hicieron crecer en HPI-BSM con la adición de TDTMA como única fuente de C y N o en medio rico LB y fueron expuestas o no a 0,1 mM de  $AlCl_3$  durante 15 min. En todos los casos, las células fueron cosechadas (8000 rpm, 10 min), lavadas y resuspendidas en solución fisiológica a una  $DO_{660}$  aproximadamente de 0,4. Las células, fueron inmovilizadas en portaobjetos por la adición de una mezcla de metanol:acetona (1:1 v/v) fría e incubadas durante 20 min a  $-20\text{ }^{\circ}C$ . Las células inmovilizadas, fueron tratadas con  $Al^{+3}$  10  $\mu M$  y Morin 10  $\mu M$ , para favorecer la formación del complejo. Posteriormente fueron lavadas para eliminar el excedente de  $Al^{+3}$  y el fluorocromo no unido. Los preparados fueron analizados en microscopio de epifluorescencia (Axiolab Zeiss®).

### 3.13. Tinción de células con 10 N-nonil naranja de acridina (NAO).

La visualización de cardiolipina (CL) en membranas de células de *P. putida* A ATCC 12633 y de *P. putida* GP01 (Tabla 3.1) se llevó a cabo utilizando el colorante fluorescente NAO. Este colorante tiene la particularidad de unirse al grupo polar de fosfolípidos aniónicos y es utilizado para visualizar la localización de CL en las membranas debido a que la afinidad por este PL es mucho mayor que la afinidad a otros PL monoacídicos (Mileykovskaya *et al.*, 2001). Básicamente, células de *P. putida* A ATCC 12633 y *P. putida* GP01 se hicieron crecer en medio HPI-BSM suplementado con glucosa y  $NH_4Cl$  o con

TDTMA como única fuente de C y N hasta final de fase exponencial ( $DO_{660}=0,8$  y  $DO_{660}=0,4$ , respectivamente). Los cultivos fueron diluidos hasta alcanzar una  $DO_{660}=0,2$ . En ese momento se les adicionó NAO (preparado en etanol en el momento de usar) a una concentración final de 200 nM. Luego de 1 h de incubación en oscuridad y a temperatura ambiente, las células fueron fijadas por calor en portaobjetos y visualizadas en microscopio de fluorescencia (Axiovert 135; Zeiss, Germany, equipado con cámara AxioCam; excitación: 450-490 nm, emisión 515-570 nm).

### 3.14. Microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Células de *P. putida* A ATCC 12633 crecidas en medio HPI-BSM con la adición de glucosa y  $NH_4Cl$  o TDTMA como única fuente de C y N hasta final de fase logarítmica fueron examinadas por TEM. Para ello, las células fueron fijadas durante 3 hs a  $4^\circ C$  con una solución de glutaraldehído 2,5 %, lavadas con buffer S-collidine, refijadas durante 1 h a temperatura ambiente con tetróxido de osmio al 1 % y lavadas nuevamente con el mismo buffer. La deshidratación se llevó a cabo a través de pasajes sucesivos en concentraciones crecientes de acetona. La preinclusión se realizó en resina epoxi EMbed 812 1:1 en acetona 100 %, durante toda la noche a temperatura ambiente y la inclusión con EMbed 812 a  $56^\circ C$ , durante 48 hs. Se obtuvieron cortes ultrafinos (20-60 nm), los que se contrastaron con acetato de uranilo durante 30 min y con citrato de plomo durante 8 min. La observación de la ultraestructura bacteriana se realizó a través de un microscopio electrónico de transmisión Elmiskop 101 (Siemens) y la adquisición de imágenes mediante microscopio electrónico de transmisión LEO (Carl Zeiss). Todos los reactivos utilizados fueron de Electron Microscopy Science.

### 3.15. Manipulación de ADN.

Las extracciones de ADN, preparación de plásmidos, clonado, cortes con enzimas de restricción, electroforesis de ADN, PCR, PCR de colonia, preparación de células competentes con cloruro de rubidio, transformación de *E. coli* y demás técnicas moleculares se realizaron según se describe en (Sambrook *et al.*, 1989, Ausubel *et al.*, 1992, Sambrook y Russel, 2001).

El aislamiento de ADN genómico se llevó a cabo utilizando QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN) a partir de células de *P. putida* A ATCC 12633 o *P. putida* KT2440 crecidas en medio rico LB a una  $DO_{660}=0,8$ . El ADN extraído fue cuantificado espectrofotométricamente según Sambrook *et al.*, (1989).

Los plásmidos fueron aislados desde las cepas de *E. coli* portadoras de los mismos por el método de lisis alcalina (Sambrook *et al.*, 1989). Cuando fue necesario, los plásmidos fueron extraídos utilizando GeneJET™ Plasmid, Minipreps Kit (Fermentas), de acuerdo a las especificación del fabricante.

La purificación de productos de PCR y de productos de los diferentes cortes por restricción se llevó a cabo utilizando Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (Fermentas), de acuerdo a las especificación del fabricante.

**Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR):** La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 50 µl: ADN 30-50 ngr, oligonucleótidos 30 pmoles/µl (0,6 µM), MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, mix de desoxinucleótidos trifosfato 200 µM, Buffer Polimerasa 1X, DMSO 5 % (importante en PCRs a partir de ADN genómico de *P. putida* rico en C+G). ADN *Taq* polimerasa (Promega) o PFU ADN Polimerasa (Productos Bio-Lógicos) 5 Unidades/µl. En todos los casos el volumen final de reacción se completó con la adición de agua deionizada bidestilada estéril. Los ciclos de PCR utilizados se detallan a continuación:

1) 95° C, 5 min (desnaturalización).

2) 30 ciclos: 95° C, 1 min (desnaturalización).

30,5-60° C, 30 s (T<sub>m</sub>, dependiendo del fragmento a analizar, ver abajo\*).

72° C, 1 min/Kb para *Taq* polimerasa o 2 min/Kb para PFU ADN Polimerasa

(Temperatura de síntesis, de acuerdo al tamaño del fragmento a amplificar y de la enzima polimerasa usada).

3) 72° C (extensión final).

\* 60° C: para *orf pp5364 (cls)* de *P. putida* KT2440 y su homólogo en *P. putida* A ATCC 12633.

63° C: para *orf pp0731* de *P. putida* KT2440 y su homólogo en *P. putida* A ATCC 12633.

62° C: para *orf pp4677* de *P. putida* KT2440 y su homólogo en *P. putida* A ATCC 12633.

58° C: para gen de resistencia a Km (*aph(3')-IIa*).

30,5° C: para gen de resistencia a Gm (*aacC1*).

**Electroforesis de ADN:** Las muestras de ADN (genómico, plasmídico, productos de PCR, producto de restricciones y otros) se analizaron sobre geles de agarosa al 0,8-1,2 % (p/v). Para ello, a una alícuota de la muestra del ADN de interés se le adicionó Loading buffer (Azul de bromofenol 0,25 %, Glicerol 30 %) en relación 3:1 v/v y se depositó en los pocillos del gel previamente sumergido en una cuba con buffer TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8). La electroforesis horizontal de ADN se realizó a 100-120 voltios durante 20-30 min y las bandas se visualizaron por exposición del gel a luz ultravioleta (260nm). El tamaño



de los fragmentos se determinó utilizando como patrón ADN del fago lambda previamente digerido con las enzimas de restricción *EcoRI* / *HindIII* (Sambrook y Russel, 2001) o marcadores de peso molecular comerciales de 1 Kb Ladder (Promega) y de 100 pb Ladder (Productos Bio-Lógicos).

Los oligonucleótidos diseñados en este estudio se detallan en la **Tabla 3.2**.

**Tabla 3.2:** Oligonucleótidos usados en este estudio.

Oligonucleótidos	Secuencias (5'-3'), características relevantes
UpCIs4	<b>CgCggATCCgTTgCAgCATCTgggCTTgTACCAgTgg</b> , localizado a 202 pb corriente arriba del gen <i>cls</i> ( <i>pp5364</i> ) Sitio adicionado para <i>BamHI</i> .
DownCIs4	<b>ACgCgTCgACTgAgAagACCCTgCggATCTggCgTTTgT</b> , localizado a 237 pb corriente abajo del gen <i>cls</i> ( <i>pp5364</i> ). Sitio adicionado para <i>SaI</i> .
oLOP731F	<b>AggAATACATATgCCCACATTggCgCgTgTg</b> , localizado al inicio del <i>orf pp0731</i> de <i>P. putida</i> KT2440. Sitio adicionado para <i>NdeI</i> , solapando al codón de inicio.
oLop731R	<b>AAAggATCCTTACCaggATgAAAgTAAATAgTg</b> , localizado después del codón stop del <i>orf pp0731</i> de <i>P. putida</i> KT2440. Sitio adicionado para <i>BamHI</i> .
oLOP4677F	<b>AggAATACATATgAgCgAACgTCCCgAagAg</b> , localizado al inicio del <i>orf pp4677</i> de <i>P. putida</i> KT2440. Sitio adicionado para <i>NdeI</i> , solapando al codón de inicio.
oLop4677R	<b>AAAggATCCTCACgCTTTgCgACggCgCg</b> , localizado después del codón stop del <i>orf pp4677</i> de <i>P. putida</i> KT2440. Sitio adicionado para <i>BamHI</i> .
oLPB19-0731	<b>CgCggATCCATgCCCACATTggCgCgTgTg</b> , localizado al inicio del <i>orf pp0731</i> de <i>P. putida</i> KT2440. Sitio adicionado para <i>BamHI</i> .
oLPB20-0731	<b>ACgCgTCgACTTACCaggATgAAAgTAAATAgTg</b> , localizado después del codón stop del <i>orf pp0731</i> de <i>P. putida</i> KT2440. Sitio adicionado para <i>SaI</i> .
oLPB21-4677	<b>CgCggATCCATgAgCgAACgTCCCgAagAg</b> , localizado al inicio del <i>orf pp4677</i> de <i>P. putida</i> KT2440. Sitio adicionado para <i>BamHI</i> .
oLPB22-4677	<b>CgCggATCCTCACgCTTTgCgACggCgCg</b> , localizado después del codón stop del <i>orf pp4677</i> de <i>P. putida</i> KT2440. Sitio adicionado para <i>BamHI</i> .
oLGL01	<b>ACgCgTCgACTgTACTCggCAAgCAggAT</b> , localizado a 18 pb corriente arriba del gen homólogo a <i>cls</i> ( <i>pp5364</i> ) Sitio adicionado para <i>SaI</i> .
oLGV02	<b>CgCggATCCgggAagATTTgTACCgCTgA</b> , localizado a 73 pb corriente abajo del gen homólogo a <i>cls</i> ( <i>pp5364</i> ). Sitio adicionado para <i>BamHI</i> .
UpGm	<b>gggTCCATggCgATgTTTgATgT</b> , localizado al inicio del gen de resistencia a Gm ( <i>aacC1</i> ) de pBBR1MCS-5. Sitio adicionado para <i>NcoI</i> .
DownGm	<b>ATCTggCCTgCggCTTgAACgAA</b> , localizado al final del gen de resistencia a Gm ( <i>aacC1</i> ) de pBBR1MCS-5. Sitio adicionado para <i>StuI</i> .
oLPB11-upGm	<b>gggTTCTAgACgATgTTTgATgT</b> , localizado al inicio del gen de resistencia a Gm ( <i>aacC1</i> ) de pPBBRMCS-5. Sitio adicionado para <i>XbaI</i> .
oLPB12-dnGm	<b>ATCTATCTAgACggCTTgAACgAA</b> , localizado al final del gen de resistencia a Gm ( <i>aacC1</i> ) de pPBBRMCS-5. Sitio adicionado para <i>XbaI</i> .
oLPB17-upKm	<b>CATgCCATggCTgCAgACgCTCAgTggAACgAAAAC</b> , localizado al inicio del gen de resistencia a Km ( <i>aph(3')-IIa</i> ) de pET9a. Sitio adicionado para <i>NcoI</i> .
oLPB18-dnKm	<b>CATgCCATggCTgCAgTCATATCACggTgCCTgACTg</b> localizado al final del gen de resistencia a Km ( <i>aph(3')-IIa</i> ) de pET9a. Sitio adicionado para <i>NcoI</i> .

Los sitios de restricción adicionados a los oligonucleótidos se encuentran indicados en **negrita**.

Los oligonucleótidos o “primers” se diseñaron a partir del banco de datos de la secuencia completa de *P. putida* KT2440 ([www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com)), utilizando el programa Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). Cuando fue necesario, los oligonucleótidos se diseñaron teniendo en cuenta los parámetros descritos en Sambrook y Russell, (2001) (contenido de G + C entre el 50-60 %, longitud de 17 a 25 nucleótidos, ausencia de secuencias repetidas y complementarias inter e intraoligonucleótidos, diferencia de no más de 5°C entre la T<sub>m</sub> de cada uno de los miembros del par, etc). Una vez especificados todos los parámetros, se utilizó el software Vector NTI, disponible en [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com), para seleccionar los primers adecuados. En el caso de requerirse, los oligonucleótidos fueron modificados agregando sitios de corte para enzimas de restricción, por simple adición de la secuencia palindrómica de la enzima requerida en el extremo 5' del primer, ó, de ser posible, introduciendo cambios en la secuencia del primer para lograr igualar la secuencia a aquella reconocida por la enzima a emplear. Los primers elegidos fueron sintetizados por IDT (integrated ADN Technologies, Invitrogene).

### 3.16. Ligación de fragmentos de ADN a vectores.

Siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante (Promega), las ligaciones se realizaron utilizando una relación inserto:vector (radio molar) de 1:1. Se utilizó 0,5 U de T<sub>4</sub> ADN ligasa (Promega) en un volumen final de 20 µl.

### 3.17. Preparación de células competentes de *E. coli*.

La preparación de células ultracompetentes se llevó a cabo por el método de Cloruro de Rubidio (Current Protocols in Molecular Biology, Jon Wiley & Sons, Inc.). Básicamente, a partir de una colonia aislada se realizó un inóculo, el cual se cultivó toda la noche a 37 °C en 5 ml de medio LB líquido. Una alícuota de 1 ml de inóculo se transfirió a 25 ml de medio LB líquido, y se cultivó con agitación vigorosa (200-250 rpm) a 37 °C hasta alcanzar una DO<sub>620</sub> máxima de 0,3. El cultivo se incubó en hielo 10 min y se transfirió a tubos de centrifuga de volumen apropiado. Se centrifugó 10 min a 8000 rpm en frío. El precipitado se resuspendió en 8 ml de buffer 1 frío (Cloruro de rubidio 12 gr/l, MnCl<sub>2</sub> 9,9 gr/l, acetato de potasio 1 M pH 7.5 30 ml/l, CaCl<sub>2</sub> (2H<sub>2</sub>O) 1,5 gr/l, glicerol 150 ml/l, ajustado a pH 5.8 con ácido acético 0,2 M, esterilizado por filtración) y se incubó en hielo durante 10 min. La suspensión se centrifugó nuevamente como se describió, y el pellet se resuspendió en 2 ml de buffer 2 (MOPs 0,5 M pH 6,8 20 ml/l, cloruro de rubidio 1,2 gr/l, CaCl<sub>2</sub> (2H<sub>2</sub>O) 11 gr/l, glicerol 150 ml/l, esterilizado por filtración). Las células competentes obtenidas se almacenaron en glicerol hasta su utilización en alícuotas de 100 µl a - 80° C.

### 3.18. Transformación de *E. coli*.

Una alícuota de células competentes de *E. coli* se descongeló en hielo. Se agregaron 10-20 µl de la mezcla de ligación y se mantuvo en hielo durante 30 min. Posteriormente se realizó un shock térmico a 42° C durante 1 min. Luego de mantener la mezcla durante 5 min en hielo, se le agregó 750µl de medio LB y se incubó a 37° C durante 60 min con agitación constante. La mezcla fue fraccionada y sembrada en placas suplementadas con los antibióticos apropiados (Sambrook y Russel, 2001).

### 3.19. Búsqueda, clonación y secuenciamiento de genes de interés.

En este trabajo, se analizaron básicamente, genes relacionados a la biosíntesis de PL en *P. putida* A ATCC 12633 y en *P. putida* KT2440. Particularmente aquellos genes involucrados la síntesis de PC y CL. A continuación se detalla la búsqueda y selección de posibles candidatos.

#### 3.19.1. Genes homólogos a fosfatidilcolina sintasa (*pcs*) en *P. putida*.

A partir de la secuencia de aminoácidos de PCS de *Sinorhizobium meliloti* (AAL53937) (Sohlenkamp *et al.*, 2000) se realizó una búsqueda en la base de datos provista por NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) en el genoma de la cepa de referencia secuenciada, *P. putida* KT2440. A continuación, las secuencias de aminoácidos de diferentes ORFs fueron alineadas usando el programa ClustalW (<http://align.genome.jp/>) y se seleccionaron dos posibles candidatos: *pp0731* y *pp4677*.

Utilizando ADN genómico de *P. putida* KT2440 y a partir de los pares de oligonucleótidos oLOP731F / oLOP731R y oLOP4677F / oLOP4677R (**Tabla 3.2**), se amplificaron por PCR los fragmentos correspondientes a los *orfs pp0731* (aproximadamente 0,6 Kb) y *pp4677* (aproximadamente 0,8 Kb). Los productos de PCR, *pp0731* y *pp4677*, fueron ligados al vector de clonado pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO (**Tabla 3.1**), originando los plásmidos pPB03 y pPB04 (**Tabla 3.1**), respectivamente. pPB03 y pPB04, se enviaron a Eurofins (Alemania) para la correspondiente secuenciación.

Posteriormente y a partir de los oligonucleótidos oLPB19-0731 y oLPB20-0731 (**Tabla 3.2**) se amplificó un fragmento de aproximadamente 0,6 Kb desde ADN genómico de *P. putida* A ATCC 12633, correspondiente al gen homólogo al *orf pp0731*. El fragmento fue ligado al vector de clonado pGem<sup>®</sup>T Easy (**Tabla 3.1**) originando el plásmido pPB22 (**Tabla 3.1**). De manera semejante, utilizando ADN genómico de *P. putida* A ATCC 12633 y a partir de los oligonucleótidos oLPB21-4677 y oLPB22-4677 (**Tabla 3.2**) se amplificó el fragmento

correspondiente al gen homólogo al *orf pp4677* (aproximadamente 0,8 Kb). El mismo fue ligado a pGem<sup>®</sup>T Easy (**Tabla 3.1**), generando el plásmido pPB23 (**Tabla 3.1**). pPB22 y pPB23, se enviaron a MacroGen (Korea) para el correspondiente secuenciamiento.

### 3.19.2. Gen homólogo a *cardiolipina sintasa (cls)* en *P. putida*.

Se conoce que el gen *pp5364 (cls)* es el principal responsable de la síntesis de CL en *P. putida* KT2440 (<http://www.tigr.org/tigr-scripts/CMR2/GenomePage3>, Nelson *et al.*, 2002). Si bien en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), *pp5364* se encuentra anotado como *cls* por similitud de secuencia (Nelson *et al.*, 2002), existen evidencias bibliográficas donde ha sido demostrado que mutantes de *P. putida* P8 y *P. putida* DOT-T1 afectadas en el gen homólogo a *pp5364*, carecen de CL en su membrana (von Wallbrunn *et al.*, 2002, Bernal *et al.*, 2007). Basados en estos antecedentes y a partir de la secuencia de nucleótidos correspondientes a *pp5364 (cls)* se diseñaron los oligonucleótidos necesarios para la amplificación de este gen.

A partir de los oligonucleótidos UpCls4 y DownCls4 (**Tabla 3.2**), se amplificó un fragmento de aproximadamente 1,8 Kb a partir del genoma de *P. putida* KT2440 correspondiente a *cls*. El fragmento fue ligado al vector de clonado pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO (**Tabla 3.1**), originando el plásmido pPB05 (**Tabla 3.1**). De manera semejante, los oligonucleótidos UpCls4 y DownCls4 (**Tabla 3.2**) fueron usados para la amplificación de un fragmento de 1,8 Kb a partir de ADN genómico de *P. putida* A ATCC 12633. El fragmento obtenido, correspondiente al gen homólogo a *cls*, fue ligado a pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO (**Tabla 3.1**), generando el plásmido pPB12 (**Tabla 3.1**). Posteriormente, pPB05 y pPB12 se enviaron a MacroGen (Korea) para el correspondiente secuenciamiento.

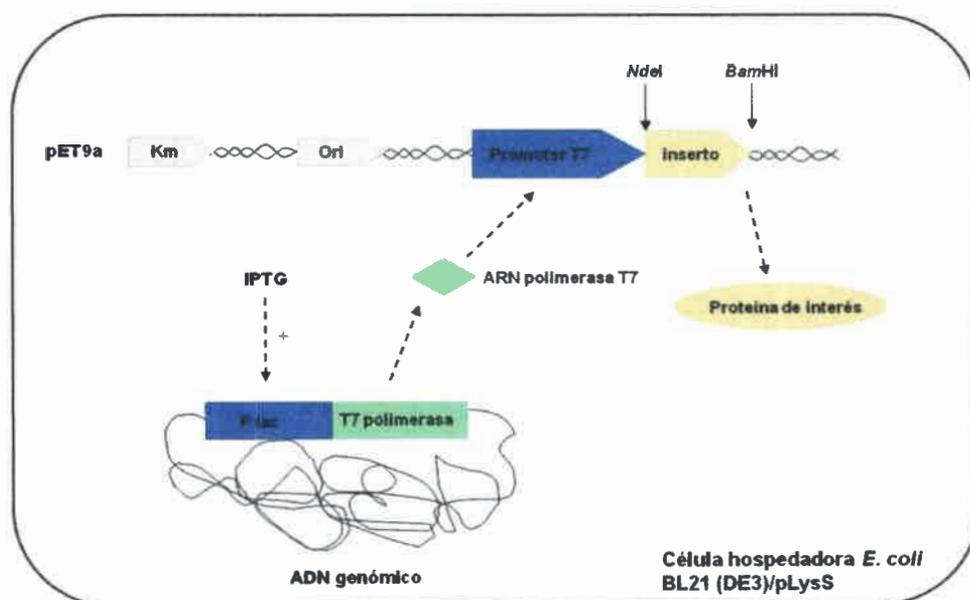
En todos los casos, la selección de células de *E. coli* portadoras de los plásmidos de interés se llevó a cabo utilizando placas de LB conteniendo 50 µg/ml de Km o 150 µg/ml de Amp, 7 µl de solución stock (20 %) de isopropilo-β-D tiogalactosido (IPTG) y 40 µl de X-Gal. Se seleccionaron las colonias blancas, las que fueron sometidas a extracción de plásmidos y posterior mapeo de los mismos por restricción.

### 3.20. Expresión de PP0731 y PP4677.

La expresión de los ORFs PP0731 y PP4677 se llevó a cabo en el huésped heterólogo carente de PC, *E. coli* BL21(DE3)/pLysS (**Tabla 3.1**). Para ello, los plásmidos pPB03 y pPB04 (**Tabla 3.1**) fueron digeridos con *NdeI* y *BamHI*. Los fragmentos obtenidos correspondientes a los *orfs pp0731* y *pp4677* fueron purificados, ligados y subclonados en el

vector de expresión pET9a (Tabla 3.1), previamente digerido con las mismas enzimas de restricción, obteniendo los plásmidos pPB03A y pPB04A (Tabla 3.1). De esta manera la expresión de los genes a analizar quedan bajo la expresión de promotor T7. Células competentes de *E. coli* BL21(DE3)/pLysS, en la cual la expresión de la polimerasa T7 se encuentra bajo el control del promotor inducible LacZ, fueron transformadas con pPB03A y pPB04A, originando las cepas *E. coli* BL21/pPB03A y *E. coli* BL21/pPB04A (Tabla 3.1), respectivamente.

Para los ensayos de expresión, básicamente células de *E. coli* BL21/pTB3559, *E. coli* BL21/pET9a (Sohlenkamp *et al.*, 2000), *E. coli* BL21/pPB03A y *E. coli* BL21/pPB04A (Tabla 3.1) se hicieron crecer en medio rico LB con la adición de 50 µg/ml de Km y 20 µg/ml de Cm, hasta una DO<sub>620</sub> de 0,3. En ese momento se tomaron alícuotas de 1 ml de cada uno de los cultivos y se les adicionó IPTG 200 µM y 1 µCi de [1-<sup>14</sup>C]-acetato. Luego de 2 hs de inducción, las células fueron cosechadas y los PL extraídos y analizados como se describe en (apartado 3.9). La Figura 3.1 esquematiza el sistema de expresión utilizado.



**Figura 3.1:** Esquema del sistema de expresión usado, pET9a-*E. coli* BL21 (DE3)/pLysS.

### 3.21. Mutagénesis de genes homólogos a *pcs* y a *cls* en *P. putida* A ATCC 12633.

Para lograr las mutaciones de los genes de interés se llevaron a cabo dos estrategias: I) la inactivación de los genes de *P. putida* A ATCC 12633 homólogos a los *orf*s *pp0731* y *pp4677* se logró por la inserción de un cassette de resistencia a antibiótico; II) la interrupción del gen homólogo a *cls* se llevó a cabo por delección de un fragmento interno al

gen y posterior reemplazo del fragmento deletado por un cassette de resistencia a antibiótico.

A continuación se detallan las etapas realizadas según las estrategias utilizadas.

### 3.21.1. Obtención de mutantes de *P. putida* A ATCC 12633 afectadas en la síntesis de PC.

#### A) Amplificación de genes de interés.

Amplificación de los orfs *pp0731* y *pp4677* de *P. putida* KT2440: Los oligonucleótidos oLPB19-0731 y oLPB20-0731 (Tabla 3.2) fueron usados para la amplificación de un fragmento de aproximadamente 0,6 Kb, correspondiente al orf *pp0731* a partir del genoma de *P. putida* KT2440. El fragmento de 0,6 Kb, fue digerido con *Bam*HI / *Sa*II y ligado al vector de clonado pK18*mob* (Tabla 3.1), previamente digerido con las mismas enzimas de restricción, y el plásmido obtenido fue denominado pPB13 (Tabla 3.1). De manera semejante, y a partir de los oligonucleótidos oLPB21-4677 y oLPB22-4677, se amplificó un fragmento de aproximadamente 0,8 Kb, correspondiente al orf *pp4677*. El fragmento amplificado fue digerido con *Bam*HI y ligado al vector pG18*mob* (Tabla 3.1). El plásmido resultante se denominó pPB14 (Tabla 3.1). La selección de colonias de *E. coli* DH5α portadoras de los plásmidos de interés se llevaron a cabo en placas de LB suplementadas con Km 50 µg/ml o Gm 100 µg/ml, según corresponda a pPB13 o pPB14. Las colonias desarrolladas fueron sometidas a extracción de plásmidos y posterior mapeo mediante enzimas de restricción.

Amplificación de los genes de resistencia a Gm (*aacC1*) y a Km (*aph(3')-IIa*): Los vectores pBBR1MCS-5 y pET9a (Tabla 3.1), fueron usados como molde para la amplificar los genes que codifican para las resistencias a Gm y a Km, respectivamente. A los oligonucleótidos oLPB11-upGm y oLPB12-dnGm (Tabla 3.2), usados para amplificar *aacC1* se les adicionaron sitios de corte para *Xba*I, sitio de restricción en la posición 233 del orf *pp0731*. De manera semejante oLPB17-upKm y oLPB18-dnKm (Tabla 3.2), diseñados para la amplificación del gen *aph(3')-IIa*, fueron modificados por la adición de sitios de restricción *Nco*I, internos en el orf *pp4677* (posición 275). Los fragmentos obtenidos, fueron purificados y reservados para llevar a cabo la posterior inactivación de los genes homólogos a los orfs *pp0731* y *pp4677* de *P. putida* A ATCC 12633.

### **B) Inactivación en *P. putida* A ATCC 12633 de genes homólogos a *pcs*.**

La inactivación en *P. putida* A ATCC 12633 de los *orfs* homólogos a *pp0731* y *pp4677*, se llevó a cabo por la inserción de un cassette de resistencia a Gm o Km, respectivamente.

Para ello, el producto de PCR correspondiente a *aacC1* (Gm) digerido con *XbaI* fue ligado a pPB13 previamente digerido con la misma enzima de restricción, generando el plásmido pPB15 (Tabla 3.1). Por otro lado, el fragmento correspondiente al gen *aph(3')-IIa* (Km) fue digerido con *NcoI* y ligado a pPB14. El plásmido obtenido se denominó pPB16 (Tabla 3.1). Posteriormente, pPB15 fue digerido con *BamHI* y *Sall* para liberar un fragmento de 1,2 Kb, correspondiente al constructo *pp0731::aacC1* y pPB16 fue digerido con *BamHI* liberando el constructo de 1,8 Kb correspondiente a *pp4677::aph(3')-IIa*. Ambos constructos fueron subclonados en el plásmido suicida pKNG101 (Tabla 3.1), previamente digerido con las mismas enzimas de restricción, generando los plásmidos pPB21 (*pp0731::aacC1*) y pPB20 (*pp4677::aph(3')-IIa*) (Tabla 3.1), los que fueron electroporados en *P. putida* A ATCC 12633 con el fin de obtener las mutantes correspondientes.

### **3.21.2. Obtención de mutantes de *P. putida* A ATCC 12633 afectadas en el gen homólogo a *cls*.**

#### **A) Amplificación de genes de interés**

Amplificación del gen *cls* (pp5364) de *P. putida* KT2440: como se describió anteriormente (apartado 3.19.2), el fragmento correspondiente al gen *cls* de *P. putida* KT2440, fue amplificado por PCR, ligado y clonado al vector pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO generando el plásmido pPB05 (Tabla 3.1). Posteriormente, el fragmento conteniendo el gen de *cls*, fue subclonado en el vector pUC18 (Tabla 3.1). Para ello, pPB05 fue digerido con *BamHI* y *Sall*, liberando el fragmento de interés, el cual fue ligado a pUC18 previamente digerido con las mismas enzimas de restricción, obteniendo el plásmido pPB07 (Tabla 3.1). Para la selección de colonias portadoras del plásmido de interés se utilizaron placas de LB suplementadas con Amp 150 µg/ml. Las colonias desarrolladas fueron sometidas a extracción de plásmidos y posterior mapeo mediante enzimas de restricción.

Amplificación de los genes de resistencia a Gm (*aacC1*): Los oligonucleótidos, upGm y dnGm (Tabla 3.2), fueron usados para la amplificación del gen de resistencia a Gm a partir de pBBR1MCS-5 (Tabla 3.1). A estos oligonucleótidos se les adicionaron sitios de restricción para *NcoI* y *StuI* (sitios de cortes internos en *cls*, en las posiciones 227 y 913, respectivamente) (Tabla 3.2). El fragmento de 0,6 Kb obtenido por PCR, correspondiente a

*aacC1* y flanqueado por *NcoI* y *StuI* fue purificado y reservado para llevar a cabo la posterior inactivación del gen homólogo a *cls* de *P. putida* A ATCC 12633.

### **B) Inactivación del gen homólogo a *cls* de *P. putida* A ATCC 12633.**

La inactivación del gen homólogo a *cls* de *P. putida* A ATCC 12633 se realizó mediante la deleción de un fragmento interno de 0,6 Kb, para lo cual se consideraron sitios de corte para *StuI* y *NcoI*. El fragmento delecionado fue remplazado mediante la inserción de un cassette de resistencia a Gm.

Para llevar a cabo esta estrategia, el producto de PCR correspondiente a *aacC1* (Gm) digerido con *StuI* y *NcoI* fue ligado a pPB07 (Tabla 3.1) previamente digerido con las mismas enzimas de restricción, generando el plásmido pPB08 (Tabla 3.1). Posteriormente, pPB08 fue digerido con *BamHI* y *Sall*, obteniendo un fragmento de 1,8 Kb, correspondiente al constructo *BamHI / Sall clsΔaacC1*. Dicho fragmento, fue subclonado en el plásmido suicida pKNG101 (Tabla 3.1), generando el plásmido pPB09 (Tabla 3.1). pPB09 fue introducido por electroporación en células *P. putida* A ATCC 12633, a fin de obtener la mutante correspondiente.

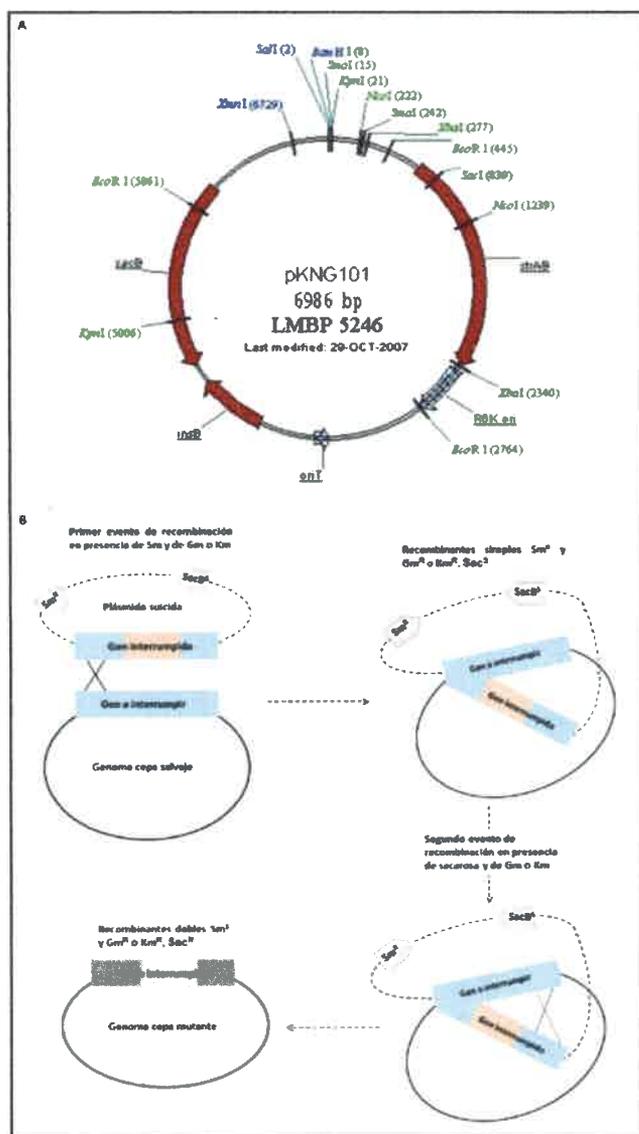
### **3.22. Electroporación de plásmidos en *P. putida* A ATCC 12633 y selección de dobles recombinantes.**

La introducción de pPB09, pPB20 y pPB21 en células de *P. putida* A ATCC 12633 se realizó siguiendo la metodología descrita por Choi *et al.*, (2003). Brevemente, se cosecharon 6 ml de cultivo de células de *P. putida* A ATCC 12633 crecidas en LB. El precipitado obtenido fue lavado 3 veces con 600  $\mu$ l de sacarosa 300 mM y resuspendido en 100  $\mu$ l de la misma solución. Estas células se combinaron con aproximadamente 50 ng de pPB09, pPB20 o pPB21 y fueron electroporadas (BioRad GenePulser, programado a: 25  $\mu$ F, 200 Ohm, 12,5 kV/cm). *P. putida* A ATCC 12633 fue recuperada en medio LB líquido durante 6 hs aproximadamente. Pasado este tiempo, los cultivos fueron suplementados con los antibióticos adecuados (Sm 100  $\mu$ g/ml y Gm 120  $\mu$ g/ml para el caso de la electroporación con pPB09 y pPB21 o Sm 100  $\mu$ g/ml y Km 75  $\mu$ g/ml para el caso de la electroporación con pPB20) y se siguió la recuperación de las cepas durante 12 hs.

La selección de dobles recombinantes se realizó siguiendo la metodología descrita en Kaniga *et al.*, (1991). Básicamente, en el primer evento de recombinación los merodiploides fueron seleccionados en placas de medio LB suplementadas con Sm 100  $\mu$ g/ml y Gm 120  $\mu$ g/ml, cuando *P. putida* A ATCC 12633 fue electroporada con pPB09 y pPB21 (Tabla 3.1) o con Sm 100  $\mu$ g/ml y Km 75  $\mu$ g/ml para el caso de la electroporación

con pPB20 (Tabla 3.1). Para favorecer el segundo evento de recombinación, las colonias desarrolladas fueron repicadas en placas de medio LB suplementadas con sacarosa 10 % y Gm 120 µg/ml o Km 75 µg/ml, a fin de lograr la pérdida de los vectores suicidas pPB09, pPB21 y pPB20. La pérdida de los plásmidos se basa en la presencia del gen *sacB* en pKNG101 (Figura 3.2 A). Este gen confiere sensibilidad a sacarosa dado que *sacB* codifica para una levanosacarasa que, a partir de la sacarosa presente en el medio, sintetiza compuestos tóxicos para la célula (levanos) (Kaniga *et al.*, 1991). La eventual pérdida de los vectores suicidas, luego de ocurrida la doble recombinación homóloga, le permite al microorganismo crecer en presencia de sacarosa.

La Figura 3.2 B muestra el esquema del mecanismo de doble recombinación homóloga entre el genoma de *P. putida* A ATCC 12633 y el plásmido de interés.



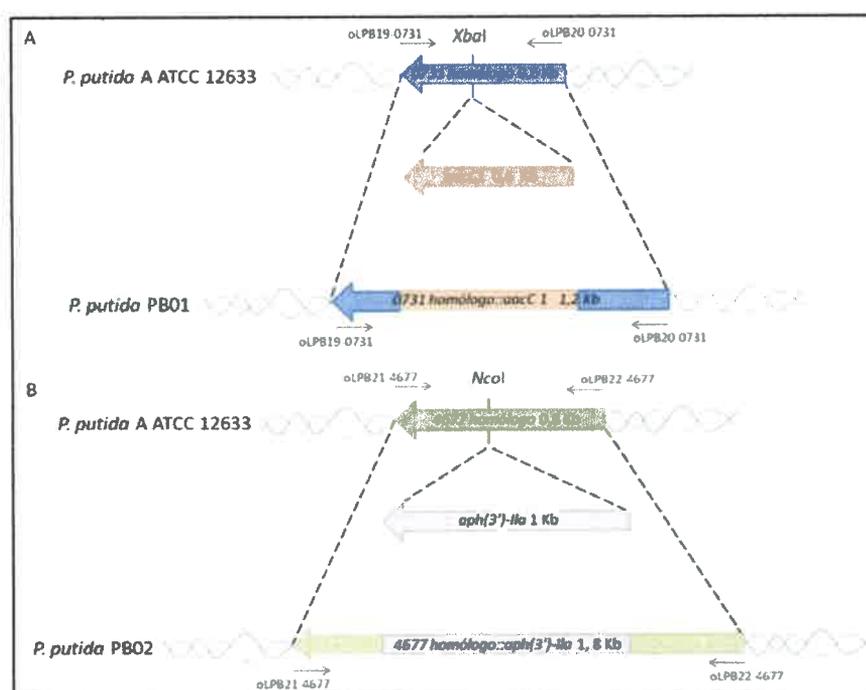
**Figura 3.2:** A) Mapa circular de pKNG101. B) Esquema del mecanismo de recombinación homóloga entre el genoma de *P. putida* A ATCC 12633 y los plásmidos suicidas de interés

Las colonias desarrolladas en presencia de sacarosa y Gm o Km, según el constructor utilizado, fueron seleccionadas como potenciales mutantes y repicadas en medio rico LB con la adición Gm 120 µg/ml o Km 75 µg/ml. A partir de las mismas se confirmó la interrupción de los genes mediante PCR.

### 3.23. Corroboración de *P. putida* A ATCC 12633 mutante:

#### 3.23.1. Confirmación de la mutación insercional en los genes homólogos a los orfs *pp0731* y *pp4677*.

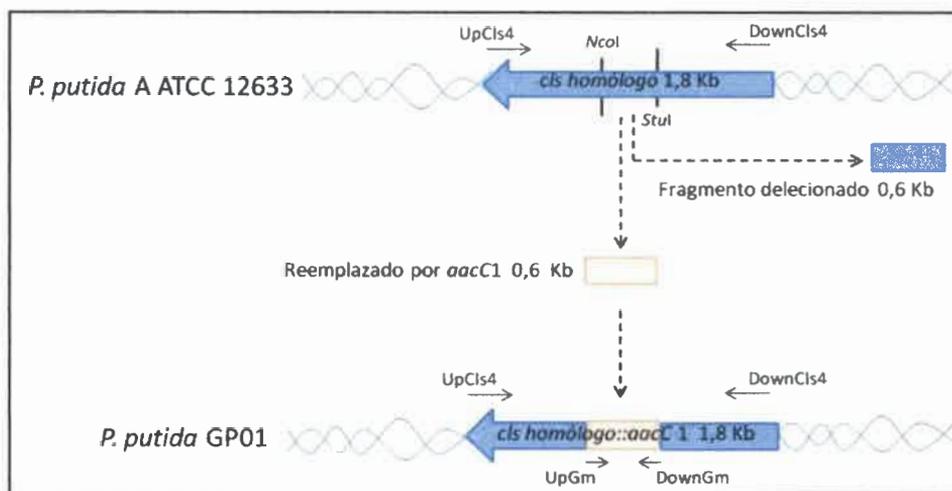
La presencia de los constructos conteniendo los genes homólogos a los orfs *pp0731* o *pp4677* interrumpidos por la inserción del cassette de resistencia a antibiótico en las cepas candidatas fue confirmada por PCR utilizando los pares de oligonucleótidos oLPB19-0731 / oLPB20-0731 o oLPB21-4677 / oLPB22-4677 (Tabla 3.2). La Figura 3.3 esquematiza los constructos deseados en las posibles mutantes: *0731homólogo::aacC1* (panel A) y *4677homólogo::aph(3')-IIa* (panel B). La diferencia de 0,6 Kb y la de 1 Kb dada por la presencia de los genes *aaaC1* o *aph(3')-IIa*, permitió corroborar la mutación correspondiente. Las mutantes fueron denominadas *P. putida* PB01 (*0731homólogo::aacC1*) y *P. putida* PB02 (*4677homólogo::aph(3')-IIa*) (Tabla 3.1).



**Figura 3.3:** Esquema representativo del genoma de *P. putida* A ATCC 12633 y de sus mutantes isogénicas: A) gen homólogo a *pp0731* en la cepa salvaje y la posterior inserción del constructo llevando el gen de resistencia a Gm. B) gen homólogo a *pp4677* en la cepa salvaje y la posterior inserción del constructo llevando el gen de resistencia a Km.

### 3.23.2. Confirmación de la mutación delecional del gen homólogo a *cls*.

La confirmación de la eventual inactivación del gen homólogo a *cls* en *P. putida* A ATCC 12633, se llevó a cabo por PCR. Para ello los oligonucleótidos UpCIs4 y DownCIs4 fueron usados para amplificar el gen homólogo a *cls* desde ADN genómico de la cepa salvaje y de la cepa seleccionada como posible mutante. El producto de PCR fue utilizado como molde para amplificar el gen de resistencia a Gm utilizando los oligonucleótidos UpGm y DownGm (Tabla 3.2). La Figura 3.4 esquematiza el constructo presente en la posible mutante. La mutante obtenida fue llamada *P. putida* GP01 (*cls* homólogo $\Delta$ *aacC1*) (Tabla 3.1).



**Figura 3.4:** Esquema representativo del genoma de *P. putida* A ATCC 12633 y de su mutante derivada. Gen homólogo a *cls* en la cepa salvaje y posterior deleción y reemplazo del fragmento por el gen de resistencia a Gm generando la cepa mutante *P. putida* GP01 (*cls* homólogo $\Delta$ *aacC1*).

### 3.24. Complementación de *P. putida* PB01 (*pcs::aacC1*) y de *P. putida* GP01 (*cls* homólogo $\Delta$ *aacC1*).

Las cepas mutantes *P. putida* PB01 y *P. putida* GP01 (Tabla 3.1), fueron complementadas con la finalidad de restablecer el fenotipo de la cepa salvaje. Para ello, los oligonucleótidos oLPB19-0731 y oLop731R (Tabla 3.2) fueron usados para amplificar un fragmento *Bam*HI / *Bam*HI de 0,6 Kb, correspondiente al gen homólogo a *pp0731* desde AND genómico de *P. putida* A ATCC 12633. De manera similar y partir de los oligonucleótidos oLGL01 y oLGL02 (Tabla 3.2) se amplificó un fragmento *Sal*I / *Bam*HI de 1,5 Kb, correspondiente al gen homólogo a *cls*, usando como molde pPB12. Ambos productos de PCR fueron digeridos y ligados al vector replicativo en *P. putida*, pBBR1MCS-2 (Tabla 3.1), los plásmidos obtenidos, llamados pPB24 y pGL01 (Tabla 3.1), fueron introducidos por electroporación a *P. putida* PB01 y *P. putida* GP01, respectivamente.

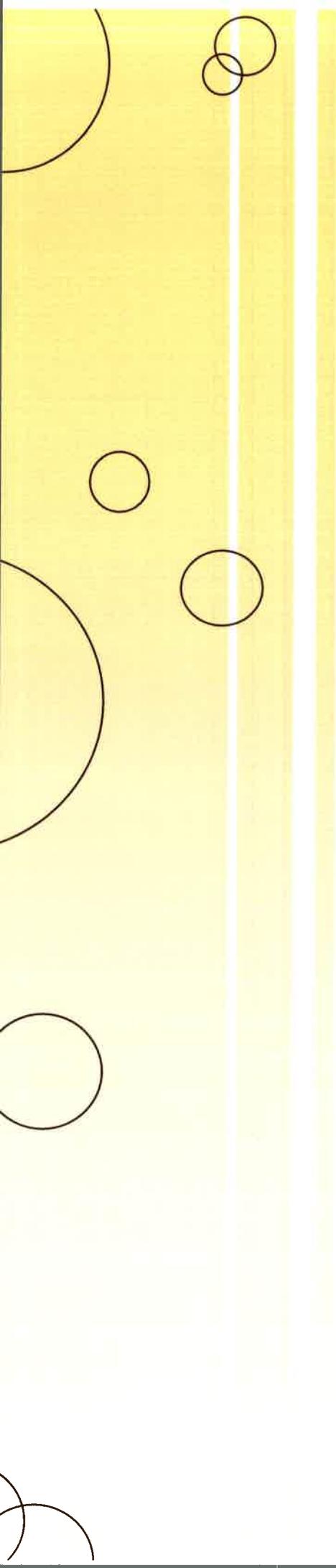
Paralelamente, las cepas mutantes fueron complementadas con el plásmido pBBRMCS-2 vacío a fin de descartar cualquier tipo de efecto ocasionado por la inserción de este vector. Las células de *P. putida* PB01 y de *P. putida* GP01 portadoras de los plásmidos de interés (Tabla 3.1) fueron seleccionadas en medio rico LB con la adición de Km 75 µg/ml.

### **3.25. Alineamientos de secuencias y construcción de árboles filogenéticos.**

Los alineamientos de las diferentes secuencias analizadas y la construcción de árboles filogenéticos se llevaron a cabo utilizando las herramientas presentes en el programa ClustalW (<http://align.genome.jp/>) o ClustalX.

### **3.26. Números de Acceso a la secuencias de nucleótidos de *pcs*.**

La secuencia de nucleótidos del gen *pcs* de *P. putida* KT2440 y de *P. putida* A ATCC 12366 han sido depositados en la base de datos del GenBank bajo los números JN368426 y JN680354, respectivamente.



4

[R E S U L T A D O S  
Y D I S C U S I Ó N]

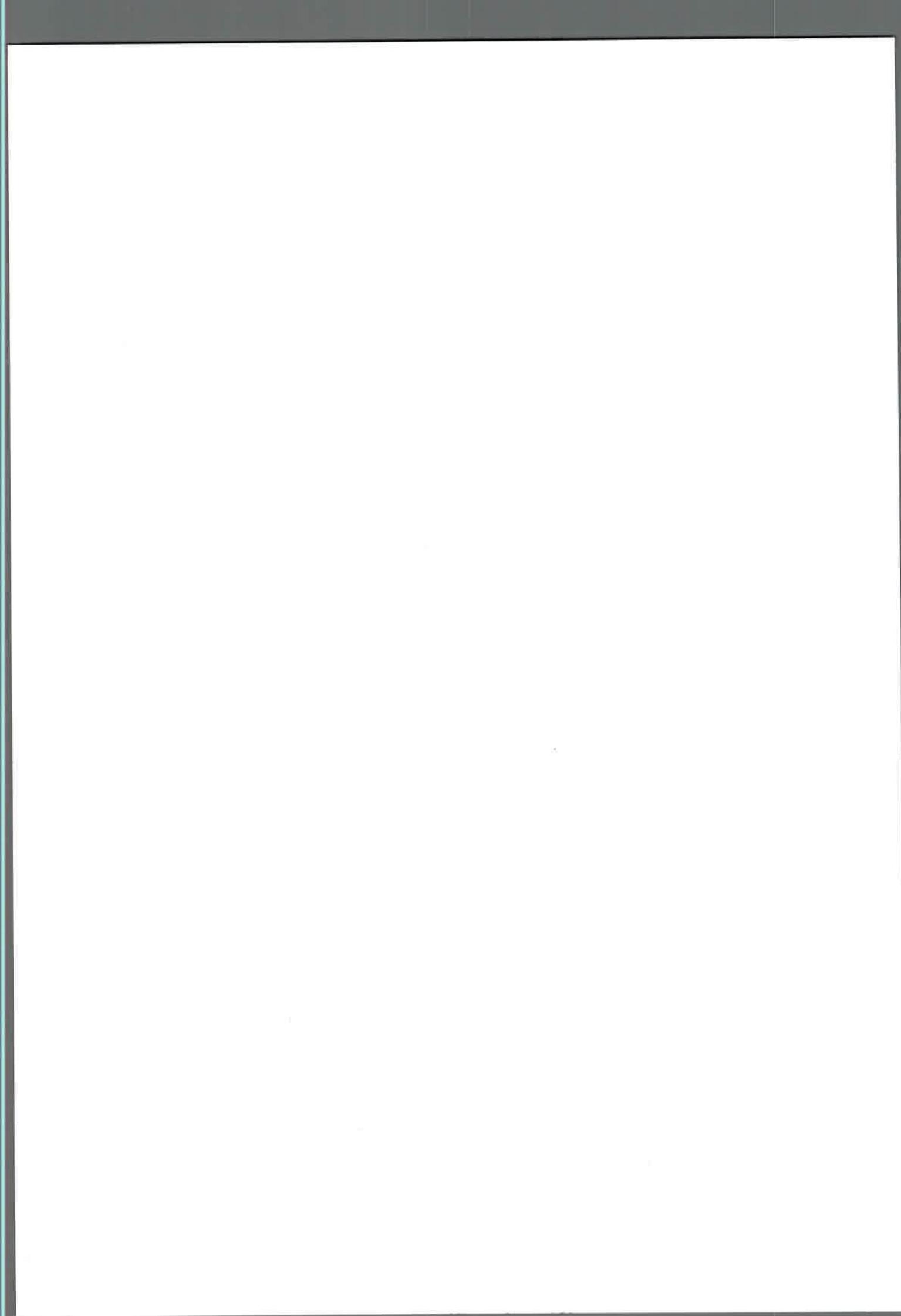
## Sección I

### Respuesta de *P. putida* A ATCC 12633 frente al estrés ocasionado por TDTMA y su relación con los fosfolípidos aniónicos

*P. putida* A ATCC 12633 es capaz de crecer en presencia de altas concentraciones (50 mg/l) del compuesto de amonio cuaternario TDTMA, utilizándolo como única fuente de C, N y energía (Liffourrena *et al.*, 2008). Entre los parámetros que podrían estar relacionados con los mecanismos que le permiten a *P. putida* A ATCC 12633 tolerar altas concentraciones de este surfactante, se evaluaron los cambios a nivel de PL de membrana cuando la cepa fue expuesta durante cortos periodos de tiempo (15 min) al detergente o cuando fue adaptada a crecer en presencia de concentraciones crecientes del biocida (mayores a la CIM = 150 mg/l). En ambas condiciones, no se detectaron modificaciones a nivel del contenido de PL totales, pero sí se observaron cambios a nivel de PL individuales. Tanto en células expuestas al surfactante como en células adaptadas, respecto a células que no estuvieron en contacto con TDTMA, el contenido de CL disminuyó aproximadamente un 60 % y los niveles de PA y PG aumentaron con un incremento superior al 100 %. Interesantemente, cuando las células adaptadas fueron desadaptadas (pasajes sin TDTMA) los niveles de estos PL retornaron a valores similares a los detectados en ausencia del detergente. Estos resultados permitieron concluir que estos PL aniónicos están involucrados en la respuesta de *P. putida* A ATCC 12633 al QAC, utilizando principalmente PA para neutralizar la alta densidad de carga positiva dada por la molécula de TDTMA (Boeris *et al.*, 2007).

La disminución a nivel de CL y el incremento en el contenido de PG y de PA llevaron a proponer que, posiblemente, el recambio de CL, a través de la acción de una actividad fosfolipasa D (PLD) que utilizara como sustrato a este PL, permitiría incrementar, de manera rápida y eficaz, los niveles de PG y PA en la membrana bacteriana necesarios para la sobrevivencia de *P. putida* A ATCC 12633 cuando el surfactante está presente en el medio. Por otro lado, también se planteó que el aumento de PG podría deberse a la disminución de otra actividad enzimática, una cardiolipina sintasa (CLs), la cual ha sido detectada en *P. putida* y es responsable de catalizar la síntesis de CL por condensación de dos moléculas de PG (von Wallbrunn *et al.*, 2002).

En base a esto, y con el objetivo de clarificar de donde proviene el aumento de PA y PG en la respuesta de *P. putida* A ATCC 12633 a TDTMA (Boeris *et al.*, 2007) se decidió, por un lado, determinar si en *P. putida* A ATCC 12633 se pone de manifiesto una actividad



PLD y, por el otro, obtener mutantes delecionales de *P. putida* A ATCC 12633 para el gen cardiolipina sintasa (*cls*) y caracterizar las mismas frente al estrés ocasionado por TDTMA.

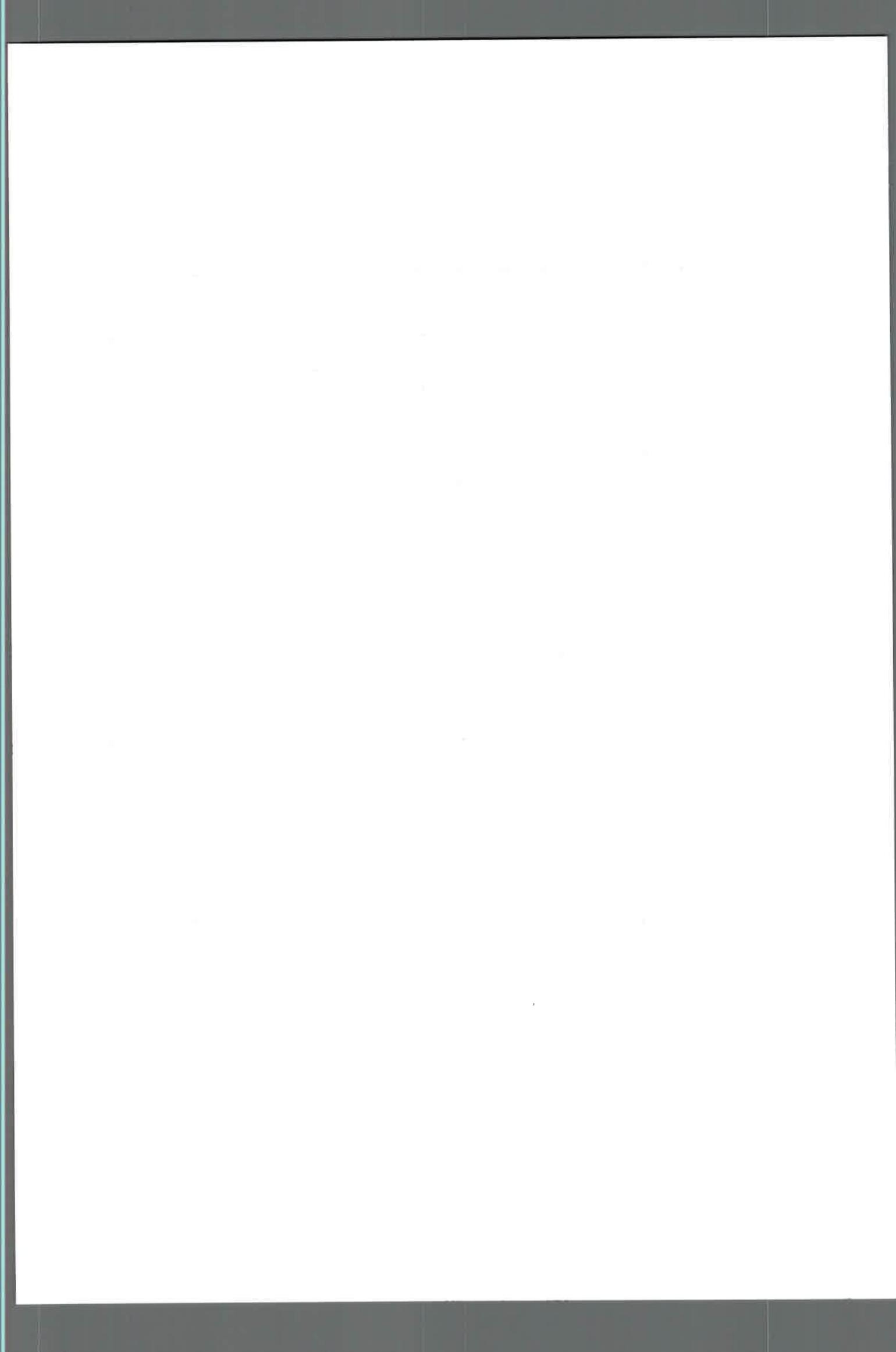
#### 4.1.1. Determinación de la Actividad Fosfolipasa D (PLD) en células de *P. putida* A ATCC 12633 estimuladas con TDTMA.

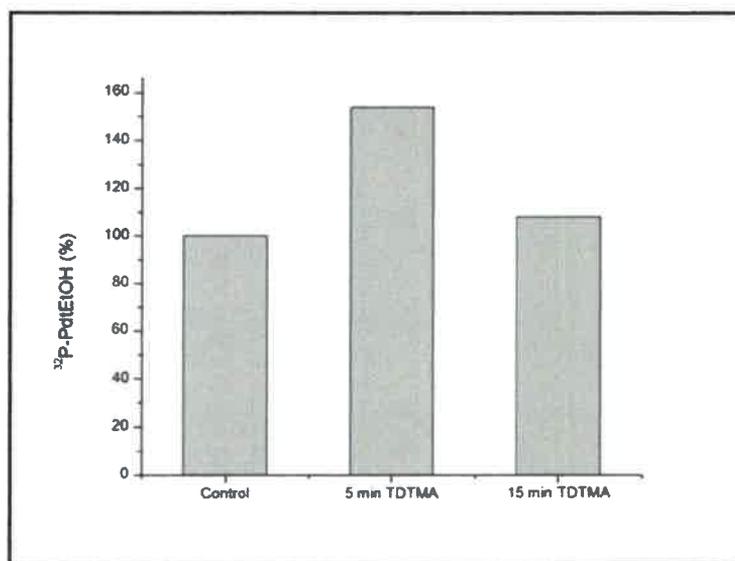
En microorganismos patógenos la mayoría de las fosfolipasas descritas, cuyos mecanismos de acción han sido dilucidados, tales como fosfolipasas C (PLC) y fosfolipasa A (PLA), actúan como factores de virulencia (Ostroff *et al.*, 1990, Weingart y Hooke, 1999). Sin embargo, en bacterias no patógenas la función biológica de las fosfolipasas, en general, es poco conocida. En determinadas condiciones de estrés, tales como shock térmico, tratamiento con EDTA y presencia de polimixina B, se ha sugerido que la PLA de membrana externa de *E. coli* podría actuar como un sensor que detecta los cambios físicos de las membranas, lo que permitiría su posterior acción sobre los ácidos grasos de los PL (Dekker, 2000 y citas incluidas). También se ha postulado que una PLA podría estar implicada en la activación de la isomerización cis/trans de los ácidos grasos en *P. oleovorans* GPo12 (Pedrotta y Witholt, 1999).

Para el caso particular de las PLD ha sido descrito que, la mayoría de ellas, utilizan como sustrato PC generando PA y colina libre (Mc Namara *et al.*, 1994, Rudolph *et al.*, 1999, Liscovitch *et al.*, 2000, Wilderman *et al.*, 2001). Sin embargo, en *E. coli*, *Proteus vulgaris* y *P. aeruginosa* se ha demostrado la presencia de una actividad PLD que cataliza la hidrólisis específica de CL (Cole y Proulx, 1975).

Con el objetivo indagar la presencia de actividad PLD en *P. putida* A ATCC 12633 se procedió a determinar dicha actividad enzimática en base a la capacidad de PLD de transfosfatidilar grupos alcoholes generando el fosfatidilalcohol correspondiente (Waite, 1999 y citas incluidas).

La **Figura 4.1.1** muestra la actividad PLD de *P. putida* A ATCC 12633 obtenida luego de estimular a las células con 50 mg/l de TDTMA durante 5 y 15 min. Respecto a células no expuestas al biocida (control), puede observarse que la formación del producto fosfatidiletanol aumentó aproximadamente un 60 % cuando *P. putida* A ATCC 12633 fue expuesta durante 5 min al surfactante y que, 15 min post-exposición, el nivel de este fosfolípido retorna a valores similares a los detectados en ausencia del estímulo. Estos resultados fueron un primer indicio de la presencia de una actividad PLD en *P. putida* A ATCC 12633, la cual se activaría frente al estímulo provocado por TDTMA.





**Figura 4.1.1:** Efecto de TDTMA sobre la actividad PLD: Células de *P. putida* A ATCC 12633 crecidas con glucosa y NH<sub>4</sub>Cl se incubaron con [<sup>32</sup>P]-Pi (AE=100 µCi/250 mg de peso húmedo) durante 2 hs; luego se adicionó 1 % de etanol, se incubaron durante 5 min y posteriormente se estimularon 5 y 15 min con TDTMA. Posterior a la extracción de PL, el fosfatidiletanol fue identificado por TLC monodireccional (acetato de etilo:iso-octano:ácido acético:agua, 12:2:3:10) y cuantificado en contador de centelleo líquido.

Si bien no existe evidencia bibliográfica que describa la presencia de PLDs en *P. putida* KT2440, cepa de referencia secuenciada (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, AE015451), Nelson y col. (2002) identificaron en este microorganismo, por homología de secuencias, varias proteínas que presentan secuencias conservadas que se corresponden a las del sitio activo de las PLDs. Estas secuencias conservadas se conocen como motivo HKD y son características de los miembros pertenecientes a la superfamilia de las PLD (Ponting y Kerr, 1996, Waite, 1999, Liscovitch *et al.*, 2000).

#### 4.1.2. Búsqueda en *P. putida* KT2440 de genes homólogos a los miembros de la superfamilia de las PLD.

La superfamilia de las PLDs incluye, entre otras, a la PLD propiamente dicha, a cardiolipina sintasa (CLs), a fosfatidilserina sintasa tipo I (PssAI), a proteínas de envolturas de poxovirus y a endonucleasas (Ponting y Kerr, 1996, Waite, 1999). Los miembros de esta superfamilia se caracterizan por tener el motivo consenso conocido como HKD (H X K (X)4 D (X)6 G (X)2 N) repetido 2 veces. Los residuos de histidina (H), lisina (K) y ácido aspártico (D), están presentes en todos los miembros de la familia, mientras que los residuos de glicina (G) y asparragina (N) pueden variar. Se conoce, además, que los residuos H, K y D



están involucrados en la catálisis enzimática y confieren similar mecanismo de acción a los diferentes miembros de la familia (Ponting y Kerr, 1996).

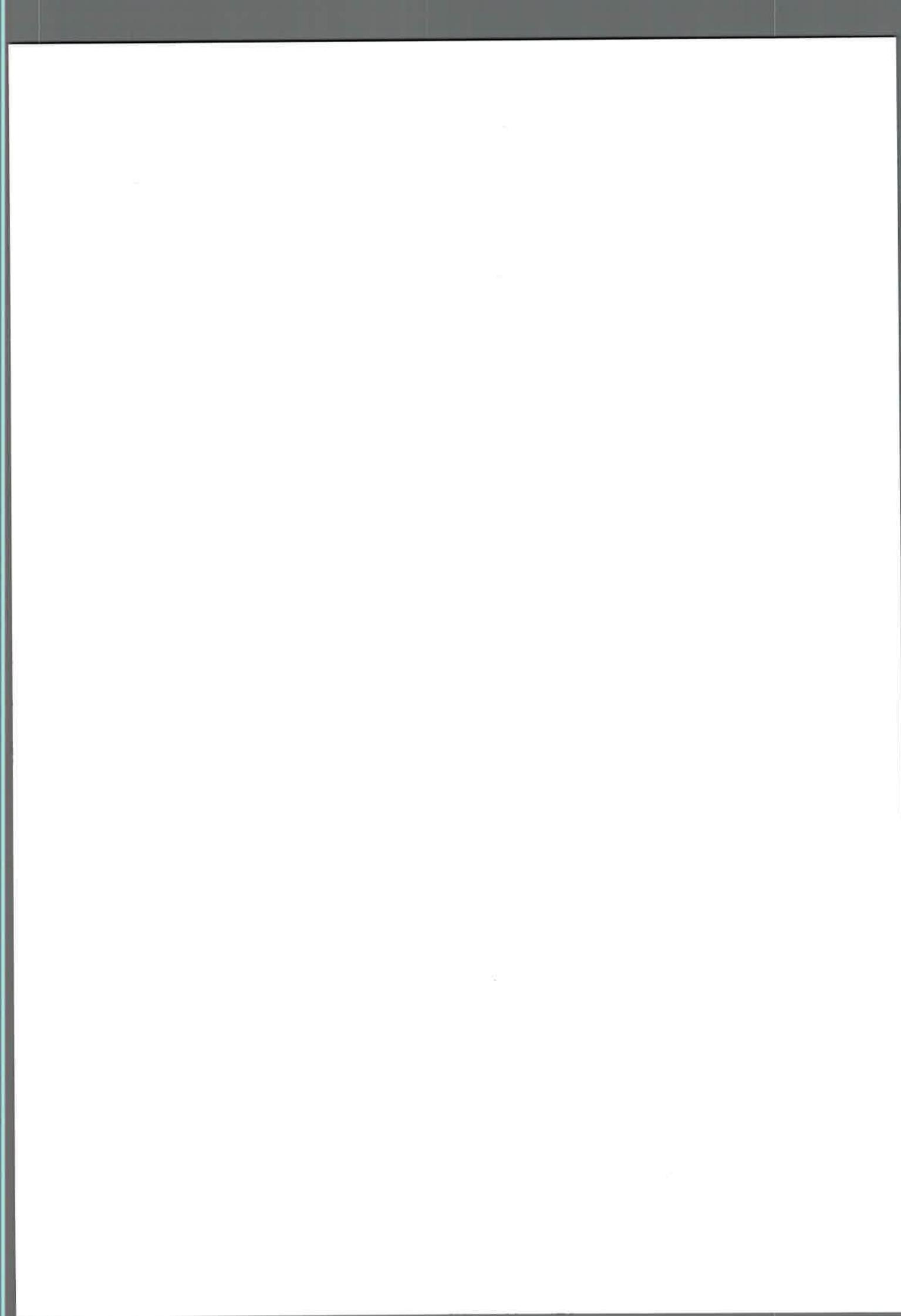
Para llevar a cabo la búsqueda de ORFs en *P. putida* homólogos a los miembros de la superfamilia de las PLD, en particular aquellos relacionados a la actividad PLD y a la síntesis de CL (cardiolipina sintasa, CLs), se examinó el genoma de la cepa de referencia secuenciada *P. putida* KT2440 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, AE015451).

El análisis por BLASTP considerando el motivo HKD presente en secuencia de aminoácidos de la PLD de *Streptomyces* PMF (Leiros *et al.*, 2000, 1V0S\_A) y de CLs de *P. putida* P8 y *P. putida* DOT T1 (von Wallbrunn *et al.*, 2002, CAD29690, Bernal *et al.*, 2007, AY960982), brindó información acerca de la existencia de cinco ORFs pertenecientes a la superfamilia de las PLDs: PP0892, PP3264, PP3664, PP5276 y PP5364, todos ellos anotados por homología de secuencia. La **Tabla 4.1.1** resume las características más relevantes de los ORFs seleccionados.

**Tabla 4.1.1:** ORFs de *P. putida* KT2440 homólogos a miembros de la superfamilia de las PLD.

ORFs	PP0892	PP3264	PP3664	PP5276	PP5364	
Nombre	Proteína de la familia de las fosfolipasas	Cardiolipina sintasa 2	Fosfatidilserina sintasa clase 1	Fosfolipasa D/ transfosfatidilasa	Cardiolipina sintasa	
Número de acceso	NP_743053	NP_745407	NP_745800	NP_747377	NP_747465	
Número de AA	358	400	442	517	481	
<b>Respecto a:</b>						
CLs <i>P. putida</i> DOT T1	Max score	160	185	35	80	940
	% cobertura	70	71	26	76	100
	E value	4x10 <sup>-47</sup>	3x10 <sup>-56</sup>	2x10 <sup>-4</sup>	1x10 <sup>-18</sup>	0,0
	% de identidad de AA	32	35	25	26	98
CLs <i>P. putida</i> P8	Max score	169	182	39	78	915
	% cobertura	70	71	26	75	100
	E value	2x10 <sup>-50</sup>	3x10 <sup>-55</sup>	1x10 <sup>-5</sup>	5x10 <sup>-8</sup>	0,0
	% de identidad de AA	33	35	25	25	98
PLD <i>Streptomyces</i> PMF	Max score	28	35	SH	40	30
	% cobertura	34	33	SH	29	12
	E value	0,0026	2x10 <sup>-4</sup>	SH	6x10 <sup>-6</sup>	8x10 <sup>-4</sup>
	% de identidad de AA	21	25	SH	26	28

A partir de la secuencia de aminoácidos de la PLD de *Streptomyces* PMF (1V0S\_A) y de CLs de *P. putida* P8 (CAD29690) y *P. putida* DOT T1 (AY960982), se analizó el genoma completo de la cepa de referencia secuenciada *P. putida* KT2440 (AE015451) en busca de ORFs homólogos a estas enzimas. Referencias: AA: aminoácidos, SH: sin homología.



Los ORFs listados en la tabla fueron sometidos a posteriores análisis, descriptos a lo largo del desarrollo de esta sección, con el objetivo de llevar a cabo la selección de posibles candidatos de ser responsables de las actividades CLs y PLD en *P. putida* A ATCC 12633. En primera instancia se consideró al ORFs PP5364 como potencial candidato de ser una CLs.

#### 4.1.3. Amplificación y secuenciación del *orf pp5364* de *P. putida* KT2440.

El *orf pp5364* (Figura 4.1.2) de *P. putida* KT2440 se encuentra anotado por homología de secuencia como *cls* (Nelson *et al.*, 2002). Este *orf* presenta un 98 % de homología con el gen *cls* de *P. putida* DOT T1 y de *P. putida* P8 (Tabla 4.1.1) y ha sido demostrado que mutantes de ambas cepas afectadas en el gen homólogo a *pp5364*, presentan solo cantidades trazas de CL en su membrana (von Wallbrunn *et al.*, 2002, Bernal *et al.*, 2007).

Basados en esta información bibliográfica se consideró, en primera instancia, que en *P. putida* A ATCC 12633 el gen homólogo al *orf pp5364*, podría ser el responsable de codificar para CLs. En función de ello, se llevaron a cabo los experimentos necesarios para amplificar, clonar, secuenciar e inactivar al *orf pp5364* de *P. putida* KT2440, para, posteriormente, obtener mutantes de *P. putida* A ATCC 12633 afectadas en el gen homólogo correspondiente.

```
>pp5364
ATGCATATGGATTACCACAGCCCCTACTTCTTTGGTTACCTACTCGGCCTGATCCATCTGCTGGGTATTGTCGCCGCACTGCATGCGCT
GTTACACCGTGCAGGACAGCCAGGGCGCCATTGCTTGGGCGATGCCCTTGTCTTCATCCCCTACCTCACCTTGATCCCCTACCTGATCT
TCGGCGCCCGCTCGTTCTATGCCTACATCAAGGCTCGGCGCCAGGCCAACCAGGAAATGCACGTGGCCATGGCCCAACCTCAACTGGCGG
CCCTGGGTTGAAGAAGCCCTTACCGCCGCGAGTCGGAAGCTACACAGCCTTGC CGGCCATGCCCAAGCTGGGTGCAATGCCATGCCT
GGCAAATAACCAGGTGAAACTGCTGATCAATGGCAAAGCCACCTTCGATGCCATCTTCGCAGCCATCGAAAAGCACGCGATGTGGTAC
TGGTGCAGTTCTTCATCATTATGACGACACCCTCGGCAAGGCACTGCAGCAACTCTTGCTACGAAAAGCCGCCGAAGGCGTGCAGGTG
TTCGTGCTGTACGACCGTGTGCGGTAGCCATGCCTTGCCTCCAGCTACAGCCAGGTGCTGCGTGACGGCGGTGTGCAGATCCATGCATT
CGCCACACGTCGCGGCTGGTTCAACCGCTTCCAGGTGAACCTCCGCAACCATCGCAAGATTGTGGTGGTGGATGGCTTGTCTCGGCTTCA
TCGGCGGCCACAATGTGGGAGACGAGTACCTGGGTGAACATCCACAGCTTTCCCTTGGCGTGACACCCACGTACAGATCAGCGGGCCA
GTACTGGCCTGCCTGCAAGAGTCGTTCCGCGAGGACTGGTACTGGGCCACGCGCCAGCTACCGCGCTGATCCTGCCCGATACATACCC
GGATAACGGCGTCTGTGTAGGCCTTGGCCAGCGGCCCCGCGAGACCCACAAGAAACCTGCTCGCTGTCTTCTTGAAGCGATTTCATT
CGGCCACCCGAGGGTGTGGATCACCAGCCGTAATTCATCCCTGACGAGGCGGTGTTCCGCCCTTGGCGCTGGCGGTGCTACGAGGA
GTCGATGTGCGGGTGTGATCCCGTACCGGCTGACCACCGCATCGTCTACGCCGCTCCAGCCTGTTTGCCTTGAAGCAGTGC CGCG
GGGGTACGTATGTTCCGTTACCAACCCGGTTTCTGCATCAGAAGTGGTCTGGTGGATGATGACGTCAGCGCAATTGGGAGTGCCA
ACCTGGACAACCGCTCGTTCGCGCTGAACTTCGAGATTACCCTGCTGACAGTCGATCGCGGCTTCCGCCAGCAGGTGAGCACATGCTC
CAGGAAGACTTCGAACAAGCGCGGAAATTA CTGCTGAAGACACCCAAGATACCCATCGACTGCAGCAATTGGGGATGCGGATTGCGCG
GCTGATATCGCCGATCTTTAG
```

**Figura 4.1.2:** Secuencia completa del gen *pp5364* (*cardiolipina sintasa*) de *P. putida* KT2440. Se señalan los sitios de restricción interno para *NcoI* y *StuI*, los cuales fueron considerados para la correspondiente inactivación del gen.



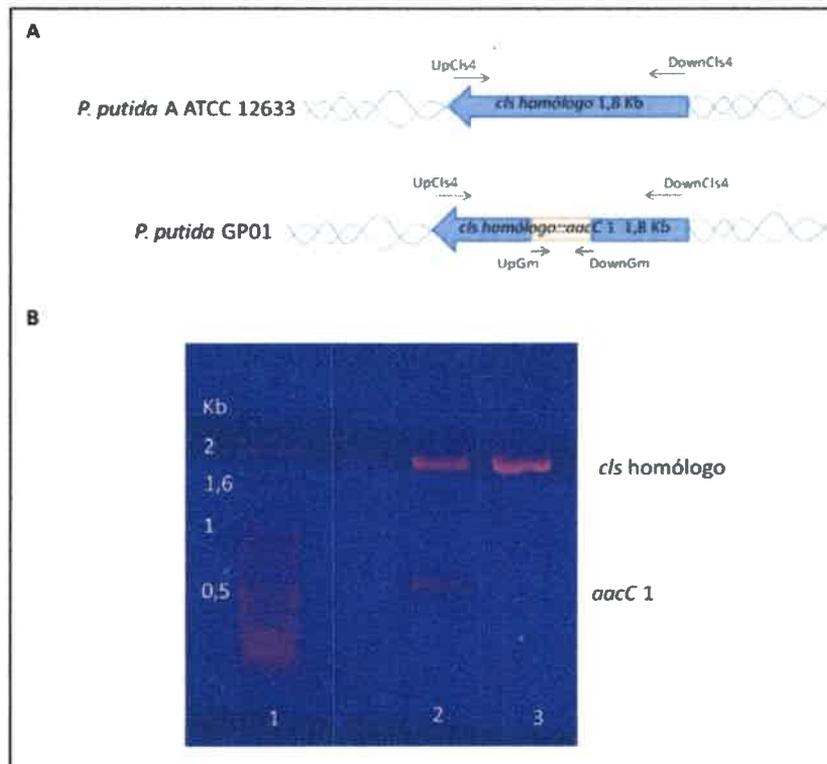
A partir de la secuencia de nucleótidos de *cls* (*pp5364*) de *P. putida* KT2440, se diseñaron los oligonucleótidos específicos (localizados a 202 pb corriente arriba y 237 pb corriente abajo) para la amplificación por PCR del gen *cls*, utilizándose como templado ADN de *P. putida* KT2440 (**Tabla 3.2**).

El fragmento obtenido, de aproximadamente 1,8 kb, fue clonado en pCR2.1-TOPO (Invitrogene) y posteriormente enviado a secuenciar a MacroGen (Korea). Mediante el uso de BLASTN del National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), se obtuvo el alineamiento de la secuencia del fragmento clonado en pCR2.1-TOPO con las secuencias de la base de datos no redundante del GenBank. Dicho alineamiento indicó que el fragmento clonado posee 100 % de identidad con el gen *cls* de *P. putida* KT2440.

#### 4.1.4. Obtención de mutantes de *P. putida* A ATCC 12633 afectadas en el gen homólogo a *cls*.

La inactivación en *P. putida* A ATCC 12633 del gen homólogo a *cls* (*pp5364*) se realizó mediante la delección de un fragmento interno (0,6 kb aproximadamente) de dicho gen y la posterior inserción de un cassette de resistencia Gm (*aacC1*), según se describe en Materiales y Métodos (apartado 3.21.2). El constructo obtenido (*cls* $\Delta$ *aacC1*) fue ligado al plásmido suicida pKNG101 generando el plásmido pPB09, (**Tabla 3.1**). Por electroporación, pPB09 fue introducido en células de *P. putida* A ATCC 12633. Las colonias desarrolladas en presencia de 120  $\mu$ g/ml de Gm fueron seleccionadas como posibles candidatas y la mutación fue corroborada por PCR. Para ello, los oligonucleótidos UpCIs4 y DownCIs4 (**Figura 4.1.3.A**) fueron usados para amplificar el gen homólogo a *cls* desde ADN genómico de la cepa salvaje y de la cepa seleccionada como posible mutante. El producto de PCR fue utilizado como molde para amplificar el gen de resistencia a Gm utilizando los oligonucleótidos UpGm y DownGm (**Figura 4.1.3.A**). Como se desprende del análisis de la **Figura 4.1.3 B**, se obtuvo un fragmento amplificado correspondiente al gen homólogo a *cls* (1,8 Kb) a partir tanto del genoma de la cepa salvaje (calle 3) como el de la cepa mutante, llamada *P. putida* GP01 (calle 2). El fragmento correspondiente al gen *aacC1* (0,6 Kb) sólo fue amplificado en la cepa mutante *P. putida* GP01 (calle 2). Estos resultados permitieron corroborar la inserción del constructo deseado y, consecuentemente, la inactivación del gen homólogo a *cls*.





**Figura 4.1.3:** A) Esquema representativo de los oligonucleótidos escogidos para llevar a cabo la confirmación de la inserción del gen *aacC 1* mediante PCR. B) Reacción de PCR, a partir del genoma de *P. putida* A ATCC 12633 y *P. putida* GP01 se amplificó el gen homólogo a *cls*. El producto de PCR fue utilizado como molde para amplificar el gen de resistencia a gentamicina (*aacC 1*). Calle 1: marcador de peso molecular. Calle 2: cepa mutante. Calle 3: cepa salvaje.

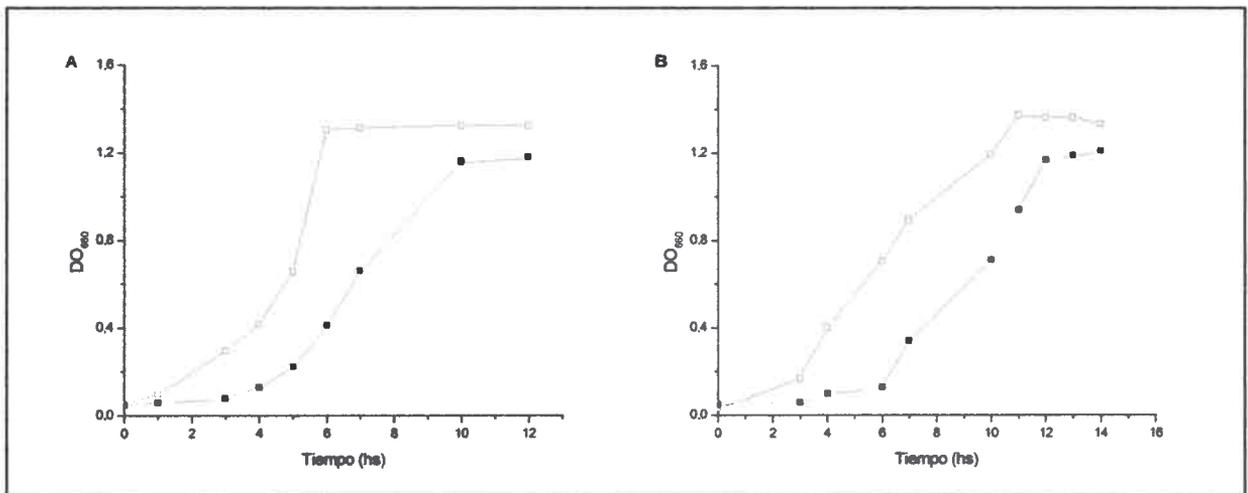
Posteriormente, el gen de *P. putida* A ATCC 12633 homólogo a *cls*, fue amplificado por PCR y ligado a pCR2.1-TOPO (Invitrogene), generando el plásmido pPB12 (Tabla 3.1), según los descrito en Materiales y Métodos (apartado 3.19.2). El fragmento clonado fue enviado a secuenciar a Macrogen (Korea). Por análisis de secuencia se determinó que el gen de *P. putida* A ATCC 12633 mutado, presenta un 87 % de homología con el *orf pp5364* de *P. putida* KT2440 y con el gen *cls* de *P. putida* DOT T1 (Bernal *et al.*, 2007).

#### 4.1.5. Caracterización fisiológica de *P. putida* GP01.

Se evaluó el comportamiento de la cepa mutante crecida en condiciones nutricionales no estresantes, con el objetivo de determinar si la mutación alteraba o no el crecimiento bacteriano en estas condiciones de cultivo.

La Figura 4.1.4 muestra las curvas de crecimiento de *P. putida* GP01 y de su cepa parental crecidas en medio rico LB (A) o en HPI-BSM con la adición de glucosa y  $\text{NH}_4\text{Cl}$  como fuente de C y N, respectivamente (B).





**Figura 4.1.4:** Crecimiento de *P. putida* A ATCC 12633 (□) y de *P. putida* GP01 (■) en: (A) medio rico LB o en (B) HPI-BSM en presencia de fuentes preferenciales de carbono y nitrógeno. Se realizaron extracciones periódicas de muestras, a las cuales se le determinó el crecimiento por medición espectrofotométrica de la turbidez del cultivo a 660 nm.

Como puede observarse, *P. putida* GP01 crecida en medio rico LB (A) o en medio salino suplementado con fuentes preferenciales de C y N (B), presenta un leve incremento de la fase de latencia y una pequeña disminución de la tasa de crecimiento, respecto a lo detectado en la cepa parental bajo las mismas condiciones nutricionales.

En diferentes cepas mutantes para *cls*, tales como, *P. putida* DOT T1, *P. putida* P8 y *B. subtilis*, entre otras, no se han detectado alteraciones en cuanto al crecimiento de las mismas en condiciones de cultivo no estresantes (von Wallbrunn *et al.*, 2004, López *et al.*, 2006, Bernal *et al.*, 2007). Sin embargo, existe evidencia bibliográfica donde se observa que mutantes de *E. coli* delecionales en *cls* presentan un incremento de la fase de latencia y del tiempo de generación bajo condiciones normales de crecimiento (Tropp, 1997 y citas incluidas), comportamiento similar a lo obtenido para *P. putida* GP01.

Si bien no se muestra, es de destacar que cuando *P. putida* GP01 se hizo crecer en medios salinos en presencia de TDTMA como única fuente de carbono, nitrógeno y energía, no se detectó crecimiento, aún manteniendo el cultivo en las condiciones adecuadas de agitación y temperatura durante más de 5 días.

#### 4.1.6. Análisis fosfolipídico de *P. putida* A ATCC 12633 salvaje y mutante en condiciones no estresantes de crecimiento.

Células de *P. putida* A ATCC 12633 salvaje y mutante se hicieron crecer en medio rico LB o en medio mínimo con la adición de glucosa y NH<sub>4</sub>Cl hasta final de la fase exponencial (DO<sub>660</sub> = 0,8). En ese momento las células fueron cosechadas y se procedió al



análisis de PL. Cabe destacar que en todas las condiciones ensayadas se detectó un patrón de PL similar, identificándose en cada una de ellas: CL, PE, PG, PC, LPE y PA.

En la **Tabla 4.1.2** se muestran los resultados obtenidos de la composición fosfolipídica de células de *P. putida* A ATCC y de *P. putida* GP01, crecidas en medio LB.

Como se desprende del análisis de los resultados mostrados, el contenido de CL en la cepa mutante disminuyó aproximadamente un 35 % respecto a lo detectado en la cepa salvaje, sin embargo, la disminución de CL no se correlacionó con un incremento en el contenido de PG, precursor inmediato de CL.

**Tabla 4.1.2:** Composición fosfolipídica de *P. putida* A ATCC 12633 salvaje y mutante crecidas en medio LB.

PL	nmol PL/mg proteínas	
	<i>P. putida</i> A ATCC 12633	<i>P. putida</i> GP01
CL	0,70 ± 0,10 (8,91)	0,45 ± 0,03 (4,73)
PE	4,45 ± 0,35 (57,0)	6,11 ± 0,50 (64,31)
PG	1,32 ± 0,07 (16,71)	1,10 ± 0,26 (11,57)
PC	0,30 ± 0,09 (3,72)	0,59 ± 0,02 (6,21)
LPE	0,24 ± 0,01 (3,00)	0,41 ± 0,09 (4,31)
PA	0,29 ± 0,09 (3,40)	0,12 ± 0,02 (1,26)
Otros	0,55 ± 0,14 (6,28)	0,72 ± 0,50 (7,57)

Las células se hicieron crecer en medio rico LB hasta el final de la fase exponencial. En ese momento las células fueron cosechadas y los fosfolípidos extraídos, separados y cuantificados según Fiske y SubbaRow (1925). En paréntesis se indica el porcentaje que representa cada uno de los PL identificados y cuantificados como mol de Pi. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes ( $\pm$  SD, n = 3).

Como muestra la **Tabla 4.1.3**, cuando el análisis de PL se llevó a cabo en células de *P. putida* A ATCC 12633 y *P. putida* GP01 crecidas en medio salino suplementado con fuentes preferenciales de C y N, no se detectaron diferencias significativas a nivel del contenido de CL y PG. Sí se detectaron diferencias significativas entre ambas cepas en el contenido de PE, sin embargo, tanto en *P. putida* salvaje como mutante, PE sigue siendo el PL mayoritario.



**Tabla 4.1.3:** Composición fosfolipídica de *P. putida* A ATCC 12633 salvaje y mutante crecida en HPI-BSM con glucosa y NH<sub>4</sub>Cl.

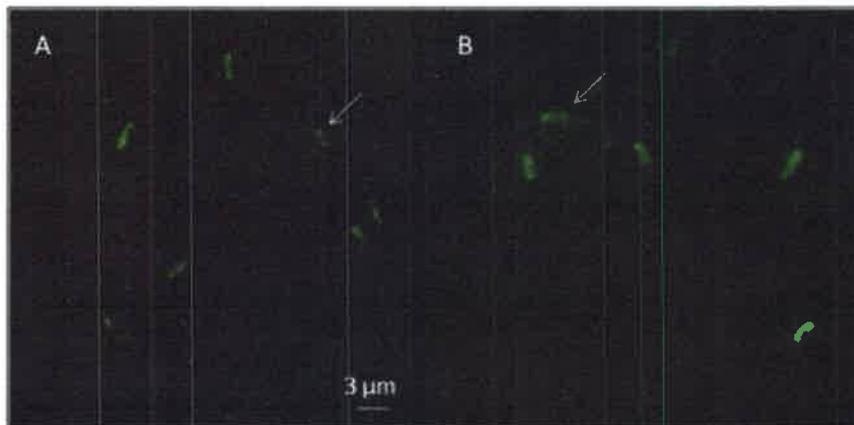
PL	nmol PL/mg proteínas	
	<i>P. putida</i> A ATCC 12633	<i>P. putida</i> GP01
CL	0,88 ± 0,07 (9,41)	1,53 ± 0,37 (17,44)
PE	5,99 ± 0,41 (64,06)	3,86 ± 0,31 (44,01)
PG	0,96 ± 0,04 (10,26)	1,38 ± 0,20 (15,73)
PC	0,48 ± 0,18 (5,13)	0,88 ± 0,08 (10,03)
LPE	0,54 ± 0,12 (5,77)	0,53 ± 0,06 (6,04)
PA	0,08 ± 0,02 (0,85)	0,11 ± 0,02(1,25)
Otros	0,42 ± 0,21 (4,49)	0,48 ± 0,16 (5,47)

Las células se hicieron crecer en medio HPI-BSM con glucosa y NH<sub>4</sub>Cl hasta DO<sub>660</sub> = 0,8. Los fosfolípidos fueron extraídos, separados y cuantificados según Fiske y SubbaRow (1925). En paréntesis se indica el porcentaje que representa cada uno de los PL identificados y cuantificados como mol de Pi. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes (± SD, n = 3).

Estos resultados, no esperados, difieren considerablemente de lo descrito para otras mutantes delecionales en *cls*, tal como *P. putida* DOT T1, *P. putida* P8 y *B. subtilis* Marburg 168, las cuales contienen cantidades trazas de CL y niveles aumentados del precursor inmediato, PG (von Wallbrunn *et al.*, 2004, Kaway *et al.*, 2004, Bernal *et al.*, 2007). Los escasos niveles de CL detectados en estas mutantes han sido atribuidos a la acción de una fosfatidilserina sintasa clase I (PSsAI), actividad enzimática capaz de condensar dos moléculas de PG, generando CL (Shibuya *et al.*, 1985; Nishijima *et al.*, 1988, Kaway *et al.*, 2004). En adición a estos antecedentes, ha sido demostrado que mutantes de *E. coli* afectadas en fosfatidilglicerol sintasa, presentan cantidades trazas de PG y CL. La síntesis de estos PL también ha sido atribuida a la acción de una PSsAI (Larson y Dowhan, 1976).

La **Figura 4.1.5** muestra la distribución de CL, visualizada por el uso del colorante fluorescente 10 *N-nonil* naranja de acridina (NAO) (apartado 3.13), en células de *P. putida* A ATCC 12633 y de *P. putida* GP01 crecidas en HPI-BSM en presencia de fuentes preferenciales de C y N hasta final de fase exponencial.





**Figura 4.1.5:** Visualización de CL en membranas: *P. putida* A ATCC 12633 y de *P. putida* GP01 se hicieron crecer en HPI-BSM en presencia de fuentes preferenciales de C y N hasta final de fase exponencial. En ese momento las células se cosecharon y se tiñeron con NAO, según lo descrito en (apartado 3.13). Los preparados fueron visualizados en microscopio de fluorescencia. A) *P. putida* A ATCC 12633, B) *P. putida* GP01. La flecha blanca indica las regiones donde se encuentra CL.

Como puede observarse, no se detectaron diferencias en la distribución de CL entre células de *P. putida* A ATCC 12633 salvaje y mutante. Los spots de fluorescencia verde fueron visualizados en los polos de células (indicados con flechas) y otros cercanos al septo de división (no mostrado), resultados que se correlacionan con el hecho de que ambas cepas, mutante y salvaje, contienen niveles similares de CL (Tabla 4.1.3). La distribución de CL detectada en los polos de las células coincide con lo demostrado en *P. putida* DOT T1, cepa salvaje tolerante a tolueno (Ramos *et al.*, 1995). En cepas mutantes de *P. putida* DOT T1 afectadas en CLs, el remanente de CL que se detecta presenta una distribución uniforme a lo largo de la membrana (Bernal *et al.*, 2007). Si bien estos mismos autores han observado, además, que el tamaño de las células de *P. putida* DOT T1 carentes de CL es más pequeño que el de la cepa salvaje, en nuestro caso determinamos que células de *P. putida* GP01 presentan una longitud mayor respecto a la determinada en la cepa parental ( $2,15 \pm 0,09 \mu\text{m}$  y  $1,46 \pm 0,13 \mu\text{m}$ , respectivamente).

En diferentes cepas de *Pseudomonas* ha sido observado que el nivel de cada PL individual varía de acuerdo con la fase de crecimiento en la que se encuentre el microorganismo. Así por ejemplo, PG es más abundante en fase exponencial de crecimiento, mientras que CL se acumula durante la fase estacionaria (Ramos *et al.*, 1997, Bernal *et al.*, 2007). La Tabla 4.1.4 muestra los resultados obtenidos de la composición de PL de células de *P. putida* A ATCC 12633 y de *P. putida* GP01 crecidas en HPI-BSM con la adición de glucosa y  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en etapas tempranas del crecimiento (inicio de fase exponencial,  $\text{DO}_{660} = 0,4$ ). A fines comparativos, también se muestra la composición fosfolipídica obtenida a final de fase exponencial de crecimiento ( $\text{DO}_{660} = 0,8$ ).

THE  
MOUNTAIN  
VIEW  
CAMP  
AND  
THE  
MOUNTAIN  
VIEW  
CAMP  
AND  
THE  
MOUNTAIN  
VIEW  
CAMP

**Tabla 4.1.4:** Composición fosfolipídica de *P. putida* A ATCC 12633 salvaje y mutante en diferentes etapas del crecimiento bacteriano.

PL	nmol PL/mg proteínas			
	<i>P. putida</i> A ATCC 12633		<i>P. putida</i> GP01	
	DO <sub>660</sub> :0,4	DO <sub>660</sub> :0,8	DO <sub>660</sub> :0,4	DO <sub>660</sub> :0,8
CL	0,89 ± 0,07 (6,96)	0,88 ± 0,07 (9,41)	1,21 ± 0,46 (11,37)	1,53 ± 0,37 (17,44)
PE	7,78 ± 1,13 (60,92)	5,99 ± 0,41 (64,06)	4,88 ± 0,65 (45,86)	3,86 ± 0,31 (44,01)
PG	2,01 ± 0,04 (15,74)	0,96 ± 0,04 (10,26)	1,40 ± 0,38 (13,15)	1,38 ± 0,20 (15,73)
PC	0,32 ± 0,05 (2,50)	0,48 ± 0,18 (5,13)	0,86 ± 0,07 (8,02)	0,88 ± 0,08 (10,03)
LPE	0,50 ± 0,13 (3,91)	0,54 ± 0,12 (5,77)	0,44 ± 0,07 (4,13)	0,53 ± 0,06 (6,04)
PA	0,92 ± 0,07 (7,20)	0,08 ± 0,02 (0,85)	1,49 ± 0,03 (14,00)	0,11 ± 0,02 (1,25)
Otros	0,35 ± 0,04 (2,74)	0,42 ± 0,21 (4,49)	0,36 ± 0,01 (3,36)	0,48 ± 0,16 (5,47)

Las células se hicieron crecer en medio HPI-BSM con glucosa y NH<sub>4</sub>Cl hasta DO<sub>660</sub> de 0,4 y 0,8 respectivamente. Los fosfolípidos fueron extraídos, separados y cuantificados según Fiske y SubbaRow (1925). En paréntesis se indica el porcentaje que representa cada uno de los PL identificados y cuantificados como mol de Pi. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes (± SD, n = 3).

Como se desprende del análisis de estos resultados, el patrón fosfolipídico detectado en *P. putida* GP01 es muy similar independientemente de la fase de crecimiento que se analice, y no se detectan cambios significativos en el contenido de CL. La diferencia más notable fue el alto contenido de PA que se detecta cuando el cultivo se encuentra en fase exponencial temprana (1,49 nmol PL mg/prot), respecto a lo obtenido al final de fase logarítmica (0,11 nmol PL mg/prot). El nivel incrementado de PA detectado al inicio de la fase exponencial de crecimiento en *P. putida* GP01, el cual también se pone de manifiesto en la cepa parental *P. putida* A ATCC 12633 probablemente se deba a que PA es un intermediario común para la biosíntesis de novo de PL (**Figura 2.3**).

En conjunto, estos resultados que muestran que *P. putida* GP01 presenta una distribución y valores de CL semejantes a los detectados en su cepa parental en todas las condiciones cultivo analizadas, permite proponer que, posiblemente, otro gen, además del gen homólogo a *cls* (*pp5364*), es responsable de la síntesis de CL en *P. putida* A ATCC 12633. No debe descartarse, además, la posibilidad de que otras enzimas que guardan cierta homología con CLs, como es el caso de fosfatidilserina sintasa clase I, también estén involucradas en la síntesis de este PL (Shibuya *et al.*, 1985, Nishijima *et al.*, 1988, Kaway *et al.*, 2004).

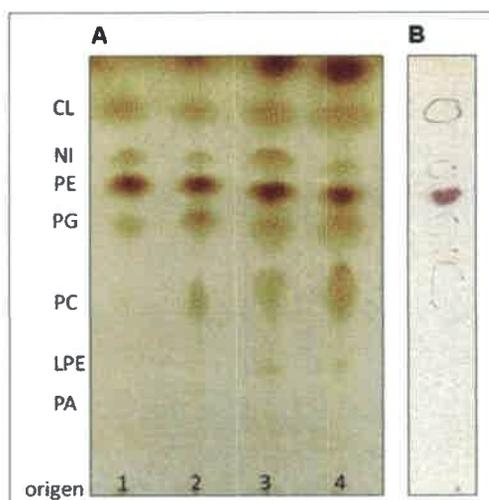
Guo y Tropp, (2000) han descrito en *E. coli* un segundo gen cuyo producto tiene actividad CLs, llamado *f413*. F413 presenta una extensa región de homología (101



identidades) con la CLs ya descrita para esta cepa. Sin embargo, el producto del gen *f413* es de menor tamaño que CLs debido a la ausencia de aproximadamente 100 aminoácidos hacia el extremo *N*-terminal. También ha sido demostrado que la proteína F413 tiene la capacidad de sintetizar CL *in vitro*, pero no *in vivo*. Esta falta de actividad *in vivo* ha sido atribuida a la ausencia de estos 100 aminoácidos, ya que se cree que los mismos estarían involucrados en su transporte a la membrana y en el correcto funcionamiento de la enzima (Guo y Tropp, 2000).

#### 4.1.7. Análisis fosfolipídico de *P. putida* GP01 en condiciones estresantes de crecimiento.

A pesar de que el contenido de CL detectado en *P. putida* GP01 fue similar al encontrado en su cepa parental, se procedió a analizar la respuesta de la cepa mutante ante la presencia de TDTMA. Para ello, *P. putida* GP01 se hizo crecer en medios salinos con la adición de fuentes preferenciales de C y N hasta final de fase exponencial y, en ese momento, las células fueron expuestas o no, durante 15 min, a 50 mg/l de TDTMA. A fines comparativos, se procedió de la misma forma con la cepa parental. La **Figura 4.1.6** muestra una TLC representativa de los PL identificados para ambas cepas, salvaje y mutante, expuestas o no a TDTMA. La **Tabla 4.1.5** muestra los valores obtenidos de la cuantificación de los diferentes PL identificados en la cepa mutante, expuesta o no al detergente.



**Figura 4.1.6:** Patrón fosfolipídico de *P. putida* A ATCC 12633 y *P. putida* GP01. Las células se hicieron crecer en medio HPI-BSM, Glucosa/NH<sub>4</sub>Cl hasta DO<sub>660</sub>=0,8 y fueron estimuladas o no con TDTMA durante 15 minutos. Los PL fueron extraídos, separados por TLC desarrollada con cloroformo:metanol:H<sub>2</sub>O (65:25:4) e identificados por comparación de sus R<sub>f</sub> con testigos correspondiente. A) Calles 1 y 2: células de *P. putida* A ATCC 12633 sin estimular y estimuladas, respectivamente. Calles 3 y 4: *P. putida* GP01 sin estimular y estimuladas, respectivamente. B) Tinción con ninhidrina. Referencias: PE, fosfatidiletanolamina; PG, fosfatidilglicerol; CL, cardiolipina; PA, ácido fosfatídico; PC, fosfatidilcolina; LPE, lisofosfatidiletanolamina.



**Tabla 4.1.5:** Composición de fosfolípidos de *P. putida* GP01 crecidas en HPI-BSM-Glucosa/NH<sub>4</sub>Cl expuestas o no a TDTMA.

PL	nmol PL/mg proteínas de <i>P. putida</i> GP01	
	Glucosa/ NH <sub>4</sub>	TDTMA 15 min
CL	1,53 ± 0,37 (17,44)	1,37 ± 0,14 (11,11)
PE	3,86 ± 0,31 (44,01)	3,55 ± 0,56 (28,79)
PG	1,38 ± 0,20 (15,73)	2,66 ± 1,18 (21,57)
PC	0,88 ± 0,08 (10,03)	1,08 ± 0,02 (8,75)
LPE	0,53 ± 0,06 (6,04)	1,06 ± 0,16 (8,59)
PA	0,11 ± 0,02 (1,25)	1,03 ± 0,29 (8,35)
Otros	0,48 ± 0,16 (5,47)	1,58 ± 0,59 (12,81)

Células de *P. putida* GP01 se hicieron crecer en medio HPI-BSM, glucosa y NH<sub>4</sub>Cl hasta el final de la fase exponencial. En ese momento las células fueron expuestas o no durante 15 min a 50 mg/l de TDTMA. Los fosfolípidos fueron extraídos y cuantificados según Fiske y SubbaRow (1925). En paréntesis se indica el porcentaje que representa cada uno de los PL identificados y cuantificados como mol de Pi. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes ( $\pm$  SD, n = 3).

Como puede observarse, el patrón de PL es similar para ambas cepas y en las dos condiciones evaluadas, ausencia o presencia de TDTMA. La modificación más notoria detectada en células de la cepa mutante expuestas a TDTMA, en comparación con células no expuestas, fue el incremento de aproximadamente 10 veces en el nivel de PA. Estos resultados coinciden parcialmente con los obtenidos para la cepa salvaje (Boeris *et al.*, 2007), ya que si bien en la cepa mutante como respuesta a la exposición al surfactante se observa incremento en el contenido de PA, no se detectó aumento significativo de PG ni disminución de CL. A pesar de estas diferencias, nuevamente se pone en evidencia que PA es un PL importante involucrado en la respuesta de *P. putida* A ATCC 12633 a TDTMA y que su aumento puede correlacionarse con la capacidad de este PL de neutralizar la alta carga positiva del detergente (Boeris *et al.*, 2007).

Si se tiene en cuenta que cuando la cepa mutante *P. putida* GP01 es expuesta a TDTMA no se detectan niveles disminuidos de CL (Tabla 4.1.5), sumados a los resultados que muestran que los niveles de CL en esta cepa no se modifican en ninguna de las condiciones de cultivo analizadas (Tablas 4.1.2, 4.1.3 y 4.1.4), planteamos la posibilidad de que la mutación generada haya afectado una actividad PLD cuyo sustrato sería CL.

Como se expuso al comienzo de esta sección, resultados preliminares realizados en base a la capacidad de PLD de transfosfatidilar grupos alcoholes generando el fosfatidilalcohol correspondiente, mostraron un incremento de actividad PLD en células de *P. putida* A ATCC 12633 enfrentadas al TDTMA (Figura 4.1.1). Esto llevó a plantear que, posiblemente, una actividad PLD podría actuar a nivel de CL generando el incremento de



PG y PA detectados. Como se mencionó anteriormente, el motivo HKD que caracteriza a la superfamilia de las PLD, les confiere similar mecanismo de acción a sus miembros (Ponting y Kerr, 1996). Por ejemplo, en *E. coli* ha sido demostrado que CLs es capaz de transfosfatidilar alcoholes, tales como manitol, originando el fosfatidilalcohol correspondiente (Shibuya *et al.*, 1985, Shibuya, 1992). En este microorganismo, también ha sido demostrado que F413 (CLs2) es capaz de sintetizar CL *in vitro* e hidrolizar PG generando PA, sin embargo F413 no puede transfosfatidilar grupos alcoholes (Guo y Tropp, 2000). El análisis por BLASTP en función de la secuencia de aminoácidos de PP5364 de *P. putida* KT2440 mostró que este ORF presenta un 98 % de identidad de aminoácidos con las PLDs/Transfosfatidilasas hipotéticas de *Ralstonia pickettii* 12J (YP\_001892697) y de *Burkholderia sp.* H160.

#### 4.1.8. Actividad fosfolipasa D en *P. putida* A ATCC 12633 salvaje y mutante.

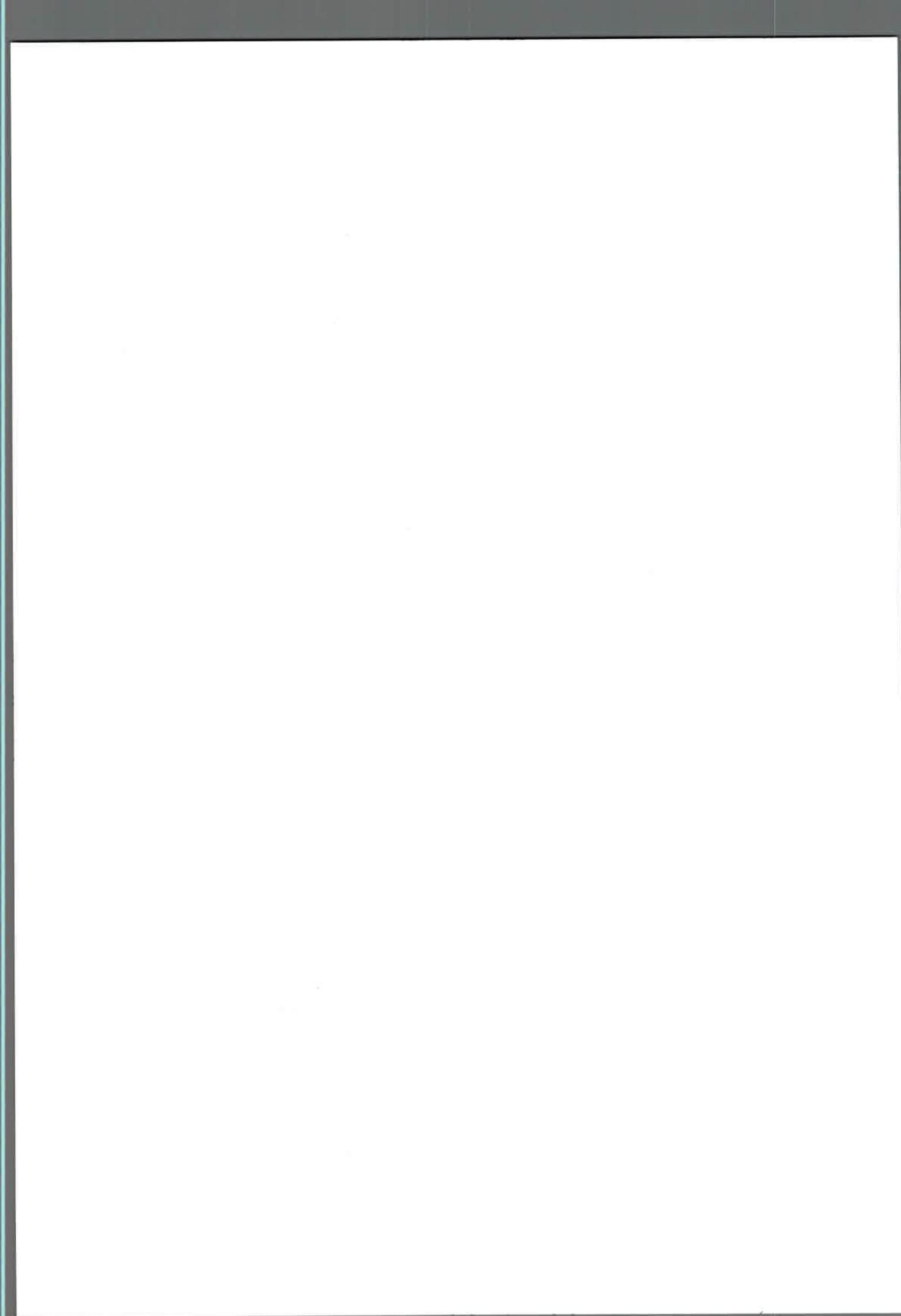
La determinación de actividad PLD se llevó a cabo con extractos libres de células provenientes de cultivos de *P. putida* A ATCC 12633 y de su mutante derivada, *P. putida* GP01 crecidas con fuentes preferenciales de carbono y nitrógeno. Los productos de reacción, PG y PA, fueron separados por TLC, identificados por tinción con yodo y cuantificados por Fiske y SubbaRow (1925) según lo descrito en Materiales y Métodos (apartado 3.9.4). La **Tabla 4.1.6** muestra los resultados obtenidos.

**Tabla 4.1.6:** Actividad PLD en *P. putida* A ATCC 12633 salvaje y mutante.

Extractos libres de células	Actividad PLD	
	nmol PA/min/mg prot	nmol PG/min/mg prot
<i>P. putida</i> A ATCC 12633	0,23	0,058
<i>P. putida</i> GP01	ND	ND

*P. putida* GP01 y su cepa parental se hicieron crecer en HPI-BSM con fuentes preferenciales de C y N hasta final de fase exponencial. En ese momento las células fueron cosechadas, lavadas y sonicadas. El extracto libre de células obtenido utilizado como fuente enzimática. La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 500µl, 2 mg/ml de proteínas, buffer fosfato de sodio 0,1 M pH 7, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, ATP 2,8 mM, cardiolipina 1 µM. Los productos de reacción, PA y PG, fueron separados en TLC, desarrollada en cloroformo:metanol:H<sub>2</sub>O (65:25:4), identificados por vapores de yodo y cuantificados según Fiske y SubbaRow (1925). ND: no detectado

Como se desprende del análisis de la **Tabla 4.1.6**, los productos de reacción de la actividad PLD sólo se detectaron con los extractos provenientes de células de *P. putida* A ATCC 12633.

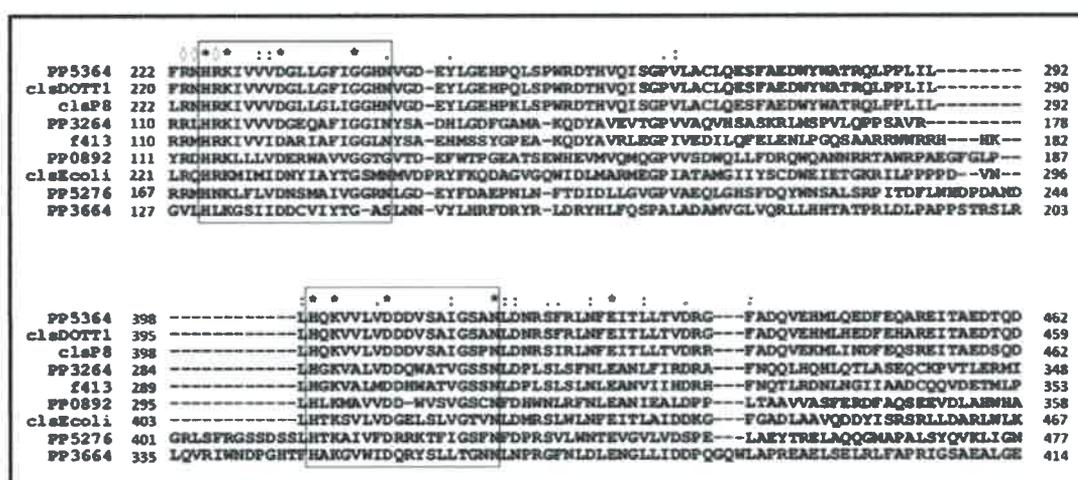


Si bien hasta el momento no es posible descartar que el producto del gen homólogo a *pp5364* de *P. putida* A ATCC 12633 posea una acción dual CLs/PLD, estos resultados fuertemente sugieren que la mutación generada afectó una actividad PLD. Es de hacer notar que, en las condiciones de ensayo realizadas (1 h de incubación (apartado 3.11.3)), la cantidad PA detectado fue mayor que la cantidad de PG, a pesar que se esperaban valores similares ya que ambos productos provienen de la hidrólisis de CL. Probablemente esta diferencia puede ser atribuida a la función esterasa de PLD (Ponting y Kerr, 1996) y que, en función del tiempo de ensayo, PLD actúe no solo a nivel de CL, sino además, lo haga a nivel de PG incrementando así los valores de PA detectados (ver perspectivas).

#### 4.1.9. Análisis de ORFs de *P. putida* KT2440 candidatos a codificar una segunda CLs.

Como se describió previamente, CLs pertenece a la superfamilia de las PLD, la cual se caracteriza por tener el motivo consenso HKD (H X K (X)4 D (X)6 G (X)2 N) repetido 2 veces (Ponting y Kerr, 1996). En adición a esta secuencia consenso, han sido descritos otros aminoácidos conservados, propios de las CLs: R N (Q) H R K, donde H y K pertenecen al primer motivo HKD (Guo y Tropp, 2000).

Con el objetivo de identificar la secuencia conservada característica de las CLs y seleccionar potenciales candidatos, se realizaron alineamientos basados en la secuencia de aminoácidos de varias CLs descriptas y de los diferentes ORFs seleccionados (Tabla 4.1.1). La Figura 4.1.7 muestra los resultados obtenidos. A fines prácticos solo se muestran los residuos pertenecientes a los motivos HKD y las regiones contiguas a los mismos.



**Figura 4.1.7:** Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de diferentes ORFs de *P. putida* KT2440 homólogos a CLs. Los alineamientos se llevaron a cabo utilizando en programa Clustal X. Los residuos pertenecientes al motivo consenso HKD están recuadrados. Los rombos indican residuos propios descriptos para las CLs. Referencias clsDOTT1 (CLs de *P. putida* DOT T1,



AY960982), clSP8 (CLs de *P. putida* P8, CAD29690), clSEcoli (CLs de *E. coli* U15986), f413 (CLs 2 de *E. coli* EGT66975).

Como se desprende del análisis de la **Figura 4.1.7**, PP3264, PP0892, PP5276 y PP3664, contienen los motivos HKD característicos de los miembros de esta familia (recuadros). Cuando se analizan los aminoácidos propios descriptos para las CLs (indicados con rombos) (Guo y Tropp, 2000) puede observarse que PP5276 contiene asparragina (N) reemplazando el segundo residuo de arginina (R). En PP3664, el primer y segundo residuo de arginina (R) está suplantado por valina (V) y leucina (L), respectivamente. Por último, PP3264 y PP0892, no presentan asparragina (N) o glutamina (Q), estos aminoácidos son reemplazados por residuos de leucina (L) y ácido aspártico (D), según corresponda a PP3264 y PP0892, respectivamente. Si analizamos la secuencia correspondiente a F413 (cardiolipina sintasa 2 de *E. coli*), podemos observar variaciones semejantes a lo descripto para PP3264 y PP0892, ya que F413 presenta metionina (M) en lugar de asparragina (N) o glutamina (Q).

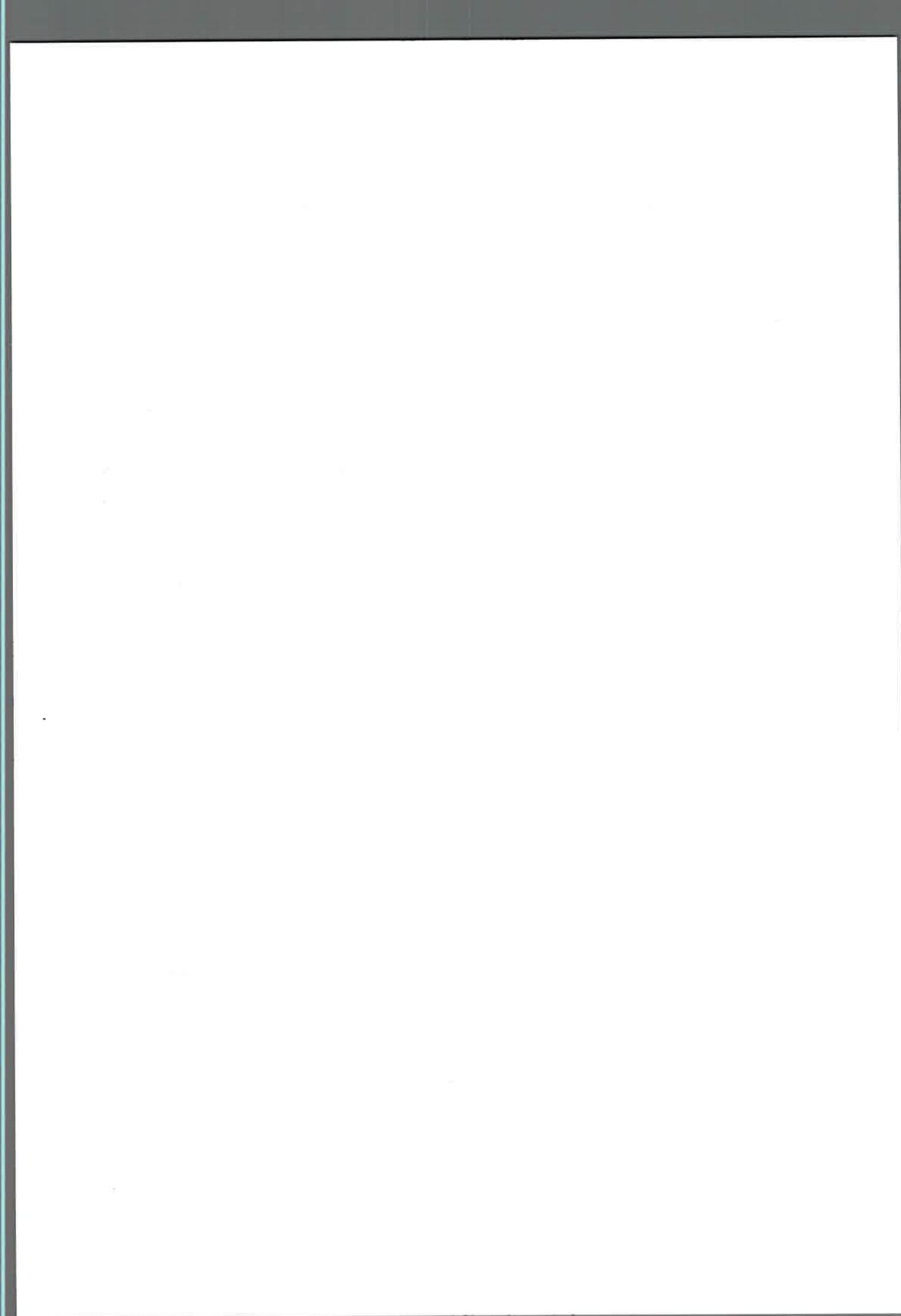
Posterior análisis *in silico* comparando la secuencia aminoacídica de PP3264 y PP0892 respecto a la secuencia de F413, brindaron la siguiente información (**Tabla 4.1.7**).

**Tabla 4.1.7:** Comparación de F413, PP0892 y PP3264.

	ORFs	PP0892	PP3264
Respecto a: F413	Max score	153	426
	% cobertura	86	95
	E value	$5 \times 10^{-45}$	$5 \times 10^{-151}$
	% de identidad de AA	31	52

Las secuencias de aminoácidos de PP3264 y de PP0892, fueron comparadas con la secuencia de aminoácidos correspondiente a *cardiolipina sintasa 2* de *E. coli* (F413, EGT66975), utilizando las herramientas provistas por el National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Basados en estos análisis y considerando los valores de los diferentes parámetros bioinformáticos mostrados en la **Tabla 4.1.1**, consideramos al *orf pp3264* como un posible candidato de codificar para una CLs. Si bien, PP3264 muestra la ausencia de aproximadamente unos 100 aminoácidos hacia el extremo *N*-terminal, de manera similar a lo descripto para F413 de *E. coli* (Guo y Tropp, 2000), tal vez en *P. putida* sea una actividad funcional *in vivo* y, en consecuencia, la responsable de la síntesis de CL presente en la membrana de *P. putida* GP01 (ver perspectivas).



## Sección II

Participación de fosfatidilcolina en la respuesta de *P. putida* A ATCC 12633 frente al estrés ocasionado por TDTMA y  $Al^{+3}$ 4.2.1. Composición fosfolipídica de células de *P. putida* A ATCC 12633 crecida con TDTMA como única fuente de C y N.

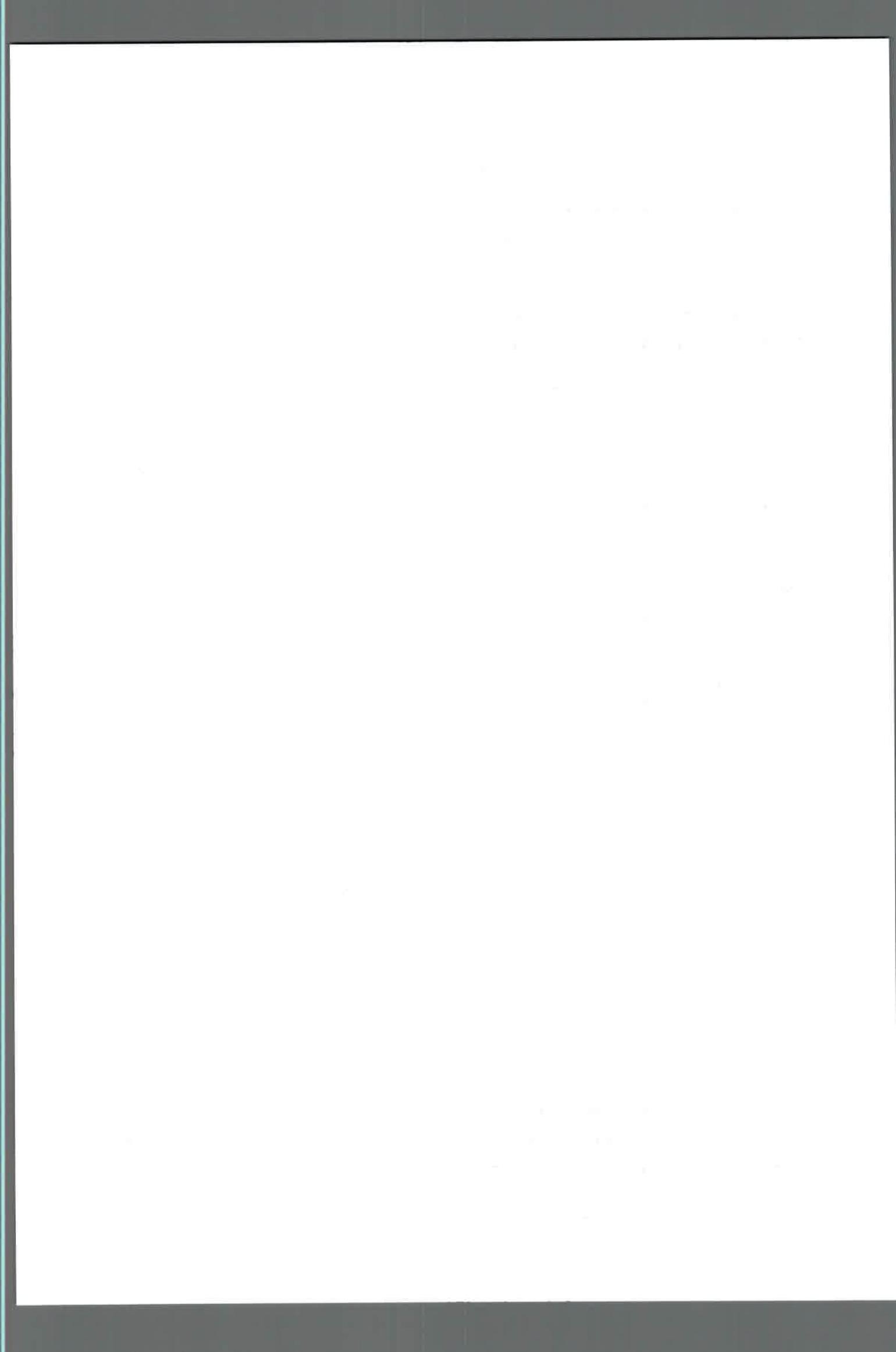
*P. putida* A ATCC 12633 es capaz de crecer en presencia del detergente catiónico TDTMA utilizándolo como única fuente de carbono, nitrógeno y energía (Liffourrena *et al.*, 2008). Con el propósito de conocer la composición fosfolipídica del microorganismo en esta condición nutricional, las células se hicieron crecer en medios salinos con 50 mg/l TDTMA y, una vez alcanzada la fase exponencial de crecimiento ( $D_{660}=0,4$ ) se procedió a la extracción, identificación y cuantificación de fosfolípidos. La **Tabla 4.2.1** muestra los valores obtenidos de la cuantificación total de PL. A efectos comparativos, se muestran los resultados obtenidos cuando *P. putida* A ATCC 12633 se hizo crecer en presencia de fuentes preferenciales de C y N.

**Tabla 4.2.1:** Fosfolípidos totales de *P. putida* A ATCC 12633 crecida con diferentes fuentes de Carbono y/o Nitrógeno.

	Condición de cultivo	
	Glucosa/ $NH_4Cl$	TDTMA
$DO_{660}$	$0,83 \pm 0,05$	$0,39 \pm 0,02$
ufc/ml	$6,65 \pm 1,00 (x10^{12})$	$1,00 \pm 0,05 (x10^7)$
mg prot/ml	$1,22 \pm 0,28$	$0,057 \pm 0,010$
nmol PL/mg prot	$15,51 \pm 0,76$	$27,89 \pm 5,65$
nmol PL/ufc	$9,18 \pm 0,8 (x10^{-12})$	$7,53 \pm 1,00 (x10^{-7})$

*P. putida* A ATCC 12633 se hizo crecer en HPI-BSM con glucosa y  $NH_4Cl$  o TDTMA como fuente de C y N hasta fase exponencial. En ese momento se procedió a la determinación del número de células viables, proteínas totales y PL totales según se describe en Materiales y Métodos. Los datos representan la media  $n=3 \pm SD$ .

Como puede observarse, el contenido de PL totales, expresado en nmoles de PL/mg de proteínas, incrementó aproximadamente un 80 % en células crecidas con el surfactante, respecto a aquellas crecidas con fuentes preferenciales de C y N (**Fila 4**). Este incremento también se puso de manifiesto cuando se relacionaron los nmoles de PL en función de la



viabilidad celular (**Fila 5**). El comportamiento obtenido difiere de aquel observado cuando *P. putida* A ATCC 12633 es enfrentada por períodos cortos de tiempo a TDTMA, ya que en esta condición no se detectaron cambios significativos en el contenido de PL totales (Boeris *et al.*, 2007).

El aumento PL totales permite sugerir un posible mecanismo de reparación de membranas para remediar los daños ocasionados por el detergente, posiblemente debido a un incremento en la tasa de biosíntesis de novo de los mismos. Es posible que en *P. putida* A ATCC 12633 el incremento de PL totales disminuya la adsorción de TDTMA a la membrana celular y permita la sobrevivencia del microorganismo en esta condición adversa de crecimiento. Apoyando este planteo, en células de *P. aeruginosa* resistentes al QAC cloruro de benzalconio (BC) ha sido descrito un comportamiento similar, que involucra el aumento de PL totales acompañado de incremento en los niveles de lípidos ácidos y neutros (FNL). A diferencia de la cepa de *P. aeruginosa* sensible a BC, los niveles incrementados de PL y FNL detectados en la cepa resistente llevan a una menor adsorción de BC en la membrana y, consecuentemente, a un incremento de la resistencia bacteriana al surfactante (Sakagami *et al.*, 1989).

El análisis del contenido de PL específicos mostró un patrón fosfolipídico semejante para células crecidas con glucosa/NH<sub>4</sub>Cl ó TDTMA (**Tabla 2.4.2**). Los fosfolípidos identificados fueron CL, PE, PG, PC, LPE y PA. En ambos casos, PE fue el PL mayoritario (porcentaje superior al 50 % del total), mientras que el resto de los PL identificados representa entre el 2 % y 20 % del total. Como se desprende del análisis de **Tabla 2.4.2**, en células crecidas con TDTMA, respecto a aquellas crecidas con fuentes preferenciales de C y N, los niveles de PG y PA incrementaron notablemente (6 y 20 veces, respectivamente). Este resultado, en concordancia con lo detectado en células de *P. putida* A ATCC 12633 expuestas durante 15 min al surfactante o adaptadas a crecer en presencia de concentraciones crecientes del mismo (Boeris *et al.*, 2007), reafirma nuevamente el importante papel de estos PL aniónicos en la sobrevivencia de *P. putida* A ATCC 12633 frente a la presencia de TDTMA, utilizando principalmente PA para neutralizar la alta densidad de carga positiva dada por el detergente (Boeris *et al.*, 2007).

Por otro lado, es de destacar que el contenido en los niveles de CL no se modifica en células crecidas con TDTMA, respecto a lo que se detecta cuando el microorganismo crece con fuentes preferenciales de C y N (**Tabla 4.2.2**). Ello sugiere que la disminución en los niveles de CL observada cuando *P. putida* se enfrenta a TDTMA (Boeris *et al.*, 2007), es importante sólo en la respuesta rápida al surfactante y conducen a plantear nuevamente que la hidrólisis de CL por acción de una actividad PLD puede ser uno de los mecanismos que,



en forma rápida y eficiente, permita generar parte de los aumentos de PA y PG, necesarios para contrarrestar el daño inicial ocasionado por el detergente en la membrana.

**Tabla 4.2.2:** Composición fosfolipídica de *P. putida* A ATCC 12633 crecida en presencia de glucosa y NH<sub>4</sub>Cl o TDTMA.

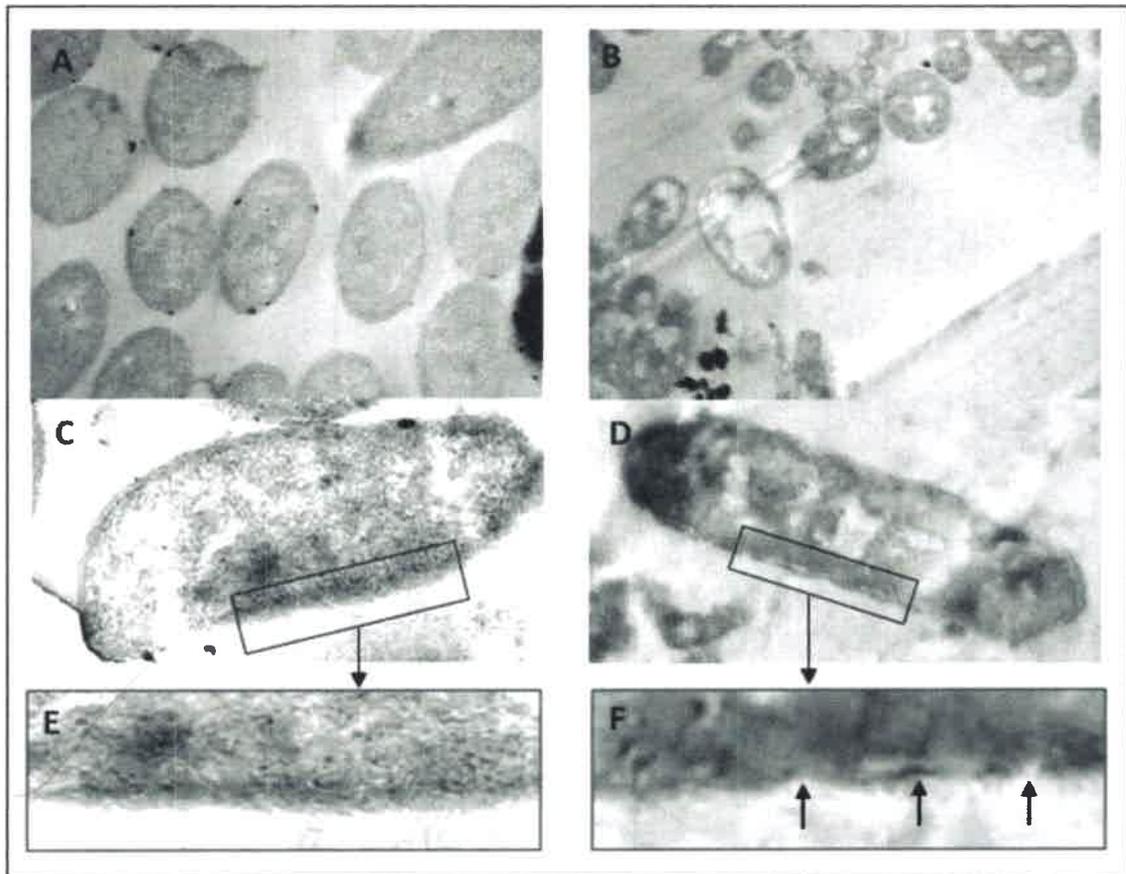
PL	nmoles PL/ mg de proteínas	
	Glucosa/NH <sub>4</sub> Cl	TDTMA
CL	0,87 ± 0,07 (5,99)	1,21 ± 0,13 (3,9)
PE	11,12 ± 0,25 (76,63)	16,11 ± 2,35 (52,9)
PG	0,93 ± 0,14 (6,40)	6,19 ± 0,37 (20,3)
PC	0,27 ± 0,04 (1,86)	0,72 ± 0,28 (2,4)
LPE	0,67 ± 0,02 (4,61)	1,66 ± 0,36 (5,5)
PA	0,07 ± 0,01 (0,48)	1,43 ± 0,09 (4,7)
Otros	0,58 ± 0,02 (3,99)	3,15 ± 0,05 (10,3)
PC/PE	0,02	0,04

*P. putida* A ATCC 12633 se hizo crecer en HPI-BSM con glucosa y NH<sub>4</sub>Cl o TDTMA hasta fase exponencial. En ese momento las células fueron cosechadas y los fosfolípidos extraídos. Los fosfolípidos fueron separados por TLC monodireccional, utilizando como mezcla de solvente cloroformo:metanol:H<sub>2</sub>O (65:25:4, v/v), identificados por comparación de sus R<sub>f</sub> con testigos correspondiente y cuantificados según Fiske & SubbaRow (1925). En paréntesis se indica el porcentaje que representa cada uno de los PL identificados y cuantificados como mol de Pi. Los datos representan la media n=3 ± SD.

#### 4.2.2. Análisis estructural de células de *P. putida* A ATCC 12633.

Para ejercer su efecto bactericida, la acción de los agentes catiónicos, está centrada en la disrupción física y en la solubilización de la pared y membrana celular (McDonell y Russell, 1999). A través de microscopía electrónica de transmisión (TEM) se evaluó la integridad de las membranas celulares del microorganismo crecido con fuentes preferenciales de carbono y nitrógeno o con TDTMA (**Figura 4.2.1**).





**Figura 4.2.1:** Microscopía electrónica de transmisión (TEM). Células de *P. putida* A ATCC 12633 se hicieron crecer en HPI-BSM con la adición de glucosa/ $\text{NH}_4\text{Cl}$  (A, C y E) o con TDTMA (B, D y F) como fuente de C y N. Las células fueron cosechadas y observadas al microscopio electrónico de transmisión. (16700x).

En las imágenes presentadas en la **Figura 4.2.1** se puede observar que las células que crecieron con fuentes preferenciales de C y N (**panel C**) muestran un tamaño celular mayor que aquellas que crecieron en presencia de TDTMA (**panel D**) y que la presencia del surfactante (**panel B**) no altera la integridad de la membrana celular. Se observa, además, en el citoplasma de *P. putida* A ATCC 12633 crecida con TDTMA (**panel B**) regiones más claras o estructuras intracelulares, ausentes si la cepa crece en presencia de glucosa y  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (**panel A**), donde el citoplasma se observa más compacto. Este tipo de estructuras internas han sido observadas cuando células de *P. aeruginosa* resistentes a cloruro de benzalconio crecen en presencia de este QAC (Hoffmann *et al.*, 1976). Bajo esta condición nutricional, estos autores han observado la formación de estructuras en el citoplasma a las que denominaron “pseudovacúolas”, rodeadas de un material difuso, propagado irregularmente en todo el citoplasma. Un análisis más exhaustivo de estas pseudovacúolas demostró que las mismas contienen membranas trilaminares, de tamaño similar a la membrana interna. Si bien estas pseudovacúolas son de función desconocida, la presencia



de las mismas ha sido atribuida a una compartimentalización del citoplasma (Hoffmann *et al.*, 1976).

En los paneles E y F de la Figura 4.2.1 se muestran imágenes ampliadas de las membranas celulares de *P. putida* A ATCC 12633. Cuando las células se hicieron crecer con TDTMA, se observa la presencia de pequeñas invaginaciones de membranas (panel F), las que están ausentes en las membranas de *P. putida* A ATCC 12633 crecidas con fuentes preferenciales de C y N (panel E). La presencia de invaginaciones de membrana han sido descritas en un amplio número de microorganismos y han sido asociadas a diferentes funciones, entre ellas, el de proporcionar a la célula de un incremento del área de la superficie de la membrana favoreciendo el accionar de ciertas enzimas de membrana involucradas en procesos metabólicos (van Niftrik *et al.*, 2004 y citas incluidas). Es probable que la presencia de las pequeñas invaginaciones de membranas sumadas a las posibles estructuras trilaminares de las pseudovacúolas detectadas cuando *P. putida* A ATCC 12633 crece con TDTMA como única fuente de C y N, guarden relación con el notable incremento de PL totales que se observa en esta condición nutricional (Tabla 4.2.1). Como consecuencia del incremento en el contenido de PL, la adsorción de TDTMA a la membrana celular sería menor y permitiría una mayor sobrevivencia del microorganismo en esta condición adversa de crecimiento.

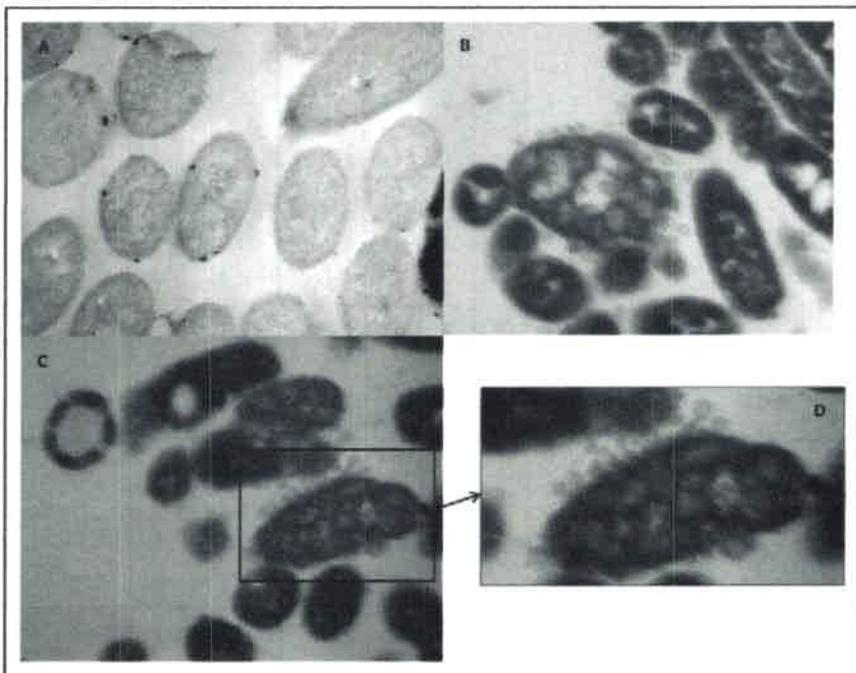
En ciertas condiciones desfavorables de crecimiento, tales como bajos pH, estrés osmótico y limitación de N, los microorganismos incrementan los niveles de polifosfatos (poliP) y los acumulan en su citoplasma en forma de gránulos (Ault-Riché *et al.*, 1998, Mullan *et al.*, 2002, Tobin *et al.*, 2007, Docampo, 2008). Estos gránulos intracelulares, caracterizados por su alto contenido en fósforo, se encuentran limitados por membrana, la que ha sido observada por microscopía electrónica (Seufferheld *et al.*, 2003, 2004). Los gránulos de poliP que se detectan por la alta densidad electrónica que presentan, son esféricos, con diámetro de entre 15 a 200 nm, están presentes en la célula en número variable ocupando un 1 % del volumen celular, si bien, en condiciones de estrés, tal como el tratamiento con metales, esta proporción suele llegar al 23 % (Seufferheld *et al.*, 2004). La presencia de poliP ha sido asociada a múltiples funciones, entre ellas las de actuar como quelantes de cationes bivalentes ( $Mn^{+2}$  y  $Ca^{+2}$ ) e iones metálicos tóxicos ( $Cd^{+2}$  y  $Hg^{+2}$ ), sustituir al ATP y ser reservorios de fósforo (Rao *et al.*, 1998 y citas incluidas, Mullan *et al.*, 2002).

Como se desprende del análisis de la Figura 4.2.1, si bien la presencia de TDTMA es una condición de estrés para el crecimiento bacteriano, no se observaron, por TEM, estructuras indicativas de la presencia de gránulos de poliP en *P. putida* A ATCC 12633 crecida con TDTMA como única fuente de C y N. Cabe destacar que no se detectaron



variaciones significativas en el contenido de poliP cuando los mismos fueron cuantificados en células crecidas con el detergente o con fuentes preferenciales de C y N (no mostrado).

Adicionalmente, entre los mecanismos de resistencia descritos que les permiten a los microorganismos crecer en condiciones ambientales desfavorables, varios autores han observado la liberación de vesículas de membrana externa (MVs) (Kobayashi *et al.*, 2000, McBroom y Kuehn, 2007). La liberación de estas vesículas ofrece a la célula una estrategia efectiva para la remoción de compuestos no deseados y/o modificación de la envoltura celular cuando el remodelamiento de la membrana no es ventajoso (McBroom y Kuehn, 2007). La **Figura 4.2.2** muestra los resultados obtenidos de la búsqueda de estas estructuras por TEM a partir de los extendidos de las células de *P. putida* A ATCC 12633 crecidas en presencia u ausencia de TDTMA.



**Figura 4.2.2:** Vesículas de *P. putida* A ATCC 12633 vistas por microscopía electrónica de transmisión (TEM). Células de *P. putida* A ATCC 12633 se hicieron crecer en HPi-BSM con la adición de glucosa/ $\text{NH}_4\text{Cl}$  (A) o con TDTMA (B, C y D) como fuente de C y N. Las células fueron cosechadas y observadas al microscopio electrónico de transmisión (Panel A: 16700x, Panel B y C: 21560x).

Como puede observarse, células de *P. putida* A ATCC 12633 crecidas en presencia de TDTMA (panel B, C y D) fueron capaces de formar MVs y liberarlas al medio. Este tipo de estructuras están ausentes cuando las células se hicieron crecer con fuentes preferenciales de C y N (panel A).

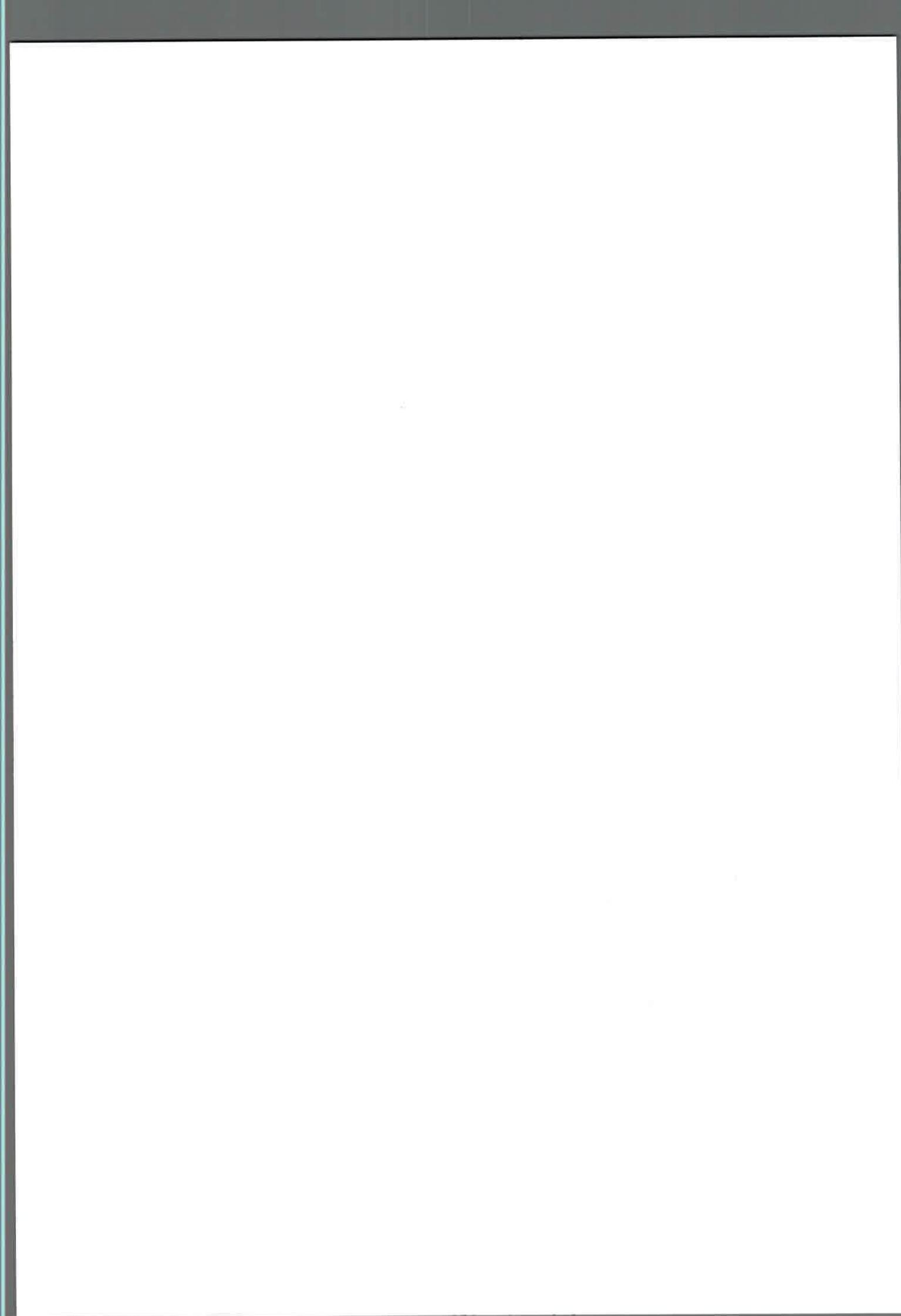


La liberación de MVs ha sido descrita en la cepa tolerante a tolueno, *P. putida* IH-2000 (Kobayashi *et al.*, 2000). Las vesículas liberadas, las cuales contiene tolueno en su interior, están constituidas por componentes de la membrana externa, entre ellos: PL, lipopolisacárido (LPS) y una pequeña cantidad de proteínas (Kobayashi *et al.*, 2000). En *P. aeruginosa* las MVs han sido intensivamente estudiadas, particularmente debido a que las mismas son responsables de transportar factores de virulencia (Ellis y Kuehn, 2010), moléculas responsables del quórum-sensing (Mashburn y Whitely, 2005) o componentes del biofilm (Schooling y Beverige, 2005). Tashiro y col. (2011) han analizado la composición fosfolipídica de las vesículas liberadas por *P. aeruginosa* creciendo en medio rico LB hasta principio de fase estacionaria. Ellos observaron que el perfil fosfolipídico de MVs es semejante al determinado en la membrana externa del microorganismo, detectándose principalmente PE, PG y PC. Sin embargo, las vesículas se caracterizaron por un alto contenido de PG, lo que provoca una disminución de la fluidez de la membrana, necesaria para la correcta curvatura presente en las vesículas (Mashburn-Warren *et al.*, 2008). Cuando analizamos la composición de PL de las vesículas liberadas por *P. putida* A ATCC 12633 crecida con TDTMA, el perfil de PL mostró una composición muy similar a la obtenida en membrana externa, con la presencia de CL, PE, PG y PC, lo que conduce a sugerir que las MVs de *P. putida* A ATCC 12633 son liberadas desde la membrana externa.

A pesar que es necesario evaluar el contenido y composición de estas MVs, probablemente la formación de las mismas resulte un mecanismo eficaz para la eliminación de TDTMA y/o algún producto de su metabolismo que pueda llegar a ser tóxico para la célula o bien, la liberación de MVs sea consecuencia de algún daño ocasionado por el detergente. Por otro lado, si bien cuando se realiza el análisis de PL de totales las bacterias crecidas en presencia del detergente son centrifugadas y sometidas a la extracción correspondiente, no es posible descartar, hasta el momento, si la presencia de vesículas en formación contribuyen o no al notorio incremento de PL detectado cuando células de *P. putida* crecen a expensas del surfactante (**Tabla 4.2.1**).

#### **4.2.3. Efecto del aluminio sobre la composición de fosfolípidos de *P. putida* A ATCC 12633.**

Cuando *P. putida* A ATCC 12633 crece en presencia de TDTMA utilizándolo como fuente de C y N se observa que el crecimiento se detiene luego de 48 hs de cultivo y que el detergente no se consume totalmente. El primer paso de degradación de TDTMA involucra la acción de una actividad monooxigenasa, que produce de trimetilamina (TMA) y un residuo alquílico. Parte de la TMA producida es utilizada por el microorganismo como fuente de N y



parte acumulada intracelularmente, inhibiendo el crecimiento bacteriano. Este efecto inhibitorio del crecimiento es revertido por la adición de  $\text{AlCl}_3$  al medio. El  $\text{Al}^{+3}$ , actuando como un ácido de Lewis, secuestra la TMA acumulada formando un complejo intracelular soluble TMA- $\text{Al}^{+3}$ . La formación de este complejo permite que el crecimiento bacteriano se reanude y, consecuentemente, se logre la completa utilización del TDTMA por *P. putida* (Liffourrena *et al.*, 2008). Paralelamente, ha sido planteado que la formación del complejo TMA- $\text{Al}^{+3}$  sería en una estrategia eficaz para la detoxificación de aluminio (Liffourrena *et al.*, 2008).

El aluminio es un ión que se encuentra en forma insoluble en cantidades abundantes en los ecosistemas, pero la actividad antropogénica ha aumentado drásticamente su biodisponibilidad y, es conocido, que las especies solubles del aluminio son tóxicas para los seres vivos (Vullo *et al.*, 2003 y citas incluidas). Las bacterias han desarrollado diversos mecanismos que les permiten sobreponerse a los efectos nocivos de los metales tóxicos (Silver y Phung, 2005). Estos mecanismos involucran a enzimas que modifican el estado redox de los metales o metaloides convirtiéndolos en formas menos tóxicas, a transportadores de membrana que expulsan las especies nocivas del citoplasma celular y a diferentes componentes celulares que capturan a los iones, neutralizando su toxicidad (Anderson *et al.*, 1992, Silver, 1998, Cervantes *et al.*, 2006). Dentro de los componentes celulares, los PL juegan roles muy importantes. Por ejemplo, ha sido demostrado que *P. fluorescens* es capaz de crecer en presencia de múltiples metales tales como  $\text{Al}^{+3}$ ,  $\text{Fe}^{+3}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$  y  $\text{Ca}^{+2}$ . Durante la exposición por largos periodos de tiempo a los mismos, se observó que estos metales son inmovilizados y secretados fuera de la célula en asociación con oxalato y PE, formando un residuo insoluble (Appanna *et al.*, 1996, Hamel y Appanna, 2003). Por otro lado, Martin, (1986) demostró que la unión del  $\text{Al}^{+3}$  a superficies celulares se lleva a cabo mediante interacciones electrostáticas con los sitios aniónicos de la superficie de la membrana, principalmente con grupos carboxilatos y grupos fosfatos de fosfolípidos. Utilizando liposomas de PC, fosfatidilinositol (PI), fosfoinosítidos (PPI) y PS, ha sido demostrado que el  $\text{Al}^{+3}$  puede interactuar con estos fosfolípidos (MacKinnon *et al.*, 2004, 2006) y que, tanto "*in vitro*" como "*in vivo*", la interacción del  $\text{Al}^{+3}$ , u otros cationes trivalentes, con estos fosfolípidos provoca cambios en las propiedades físicas de membranas, tal como rigidificación de las mismas (Verstraeten *et al.*, 1997, 2003).

En base a estos antecedentes se decidió evaluar, en *P. putida* A ATCC 12633, si la adición de  $\text{Al}^{+3}$  al medio, necesario para reanudar el crecimiento bacteriano y lograr la completa mineralización de TDTMA (Liffourrena *et al.*, 2008), provoca algún tipo de efecto a nivel de sus PL de membrana. Para ello, células de *P. putida* A ATCC 12633 crecidas con



TDTMA hasta fase estacionaria ( $D_{660}=0,4$ ; 48 hs de cultivo), se expusieron durante 15 y 180 min a 0,1 mM de  $AlCl_3$ . Luego de este tiempo, los cultivos se cosecharon y se procedió a la extracción y cuantificación de PL. La **Tabla 4.2.3** muestra los resultados obtenidos de análisis de los PL específicos.

**Tabla 4.2.3:** Composición de PL de *P. putida* A ATCC 12633 crecida con TDTMA y expuesta o no a  $Al^{+3}$ .

PL	nmoles PL/ mg de proteínas		
	TDTMA	TDTMA 15 min $Al^{+3}$	TDTMA 180 min $Al^{+3}$
CL	1,21 ± 0,13 (3,9)	3,86 ± 0,47 (10,4)	4,66 ± 0,80 (13,2)
PE	16,11 ± 2,35 (52,9)	15,63 ± 1,23 (42,2)	19,13 ± 2,49 (54,0)
PG	6,19 ± 0,37 (20,3)	6,50 ± 0,89 (17,6)	5,65 ± 0,57 (16,0)
PC	0,72 ± 0,28 (2,4)	3,34 ± 0,01 (9,0)	1,57 ± 0,16 (4,4)
LPE	1,66 ± 0,36 (5,5)	1,98 ± 0,11 (5,3)	2,29 ± 0,46 (6,5)
PA	1,43 ± 0,09 (4,7)	1,54 ± 0,18 (4,2)	0,48 ± 0,13 (1,4)
Otros	3,15 ± 0,05 (10,3)	4,15 ± 0,02 (11,2)	1,63 ± 0,10 (4,6)
PC/PE	0,04	0,21	0,06

*P. putida* A ATCC 12633 se hizo crecer en HPI-BSM en presencia de TDTMA como fuente de C y N hasta final de fase logarítmica. En ese momento las células fueron expuestas o no a 0,1 mM de  $AlCl_3$  durante 15 y 180 min. A continuación las células fueron cosechadas y los PL analizados. Los PL fueron separados por TLC monodireccional, utilizando como mezcla de solvente cloroformo:metanol: $H_2O$  (65:25:4, v/v). Los mismos fueron identificados por comparación de sus  $R_f$  con los testigos correspondiente y cuantificados según Fiske & SubbaRow (1925). En paréntesis se indica el porcentaje que representa cada uno de los PL identificados y cuantificados como mol de Pi. Los datos representan la media  $n=3 \pm SD$ .

Como puede observarse, el patrón fosfolipídico obtenido fue similar para todas las condiciones analizadas, identificándose, nuevamente, CL, PE, PG, PC, LPE y PA. Es de destacar que no se detectaron diferencias significativas en el contenido de PL totales en células expuestas o no al ión ( $34,04 \pm 3,72$  y  $27,89 \pm 5,65$  nmol PL/ mg de proteínas, respectivamente).

Respecto a células no expuestas a  $Al^{+3}$ , los cambios más notables observados 15 min post-exposición al ión fueron a nivel del contenido de CL y PC, quienes aumentaron aproximadamente 3 veces. Para este tiempo de exposición al metal, y como consecuencia del aumento de PC, se observó un incremento (5 veces) de la relación PC/PE, parámetro indicativo de una disminución transitoria de la fluidez de membrana (Senault *et al.*, 1990, Bangur *et al.*, 1995).

La exposición prolongada a  $Al^{+3}$  (180 min) resultó en un incremento de los niveles de CL y PC, con una concomitante disminución de PA. Sin embargo, los valores de la relación



PC/PE fueron semejantes a los obtenidos en ausencia del ión (0,04 y 0,06, respectivamente).

A los efectos de descartar un posible efecto sinérgico de la presencia de TDTMA y  $Al^{+3}$ , se analizó la composición de PL cuando *P. putida* A ATCC 12633 se hizo crecer en HPI-BSM con glucosa y  $NH_4Cl$  hasta fase exponencial y, en ese momento, las células se enfrentaron o no, durante 15 min a  $Al^{+3}$  (Tabla 4.2.4).

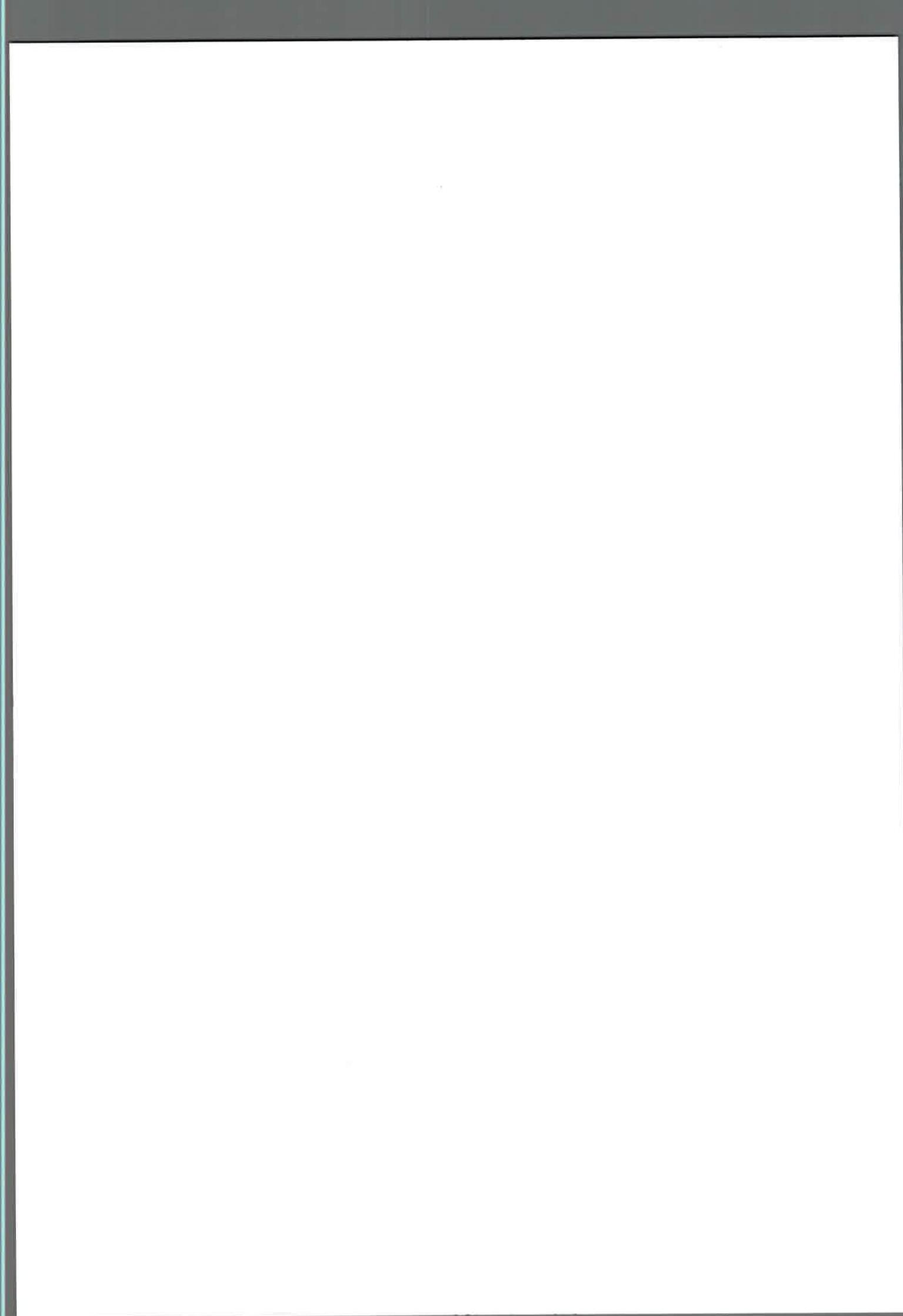
**Tabla 4.2.4:** Composición de PL de *P. putida* A ATCC 12633 crecida con fuentes preferenciales de C y N, expuesta o no a  $Al^{+3}$ .

PL	nmoles PL/ mg de proteínas	
	Glucosa/ $NH_4Cl$	Glucosa/ $NH_4Cl$ 15 min $Al^{+3}$
CL	0,87 ± 0,07 (5,99)	1,09 ± 0,13 (5,30)
PE	11,12 ± 0,25 (76,63)	12,40 ± 2,35 (61,32)
PG	0,93 ± 0,14 (6,40)	2,14 ± 0,37 (10,58)
PC	0,27 ± 0,04 (1,86)	0,85 ± 0,18 (4,20)
LPE	0,67 ± 0,02 (4,61)	2,14 ± 0,21 (10,58)
PA	0,07 ± 0,01 (0,48)	1,32 ± 0,01 (6,50)
Otros	0,58 ± 0,02 (3,99)	0,28 ± 0,3 (1,38)
PC/PE	0,02	0,06

*P. putida* A ATCC 12633 se hizo crecer en HPI-BSM con glucosa y  $NH_4Cl$  como fuente de C y N hasta final fase logarítmica. En ese momento las células fueron expuestas o no a 0,1 mM de  $AlCl_3$  durante 15. A continuación las células fueron cosechadas y los PL fueron analizados. Los PL fueron separados por TLC monodireccional, utilizando como mezcla de solvente cloroformo:metanol: $H_2O$  (65:25:4, v/v). Los mismos fueron identificados por comparación de sus  $R_f$  con los testigos correspondiente y cuantificados según Fiske & SubbaRow (1925). En paréntesis se indica el porcentaje que representa cada uno de los PL identificados y cuantificados como mol de Pi. Los datos representan la media  $n=3 \pm SD$ .

Del análisis de la tabla se desprende que en presencia de  $Al^{+3}$ , respecto a células no tratadas con el ión, el contenido de PC se incrementó 3 veces mientras que no se detectaron modificaciones significativas a nivel del contenido de CL. Acompañando el aumento de PC, la presencia de  $Al^{+3}$  en el medio provocó un incremento en los niveles de PG y LPE de 2 a 3 veces, mientras que el contenido de PA incremento 18 veces, comportamiento no detectado cuando la bacteria crece con TDTMA y es expuesta al metal (Tabla 4.2.3).

Debido a que en todas las condiciones de cultivo ensayadas en las que estuvo presente el  $Al^{3+}$  la cantidad de PC siempre se modificó, es posible implicar a este PL en la respuesta bacteriana a aluminio.



#### 4.2.4. Determinación de las actividades enzimáticas involucradas en la biosíntesis de PC en *P. putida* A ATCC 12633.

En *P. putida* A ATCC 12633 la o las vías metabólicas involucradas en la síntesis de PC no han sido descritas. Sin embargo es conocido que, en bacterias Gram negativas, PC puede ser sintetizada por dos caminos diferentes. Uno de ellos involucra la metilación sucesiva de PE por una o varias fosfolípidos *N*-metiltransferasa (PMT). El otro camino es el de la fosfatidilcolina sintasa (PCS), donde PC es sintetizada a partir de la condensación de CDP-diacilglicerol con colina, reacción catalizada por la PCS (**Figura 2.3**). Ha sido demostrado que los microorganismos que presentan PC en sus membranas pueden tener ambas o sólo una de estas vías metabólicas (de Rudder *et al.*, 1997, 1999, 2000, Sohlenkamp *et al.*, 2000, 2003, Martínez Morales *et al.*, 2003, Wilderman *et al.*, 2002). En miembros del género *Pseudomonas*, tal como *P. aeruginosa*, ha sido descrito que sólo la vía de PCS es activa para la síntesis de PC (Wilderman *et al.*, 2002, Martínez Morales *et al.*, 2003).

Para conocer si la vía de metilación de PE está o no involucrada en la síntesis de PC en *P. putida* A ATCC 12633 se obtuvieron extractos provenientes de células crecidas en HPi-BSM, con fuentes preferenciales de C y N (glucosa y NH<sub>4</sub>Cl) o con TDTMA como única fuente de C y N. La actividad PMT se determinó según se describe en Materiales y Métodos (apartado 3.11.2). Con los diferentes extractos y variando las condiciones de ensayo, no fue posible detectar los productos de reacción de la actividad PMT: monometilfosfatidiletanolamina (MMPE), dimetilfosfatidiletanolamina (DMPE) o PC.

La actividad PCS se determinó utilizando extractos libres de células de *P. putida* A ATCC 12633 crecidas con TDTMA como única fuente de C y N y expuestas a no al Al<sup>3+</sup>. Cuando fue necesario, y para determinar si el catión es un activador de la enzima, los extractos fueron dializados (apartado 3.11.1). El producto de reacción, PC, fue detectado por HPLC, según se describe en Materiales y Métodos (apartado 3.9.6). La **Tabla 4.2.5** muestra los resultados obtenidos.



**Tabla 4.2.5:** Efecto del  $Al^{+3}$  sobre la actividad fosfatidilcolina sintasa de *P. putida* A ATCC 12633.

Extracto libre de células	$Al^{+3}$ nmol/mg proteínas	actividad PCS nmol PC/min/ $\mu$ g prot
TDTMA	ND	50,8 $\pm$ 0,13
TDTMA + $AlCl_3$ 15 min	6,82 $\pm$ 0,02	168,6 $\pm$ 2,35
TDTMA + $AlCl_3$ 15 min*	1,02 $\pm$ 0,01	40,8 $\pm$ 0,37
TDTMA + $AlCl_3$ 180 min	6,86 $\pm$ 0,03	129,8 $\pm$ 0,28
TDTMA + $AlCl_3$ 180 min*	0,96 $\pm$ 0,01	39,4 $\pm$ 0,36
Extracto dializado + $AlCl_3$ **	98 $\pm$ 3,50	109 $\pm$ 3,00

*P. putida* A ATCC12633 se hizo crecer en HPI-BSM y TDTMA como fuente de C y N hasta final de fase logarítmica. En ese momento las células fueron expuestas o no a 0,1 mM de  $AlCl_3$  durante 15 y 180 min. A continuación las células fueron cosechadas, lavadas y sonicadas. El extracto libre de células obtenido fue usado como fuente enzimática. El producto de reacción, PC, fue determinado por HPLC, la detección de  $Al^{+3}$  se llevó a cabo según se describe en Materiales y Métodos (apartado 3.12).

\* extractos libres de células dializados a 4°C contra buffer HCl-Tris 10 mM, pH 8.

\*\*a extractos previamente dializados se les adicionó 0,1 mM de  $AlCl_3$  en el tubo de reacción.

ND: no detectado.

Los datos representan la media  $n=3 \pm$  SD.

Como puede observarse, los extractos provenientes de células crecidas con TDTMA y enfrentadas a  $Al^{+3}$  durante 15 y 180 min presentaron valores de actividad PCS 3 veces superiores a los detectados en células no expuestas al ión (**columna 3**). Cuando los extractos provenientes de células expuestas al catión fueron extensivamente dializados, la concentración de  $Al^{+3}$  en el extracto disminuyó de 7 a 1 nmol/mgprot (**columna 2**) y la actividad PCS presentó valores similares a los detectados con extractos provenientes de células no expuestas al ión. Cuando la actividad se determinó con extractos previamente dializados y se adicionó 0,1 mM de  $AlCl_3$  a la mezcla de reacción, nuevamente la actividad PCS incrementó, lo que confirma la activación por el catión.

Diferentes autores han demostrado la dependencia estricta de cationes bivalentes ( $Mg^{+2}$ ,  $Co^{+2}$  y  $Mn^{+2}$ ) para el correcto funcionamiento de PCS (Sohlenkamp *et al.*, 2003, Martínez-Morales *et al.*, 2003). Sin bien no existe evidencia bibliográfica que demuestre dependencia o activación de PCS o de otros miembros de la familia por cationes trivalentes, los resultados antes descriptos relacionados a la actividad PCS en presencia o ausencia de  $Al^{+3}$ , indican que este catión es un activador de PCS en *P. putida* A ATCC 12633.

En conjunto, estos resultados muestran que en la síntesis de PC en *P. putida* A ATCC 12633 sólo es funcional la vía de la PCS.

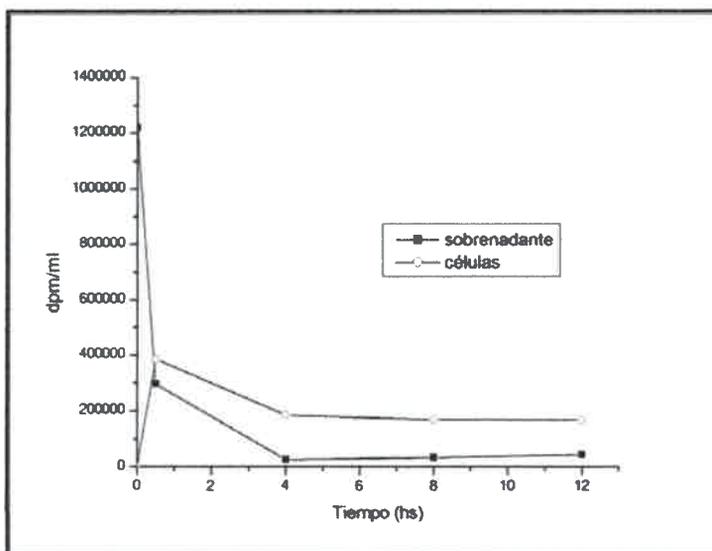


#### 4.2.5. Incorporación de colina a PC.

Diferentes autores han descrito que la síntesis de PC vía PCS es activa sólo cuando se suministra, en forma exógena, colina a las condiciones de cultivo (Sohlenkamp *et al.*, 2000, 2003, Comerci *et al.*, 2006). En nuestro caso particular, detectamos actividad PCS en células de *P. putida* A ATCC 12633 crecidas con TDTMA, sin la adición de colina exógena y, tratadas o no, con  $Al^{+3}$ .

Para determinar si la actividad PCS de *P. putida* A ATCC 12633 es dependiente o no del agregado de colina al medio de cultivo, inicialmente se determinó la capacidad de esta cepa de incorporar [metil- $^{14}C$ ]-colina exógena. Para ello células de *P. putida* A ATCC 12633 se hicieron crecer en HPI-BSM con 50 mg/l de TDTMA hasta  $DO_{660}$  de 0,3. En ese momento se adicionó 1  $\mu Ci/ml$  de [metil- $^{14}C$ ]-colina, se tomaron alícuotas a diferentes tiempos y la radioactividad se determinó según lo descrito en Materiales y Métodos (apartado 3.7).

En la **Figura 4.2.4** se observa que luego de 30 min de incubación con [metil- $^{14}C$ ]-colina, aproximadamente el 75 % de la colina radiactiva desaparece del sobrenadante de cultivo y es incorporada a las células de *P. putida*.



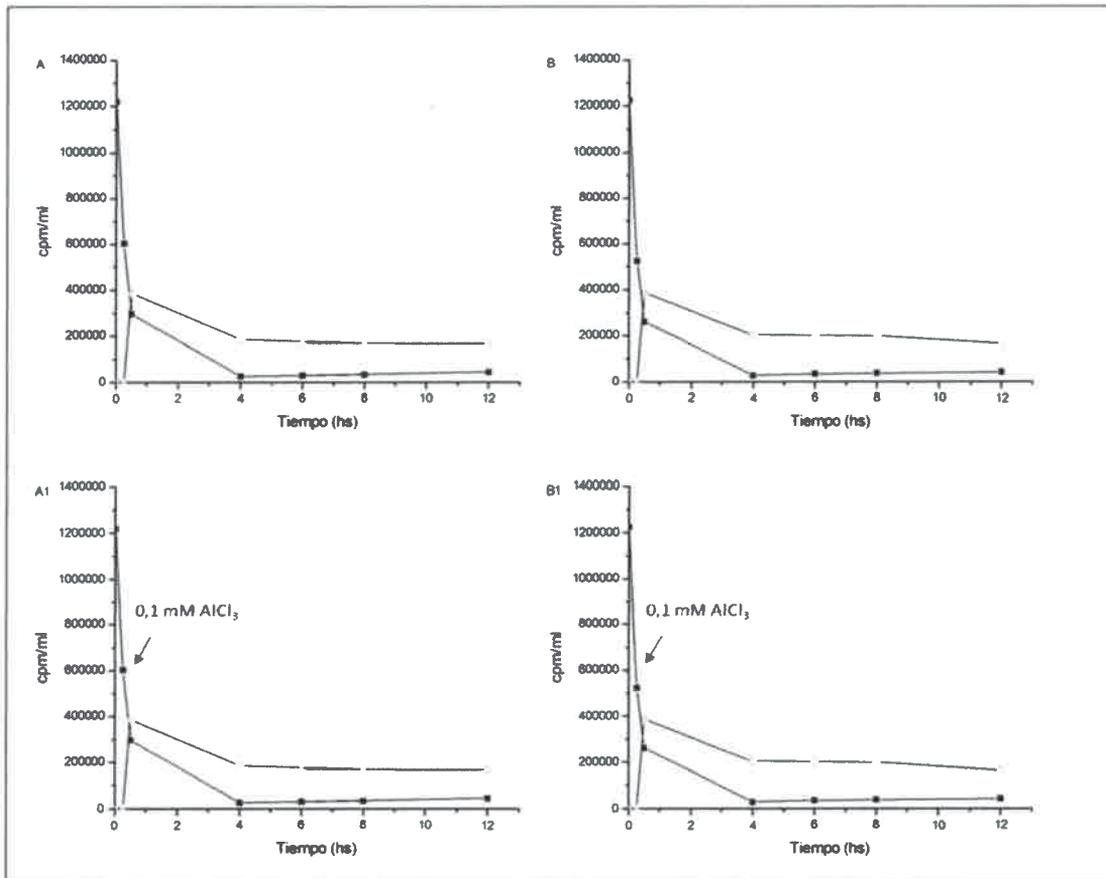
**Figura 4.2.3:** Incorporación de colina en *P. putida* A ATCC 12633: El microorganismo se hizo crecer en HPI-BSM con la adición de TDTMA 50 mg/l hasta  $DO_{660}=0,3$ . En ese momento se adicionó 1  $\mu Ci/ml$  de [metil- $^{14}C$ ]-colina, se tomaron alícuotas a diferentes tiempos, las que se centrifugaron y se determinó la radioactividad, en las células y en el sobrenadante, utilizando contador de centelleo líquido.

Confirmado que colina se incorpora a las células, se determinó si la presencia de colina provoca algún efecto sobre la composición y/o cantidad de PL específicos, particularmente a nivel de PC. Para ello, las células se hicieron crecer en presencia de TDTMA (fuente de C y N) con la adición o no de 100  $\mu M$  de colina, hasta  $DO_{660}$  de 0,3. En ese momento las células fueron marcadas por la adición de 1  $\mu Ci/ml$  [metil- $^{14}C$ ]-colina y posteriormente, los lípidos fueron extraídos y analizados. Tanto en presencia como en



ausencia de colina fría, el perfil de PL fue similar, detectándose PE, CL, PG, PA, LPE, PC y otros PL no identificados (no mostrado). El contenido de PC fue similar tanto si colina estuvo o no presente en el medio de cultivo (1,85 y 1,87 unidades arbitrarias, respectivamente).

La **Figura 4.2.4** muestra la incorporación de [metil-<sup>14</sup>C]-colina en células de *P. putida* A ATCC 12633 crecidas con TDTMA y con TDTMA /colina, expuestas o no a Al<sup>+3</sup>.

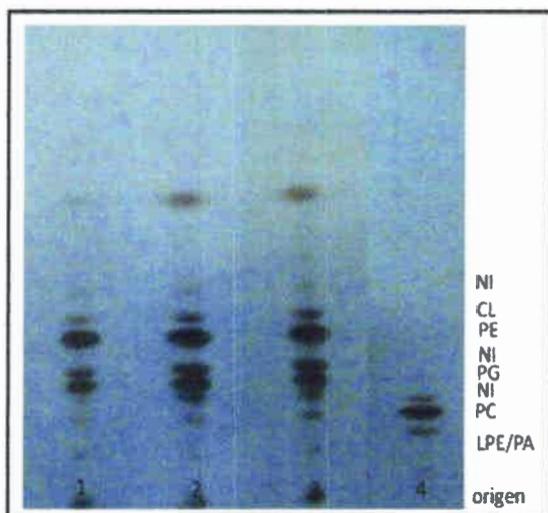


**Figura 4.2.4:** Incorporación de colina en células de *P. putida* A ATCC12633 crecida en diferentes condiciones nutricionales: El microorganismo se hizo crecer en presencia de TDTMA (A y A1) o TDTMA/colina 100  $\mu$ M (B y B1), hasta DO<sub>660</sub> de 0,3. En ese momento se adicionó 1 $\mu$ Ci/ml [metil-<sup>14</sup>C]-colina. Luego de 15 min de incubación con colina radiomarcada, las células fueron expuestas (A1 y B1) o no a Al<sup>+3</sup> (A y B). Se tomaron alícuotas a diferentes tiempos, se centrifugaron (según se describe en Materiales y Métodos, apartado 3.7) y se determinó la radiactividad en contador de centelleo líquido en sobrenadante (■) y en células (○).

Como puede observarse, tanto en ausencia (A y A1) como en presencia (B y B1) de colina fría, luego de 30 min de incubación con [metil-<sup>14</sup>C]-colina, aproximadamente el 75 % de la colina radiomarcada desaparece del sobrenadante y es incorporada a las células de *P. putida* A ATCC 12633. Cuando Al<sup>+3</sup> fue adicionado al medio de cultivo, no se detectaron cambios significativos en la incorporación de [metil-<sup>14</sup>C]-colina a las células, respecto a lo detectado en células no expuestas al ión.



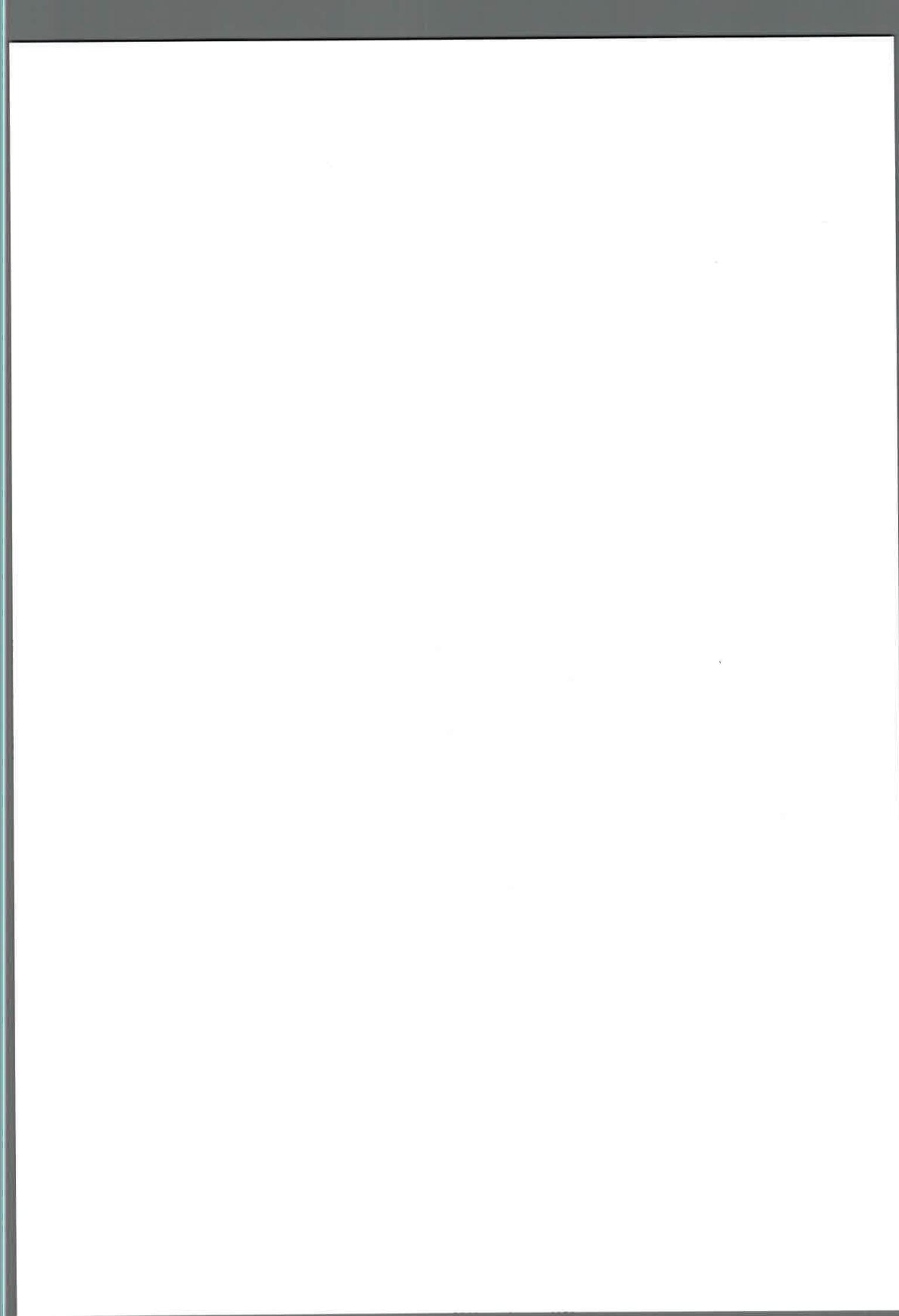
La **Figura 4.2.5** muestra una TLC representativa del perfil fosfolipídico determinado para todas las condiciones ensayadas. En todos los casos el perfil de PL fue semejante, detectándose la presencia de: CL, PE, PG, PC, LPE, PA y otros PL no identificados.



**Figura 4.2.5:** Marcaje de PL de *P. putida* A ATCC 12633: El microorganismo se hizo crecer en HPI-BSM y TDTMA como fuente de C y N hasta una  $DO_{660}=0.3$ . En ese momento las células fueron marcadas con  $1\mu\text{Ci}$  de [metil- $^{14}\text{C}$ ]-colina y expuestas o no a  $0,1\text{ mM}$  de  $\text{AlCl}_3$  durante 15 y 180 min. Los fosfolípidos fueron separados por TLC monodireccional y cuantificados por Phosphor-Imager. Referencias: Línea 1. *P. putida* no expuesta a  $\text{Al}^{3+}$ , línea 2: *P. putida* expuesta durante 15 min a  $\text{Al}^{3+}$ , línea 3: *P. putida* expuesta durante 180 min a  $\text{Al}^{3+}$ , línea 4: PL de *S. meliloti* marcados con [metil- $^{14}\text{C}$ ]-colina, control positivo para la presencia de PC. PE, fosfatidiletanolamina; PG, fosfatidilglicerol; CL, cardiolipina; PA, ácido fosfatídico; PC, fosfatidilcolina; LPE, lisofosfatidiletanolamina.

Dado que en todas las condiciones evaluadas se detectaron PL marcados y que el perfil de PL fue muy similar, puede plantearse que *P. putida* A ATCC 12633 metaboliza colina incorporándola a sus PL. Existen evidencia bibliográfica donde ha sido demostrado que cuando *P. aeruginosa* crece en presencia de colina (compuesto de amonio cuaternario natural), utilizándola como fuente de carbono, ésta es incorporada a los PL. Los grupos metilos presentes en colina son metabolizados a acetato activo e incorporados a los ácidos grasos, mientras que el esqueleto carbonado es utilizado para la síntesis del glicerol (Salvano *et al.*, 1989, Albelo y Domenech, 1997).

Los PL fueron cuantificados por Phosphor-Imager considerando el área correspondiente a los spots identificados. En la **Tabla 4.2.6** se presentan los valores de área correspondientes a los spots de PC detectados en ausencia y presencia de  $\text{Al}^{3+}$ .



**Tabla 4.2.6:** Efecto del  $Al^{+3}$  sobre la producción de PC en células crecidas con TDTMA en presencia o ausencia de colina exógena.

	Area del spot ( $\times 10^4$ )					
	Sin $Al^{+3}$ <sup>a</sup>		$Al^{+3}$ 15 min <sup>b</sup>		$Al^{+3}$ 180 min <sup>c</sup>	
	TDTMA	TDTMA/colina	TDTMA	TDTMA/colina	TDTMA	TDTMA/colina
PC	1,87	1,85	3,78	4,23	2,50	2,82

*P. putida* A ATCC 12633 se hizo crecer en HPI-BSM y TDTMA o TDTMA/colina 100  $\mu$ M hasta  $DO_{660}=0.3$ . En ese momento las células fueron marcadas con 1 $\mu$ Ci/ml de [metil- $^{14}$ C]-colina y expuestas o no a 0,1 mM de  $AlCl_3$  durante 15 y 180 min. Los PL fueron extraídos, separados y cuantificados por Phosphor-Imager.

<sup>a</sup> *P. putida* crecida con TDTMA 50 mg/l o TDTMA 50 mg/l-colina 100  $\mu$ M.

<sup>b</sup> *P. putida* crecida con TDTMA 50 mg/l o TDTMA 50 mg/l-colina 100  $\mu$ M y expuesta 15 min a  $Al^{+3}$ .

<sup>c</sup> *P. putida* crecida con TDTMA 50 mg/l o TDTMA 50 mg/l-colina 100  $\mu$ M y expuesta 180 min a  $Al^{+3}$ .

Dado que el incremento de PC detectado en presencia de  $Al^{+3}$  es similar tanto si las células se hacen crecer en presencia o en ausencia de colina exógena, podemos concluir que la actividad PCS de *P. putida* A ATCC 12633, a diferencia de otras previamente descritas (Comerci *et al.*, 2006, Sohlenkamp *et al.*, 2000, 2003), es independiente de la adición exógena de colina y activada por la presencia de  $Al^{+3}$ .

En plantas, colina puede ser sintetizada a partir del aminoácido serina. En esta vía metabólica, serina es descarboxilada a etanolamina por una serina descarboxilasa dependiente de piridoxalfosfato. Subsecuentemente, etanolamina es metilada tres veces para dar colina, reacción catalizada por *N*-metiltransferasas dependientes de *S*-adenosilmetionina (Rhodes y Hanson, 1993, Gorhan, 1995, Hanson *et al.*, 1995, Rontein *et al.*, 2001). De esta manera, colina queda disponible para ser utilizada en diferentes vías metabólicas, entre ellas, en la formación de PC.

Basados en la secuencia de aminoácidos de la serina descarboxilada (SDC) (AAK77493) y de una hipotética etanolamina metiltransferasa (AEE35480) de *Arabidopsis thaliana* (Theologis *et al.*, 2000, Rontein *et al.*, 2001) se analizó el genoma de la cepa de referencia secuenciada, *P. putida* KT2440 en búsqueda de ORFs homólogos a estas proteínas. Los análisis por BLASTP arrojaron como resultados dos posibles ORFs: PP2552 (NP\_744697) y PP2927 (NP\_745071). PP2552, se encuentra anotada en la base de datos como una hipotética descarboxilasa de aminoácidos aromáticos y presenta un 24 % de identidad de AA con la SDC de *A. thaliana*. Por otro lado, PP2927, presenta un 34 % de identidad de AA con la hipotética etanolamina metiltransferasa.

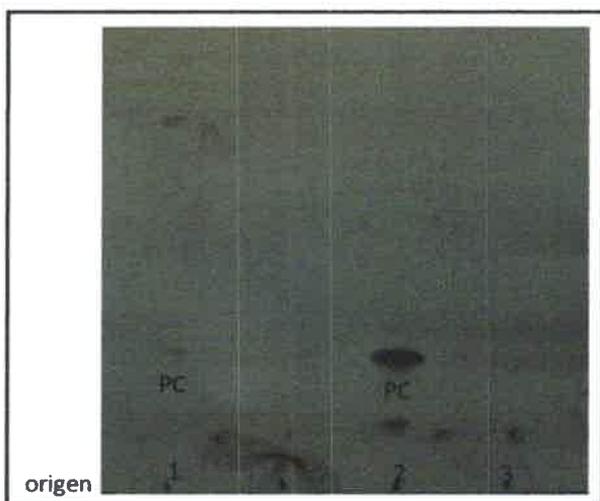


Esta búsqueda bioinformática permite suponer que, posiblemente, *P. putida* A ATCC 12633 genere colina por un mecanismo similar al que ocurre en plantas, generando de esta manera la colina necesaria para la posterior síntesis de PC.

#### 4.2.6. Determinación de actividad PCS y PMT en *P. putida* KT2440.

Anterior a la búsqueda de potenciales genes responsables de la síntesis de PC en la cepa de referencia secuenciada, *P. putida* KT2440 (Nelson *et al.*, 2002), se procedió a la determinación de las actividades PCS y PMT en esta cepa. Para ello se utilizaron extractos libres de células provenientes de cultivos de *P. putida* KT2440 crecidas con fuentes preferenciales de carbono y nitrógeno (glucosa y NH<sub>4</sub>Cl). Es de destacar que, de manera semejante a lo ocurrido en *P. putida* A ATCC 12633, no se detectó actividad PMT.

La **Figura 4.2.6** muestra una autorradiografía correspondiente a los resultados obtenidos de la determinación de actividad PCS a partir de extractos de células de *P. putida* KT2440.



**Figura 4.2.6:** Determinación de actividad PCS en *P. putida* KT2440: La fuente enzimática corresponde a extractos obtenidos por sonicación de células de *P. putida* KT2440 crecidas en HPI-BSM con glucosa y NH<sub>4</sub>Cl. El producto de la reacción (PC), fue separado por TLC monodireccional (propanol:ácido propiónico:cloroformo:H<sub>2</sub>O, 3:2:2:1) y detectado por autorradiografía. Referencias: Calle 1: *P. putida* KT2440. Calle 2: *E. coli* BL21pTB3559, control positivo. Calle 3: *E. coli* BL21pTE9a, control negativo (Tabla 3.1).

Como puede observarse, y de manera similar a lo detectado en *P. putida* A ATCC 12633, el producto de reacción de PCS, PC, fue detectado en la cepa secuenciada. En base a estos resultados se procedió a la búsqueda de genes homólogos en *P. putida* KT2440 al gen *pcs* de *Sinorhizobium meliloti* (Sohlenkamp *et al.*, 2000).



#### 4.2.7. Búsqueda de ORFs homólogos a PCS en *P. putida* KT2440.

PCS pertenece a la familia de las CDP-alcohol fosfatidiltransferasa. Dentro de esta familia también se encuentran otras enzimas involucradas en la biosíntesis de fosfolípidos, entre ellas, fosfatidilserina sintasa tipo II (PSsAll), fosfatidilinositol sintasa (PIs) y fosfatidilglicerol sintasa (PGs). Los miembros de esta familia se caracterizan por catalizar la siguiente reacción:

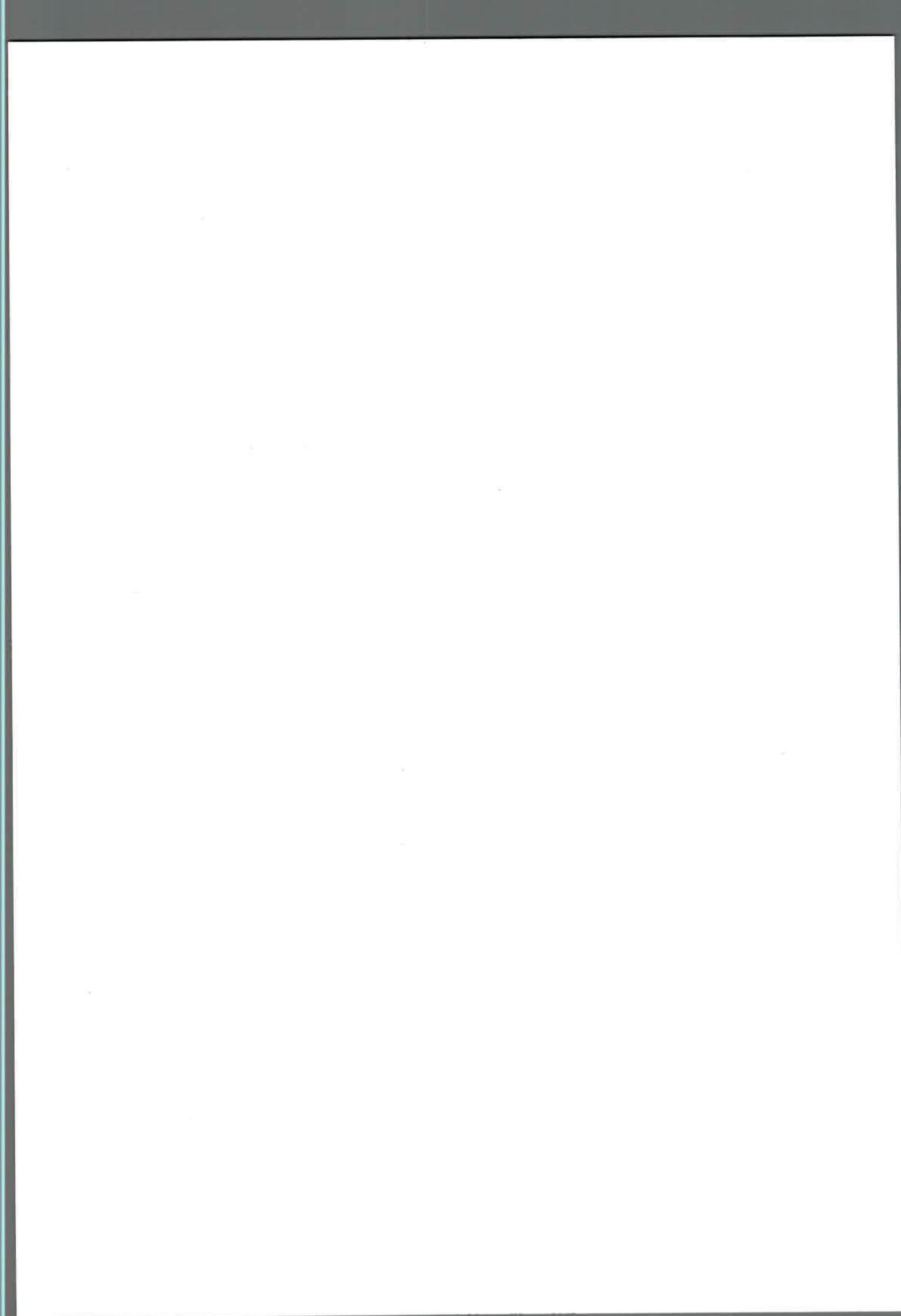


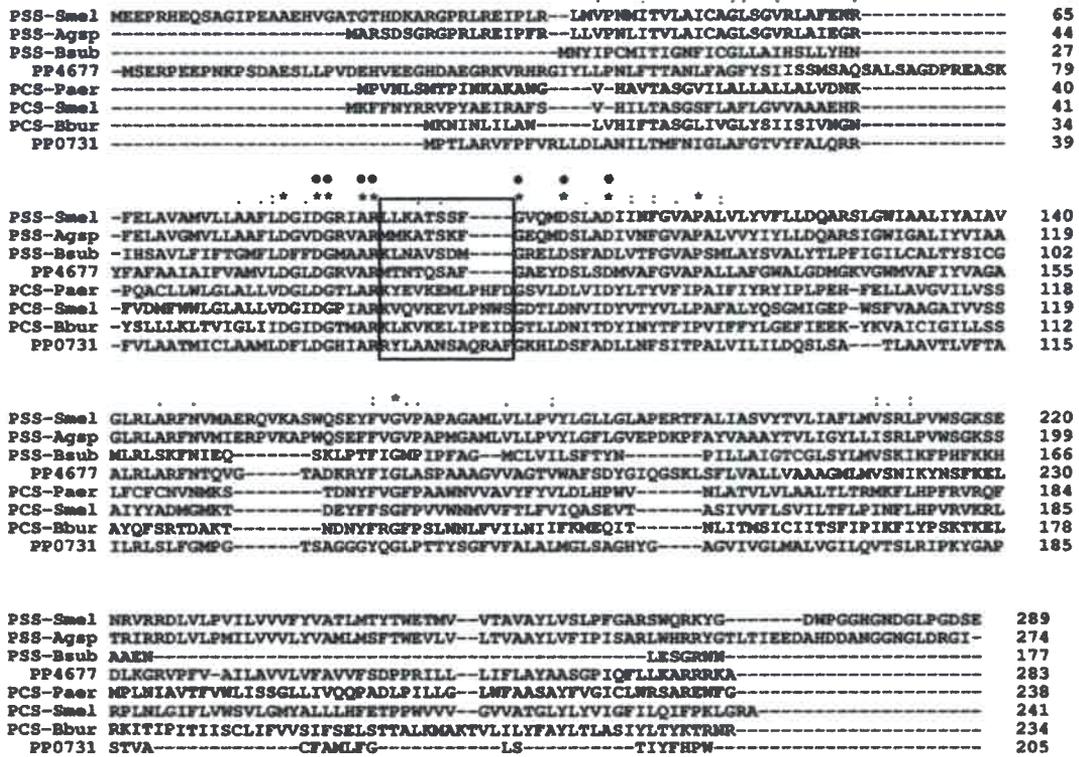
La secuencia consenso presente en las diferentes PCS descritas y en los diferentes ORFs identificados en una amplia variedad de microorganismos es: DG (X)2 AR (X)12 G (X)3 D (X)3 D (Sohlenkamp *et al.*, 2000). El motivo consenso de PCS presenta una variación respecto a la secuencia consenso de las demás CDP-alcohol fosfatidiltransferasas: DG (X)2 AR (X)8 G (x)3 D (X)3 D (Williams y McMaster, 1998).

Como puede observarse en la **Figura 4.2.7**, en PCS existen 12 residuos aminoacídicos entre la arginina (R) y la glicina (G) conservadas, mientras que solo existen 8 residuos para el resto de los miembros de esta familia. Otra característica destacable para PCS es que, generalmente, existe una prolina (P) conservada en la posición 9 de esos 12 aminoácidos.

Basados en la secuencia de aminoácidos de PCS de *S. meliloti* (AAL53937) (Sohlenkamp *et al.*, 2000) se examinó el genoma completo de *P. putida* KT2440 en busca de proteínas homólogas a esta enzima. Los resultados mostraron dos posibles ORFs: PP0731 y PP4677. *pp0731* codifica para una proteína de 205 aminoácidos, con un 26 % de identidad con la PCS de *S. meliloti*, mientras que *pp4677* codifica para una proteína de 283 aminoácidos con un 33 % de identidad para esta misma PCS. Ambos ORFs están anotados, por homología de secuencia, en la base de datos de *P. putida* KT2440 como hipotéticas fosfatidilserinas sintasas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). La **Figura 2.4.7** muestra los alineamientos realizados de la secuencia de aminoácidos de los ORFs PP0731 y PP4677 de *P. putida* KT2440 con PCSs y PSsAll descritas en varios microorganismos.

Los resultados más significantes mostraron que: PP0731 presenta una homología del 35 % de identidad de AA con la PCS de *P. aeruginosa* (NP002516) y PP4677 muestra un 34 % de identidad de AA con las PSsAll de *Agrobacterium* sp. 317459 (AAL01116), de *S. meliloti* (AF247564) y de *B. subtilis* (D38022).



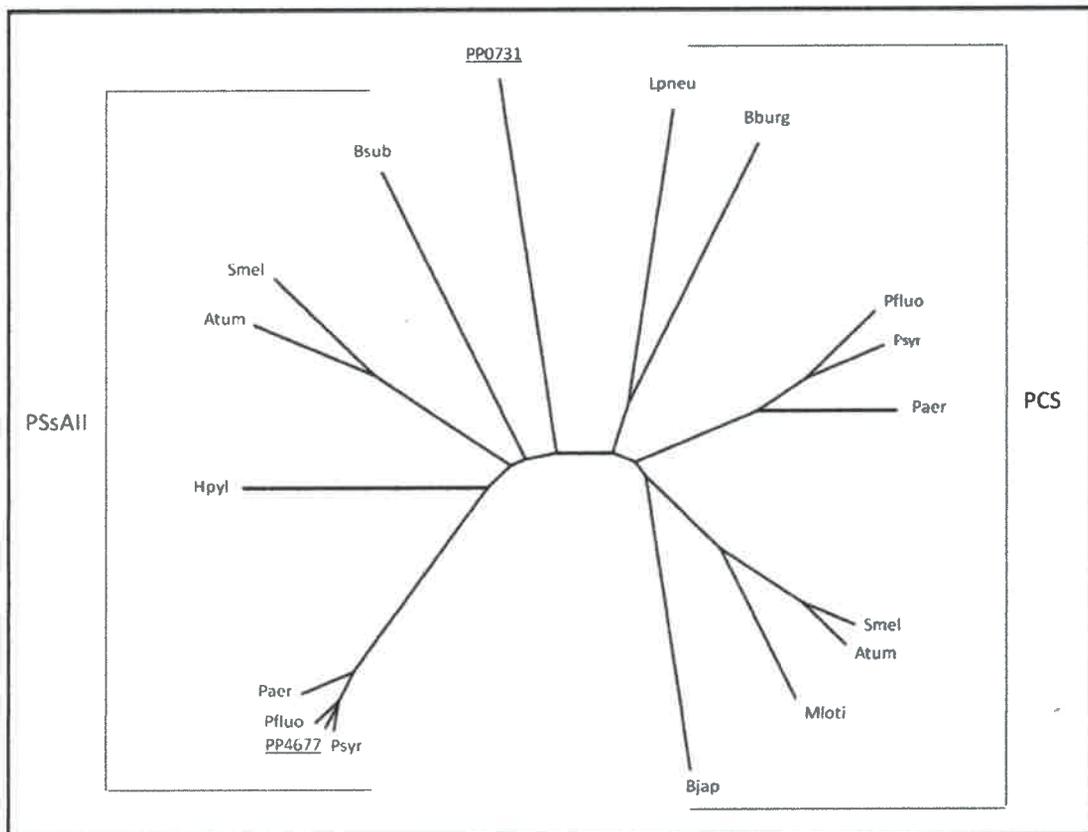


**Figura 4.2.7:** Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de diferentes CDP-alcohol fosfatidil transferasas: PSs de *S. meliloti* (AF247564), PSs de *Agrobacterium* sp. 317459 (AAL01116), PSs de *B. subtilis* (D38022), ORF PP4677 (*P. putida* KT2440), PCS de *P. aeruginosa* (NP002516), PCS de *S. meliloti* (AAL53937), PCS de *Borrelia burgdorferi* (NP\_212383) y ORF PP0731 (*P. putida* KT2440). Los alineamientos se llevaron a cabo utilizando en programa Clustal W. Los residuos pertenecientes al motivo consenso están indicados con círculos negros. El recuadro indica la principal diferencia entre PCS y los demás miembros de la familia.

Como se desprende del análisis de **Figura 2.4.7**, PP0731 contiene los aminoácidos descriptos para el motivo consenso de las CDP-alcohol fosfatidiltransferasas (indicados con círculos negros) y existen 12 residuos entre la Arg y la Gly conservada (recuadro). Sin embargo, PP0731 no contiene la Pro conservada, descrita en otras PCS. A diferencia de PP0731, PP4677 contiene solo 8 residuos entre Arg y Gly, característico de las demás CDP-alcohol fosfatidiltransferasas.

A partir de las secuencias de aminoácidos correspondientes a PCS y PSsAll y de las secuencias de aminoácidos correspondientes a ORFs homólogos a estas mismas proteínas en distintos microorganismos, se construyó un árbol filogenético a fin de conocer la posible ubicación de PP0731 y PP4677 dentro de la superfamilia de las CDP-alcohol fosfatidiltransferasas. La **Figura 4.2.8** muestra los resultados obtenidos.





**Figura 4.2.8:** Árbol filogenético de PCS, PSsAll y sus homólogos. PSs de *B. subtilis* (D38022), PSs de *S. meliloti* (AF247564), PSs de *H. pylori* (AAC45587), ORFs homólogos a PSs en *A. tumefaciens* (NP354086), *P. aeruginosa* (NP002516), *P. fluorescens* (NP007492), *P. syringae* (NP004578), *P. putida* KT2440 (ORF PP4677, NP746786), PCS de *S. meliloti* (AAL53937), PCS de *A. tumefaciens* (YP002544487), PCS de *M. loti* (NP102294), PCS de *B. japonicum* (NP771225), PCS de *L. pneumophila* (YP095613), PCS de *B. burgdorferi* (ZP03673743), PCS de *P. aeruginosa* (NP252546), ORFs homólogos a PCS en *P. fluorescens* (YP347825), *P. syringae* (YP233962), *P. putida* KT2440 (ORF PP0731, NP742892). El árbol fue construido usando el programa Clustal W.

El análisis de esta figura muestra que las PCS y PSsAll conforman dos grupos. A su vez, dentro de cada grupo, las secuencias de aminoácidos de PCS y PSsAll de organismos relacionados se agrupan juntas, tal es el caso de los homólogos de miembros de la familia *Pseudomonadaceae* ( $\gamma$ -proteobacterias) y de miembros de la familia *Rhizobiaceae* ( $\alpha$ -proteobacterias).

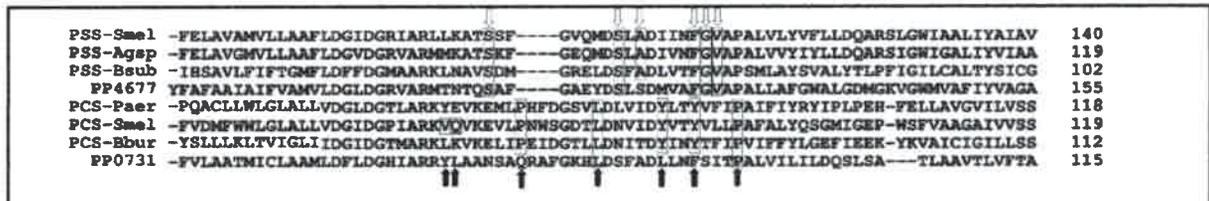
PP4677 se agrupa junto con los ORFs homólogos a PSsAll pertenecientes a especies del género *Pseudomonas*.

PP0731 conforma una rama separada y no se agrupa en ninguno de los clusters formados por PCS o PSsAll. Probablemente, PP0731 forme parte de un subgrupo de las CDP-alcohol fosfatidiltransferasas.

Diferentes análisis bioinformáticos han mostrado que en la familia de las CDP-alcohol fosfatidiltransferasas, además del motivo consenso altamente conservado, existen otros aminoácidos conservados que rodean la región consenso y que son característicos de cada



miembro de esta familia (Sohlenkamp *et al.*, 2004). Aparentemente estos aminoácidos estarían relacionados con la especificidad de sustrato para cada una de ellas. El análisis de los alineamientos (Figura 4.2.9) mostró, para PP4677 (flechas blancas) y PP0731 (flechas negras), que algunos de estos aminoácidos característicos están presentes y otros están ausentes. Es de destacar que sólo uno de los aminoácidos involucrados en la especificidad de sustrato para PSsAll está ausente en PP4677.



**Figura 4.2.9:** Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de diferentes CDP-alcohol fosfatidil transferasas: PSs de *S. meliloti* (AF247564), PSs de *Agrobacterium* sp. 317459 (AAL01116), PSs de *B. subtilis* (D38022), ORF PP4677 (*P. putida* KT2440), PCS de *P. aeruginosa* (NP002516), PCS de *S. meliloti* (AAL53937), PCS de *Borrelia burgdorferi* (NP\_212383) y ORF PP0731 (*P. putida* KT2440). Los alineamientos se llevaron a cabo utilizando el programa Clustal W. Las flechas y recuadros indican los residuos de aminoácidos implicados en la especificidad de sustrato. Flechas negras: residuos aminoácidos característicos de las PCS. Flechas blancas: residuos aminoácidos característicos de las PSs.

Si bien el ORF PP0731 presenta algunas diferencias con las PCS descritas, el análisis bioinformático en su conjunto, llevó a considerar a PP0731 como potencial PCS.

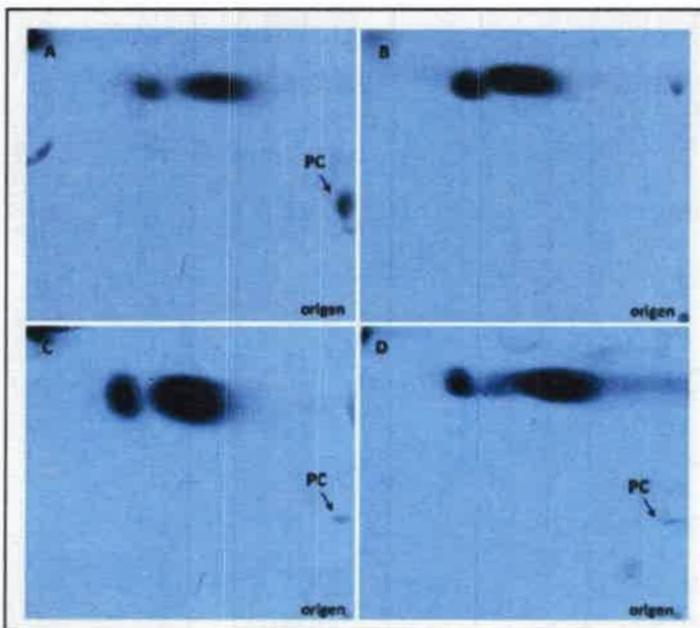
Por otro lado y dado que PP4677 se agrupa junto con los ORFs homólogos a PSsAll y que esta proteína presenta la mayoría de los aminoácidos involucrados en la especificidad de sustrato de las PSsAll, se decidió determinar si *pp4677* se corresponde o no con el gen responsable de fosfatidilserina sintasa (*pss*). En la vía de biosíntesis de PL, PS es descarboxilada para dar PE y, generalmente, al ser PS un intermediario en la síntesis de PL, raramente se encuentra en las membranas procariontas (Tornabene, 1973, van Golde *et al.*, 1975). Por ello, la identificación del gen responsable de la síntesis de PS permitiría la construcción de cepas mutantes carentes de PS y en consecuencia, de PE. De esta manera la composición de la membrana de estas cepas podría estar enriquecida en PL aniónicos, principalmente CL y PG, lípidos involucrados en la respuesta al estrés ocasionado por TDTMA (Boeris *et al.*, 2007).

A partir de la secuencia de nucleótidos de *pp0731* y *pp4677* se diseñaron los correspondientes oligonucleótidos (Tabla 3.2). Los fragmentos de ADN correspondiente a *pp0731* y *pp4677* ligados y clonados a pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO (Invitrogene), fueron enviados a Eurofins, Alemania, para su secuenciación. Mediante el uso de BLASTN del National Center for Biotechnology Information (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), se obtuvieron los alineamientos de las secuencias clonadas con las secuencias de la base de datos de

nucleótidos de colección (nr/nt). Los alineamientos indicaron que los fragmentos clonados poseen 100 % de identidad con los orfs *pp0731* y *pp4677* de *P. putida* KT2440.

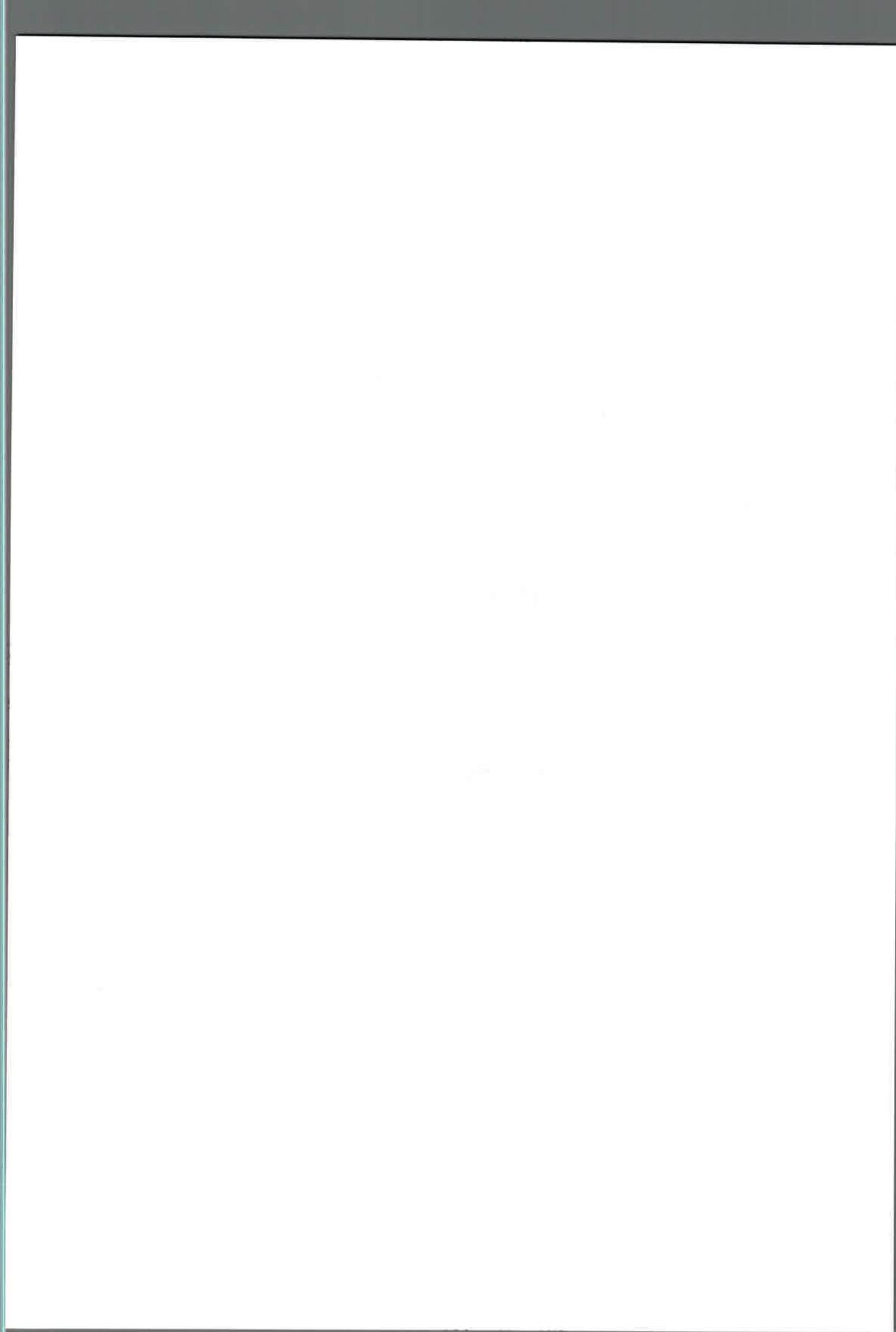
#### 4.2.8. Expresión de PP0731 y PP4677 de *P. putida* KT2440.

La expresión de los ORFs PP0731 y PP4677 se llevó a cabo en el huésped heterólogo carente de PC, *E. coli* BL21(DE3)/pLysS (Tabla 3.1). Para estos ensayos se utilizó como parámetro de expresión la producción de PC y/o PS. La Figura 4.2.10, muestra los resultados obtenidos de la identificación de PL de las diferentes cepas de *E. coli* BL21 portando los genes de interés, *E. coli* BL21pPB03A y *E. coli* BL21pPB04A (Tabla 3.1), luego de la inducción con IPTG y la adición de [1-<sup>14</sup>C]-acetato, según se describió en Materiales y Métodos (apartado 3.20).



**Figura 4.2.10:** Expresión de PP0731 y PP4677. *E. coli* BL21pTB3559 (A, control positivo), *E. coli* BL21pET9a (B, control negativo), *E. coli* BL21pPB03A (C, PP0731) y *E. coli* BL21pPB04A (D, PP4677) fueron crecidas en LB/Km/cl hasta una DO<sub>620</sub> de 0,3. En ese momento se tomaron alícuotas de 1 ml de cada uno de los cultivos y se les adicionó IPTG 200 μM y 1 μCi/ml de [1-<sup>14</sup>C]-acetato. Después de 3 hs de inducción, las células fueron cosechadas, los PL fueron extraídos, separados e identificados, de acuerdo a los descrito en Materiales y Métodos (apartado 3.9).

Como puede observarse, la expresión de PP0731 (C) y de PP4677 (D) llevó a la síntesis de PC en *E. coli*. Estos resultados no esperados, permiten sugerir que posiblemente, en *P. putida* existan dos genes responsables de codificar para proteínas con actividad PCS.



#### 4.2.9. Obtención de mutantes de *P. putida* A ATCC 12633 en los genes homólogos a *pp0731* y *pp4677*.

A los efectos de confirmar cual es el gen o los genes involucrados en la biosíntesis de fosfatidilcolina y/o fosfatidilserina, se procedió a la obtención de mutantes de *P. putida* A ATCC 12633 afectadas en los genes homólogos a los orfs *pp0371* y *pp4677*. La obtención de mutantes se llevó a cabo mediante la inserción de un cassette de resistencia a gentamicina (*aacC1*) y kanamicina (*aph(3')-IIa*), respectivamente, de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos (apartado 3.21.1). La **Figura 4.2.11** muestra la secuencia de nucleótidos correspondientes a los orfs *pp0731* y *pp4677*, a partir de las cuales se diseñaron los oligonucleótidos específicos para su amplificación por PCR. Las correspondientes amplificaciones se llevaron a cabo usando como molde ADN genómico de *P. putida* KT2440. Los sitios de restricción usados para la posterior inserción de los cassettes de resistencias están subrayados.

```
>pp0731
ATGCCACATTGGCGCGTGTGTTCCGTTTCGTCCTTTTGGATTGGCGAACATATTAACAATGTTCAATATCGGCCTGGCCTTCGGTACTG
TTTATTTTTCGTTGCAAAGACGGTTTGTCTGGCGGCGACGATGATTTGCTGGCCGCGATGCTCGATTCCTTGACGGCCACATAGCCCGCG
CTACCTGGCTGCGAACAGCGCGCAACGGGCTTCGGCAAGCATCTAGACAGTTTTCGCGACTTGCTCAATTCAGCATCACGCCAGCCCTTGTC
ATCCTAATCCTCGACAGTCTCTTTCGGCCACGCTGGCCGAGTAACCTGTTTTCACGGCCATTTGCGGCTATCGCTGTTGGCATGCCCCG
GCACATCGGCTGGCGGGGATATCAGGGGTACCCACCACATATTCAGGATTTGCTTTGCGCTGGCGCTGATGGGGTTATCGGCCGGGCATTA
CGGTGCCGGTGTGATCGTCGGCCTAATGGCCCTGGTCCGATCCTCCAGTCCAGCTCAGCAGCTTGAGAATCCCAAGTATGGCGCACCTTCGACGGTC
GCTTGCCTTCGCAATGCTGTTCCGGCTCAGCACTATTACTTTTCATCCCTGGTAA

>pp4677
ATGAGCGAACGTCGCCGAAGAGCCGAACAAGCCCTCCGACGCCGAAAGCCTGCTACCTGTCGATGAGCACGTTGAAGAAGGGCATGACGCCGAAG
GCCGAAGGTGCGCCACCCGCGCATCTACCTGTTGCCCAACCTGTTTACCACCGCCAACTGTTTTCGCGGTTTCTATTCATCATCAGCTCGAT
GAGCGCACAGAGCGCCCTGAGTGCCGGCGACCCGCGGAGGCGAGCAAGTACTTCGCTTTTGGCGCTATCGCCATCTTCGTTGGCCATGGTGTCTC
GACGGCCTGGACGGCCGCGTTGCGCGCATGACCAATACCCAGAGTGCCTTCGGTGCCGAGTATGACTCGCTGTCCGATATGGTCCGCTTCGGCG
TGCCCCGGCTTTGCTGGCCTTCGCTGGGCGCTGGGTGACATGGCAAGGTGGCTGGATGGTTGCCCTTCATCTATGTGGCCGGTGCCTCGTT
GCGCCTGGCGCGCTTCAATACCCAGGTCCGTACCCCGGACAAGCGCTACTTTCATCGGCCTGGCCAGCCCGGCTGCCCGCGTGTGGTGGCAGGC
ACCGTATGGGCGTTTACGGACTACGGCATCCAGGGCTCCAAGCTGTCGTTCTGGTCGCGCTGCTGGTGGCTGCTGGCATGCTGATGGTCA
GCAACATCAAGTACAACAGTTTCAAGGAGCTGGACCTCAAGGGCGCGTCCCGTTTCGTTGGCGATCCTGGCGGTGGTGTGTTTCCGCTCGT
GTTTCAGGACCCGCGGTATCCTGCTGTTGATCTTCTTGCCTATGCAGCATCGGGGCCGATCCAGTTCCTGCTGAAGGCGCGCCTCGCAA
CCGTGA
```

**Figura 4.2.11:** Secuencia nucleotídica completa de los genes *pp0731* y *pp4677* de *P. putida* KT2440. En *pp0731*, se señala el sitio de restricción interno para *Xba*I y en *pp4677* el sitio interno de corte para *Nco*I, los cuales fueron considerados para la correspondiente inactivación de los genes.

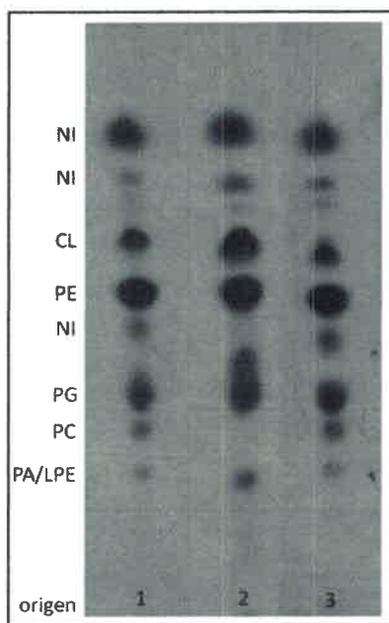
Una vez obtenidas las construcciones deseadas: *pp0731::aacC1* y *pp4677::aph(3')-IIa*, fueron ligadas al plásmido suicida pKNG101, obteniéndose los plásmidos pPB21 y pPB20, respectivamente, (**Tabla 3.1**), los que fueron electroporados a células de *P. putida* A ATCC 12633 a fin de obtener las mutantes correspondientes. Las mutaciones fueron corroboradas por PCR de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos (apartado 3.23.1). Las mutantes obtenidas fueron denominadas *P. putida* PB01 (*pp0731*homólogo::*aacC*) y *P. putida* PB02 (*pp4677*homólogo::*aph(3')-IIa*).



Adicionalmente, los genes de *P. putida* A ATCC 12633 homólogos a *pp0731* y a *pp4677*, fueron amplificados por PCR y ligados a pGem<sup>®</sup>T Easy (Promega), generando los plásmidos pPB24 y pPB23, respectivamente (Tabla 3.1). Los fragmentos clonados fueron enviados a secuenciar a Macrogen (Korea). Por análisis de secuencia se determinó que los genes de *P. putida* A ATCC 12633 mutados, presentan una homología de aproximadamente de un 98 % con los orfs *pp0731* y *pp4677* de *P. putida* KT2440.

#### 4.2.10. Perfil fosfolipídico de *P. putida* PB01 y *P. putida* PB02.

Para determinar si las mutantes presentaban algún defecto en la síntesis de alguno de sus PL, particularmente PC y/o PS, se evaluó el perfil fosfolipídico de *P. putida* A ATCC 12633, *P. putida* PB01 y *P. putida* PB02. La Figura 4.2.12 muestra una TLC representativa de los resultados obtenidos.



**Figura 4.2.12:** Patrón fosfolipídico de *P. putida* A ATCC 12633 (calle 1), *P. putida* PB01 (calle 2) y *P. putida* PB02 (calle 3). Las células se hicieron crecer en medio rico LB hasta una  $DO_{660}=0,2$ . En ese momento se les adicionó  $1\mu\text{Ci/ml}$  de  $[1-^{14}\text{C}]$ -acetato y se incubaron durante 2 hs. Los PL fueron extraídos, separados por TLC desarrollada con cloroformo:metanol: $\text{H}_2\text{O}$  (65:25:4, v/v) e identificados por comparación de sus  $R_f$  con testigos correspondiente. Referencias: PE, fosfatidiletanolamina; PG, fosfatidilglicerol; CL, cardiolipina; PA, ácido fosfatídico; PC, fosfatidilcolina; LPE, lisofosfatidiletanolamina, NI: no identificado

Como se desprende del análisis de la Figura 4.2.12, *P. putida* PB01 (mutante deficiente en el gen homólogo a *pp0731*) carece de PC en su membrana (calle 2) mientras que el perfil fosfolipídico de *P. putida* PB02 (calle 3), es semejante a lo observado en la cepa salvaje (calle 1), detectándose la presencia de PC. Adicionalmente, cuando se determinó actividad PCS con extractos libres de células de *P. putida* A ATCC 12633 y *P. putida* PB01, PCS solo fue detectada en los extractos libres de células provenientes de *P. putida* A ATCC 12633 ( $35,80 \pm 0,13$  nmol PC/min/ $\mu\text{g}$  prot). En conjunto, estos resultados



indicaron que el gen homólogo a *pp0731* en *P. putida* A ATCC 12633 es el responsable de la síntesis de PC.

La cuantificación de PL de *P. putida* PB01 mostró como cambio más notorio, respecto a lo detectado en la cepa salvaje *P. putida* A ATCC 12633, un incremento del 130 % en el contenido de CL.

El incremento de PL aniónicos (An) compensando la falta de PC en membranas ha sido observado en *Brucella abortus* y *Acetobacter aceti* (Hanada *et al.*, 2001, Comerci *et al.*, 2006). *B. abortus* sintetiza PC a través de una actividad PCS colina dependiente. Si la cepa salvaje de *B. abortus* se hace crecer en ausencia de colina exógena, no presenta PC en su membrana y la falta de este PL zwitteriónico (Zw), es subsanada a través de un gran incremento en los niveles de otro PL-Zw, PE y un pequeño incremento del PL aniónico PG. La mutante de *B. abortus* deficiente en *pcs*, compensa la ausencia de PC con cambios semejantes a los detectados en su cepa parental crecida sin colina exógena (Comerci *et al.*, 2006). Un comportamiento similar a este ha sido detectado en mutantes de *A. aceti* deficientes en PMT (enzima involucrada en síntesis de PC) pero, a diferencia de lo observado en *B. abortus*, el incremento de PG en esta cepa fue aproximadamente un 100 % respecto a lo detectado en su cepa salvaje (Hanada *et al.*, 2001).

La composición de la membrana bacteriana y su funcionalidad han sido examinadas de acuerdo al empaquetamiento de los lípidos que la constituyen. Goldfine (1984), señala que en bacterias con alta proporción de ácidos grasos (AG) insaturados, la presencia de PC, PG, CL y/o PS es necesaria para compensar el aumento del volumen de la membrana provocado por la presencia de estos AG insaturados, a los efectos de mantener bicapas estables. En diferentes especies de *Pseudomonas* los AG insaturados predominantes son: ácido palmitoleico (*cis*- $\Delta^9$ -16:1), ácido vaccénico (*cis*- $\Delta^{11}$ -18:1) y C17:ciclopropano (ácido *cis*-9,10-metilenehexadecanoico) (Ramos *et al.*, 1997, Schweizer, 2004). Para el caso particular de *P. putida* DOT-T1, el porcentaje de C17:ciclopropano alcanza un 30 % (Ramos *et al.*, 1997).

Si bien para *P. putida* A ATCC 12633 no se ha realizado un análisis de los AG constituyentes de los PL, los antecedentes antes mencionados permiten plantear que, posiblemente el incremento de CL detectado *P. putida* PB01, sumado a posibles cambios en la composición de los ácidos grasos de los PL, sea la estrategia eficaz para compensar la falta de PC, estabilizando de esta manera la membrana celular.

Anteriormente y durante el análisis de los miembros de la superfamilia de CDP-alcohol fosfatidiltransferasa (apartado 4.2.7), se mostró, en términos de homología, que *pp4677* podría codificar para una fosfatidilserina sintasa clase II (PssAII).



Cuando se llevó a cabo la expresión de PP4677 en el huésped heterólogo *E. coli*, se detectó la presencia de PC (**Figura 4.2.10**). Sin embargo la interrupción del gen homólogo a *pp4677* en *P. putida* A ATCC 12633, no produce cambios significativos en la composición de sus PL, particularmente en lo que se refiere al contenido de PC y PE (**Figura 4.2.12, calles 1 y 3**). Estos resultados ponen en evidencia que en *P. putida* A ATCC 12633 el gen *pp4677*-homólogo no estaría involucrado en la síntesis de PC o PS o que, posiblemente, este gen no sea funcional en este microorganismo. La detección de PC en células de *E. coli* expresando el gen *pp4677*, podría ser atribuida a que el gen fue amplificado desde el genoma de *P. putida* KT2440 y no de *P. putida* A ATCC12633. En numerosas bacterias han sido descritos una amplia cantidad de genes no funcionales o pseudogenes (Mira y Pushker, 2005, Chih-Horng y Howard, 2010). Para el caso particular de *P. aeruginosa*, Wilderman y col. (2002) demostraron la existencia de un gen *pmt* no funcional. En la búsqueda de posibles genes involucrados en la biosíntesis de PC en *P. aeruginosa* se seleccionaron dos posibles candidatos, uno con homología a la PCS de *S. meliloti* (39 % de identidad de AA) y el otro con homología a la PMT de *Rhodobacter sphaeroides* (35 % de identidad de AA). Ambos candidatos fueron mutados y solo la mutante afectada en el gen homólogo a *pcs* resultó deficiente en la síntesis de PC. La no funcionalidad de PMT fue atribuida a ciertas variaciones en el extremo amino terminal de la proteína, siendo éste algo más hidrofóbico que el mismo extremo de la PMT de *R. sphaeroides* (Wilderman *et al.*, 2002).

Considerando que la mutación generada en *P. putida* PB02 no afectó la biosíntesis de PS y, consecuentemente, de PE, es factible proponer que en *P. putida* A ATCC 12633 la síntesis de PS se lleve a cabo por medio de otra enzima.

Estudios genéticos y bioquímicos han revelado la existencia de dos subclases de PSs: fosfatidilserina sintasa clase I (PSsAI), perteneciente a la superfamilia de las fosfolipasas D y fosfatidilserina sintasa clase II (PSsAII), la cual forma parte de las CDP-alcohol fosfatidiltransferasa (Matsumoto, 1997, Koonin, 1996). Análisis bioinformáticos indicaron que PSsAII puede estar presente en eucariotas, eubacterias y archeobacterias, mientras que PSsAI ha sido relacionada únicamente a ciertas familias de las -proteobacterias. Para el caso particular de *Pseudomonas*, algunas de las especies del género pueden tener ambos genes responsables de la síntesis de PS, como es el caso de *P. fluorescens* y *P. syringae* (Sohlenkamp *et al.*, 2003).

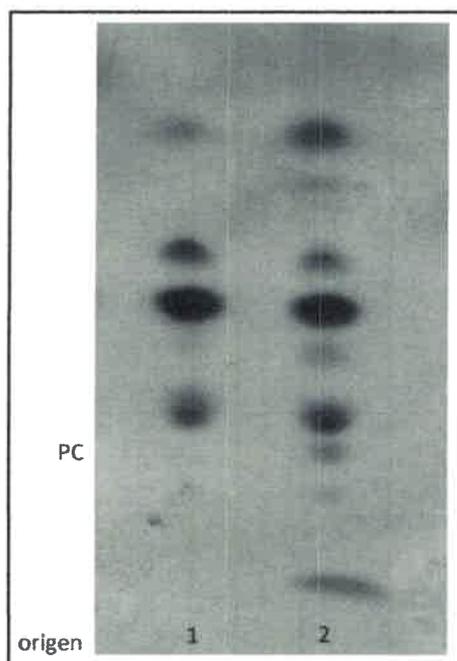
En *E. coli*, ha sido descrito la secuencia completa del gen responsable de la síntesis de PS (*pssAI*) (Matsumoto, 1997 y citas incluidas). A partir de la secuencia de aminoácidos de PSsAI de *E. coli* (EGP24480) examinamos el genoma de *P. putida* KT2440 en busca de ORFs homólogos. El análisis mostró como resultado del ORF, PP3664, el cual codifica para una proteína de 442 aminoácidos, con un 44 % de identidad a PSsAI de *E. coli*. En función



de ello, consideramos al *orf pp3664* candidato de ser el responsable de participar en la síntesis de PS. Hasta el momento no ha sido posible amplificar el fragmento correspondiente a *pp3664* a pesar que se realizaron cambios de ciclos de PCR, en la temperatura de fusión, modificaciones en la concentración de ADN, de ADN polimerasa y remodelaciones de oligonucleótidos. Posiblemente se deban realizar otros cambios para continuar, de ser necesario, con el análisis de este gen (ver perspectivas). Cabe recordar que el ORF PP3664, fue previamente seleccionado cuando se realizó la búsqueda de genes homólogos a la superfamilia de las PLDs (Tabla 4.1.1).

#### 4.2.11. Complementación de *P. putida* PB01.

*P. putida* PB01 fue complementada con pPB24 (Tabla 3.1), el cual contiene el gen homólogo a *pp0731* amplificado desde el genoma de *P. putida* A ATCC 12633 ligado al plásmido replicativo pBBRMCS-2 (Tabla 3.1). En paralelo, y como control negativo, la cepa mutante fue complementada con pBBRMCS-2 vacío. La Figura 4.2.13 muestra el perfil fosfolipídico de las cepas portando los plásmidos de interés.



**Figura 4.2.13:** Perfil fosfolipídico de *P. putida* PB01 complementada. *P. putida* PB01/pBBRMCS-2 (calle 1) y de *P. putida* PB01/pPB24 (calle 2) se hicieron crecer en medio rico LB hasta una  $DO_{660}=0,2$ . En ese momento se les adicionó  $1\mu\text{Ci/ml}$  de  $[1-^{14}\text{C}]$ -acetato y se incubaron durante 2 hs. Los PL fueron extraídos y separados por TLC desarrollada con cloroformo:metanol: $\text{H}_2\text{O}$  (65:25:4). PC: fosfatidilcolina.

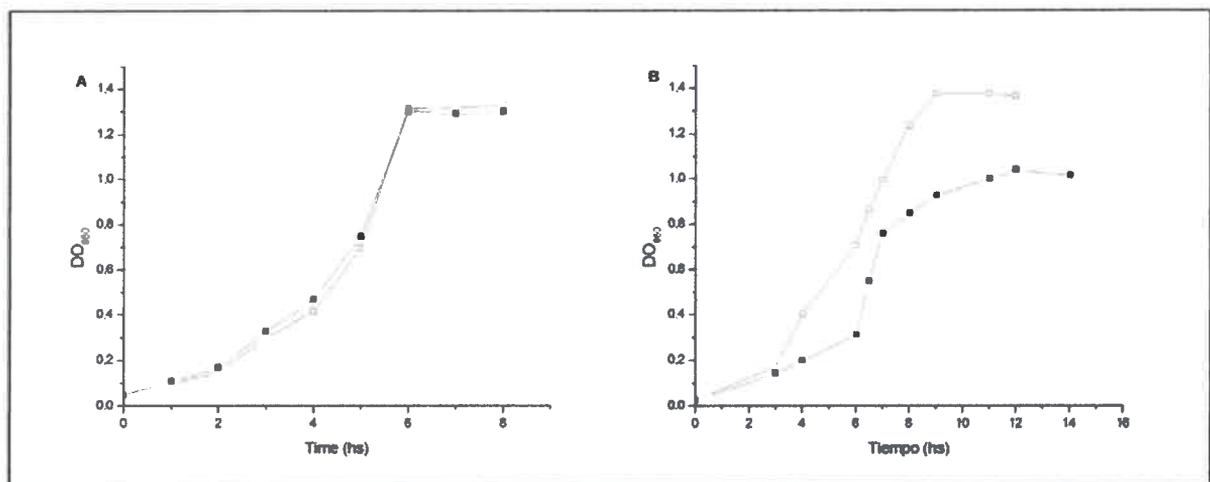
En esta figura puede observarse que la complementación con el plásmido vacío (pBBRMCS-2) (calle 1), resultó en un perfil de PL cualitativamente semejante al de la cepa mutante (Figura 4.2.12, calle 2), y que cuando *P. putida* PB01 fue complementada con pPB24, los niveles de PC se restablecieron (calle 2).



En conjunto estos resultados ponen de manifiesto que en *P. putida* A ATCC 12633, el gen homólogo a *pp0731*, denominado de ahora en adelante *pcs*, es el responsable de codificar para PCS y consecuentemente, está involucrado de la síntesis de PC.

#### 4.2.12. Caracterización fisiológica de *P. putida* PB01.

Con el objetivo de determinar si la mutación a nivel de *pcs* altera o no el crecimiento bacteriano, *P. putida* PB01 y su cepa parental *P. putida* A ATCC 12633, se hicieron crecer en medio rico LB o en HPI-BSM suplementado con fuentes preferenciales de C y N (glucosa y  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , respectivamente) (Figura 4.2.14).



**Figura 4.2.14:** Crecimiento de *P. putida* A ATCC 12633 (□) y de *P. putida* PB01 (■) en: (A) medio rico LB o en (B) HPI-BSM en presencia de fuentes preferenciales de carbono y nitrógeno: Se realizaron extracciones periódicas de muestras, a las cuales se le determinó el crecimiento por medición espectrofotométrica de la turbidez del cultivo a 660 nm.

El crecimiento de *P. putida* PB01 en medio rico fue semejante a lo detectado en su cepa parental (A). Sin embargo, cuando la cepa mutante se hizo crecer en medio salino, la tasa de crecimiento fue algo menor, respecto a lo detectado en *P. putida* A ATCC 12633 (B). Este fenotipo fue revertido, parcialmente, cuando *P. putida* PB01 fue complementada con pPB24 (no mostrado). Cabe destacar que cuando *P. putida* PB01 se hizo crecer en medios salinos en presencia de TDTMA como única fuente de carbono, nitrógeno y energía, no se detectó crecimiento, aún manteniendo el cultivo en las condiciones adecuadas de agitación y temperatura durante más de 5 días. Si bien no es posible explicar este fenotipo, diferentes autores han reportado deficiencias en el crecimiento bacteriano y en la movilidad celular debido a la ausencia de PC (de Rudder *et al.*, 2000, Minder *et al.*, 2001, Hanada *et al.*, 2001, Medeot *et al.*, 2009). Los PL han sido asociados al mantenimiento de la integridad de la membrana celular formando bicapas estables y al ensamblaje y estabilidad de proteínas de



membranas (Goldfine, 1984). Las funciones de estas proteínas dependen de las propiedades físico-químicas determinadas por la composición exacta de la bicapa y ciertos cambios en el entorno lipídico pueden afectar la topología y función de las mismas (Matsumoto *et al.*, 2006).

#### 4.2.13. Efecto del aluminio en la sobrevivencia de *P. putida* PB01.

Como se mencionó anteriormente, cuando *P. putida* A ATCC 12633 crece en presencia de TDTMA como única fuente de C y N, la adición de  $Al^{+3}$  al medio, necesario para reanudar el crecimiento bacteriano y lograr la completa mineralización del QAC (Liffourrena *et al.*, 2008) provoca, entre otras modificaciones, un incremento en el contenido de PC (Boeris *et al.*, 2009 y **Tabla 4.2.3**). Un comportamiento similar se observa cuando *P. putida* A ATCC 12633 crece con fuentes preferenciales de C y N (glucosa y  $NH_4Cl$ ) y es expuesta al ión (**Tablas 4.2.4**).

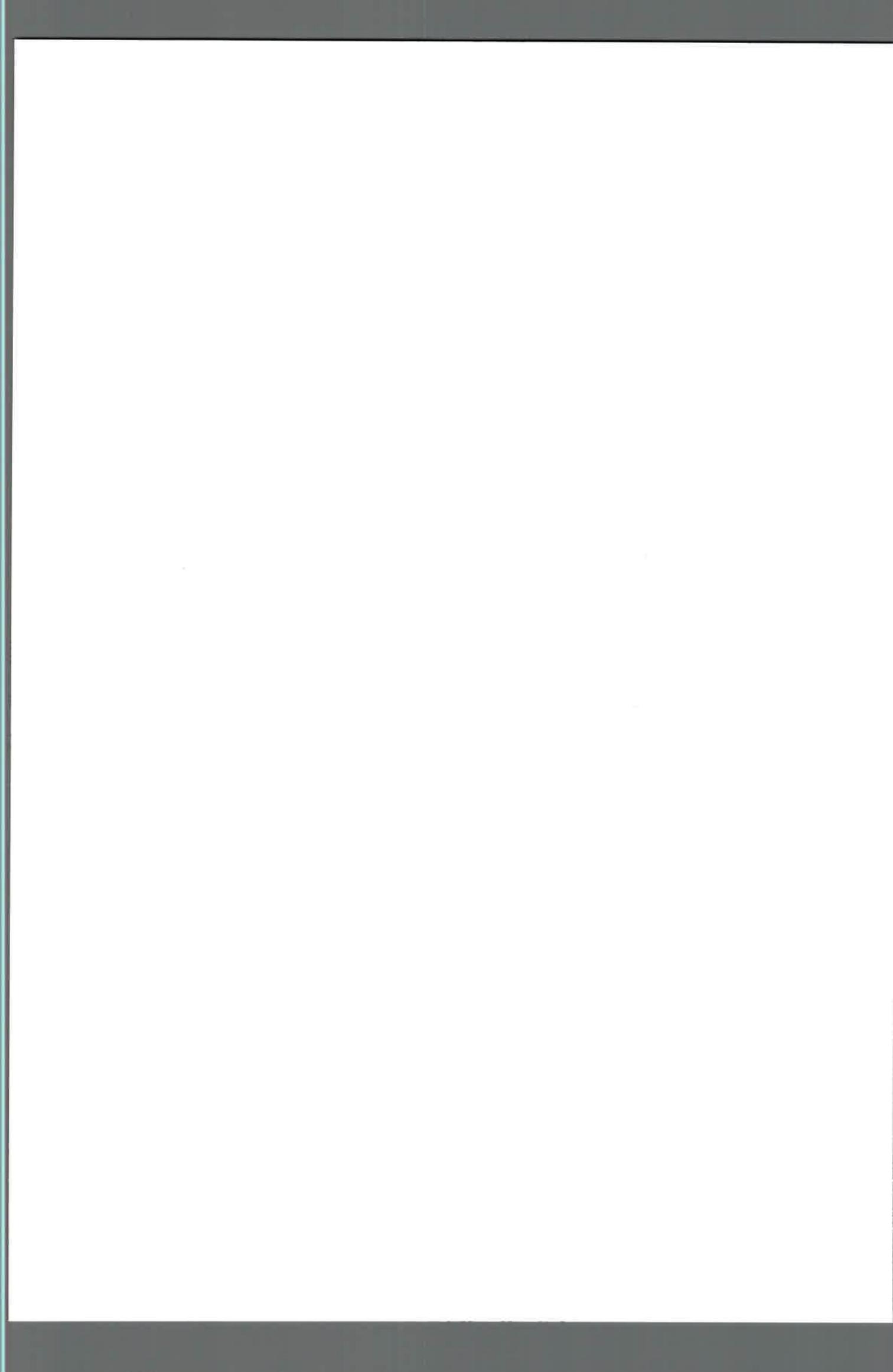
La **Tabla 4.2.7** muestra los resultados obtenidos expresados como viabilidad celular cuando células de *P. putida* A ATCC 12633, *P. putida* PB01 y las correspondientes cepas complementadas se hicieron crecer en medios salinos con adición de glucosa y  $NH_4Cl$  y fueron enfrentadas o no a TDTMA o  $Al^{+3}$ .

**Tabla 4.2.7:** Recuento de células viables de en diferentes cepas de *P. putida*.

Condición	ufc/ml			
	<i>P. putida</i> A ATCC12633	<i>P. putida</i> PB01	<i>P. putida</i> PB01/pBBRMCS-2	<i>P. putida</i> PB01/pPB24
Control	$1,15 \times 10^{12}$	$1,30 \times 10^{12}$	$1,20 \times 10^{12}$	$1,46 \times 10^{12}$
+ 50 mg/l TDTMA	$1,20 \times 10^{12}$	$5,50 \times 10^9$	$9,50 \times 10^{10}$	$7,00 \times 10^{12}$
+ 0,1 mM $Al^{+3}$	$1,30 \times 10^{12}$	$5,50 \times 10^6$	$4,00 \times 10^6$	$1,50 \times 10^{12}$

*P. putida* A ATCC 12633, *P. putida* PB01, *P. putida* PB01/pBBRMCS-2 y *P. putida* PB01/pPB24 se hicieron crecer en HPi-BSM con fuentes preferenciales de C y N hasta final de fase exponencial. En ese momento los cultivos fueron divididos y expuestos o no (control) a 50 mg/l de TDTMA o 0,1 mM de  $AlCl_3$ . Luego de 15 min de exposición se determinó el número de unidades formadoras de colonias (ufc). Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes.

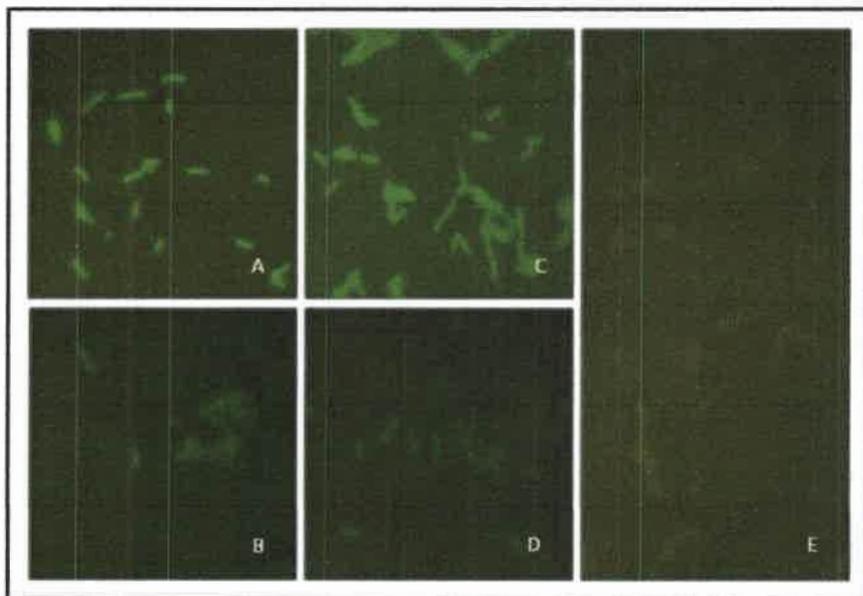
Del análisis de esta tabla, se desprende que la viabilidad celular de *P. putida* A ATCC 12633 (**columna 2**) no se ve afectada por la adición de TDTMA o de  $Al^{+3}$  al medio de cultivo. En la cepa mutante *P. putida* PB01 (**columna 3**), y a diferencia de lo observado para la cepa



salvaje, la presencia del surfactante provoca una disminución de 3 órdenes de magnitud en el número de células viables. La disminución de ufc es mucho más notable (6 órdenes de magnitud) cuando estas células fueron expuestas a  $Al^{+3}$  ya que solo  $5,50 \times 10^6$  células sobreviven a esta situación de estrés. Cuando *P. putida* PB01 fue complementada con pPB24 (Tabla 3.1), el fenotipo fue revertido (columna 5). En conjunto, estos resultados que reflejan una mayor sobrevivencia de *P. putida* A ATCC 12633 y de *P. putida* PB01/pPB24 en presencia del ión, confirman la importancia de PC en la respuesta del microorganismo al aluminio.

#### 4.2.14. Detección de $Al^{+3}$ en membrana de *P. putida* A ATCC 12366 salvaje y mutante.

La Figura 4.2.15 muestra las fotografías de los resultados obtenidos por microscopía de fluorescencia referidos a la detección de  $Al^{+3}$  en las diferentes cepas de *P. putida*. La detección del catión se llevó a cabo utilizando el fluorocromo 2',3,4',5,7-pentahydroxyflavone (reactivo de Morin), compuesto que se une al  $Al^{+3}$  formando un complejo fluorescente Al-Morin (Browne *et al.*, 1990).



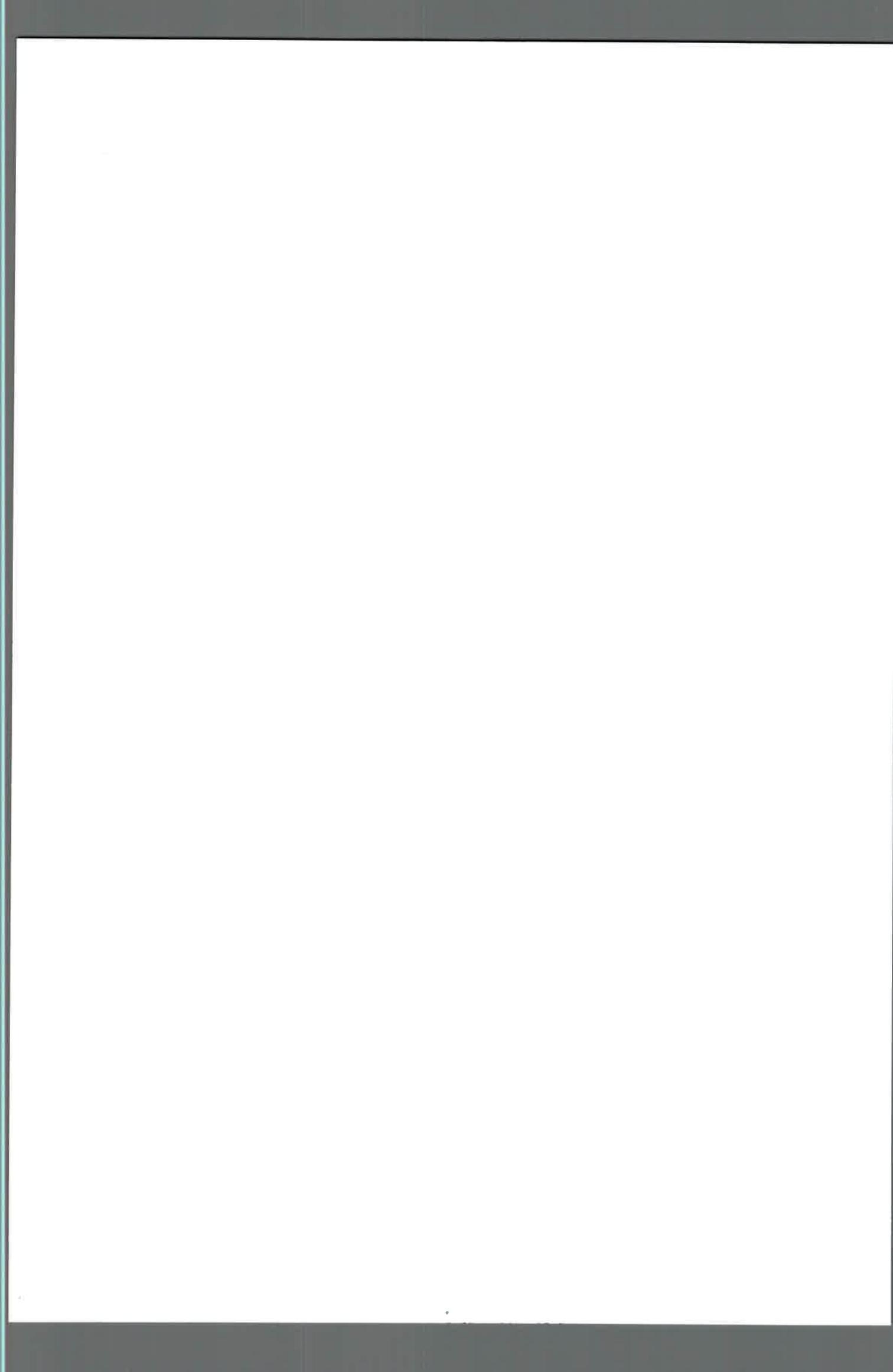
**Figura 4.2.15:** Detección de  $Al^{+3}$  en membranas: Las diferentes cepas de *P. putida* fueron crecidas en medio rico LB hasta final de fase exponencial. A continuación, las células fueron inmovilizadas en portaobjetos y tratadas con Morin según se describe Materiales y Métodos. Los preparados fueron analizados en microscopio de fluorescencia. (A) *P. putida* A ATCC 12633, (B) *P. putida* PB01, (C) *P. putida* PB01/pPB24 y (D) *P. putida* PB01/pBBRMCS-2. (E) células de *P. putida* A ATCC 12633 teñidas con morin sin adición de aluminio (control negativo).

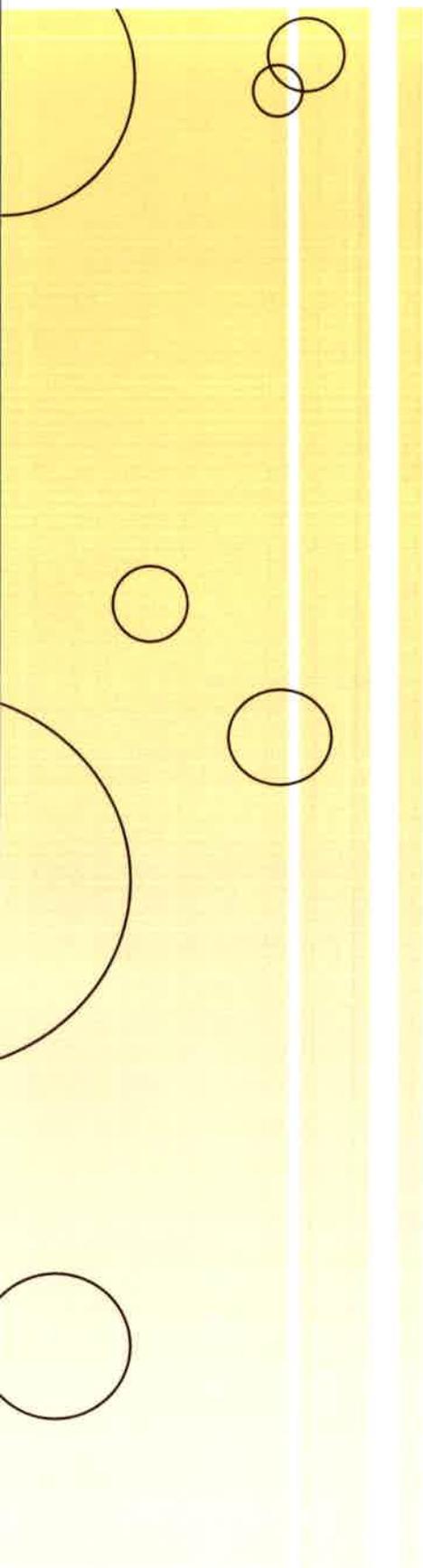


Como puede observarse, los spots de fluorescencia verde se encuentran homogéneamente distribuidos a lo largo de la membrana celular. En concordancia con la ausencia de PC, la intensidad de fluorescencia detectada en células de *P. putida* PB01 (**Panel B**) es mucho menor que la que se observa en *P. putida* A ATCC 12633 (**Panel A**). La intensidad de fluorescencia en la cepa mutante fue restaurada cuando la misma fue complementada con *pcs* (**Panel C**). Cuando la complementación se llevó a cabo con el plásmido vacío (**Panel D**), la fluorescencia observada fue semejante a lo detectado en la mutante *P. putida* PB01.

Estos resultados, sumados a aquellos donde se demostró que en todas las condiciones de cultivo ensayadas en las que estuvo presente el  $Al^{3+}$  la cantidad de PC siempre se modificó (**Tablas 4.2.3 y 4.2.4**), y basándonos en información bibliográfica donde ha sido demostrado que este ión es capaz de interaccionar con los grupos fosfatos de los PL, entre ellos PC y PS (Martin, 1986, Verstraeten *et al.*, 1997, 2003, MacKinnon, *et al.*, 2004, 2006), permitieron plantear un rol fisiológico para PC en el que este PL actuaría como un reservorio temporario del ión a través de la formación de complejos  $Al^{3+}$ -PC.

El mecanismo propuesto implica la formación, en la membrana de *P. putida* A ATCC12633, de complejos  $Al^{3+}$ -PC los cuales, disminuirían el  $Al^{3+}$  libre que pueda ser tóxico para el microorganismo. De esta manera, la formación de estos complejos  $Al^{3+}$ -PC en la membrana se constituyen en una herramienta para la detoxificación del metal tóxico por un mecanismo de bioadsorción. Por otro lado, los complejos  $Al^{3+}$ -PC mantendrían disponible  $Al^{3+}$  para cuando *P. putida* A ATCC 12633 necesite reducir los niveles de TMA acumulados durante el crecimiento con TDTMA, lo cual contribuye a una eficiente utilización del detergente por este microorganismo y su posible utilización como vehículo para la remoción de este contaminante.







Los resultados obtenidos en este trabajo permiten establecer las siguientes conclusiones:

✓ La respuesta de *P. putida* A ATCC 12633 frente al estímulo provocado por el detergente catiónico TDTMA, durante cortos o largos periodos de tiempo, implica cambios en la composición de sus fosfolípidos de membrana, con disminución en el contenido de cardiolipina y aumento de los niveles de fosfatidilglicerol y ácido fosfatídico.

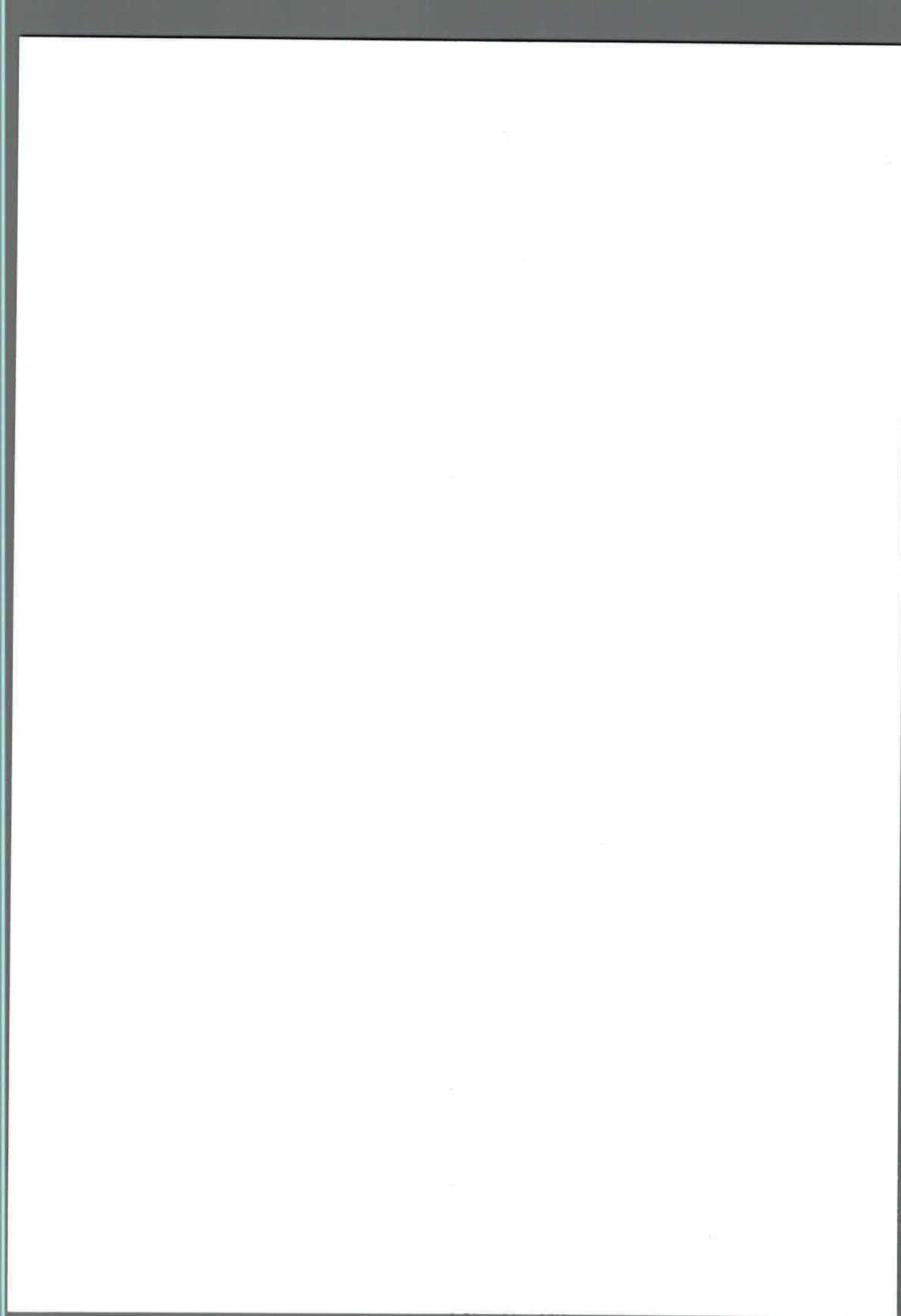
✓ El notorio aumento en el contenido de fosfatidilglicerol y ácido fosfatídico indicó que las cargas negativas de las cabezas polares de los fosfolípidos son los factores primarios implicados en la respuesta a TDTMA, utilizando principalmente ácido fosfatídico para neutralizar la alta densidad de carga positiva del grupo amonio cuaternario del detergente.

✓ La actividad fosfolipasa D detectada en células de *P. putida* A ATCC 12633, sumado al incremento de esta actividad enzimática que se detecta cuando las células se enfrentan a TDTMA, conducen a proponer que esta enzima sería la responsable de catalizar la hidrólisis de cardiolipina generando, de manera rápida y eficaz, parte de los aumentos de ácido fosfatídico y fosfatidilglicerol necesarios para contrarrestar el daño inicial ocasionado por el detergente.

✓ La obtención de una cepa mutante de *P. putida* A ATCC 12633 (*P. putida* GP01) afectada en el gen homólogo al *orf pp5364* de *P. putida* KT2440 (descrito por homología de secuencia como cardiolipina sintasa (*cls*)) y al gen *cls* de *P. putida* DOT T1, cuyo contenido y distribución de cardiolipina en la membrana es semejante a lo que se detecta en la cepa salvaje, permiten proponer: *i*) que en *P. putida* A ATCC 12633 existe otro gen responsable de codificar para cardiolipina sintasa. *ii*) La síntesis de cardiolipina se lleva a cabo a través del accionar de otra actividad enzimática que guarda cierta homología con las cardiolipinas sintasas, como es el caso de la fosfatidilserina sintasa clase I.

✓ El resultado que muestra que la cepa mutante *P. putida* GP01 (*cls* homólogo  $\Delta$ *aacC1*), además de contener niveles de cardiolipina semejantes a los de su cepa parental, carece de actividad fosfolipasa D conduce a plantear que la mutación generada en el gen homólogo a *cardiolipina sintasa* afectó una actividad fosfolipasa D, si bien no es posible descartar, que dicho gen codifique para una actividad dual fosfolipasa D/cardiolipina sintasa.

✓ El aumento de fosfatidilcolina detectado en células de *P. putida* A ATCC 12633 expuestas a  $Al^{+3}$  conduce a proponer que este fosfolípido está implicado en la respuesta bacteriana a este metal tóxico.

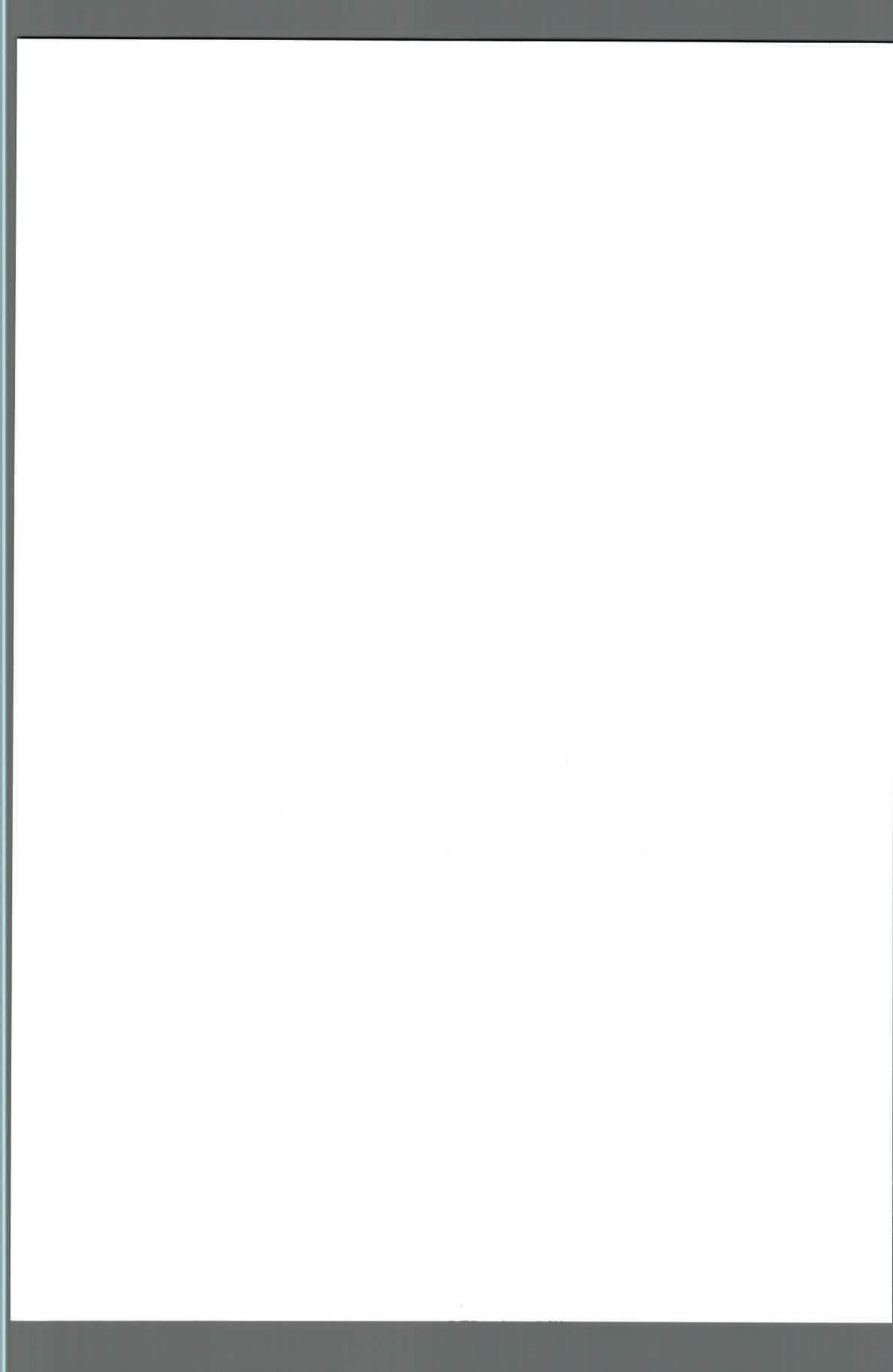


✓ La síntesis de fosfatidilcolina en *P. putida* A ATCC 12633 ocurre sólo a través de la vía de la fosfatidilcolina sintasa. La actividad fosfatidilcolina sintasa es independiente de la adición exógena de colina y activada por la presencia de  $Al^{3+}$ .

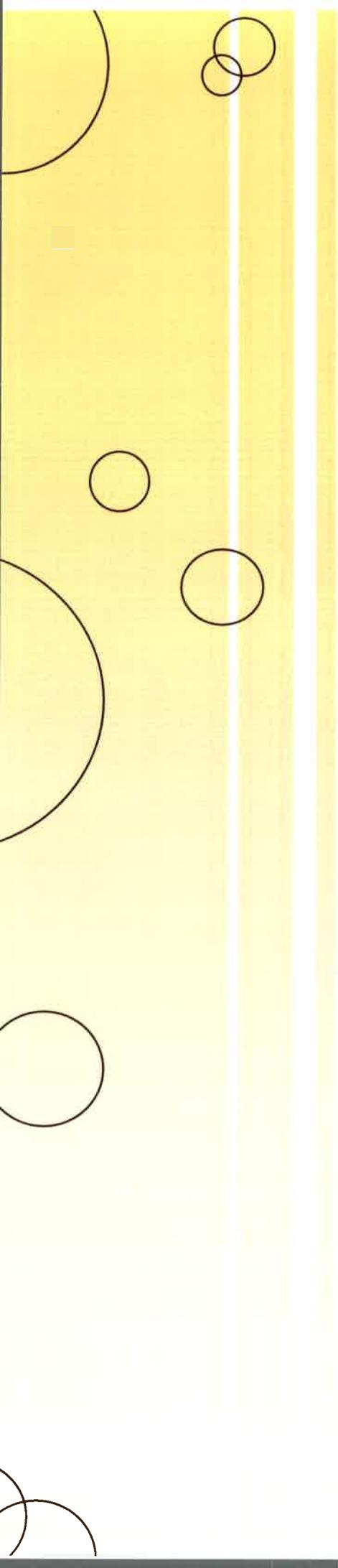
✓ La obtención de una cepa mutante de *P. putida* A ATCC 12633 (*P. putida* PB01) afectada en el gen homólogo al *orf pp0731* de *P. putida* KT2440 (anotado por homología de secuencia como fosfatidilserina sintasa clase II) y al gen *fosfatidilcolina sintasa* de *S. meliloti*, que carece de actividad fosfatidilcolina sintasa y, en consecuencia, de PC en la membrana, confirmó que este gen es el responsable de la síntesis de fosfatidilcolina en *P. putida* A ATCC 12633.

✓ Células de *P. putida* PB01 carentes de fosfatidilcolina y expuestas a  $Al^{3+}$  disminuyen notablemente su viabilidad celular frente al ión y contienen menor cantidad de  $Al^{3+}$  que las membranas de la cepa salvaje, lo que confirma la importancia de fosfatidilcolina en la respuesta bacteriana frente al estrés ocasionado por el metal y permite formular un papel fisiológico para fosfatidilcolina a través de la formación de complejos  $Al^{3+}$ -PC. Estos complejos estarían involucrados en la adsorción del ión a la membrana y mantendrían disponible al mismo para cuando *P. putida* necesite disminuir los niveles de trimetilamina intracelular, que se producen como consecuencia del metabolismo de TDTMA.

✓ Los resultados que muestran el aumento en el contenido de fosfolípidos totales y de fosfatidilglicerol y ácido fosfatídico cuando *P. putida* A ATCC 12633 crece con TDTMA como única fuente de C y N, sumados a los cambios estructurales donde se observa que la presencia del surfactante no altera la integridad de la membrana celular, si bien se detectan pequeñas invaginaciones de membrana, la presencia de estructuras intracelulares (pseudovacúolas) que, posiblemente, guarden relación con el notorio incremento de fosfolípidos totales detectados, y la liberación vesículas de membrana al medio, reflejan distintas estrategias llevadas a cabo por el microorganismo para remediar los daños ocasionado por la presencia del surfactante. El incremento de fosfolípidos totales llevaría a una menor adsorción de TDTMA a la membrana celular, el aumento de ácido fosfatídico a neutralizar la carga positiva del detergente adsorbido y la liberación de vesículas a la excreción de compuestos no deseados, tal como TDTMA o productos de su metabolismo.



En conjunto, los resultados presentados en este trabajo contribuyen al conocimiento de los mecanismos adaptativos que le permiten a *P. putida* A ATCC 12633 contrarrestar el efecto ocasionado por agentes que perturben la integridad de la membrana, tales como detergentes catiónicos o metales tóxicos. Estos mecanismos de adaptación, que implican modificación en el contenido de fosfolípidos específicos por la acción de diferentes actividades enzimáticas, sumados a la capacidad de *P. putida* A ATCC 12633 de crecer a expensas de altas concentraciones de TDTMA y/o TDTMA/Al<sup>3+</sup> muestra el potencial de esta cepa para ser utilizada como vehículo en los procesos de eliminación de estos contaminantes ambientales.



6

[P E R S P E C T I V A S]

Algunas perspectivas que se desprenden de este trabajo de Tesis se describen a continuación:

**Obtener y caracterizar, frente al estrés ocasionado por TDTMA, cepas mutantes de *P. putida* A ATCC 12633 afectadas en el gen homólogo a *cls2* (*pp3264*):** En el apartado 4.1.9. de este trabajo se mostró que el análisis por BLASTP en busca de genes candidatos a codificar para una proteína con actividad cardiolipina sintasa, arrojó diferentes ORFs. Basados en los alineamientos de secuencia, considerando los valores de los diferentes parámetros brindados a partir de la búsqueda informática, uno de los posibles candidatos es el *orf pp3264*, el cual se encuentra anotado por homología de secuencia en *P. putida* KT2440 como *cls2*. Estudios recientes realizados en nuestro laboratorio han permitido clonar un fragmento de 1,5 KB, amplificado por PCR a partir de ADN genómico de *P. putida* A ATCC 12633 del gen homólogo a *cls2*, cuyo alineamiento, mediante el uso de BLASTN del NCBI, indicó que el fragmento clonado posee 97 % de homología con *cls2* de *P. putida* KT2440. Se ha procedido a la inactivación del gen de *P. putida* A ATCC 12633 homólogo a *cls2* mediante inserción del gen de resistencia a kanamicina (*aph(3')-IIa*). El constructo obtenido, fue subclonado en el plásmido suicida pKNG101 y el plásmido obtenido, pRH03, electroporado en *P. putida* A ATCC 12633 y en *P. putida* GP01 a fin de obtener la mutante simple *P. putida* RH01 (*cls2-homólogo::aph(3')-IIa*) y la mutante doble *P. putida* RH02 (*cls-homólogoΔaacC1* y *cls2-homólogo::aph(3')-IIa*), respectivamente. Las mutaciones generadas fueron confirmadas por PCR y, hasta el momento, la caracterización a nivel de fosfolípidos de estas cepas muestra que el contenido de CL y PG de *P. putida* RH01 es semejante a lo observado en la cepa salvaje *P. putida* A ATCC 12633, mientras que en *P. putida* RH02 cardiolipina disminuyó un 50 % y fosfatidilglicerol incrementó aproximadamente 90 % respecto a lo detectado en la cepa salvaje. Parte de estos experimentos se están llevando a cabo en colaboración con la alumna de Microbiología Romina Heredia.

**Expresar, purificar y caracterizar bioquímicamente la actividad PLD de *P. putida* A ATCC 12633:** Como se describió en apartado 4.1.8 de este trabajo, la mutación generada en *P. putida* GP01 a nivel del gen homólogo a *cls* afectó una actividad PLD. Sin embargo, hasta el momento, no hemos podido descartar que el producto del gen homólogo a *cls* tenga una actividad dual PLD/CLs. La cepa mutante *P. putida* GP01 ha sido complementada con el gen homólogo a *cls* de *P. putida* A ATCC 12633 (apartado 3.24), y la actividad PLD fue restaurada. El Doctorando Gastón López está desarrollando los experimentos necesarios para expresar y posteriormente purificar y proceder a la caracterización bioquímica de esta enzima.

**Caracterizar las estructuras intracelulares (pseudovacúolas) y las vesículas extracelulares liberadas cuando *P. putida* A ATCC 12633 crece en presencia de TDTMA como única fuente de C y N:** Sería apropiado analizar el contenido y composición de las pseudovacúolas y vesículas extracelulares en cuanto a la presencia de TDTMA, aluminio y/o algún producto del catabolismo del surfactante, como así también analizar la composición de PL, proteínas y/o lipopolisacárido de las mismas, con la finalidad de aportar al conocimiento de la función de estas estructuras celulares y a su biogénesis.

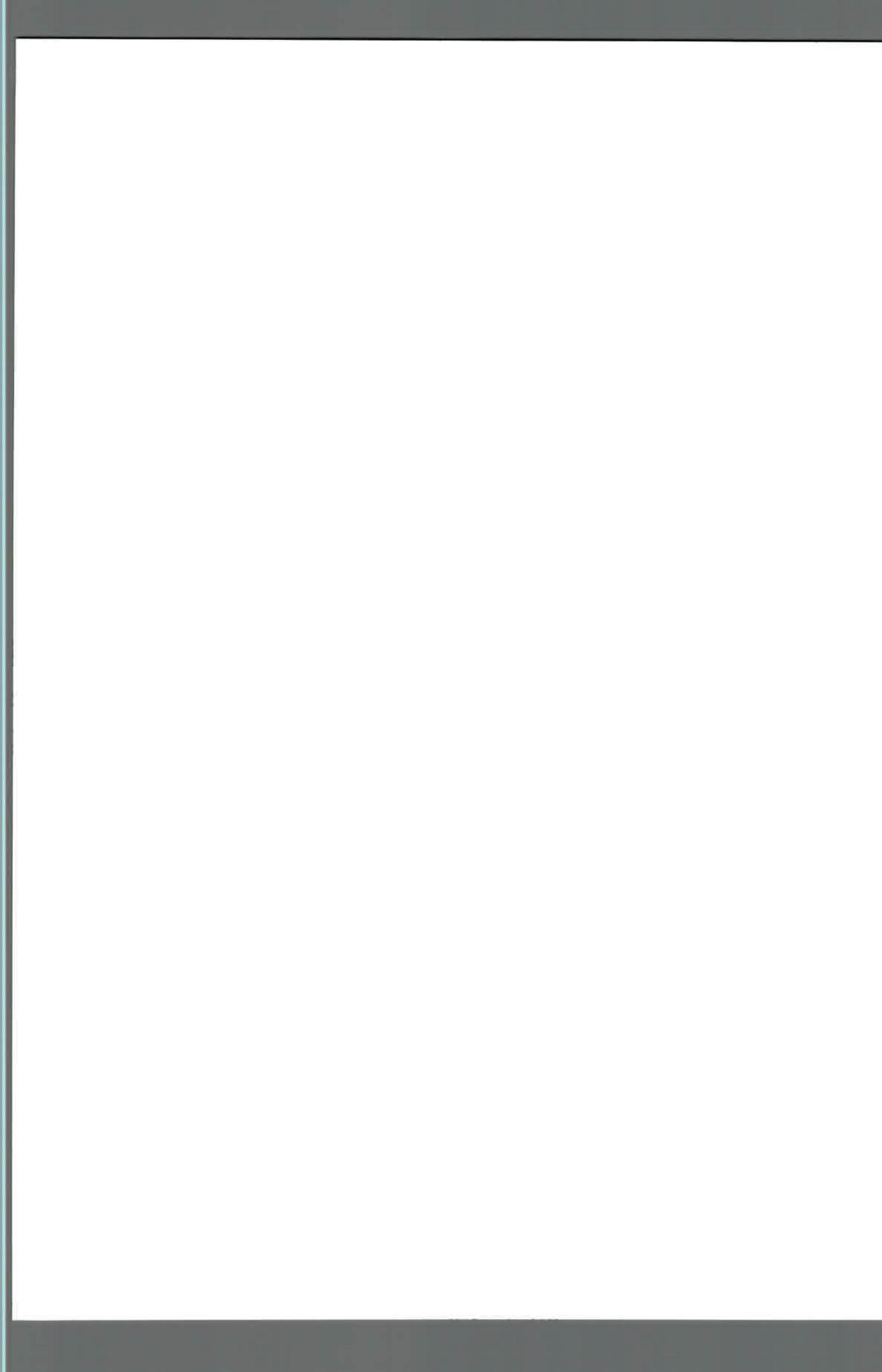
**Obtener mutantes de *P. putida* A ATCC 12633 afectadas en la síntesis de fosfatidilserina (PS):** La obtención de una cepa mutante de *P. putida* A ATCC 12633 afectada en la síntesis de PS y, por lo tanto enriquecida en su membrana con fosfolípidos aniónicos (principalmente CL y PG), permitiría determinar el papel que cumplen los mismos en la respuesta bacteriana al TDTMA. Como corolario de los resultados mostrados en este trabajo de tesis se desprende que la mutación generada en *P. putida* A ATCC 12633 a nivel del gen homólogo al *orf pp4677* (posible *pss* clase II) no afectó la síntesis de PS, lo que llevó a plantear que este gen no es funcional en *P. putida* A ATCC 12633 y que otro gen es responsable de codificar para una fosfatidilserina sintasa (apartado 4.2.10). Para llevar a cabo la obtención de las mutantes de *P. putida* A ATCC 12633 afectada en la síntesis de PS, y de acuerdo al análisis bioinformático realizado (apartado 4.2.10), sería apropiado el estudio en *P. putida* A ATCC 12633 del gen homólogo al *orf pp3664* de *P. putida* KT2440. PP3664 se encuentra anotado en la base de datos como una PSs clase I y presenta un 44 % de identidad de aminoácidos con la PSs clase I descrita en *E. coli*.

**Analizar por cromatografía gaseosa la composición de ácidos grasos de los PL de *P. putida* A ATCC 12633 expuesta o no a TDTMA y/o aluminio:** En este trabajo de tesis se estudiaron particularmente los cambios a nivel de las cabezas polares de los PL cuando *P. putida* A ATCC 12633 fue expuesta a TDTMA o aluminio, contribuyendo al conocimiento general del mecanismo adaptativo que le permite a este microorganismo crecer en presencia de agentes que perturben la integridad de la membrana. Teniendo en cuenta que los mecanismos adaptativos que implican cambios a nivel de PL de membrana incluyen, además, modificaciones a nivel de ácidos grasos de estos PL, sería necesario el análisis de la composición de los ácidos grasos de los PL de *P. putida* A ATCC 12633 expuesta a TDTMA y/o aluminio como así también determinar la fluidez de la membrana celular bajo estas condiciones desfavorables de crecimiento.

**Profundizar estudios de decontaminación de aluminio por *P. putida* A ATCC 12633:** Teniendo en cuenta lo demostrado en este trabajo en cuanto a la participación de PC en respuesta a la presencia de aluminio, sería apropiado analizar si tal interacción ocurre con biomasa muerta y cuál es el comportamiento si se utilizan células inmovilizadas en diferentes matrices.

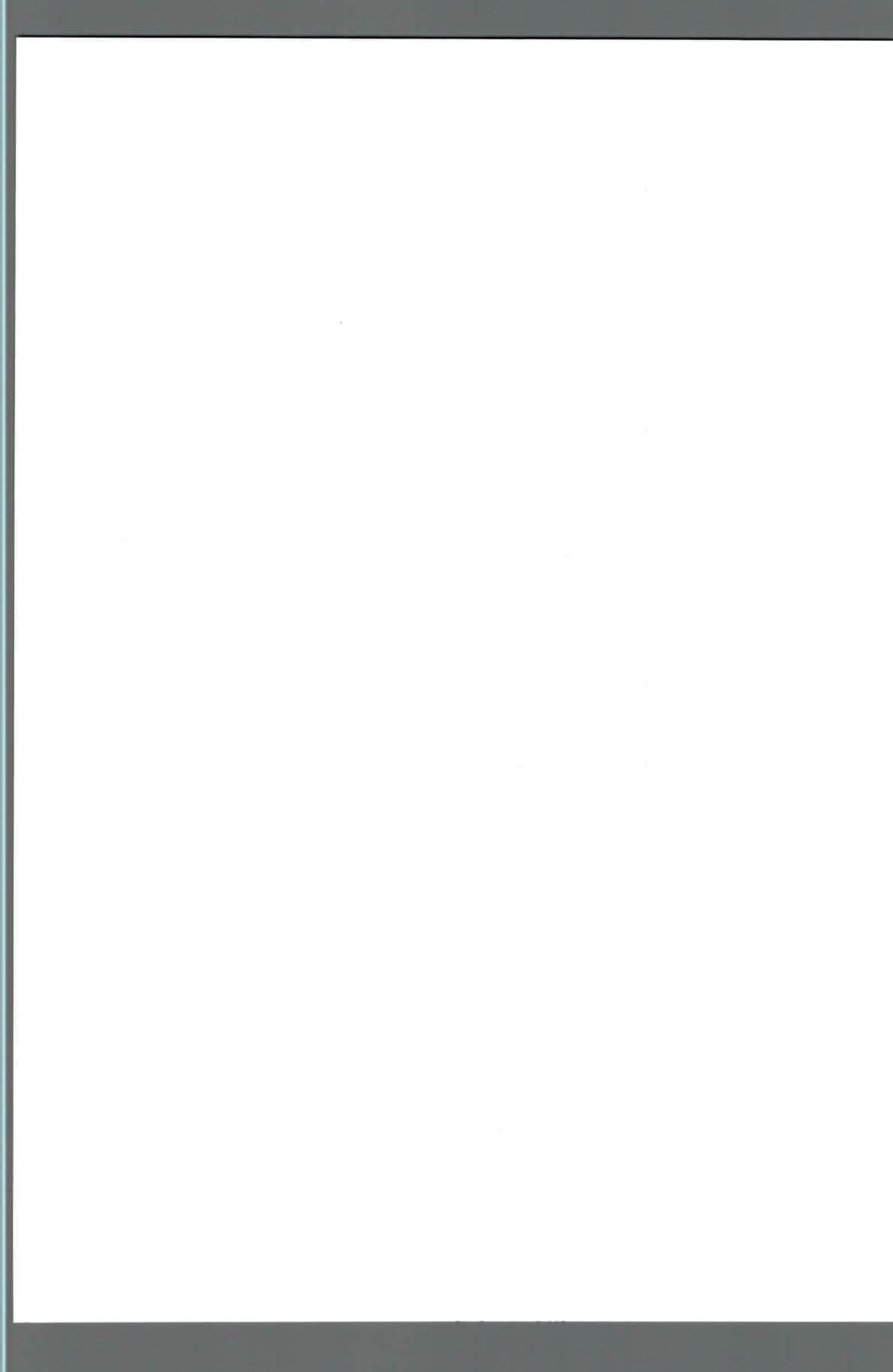


[B I B L I O G R A F Í A]



- Albelo, S.T. and Domenech, C.E. (1997) "Carbons from choline present in the phospholipids of *Pseudomonas aeruginosa*" *FEMS Microbiol. Letters* 157:271-274.
- Allievi, M.C., Sabbione, F., Prado-Acosta, M., Palomino, M.M., Ruzal, S.M. and Sanchez-Rivas, C. (2011) "Metal biosorption by S-layers from *Bacillus* species" *J. Microbiol. Biotechnol.* 21:147-153.
- Anderson, S., Appanna, V.D., Huang, J. and Viswanatha, T. (1992) "A novel role for calcite in calcium homeostasis" *FEBS Lett.* 308:94-96.
- Appanna, V.D., Gázsó, L.G., and St Pierre, M. (1996) "Multiple-metal tolerance in *Pseudomonas fluorescens* and its biotechnological significance" *J. Biotech.* 52:75-80.
- Arica, Y., Kacar, M. and Genc, O. (2001) "Entrapment of white-rot fungus *Trametes versicolor* in Ca-Alginate beads: preparation and biosorption kinetic analysis for cadmium removal from aqueous solution" *Bioresource Technol.* 80:121-129.
- Atlas, R.M. and Bartha, R. (2001) "Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental". IV Edición. Capítulo 10. Ed. Prentice Hall. España.
- Ault-Riche, D., Fraley, D.D., Tzeng, C. and Korberg, A. (1998) "Novel assay reveals multiple pathways regulating stress-induced accumulations of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*" *J. Bacteriol.* 180:1841-1847.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J. and Struhl, K. (1992) "Short protocols in molecular biology". 2<sup>da</sup> Ed. Nolan, C. Harvard Medical School, New York.
- Avila-Sakar, A.J., Misaghi, S., Wilson-Kubalek, E.M., Downing, K.H., Zgurskaya, H., Nikaido, H. and Nogales, E. (2001) "Lipid-layer crystallization and preliminary threedimensional structural analysis of AcrA, the periplasmic component of a bacterial multidrug efflux pump" *J. Struct. Biol.* 136:81-88.
- Bangur, C.S., Howland, J.L. and Katyare, S.S. (1995) "Thyroid hormone treatment alters phospholipid composition and membrane fluidity of the rat brain mitochondria" *J. Biochem.* 305:29-32.
- Berault, R., Hamel, R., Chenier, D., Mailloux, R.J., Joly, H. and Appanna, V.D. (2007) "The overexpression of NADPH-producing enzymes counters the oxidative stress evoked by gallium, an iron mimetic" *Biometals* 20:165-176.
- Beringer, J.E. (1974) "R factor transfers in *Rhizobium leguminosarum*" *J. Gen. Microbiol.* 84:188-198.
- Bernal, P., Muñoz-Rojas, J., Hurtado, A., Ramos, J.L. and Segura, A. (2007) "A *Pseudomonas putida* cardiolipin synthesis mutant exhibits increased sensitivity to drugs related to transport functionality" *Environ. Microbiol.* 9:1135-45.
- Bianchi, V., Ceccanti, B., Masciandaro, G., Doni, S., Macci, C. and Iannelli, R. (2010) "Coupling vermiremediation with phytoremediation technology to enhance the efficiency of reclamation of polluted marine sediments" *International Journal of Global Environmental Issues.* 10:3-4.
- Bligh, E.G. and Dyer, W.J. (1959) "A rapid method of total lipid extraction and purification" *J. Biochem. Physiol.* 37:911-918.
- Boeris, P.S., Domenech, C.E. and Lucchesi, G.I. (2007) "Modification of phospholipid composition in *Pseudomonas putida* A ATCC 12633 induced by contact with tetradecyltrimethylammonium" *J. Appl. Microbiol.* 4:1048-1054.
- Boeris, P.S., Liffourrena, A.S., Salvano, M.A. and Lucchesi, G.I. (2009) "Physiological role of phosphatidylcholine in the *Ps. putida* A ATCC 12633 response to tetradecyltrimethylammonium bromide and aluminium" *Let. Appl. Microbiol.* 49:491-496.
- Boethling, R.S., Howard, P.H., Meylan, W., Stiterler, W., Beauman, H. and Tirado, N. (1994) "Group contribution method for predicting probability and rate of aerobic biodegradation" *Environ. Sci. Technol.* 28:459-465.
- Bogdanov, M., Heacock, P.N. and Dowhan, W. (2002) "A polytopic membrane protein displays a reversible topology dependent on membrane lipid composition" *EMBO* 21:2107-2116.
- Bradford, M. (1976) "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding" *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Brady, D.J., Edwards, D.G., Asher, C.J. and Blamey, F.P.C. (1993) "Calcium amelioration toxicity affects on root hair development in soybean (*Glycine max* (L) Merr)" *New Phytol.* 123:531-538.
- Bréant, D., Jézéquel, K. and Lebeau, T. (2002) "Optimisation of the cell release from immobilised cells of *Bacillus simplex* cultivated in culture media enriched with Cd<sup>2+</sup>: influence of Cd<sup>2+</sup>, inoculum size, culture medium and alginate beads characteristics" *Biotechnol. Lett.* 24:1237-1241.
- Brombacher, C., Bachofen, R. and Brandl, H. (1998) "Development of a laboratory-scale leaching plant for metal extraction from Fly Ash by *Thiobacillus* Strains". *Appl. Environ. Microbiol.* 64:1237-1241.
- Brook, T.D. and Madigan, M.T. (1993) "Microbiología". VI edición. Ed. Prentice may Hispanoamericana. México.
- Browne, B.A., McColl, J.C. and Driscoll, C.T. (1990) "Aluminium speciation using morin. Morin and its complexes with aluminium" *J. Environ. Qual.* 19:65-72.
- Campos-García J. (2001) "Biodegradación de detergentes alquilbenceno sulfonatos" *Ciencia Nicolaita.* 26.
- Carelli, A.A., Brevedan, M.I.V. and Crapiste G.H. (1997) "Quantitative determination of phospholipids in sunflower oil" *JAOCs* 74:511-514.
- Cases I. and de Lorenzo, V. (1998) "Expression systems and physiological control of promoter activity in bacteria" *Curr. Microbiol.* 1:303-310.
- Catucci, L., Depalo, N., Lattanzio, V.M.T., Agostiano, A. and Corcelli, A. (2004). "Neosynthesis of cardiolipin in *Rhodobacter sphaeroides* under osmotic stress" *Biochem.* 43:15066-15072.

- Cervantes C, Espino-Saldaña, A.E., Acevedo-Aguilar, F., León-Rodríguez I.L., Rivera-Cano, M.E., Avila-Rodríguez, M., Wróbel-Kaczmarczyk, K., Wróbel-Zasada, K., Gutiérrez-Corona, J.F., Rodríguez-Zavala, J.S. and Moreno-Sánchez, R. (2006) "Interacciones microbianas con metales pesados" *Revista latinoamericana de microbiología*. 48:203-210.
- Chang, Y.Y., Elchel, J. and Cronan Jr, J.E. (2000) "Metabolic instability of *Escherichia coli* cyclopropane fatty acid synthase is due to RpoH-dependent proteolysis" *J. Bacteriol.* 182:4288-4294.
- Chih-Horng, K. and Howard, O. (2010) "The extinction dynamics of bacterial pseudogenes" *PLoS Genetics*. 6:1050-1057.
- Choi, D.W., Kunz, R.C., Boyd, E.S., Semrau, J.D., Antholine, W.E., Han, J.I., Zahn, J.A., Boyd, J.M., de la Mora, A.M. and Dispirito, A.A. (2003) "The Membrane-Associated Methane Monooxygenase (pMMO) and pMMO-NADH:Quinone Oxidoreductase Complex from *Methylococcus capsulatus* Bath" *J. Bacteriol.* 185:5755-5764.
- Clara M., Scharf, S., Scheffknecht, C. and Gans, O. (2007) "Occurrence of selected surfactants in untreated and treated sewage" *Water Res.* 41:4339-4348.
- Clarke, P. (1982) "The metabolic versatility of pseudomonas". *Antonie Van Leeuwenhoek. Biomedical and life sciences* 48:105-130.
- Clarke, P. and Richmond, M.H. (1975) "Genetic and biochemistry of *Pseudomonas*". Ed. John Wiley and Sons. New York, USA.
- Cole, R. and Prouxl, P. (1975) "Phospholipase D activity of Gram-negative bacteria" *J. Bacteriol.* 124:1148-1152.
- Comerci, D.J., Altabe, S., de Mendoza, D. and Ugalde, R.A. (2006) "*Brucella abortus* synthesizes phosphatidylcholine from choline provided by the host" *J. Bacteriol.* 188:1929-1934.
- Comité Européen Des Agents De Surface Et De Leurs Intermediaires Organiques (CESIO). (2004). 6th World Surfactants Congress, Berlin, Germany.
- Conover, G., Martinez-Morales, F., Heidtman, M.I., Luo, Z.Q., Tang, M., Cheng, C., Geiger, O. and Isberg, R.R. (2008) "Phosphatidylcholine synthesis is required for optimal function of *Legionella pneumophila* virulence determinant" *Cell. Microbiol.* 10:514-528.
- Correa, O.S., Rivas, E.A. and Barneix, A.J. (1999) "Cellular envelopes and tolerance to acid pH in *Mesorhizobium loti*" *Curr. Microbiol.* 38:329-334.
- Cronan Jr, J.E. (2002) "Phospholipid modifications in bacteria" *Current Opinion in Microbiol.* 5:202-205.
- Daiyasu, H., Kuma, K.I., Yokoi, T., Morii, H., Koga, Y. and Toh, H. (2005) "A study of archaeal enzyme involved in polar lipid composition synthesis linking amino acid sequence information, genomic context and lipid composition" *Archea*. 1:399-410.
- Davis, W.B., McCauley, M.J. and Byers, B.R. (1971) "Iron requirements and aluminium sensitivity of hidroxamic requiring strains of *Bacillus megaterium*" *J. Bacteriol.* 58:274-278.
- de Rudder, K.E.E., Lopez-Lara, I.M. and Geiger, O. (2000) "Inactivation of the gene for phospholipid *N*-methyltransferase in *Sinorhizobium meliloti*: phosphatidylcholine is required for normal growth" *Mol. Microbiol.* 37:763.772.
- de Rudder, K.E.E., Sohlenkamp, C. and Geiger, O. (1999) "Plant-exuded choline is used for rhizobial lipid biosynthesis by phosphatidylcholine synthase" *J. Biol. Chem.* 274:20011-20016.
- de Rudder, K.E.E., Thomas-Oates, J.E. and Geiger, O. (1997) "*Rhizobium meliloti* mutants deficient in phospholipid *N*-methyltransferase still contain phosphatidylcholine" *J. Bacteriol.* 179:6921-6928.
- Dean-Raymond, D. and Alexander, M. (1977) "Bacterial metabolism of quaternary ammonium compounds" *Appl. Environ. Microbiol.* 33:1037-1041.
- Dejonghe W., Boon, N., Seghers, D., Top, E.M. and Verstraete, W. (2001). "Bioaugmentation of soil by increasing microbial richness: missing links" *Environ. Microbiol.* 3:649-657.
- Dekker, N. (2000) "Outer-membrane phospholipase A: known structure, unknown biological function" *Mol. Microbiol.* 35:711-717.
- Denich, T.J., Beaudette, L.A., Lee, H. and Trevors J.T. (2003) "Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes" *J. Microbiol. Methods* 52:149-182.
- Ding, W.H. and Liao, Y.H. (2001) "Determination of alkylbenzyl dimethylammonium chlorides in river water and sewage effluent by solid phase extraction and gas chromatography mass spectrometry" *Anal. Chem.* 73:36-40.
- Docampo, R. (2008). "Estructura y función de los acidocalcisomas" *Mensaje Bioquímico*. 32:11-24.
- Dulley, J.R. and Grieve, P.A. (1975) "A simple technique for elimination interference by detergents in the Lowry method of protein determination" *Anal. Biochem.* 64:136-141.
- Edman, K. and Ericson, I. (1987) "Phospholipid and fatty acid composition in mitochondria from spinach (*Spinacia oleracea*) leaves and petioles" *J. Biochem.* 243:575-578.
- El-Ayout, Y.M. and Shaaban-Dessouki, S.A. (1992) "Morphological and structural aberrations of *Sphaeronostoc* sp. induced by Al<sup>3+</sup>" *Egypt J. Microbiol* 27:281-290.
- Ellis, T.N. and Kuehn, M.J. (2010) "Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles" *Mol. Biol. Rev.* 74:81-94.
- El-Said, A.G., Badawy, N.A. and Garamon, S.E. (2010) "Adsorption of cadmium (II) and mercury (II) onto natural adsorbent Rice Husk Ash (RHA) from aqueous solutions: study in single and binary system" *J. American Sci.* 6:400-409.
- Exley, C. (2004) "The pro-oxidant activity of aluminum" *Free Radic. Biol. Med.* 36:380-387.
- Exley, C. and Birchall, J.D. (1992) "The cellular toxicity of aluminium" *J. Theor. Biol.* 159:83-89.



- Fang, J., Barcelona M.J. and Alvarez, P.J. (2000) "Phospholipid compositional changes of five pseudomonad archetypes grown with and without toluene" *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54:82-389.
- Ferrer I. and Furlong, E.T. (2002) "Accelerated solvent extraction followed by on-line solid-phase extraction coupled to ion trap LC/MS/MS for analysis of benzalkonium chlorides in sediment samples" *Anal. Chem.* 74:1275-80.
- Finean, J.B. and Michell, R.H., (1981) "Isolation, composition and general structure of membranes" In: *Membrane Structure*. Ed. Finean, J.B., Michell, R.H. Elsevier, New York, pp. 19-25.
- Fischer, W. and Leopold, K. (1999) "Polar lipids of four *Listeria* species containing L-lysylcardiolipin, a novel lipid structure, and other unique phospholipids" *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49:653-62.
- Fiske, C.H. and SubbaRow, Y. (1925) "Methods in Enzimology" Colowick, S.P. y N.O. Kaplan. Vol 14. Lipids. Dited by Lowenstein, J.M. pp. 486.
- Gadd, G.M., (2000) "Bioremedial potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization" *Current Opinion in Biotechnol.* 11:271-279.
- Galán, B., Díaz, E. and García, J.L. (2000) "Enhancing desulphurization by engineering a flavin reductase-encoding gene cassette in recombinant biocatalysts" *Environ. Microbiol.* 2:687-669.
- Games, L.M., King, J.E. and Larson, R.J. (1982) "Fate and distribution of a Quaternary ammonium surfactant, octadecyltrimethylammonium chloride (OTAC), in wastewater treatment" *Enviromen. Sci. Technol.* 16:483-488.
- Gandhi, M.R, Viswanathan, N. and Meenakshi, S. (2010) "Adsorption mechanism of hexavalent chromium removal using Amberlite IRA 743 resin" *Ion Exchange Letters.* 3:25-35.
- Garcidueñas Piña, R. and Cervantes, C. (1996) "Microbial interactions with aluminium" *Biol. Met.* 9:311-316.
- Ghosh, A.K., Ramakrishnan, G. and Rajasekharan, R. (2008) "YLR099C (ICT1) encodes for a soluble acylCoA dependent lysophosphatidic acid acyl tranferase responsible for enhanced phospholipid synthesis on organic stress in *Saccharomyces cerevisiae*" *J. Biol. Chem.* 283:24525-24533.
- Gilbert, E.S., Walker, A.W. and Keasling, J. (2003) "A constructed microbial consortium for biodegradation of the organophosphorus insecticide parathion" *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61:77-81.
- Gilbert, P. and Moore, L.E. (2005) "Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet" *J. Appl. Microbiol.* 99:703-715.
- Goldfine H. (1982) "Current topics in membranes and transport". In: Razin, S., Rotten, S., editors. New York, NY, USA: Academic Press. pp.1-43.
- Goldfine, H. (1984) "Bacterial membranes and lipid packing theory" *J. Lipid. Res.* 25:1501-7.
- Goren, M. (1984) "The Mycobacteria", part A. In: *Microbiology Series*. Ed. Kubica, P., Wayne, L.G. New York, USA. pp.379-415.
- Gorhan, J. (1995) "Betaines in higher plant-biosynthesis and role in stress metabolism. In Amino acid and their derivatives in higher plants. Society for Experimental Biology Seminar series, Vol 56, Cambridge University Press, Cambridge. pp. 173-203.
- Grogan, D.W. and Cronan Jr, J.E. (1997) "Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria" *Microbiol. Mol. Rev.* 61:429:441.
- Guerin-Mechín, L., Dubois-Brissonet, F., Heyd, B. and Leveau, J.Y. (1999) "Specific variations of fatty acid composition of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 induced by quaternary ammonium compounds and relation with resistance to bactericidal activity" *J. Appl. Microbiol.* 87:735-742.
- Guida, L., Saidi, Z., Hughes, M.N. and Poole, R.K. (1991) "Aluminum toxicity and binding *Escherichia coli*" *Arch. Microbiol.* 156:507-512.
- Guo, D., and Tropp, B.E. (2000) "A second *Escherichia coli* protein with CL synthase activity" *Biochim. Biophys. Acta.* 1483:263-274.
- Guzzo, A., Diorio, C. and DuBow, M.S. (1991) "Transcription of the *Escherichia coli* *fliC* gene is regulated by metal ion" *Appl. Environ. Microbiol.* 57:2255-2259.
- Hamel, R. and Appanna, V.D. (2003) "Aluminum detoxification in *Pseudomonas fluorescens* is mediated by oxalate and phosphatidylethanolamine" *Biochim. Biophys. Acta.* 1619:70-76.
- Hanada, T., Kashima Y., Kosugi, A., Koizumi, Y., Yanagida, F. and Udaka, S. (2001) "A gene encoding phosphatidylethanolamine N-methyltransferase from *Acetobacter acetii* and some properties of its disruptant" *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65:2741-2748.
- Hanahan, D. (1983) "Studies of transformation *Escherichia coli* of plasmids" *J. Mol. Biol.* 166:557-580.
- Hanson, A.D., Rivoal, J., Burnet, M. and Rathinasabapathi, B. (1995) "Quaternary ammonium and ternary sulfonium compounds in response to water deficit". In: *Environment and Plant metabolism: Flexibility and Acclimation*. Ed. Smirnov, N. Bios. Scientific, Oxford. pp.189-198.
- Harbhajan S. (2006) "*Mycoremediation: fungal bioremediation*" New York: Wiley-Interscience.
- Higgins, J.A. (1987) "Separation and analysis of membrane lipid components". In: *Biological membranes: a practical approach*. Ed. J.B.C. Findlay & W.H. Evans Oxford, England: IRL Press. pp. 103-137.
- Hoffmann, H., Gefdic, S.G., Gelzer, J., Heymann, H. and Adair, W.F. (1973) "Ultrastructural alterations associated with the growth of resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of benzalkonium chloride" *J. Bacteriol.* 113:409-416.
- Holtwick, R., Meinhardt, F. and Keweloh, H. (1997) "Cis-trans isomerization of unsaturated fatty acids: cloning and sequencing of the *cti* gene from *Pseudomonas putida* P8" *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4292-4297.
- Jackson, M., Crick, D.C. and Brennan, P.J. (2000) "Phosphatidylinositol is an essential phospholipid of mycobacteria" *J. Biol. Chem.* 275:30092-30099.

- Johnson, A.C. and Wood, M. (1990) "DNA, a possible site of action of aluminium in *Rhizobium spp.*" Appl. Environ. Microbiol. 56:3629-3633.
- Jones, M.V., Herd, T.M. and Christie, H.J. (1989) "Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to amphoteric and quaternary ammonium biocides" Microbios. 9:255-264.
- Junker, F. and Ramos, J.L. (1999) "Isolation and characterization of the cis-trans-unsaturated fatty acid isomerase of *Pseudomonas oleovorans* Gpo12" J. Bacteriol. 181:5693-5700.
- Kaniga, K., Delor, I. and Cornelis, G.R. (1991) "A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in Gram-negative bacteria: inactivation of the *blaA* gene of *Yersinia enterocolitica*" Gene. 109:137-141.
- Kaway, K., Shoda, M., Harashima, R., Salade, Y., Hara, H. and Matsumoto, K. (2004). "Cardiolipin domains in *Bacillus subtilis* Marburg membranes" J. Bacteriol. 186:1475-1483.
- Kikuchi, S., Shibuya, I. and Matsumoto, K. (2000) "Viability of an *Escherichia coli* *pgsA* null mutant lacking detectable phosphatidylglycerol and cardiolipin" J. Bacteriol. 182:371-376.
- Kinraide, T.B., Ryan, P.R. and Kochian, L.V. (1992) "Interactive effects of  $Al^{3+}$ ,  $H^{+}$  and other cations on root elongation considered in terms of cell-surface electrical potential" Physiol. Plant. 99:1461-1468
- Kirchner, O. and Tauch, A. (2003) "Tools for genetic engineering in the amino acid-producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*" J. Biotech. 104: 287-299.
- Klompenburg, W.V., Paetzel, M., de Jong, J.M., Dalbey, R.E., Demel, R.A., von Heijne, G. and de Kruijff, B. (1998) "Phosphatidylethanolamine mediates insertion of the catalytic domain of leader peptidase in membranes" FEBS Lett. 431:75-79.
- Kobayashi, H., Uematsu, K., Hirayama, H. and Horikoshi, K. (2000) "Novel toluene elimination system in a toluene-tolerant microorganism" J. Bacteriol. 182:6451-6455.
- Kolling, G.L. and Matthews, K.R. (1999) "Export of virulence genes and Shiga toxin by membrane vesicles of *Escherichia coli* O157:H7" Appl. Environ. Microbiol. 65:1843-8.
- Koonin, E.V. (1996) "A duplicated catalytic motif in a new superfamily of phosphohydrolases and phospholipid synthases that includes poxvirus envelope protein" Trends Biochem. Sci. 21:242-243.
- Koronakis, V., Sharff, A., Koronakis, E., Luisi, B. and Hughes, C. (2000) "Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export" Nature. 405:914-919.
- Kovach, M.E., Elzer, P.H., Hill, D.S., Robertson, G.T., Farris, M.A., Roop, R.M. and Peterson, K.M. (1995). "Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes" Gene:175-176.
- Kreuzinger, N., Fuerhacker, M., Scharf, S., Uhl, M., Gans, O. and Grillitsch, B. (2007) "Methodological approach towards the environmental significance of uncharacterized substance-quaternary ammonium compounds as an example" Desalination. 215:209-222.
- Kroon, A.G.M. and van Ginkel, C.G. (2001) "Complete mineralization of dodecyltrimethylamine using a two-membered bacterial culture". Environ. Microbiol. 3:131-136.
- Kümmer, K., Eitel, A., Braun, U., Hubner, P., Dashner, F., Mascart, G., Milandri, M., Reinthaler, F. and Verhoef, J. (1997) "Analysis of benzalkonium chloride in the effluent from European hospitals by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with post-column ion-pairing and fluorescence detection" J. Chromatogr. A. 774:281-286.
- Kusters, R., Dowhan, W. and de Kruijff, B. (1991) "Negatively charged phospholipids restore prePhoE translocation across phosphatidylglycerol-depleted *Escherichia coli* inner membranes" J. Biol. Chem. 266:8659-8662.
- Langsrud, S. and Sundheim, G. (1997) "Factors contributing to the survival of poultry associated *Pseudomonas spp.* exposed to a quaternary ammonium compounds" J. Appl. Microbiol. 82:705-712.
- Langsrud, S., Sundheim G. and Borgmann-Strahsen, R. (2003) "Intrinsic and acquired resistance to quaternary ammonium compound in food-related *Pseudomonas spp.*" J. Appl. Microbiol. 95:874-882.
- Larson, T.J. and Dowhan, W. (1976) "Ribosomal-associated phosphatidylserine synthetase from *Escherichia coli*: purification by substrate-specific elution from phosphocellulose using cytidine 59-diphospho-1,2-diacyl-sn-glycerol" Biochem. 15:5212-5218.
- Lebeau, T., Bagot, D., Jézéquel, K. and Fabre, B. (2002) "Cadmium biosorption by free and immobilised microorganisms cultivated in a liquid soil extract medium: effects of Cd, pH and techniques of culture" Sci. Environ. 291:73-83.
- Leigh, M.B. (2006) "Methods for rhizoremediation research. In: Phytoremediation and Rhizoremediation. Ed. Mackova M, Dowling, D. and Macek T. Springer, Netherlands. pp 33-52.
- Leiros, I., Secundo, F., Zambonelli, C., Servi, S. and Hough, E. (2000) "The first crystal structure of a phospholipase D" Structure.15:655-67.
- Lemire, J., Mailloux, R., Auger, C., Whalen, D. and Appanna, V.D. (2010) "*Pseudomonas fluorescens* orchestrates a fine metabolic-balancing act to counter aluminium toxicity" Environ. Microbiol. 12:1384-1390.
- Liffourrena, A.S., Boeris, P.S., Salvano, M.A. and Lucchesi, G.I. (2009) "A fluorescence assay for tetradecyltrimethylammonium mono-oxygenase activity that catalyzes the cleavage of the C-N bond with the production of trimethylamine" Anal. Biochem. 384:343-347.
- Liffourrena, A.S., López, F.G., Salvano, M.A., Domenech, C.E. and Lucchesi, G.I. (2008) "Biodegradation of tetradecyltrimethylammonium in *Pseudomonas putida* A ATCC 12633 improved by aluminium ions" J. Appl. Microbiol. 2:396-402.
- Liscovitch, M., Czarny, M., Fiucci, G. and Tang, X. (2000) "Phospholipase D: molecular and cell biology of a novel gene family" Biochem. 345:401-415.

- López, C.S., Alice, A.F., Heras, H., Rivas, E.A. and Sánchez-Rivas, C. (2006) "Role of anionic phospholipids in the adaptation of *Bacillus subtilis* to high salinity" *Microbiol.* 152:605-616.
- López, C.S., Heras, H., Ruzal, S.M., Sánchez-Rivas, C. and Rivas, E. (1998) "Variations of the envelope composition of *Bacillus subtilis* during growth in hyperosmotic medium" *Current Microbiol.* 36: 55-61.
- López-Lara, I.M. and Geiger, O. (2001) "Novel pathway for phosphatidylcholine biosynthesis in bacteria associated with eukaryotes" *J. Biotechnol.* 91:211-221.
- López-Lara, I.M., Sohlenkamp, C. and Geiger, O. (2003) "Membrane lipids in plant-associated bacteria: their biosyntheses and possible functions" *Mol. Plant. Microbe Interact.* 16:567-79.
- Loughlin, M.F., Jones, M.V. and Lambert, A. (2002) "*Pseudomonas aeruginosa* cells adapted to benzalkonium chloride show resistance to other membrane-active agents but not clinically relevant antibiotics" *J. Antimicrob. Chemother.* 49:41-49.
- Lovley, D.R., (2000) "Environmental Microbe-Metal Interactions". American Society for Microbiology, Washington D.C.
- Lucchesi, G.I., Lisa, A.T. and Domenech, C.E. (1989) "Choline and betaine as inducer agents of *Pseudomonas aeruginosa* phospholipase C activity in high phosphate medium" *FEMS Microbiol. Lett.* 57:335-338.
- Macdonald, T.L. and Martin, R.B. (1988) "Aluminium ion in biological systems" *Trends Biochem. Sci.* 13:15-19.
- Machado, M.C., Lopez, C.S., Heras, H. and Rivas, E.A. (2004) "Osmotic response in *Lactobacillus casei* ATCC 393: biochemical and biophysical characteristics of membrane" *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 422:61-70
- MacKinnon, N., Crowell, K.J., Udit, A.K. and Macdonald, P.M. (2004) "Aluminium binding to phosphatidylcholine membranes:  $^{27}\text{Al}$  and  $^{31}\text{P}$  NMR spectroscopic studies" *Chem. Phys. Lipids.* 132:23-36.
- MacKinnon, N., Ridgway, J., Crowell, K.J. and Macdonald, P.M. (2006) "Aluminum binding to phosphatidylcholine lipid bilayer membranes: aluminum exchange lifetimes from  $^{31}\text{P}$  NMR spectroscopy" *Chem. Phys. Lipids.* 139: 85-95.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. and Parker, J. (2000) "Microbial Ecology". In: Brock, *Biology of Microorganisms*. Prentice Hall, N.J. pp. 642-719.
- Marinetti, G.V. (1986) "Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology". Vol. 3 Ed. Burdon, R.H. and van Knippenberg, P.H. Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford. pp240-241.
- Martin, R.B. (1986) "The chemistry of aluminium as related to biology and medicine" *Clin. Chem.* 32:1797-1806.
- Martinez-Carballo, E., Sitka, A., Gonzales-Barreiro, C., Kreuzinger, N., Furhacker, Scharf, M.S. and Gans, O. (2007) "Determination of selected quaternary ammonium compounds by liquid chromatography with mass spectrometry". Part I. In: Application to surface, waste and indirect discharge water sample Austria. *Environ. Pollut.* 145:489-496.
- Martínez-Morales, F., Schobert, M., López-Lara, I.M., and Geiger, O. (2003) "Pathways for phosphatidylcholine biosynthesis in bacteria" *Microbiol.* 149:3461-3471.
- Martins dos Santos, V.A.P., Heim, S., Moore, E.R.B., Strätz, M. and Timmis, K.N. (2004) "Insights into the genomic basis of niche specificity of *Pseudomonas putida* KT2440" *Environ. Microbiol.* 6:1264-1286.
- Mashburn, L.M. and Whiteley, M. (2005) "Membrane vesicles traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote" *Nature.* 437:422-425.
- Mashburn-Warren, L., Howe, J., Garidel, P., Richter, W., Steiniger, F., Roessle, M., Brandenburg, K. and Whiteley, M. (2008) "Interaction of quorum signals with outer membrane lipids: insights into prokaryotic membrane vesicle formation" *Mol. Microbiol.* 69:491-502.
- Matsumoto, K. (1997) "Phosphatidylserine synthase from bacteria" *Biochim. Biophys. Acta.* 1348:2140-227.
- Matsumoto, K. (2001) "Dispensable nature of phosphatidylglycerol in *Escherichia coli*: dual roles of anionic phospholipids" *Mol. Microbiol.* 39:1427-1433.
- Matsumoto, K., Kusaka, J., Nishibori, A. and Hara, H. (2006) "Lipid domains in bacterial membranes" *Mol. Microbiol.* 61:1110-1117.
- McBain A.J., Ledder, R.G., Moore, L.E., Catrenich, C.E. and Gilbert, P. (2004) "Effects of quaternary-ammonium-based formulations on bacterial community dynamics and antimicrobial susceptibility" *Appl. Environ. Microbiol.* 70:3449-56.
- McBroom, A. and Kuehn, M.J. (2007) "Release of outer membrane vesicles by Gram-negative bacteria is a novel envelope stress response" *Mol. Microbiol.* 63:545-558.
- McDonnell, G. and Russell, A.D. (1999) "Studies on the biodegradability of some cationic surfactant" *Rev. Clin. Microbiol.* 12:147-179.
- McEldowney, S. (2000) "The impact of surface attachment on cadmium accumulation by *Pseudomonas fluorescens* H2" *FEMS Microbiol. Ecology.* 33:121-128.
- McNamara, P.J., Bradley, G.A. and Songer, J.G. (1994) "Targeted mutagenesis of the phospholipase D gene results in decreased virulence of *Corynebacterium pseudotuberculosis*" *Mol. Microbiol.* 12:921-930.
- Meade, H.M., Long, S.R., Ruvkun, G.B., Bown, S.E. and Ausubel, F.M. (1982) "Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn5 mutagenesis" *J. Bacteriol.* 149:114-122.
- Mechin, L., Dubois-Brissonnet, F., Heyd, B. and Leveau, L.Y. (1999) "Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 to didecyltrimethylammonium bromide induces changes in membrane fatty acid composition and in resistance of cells" *J. Appl. Microbiol.* 86:859-866.



- Medeot D.B., Bueno M.A., Dardanelli M.S. and de Lema, M.G. (2007) "Adaptational changes in lipids of *Bradyrhizobium* SEMIA 6144 nodulating peanut as a response to growth temperature and salinity" *Curr. Microbiol.* 54:31-35.
- Medeot, D.B., Sohlenkamp, C., Dardanelli, M.S., de Lema M.G., Geiger, O. and López-Lara, I.M. (2009) "Phosphatidylcholine levels of peanut-nodulating *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 affect cell size and motility" *FEMS Microbiol. Lett.* 303:123-131.
- Merino, F., Rubio, S. and Perez-Bendito, D. (2003) "Solid-phase extraction of amphiphiles based on mixed hemimicelle/admicelle formation: Application to the concentration of benzalkonium surfactants in sewage and river water" *Anal. Chem.* 75:6799-6806.
- Middaugh, J., Hamel, R., Jean-Baptiste, G., Beriault, R., Chenier, D. and Appanna, V.D. (2005) "Aluminum triggers decreased aconitase activity via Fe-S cluster disruption and the overexpression of isocitrate dehydrogenase and isocitrate lyase: a metabolic network mediating cellular survival" *J. Biol. Chem.* 280:3159-3165.
- Mileykovskaya, E., Dowhan, W., Birke, R.L., Zheng, D., Luterodt, L. and Haines, T.H. (2001) "Cardiolipin binds nonyl acridine orange by aggregating the dye at exposed hydrophobic domains on bilayer surfaces". *FEBS Lett* 507: 187-190.
- Minder, A.C., de Rudder, K.E.E., Narberhaus, F., Fischer, H.M., Hennecke, H. and Geiger, O. (2001) "Phosphatidylcholine levels in *Bradyrhizobium japonicum* membranes are critical for an efficient symbiosis with the soybean host plant" *Mol. Microbiol.* 39:1186-1198.
- Mira, A. and Pushker, R. (2005) "The silencing of pseudogenes" *Mol. Biol. Evol.* 22:2135-2138.
- Mullan, A., Quinn, J.P. and McGrath, J.W. (2002) "Enhanced phosphate uptake and polyphosphate accumulation in *Burkholderia cepacia* grown under low-pH conditions" *Microb. Ecol.* 44:69-77.
- Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E. and Yamaguchi, A. (2002) "Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB" *Nature* 419:587-593.
- Nagai, K., Murata, T., Ohta, S., Zenda, H., Ohnishi, M. and Hayashi, T. (2003) "Two different mechanisms are involved in the extremely high-level benzalkonium chloride resistance of a *Pseudomonas fluorescens* strain" *Microbiol. Immunol.* 47:709-715.
- Nahaie, M.R., Goodfellow, M., Minnikin, D.E. and Hajek, V. (1984) "Polar lipid and isoprenoid quinone composition in the classification of *Staphylococcus*" *J. Gen. Microbiol.* 130:2427-37.
- Nelson, K.E., Weinel, C., Paulsen, I.T., Dodson, R.J., Hilbert, H., Martins dos Santos V.A.P., Fouts, D.E., Gill, S.R., et al., Fraser, C.M. (2002) "Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440" *Environ. Microbiol.* 4:799-808.
- Nieboer, M., Kingma, J. and Witholt, B. (1993) "The alkane oxidation system of *Pseudomonas oleovorans*: induction of the *alk* genes in *Escherichia coli* W3110 (pGEc47) affects membrane biogenesis in a distinct cytoplasmic membrane subfraction" *Mol. Microbiol.* 8:1039-1051.
- Nikaido, H. (1985) "Role of permeability barriers in resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics" *Pharmacol. Ther.* 27:197-231.
- Nikaido, H. (1989) "Role of the outer membrane of Gram-negative bacteria in antimicrobial resistance". In L.E. Bryan (Ed), *Handbook of experimental pharmacology*, vol. 91. Microbial resistance to drugs. Springer-Verlag K.G., Berlin. pp. 1-34.
- Nishijima, S., Asami, Y., Uetake, N., Yamagoe, S., Ohta, A. and Shibuya, I. (1988) "Disruption of the *Escherichia coli* *cls* gene responsible for cardiolipin synthesis" *J. Bacteriol.* 170:775-780.
- Nishiyama N., Tushima, Y. and Ikeda, Y. (1995) "Biodegradation of alkytrimethylammonium salts in activated sludge" *Chemosphere* 30:593-603.
- Oh, S.E., Hassan S.H.A. and Joo, J.H. (2009) "Biosorption of heavy metals by lyophilized cells of *Pseudomonas stutzeri*" *J. Microbiol. Biotechnol.* 25:1771-1778.
- Olivera, E.R., Carnicero, D., Jodra, R., Minambres, B., Garcia, B., Abraham, G.A., Gallardo A., Román J.S., García J.L., Naharro G. and Luengo J.M. (2001) "Genetically engineered *Pseudomonas*: a factory of new bioplastics with broad applications" *Environ. Microbiol.* 3:612-618.
- Op den Kamp, J.A., Redai, I. and van Deenen, L.L. (1969) "Phospholipid composition of *Bacillus subtilis*" *J. Bacteriol.* 99:298-303.
- Ostroff, R.M., Vasil, A.I. and Vasil, M.L. (1990) "Molecular comparison of a nonhemolytic and a hemolytic phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa*" *J. Bacteriol.* 172:5915-5923.
- Palleroni, N.J. (1992) "Taxonomy and Identification". In: *Pseudomonas*. Ed. Galli, E., Silver, S. and Witholt, B. American Society for Microbiology, Washington, D.C. pp. 105-115.
- Paulsen, I.T., Brown, M.H. and Skurray, R.A. (1996) "Proton-dependent multidrug efflux systems" *Microbiol.* 60:575-608.
- Pedrotta, V. and Witholt, B. (1999) "Isolation and characterization of the cis/trans-unsaturated fatty-acid isomerase of *Pseudomonas oleovorans* GPo12" *J. Bacteriol.* 181:3256-3261.
- Pfeiffer, K., Gohil, V., Stuart, R.A., Hunte, C., Brandt, U., Greenberg, M.L. and Shägger, H. (2003) "Cardiolipin stabilizes respiratory chain supercomplexes" *J. Biol. Chem.* 278:52873-52880.
- Pinkart, H.C. and White, D.C. (1997) "Phospholipid biosynthesis and solvent tolerance in *Pseudomonas putida* strains" *J. Bacteriol.* 176:4219-4226.
- Ponting, C.P. and Kerr, I.D. (1996) "A novel family of phospholipase D homologues that includes phospholipid synthases and putative endonucleases: Identification of duplicated repeats and potential active site residues" *Protein Science.* 5:914-922.



- Prado Acosta, M., Valdman, E., Battaglini, F., Leite, S.G.F. and Ruzal, S. (2005) "Biosorption of copper by *Paenibacillus polymyxa* cells and their exopolysaccharide" *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21: 1157-1163.
- Raetz, C.R.H. and Dowhang, W. (1990) "Biosynthesis and function of phospholipids in *Escherichia coli*" *J. Biol. Chem.* 265:1235-1238.
- Ramos, J.L., Duque, E., Huertas, M.J. and Haïdour, A. (1995) "Isolation and expansion of the catabolic potential of a *Pseudomonas putida* strain able to grow in the presence of high concentrations of aromatic hydrocarbons" *J. Bacteriol.* 177:3911-3916.
- Ramos, J.L., Duque, E., Rodriguez-Herva, J.J., Godoy P. and Fernandez-Barrero A. (1997) "Mechanisms for solvent tolerance in bacteria" *J. Bacteriol. Chem.* 272:3887-3897.
- Ramos, J.L., Wasserfallen, A., Rose, K. and Timmis, K.N. (1987) "Redesigning metabolic routes: manipulation of TOL plasmid pathway for catabolism of alkylbenzoates" *Sci.* 235:593-596.
- Rao, N.N., Liu, S. and Kornberg A. (1998) "Inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*: the phosphate regulon and the stringent response" *J. Bacteriol.* 180:2186-2193.
- Renner, L.D. and Welbel, D.B. (2011) "Cardiolipin microdomains localize to negatively curved regions of *Escherichia coli* membranes" *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108:6264-6269.
- Resnick, S.M. and Gibson, D.T. (1996) "Diverse reactions catalyzed by naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain NCIB 9816" *J. Ind. Microbiol.* 17:438-457.
- Rhodes, D. and Hanson, A.D. (1993) "Quaternary ammonium and ternary sulfonium compounds in higher plants". *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 44:357-384.
- Rock, C.O., Jackowski, S. and Cronan, J.E. (1996) "Lipid metabolism in prokaryotes" In: *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. Ed. Vance, D.E. and Vance, J. Amsterdam: Elsevier. pp 35-74.
- Romantsov, T., Guan, Z. and Wood, J.M. (2009) "Cardiolipin and the osmotic stress responses of bacteria" *Biochim. Biophys. Acta* 1788:2092-2100.
- Rotein, D., Nishida, I., Tashiro, G., Yoshioka, K., Wu, W.I., Voelker, D.R., Basset, G. and Hanson, A.D. (2001) "Plant synthesises ethanolamine by direct decarboxylation of serine using a pyridoxal phosphate enzyme" *J. Biol. Chem.* 276:35523-35529.
- Rothman, J.E. and Lenard, J. (1977) "Membrane asymmetry" *Sci.* 195:743-753.
- Roy, H. and Ibba, M. (2008) "RNA-dependent lipid remodeling by bacterial multiple peptide resistance factors" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105:4667-72.
- Rudolph, A.E., Stuckey, J.A., Zhao, Y., Matthews, H.R., Patton, W.A., Moss, J. and Dixon, J.E. (1999) "Expression, characterization, and mutagenesis of the *Yersinia pestis* murine toxin, a phospholipase D superfamily member" *J. Biol. Chem.* 17:11824-11831.
- Russell, A.D., Hammond, S.A. and Morgan, J.R. (1986) "Bacterial resistance to antiseptics and disinfectants" *J. Hospital Infection.* 7:213-225.
- Russell, N.J. (1992) "Physiology and molecular biology of psychrophilic microorganism. In: Herbert RA, Sharp RJ (eds). *Molecular Biology and biotechnology of extremophiles*. Glasgow and London. Blackie, pp 203-224.
- Sakagami, Y., Yokoyama, H., Nishimura, H., Ose, Y. and Tashima, T. (1989) "Mechanism of resistance to benzalkonium chloride by *Pseudomonas aeruginosa*" *Appl. Environ. Microbiol.* 55:3036-2040.
- Salvano, M.A., Lisa, T.A. and Domenech, C.E. (1989) "Choline transport in *Pseudomonas aeruginosa*" *Mol. Cell. and Biochem.* 85:81-89.
- Samant, S., Hsu, F.F., Neyfakh, A.A. and Lee, H. (2009) "The *Bacillus anthracis* protein MprF is required for synthesis of lysylphosphatidylglycerols and for resistance to cationic antimicrobial peptides" *J. Bacteriol.* 191:1311-1319.
- Sambrook, J. and Russell, D.R. (2001) "Molecular cloning: a laboratory manual". Cold Spring Harbor Laboratory Press, Ed. Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Sambrook, J., Fritsch, E. and Maniatis, T. (1989) "Molecular cloning. A laboratory manual". Second edition. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Appendix A.
- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G. and Pühler, A. (1994). "Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*" *Gene.* 145:69-73.
- Schmid, A., Dordick, J.S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M. and Witholt, B. (2001) "Industrial biocatalysis today and tomorrow" *Nature.* 409:258-268.
- Schoiling, S.R. and Beveridge, T.J. (2005) "Membrane vesicles: an overlooked component of the matrices of biofilms" *J. Bacteriol.* 188:5954-5957.
- Schweizer, H.P. (2004) "Fatty acid biosynthesis and biologically significant acyl transfer reactions in Pseudomonads". In *Pseudomonas*, vol.3. Chapter 3. Ed. Ramos, J.L. London, UK: Kluwer. pp. 83-110.
- Senault, C., Yazbeck, J., Goubert, M., Porter, R., Vincent, M. and Gallay, M. (1990) "Relation between membrane phospholipid composition, fluidity and function in mitochondria of rat brown adipose tissue: effect of thermal adaptation and essential fatty acid deficiency" *Biochim. Biophys. Acta.* 1023:283-289.
- Seufferheld, M., Vieira, M.C.F., Ruiz, F.A., Rodrigues, C.O., Moreno, S.N.J. and Docampo, R. (2003) "Identification of organelles in bacteria similar to acidocalcisomes of unicellular eukaryotes" *J. Biol. Chem.* 278:29971-29978.
- Seufferheld, M., Lea, C., Vieira, M., Oldfield, E. and Docampo, R. (2004) "The H(+)-pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum* is predominantly located in polyphosphate-rich acidocalcisomes" *J. Biol. Chem.* 279:51193-51202.



- Sharma, P.K., Balkwill, D.L., Frenkel, A. and Vairavamurthy, M.A., (2000) "A new *Klebsiella planticola* Strain (Cd-1) grows anaerobically at high cadmium concentrations and precipitates cadmium sulphide" *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3083-3087.
- Shi, W., Bogdanov, M., Dowhan, W. and Zusman, D.R. (1993) "The *pss* and *psd* genes are required for motility and chemotaxis in *Escherichia coli*" *J. Bacteriol.* 175:7711-7714.
- Shibuya I. (1992) "Metabolic regulations and biological functions of phospholipids in *Escherichia coli*" *Prog. Lipid Res.* 31:245-299.
- Shibuya, I., Miyazaki, C. and Ohta, A. (1985) "Alteration of phospholipid composition by combined defects in phosphatidylserine and cardiolipin synthase and physiological consequences in *Escherichia coli*" *J. Bacteriol.* 161:1086-1092.
- Silver, S. (1998) "Genes for all metals a bacterial view of the periodic table" *J. Ind. Microbiol. Biotech.* 20:1-12.
- Silver, S. and Misra, T. (1988) "Plasmid-mediated heavy metal resistances" *Annual Reviews on Microbiology.* 42:717-43.
- Silver, S. and Phung, L.T. (2005) "A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions" *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 32:587-605.
- Simões M., Pereira, M.O., Machado, I., Simões L.C. and Vieira, M.J. (2006) "Comparative antibacterial potential of selected aldehyde-based biocides and surfactants against planktonic *Pseudomonas fluorescens*" *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33:741-749.
- Sinensky, M. (1974) "Homeoviscous adaptation a homeostatic process that regulates the viscosity of the membrane lipids in *Escherichia coli*" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 71:522-525.
- Sleytr, U., Messner, P., Pum, D. and Sára, M. (1993) "Crystalline bacterial cell surface layers" *Mol. Microbiol.* 10:911-6.
- Sohlenkamp, C., de Rudder, K.E.E. and Geiger, O. (2004) "Phosphatidylethanolamine is not essential for growth of *Sinorhizobium meliloti* on complex culture media" *J. Bacteriol.* 186:1667-1677.
- Sohlenkamp, C., de Rudder, K.E.E., Rohrs, V., López-Lara, I.M. and Geiger, O. (2000) "Cloning and characterization of the gene for phosphatidylcholine synthase" *J. Biol. Chem.* 275:18919-18925.
- Sohlenkamp, C., López-Lara, I.M. and Geiger, O. (2003) "Biosynthesis of phosphatidylcholine in bacteria" *Prog. Lipid. Res.* 42:115-162.
- Spencer, J. and Ragout, A. (2001) "Métodos microbiológicos". Humana. Press Inc. Totowa, New Jersey, USA. pp. 335.
- Stanacev, N.Z. and Stuhne-Sekalec, L. (1970) "On the mechanism of enzymatic phosphatidylation. Biosynthesis of cardiolipin catalyzed by phospholipase D" *Biochim. Biophys. Acta.* 210:350-352.
- Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warriner, P., Hickey, M.J., Brinkman, F.S., Hufnagle, W.O., *et al.*, Olson, M.V. (2000) "Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen" *Nature*, 406:959-64.
- Studier, F.W., Roserberg, A.H., Dunn, J.J. and Dubendorff, J.W. (1990) "Use of T7 polymerase to direct expression of cloned genes" *Methods Enzimol.* 185:60-89.
- Suhayda, C.G. and Haug, A. (1986) "Organic acids reduce aluminium toxicity in maize root membranes" *Physiol. Plant.* 68:189-195.
- Suresh, B. and Ravishankar, G.A. (2004) "Phytoremediation: a novel and promising approach for environmental clean-up" *Crit. Rev. Biotechnol.* 24:97-124.
- Szumala, A. and Pernak, J. (1986) "The natural and laboratory resistance of Gram-negative rods to quaternary ammonium chlorides whit alkythiomethyl radical" *Pharmazie* 41:521.
- Tang, Y. and Hollingsworth, R. (1998) "Regulation of lipid synthesis in *Bradyrhizobium japonicum*: low oxygen concentrations tigger phosphatidylinisitol biosynthesis" *Appl. Environ. Microbiol.* 64:1963-1966.
- Tashiro, Y., Inagaki, A., Shimizu, M., Ichikawa, S., Takaya, N., Nakajima-Kambe, T., Uchiyama, H. and Nomura, N. (2011) "Characterization of phospholipids in membrane vesicles derived from *Pseudomonas aeruginosa*" *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75:605-607.
- Theologis, A., Ecker, J.R., Palm, C.J., Federspiel, N.A., Kaul, S., White, O., Alonso, J., Altafi, H., *et al.*, and Davis, R.W. (2000) "Sequence and analysis of chromosome 1 of the plant *Arabidopsis thaliana*" *Nature.* 14:816-820.
- Timmis, K.N. (2002) "*Pseudomonas putida*: a cosmopolitan opportunist par excellence" *Environ. Microbiol.* 4:779-781.
- Timmis, K.N., Steffan, R.J. and Unterman, R. (1994) "Designing microorganisms for the treatment of toxic wastes" *Annu. Rev. Microbiol.* 48:525-557.
- To, N.S., Favrin, S., Romanova, N. and Griffiths, M.W. (2002) "Post adaptational resistance to benzalkonium chloride and subsequent physicochemical modifications of *Listeria monocytogenes*" *Appl. Environ. Microbiol.* 68:5258-5464.
- Tobin, K.M., McGrath, J.W., Mullan, A., Quinn, J.P. and O'Connor, K.E. (2007) "Polyphosphate accumulation by *Pseudomonas putida* CA-3 and others medium-chain-length polyhydroxyalkanoate-accumulating bacteria under aerobic growth conditios" *Appl. Environ. Microbiol.* 73:1383-1387.
- Tornabene, T.G. (1973) "Lipid composition of selected strains of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis*" *Biochim. Biophys. Acta* 306:173-185.
- Tropp B.E., Ragolia, L., Xia, W., Dowhan, W., Milkman, R., Rudd, K.E., Ivanisevic, R. and Savic, D.J. (1995) "Identity of the *Escherichia coli* *cls* and *nol* genes" *J. Bacteriol.* 177:5155-5157.
- Tropp, B.E. (1997) "Cardiolipin synthase from *Escherichia coli*" *Biochim. Biophys. Acta* 1348:192-200.



- van Ginkel C.G. (1991) "Relations between the structure of quaternary alkyl ammonium salts and their biodegradability" *Chemosphere*. 23:281-289.
- van Ginkel C.G., Louwse, A. and van der Togt, B. (2008) "Substrate specificity of a long-chain alkylamine-degrading *Pseudomonas sp.* isolated from activated sludge" *Biodegradation*. 19:129-36.
- van Ginkel C.G., Pomper, M.A., Stroo, C.A. and Kroon. A.G.M. (1995) "Biodegradation of fatty amines" *Tenside Surfact. Deterg.* 32:355-359.
- van Ginkel C.G., van Dijk, J.B. and Kroon. A.G.M. (1992) "Metabolism of hexadecyltrimethylammonium chloride in *Pseudomonas* Strain B1" *Appl. Environ. Microbiol.* 58:3083-3087.
- van Golde, L.M., Akkermans-Kruyswijk, J., Franklin-Klein, W., Lankhorst, A. and Prins, R.A. (1975) "Accumulation of phosphatidylserine in strictly anaerobic lactate fermenting bacteria" *FEBS Letter*. 53:57-60.
- van Niftrik, L.A., Fuerst, J.A., Sinninghe Damsté, J.S., Kuenen, J.G., Jetten, M.S.M. and Strous, M. (2004) "The anammoxosome: an intracytoplasmic compartment in anammox bacteria" *FEBS Microbiol. Letter* 233:237-13.
- Vasudevan, N.K., Vedachalam, S. and Sridhar D. (2003) "Study on the various methods of landfill remediation" Workshop on Sustainable Landfill Management.
- Versteeg D.J. and Shorter, S.J. (1992) "Effect of organic carbon on the uptake and toxicity of quaternary ammonium compounds to the fathead minnow, *Pimephales promelas*" *Environ. Toxicol. Chem.* 11:571-580.
- Verstraeten, S.V., Nogueira, L.V., Schreier, S. and Oteiza P.I. (1997) "Effect of trivalent metal ions on phase separation and membrane lipid packing: role in lipid peroxidation" *Arch. Biochem. Biophys.* 338:121-127.
- Verstraeten, S.V., Villaverde, M.S. and Oteiza P.I. (2003) "Al<sup>3+</sup>-mediated changes on membrane fluidity affects the activity of PI-PLC but not of PLC" *Chem. Phys. Lipids* 122:159-163.
- Villasuso, A.L., Aveldañó, M., Vicario, A., Machado-Domenech E.E. and García de Lema, M. (2005) "Culture age and carbamoylcholine increase the incorporation of endogenously synthesized linoleic acids in lipids of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes" *Biochem. Biophys. Acta.* 1735:185-191.
- Visca, P., Colotti, G., Serino, L., Verzili, D., Orsi, N., Chiancone, E., (1992) "Metal regulation of siderophore synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* and functional effects of siderophore-metal complexes" *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2886-2893.
- Vodovar, N., Vallenet, D., Cruveiller, S., Rouy, Z., Barbe, V., Acosta, C., Cattolico, L., Jubin, C., Lajus, A., Segurens, B., Vacherie, B., Wincker, P., Weissenbach, J., Lemaître, B., Médigue, C. and Boccard, F. (2006) "Complete genome sequence of the entomopathogenic and metabolically versatile soil bacterium *Pseudomonas entomophila*" *Nat. Biotechnol.* 24:673-679.
- von Wallbrunn, A., Heipieper, H.J. and Meinhardt, F. (2002) "Cis/trans isomerisation of unsaturated fatty acids in cardiolipin synthase Knock-out mutant of *Pseudomonas putida* P8". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60:179-185.
- Vuilleumier, S. and Pagni, M. (2002) "The elusive roles of bacterial glutathione S-transferases: new lessons from genomes" *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58:138-146.
- Vullo, D.L. (2003) "Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente" *Química Viva*. Vol 2. UBA.
- Waite, M. (1999) "The PLD superfamily: insights into catalysis" *Biochim. Biophys. Acta* 1439:187-197.
- Walsh, U.F., Morrissey, J.P. and O'Gara, F. (2001) "*Pseudomonas* for biocontrol of phytopathogens: from functional genomics to commercial exploitation" *Curr. Opin. Biotechnol.* 12:2013-2017.
- Wang, C.L., Michels, P.C., Dawson, S.C., Kitisakkul, S., Baross, J.A., Keasling, J.D. and Clark, D.S. (1997) "Cadmium removal by a new strain of *Pseudomonas aeruginosa* in aerobic culture" *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4075-4078.
- Weingart, C.L. and Hooke, A.M. (1999) "A nonhemolytic phospholipase C from *Burkholderia cepacia*" *Curr. Microbiol.* 38:233-238.
- Wessel, M., Klüsener, S., Deke, J., Fritz, C., Hacker, S. and Narberhaus, F. (2006) "Virulence of *Agrobacterium tumefaciens* requires phosphatidylcholine in the bacterial membrane" *Mol. Microbiol.* 62:906-915.
- White D.C., Tucker, A.N. and Sweeley, C.C. (1969) "Characterization of the iso-branched sphinganes from the ceramide phospholipids of *Bacteriodes melaninogenicus*" *Biochim. Biophys. Acta.* 187:527-532.
- Wilderman, P.J., Vasil, A.I., Martin, W.E., Murphy, R.C. and Vasil, M.L. (2002) "*Pseudomonas aeruginosa* synthesizes phosphatidylcholine by use of the phosphatidylcholine synthase pathway" *J. Bacteriol.* 184:4792-4799.
- Williams, J.G. and McMaster, C.R. (1998) "Scanning alanine mutagenesis of the CDP-alcohol phosphotransferase motif of *Saccharomyces cerevisiae* cholinephosphotransferase" *J. Biol. Chem.* 273:13482-7.
- Xia, W. and Dowhan, W. (1995) "In vivo evidence for the involvement of anionic phospholipids in initiation of DNA replication in *Escherichia coli*" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:783-787.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985) "Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors" *Gene.* 33:103-119.
- Yaron, S., Kolling, G.L. and Matthews, K.R. (2000) "Vesicles-mediated transfer of virulence genes from *Escherichia coli* O157:H7 to other enteric bacteria" *Appl. Environ. Microbiol.* 66:4414-20.
- Zatta, P., Lucchini, R., van Rensburg, S.J. and Taylor, A. (2003) "The role of metals in neurodegenerative processes: aluminum, manganese, and zinc" *Brain. Res. Bull.* 62:15-28.
- Zhang, M., Mileykovskaya, E. and Dowhan, W. (2002) "Gluing the respiratory chain together" *J. Biol. Chem.* 277:43553-43556.



**Zhao, T. and Sum, G. (2007)** "Antimicrobial finishing of wool fabric with quaternary aminopyridinium salts" J. Appl. Polym. Sci. 103:482-486.







Parte de los resultados de este trabajo de Tesis han sido incluidos en tres trabajos científicos y en un capítulo de libro:

P.S. Boeris, C.E. Domenech and G.I. Lucchesi. 2007. Modification of phospholipid composition in *Pseudomonas putida* A ATCC 12633 induced by contact with tetradecyltrimethylammonium. *J. Appl. Microbiol.* 103:1048-1054.

P.S. Boeris, A.S. Liffourrena, M.A. Salvano and G.I. Lucchesi. 2009. Physiological role of phosphatidylcholine in the *Ps. putida* A ATCC 12633 response to tetradecyltrimethylammonium bromide and aluminum. *Lett. Appl. Microbiol* 49:491-496.

P.S. Boeris and G.I. Lucchesi. 2011. The phosphatidylcholine synthase of *Pseudomonas putida* A ATCC 12633 is responsible for the synthesis of phosphatidylcholine which acts as a temporary reservoir for Al<sup>3+</sup> (Microbiology paper no. mic/2011/054072 (en revision)).

G.I. Lucchesi, A.S. Liffourrena, P.S. Boeris, M.A. Salvano. Adaptive Response and Degradation of Quaternary Ammonium Compounds by *Pseudomonas putida* A ATCC 12633. 2010. In: Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. Vol. 2, pp: 1297-1303. A. Méndez-Vilas (Ed), Formatex Research Center, Badajoz, Spain.



## ORIGINAL ARTICLE

# Modification of phospholipid composition in *Pseudomonas putida* A ATCC 12633 induced by contact with tetradecyltrimethylammonium

P.S. Boeris, C.E. Domenech and G.I. Lucchesi

Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Exactas, Físicoquímicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Córdoba, Argentina

## Keywords

phospholipids, *Pseudomonas putida*, quaternary ammonium compounds.

## Correspondence

G.I. Lucchesi, Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, CPX5804BYA Río Cuarto, Córdoba, Argentina. E-mail: glucchesi@exa.unrc.edu.ar

2006/1289: received 13 September 2006, revised and accepted 21 January 2007

doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03346.x

## Abstract

**Aims:** The aim of this work was to establish if the response to tetradecyltrimethylammonium (TDTMA), a representative quaternary ammonium compound (QAC), involves changes in the phospholipid (PL) composition of *Pseudomonas putida* A ATCC 12633.

**Methods and Results:** *Pseudomonas putida* was exposed to 50 mg l<sup>-1</sup> of TDTMA for 15 min, and PL composition was analysed. With respect to control values, phosphatidic acid and phosphatidylglycerol increased by 140% and 120%, respectively; cardiolipin decreased about 60%. In TDTMA-adapted bacteria, the most significant change was a 380% increase in phosphatidic acid. Accompanying this change was a 130% increase in phosphatidylglycerol and a 70% decrease in cardiolipin. The changes in adapted cells were reverted after two subcultures without biocide.

**Conclusions:** *Pseudomonas putida* responded to TDTMA through quantitative changes in PLs with specific variations in the content of phosphatidic acid, phosphatidylglycerol and cardiolipin. These modifications indicated that these PLs are involved in cellular responses to QACs, utilizing phosphatidic acid principally to neutralize the high positive charge density given for the ammonium quaternary moiety from TDTMA.

**Significance and Impact of the Study:** The changes in PL composition give a new insight about the response inflicted by *Ps. putida* when these bacteria are exposed to QACs.

## Introduction

Quaternary ammonium compounds (QACs) are cationic biocides widely included in antiseptic solutions and clinical preparations. They are active against Gram-negative and Gram-positive bacteria, some viruses, fungi and protozoa (Lopes 1986; McDonnell and Russell 1999). When bacteria are exposed to QACs, the following sequence of events has been proposed to occur: (i) adsorption of cationic compound onto bacterial cell surface; (ii) diffusion through the cell wall; (iii) binding to the cytoplasmic membrane; (iv) disorganization of the cytoplasmic membrane; (v) release of cytoplasmic constituents and (vi)

death of the bacterial cell (McDonnell and Russell 1999). However, several reports have described intrinsic and acquired resistance to these compounds, especially among Gram-negative species (Russell *et al.* 1986; Szumala and Pernak 1986; Jones *et al.* 1989; Langsrud and Sundheim 1997; Russell and Chopra 1996). The intrinsic resistance to QACs in bacteria appears to be because of the cell wall and the cell membrane (Nikaido 1994), and exclusion mechanism (Li *et al.* 1995; Heir *et al.* 1998; Aase *et al.* 2000; To *et al.* 2002). It is well known that QACs can be substrates for efflux pumps mechanisms in both Gram-positive (Midgley 1994; Takiff *et al.* 1996; Heir *et al.* 1998, 1999) and Gram-negative bacteria (Paulsen *et al.*



1996; Nagai *et al.* 2003). In addition, the relationship between the membrane fatty acid composition and the resistance of different bacteria to the activity of biocidal QACs was studied (Jones *et al.* 1989; Guerin-Mechin *et al.* 1999; Mechin *et al.* 1999; Loughlin *et al.* 2002; To *et al.* 2002).

Some strains of *Pseudomonas* from the environment, including *Pseudomonas* sp. and *Pseudomonas fluorescens* have high resistance to QACs and are thought to be responsible for biodegradation of QACs in activated sludge (Dean-Raymond and Alexander 1977; van Ginkel *et al.* 1992; Nishihara *et al.* 2000). *Pseudomonas putida* A ATCC 12633 utilized the QAC tetradecyltrimethylammonium (TDTMA) as a carbon and nitrogen source and was capable of growing in media containing up to 50 mg l<sup>-1</sup> of this compound (Liffourrena *et al.* 2004). This ability has a great application for the bioremediation of contaminated sites and biotransformation of industrial wastes. However, a little is known about the biochemical and physiological basis of QAC tolerance by strains capable of degrading these compounds. Therefore, the aim of this work was to investigate if the response to TDTMA, a QAC, involves changes in the phospholipid (PL) composition of *Ps. putida* A ATCC 12633. The first goal was to determine the response when *Ps. putida* A ATCC 12633 is exposed to TDTMA during a 15-min period. Considering that changes induced by adaptation to QACs are frequently unstable, the second goal of this study was to determine the difference in PL composition when *Ps. putida* A ATCC 12633 is adapted to grow at increasing concentrations of TDTMA.

## Materials and methods

### Organisms and culture conditions

*Pseudomonas putida* A ATCC 12633 was grown aerobically at 30°C, with shaking in a basal salt liquid medium (HPi-BSM) (Lucchesi *et al.* 1989) with 20 mmol l<sup>-1</sup> glucose and 18.7 mmol l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl as the carbon and nitrogen source, respectively. The growth was measured by the absorbance of the culture at 660 nm. The minimal inhibitory concentration (MIC) of TDTMA (defined as the lowest concentration which prevent an increase in turbidity after 48–72 h incubation at 30°C (Mechin *et al.* 1999), was determined in HPi-BSM with 20 mmol l<sup>-1</sup> glucose and 18.7 mmol l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl in the presence of 10–150 mg l<sup>-1</sup> TDTMA bromide concentrations.

For determination of survival of *Ps. putida* A ATCC 12633, cells were grown in HPi-BSM with glucose and NH<sub>4</sub>Cl until the culture reached a turbidity of about 0.8–1.0 at 660 nm. At this point, the culture was divided into five parts: one part was kept as a control and to the rest, 10,

50, 100 and 150 mg l<sup>-1</sup> TDTMA was added. The number of viable cells (CFU ml<sup>-1</sup>) was determined by plating the serially diluted cell suspension on LB plates before TDTMA was added and at 10, 30, 60 and 120 min after TDTMA addition (Duque *et al.* 2004). All experiments were conducted in triplicate, repeated independently and the standard deviations (SDs) are shown as error bars in the figures.

### Adaptation to growth in the presence of TDTMA

*Pseudomonas putida* A ATCC 12633 was cultivated in HPi-BSM with glucose and NH<sub>4</sub>Cl containing gradually increasing concentrations of TDTMA. The first range of concentrations used was 10–30 mg l<sup>-1</sup>. Bacteria showing growth after 24–72 h in the presence of the high concentration were used to inoculate the next culture series (increasing by 10 mg l<sup>-1</sup> steps). Following the last culture grown in the presence of TDTMA, successive subcultures in HPi-BSM without TDTMA were made (de-adapted cultures) (Mechin *et al.* 1999). The experiments were conducted in triplicate, repeated independently and the SDs are shown as error bars in the figures.

### PL radiolabelling and extraction

*Pseudomonas putida* A ATCC 12633 was cultivated in HPi-BSM with glucose and NH<sub>4</sub>Cl containing 1.5 × 10<sup>5</sup> Bq ml<sup>-1</sup> <sup>32</sup>P-orthophosphate ([<sup>32</sup>P]-Pi), NEN Perkin Elmer (Boston, MA, USA) (AE: 4 × 10<sup>6</sup> Bq mmol<sup>-1</sup>). Cells were harvested at late exponential phase by centrifugation at 8000 g for 10 min, in a Sorvall RC5C refrigerated centrifuge (Sorvall Dupont, Wilmington, DE, USA). Pellets were washed twice with 0.9% (w/v) NaCl and used for further studies. In experiments where the cells were exposed during 15 min with TDTMA, when the culture reached a late exponential phase (OD<sub>660 nm</sub> of about 0.8), the culture was divided in two parts: one part was kept as a control and to the rest, 50 mg l<sup>-1</sup> TDTMA was added. After 15 min, the cells were collected and washed twice by centrifugation at 8000 g for 10 min, to eliminate the unincorporated [<sup>32</sup>P]-Pi. The same procedures and conditions were used for unlabelled samples. Lipids were extracted from the cells according to the Bligh and Dyer method (1959). The resulting lower phase was removed, evaporated to dryness under a stream of nitrogen, and dissolved in a suitable volume of chloroform/methanol (9 : 1, v/v). Lipids were separated by thin-layer-chromatography (TLC) plates (silica gel HLF, 250 microns, from Analtech, Newark, DE, USA), developed with chloroform/methanol/water (65 : 25 : 4, by vol.). When necessary, lipids were separated by two-dimensional TLC using chloroform/methanol/acetone/acetic acid/water (20 : 7 : 7.5 : 6 : 3.5, by vol.) and chloroform/pyridine/formic



acid (17.5 : 15 : 3.5, by vol.) for the first and second dimension, respectively (Wising and Behrbohm 1967; Edman and Ericson 1987). All solvents were of analytical grade. Separated lipids were detected with iodine vapours and identified by comparison with authentic purified standards purchased from Sigma. The position of radiolabelled lipids was determined by autoradiography on Agfa-Gevaert film (Mortsel, Belgium). Spots were scrapped off the plates, and fractions were quantified by radioactivity measured in a liquid scintillation counter (Beckman LS 60001 C; Fullerton, CA, USA). The experiments, carried out in duplicate, were conducted fourfold.

### Processing of nonradioactive samples

Aliquots of the extracts were taken for the determination of total lipid phosphorus. Lipids were resolved using the TLC procedure just described for labelled samples. PL classes were scraped and the fractions were quantified by phosphorus determination as described by Fiske and Subbarow (1925). The experiments, carried out in duplicate, were conducted fourfold.

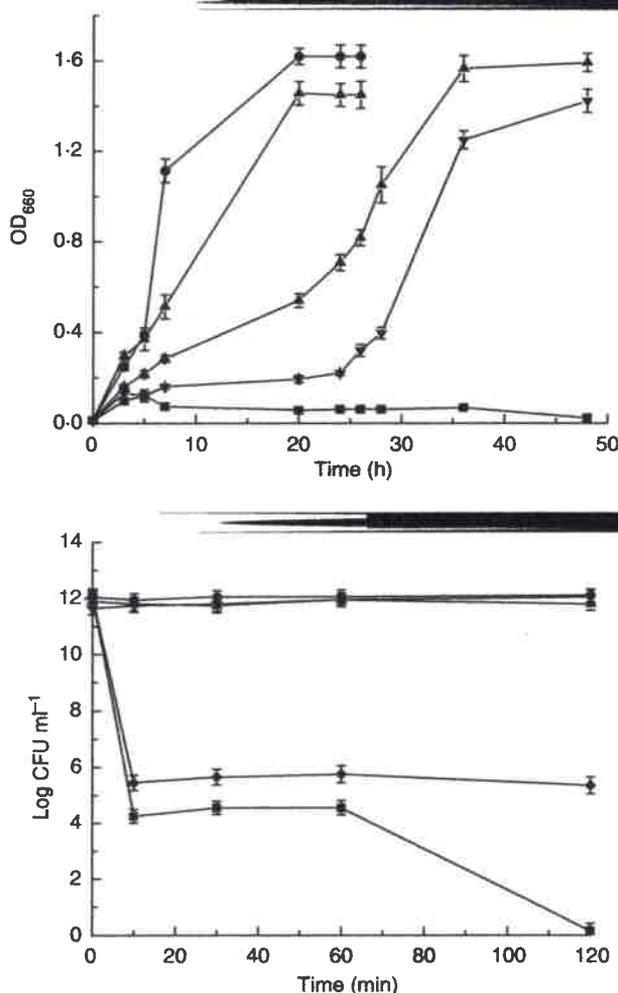
### Protein determination

Protein concentration was determined by the methods of Bradford (1976) with bovine albumin as the standard.

## Results

### Effects of TDTMA on growth of *Pseudomonas putida* A ATCC 12633

In a basal salt medium containing glucose and ammonium chloride, the MIC of TDTMA was 150 mg l<sup>-1</sup>. At 100 mg l<sup>-1</sup> of TDTMA, the lag phase was 20 h and the doubling time was 8.6 h. With 50 mg l<sup>-1</sup> of TDTMA, the doubling time was 8.1 h (Fig. 1a). The study of viability of *Ps. putida* A ATCC 12633 tested at 100 mg l<sup>-1</sup> of TDTMA indicated that the number of cells decreased 5 to 6 orders of magnitude with respect to the initial number of bacteria; with 50 mg l<sup>-1</sup> TDTMA, the bacterial survival was more than 99% (Fig. 1b). Therefore, this latter concentration was used for further studies. *Pseudomonas putida* A ATCC 12633 exhibited tolerance to highest concentrations of TDTMA after successive subculturing in the presence of an increased concentration of TDTMA. This TDTMA concentration (280 mg l<sup>-1</sup>) was about two times the value of the MIC detected in nonadapted cells. The same adapted bacteria after two subcultures without TDTMA lost the increased resistance to the QAC, followed by a higher growth rate, and the MIC remained unchanged (150 mg l<sup>-1</sup>).



**Figure 1** (a) Growth of *Ps. putida* A ATCC 12633 in HPI-BSM with 20 mmol l<sup>-1</sup> glucose and 18.7 mmol l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl in the presence of different TDTMA concentrations: (●) 0, (▲) 10, (▼) 50, (◆) 100 and (■) 150 mg l<sup>-1</sup>. (b) Survival of *Ps. putida* A ATCC 12633 that was grown in HPI-BSM with 20 mmol l<sup>-1</sup> glucose and 18.7 mmol l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl until the culture reached an OD<sub>660</sub> of 1. On this point, the culture was divided and the following TDTMA concentrations were added: (●) 0, (▲) 50, (◆) 100 and (■) 150 mg l<sup>-1</sup>. The number of viable cells (CFU ml<sup>-1</sup>) was determined at the indicated times by plating the serially diluted cell suspension on LB plates. Values are the means ± SD of three independent experiments.

### Analysis of change in PLs composition

#### Response of *Pseudomonas putida* A ATCC 12633 exposed to TDTMA during 15 min

No significant variation in the total amount of PL was detected in 15 min treated bacteria with TDTMA with respect to untreated cells, 8.39 ± 0.76, and 8.63 ± 0.95 nmol PL per milligram of protein (n = 4), respectively. These results were consistent with those obtained



**Table 1** Effect of TDTMA on PL composition of *Ps. putida* ATCC 12633

PL	Control*			TDTMA (15 min)†		
	nmol PL per milligram of protein	Bq per milligram of protein	DL (%)	nmol PL per milligram of protein	Bq per milligram of protein	DL (%)
PE	5.70 ± 0.25	335.13 ± 14.28	76.63 ± 4.50	4.95 ± 0.44	325.35 ± 35.35	72.84 ± 6.90
PG	0.46 ± 0.14	27.63 ± 7.49	6.49 ± 1.95	0.90 ± 0.15	64.01 ± 9.92	14.61 ± 2.25
CL	0.43 ± 0.07	25.92 ± 4.30	6.06 ± 1.00	0.16 ± 0.01	11.08 ± 0.70	2.57 ± 0.16
PA	0.035 ± 0.01	2.11 ± 0.91	0.56 ± 0.24	0.07 ± 0.03	6.30 ± 1.69	1.30 ± 0.49
PC	0.13 ± 0.04	8.12 ± 2.56	1.90 ± 0.60	0.11 ± 0.02	6.39 ± 2.76	1.87 ± 0.43
LPE	0.33 ± 0.02	19.82 ± 1.6	4.65 ± 0.37	0.40 ± 0.03	28.54 ± 2.44	6.60 ± 0.56
Others	0.27 ± 0.18	38.51 ± 1.36	3.71 ± 0.32	0.30 ± 0.10	18.93 ± 6.28	0.31 ± 0.04
Zw/An	6.65 ± 0.26	6.50 ± 0.80	6.34 ± 0.50	4.56 ± 0.20	4.18 ± 0.40	4.49 ± 0.29

[<sup>32</sup>P]-Pi (1.5 × 10<sup>5</sup> Bq ml<sup>-1</sup>) was added when Bq per milligram of protein was measured. Phospholipids were resolved by TLC and levels of radioactivity (columns 2, 5) or inorganic phosphorus (columns 1, 4) were determined as described in section 'Materials and methods'.

PL, phospholipids; DL, Distribution of label; PE, Phosphatidylethanolamine; PG, phosphatidylglycerol; CL, cardiolipin; PA, Phosphatidic acid; PC, phosphatidylcholine; LPE, lisophosphatidylethanolamine; Zw/An: ratio zwitterionic to anionic PL. Results are expressed as mean values ± SD (*n* = 4).

\*Cultures were grown with glucose and NH<sub>4</sub>Cl at late exponential phase.

†Cultures were grown with glucose and NH<sub>4</sub>Cl at late exponential phase, and 50 mg l<sup>-1</sup> TDTMA was added. After 15 min, the cells were collected.

by incorporation of [<sup>32</sup>P]-Pi into total lipids of *Ps. putida*, 428 ± 0.90 and 415 ± 0.46 Bq per milligram of protein (*n* = 4), for cells control and treated, respectively. Table 1 represents the PL patterns of *Ps. putida* A ATCC 12633 growing exponentially in basal medium in the presence or absence of TDTMA. In this latter case, about 76% of the total polar head groups were phosphatidylethanolamine (PE), and the remaining head groups were

distributed between phosphatidylglycerol (PG), diphosphatidylglycerol or cardiolipin (CL) and lisophosphatidylethanolamine (LPE) (Table 1, column 3). Phosphatidic acid (PA), and phosphatidylcholine (PC) were two minor PL, and phosphatidylserine (PS) was not detected. In cells exposed to TDTMA for 15 min, the PL pattern was qualitatively the same as that observed in the absence of TDTMA (Table 1, columns 4–6) but the amount of each

**Table 2** Phospholipid composition in TDTMA adapted and de-adapted *Ps. putida* ATCC 12633

PL	Control*		Adapted cells†		De-adapted cells‡	
	nmol PL per milligram of protein	DP (%)	nmol PL per milligram of protein	DP (%)	nmol PL per milligram of protein <sup>-1</sup>	DP (%)
PE	5.70 ± 0.25	75.63 ± 3.25	6.10 ± 0.22	70.01 ± 5.30	6.28 ± 0.30	75.7 ± 5.32
PG	0.46 ± 0.14	6.35 ± 1.82	1.10 ± 0.15	11.26 ± 1.40	0.48 ± 0.15	5.82 ± 1.30
CL	0.43 ± 0.07	6.19 ± 1.05	0.12 ± 0.05	1.44 ± 0.52	0.48 ± 0.12	5.84 ± 1.52
PA	0.035 ± 0.01	0.60 ± 0.14	0.17 ± 0.04	2.0 ± 0.23	0.07 ± 0.02	0.89 ± 0.13
PC	0.13 ± 0.04	1.71 ± 0.20	0.18 ± 0.04	2.0 ± 0.50	0.17 ± 0.04	2.14 ± 0.45
LPE	0.33 ± 0.02	4.29 ± 0.17	0.57 ± 0.20	6.64 ± 0.52	0.39 ± 0.08	4.55 ± 0.52
Others	0.27 ± 0.18	5.23 ± 0.32	0.44 ± 0.18	5.59 ± 1.30	0.41 ± 0.09	5.06 ± 0.30
Zw/An	6.65 ± 0.26	6.21 ± 0.50	5.39 ± 0.50	5.30 ± 0.30	6.64 ± 0.60	6.57 ± 0.66

Phospholipids were resolved by TLC and levels of inorganic phosphorus were determined as described in section 'Materials and methods'.

PL, phospholipids; DP, distribution of phosphorus; PE, Phosphatidylethanolamine; PG, phosphatidylglycerol; CL, cardiolipin; PA, Phosphatidic acid; PC, phosphatidylcholine; LPE, lisophosphatidylethanolamine; Zw/An: ratio zwitterionic to anionic PL. Results are expressed as mean values ± SD (*n* = 4).

\*Cultures were grown with glucose and NH<sub>4</sub>Cl at late exponential phase.

†Cultures were grown with glucose and NH<sub>4</sub>Cl containing gradually increasing concentrations of TDTMA. The adaptation corresponds to 280 mg l<sup>-1</sup> of TDTMA.

‡Adapted-cells were subcultivated without TDTMA. The de-adaptation corresponds to two subcultures.



individual PL, measured by Pi concentration (column 4) or [<sup>32</sup>P]-Pi (column 5), changed. Thus, the level of CL decreased about 60% with respect to the control, with a concomitant increase in PA and PG (about 140% and 120%, respectively). In contrast, the level of PE and PC did not change significantly. The ratio of zwitterionic (PE, LPE, PC) to anionic (PG, CL, PA) PL decreased approx. 32%, mainly as a consequence of the increment of PG and PA. The PG/CL relationship (calculated from the mass values given in Table 1, column 1 and 4), in the cells exposed to TDTMA increased with respect to untreated cells approx. 6 : 1. This observation was confirmed by the results demonstrating that the incorporation of [<sup>32</sup>P]-Pi in CL relative to PG is significantly reduced in TDTMA-treated cells (Table 1, column 5).

*Response of adapted Pseudomonas putida A ATCC 12633 to TDTMA*

In this case the most significant change associated with the stress was the increase of 380% in PA with respect to the content in untreated cells. Accompanying this change was the increment of 130% in PG and a 70% decreased CL (Table 2, columns 3 and 4). The relationship of zwitterionic to anionic PL decreased 20% mainly as a consequence of the PA increase. The same adapted bacteria after two subcultures without TDTMA lost the increased resistance to the QAC. The PA content increased near 100% and the rest of the PL pattern was similar to that seen in untreated cells (Table 2, columns 5 and 6).

**Discussion**

The above results indicated that the action of TDTMA on *Ps. Putida* A ATCC 12633 was similar to the action described for other QACs. The MIC detected for TDTMA in *Ps. putida* A ATCC 12633 was similar to those reported for benzalkonium chloride or dodecyl dimethylammonium chloride against other *Pseudomonas* (Langsrud and Sundheim 1997; Langsrud *et al.* 2003). The reversible adaptive response and the resistance of *Ps. Putida* A ATCC 12633 to the bactericidal activity of TDTMA dependent on the presence of the biocide seemed to be a characteristic of the bacterial adaptation (Heinzl 1998). Apparently, this adaptation to TDTMA might involve an initial mechanism producing changes at membrane levels involving the PL composition of *Ps. putida* A ATCC 12633. In the absence of TDTMA, the PL composition of this strain was similar to that described for other fluorescent *Pseudomonas* cultivated in nonstressed conditions, such as *Ps. aeruginosa* (Albelo and Domenech 1997); *Ps. putida* DOT-T1 (Ramos *et al.* 1996); *Ps. putida* Idaho (solvent-tolerant) and *Ps. putida* MW1200 (solvent-sensitive) (Pinkart and White 1997). As in the presence of the

biocide PG and PA showed the greatest changes with respect to nontreated cells it is possible that these PL, by their anionic characteristics, were initially and consecutively damaged by TDTMA and need to be replaced more rapidly. As the amount of CL decreases, it is possible that the turnover of CL might be an efficient method to replenish PG and PA pools, through the action of a phospholipase hydrolysing CL, a phospholipase D enzyme present in Gram-negative bacteria such as *E. coli*, *Pr. vulgaris* and *Ps. aeruginosa* (Cole and Prouxl 1975). Alterations in the membrane could activate this enzyme, resulting in the release of PA and PG, which finally would result in the maintenance of the integrity of the cell envelope. The PG/CL ratio of 6 : 1 observed in cells exposed to TDTMA, with respect to untreated bacteria, may indicate that these changes could also involve a decreased activity of other enzyme, a cardiolipin synthase, which was detected in *Ps. Putida*, and is capable of catalysing the synthesis of CL by the condensation of two PG molecules (Palmer *et al.* 1991; von Wallbrunn *et al.* 2002). Independent of the phospholipases acting on different PL species, it is clear that the major bacterial response in TDTMA-containing media is to produce a highly negatively charged membrane, given in this case by an increase of the anionic PL, PA and PG, probably to neutralize the positive charge found in the trimethylammonium moiety from TDTMA.

**Acknowledgements**

CED and GIL are Career Members of the Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). This work was supported by grants from PICTO 2004–2006, CONICET and SECYT–UNRC of Argentina.

**References**

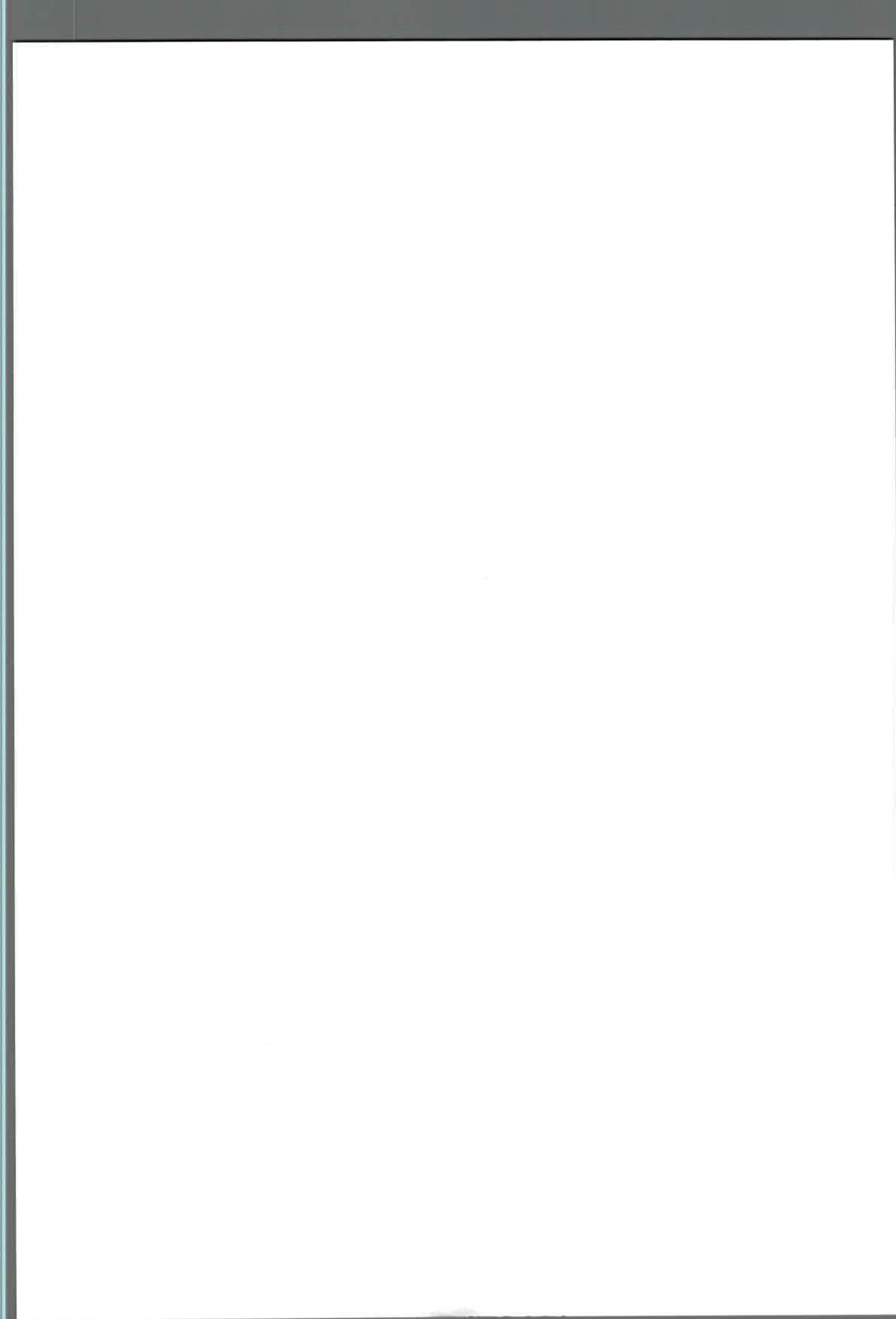
Aase, B., Sundheim, G., Langsrud, S. and Rorvik, L.V. (2000) Occurrence of and a possible mechanism for resistance to a quaternary ammonium compounds in *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* **62**, 57–63.  
 Albelo, S.T. and Domenech, C.E. (1997) Carbons from choline present in the phospholipids of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* **156**, 271–274.  
 Bligh, E.G. and Dyer, W.J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *J Biochem Physiol* **37**, 911–918.  
 Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248–254.  
 Cole, R. and Prouxl, P. (1975) Phospholipase D activity of gram-negative bacteria. *J Bacteriol* **124**, 1148–1152.



- Dean-Raymond, D. and Alexander, M. (1977) Bacterial metabolism of quaternary ammonium compounds. *Appl Environ Microbiol* **33**, 1037–1041.
- Duque, E., García, V., de la Torre, J., Godoy, P., Bernal, P. and Ramos, J.L. (2004) Plasmolysis induced by toluene in a cyoB mutant of *Pseudomonas putida*. *Environ Microbiol* **6**, 1021–1031.
- Edman, K. and Ericson, I. (1987) Phospholipid and fatty acid composition in mitochondria from spinach (*Spinacia oleracea*) leaves and petioles. *Biochem J* **243**, 575–578.
- Fiske, C.H. and Subbarow, Y. (1925) The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem* **66**, 361–375.
- Guerin-Mechin, L., Dubois-Brissonnet, F., Heyd, B. and Leveau, J.Y. (1999) Specific variations of fatty acid composition of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 induced by quaternary ammonium compounds and relation with resistance to bactericidal activity. *J Appl Microbiol* **87**, 735–742.
- Heinzel, M. (1998) Phenomena of biocide resistance in microorganisms. *Int Biodeterior Biodegradation* **41**, 225–234.
- Heir, E., Sundheim, G. and Holk, A.L. (1998) The *Staphylococcus qacH* gene product: a new member of the SMR family encoding multidrug resistance. *FEMS Microbiol Lett* **163**, 49–56.
- Heir, E., Sundheim, G. and Holk, A.L. (1999) The plasmid psT94 confers resistance to quaternary ammonium compounds in staphylococci isolated from the food industry. *J Appl Microbiol* **86**, 378–388.
- Jones, M.V., Herd, T.M. and Christie, H.J. (1989) Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to amphoteric and quaternary ammonium biocides. *Microbios* **9**, 255–264.
- Langsrud, S. and Sundheim, G. (1997) Factors contributing to the survival of poultry associated *Pseudomonas* spp. exposed to a quaternary ammonium compounds. *J Appl Microbiol* **82**, 705–712.
- Langsrud, S., Sundheim, G. and Borgmann-Strahsen, R. (2003) Intrinsic and acquired resistance to quaternary ammonium compounds in food-related *Pseudomonas* spp. *J Appl Microbiol* **95**, 874–882.
- Li, X., Nikaido, H. and Poole, K. (1995) Role of MexA-MexB-OprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **39**, 1948–1953.
- Liffourrena, A.S., Boeris, P.S., Salvano, M.A. and Lucchesi, G.I. (2004) Monooxygenase-mediated degradation of tetracycltrimethylammonium by *Pseudomonas putida*. *Biocell* **28**(Suppl), 51.
- Lopes, J.A. (1986) Evaluation of dairy plant sanitizers against *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes*. *J Dairy Sci* **69**, 2791–2796.
- Loughlin, M.F., Jones, M.V. and Lambert, A. (2002) *Pseudomonas aeruginosa* cells adapted to benzalkonium chloride show resistance to other membrane-active agents but not clinically relevant antibiotics. *J Antimicrob Chemother* **49**, 41–49.
- Lucchesi, G.I., Lisa, A.T. and Domenech, C.E. (1989) Choline and betaine as inducer agents of *Pseudomonas aeruginosa* phospholipase C activity in high phosphate medium. *FEMS Microbiol Lett* **57**, 335–338.
- McDonnell, G. and Russell, A.D. (1999) Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev* **12**, 147–179.
- Mechin, L., Dubois-Brissonnet, F., Heyd, B. and Leveau, J.Y. (1999) Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 to didecyltrimethylammonium bromide induces changes in membrane fatty acid composition and in resistance of cells. *J Appl Microbiol* **86**, 859–866.
- Midgley, M. (1994) Characteristics of an ethidium efflux system in *Enterococcus hirae*. *FEMS Microbiol Lett* **120**, 119–123.
- Nagai, K., Murata, T., Otha, S., Zenda, H., Ohnishi, M. and Hayashi, T. (2003) Two different mechanisms are involved in the extremely high-level benzalkonium chloride resistance of a *Pseudomonas fluorescens* strain. *Microbiol Immunol* **47**, 709–715.
- Nikaido, H. (1994) Prevention of drug access to bacterial target: permeability barriers and active efflux. *Science* **264**, 382–388.
- Nishihara, T., Okamoto, T. and Nishihara, N. (2000) Biodegradation of didecyltrimethylammonium chloride by *Pseudomonas fluorescens* TN4 isolated from activated sludge. *J Appl Microbiol* **88**, 641–647.
- Palmer, J.A., Madhusudhan, K.T., Hatter, K. and Sokatch, J.R. (1991) Cloning, sequence and transcriptional analysis of the structural gene for lpd-3, the third lipoamide dehydrogenase of *Pseudomonas putida*. *Eur J Biochem* **202**, 231–240.
- Paulsen, I.T., Brown, M.H. and Skurray, R.A. (1996) Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol Rev* **60**, 575–608.
- Pinkart, H.C. and White, D.C. (1997) Phospholipid biosynthesis and solvent tolerance in *Pseudomonas putida* strains. *J Bacteriol* **176**, 4219–4226.
- Ramos, J.L., Duque, E., Rodriguez-Herva, J.J., Godoy, P. and Fernandez-Barrero, A. (1996) Mechanisms for solvent tolerance in bacteria. *J Bacteriol Chemistry* **272**, 3887–3897.
- Russell, A.D. and Chopra, I. (1996) *Understanding Antibacterial Action and Resistance*, 2nd edn. Chichester, England: Ellis Horwood.
- Russell, A.D., Hammond, S.A. and Morgan, J.R. (1986) Bacterial resistance to antiseptics and disinfectants. *J Hosp Infect* **7**, 213–225.
- Szumala, A. and Pernak, J. (1986) The natural and laboratory resistance of Gram-negative rods to quaternary ammonium chlorides whit alkylthiomethyl radical. *Pharmazie* **41**, 521.
- Takiff, H.E., Ciminio, M. and Musso, M.C. (1996) Efflux pump of the antiporter family confer low level fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium smegatis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 161–167.
- To, N.S., Favrin, S., Romanova, N. and Griffiths, M.W. (2002) Post adaptational resistance to benzalkonium chloride and



- subsequent physicochemical modifications of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **68**, 5258–5464.
- van Ginkel, G.G., van Dick, C.B. and Kroon, A.G.M. (1992) Metabolism of hexadecyltrimethylammonium chloride in *Pseudomonas* strain B. *Appl Environ Microbiol* **58**, 3083–3087.
- von Wallbrunn, A., Heipieper, H.J. and Meinhardt, F. (2002) Cis/trans isomerization of unsaturated fatty acids in cardiolipin synthase knock-out mutant of *Pseudomonas putida* P8. *Appl Microbiol Biotechnol* **60**, 179–185.
- Wising, J. and Behrbohm, H. (1967) DAG pyrophosphate, a novel phospholipids compound. *FEBS Lett* **315**, 95–99.



ORIGINAL ARTICLE

# Physiological role of phosphatidylcholine in the *Pseudomonas putida* A ATCC 12633 response to tetradecyltrimethylammonium bromide and aluminium

P.S. Boeris, A.S. Liffourrena, M.A. Salvano and G.I. Lucchesi

Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Exactas, Físicoquímicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Córdoba, Argentina

## Keywords

aluminium, cationic surfactant, phospholipids, *Pseudomonas putida*.

## Correspondence

Gloria I. Lucchesi, Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias, Exactas Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto. CPX5804BYA Río Cuarto. Córdoba, Argentina.  
E-mail: glucchesi@exa.unrc.edu.ar

2009/0513: received 18 March 2009, revised and accepted 2 July 2009

doi:10.1111/j.1472-765X.2009.02699.x

## Abstract

**Aims:** To evaluate the effect of tetradecyltrimethylammonium bromide (TTAB) and aluminium stresses on the phospholipid (PL) composition of *Pseudomonas putida* A ATCC 12633.

**Methods and Results:** *Pseudomonas putida* were grown with TTAB in the presence or absence of AlCl<sub>3</sub>, and the PL composition was analysed. The presence of TTAB resulted in an increase in phosphatidylglycerol and phosphatidic acid levels (6- and 20-fold, respectively) with respect to the levels in cells grown without the surfactant. With AlCl<sub>3</sub>, phosphatidylcholine (PC) increased (three-fold) and cell-free extracts contained approximately threefold more phosphatidylcholine synthase activities than extracts without AlCl<sub>3</sub>, indicating that the PC level is dependent upon activation of this enzyme.

**Conclusions:** The negative charges of the headgroups of PL are the primary membrane-associated factors for the response to TTAB. PC are involved in cellular responses to binding Al<sup>3+</sup> and should be viewed as a temporary reservoir of available Al<sup>3+</sup> to allow a more efficient utilization of TTAB by *Ps. putida*.

**Significance and Impact of the Study:** The changes in the PL of *Ps. putida* in the presence of TTAB and AlCl<sub>3</sub> indicate that different responses are utilized by bacteria to maintain optimal PL composition in the presence of such environmental pollutants.

## Introduction

Quaternary ammonium compounds (QACs) are commercially available chemicals commonly used as biocides or disinfectants in a variety of products, such as cosmetics, antiseptic solutions, textile finishes, house-cleaning products and fabric softeners (Macdonnell and Russell 1999; Gilbert and Moore 2005; Zhao and Sum 2007). The biodegradability of QACs, which are released into the environment, may be limited by their antimicrobial activity (Nishiyama *et al.* 1995), but some species of bacteria, notably strains of *Pseudomonas*, have high resistance to QACs and are thought to be responsible for the biodegradation of QACs in activated sludge (van Ginkel *et al.* 1992; Nishihara *et al.* 2000; Takenaka *et al.* 2007). Several reports have described intrinsic and acquired resistance to these compounds because of the changes in the acidic

phospholipid (PL) content of the membrane (Nikaido 1994), as well as exclusion mechanisms by multi-drug efflux pumps (Aase *et al.* 2000; To *et al.* 2002; Gilbert and Moore 2005). In *Pseudomonas putida* A ATCC 12633, the adaptive response and resistance to the bactericidal activity of the QAC tetradecyltrimethylammonium bromide (TTAB) involve an initial mechanism producing changes at membrane levels involving specific variations in the content of phosphatidic acid (PA), phosphatidylglycerol (PG) and cardiolipin (CL) (Boeris *et al.* 2007). In addition to the above data, we have recently demonstrated that *Ps. putida* A ATCC 12633 use TTAB as a sole carbon, nitrogen and energy source and that more efficient TTAB degradation was obtained when the culture was supplemented with 0.1 mmol l<sup>-1</sup> of AlCl<sub>3</sub> (Liffourrena *et al.* 2008). Aluminium (Al<sup>3+</sup>) is known to interfere with the normal functioning of most cellular sys-

tems and, in general, induces changes in the properties of the plasma membrane, including membrane potentials (Silva *et al.* 2001), peroxidation of membrane lipids (Cakmak and Horst 1991) and membrane integrity (Martinez-Estévez *et al.* 2003). During growth in media containing elevated concentrations of aluminium, bacteria developed several strategies to overcome the metal stress: active efflux, intracellular sequestration, precipitation and bio-transformation (Ledin 2000; Hamel and Appanna 2003). The formation of an  $\text{Al}^{3+}$ -trimethylamine complex, detected in *Ps. putida* A ATCC 12633 grown with TTAB, is also considered to enable the bacteria to overcome the possible damage caused by aluminium (Liffourrena *et al.* 2008). This finding plus the fact that there are important changes in the composition of PL in the *Ps. putida* A ATCC 12633 membrane exposed to TTAB (Boeris *et al.* 2007) led us to examine the effect of TTAB and  $\text{Al}^{3+}$  in more detail. The results presented here indicated that in the presence of both compounds, significant increase in phosphatidylcholine (PC) was detected and that this increase can be attributed to the activation of phosphatidylcholine synthase (PCS) activity. The potential physiological role of PC as a temporary reservoir of available  $\text{Al}^{3+}$  is also discussed.

## Materials and methods

### Organisms and culture conditions

*Pseudomonas putida* A ATCC 12633 were grown aerobically at 30°C, with shaking, in a basal salt liquid medium (HPi-BSM) (Lucchesi *et al.* 1989) with 50 mg l<sup>-1</sup> (0.15 mmol l<sup>-1</sup>) TTAB as the carbon and nitrogen source. At the beginning of the stationary phase ( $D_{660} = 0.4$ ), approximately after 48 h, the culture was divided, and growth continued in the presence or absence of 0.1 mmol l<sup>-1</sup>  $\text{AlCl}_3$ . To prevent loss of TTAB by adsorption on glass surfaces, all glassware used was conditioned by overnight treatment with an aqueous 5 mg l<sup>-1</sup> TTAB solution (Fernández *et al.* 1996). To control cultures, bacteria were grown in HPi-BSM with 20 mmol l<sup>-1</sup> glucose and 18.7 mmol l<sup>-1</sup>  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Growth was measured as attenuation at 660 nm ( $D_{660}$ ) with a spectrophotometer (Beckman DU 640).

### Phospholipid extraction

Cells of *Ps. putida* A ATCC 12633 cultivated in HPi-BSM with TTAB or with glucose and  $\text{NH}_4\text{Cl}$  were harvested at late exponential phase by centrifugation at 8000 g for 10 min in a Sorvall RC5C refrigerated centrifuge. Pellets were washed twice with 0.9% (w/v) NaCl and used for further studies. In experiments where the cells were exposed to  $\text{AlCl}_3$ , when the culture reached a late exponential phase,

the culture was divided into two parts: one part was kept as a control, and to the other, 0.1 mmol l<sup>-1</sup>  $\text{AlCl}_3$  was added. At different times (15 and 180 min), aliquots of the cells were collected and washed twice by centrifugation at 8000 g for 10 min. Lipids were extracted from the cells according to the Bligh and Dyer (1959) method and separated by thin-layer-chromatography (TLC) plates (silica gel HLF, 250 microns; Analtech, Newark, DE) according to Boeris *et al.* (2007). Separated lipids were detected with iodine vapors and identified by comparison with authentic purified standards purchased from Sigma. PL classes were scraped and the fractions were quantified by phosphorus determination as described by Fiske and Subbarow (1925). The experiments, carried out in duplicate, were performed three times.

### Determination of PCS activity

Cell suspensions of *Ps. putida* A ATCC 12633 grown at the beginning of the stationary phase were harvested by centrifugation at 10 000 g for 10 min at 4°C, washed with 0.9% (w/v) NaCl, and resuspended in 20 mmol l<sup>-1</sup> HCl-Tris buffer, pH 8. Washed cells were disrupted 10 times, for 10 s each time, by sonication in an ice bath at 20 000 Hz using a Vibra cell ultrasonic processor (Sonics & Materials Inc., Newtown, CT). Whole cells and cell debris were removed by centrifugation, and the supernatant of the cell extracts was used for the determination of PCS as described by Martínez-Morales *et al.* (2003). The reaction mixture contained 50 mmol l<sup>-1</sup> HCl-Tris buffer, pH 8, 10 mmol l<sup>-1</sup>  $\text{MnCl}_2$ , 345  $\mu\text{mol l}^{-1}$  cytidine diphosphate-diacylglycerol (CDP-DAG), 0.2% (w/v) Triton X-100, 100  $\mu\text{mol l}^{-1}$  choline and 1 mg ml<sup>-1</sup> protein. When necessary, cell-free extracts were dialysed at 4°C against 10 mmol l<sup>-1</sup> HCl-Tris buffer, pH 8.  $\text{Al}^{3+}$  in the dialysed or undialysed extracts was measured as described below. The production of PC, the product of the PCS action, was followed by HPLC as described by Carelli *et al.* (1997). The concentration of PC was calculated by calibration graphs constructed previously. Unit enzyme activity was expressed as nmol of PC per min per  $\mu\text{g}$  protein. Protein concentration was determined by the method of Bradford (1976) with bovine albumin as the standard.

### $\text{Al}^{3+}$ determination

$\text{Al}^{3+}$  in the dialysed or undialysed cell-free extracts was determined using the fluorochrome 2',3,4',5,7-pentahydroxyflavone (morin reagent; Sigma Chemical Co., USA) according to Liffourrena *et al.* (2008). Briefly, stock solution of morin was prepared in absolute ethanol, and adequate fresh solution was prepared by appropriate dilution with glass-distilled water. Aliquots of the extracts were



incubated with 0.3 mmol l<sup>-1</sup> morin for 30 min, and the fluorescence of Al<sup>3+</sup>-morin complex was measured with a Fluoromax-3 spectrophotometer (Jobin Yvon Inc., Edison, NJ) using excitation and emission wavelengths of 440- and 520-nm, respectively. The concentration of Al<sup>3+</sup> was calculated by calibration graphs constructed previously by plotting the fluorescence intensity of Al<sup>3+</sup>-morin complex vs Al<sup>3+</sup> concentration.

To detect Al<sup>3+</sup> in cells, *Ps. putida* A ATCC 12633 were grown with TTAB until the culture reached a turbidity of about 0.40 at 660 nm. At this point, the culture was divided into two parts. One part was kept as control, and to the other, 0.1 mmol l<sup>-1</sup> of AlCl<sub>3</sub> was added. After 15 min, the cells were harvested by centrifugation at 8000 g for 10 min, washed twice with 0.9% (w/v) NaCl and diluted in HPI-BSM to D<sub>660</sub> around 0.1. Cells were immobilized on a microscope slides by desiccation, treated with 10 μmol l<sup>-1</sup> of AlCl<sub>3</sub> for 10 s, to allow incorporation of the ion into the membrane, and then washed with 0.9% (w/v) NaCl. Cells were stained by the addition of 10 μmol l<sup>-1</sup> morin during 30 s. The slides were washed with 0.9% (w/v) NaCl to eliminate the fluorochrome not united. Samples were observed with a Zeiss microscope (Axiovert 135; Zeiss, Germany) equipped with an Axiocam camera.

## Results

### Change in the PL composition of *Pseudomonas putida* A ATCC 12633 grown with TTAB with and without AlCl<sub>3</sub>

Table 1 shows the PL patterns of *Ps. putida* A ATCC 12633 growing exponentially in basal medium with TTAB

and with NH<sub>4</sub>Cl and glucose. In this latter case, in close agreement with our previous reports (Boeris et al. 2007), about 76% of the total polar headgroups were phosphatidylethanolamine (PE), while the other components – PG, diphosphatidylglycerol or CL, PC and lisophosphatidylethanolamine (LPE) – ranged from 2% to 6%. PA was a minor PL (0.5%) (Table 1, column 2). In cells grown with 50 mg l<sup>-1</sup> (0.15 mmol l<sup>-1</sup>) of TTAB as the sole carbon, nitrogen and energy source, the PL pattern was qualitatively the same as that observed in the absence of TTAB, but the amount of each PL changed. PG and PA showed greatest changes with an increase of about 6- and 20-fold, respectively (Table 1, column 3). Thus, the ratio of zwitterionic (PE, LPE, PC) to anionic (PG, CL, PA) PL decreased approximately threefold, mainly as a consequence of the increment of PG and PA. Interestingly, with respect to cells grown with TTAB, treatment with Al<sup>3+</sup> during 15 min resulted in an increase in CL and PC (three- and fourfold, respectively), while the content of the other PL was similar to that seen in untreated cells (Table 1, column 4). The molar ratio of PC/PE increased (0.04–0.21). Prolonged treatment with Al<sup>3+</sup> (180 min) also resulted, respect to cells growing exponentially with TTAB in the absence of this ion, in an increased level of CL and PC (four- and twofold, respectively) with a concomitant decrease of PA (threefold). The observed changes in the relative percentages of each PL detected in this case maintain the ratio from zwitterionic to anionic PL and a molar ratio PC/PE similar to control values (Table 1, column 5). The Al<sup>3+</sup> in the membrane of cells grown with TTAB and exposed or not to ion were visualized using the fluorochrome 2',3,4',5,7-pentahydroxyflavone.

**Table 1** PL composition of *Pseudomonas putida* A ATCC 12633 grown with glucose-NH<sub>4</sub>Cl or TTAB in the presence or absence of AlCl<sub>3</sub>

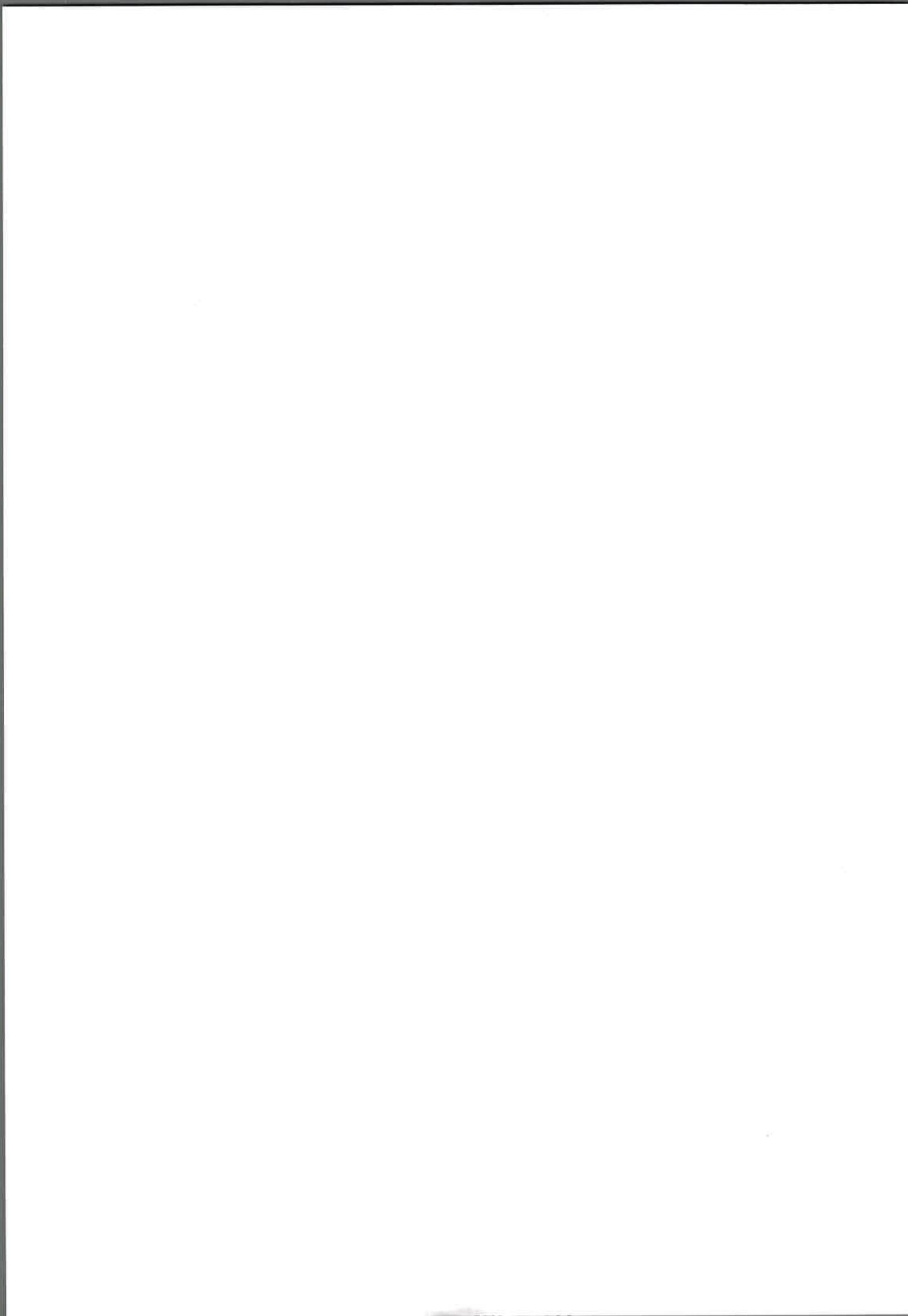
PL	nmol PL mg per protein			
	Glucose + NH <sub>4</sub> Cl	TTAB	TTAB* + AlCl <sub>3</sub>	TTAB† + AlCl <sub>3</sub>
CL	0.87 ± 0.07 (6.0)‡ a	1.21 ± 0.13 (3.9) b	3.86 ± 0.47 (10.4) c	4.66 ± 0.80 (13.2) c
PE	11.12 ± 0.25 (76.6) a	16.11 ± 2.35 (52.9) b	15.63 ± 1.23 (42.2) b	19.13 ± 2.49 (54.0) b
PG	0.93 ± 0.14 (6.4) a	6.19 ± 0.37 (20.3) b	6.50 ± 0.89 (17.6) b	5.65 ± 0.57 (16.0) b
PC	0.27 ± 0.04 (1.9) a	0.72 ± 0.28 (2.4) a	3.34 ± 0.01 (9.0) b	1.57 ± 0.16 (4.4) c
LPE	0.67 ± 0.02 (4.6) a	1.66 ± 0.36 (5.5) b	1.98 ± 0.11 (5.3) b	2.29 ± 0.46 (6.5) b
PA	0.07 ± 0.01 (0.5) a	1.43 ± 0.09 (4.7) b	1.54 ± 0.18 (4.2) b	0.48 ± 0.13 (1.4) c
Others	0.58 ± 0.02 (4.0) a	3.15 ± 0.05 (10.3) b	4.15 ± 0.02 (11.2) c	1.63 ± 0.10 (4.6) d
Zw/An	6.45	2.09	1.75	2.13
PC/PE	0.02	0.04	0.21	0.06

Cultures were grown with glucose and NH<sub>4</sub>Cl or TTAB at late exponential phase, and 0.1 mmol l<sup>-1</sup> of AlCl<sub>3</sub> was added. After 15 min\* or 180 min†, the cells were collected and PL were extracted. PL were resolved by thin-layer chromatography and quantified.

Values with the same letter within a row are not significantly ( $P \leq 0.05$ ) different according to the ANOVA test. Results are expressed as mean values ± SD ( $n = 3$ ).

PL, phospholipids; CL, cardiolipin; PE, phosphatidylethanolamine; PG, phosphatidylglycerol; PC, phosphatidylcholine; LPE, lisophosphatidylethanolamine; PA, phosphatidic acid; TTAB, tetradecyltrimethylammonium bromide; Zw/An, ratio of zwitterionic to anionic PL.

‡Numbers in parentheses indicate the percentage of the total PL content (mol phosphorus).



**Table 2** Influence of Al<sup>3+</sup> on phosphatidylcholine synthase (PCS) activity of *Pseudomonas putida* A ATCC 12633

Cell-free extracts	Al <sup>3+</sup> nmol per mg protein	PCS activity nmol PC per min per µg protein
TTAB	ND	50.8 ± 0.13
TTAB + AlCl <sub>3</sub> 15 min	6.82 ± 0.02	168.6 ± 2.35
TTAB + AlCl <sub>3</sub> 15 min*	1.02 ± 0.01	40.8 ± 0.37
TTAB + AlCl <sub>3</sub> 180 min	6.86 ± 0.03	129.8 ± 0.28
TTAB + AlCl <sub>3</sub> 180 min*	0.96 ± 0.01	39.4 ± 0.36

*Pseudomonas putida* A ATCC 12633 was grown with TTAB at late exponential phase, and 0.1 mmol l<sup>-1</sup> of AlCl<sub>3</sub> was added. After 15 or 180 min the cells were collected, washed, disrupted by sonication and the supernatant of the cell extracts were used for PCS and Al<sup>3+</sup> determination.

Values are means ± SD (*n* = 3).

ND, not detected; TTAB, tetradecyltrimethylammonium bromide.

\*Cell-free extracts were dialysed at 4°C against 10 mmol l<sup>-1</sup> HCl-Tris buffer, pH 8.

In *Ps. putida* exposed to ion, the pattern of distribution of green fluorescence is quite similar to that cells not treated but a high level of fluorescence intensity was visualized in the cell membranes, consistent with the presence of more Al<sup>3+</sup> content (not shown).

#### PCS activity in cell-free extracts

Cell-free extracts obtained from *Ps. putida* A ATCC 12633 growing exponentially with TTAB and exposed to Al<sup>3+</sup> during 15 or 180 min contained approximately threefold more PCS activity than the cell-free extracts from TTAB (Table 2). When these cell-free extracts were extensively dialysed, the concentration of Al<sup>3+</sup> decreased from about 7 to 1 nmol mg<sup>-1</sup> protein and in these extracts the PCS activity was similar to the activity detected in extracts from cultures without AlCl<sub>3</sub> (Table 2). When the enzyme activity was measured in the reaction mixture with cell-free extracts dialysed, in the presence of 0.1 mmol l<sup>-1</sup> Al<sup>3+</sup> activation of PCS occurred [109 ± 3 nmol min<sup>-1</sup> per µg protein (*n* = 3)], indicating that Al<sup>3+</sup> is an activator of the enzyme.

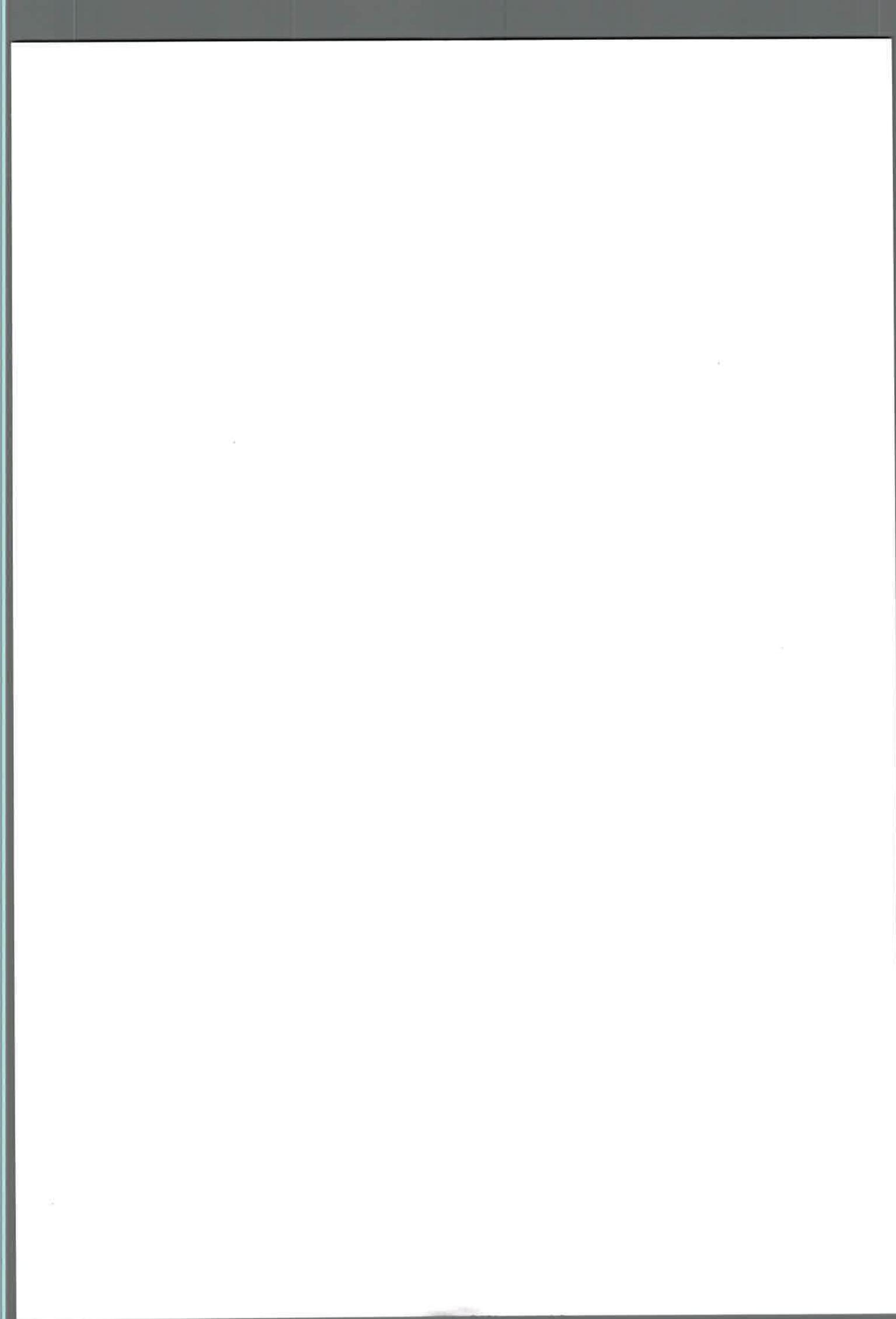
#### Discussion

The results indicated that the growth of *Ps. putida* A ATCC 12633 on TTAB involves changes at membrane levels involving the PL composition. In the presence of TTAB, PG and PA showed the greatest changes, indicating that the negative charges of the headgroups of PL are the primary membrane-associated factors affecting the response of *Ps. putida* A ATCC 12633 to TTAB. In the long-term response of *Ps. putida* A ATCC 12633 to TTAB and in TTAB-adapted bacteria, the most significant

change detected was also an increase in PA and PG levels, but accompanying these changes, the amount of CL decreased (60%) (Boeris et al. 2007). In contrast to this, in cells grown with TTAB, the level of CL did not change considerably (Table 1). This result clearly indicates that the decrease in CL, although important for the initial response to TTAB, is not essential when *Ps. putida* are grown with TTAB as the sole carbon and nitrogen source and that the increase in PA (20-fold) plays an important role in the cellular responses to QACs, probably to neutralize the positive charge found in the trimethylammonium moiety from TTAB.

Aluminium is known to interfere with the normal functioning of most cellular systems, but to combat metal stress, numerous organisms elaborate strategies, such as active efflux, intracellular sequestration, volatilization and biotransformation (Ledin 2000). Previous studies in our laboratory have demonstrated that *Ps. putida* A ATCC 12633 are capable of sequestering Al<sup>3+</sup> when the bacteria are grown in the presence of TTAB, by the formation of a soluble Al<sup>3+</sup>-trimethylamine complex (Liffourrena et al. 2008). In spite of this role, the Al<sup>3+</sup> induces different changes in the properties of the bacterial membrane. In cells of *Ps. putida* A ATCC 12633 grown with TTAB and exposed to Al<sup>3+</sup> for 15 min, an increase in CL and PC (about fourfold) was detected. Thus, the molar ratio PC/PE increased (0.04–0.21), which suggests a transitory decrease in the membrane fluidity (Senault et al. 1990; Bangur et al. 1995). The increase in PC and CL levels was maintained during prolonged Al<sup>3+</sup> treatment (180 min), with a concomitant decrease of PA (threefold), but the observed changes in the relative percentages of each PL maintain a molar ratio PC/PE similar to those detected in cells grown with TTAB as the sole carbon and nitrogen source (0.04 and 0.06, respectively). Consequently, cells adapt to external stimuli by altering the lipid composition such that the bilayer fluidity remains relatively constant and maintains the homeostasis of the cell.

Because the PC amounts were always modified in all the conditions tested in the presence of AlCl<sub>3</sub>, we suggest that this PL may be involved in the bacteria response to binding Al<sup>3+</sup> and allowed us to formulate a physiological role of PC as a temporary reservoir of available Al<sup>3+</sup>. This assumption is in agreement with the presence of more Al<sup>3+</sup> content in the cell membranes and with previous studies demonstrating that in multilamellar vesicles, Al<sup>3+</sup> binds to the phosphate group of PC (MacKinnon et al. 2004, 2006). The mechanism proposed for this benefit effect is the formation of Al<sup>3+</sup>-PC complexes, which decreases the free toxic Al<sup>3+</sup> and maintains available Al<sup>3+</sup> for a more efficient utilization of TTAB by *Ps. putida* A ATCC 12633. When *Ps. putida* cells grow on TTAB, intracellular trimethylamine accumulated; however, by the



additions of sufficient  $\text{AlCl}_3$  ( $0.1 \text{ mmol l}^{-1}$ ), the internal concentration of intracellular trimethylamine decreased, and TTAB was fully consumed without the accumulation of undesirable compounds (Liffourrena et al. 2008). On the basis of these data, we propose that the  $\text{Al}^{3+}$ -PC complexes are utilized as a reservoir of  $\text{Al}^{3+}$ , and the bacteria may obtain the ion to reduce the trimethylamine accumulated inside the cell in concordance with the total degradation of TTAB. Two pathways for PC biosynthesis are known in bacteria, the methylation pathway and the phosphatidylcholine synthase (PCS) pathway (Martínez-Morales et al. 2003 and citations therein). Evidence of the existence of a PCS pathway has been proposed in Gram-negative bacteria, such as *Sinorhizobium meliloti*, *Rhizobium leguminosarum* and *Pseudomonas aeruginosa* (Wilderman et al. 2002; López-Lara et al. 2003; Martínez-Morales et al. 2003), but there is no literature that has described the presence of a PCS pathway in *Ps. putida*. In this work, we have shown that an increase in PCS activity was detected in cell-free extracts of *Ps. putida* A ATCC 12633 grown in the presence of TTAB and  $\text{Al}_3\text{Cl}$  and that the  $\text{Al}^{3+}$  is an activator of the enzyme. We conclude that the increase in PC can be attributed to the activation of PCS activity. Thus, further research is required to elucidate the complete PCS pathway in these bacteria.

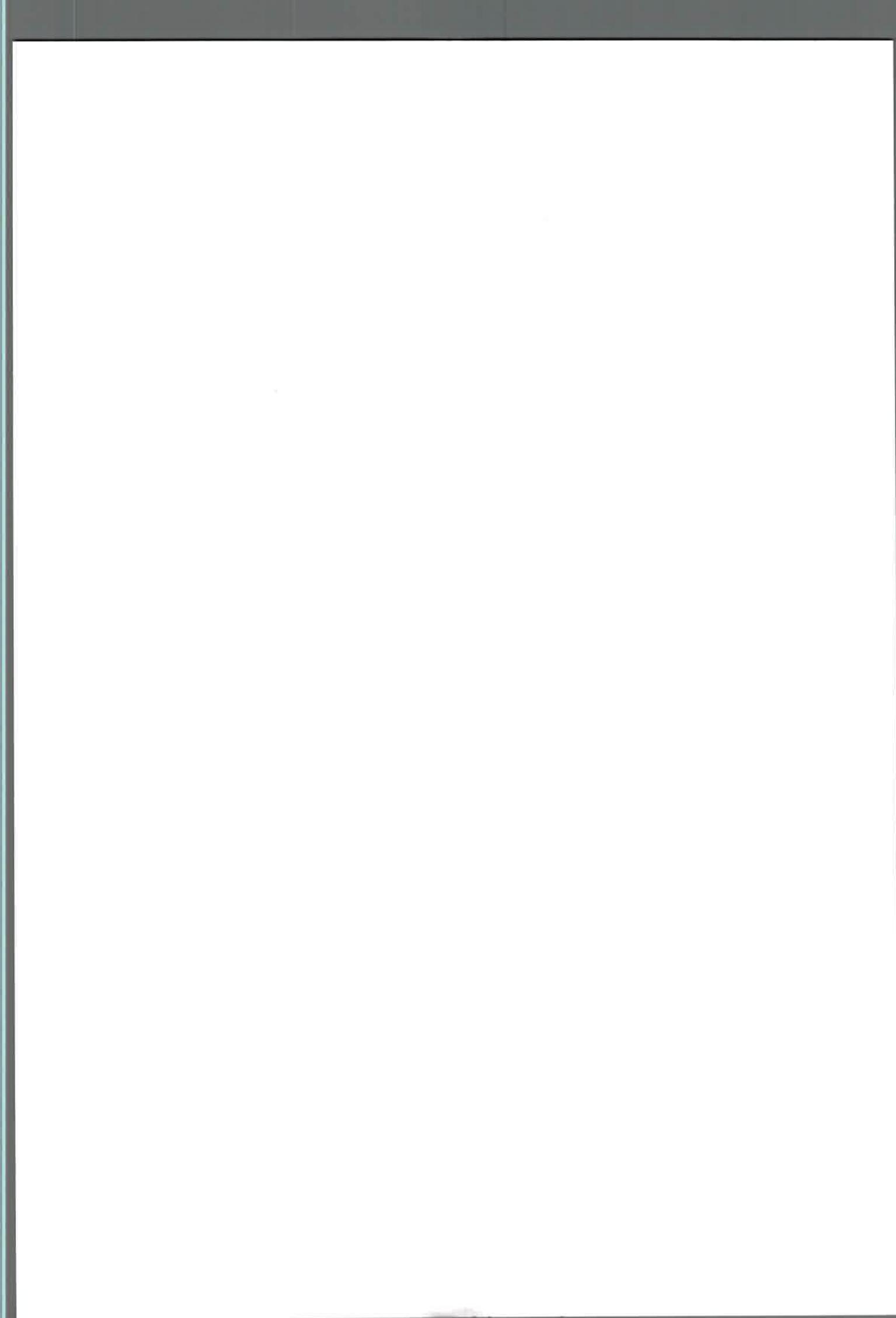
Finally, the results present another notable example of versatility of *Ps. putida* A ATCC 12633 to provide for its survival, in this case maintain optimal PL pattern by ensuring its nitrogen, carbon and energy source through the utilization of TTAB in the presence of  $\text{AlCl}_3$ .

## Acknowledgements

GIL is Career Members of the Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). PSB and ASL are grateful for fellowships from CONICET-Ministerio de Ciencia y Tecnología de Córdoba. This work was supported by grants from ANPCyT-UNRC, CONICET and SECYT-UNRC of Argentina.

## References

- Aase, B., Sundheim, G., Langsrud, S. and Rorvik, L.V. (2000) Occurrence of a possible mechanism for resistance to a quaternary ammonium compounds in *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* **62**, 57–63.
- Bangur, C.S., Howland, J.L. and Katyare, S.S. (1995) Thyroid hormone treatment alters phospholipid composition and membrane fluidity of the rat brain mitochondria. *Biochem J* **305**, 29–32.
- Bligh, E.G. and Dyer, W.J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* **37**, 911–918.
- Boeris, P.S., Domenech, C.E. and Lucchesi, G.I. (2007) Modification of phospholipid composition in *Pseudomonas putida* A ATCC 12633 induced by contact with tetradecyltrimethylammonium. *J Appl Microbiol* **4**, 1048–1054.
- Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248–254.
- Cakmak, C.J. and Horst, W.J. (1991) Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Plant Physiol* **83**, 463–468.
- Carelli, A.A., Brevedan, M.I.V. and Crapiste, G.H. (1997) Quantitative determination of phospholipids in sunflower oil. *J Am Oil Chem Soc* **74**, 511–514.
- Fernández, P., Alder, A.C., Suter, M.J.F. and Giger, W. (1996) Determination of the quaternary ammonium surfactant ditallowdimethylammonium in digested sludges and marine sediments by supercritical fluid extraction and liquid chromatography with post column ion-pair formation. *Anal Chem* **68**, 921–929.
- Fiske, C.H. and Subbarow, Y. (1925) The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem* **66**, 361–375.
- Gilbert, P. and Moore, L.E. (2005) Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *J Appl Microbiol* **99**, 703–715.
- van Ginkel, C.G., van Dijk, J.B. and Kroon, A.G.M. (1992) Metabolism of hexadecyltrimethylammonium chloride in *Pseudomonas* Strain B1. *Appl Environ Microbiol* **58**, 3083–3087.
- Hamel, R. and Appanna, V.D. (2003) Aluminum detoxification in *Pseudomonas fluorescens* is mediated by oxalate and phosphatidylethanolamine. *Biochim Biophys Acta* **1619**, 70–76.
- Ledin, M. (2000) Accumulation of metals by microorganisms. Processes and importance for soil systems. *Earth-Sci Rev* **51**, 1–31.
- Liffourrena, A.S., López, F.G., Salvano, M.A., Domenech, C.E. and Lucchesi, G.I. (2008) Biodegradation of tetradecyltrimethylammonium in *Pseudomonas putida* A ATCC 12633 improved by aluminum ions. *J Appl Microbiol* **2**, 396–402.
- López-Lara, I.M., Sohlenkamp, C. and Geiger, O. (2003) Membrana lipids in plant-associated bacteria: their biosynthesis and possible functions. *Mol Plant Microbe Interact* **16**, 567–579.
- Lucchesi, G.I., Lisa, A.T. and Domenech, C.E. (1989) Choline and betaine as inducer agents of *Pseudomonas aeruginosa* phospholipase C activity in high phosphate medium. *FEMS Microbiol Lett* **57**, 335–338.
- Macdonnell, G. and Russell, A.D. (1999) Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev* **12**, 47–179.
- MacKinnon, N., Crowell, K.J., Udit, A.K. and Macdonald, P.M. (2004) Aluminum binding to phosphatidylcholine



- lipid bilayer membranes:  $^{27}\text{Al}$  and  $^{31}\text{P}$  NMR spectroscopic studies. *Chem Phys Lipids* **132**, 23–36.
- MacKinnon, N., Ridgway, J., Crowell, K.J. and Macdonald, P.M. (2006) Aluminum binding to phosphatidylcholine lipid bilayer membranes: aluminum exchange lifetimes from  $^{31}\text{P}$  NMR spectroscopy. *Chem Phys Lipids* **139**, 85–95.
- Martínez-Estévez, M., Ku-Gonzalez, A., Muñoz-Sánchez, J.A., Loyola-Vargas, V.M., Pérez-Brito, D., Tapia-Tusell, R., Escamilla-Bencomo, J.A. and Hernández-Sotomayor, S.M.T. (2003) Changes in some characteristics between the wild and Al-tolerant coffee (*Coffea arabica* L.) cell line. *J Inorg Biochem* **97**, 69–78.
- Martínez-Morales, F., Schobert, M., López-Lara, I.M. and Geiger, O. (2003) Pathways for phosphatidylcholine biosynthesis in bacteria. *Microbiology* **149**, 3461–3471.
- Nikaido, H. (1994) Prevention of drug access to bacterial target: permeability barriers and active efflux. *Science* **264**, 382–388.
- Nishihara, T., Okamoto, T. and Nishihara, N. (2000) Biodegradation of didecyltrimethylammonium chloride by *Pseudomonas fluorescens* TN4 isolated from activated sludge. *J Appl Microbiol* **88**, 641–647.
- Nishiyama, N., Toshima, Y. and Ikeda, Y. (1995) Biodegradation of alkyltrimethylammonium salts in activated sludge. *Chemosphere* **30**, 593–603.
- Senault, C., Yazbeck, J., Goubern, M., Porter, R., Vincent, M. and Gallay, M. (1990) Relation between membrane phospholipid composition, fluidity and function in mitochondria of rat brown adipose tissue: effect of thermal adaptation and essential fatty acid deficiency. *Biochim Biophys Acta* **1023**, 283–289.
- Silva, I.R., Smyth, T.J., Israel, D.W., Raper, C.D. and Rufty, T.W. (2001) Magnesium is more efficient than calcium in alleviating aluminum rhizotoxicity in soybean and its ameliorative effect is not explained by the Gouy–Chapman–Stern model. *Plant Cell Physiol* **42**, 538–545.
- Takenaka, S., Tonoki, T., Taira, K., Murakami, S. and Aokil, K. (2007) Adaptation of *Pseudomonas* sp. strain 7-6 to quaternary ammonium compounds and their degradation via dual pathways. *Appl Environ Microbiol* **73**, 1797–1802.
- To, N.S., Favrin, S., Romanova, N. and Griffiths, M.W. (2002) Post adaptational resistance to benzalkonium chloride and subsequent physicochemical modifications of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **68**, 5258–5464.
- Wilderman, P.J., Vasil, A.I., Martin, W.E., Murphy, R.C. and Vasil, M.L. (2002) *Pseudomonas aeruginosa* synthesizes phosphatidylcholine by use of the phosphatidylcholine synthase pathway. *J Bacteriol* **184**, 4792–4799.
- Zhao, T. and Sum, G. (2007) Antimicrobial finishing of wool fabric with quaternary aminopyridinium salts. *J Appl Polym Sci* **103**, 482–486.



## Adaptative response and degradation of quaternary ammonium compounds by *Pseudomonas putida* A ATCC 12633

Gloria I. Lucchesi\*, Andrés S. Liffourrena, Paola S. Boeris and Mario A. Salvano

Department of Molecular Biology, Universidad Nacional de Río Cuarto, (5800) Río Cuarto, Córdoba, Argentine.

\* Corresponding author. E-mail: glucchesi@exa.unrc.edu.ar

Quaternary ammonium compounds (QACs) are commercially available chemicals commonly used in a variety of products such as cosmetics, antiseptic solutions, textile finishes, and fabric softeners. Released into the environment, the biodegradability of QACs may be limited by their antimicrobial activity. However some species of bacteria, notably strains of *Pseudomonas*, have high resistance to QACs and are thought to be responsible for biodegradation in activated sludge. Here, we show how tetradecyltrimethylammonium bromide (TTAB), a representative of QACs, might be degraded by *P. putida* A ATCC 12633. We also establish that the response to TTAB involves changes in the membrane phospholipids composition.

*P. putida* A ATCC 12633 uses TTAB as a sole carbon, nitrogen, and energy source. The TTAB degradation is initiated by N-dealkylation catalyzed by a monooxygenase activity resulting in the formation of tetradecylalkanal and trimethylamine (TMA). The TMA produced is used by *P. putida* A ATCC 12633 as a nitrogen source through trimethylamine monooxygenase activity and is also accumulated inside the cell, decreasing the bacterial growth an effect counteracted by the addition of  $AlCl_3$ . In the presence of 0.1 mM  $AlCl_3$ , the intracellular concentration of free TMA is decreased by the formation of an  $Al^{3+}$ :TMA complex, and the TTAB is fully consumed without accumulation of undesirable compounds.

On the other hand, in *P. putida* A ATCC 12633, the adaptative response and resistance to the bactericidal activity of TTAB involves an initial mechanism, producing changes at membrane levels involving specific variations in the content of phosphatidic acid, phosphatidylglycerol, and cardiolipin. These modifications indicate that these phospholipids are involved in cellular responses to QACs, utilizing principally phosphatidic acid to neutralize the high positive charge density given for the ammonium quaternary moiety from TTAB. Also, when *P. putida* are grown with TTAB in the presence of  $AlCl_3$ , phosphatidylcholine increased. This indicate that this particular phospholipid may be involved in the bacteria response to binding  $Al^{3+}$  and allowing us to formulate a physiological role of phosphatidylcholine as a temporary reservoir of available  $Al^{3+}$ .

**Keywords:** *Pseudomonas putida*; cationic surfactant; aluminum.

### 1. Introduction

Surfactants are usually amphiphilic organic compounds commonly classified into four categories according to the formal charge present in their hydrophilic head: anionic, cationic, nonionic and amphoteric. For each classification, it is possible to further sub-classify them according to the functional group of their hydrophilic head. For the household industry, the most common cationic surfactants are those with quaternary ammonium groups [1]. Quaternary ammonium compounds (QACs) are molecules with at least one hydrophobic long alkyl chain attached to a positively-charged nitrogen atom. Among the QACs, the generic term Cetrimide relates to mixtures of n-alkyltrimethyl ammonium bromides where the n-alkyl group is between eight and 18 carbons long, whereas Cetrimide USP is tetradecyltrimethylammonium bromide (TTAB). Benzalkonium chlorides are always mixtures of n-alkyldimethylbenzylammonium chlorides, where the n-alkyl groups can be of variable length within a specified range. QACs have a wide-range of commercial and consumer uses such as detergents, antistatics, wetting and softening agents, biocides, germicides, deodorizers and emulsifiers. In quantitative terms, this utilization translates into mostly fabric softeners (66%), coated clays (16%), and biocides (8%) [2]. After use, the residual product is discharged to sewage treatment plants or surface waters and finally to coastal waters. Released into the environment, the biodegradability of QACs is limited by their antimicrobial activity [3, 4].

As biocides, QACs are active against Gram-negative and Gram-positive bacteria and some viruses, fungi and protozoa [5, 6]. When bacteria are exposed to QACs, the following sequence of events has been proposed to occur: (i) adsorption of the cationic compound into the bacterial cell surface; (ii) diffusion through the cell wall; (iii) binding to the cytoplasmic membrane; (iv) disorganization of the cytoplasmic membrane; (v) release of cytoplasmic constituents; and (vi) death of the bacterial cell [6]. Thus, the bactericidal action of QACs is centred upon physical disruption and partial solubilization of the cell wall and membrane. However, several reports have described intrinsic and acquired resistance to these compounds, especially among Gram-negative species [7-9]. Some microorganisms are able to demonstrate intrinsic resistance through inactivation of the biocide, and this will assist in the removal of such agents from the environment. Consequently, some strains of *Pseudomonas* from the environment, including *Pseudomonas* sp. and *Pseudomonas fluorescens*, have high resistance to QACs and are thought to be responsible for biodegradation of QACs in activated sludge [10, 11].

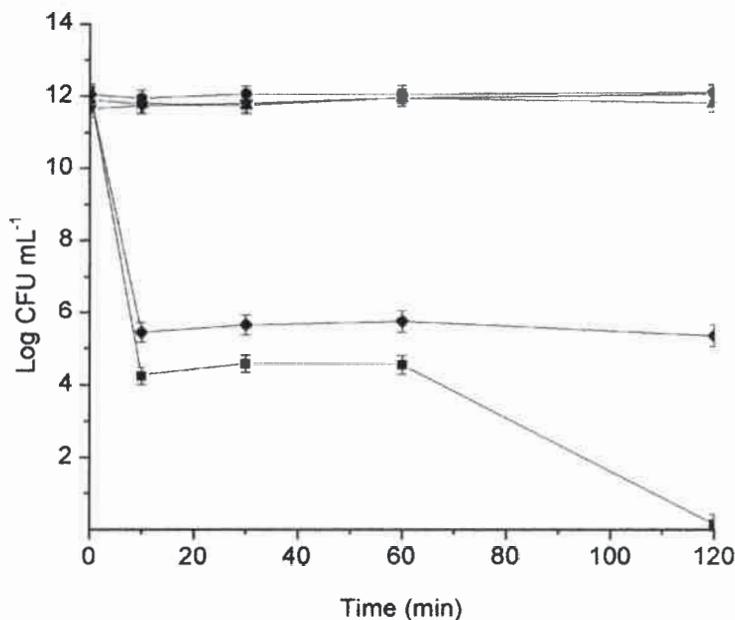


In this context, we investigated *Pseudomonas* strains for their adaptive response and resistance to the bactericidal activity of a representative QAC, TTAB. Because the resistance to antimicrobial agents can be due to enzymes transforming the biocide to a non-toxic form and this phenomenon is usually investigated from the biodegradation point of view, we also analyzed if TTAB might be degraded by a pure culture of different species from the *Pseudomonas* genus and whether factors in the medium influenced its biodegradability. Because the different *Pseudomonas* strains, which can be fluorescent or not, and plant or animal pathogens or saprophytes [12], *Pseudomonas putida* A ATCC 12633 which utilizes TTAB as its sole carbon, nitrogen and energy source when screened on a basal salt liquid medium (HPi-BSM) [13], was selected for the present study.

## 2. Adaptative response and resistance to the bactericidal activity of TTAB

### 2.1. Effects of TTAB on the growth of *P. putida* A ATCC 12633

The activity of antimicrobial agents is often quantified as the minimum concentration that is required to inhibit the growth of the target organisms (minimum inhibitory concentration or MIC) or as the concentration that leaves no detectable survivors after a specified contact time (minimum bactericidal concentration (MBC), generally taken as > 99.9% killing) [14]. The MIC detected for TTAB in *P. putida* A ATCC 12633, defined as the lowest concentration of the biocide that prevented an increase in turbidity at 660 nm after 48-72 h incubation at 30°C [15], was 150 mg L<sup>-1</sup>. Even though the intrinsic susceptibility of an organism to a biocide, documented from an MIC or MBC determination by standard methods, is not a fixed value, the MIC value detected for TTAB in *P. putida* A ATCC 12633 was similar to those reported for other QACs, such as benzalkonium chloride or dodecyl dimethylammonium chloride against other *Pseudomonas* [9, 16]. The viability of *P. putida* A ATCC 12633, tested at 100 mg L<sup>-1</sup> of TTAB, indicated that the number of viable cells (cfu mL<sup>-1</sup>) decreased 5 to 6 orders of magnitude, with respect to the initial number of bacteria. With 50 mg L<sup>-1</sup> TTAB, the bacterial survival was more than 99% (Figure 1) and this concentration was used for further study.



**Fig. 1** Survival of *P. putida* A ATCC 12633 that was grown in HPi-BSM with 20 mmol L<sup>-1</sup> glucose and 18.7 mmol L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl until the culture reached an OD<sub>660</sub> of 1. At this point the culture was divided, and the following TTAB concentrations were added: (●) 0, (▲) 10, (▼) 50, (◆) 100 and (■) 150 mg L<sup>-1</sup>. The number of viable cells (cfu mL<sup>-1</sup>) were determined, at the indicated times, by plating the serially-diluted cell suspension on LB plates. Values are the means ± SD of three independent experiments.

*P. putida* A ATCC 12633 also exhibited tolerance to the highest concentration of TTAB (280 mg L<sup>-1</sup>) after successive subculturing in the presence of progressively higher concentrations of TTAB. For adaptation to growth in the presence of TTAB, the first range of concentrations used was 10-30 mg L<sup>-1</sup>. Bacteria showing growth after 24-72 h in the presence of this concentration were used to inoculate the next culture series (increasing by 10 mg L<sup>-1</sup> for each step). The same adapted bacteria lost the increased QAC resistance after two sub-cultures without TTAB, followed by a higher growth rate; the MIC remained unchanged (150 mg L<sup>-1</sup>) [17]. This reversible adaptive response of *P. putida* A ATCC 12633 to the bactericidal activity of TTAB, which is dependent on the presence of the biocide, seems to be a characteristic of bacterial adaptation [18].



## 2.2. Growth of *P. putida* A ATCC 12633 with TTAB as the sole carbon and nitrogen source

Because some microorganisms are able to demonstrate intrinsic resistance through inactivation of a biocide and this will assist in the removal of such agents from the environment, we tested the growth of *P. putida* in the presence of TTAB as the sole carbon (C) and nitrogen (N) source. *P. putida* A ATCC 12633 was grown with 50 mg L<sup>-1</sup> of TTAB, and after 48 h, the cells entered in a stationary phase and growth ceased. To gain definitive evidence of the metabolism of TTAB, the correlation between growth yield and QAC consumption was determined. TTAB consumption was analyzed by a colorimetric method based on the reaction of TTAB found in the culture supernatants with bromothymol blue [19], and the growth was expressed by the protein content determined as previously described [20]. The growth yield for the biodegradation process was 0.22 mg protein mg TTAB<sup>-1</sup>. The net increase in cell protein when the culture reached the stationary phase was 6.27 mg L<sup>-1</sup>, and the TTAB consumption was 28.5 mg L<sup>-1</sup>. Because the average N content of proteins is about 15%, the N incorporated into the cell biomass was 0.94 mg L<sup>-1</sup>. This represented about 79 % of the initial N-TTAB incorporated into the cell biomass. The rest of the initial N (21% of the total) was not incorporated in protein synthesis and was found as trimethylamine (TMA), which accumulated with time [21].

## 2.3. Experimental approach to combat a stress situation

The maximal growth of *P. putida* A ATCC 12633 is clearly not optimal when TTAB is available as the sole carbon and nitrogen source, and the low biomass obtained was attributed to an accumulation of intracellular TMA in the cell after initial TTAB oxidation. Considering that TMA is a Lewis base, we hypothesized that the addition of a Lewis acid, such as AlCl<sub>3</sub>, should diminish the intracellular TMA concentration through the following reaction: Al<sup>3+</sup> + :N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> → Al<sup>3+</sup>:N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>. As shown in Figure 2, the addition of 0.1 mM AlCl<sub>3</sub> to the *P. putida* A ATCC 12633 culture after 48 h of growth with TTAB, increased both the bacterial growth and TTAB consumption, and the free-TMA intracellular concentration decreased to approximately zero by the formation of a soluble Al<sup>3+</sup>:TMA complex [21]. For these experiments, the intracellular TMA concentration was determined by fluorescence using the fluorochrome 2',3,4',5,7-pentahydroxyflavone (morin reagent) with the addition of AlCl<sub>3</sub>. Morin reacts with Al<sup>3+</sup> to form a fluorescent complex, Al<sup>3+</sup>:morin [22], and in the presence of compounds that sequester Al<sup>3+</sup>, Al<sup>3+</sup>:morin is not formed [23, 24]. We determined that in the presence of TMA, the fluorescence intensity of the Al<sup>3+</sup>:morin complex decreased linearly with increased TMA concentrations, providing evidence for the formation of an Al<sup>3+</sup>:TMA complex. Consequently, the concentration of TMA was calculated by calibration graphs constructed by plotting the fluorescence intensity of the Al<sup>3+</sup>:morin complex versus TMA concentration, and the intracellular concentration of free TMA in the cells was calculated by taking the difference between the total TMA detected by GC-MS in the cellular extracts, and the TMA present in the Al<sup>3+</sup>:TMA complex [21].

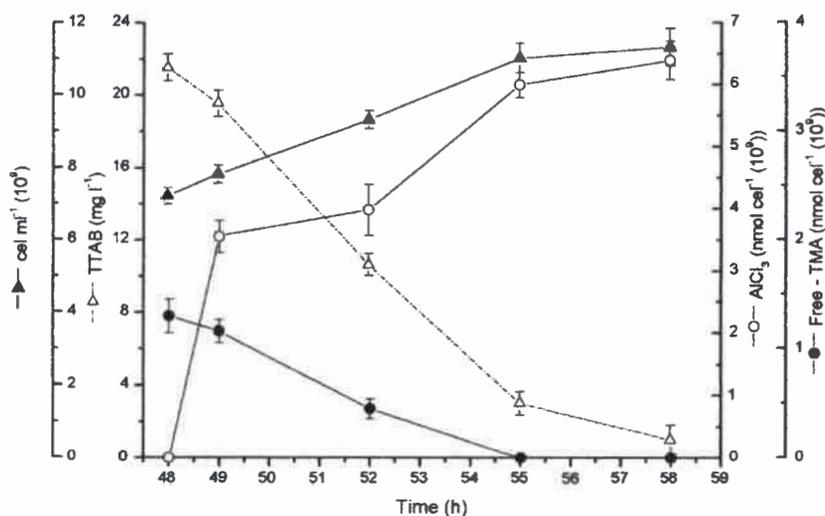


Fig. 2 Growth (▲) and TTAB consumption (Δ) of *P. putida* A ATCC 12633 in HPi-BSM with 50 mg L<sup>-1</sup> TTAB as the carbon and nitrogen source. After 48 h, the culture was divided, and growth and consumption continued in the presence of AlCl<sub>3</sub> 0.1 mmol L<sup>-1</sup>. AlCl<sub>3</sub> (○) and free-TMA (●) were measured in resuspended cells. Values are the means ± SD of three independent experiments.

Thus, the utilization of Al<sub>3</sub>Cl was a good experimental approach to combat a stressful growth situation and allows the bacteria to better and more efficiently utilization TTAB. It is also possible to postulate that the intracellular increase of any substituted or non-substituted ammonium ion (e.g. alkylammonium ions, amino sugars, amino acids, phosphatidylethanolamine (PE), etc.) may be useful bacterial strategies to survive by sequestering ionic species of Al<sup>3+</sup>. Although Al<sup>3+</sup> is known to interfere with the normal functioning of most cellular systems, numerous organisms have

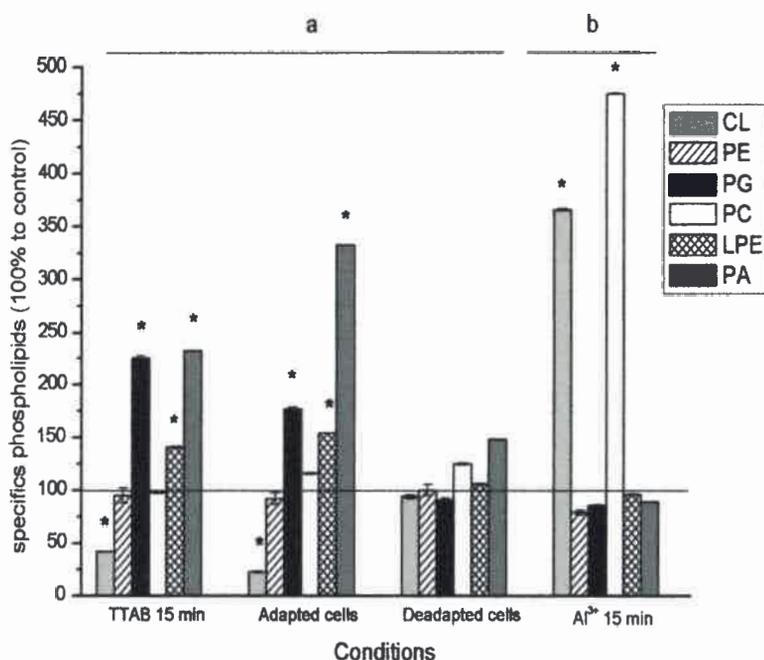


elaborate strategies to combat metal stress, such as active efflux, intracellular sequestration, volatilization, and biotransformation [25, 26]. Hence, the formation of an  $Al^{3+}$ :TMA complex can also enable bacteria to overcome the possible damage caused by aluminium [21].

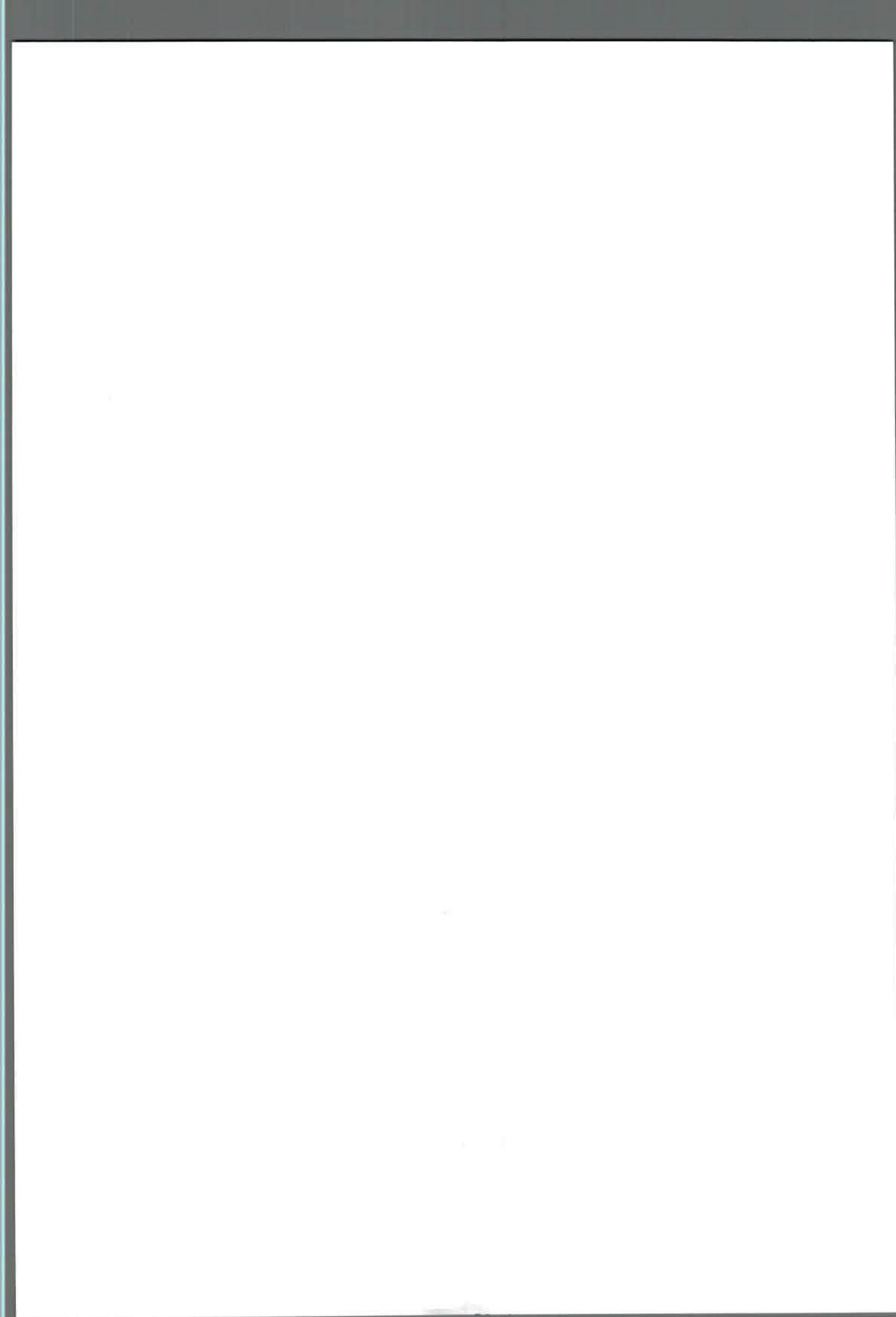
#### 2.4. Changes in phospholipid composition in *P. putida* A ATCC 12633 induced by TTAB

The mode of action of QAC against bacterial cells is thought to involve a general perturbation of lipid bilayer membranes that leads to a generalized and progressive leakage of cytoplasmic materials to the environment. Low concentrations of QAC bind firmly to anionic sites found on the membrane surface, causing cells both to lose osmoregulatory capability and to leak potassium ions and protons [27]. Intermediate levels perturb membrane-located physiologies such as respiration, solute transport, and cell wall biosynthesis [28]. The high concentrations used in many biocidal formulations however, kill cells by solubilization of the membranes to release all of the cells contents, hence their designation as biological detergents [29]. It has been demonstrated in different microorganisms that the adaptation to grow in high concentrations of QAC is followed by changes in fatty acid composition [8, 15, 30, 31], changes in the acidic phospholipid content of the membrane [32] or with the acquisition or hyperexpression of multi-drug efflux pumps [31, 33, 34].

The reversible adaptive response and the resistance of *P. putida* A ATCC 12633 to the bactericidal activity of TTAB involve an initial mechanism producing changes in the membrane involving the phospholipid composition. In *Pseudomonas* there are three main phospholipids: phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylglycerol (PG) and cardiolipin (CL) [35]. Although their ratio is influenced by the growth phase, PE is the most abundant of the total phospholipid content; PG is most abundant in cells in the logarithmic phase, whereas CL accumulates in stationary-phase cells [36, 37]. In the absence of TTAB, the phospholipid composition of *P. putida* A ATCC 12633 was similar to that described for other fluorescent *Pseudomonas* cultivated in non-stressed conditions, such as *P. aeruginosa* [38]; *P. putida* DOT-T1 [36]; *P. putida* Idaho (solvent-tolerant) and *P. putida* MW1200 (solvent-sensitive) [39]. In the long-term response of *P. putida* A ATCC 12633 to TTAB and in TTAB-adapted bacteria, phosphatidic acid (PA) and PG increased and CL decreased. The changes in adapted cells reverted after two subcultures without the biocide (Figure 3). Since in the presence of the biocide PG and PA showed the greatest changes with respect to non-treated cells, it is possible that these phospholipids, by their anionic characteristics, were initially and consecutively damaged by TTAB and need to be replaced more rapidly. Although at present how these changes are interrelated has not been studied because the amount of CL decreases, it is possible that the turnover of CL might be an efficient method to replenish PG and PA pools, through the action of a phospholipase-hydrolyzing CL, such as the phospholipase D enzyme present in Gram-negative bacteria, such as *E. coli*, *Pr. vulgaris*, and *P. aeruginosa* [40]. Alterations in the membrane could activate this enzyme, resulting in the release of PA and PG, which would maintain the cell envelope integrity. Independent of the phospholipases acting on different phospholipids species, it is clear that the major bacterial response in TTAB-containing media is to produce a highly negatively-charged membrane, exemplified here as an increase in the anionic phospholipids, PA and PG, principally to neutralize the high positive charge density given for the ammonium quaternary moiety from TTAB [17, 41].



**Fig. 3** Effect of TTAB and  $Al^{3+}$  on phospholipid composition of *P. putida* ATCC 12633. TTAB 15 min: Cells grown with glucose and  $NH_4Cl$  and exposed to TTAB for 15 min. Adapted cells: Cultures grown with glucose and  $NH_4Cl$  containing gradually increasing concentrations of TTAB (280 mg  $l^{-1}$ ). De-adapted cells: Adapted cells were subcultivated twice without TTAB.  $Al^{3+}$  15 min: Cultures grown with TTAB and exposed to  $AlCl_3$  for 15 min. Results are expressed as percentages of the specific PL compared to 100% content of the PL in control: a) cells grown with glucose/ $NH_4Cl$  and b) cells grown with TTAB. Values are the means  $\pm$  SD of three independent experiments. \* Significantly different from the values obtained in control conditions ( $p < 0,005$ ).



### 2.5. Physiological role of phosphatidylcholine in the *P. putida* A ATCC 12633 response to TTAB and Al<sup>3+</sup>

The Al<sup>3+</sup> in the membrane can be visualized using morin, which becomes fluorescent when it reacts with aluminium. In *P. putida* A ATCC 12633 exposed to Al<sup>3+</sup>, a high level of fluorescence intensity was visualized in the cell membranes, consistent with the presence of more Al<sup>3+</sup> content [41]. In cells grown with TTAB and exposed to Al<sup>3+</sup>, an increase of CL and phosphatidylcholine (PC) (3-4 fold) was detected (Figure 3) with respect to cells grown without Al<sup>3+</sup>, but the molar ratio of PC/PE, which suggests a transitory change in the membrane fluidity [42, 43], was similar for both conditions. Consequently, cells adapt to external stimuli by altering their lipid composition, such that the bilayer fluidity remains relatively constant and maintains cellular homeostasis.

Because the PC was always modified in the presence of Al<sup>3+</sup> and Al<sup>3+</sup> binds to the phosphate group of PC in multilamellar vesicles [44, 45], we propose a physiological role for PC as a temporary reservoir of available Al<sup>3+</sup> through the formation of Al<sup>3+</sup>:PC complexes. Consequently, these complexes are utilized as a reservoir of Al<sup>3+</sup> in the membrane, and when *P. putida* cells grown with TTAB in the presence of Al<sup>3+</sup>, the bacteria can obtain the ion to reduce the TMA accumulated inside the cell, through the formation of the Al<sup>3+</sup>:TMA complex [21], in concordance with the total degradation of TTAB [41].

### 3. Biodegradation of TTAB by *P. putida* ATCC 12633

It has been shown that QAC biodegradation may occur through different pathways [4, 10], among others, one of these pathways is N-dealkylation, which involves monooxygenase activity with the production of TMA and an alkyl residue [10, 46]. When *P. putida* A ATCC 12633 grown with TTAB induces NADH or NAD(P)H-dependent TTAB monooxygenase activity, TMA and tetradecanoic acid is produced and is responsible for the first step in the degradation of this QAC [21]. Assays of monooxygenase activity are performed using a GC-MS method [10, 21, 46], and, although this method is appropriate, it is time-consuming and tedious, particularly in studies where numerous samples need to be tested. To overcome these limitations, we developed a simple fluorescent method to determine TTAB monooxygenase activity by measuring the formation of TMA with the use of the morin reagent and the addition of Al<sup>3+</sup>. The method is based on the fluorescence quenching of the Al<sup>3+</sup>:morin complex by the formed TMA [47]. The activity of the enzyme and its kinetic behaviour, as determined by these two quantitative methods, GC-MS and the fluorescence assay, showed that TTAB monooxygenase has an activity of 4.9 nmol min<sup>-1</sup> mg prot<sup>-1</sup> and an allosteric behaviour with K<sub>0.5</sub> and napp (apparent Hill coefficient) values of 4.41 x 10<sup>-4</sup> M and 2.35, respectively. Also, the enzyme was inhibited by the production of TMA, but this inhibition was avoided by the presence of AlCl<sub>3</sub> [47].

As shown the Figure 4, in *P. putida* A ATCC 12633 the N-dealkylation of TTAB catalyzed by TTAB monooxygenase activity resulted in the formation of tetradecylalkanal and TMA. Tetradecylalkanal is oxidized to tetradecanoic acid and metabolized by β-oxidation, a metabolic pathway present in *P. putida* [48]. The second product, TMA, is, in part, accumulated inside the cell [47] or metabolized to NH<sub>3</sub> through oxidation and demethylation [49]. In the latter case, TMA is oxidized to TMA N-oxide through TMA monooxygenase activity, NADH or NADPH-dependent, with an activity of 0.084 nmol min<sup>-1</sup> mg prot<sup>-1</sup> (measured with the same extracts as for determination of TTAB monooxygenase activity). The product, TMA N-oxide, is demethylated to dimethylamine and methanal by a TMA N-oxide demethylase, whose activity is also NADPH-dependent. Dimethylamine monooxygenase oxidizes dimethylamine producing monomethylamine and methanal, and monomethylamine monooxygenase then produces methanal and ammonia [50].

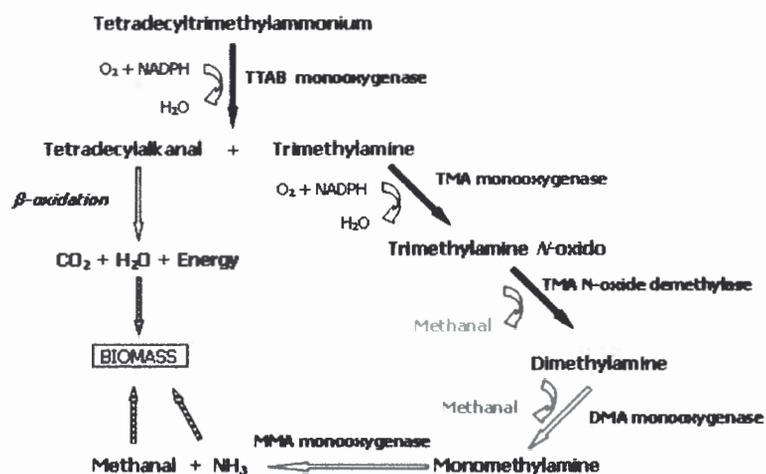


Fig. 4 Complete pathway of mineralization of TTAB by *P. putida* A ATCC 12633.

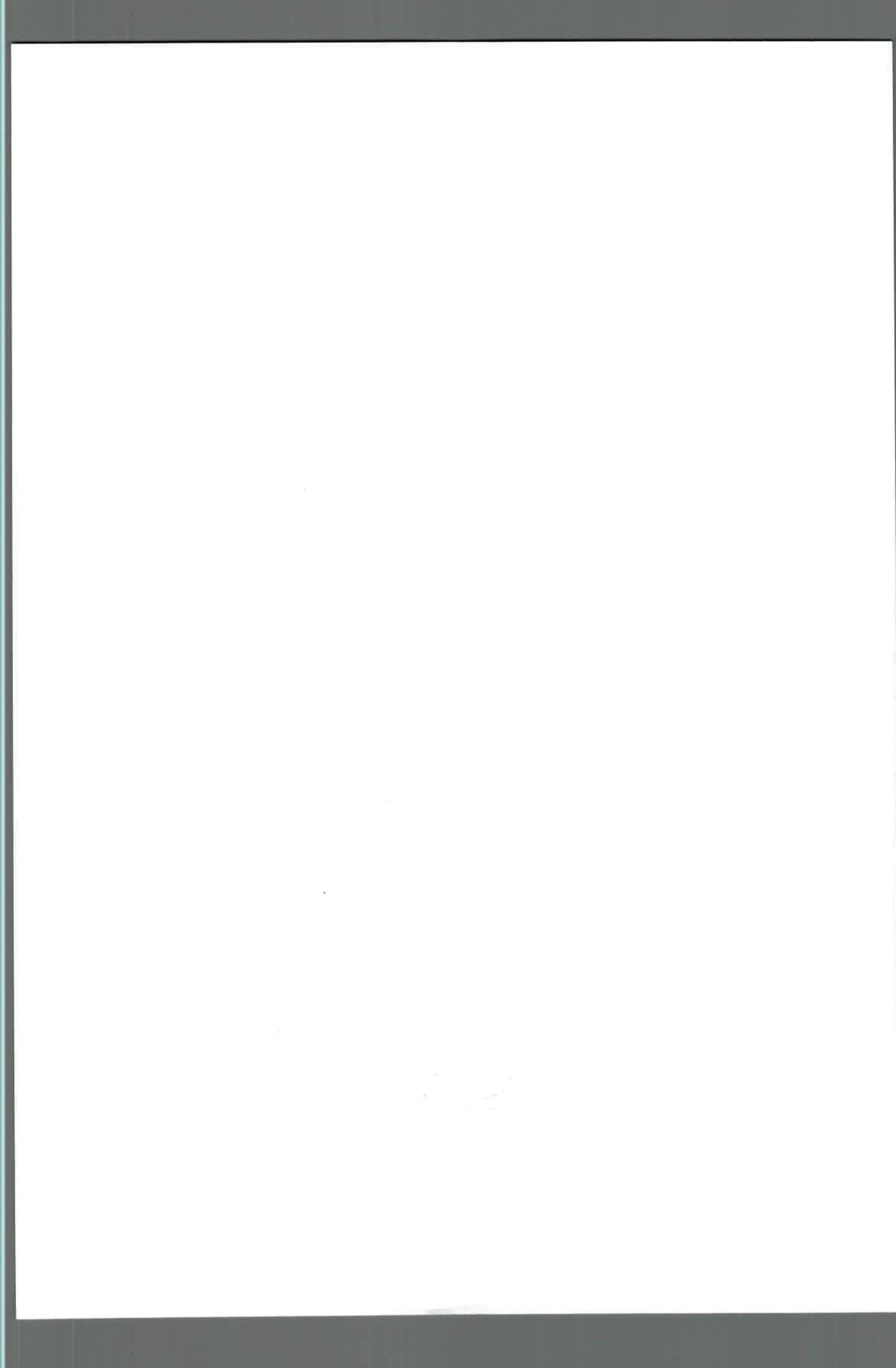


On the other hand, based on these results, we consider that the different catalytic activities for TMA monoxygenase and TTAB monoxygenase are responsible of the accumulation of TMA inside the cells when *P. putida* is grown with TTAB [49]. In this sense, the low catalytic activities of TMA monoxygenase ( $0.084 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg prot}^{-1}$ ) were not sufficient to completely metabolize the TMA produced in the cell by TTAB monoxygenase ( $4.9 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg prot}^{-1}$ ) and, therefore, TMA is accumulated in the cell in sufficient quantities to inhibit TTAB monoxygenase and, consequently, the growth. This effect can be avoided by the addition of  $\text{Al}^{3+}$ , with the consequential formation of the  $\text{Al}^{3+}$ :TMA complexes [49]. Thus, *P. putida* A ATCC 12633, is an organism capable of completely mineralizing TTAB in the presence of  $\text{Al}^{3+}$  and offers promising opportunities for the efficient biological removal of this or similar quaternary ammoniums.

**Acknowledgments** Works related to this paper were supported by grants from Secretaría de Ciencia y Técnica-UNRC, MCyT Córdoba, CONICET and FONCYT, Argentina. GIL is a Career Member of CONICET. ASL and PSB are grateful for fellowships from CONICET-MCyT Córdoba. We thank Dr. Carlos E. Domenech at UNRC, Argentina, for his valuable comments on this work.

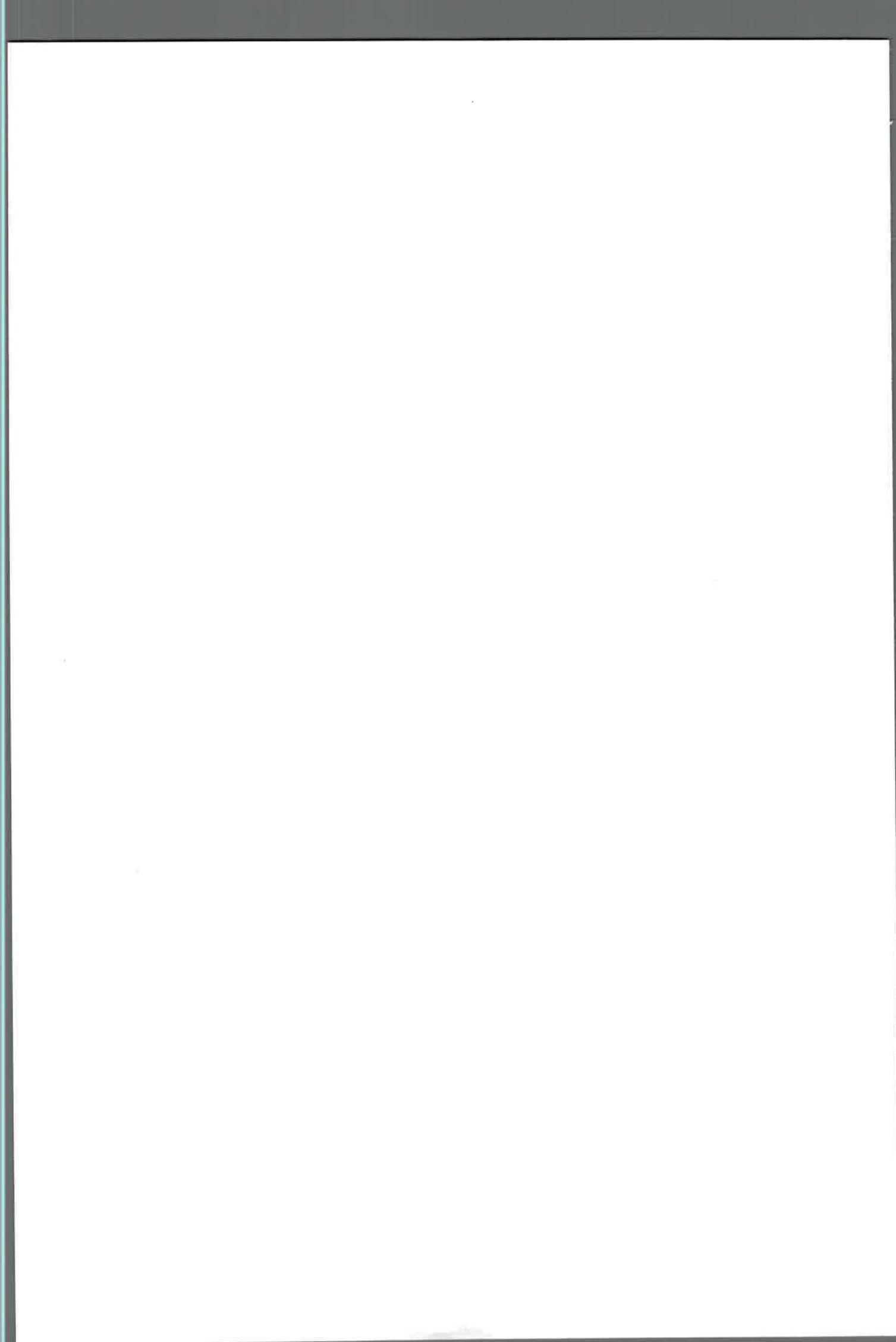
## References

- [1] Holah JT, Taylor JH, Dawson DJ, Hall KE. Biocide use in the food industry and the disinfectant resistance of persistent strains of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. *Symposium series J Appl Microbiol.* 2002;92:111-120.
- [2] Cross J. Introduction to cationic surfactants. In: Jungermann E, ed. *Cationic Surfactants* New York, NY:Marcel Dekker; 1994:6-5.
- [3] van Ginkel CG. Relations between the structure of quaternary alkyl ammonium salts and their biodegradability. *Chemosphere.* 1991;23:281-289.
- [4] Nishiyama N, Toshima Y, Ikeda Y. Biodegradation of alkyltrimethylammonium salts in activated sludge. *Chemosphere.* 1995;30:593-603.
- [5] Lopes JA. Evaluation of dairy plant sanitizers against *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes*. *J Dairy Sci.* 1986;69:2791-2796.
- [6] Macdonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1999;12:47-179.
- [7] Russell AD, Hammond SA, Morgan, JR. Bacterial resistance to antiseptics and disinfectants. *J of Hospital Infection.* 1986;7:213-225.
- [8] Jones MV, Herd TM, Christie HJ. Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to amphoteric and quaternary ammonium biocides. *Microbios.* 1989;9:255-264.
- [9] Langsrud S, Sundheim G. Factors contributing to the survival of poultry associated *Pseudomonas* spp. exposed to a quaternary ammonium compounds. *J Appl Microbiol.* 1997;82:705-712.
- [10] van Ginkel CG, van Dijk JB, Kroon AGM. Metabolism of hexadecyltrimethylammonium chloride in *Pseudomonas* Strain B1. *Appl Environ Microbiol.* 1992;58:3083-3087.
- [11] Nishihara T, Okamoto T, Nishihara N. Biodegradation of didecyltrimethylammonium chloride by *Pseudomonas fluorescens* TN4 isolated from activated sludge. *J Appl Microbiol.* 2000;88:641-647.
- [12] Palleroni NJ. Taxonomy and Identification. In: Galli E, Silver S, Witholt B. eds. *Pseudomonas, Molecular Biology and Biotechnology.* Washington, D.C: American Society for Microbiology; 1992:105-115.
- [13] Lucchesi GI, Lisa AT, Domenech CE. Choline and betaine as inducer agents of *Pseudomonas aeruginosa* phospholipase C activity in high phosphate medium. *FEMS Microbiol Lett.* 1989;57:335-338.
- [14] Gilbert P, McBain AJ. Potential impact of increased use of biocides in consumer products on prevalence of antibiotic resistance. *Clin Microbiol Rev.* 2003;16:189-208.
- [15] Mechín L, Dubois-Brissonnet F, Heyd B, Leveau LY. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 to didecyltrimethylammonium bromide induces changes in membrane fatty acid composition and in resistance of cells. *J Appl Microbiol.* 1999;86:859-866.
- [16] Langsrud S, Sundheim G, Borgmann-Strahsen R. Intrinsic and acquired resistance to quaternary ammonium compounds in food-related *Pseudomonas* spp. *J Appl Microbiol.* 2003;95:874-882.
- [17] Boeris PS, Domenech CE, Lucchesi GI. Modification of phospholipid composition in *Pseudomonas putida* A ATCC 12633 induced by contact with tetradecyltrimethylammonium. *J Appl Microbiol.* 2007;4:1048-1054.
- [18] Heizel M. Phenomena of biocide resistance in microorganisms. *Int Biodeterior Biodegradation.* 1998;41:225-234.
- [19] Cross JT. A critical review of techniques for the identification and determination of cationic surfactants. In: Jungermann E, ed. *Cationic Surfactants.* New York, NY:Marcel Dekker; 1970:423-449.
- [20] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-254.
- [21] Liffourrena AS, López FG, Salvano MA, Domenech CE, Lucchesi, GI. Biodegradation of tetradecyltrimethylammonium in *Pseudomonas putida* A ATCC 12633 improved by aluminum ions. *J Appl Microbiol.* 2008;2:396-402.
- [22] Lian HZ, Kang IF, Yasin A, Bi, S, Shao DL, Chen YJ, Dai LM, Tian LC. Determination of aluminium in environmental and biological samples by reversed-phase high-performance liquid chromatography via pre-column complexation with morin. *J Chromatogr A.* 2003;993:179-185.
- [23] Vitorello VA, Haug A. An aluminum-morin fluorescence assay for the visualization and determination of aluminum in cultured cells of *Nicotiana tabacum* L. cv. BY-2. *Plant Sci.* 1997;122:35-42.
- [24] Eticha D, Stass A, Horst WJ. Localization of aluminium in the maize root apex: can morin detect cell wall-bound aluminium? *J Exp Bot.* 2005;56:1351-1357.



- [25] Ledin M. Accumulation of metals by microorganisms. Processes and importance for soil systems. *Earth-Science Reviews*. 2000;51:1-31.
- [26] Hamel R, Appana VD. Aluminum detoxification in *Pseudomonas fluorescens* is mediated by oxalate and phosphatidylethanolamine. *Biochim Biophys Acta*. 2003;1619:70-76.
- [27] Lambert PA, Hammond SM. Potassium fluxes, first indications of membrane damage in microorganisms. *Biochem Biophys Acta*. 1973;54:796-799.
- [28] Salt WD, Wiseman D. Relationship between uptake of cetyltri-methylammonium bromide by *Escherichia coli* and its effects on cell growth and viability. *J Pharm Pharmacol*. 1970;22:261-264.
- [29] Salton MRJ. Lytic agents, cell permeability and monolayer permeability. *J Gen Physiology*. 1968;52:227-252.
- [30] Loughlin MF, Jones MV, Lambert PA. *Pseudomonas aeruginosa* adapted to benzalkonium chloride show resistance to other membrane-active agents but not clinically relevant antibiotics. *J Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46:631-639.
- [31] To NS, Favrin S, Romanova N, Griffiths MW. Post adaptational resistance to benzalkonium chloride and subsequent physicochemical modifications of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol*. 2002;68:5258-5464.
- [32] Nikaïdo H. Prevention of drug access to bacterial target: permeability barriers and active efflux. *Science*. 1994;264:382-388.
- [33] Aase B, Sundheim G, Langsrud S, Rorvik LV. Occurrence of and a possible mechanism for resistance to a quaternary ammonium compounds in *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol*. 2000;62:57-63.
- [34] Gilbert P, Moore LE. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *J Appl Microbiol*. 2005;99:703-715.
- [35] Schweizer HP. Fatty acid biosynthesis and biologically significant acyl transfer reactions in Pseudomonads In: Ramos JL, ed. *Pseudomonas*. London, UK: Kluwer; 2004:83-110.
- [36] Ramos JL, Duque E, Rodríguez-Herva JJ, Godoy P, Haïdour A, Reyes F, Fernández-Barrero A. Mechanisms for solvent tolerance in bacteria. *J Biol Chem*. 1997;272:3887-3890.
- [37] Bernal P, Muñoz-Rojas J, Hurtado A, Ramos JL, Segura AA. *Pseudomonas putida* cardiolipin synthase mutant exhibits increased sensitivity to drugs related to transport functionality. *Environ Microbiol*. 2007;9:1135-1145.
- [38] Albelo ST, Domenech CE. Carbons from choline present in the phospholipids of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett*. 1997;156:271-274.
- [39] Pinkart HC, White DC. Phospholipid biosynthesis and solvent tolerance in *Pseudomonas putida* strains. *J Bacteriol*. 1997;176:4219-4226.
- [40] Cole R, Proulx P. Phospholipase D activity of Gram-negative bacteria. *J Bacteriol*. 1975;124:1148-1152.
- [41] Boeris PS, Liffourrena AS, Salvano MA, Lucchesi GI. Physiological role of phosphatidylcholine in the *Ps. putida* A ATCC 12633 response to tetradecyltrimethylammonium bromide and aluminum. *Lett Appl Microbiol*. 2009;49:491-496.
- [42] Senault C, Yazbeck J, Goubern M, Porter R, Vincent M, Gallay M. Relation between membrane phospholipid composition, fluidity and function in mitochondria of rat brown adipose tissue: effect of thermal adaptation and essential fatty acid deficiency. *Biochim Biophys Acta*. 1990;1023:283-289.
- [43] Bangur CS, Howland JL, Katyare SS. Thyroid hormone treatment alters phospholipid composition and membrane fluidity of the rat brain mitochondria. *Biochem J*. 1995;305:29-32.
- [44] MacKinnon N, Crowell KJ, Udit, AK, Macdonald PM. Aluminum binding to phosphatidylcholine membranes:  $^{27}\text{Al}$  and  $^{31}\text{P}$  NMR spectroscopic studies. *Chem and Phys Lipids*. 2004;132:23-36.
- [45] MacKinnon N, Ridgway J, Crowell KJ, Macdonald PM. Aluminum binding to phosphatidylcholine lipid bilayer membranes: aluminum exchange lifetimes from  $^{31}\text{P}$  NMR spectroscopy". *Chem Phys Lipids*. 2006;139: 85-95.
- [46] Takenaka S, Tonoki T, Taira K, Murakami S, Aoki K. Adaptation of *Pseudomonas* sp. Strain 7-6 to Quaternary Ammonium Compounds and Their Degradation via Dual Pathways. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73:1797-1802.
- [47] Liffourrena AS, Boeris PS, Salvano MA, Lucchesi GI. A fluorescence assay for tetradecyltrimethylammonium mono-oxygenase activity that catalyzes the cleavage of the C-N bond with the production of trimethylamine. *Anal Biochem*. 2009;384:343-347.
- [48] de Waard P, van der Wal H, Huijberts GNM, Eggink G. Heteronuclear NMR analysis of unsaturated fatty acids in poly(3-hydroxyalkanoates). Study of  $\beta$ -oxidation in *Pseudomonas putida*. *J Biol Chem*. 1993;268: 315-319.
- [49] Liffourrena AS, Salvano MA, Lucchesi GI. *Pseudomonas putida* A ATCC 12633 oxidizes trimethylamine aerobically via two different pathways. *Arch Microbiol*. 2010;192:471-476.
- [50] Kim SG, Bae HS, Lee ST. A novel denitrifying bacterial isolate that degrades trimethylamine both aerobically and anaerobically via two different pathways. *Arch Microbiol*. 2001;176:271-277.





71253

U.N.R.C.  
Biblioteca Central



71253