



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO
Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales
Departamento de Biología Molecular

Cambios en la composición lipídica de *Pseudomonas putida* A (ATCC 12633) inducidos por compuestos de amonio cuaternario sintéticos y su relación con la capacidad de biodegradar estos compuestos

Tesis Doctoral

Gastón A. López

Abril, 2016

A mi hija, Guillermina

A mi tío, Arturo

A mis padres, Estela y Juan



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO
Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales
Departamento de Biología Molecular

**Cambios en la composición lipídica de *Pseudomonas putida* A
(ATCC 12633) inducidos por compuestos de amonio cuaternario
sintéticos y su relación con la capacidad de biodegradar estos
compuestos**

Tesis Doctoral

Gastón A. López

Abril, 2016

Trabajo presentado por el microbiólogo Gastón A. López para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas por la Universidad Nacional de Río Cuarto.

Directora de la Tesis Doctoral:

Dra. Gloria I. Lucchesi _____

Miembros del Jurado:

Dra. Nancy López, UBA. _____

Dra. Susana Genti de Raimondi, UNC. _____

Dr. Edgardo Jofré, UNRC. _____

Río Cuarto, 15 de abril de 2016

Si bien la realización de este trabajo de Tesis ha requerido de mucho esfuerzo y dedicación de mi parte durante estos cinco años, la finalización del mismo no hubiese sido posible sin la cooperación de todas y cada una de las personas que cito a continuación, a las cuales quiero desearles mis más sinceros agradecimientos.

A mi hija Guillermina, por ser desde hace ya casi cinco años, el motor que me da fuerzas día a día, por su inocencia y por el amor que me brinda cotidianamente.

A mi Tío Arturo, porque a pesar de ya no estar físicamente, compartió conmigo los primeros años de este doctorado, apoyándome siempre en todo y no escatimando nunca en las demostraciones de alegría y orgullo que le generaban mis logros.

A mis padres, Juan y Estela, pilares fundamentales a lo largo de mi vida, que en todo momento me permitieron elegir mi camino con libertad y me brindaron su apoyo incondicional.

A Ester, Mary y Pety, por ser junto a mis padres las personas que más me apoyaron, me contuvieron y estuvieron siempre presentes a lo largo de mi vida.

A Gloria, por darme la posibilidad de formar parte de su grupo de trabajo, para la realización de mi tesina de grado, allá por el año 2008 y luego haber aceptado ser la directora de esta Tesis de Doctorado. Gracias por tus consejos útiles, por tus valiosos aportes en la discusión e interpretación de los resultados presentados en esta Tesis, por tu predisposición para ayudarme con la escritura (que evidentemente no es mi fuerte) y por contagiarme constantemente con tu actitud positiva

A la Dra. Nancy López, Dra Susana Genti de Raimondi y al Dr Edgardo Jofré, por aceptar ser jurados de mi Tesis Doctoral, por los valiosos aportes que cada una me brindó, por cumplir en tiempo y forma con las correcciones de los informes anuales y del borrador de Tesis y por la excelente y afectuosa predisposición para conmigo.

A mis compañeros de "Lab 5", Loli, Liffu, Fer y Romi, por haberme brindado su ayuda para dar los primeros pasos dentro del Lab., por sus valiosos aportes para conmigo tanto en la parte metodológica, como así también en la interpretación y discusión de resultados, por crear un ambiente de trabajo excelente y por tantas horas inolvidables compartidas en Lab, MUCHAS GRACIAS!!!

A mis compañeros del Dpto de Biología Molecular, Tincho, Guati, Lucas, Fernando, Emiliano, Cristhian, Christopher, Walter, por haberme brindado su compañía incondicional durante esta etapa, por los “asesoramientos técnicos” brindados siempre que fue necesario, por las horas y horas de mates compartidas y por los tremendos asados en el bajo los viernes al medio día. Gracias por todo muchachos!!!

A todas aquellas personas del Departamento de Biología Molecular que colaboraron, en mayor o menor medida, en la realización de este trabajo y por haber compartido conmigo todo este tiempo, simplemente me queda decirles MUCHISIMAS GRACIAS...

1.- Resumen/Abstract	1
2.- Introducción	3
2.1.- Características generales del Género <i>Pseudomonas</i>	3
2.2.- Contaminación ambiental. Biorremediación.....	4
2.3.- Contaminantes químicos. Compuestos de amonio cuaternario sintéticos (QACs).....	5
2.3.1.- Efecto bactericida y mecanismos de resistencia bacteriana a QACs.....	7
2.4.- Biosíntesis y funciones generales de los fosfolípidos bacterianos.....	9
2.4.1.- Papel de los fosfolípidos en la resistencia microbiana a condiciones de estrés ambiental.....	11
2.4.2.- Cardiolipina como componente esencial de membranas bacterianas.....	13
2.5.- Antecedentes específicos e Hipótesis.....	16
2.6.-. Objetivo general.....	17
2.6.1.- Objetivos específicos.....	17
3. Materiales y Métodos	19
3.1.- Medios de cultivo.....	19
3.2.- Conservación y mantenimiento de las cepas.....	19
3.3.- Microorganismos y condiciones de cultivo.....	19
3.4.- Manipulación de ADN.....	21
3.5.- Clonado y secuenciamiento de genes de interés de <i>P. putida</i> A (ATCC 12633).....	23
3.5.1- Amplificación de genes homólogos involucrados en la síntesis de CL.....	23
3.5.2.- Amplificación de los genes de resistencia a Gm (<i>aacC1</i>) y Km (<i>aph(3')-IIa</i>).....	23
3.6.- Mutagénesis de genes homólogos a <i>cls</i> y <i>cls2</i> en <i>P. putida</i> A (ATCC 12633).....	24
3.6.1.- Obtención de cepas mutantes de <i>P. putida</i> A (ATCC 12633) afectadas en el gen homólogo a <i>cls</i> (<i>pp5364</i>).....	24
3.6.2.- Obtención de cepas mutantes de <i>P. putida</i> A (ATCC 12633) afectadas en el gen homólogo a <i>cls2</i> (<i>pp3264</i>).....	25
3.6.3.- Obtención de una cepa doble mutante de <i>P. putida</i> A (ATCC 12633) afectada en los genes homólogos a <i>cls</i> (<i>pp5364</i>) y <i>cls2</i> (<i>pp3264</i>).....	26
3.7.- Electroporación de plásmidos en <i>P. putida</i> A (ATCC 12633) y selección de dobles recombinantes.....	26
3.8.- Confirmación de la inactivación de genes <i>cls</i> en cepas mutantes.....	28
3.8.1.- Confirmación de la mutación delecional del gen homólogo a <i>cls</i> (<i>pp5364</i>).....	28
3.8.2.- Confirmación de la mutación insercional en el gen homólogo al <i>cls2</i> (<i>pp3664</i>).....	29
3.9.- Complementación de <i>P. putida</i> RH02.....	29
3.10.- Análisis bioinformáticos de secuencias.....	30
3.11.- Sobreexpresión de <i>Cl</i> s y <i>Cl</i> s2 de <i>P. putida</i> A (ATCC 12633).....	30
3.12.- Exposición de células de <i>P. putida</i> y sus mutantes isogénicas a TDTMA durante cortos periodos de tiempo.....	31
3.13.- Recuento de células viables.....	32
3.14.- Ensayo de viabilidad en placa.....	32
3.15.- Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	32
3.16.- Tinción de células con 10 N-nonil naranja de acridina (NAO).....	33
3.17.- Obtención de células marcadas con TopFluor-CL.....	33
3.18.- Análisis de fosfolípidos (PL).....	34

3.18.1.- Extracción de fosfolípidos.....	34
3.18.2.- Cromatografía en placa delgada (TLC).....	34
3.18.3.- Revelado de cromatogramas.....	35
3.18.4.- Cuantificación de fosfolípidos.....	35
3.18.5.- Obtención, identificación y cuantificación de PL marcados radiactivamente.....	36
3.19.- Determinación del perfil de ácidos grasos de <i>P. putida</i> (A ATCC 12633) y <i>P. putida</i> RH02.....	36
3.20.- Determinación de la fluidez de membrana.....	37
3.21.- Determinación de proteínas.....	38
3.22.- Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	38
3.22.1.- Tinción de proteínas en geles.....	38
3.23.- Obtención de fuentes enzimáticas.....	39
3.24.- Obtención de [¹⁴ C]-PE.....	39
3.25.- Determinación de actividad cardioplipina sintasa (Cls).....	40
3.26.- Determinación de actividad PLD.....	40
4. Resultados y Discusión	
4.1.- CAPITULO I: Síntesis de cardioplipina en células de <i>P. putida</i> A (ATCC 12633): Aspectos moleculares y bioquímicos	42
4.1.1.- Identificación de genes involucrados en la biosíntesis de CL de <i>P. putida</i> A (ATCC 12633).....	43
4.1.2.- Obtención de cepas mutantes de <i>P. putida</i> A (ATCC 12633) afectadas en <i>cls</i> y/o <i>cls2</i>	45
4.1.2.1.- Inactivación del gen homólogo <i>cls</i> (<i>pp5364</i>) de <i>P. putida</i> A (ATCC 2633).....	45
4.1.2.2.- Inactivación del gen homólogo a <i>cls2</i> (<i>pp3264</i>) de <i>P. putida</i> A (ATCC 12633).....	46
4.1.2.3.- Obtención de una cepa doble mutante de <i>P. putida</i> A (ATCC12633) afectada en los genes homólogos a <i>cls</i> (<i>pp5364</i>) y <i>cls2</i> (<i>pp3264</i>).....	46
4.1.3.- Caracterización fisiológica de <i>P. putida</i> GL01, <i>P. putida</i> RH01 y <i>P. putida</i> RH02.....	47
4.1.3.1.- Crecimiento de <i>P. putida</i> A (ATCC 12633) y sus mutantes isogénicas en diferentes condiciones nutricionales.....	47
4.1.3.2.- Distribución porcentual de los fosfolípidos de <i>P. putida</i> A (ATCC 12633) y de sus mutantes isogénicas crecidas en condiciones no estresantes de cultivo.....	49
4.1.3.3.- Microscopia electrónica de transmisión de <i>P. putida</i> RH02.....	52
4.1.3.4.- Composición fosfolipídica de <i>P. putida</i> A (ATCC 12633) y sus mutantes isogénicas en diferentes etapas de crecimiento.....	54
4.1.4.- Determinación de la actividad Cls en <i>P. putida</i> A (ATCC 12633) y sus mutantes isogénicas utilizando PG como sustrato.....	56
4.1.5.- Complementación de <i>P. putida</i> RH02.....	57
4.1.6.- Búsqueda en <i>P. putida</i> KT2440 de ORFs homólogos a ClsC (NP_415564) de <i>E.coli</i> K-12.....	60
4.1.7.- Determinación de la actividad Cls en <i>P. putida</i> A (ATCC 12633) y <i>P. putida</i> RH02 utilizando PE y PG como sustrato.....	63
4.1.8.- Sobreexpresión de Cls (KF835427) y Cls2 (KF835428) de <i>P. putida</i> A (ATCC12633).....	64
4.2. CAPITULO II: Respuesta de <i>P. putida</i> A (ATCC 12633) frente al estrés ocasionado por TDTMA: cambios en la composición lipídica	68
4.2.1.- Distribución porcentual de los fosfolípidos en <i>P. putida</i> GL01, <i>P. putida</i> RH01 y <i>P. putida</i> RH02 expuestas a condiciones de estrés por TDTMA.....	68
4.2.2.- Composición de ácidos grasos de <i>P. putida</i> A (ATCC 12633) y <i>P. putida</i> RH02 expuestas o no a TDTMA.....	69
4.2.3.- Determinación de actividad PLD en <i>P. putida</i> A (ATCC12633).....	76

4.2.3.- Acción bactericida del TDTMA sobre células de <i>P. putida</i> A (ATCC 12633) y su doble mutante <i>P. putida</i> RH02.....	79
5. Conclusiones.....	82
6. Perspectivas.....	84
7. Bibliografía.....	85
8. Trabajos científicos publicados.....	92

Índice de Tablas y Figuras.

Introducción

Figura 1: Clasificación general de los detergentes sintéticos.....	6
Figura 2: Representación esquemática del mecanismo de acción bactericida de los QACs sobre la membrana plasmática.....	8
Figura 3: Vía de biosíntesis de PL en bacterias.....	9
Figura 4: Estructura química de CL. Modelo esquemático de la distribución de CL en una bicapa formada por PC y 20% de CL.....	15

Materiales y Métodos

Tabla 1: Cepas bacterianas y plásmidos usados en este estudio.....	20
Tabla 2: Oligonucleótidos usados en este estudio.....	22
Figura 5: Esquema representativo del genoma de <i>P. putida</i> y de su mutante isogénica: gen homólogo a <i>cls</i> en la cepa salvaje y la posterior inserción del constructo llevando el gen de resistencia a Gm.....	25
Figura 6: Esquema representativo del genoma de <i>P. putida</i> y de su mutante isogénica: gen homólogo a <i>cls2</i> en la cepa salvaje y la posterior inserción del constructo llevando el gen de resistencia a Km.....	26
Figura 7: Representación esquemática del mecanismo de recombinación homóloga entre el genoma de <i>P. putida</i> A (ATCC12633) y del vector suicida pKNG101 conteniendo el gen de interés interrumpido.....	28
Figura 8: Esquema del sistema de expresión usado, pET15b/pET28a- <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	31
Tabla 3: Composición de geles de poliacrilamida utilizados en SDS-PAGE.....	38
Tabla 4: Composición de soluciones de tinte y destinte para geles de poliacrilamida.....	39

Resultados y Discusión

Capítulo I: Síntesis de cardiolipina en células de *P. putida* A (ATCC 12633): Aspectos moleculares y bioquímicos

Figura 9: Secuencias completas de los genes <i>cls</i> y <i>cls2</i> de <i>P. putida</i> KT 2440.....	44
Figura 10: Productos de amplificación obtenidos a partir del genoma de <i>P. putida</i> A (ATCC 12633) y <i>P. putida</i> GL01.....	45
Figura 11: Productos de amplificación obtenidos a partir del genoma de <i>P. putida</i> A (ATCC12633) y <i>P. putida</i> RH01.....	46
Figura 12: Crecimiento de <i>P. putida</i> A (ATCC 12633), <i>P. putida</i> GL01, <i>P. putida</i> RH01 y de <i>P. putida</i> RH02 en medio rico LB o en HPI-BSM con glucosa y NH ₄ Cl.....	47
Figura 13: Composición de PL de <i>P. putida</i> salvaje y mutantes crecidas en medio HPI-BSM-Glucosa/NH ₄ Cl.....	50
Figura 14: Visualización de CL en membranas. <i>P. putida</i> A (ATCC 12633) y sus mutantes isogénicas.....	51
Figura 15: Microscopía electrónica de transmisión de células de <i>P. putida</i> A (ATCC 12633) y <i>P. putida</i> RH02.....	53

Tabla 5: Composición fosfolipídica de <i>P. putida</i> A (ATCC12633), <i>P. putida</i> GL01, <i>P. putida</i> RH01 y <i>P. putida</i> RH02 en diferentes etapas de crecimiento.....	54
Figura 16: Determinación de actividad Cls a partir de extractos libres de células de <i>P. putida</i> A (ATCC 12633) y sus mutantes derivadas.....	56
Figura 17: Determinación de actividad Cls con extractos libres de células de <i>P. putida</i> RH02, <i>P. putida</i> RH02/pGL08, <i>P. putida</i> RH02/pGL09 y <i>P. putida</i> A (ATCC 12633).....	58
Figura 18: Visualización de CL en membrana: <i>P. putida</i> RH02/pGL08, <i>P. putida</i> RH02/pGL09 y <i>P. putida</i> RH02.....	59
Tabla 6: ORFs de <i>P. putida</i> KT2440 homólogos a ClsC de <i>E.coli</i> K-12.....	61
Figura 19: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de diferentes ORFs de <i>P. putida</i> KT2440 homólogos a ClsC de <i>E.coli</i> K-12.....	62
Figura 20: Determinación de actividad Cls utilizando [¹⁴ C]-PE como sustrato.....	63
Figura 21: Expresión de Cls (KF835427) y Cls2 (KF835428). Cls (KF835427).....	65
CAPITULO II: Respuesta de <i>P. putida</i> A (ATCC 12633) frente al estrés ocasionado por TDTMA: cambios en la composición lipídica	
Figura 22: Composición de fosfolípidos de <i>P. putida</i> salvaje y mutantes expuestas o no a TDTMA.....	68
Tabla 7: Composición de AG de <i>P. putida</i> A ATCC 12633 y <i>P. putida</i> RH02 crecidas con fuentes preferenciales de C y N, expuestas o no a TDTMA.....	70
Figura 23: Cromatograma representativo de la composición de ácidos grasos de <i>P. putida</i> A (ATCC 12633) obtenido por GC.....	71
Figura 24: Polarización de fluorescencia de DPH en células de <i>P. putida</i> A (ATCC 12633) expuestas a TDTMA.....	73
Figura 25: Polarización de fluorescencia de DPH en células de <i>P. putida</i> RH02 expuestas a TDTMA.....	75
Figura 26: Células de <i>P. putida</i> A (ATCC1233) marcadas con TopFluor-CL.....	76
Figura 27: Determinación de actividad PLD en células de <i>P. putida</i> marcadas con TopFluor-CL expuestas durante diferentes periodos de tiempo a TDTMA.....	77
Figura 28: Determinación de actividad de PLD in vitro según Cole y Proulx, (1975) y Choi <i>et al.</i> , (2006)....	78
Tabla 8: Recuento de UFC/ml de <i>P. putida</i> A (ATCC 12633) y <i>P. putida</i> RH02 en medio LB sólido, luego del crecimiento con fuentes preferenciales de C y N, expuestas a 150µM TDTMA durante diferentes periodos de tiempo.....	79
Figura 29: Ensayo de viabilidad en placa.....	80

% p/v: porcentaje peso en volumen.

% v/v: porcentaje volumen en volumen.

μM: micromolar.

μCi: microCurie.

μF: micro Faraday.

¹⁴C: carbono radiactivo.

aacC1: gen codificante para la resistencia a Gm.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

Amp: ampicilina.

Amp^R: ampicilina resistente.

aph(3')-IIa: gen codificante para la resistencia a Km.

C: carbono.

CL: cardiolipina.

Cm: cloranfenicol.

Cm^R: cloranfenicol resistente.

CIs: cardiolipina sintasa.

cls: gen para cardiolipina sintasa.

cls2: gen para cardiolipina sintasa 2.

cm: centímetro.

DO: densidad óptica.

Gbq: Giga Beckerel.

Gm: gentamicina.

Gm^R: gentamicina resistente.

h o hs: hora u horas.

HPI-BSM: Medio salino basal de alto contenido en fosfato.

IPTG: isopropilo-β-D tiogalactosido.

Kb: kilo base/s.

Km: kanamicina.

Km^R: kanamicina resistente.

kV: kilo voltios.

l: litro.

LB: medio rico Luria-Broth.

LPE: lisofosfatidiletanolamina.

mg: miligramo.

min: minuto.

ml: mililitro.

mM: milimolar.

mmol: milimol.

N: nitrógeno.

N: normal.

NAO: 10 *N*-nonil naranja de acridina.

nCi: nanoCurie.

nm: nanómetros.

nM: nanomolar.

ORF/s u orf/s: open reading frame (marco de lectura abierto).

PA: ácido fosfatídico.

pb: pares de bases.

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.

PE: fosfatidiletanolamina.

PG: fosfatidilglicerol.

PL: fosfolípidos.

PLD: Fosfolipasa D.

QACs: compuestos de amonio cuaternario (Quaternary Ammonium Compounds).

rpm: revoluciones por minuto.

sacB: gen que codifica para la levanosacarasa.

Sac^S: sacarosa sensible.

Sac^R: sacarosa resistente.

Sm: estreptomycin.

Sm^R: estreptomycin resistente.

Sm^S: estreptomycin sensible.

TDTMA: tetradeciltrimetilamonio.

TEM: Microscopía electrónica de transmisión.

TLC: cromatografía en capa delgada.

UFC: unidades formadoras de colonias.

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

FAME: esteres metílicos de ácidos grasos

GC: cromatografía gaseosa

Cm: cloranfenicol

Cm^R: cloranfenicol resistente.

NAO: 10 *N*-nonil naranja de acridina.

AG: ácidos grasos.

DPH: 1,6-difenil-1,3,5-exatrieno.

[¹⁴C]-PE: ¹⁴C-Fosfatidiletanolamina.

NI: fosfolípidos no identificados.

Zw/An: relación fosfolípidos zwitterionicos/ fosfolípidos anicónicos.



1. - RESUMEN / ABSTRACT

Pseudomonas putida A (ATCC 12633) es un microorganismo de interés biotecnológico que utiliza el detergente catiónico Br-tetradeciltrimetilamonio (TDTMA) como fuente de carbono, nitrógeno y energía. En esta cepa bacteriana, la tolerancia y respuesta al estrés generado por la presencia del detergente en el medio involucra cambios cuantitativos en el contenido de sus fosfolípidos de membrana, con incremento de ácido fosfatídico y fosfatidilglicerol (PG) y disminución de cardiolipina (CL). Con el propósito de ampliar el conocimiento del papel que cumplen los fosfolípidos aniónicos en la respuesta bacteriana al detergente, en este trabajo se identificaron dos genes, *cls* y *cls2*, que codifican para cardiolipina sintasas (Cls) activas. Ambos productos génicos catalizan la síntesis de CL a través de la condensación de dos moléculas de PG. El análisis de cepas mutantes afectadas en uno u otro gen, reveló que la inactivación de uno de los genes puede ser compensada totalmente por la actividad del producto génico del otro gen y viceversa. Sólo la inactivación simultánea de ambos genes conduce a la obtención de una cepa doble mutante que muestra una marcada reducción en el contenido de CL, 60 % menos que la cantidad registrada en la cepa salvaje. Acompañando este cambio, se detecta una disminución del 40 % en el contenido de ácidos grasos insaturados (AGI) y, consecuentemente, la membrana de la cepa mutante es más rígida que la de la cepa parental. Los muy bajos niveles de CL detectados en la cepa doble mutante son sintetizados por una tercera actividad Cls que utiliza como sustratos PG y fosfatidiletanolamina y que es activa sólo si se encuentran inactivas Cls y Cls2.

El TDTMA ejerce un efecto fluidificante sobre las membranas bacterianas y *P. putida* A (ATCC 12633) contrarresta este efecto no sólo modificando el contenido de fosfolípidos aniónicos sino, además, disminuyendo el contenido de los AGI de sus fosfolípidos, lo que se refleja en un aumento de la rigidez de membrana. Sin embargo, células de *P. putida* con muy bajo contenido de CL en sus membranas son incapaces de tolerar el efecto fluidificante del detergente, lo que se refleja en una reducida viabilidad celular en presencia del mismo. Dado que este efecto se revierte con la incorporación a las células de CL agregada exógenamente al medio, se concluye que son necesarios ciertos niveles de CL para garantizar la estabilidad y la funcionalidad de la membrana bacteriana y tolerar el efecto bactericida generado por el detergente.

En su conjunto, los resultados obtenidos permiten plantear que la respuesta de *P. putida* A (ATCC 12633) frente al estrés generado por el detergente catiónico TDTMA es un fenómeno multifactorial que implica, a nivel de membrana, modificaciones en el contenido de fosfolípidos aniónicos y de ácidos grasos específicos y donde CL juega un papel significativo y necesario que le permite a las células contrarrestar el efecto fluidificante que ejerce el detergente sobre las membranas.

Pseudomonas putida A (ATCC 12633) is a pollutant degrader that can utilize the cationic surfactant tetradecyltrimethylammonium bromide (TTAB) as a carbon, nitrogen and energy source. In this bacterial strain, the response to the stress produced by TTAB involves quantitative changes in its membrane phospholipids (PL), with increases in the phosphatidic acid (PA), phosphatidylglycerol (PG) contents and decrease of cardiolipin (CL). With the aim to continue with the study of the role of PL of the membrane in response to the presence of TTAB, two ORFs of *Ps. putida* A (ATCC 12633), which in *P. putida* KT2440 encode the putative cardiolipin synthase genes *cls* and *cls2*, were cloned, sequenced and mutated. Sequence comparisons and alignments revealed that the *P. putida cls* and *cls2* are related to members of the PLD superfamily, a characteristic of numerous prokaryotic cardiolipin synthases (Cls). No significant differences were detected in CL levels between the wild-type and the single mutants. In contrast, the double mutant, lacking *cls* and *cls2*, showed a reduction of the CL content, 83% lower than the amount produced by the wild-type. Accompanying this change was a 40% decrease in the content of unsaturated fatty acids consequently, the membrane of the double mutant was more rigid than the one of the parental strain. The results obtained on the catalytic conversion of 2 PG to CL plus glycerol with extracts of each single mutant and of the *cls/cls2* mutant complemented with *cls* or *cls2* gene, pointed out that both ORFs were involved in the CL synthesis in *P. putida* A (ATCC 12633). On the other hand, the low levels of CL detected in the double mutant strain are attributed to a third Cls activity that uses PG and phosphatidylethanolamine as substrates and that is active only when Cls and Cls2 are inactive.

Cells of *P. putida* with very low content of CL in their membranes cannot counteract the fluidizing effect of the detergent and this is accompanied by cell death, since the low levels of CL allows that the TTAB to pass through to the membrane, reach its site of action and destroy the cell. Since the incorporation of exogenous CL into its membrane can be correlated with a substantial increase in survival the double mutant cells in presence of TTAB, it is concluded that the presence of CL in regular amounts, i.e., levels found in wild-type cells, is necessary to counteract the biocide effect of TTAB.

Taken together, the results lead us to propose that the response of *P. putida* A (ATCC 12633) against the stress generated by TTAB is a multifactorial phenomenon where CL plays a significant role that allows cells counter the fluidizing effect exerted by the cationic surfactant.



2. - INTRODUCCIÓN

2.1.- Características generales del Género *Pseudomonas*

Las bacterias del género *Pseudomonas* pertenecen a la familia *Pseudomonadaceae*, clasificadas dentro de la clase de las γ -proteobacterias (Palleroni, 1992). Este género incluye a bacilos Gram negativos, móviles por flagelación polar, quimioorganótrofos y aerobios estrictos, a pesar que, en algunos casos, pueden utilizar nitrato como aceptor final de electrones. Crecen a pH neutro y a temperaturas dentro del rango de la mesofilia (Edward *et al.*, 2006). Particularmente este género comprende especies que son capaces de desarrollarse bajo diversas condiciones ambientales, gracias a su versatilidad metabólica y plasticidad génica, lo cual les permite utilizar un amplio rango de compuestos orgánicos e inorgánicos como fuentes de carbono, nitrógeno y energía (Edward *et al.*, 2006).

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). Debido a la gran plasticidad genética de los miembros del género (Clarke y Richmond, 1975, Clarke, 1982), ciertas cepas de *Pseudomonas* son 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; Boeris *et al.*, 2009).

En los últimos años se han secuenciado los genomas 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/>), *P. putida* DOT-1E (Udaondo *et al.*, 2012), entre otras. Estas bacterias presentan en promedio 5500 genes en sus genomas, la mitad de ellos de función desconocida.

El genoma de *P. putida* KT2440 (Nelson *et al.*, 2002, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, AE015451) exhibe características semejantes a los genomas de bacterias terrestres, acuáticas y rizosféricas. *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* (Stover *et al.*, 2000, <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 del medio.

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, algunas de las bacterias de este género se han convertido, además, en microorganismos de interés biotecnológico (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). Además, 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.

2.2.- Contaminación ambiental. Biorremediación

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 ambiental a la presencia en el ambiente de cualquier agente (físico, químico o biológico) o bien a una combinación de varios agentes en lugares, formas y concentraciones tales que puedan ser nocivos o causar inestabilidad, desorden, daño o malestar en un ecosistema, en el medio físico o en un ser vivo (Atlas y Bartha, 2001).

Las fuentes de contaminación se dividen en dos grandes grupos: naturales y antropogénicas. Las primeras son generadas por diversos fenómenos naturales, como por ejemplo, incendios forestales, erosión de suelos, emisión de gases o cenizas durante las erupciones volcánicas, 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).

La tecnología orientada a la limpieza del medio ambiente y a la prevención de su deterioro se conoce como biorremediación. La biorremediación, a diferencia de la biodegradación que ocurre naturalmente, es un proceso en el cual se utilizan organismos con el propósito de remediar los daños ocasionados en el ambiente y, en muchos casos, permite la degradación o inmovilización de una amplia variedad de contaminantes peligrosos (Atlas y Bartha, 2001).

2.3.- Contaminantes químicos. Compuestos de amonio cuaternario sintéticos (QACs)

Los contaminantes químicos han sido clasificados en dos grandes grupos: Biogénicos y Xenobióticos. La principal diferencia entre ellos radica en que la estructura química de los primeros es semejante a la de los compuestos naturales, lo que facilita su remoción por medio de microorganismos capaces de utilizarlos como fuentes de carbono, nitrógeno y energía, mineralizándolos completamente hasta CO_2 , H_2O y compuestos inorgánicos (Atlas y Bartha, 2001).

Entre los contaminantes ambientales biogénicos se destacan los compuestos de amonio cuaternario, QACs (del inglés, Quaternary Ammonium Compounds). Los QACs son detergentes catiónicos sintéticos en los cuales las cuatro valencias del átomo de nitrógeno están ocupadas por un grupo alquilo de complejidad variable. En la **Figura 1** se muestra, de manera simplificada, la clasificación general de los mismos. Entre los QACs, el término genérico Cetrimida se refiere a mezclas de Br de N-alquiltrimetilamonio, donde la longitud del grupo N-alquilo es de entre 8 y 18 átomos de carbono, Cetrimida USP es Br-tetradeciltrimetilamonio (TDTMA) y el Cl-Benzalconio es una mezcla de N-alquildimetilbencilamonio con diferentes longitudes de cadena alquílica (generalmente C12, C14 y C16). Como características destacables de los QACs pueden citarse: su solubilidad en agua y alcohol, sus propiedades tensioactivas y su amplio uso industrial. Actualmente, los QACs son la principal clase de tensioactivos catiónicos usados como componentes en

suavizantes de telas, antiestáticos, biocidas, desinfectantes, detergentes, agentes de transferencia de fase y numerosos productos de cuidado personal (Zhang *et al.*, 2015).

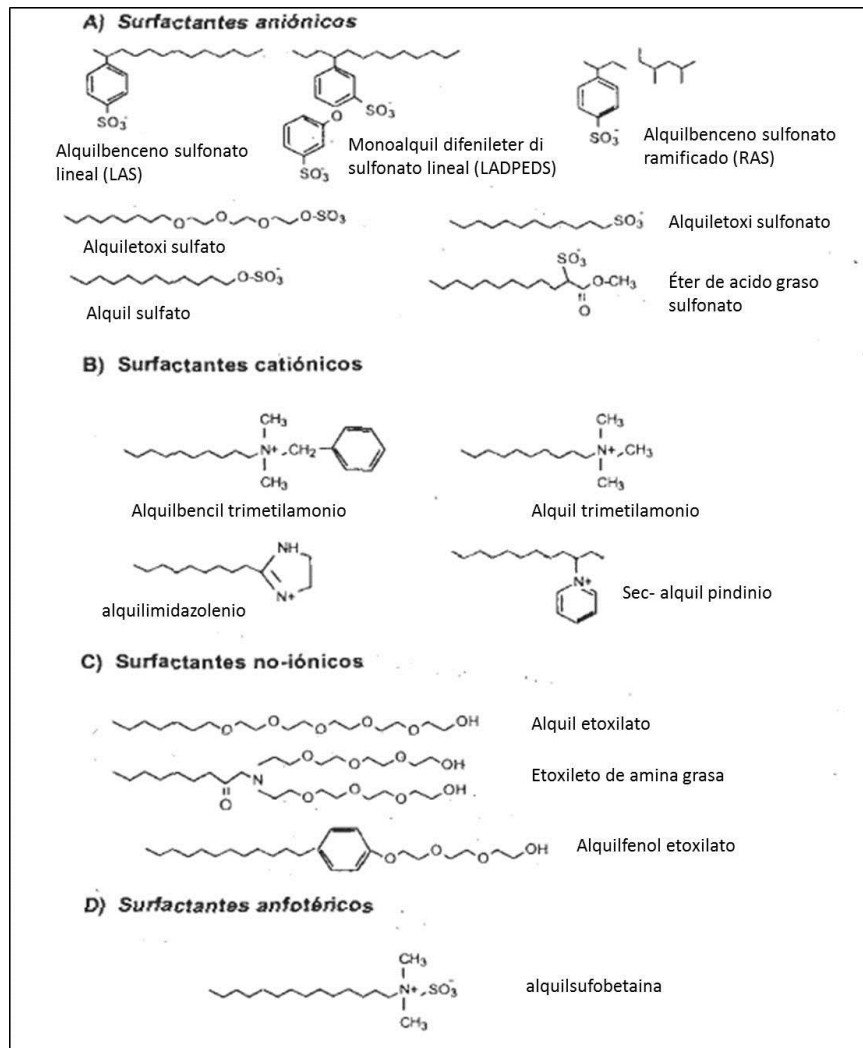


Figura 1: Clasificación general de los detergentes sintéticos (Campos-García, 2001).

La utilización a gran escala de estos compuestos, los convierte en contaminantes ubicuos que se han encontrado en aguas residuales, en efluentes industriales, efluentes de las lavanderías de hospitales, efluentes tratados, aguas superficiales y sedimentos acuáticos (Merino *et al.*, 2003, Clara *et al.*, 2007, Kreuzinger *et al.*, 2007; Ferrer y Furlong 2001; Ding y Liao 2001). En general los QACs son removidos del medio por adsorción y degradación en plantas de tratamiento de aguas, sin embargo, concentraciones reducidas entran al ambiente tornándose recalcitrantes (Games *et al.*, 1982). Estas concentraciones son sumamente variables, dependiendo del origen de la contaminación. Así por ejemplo un efluente de origen doméstico contiene alrededor de 1 mg/l, mientras que los efluentes industriales contienen tenores superiores a 20 mg/l.

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.

Ha sido descrito que, en muchos casos, la degradación completa de los QACs se puede lograr mediante la utilización de consorcios microbianos que utilizan estos compuestos como única fuente de C, N y energía y que en algunos casos es necesaria la adición de factores de crecimiento al medio de cultivo (van Ginkel *et al.*, 1995; Nishiyama y Nishihara, 2002; Tezel *et al.*, 2012).

2.3.1.- Efecto bactericida y mecanismos de resistencia bacteriana a QACs

Se ha observado que el espectro de actividad de los QACs 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. El mecanismo de acción de los QACs como agentes bactericidas, centrado en la disrupción física y en la solubilización de la pared y membrana celular bacteriana incluye, según describen McDonell y Russell (1999):

- 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.

La **Figura 2** muestra una representación esquemática del mecanismo de acción bactericida de los QACs sobre la membrana plasmática.

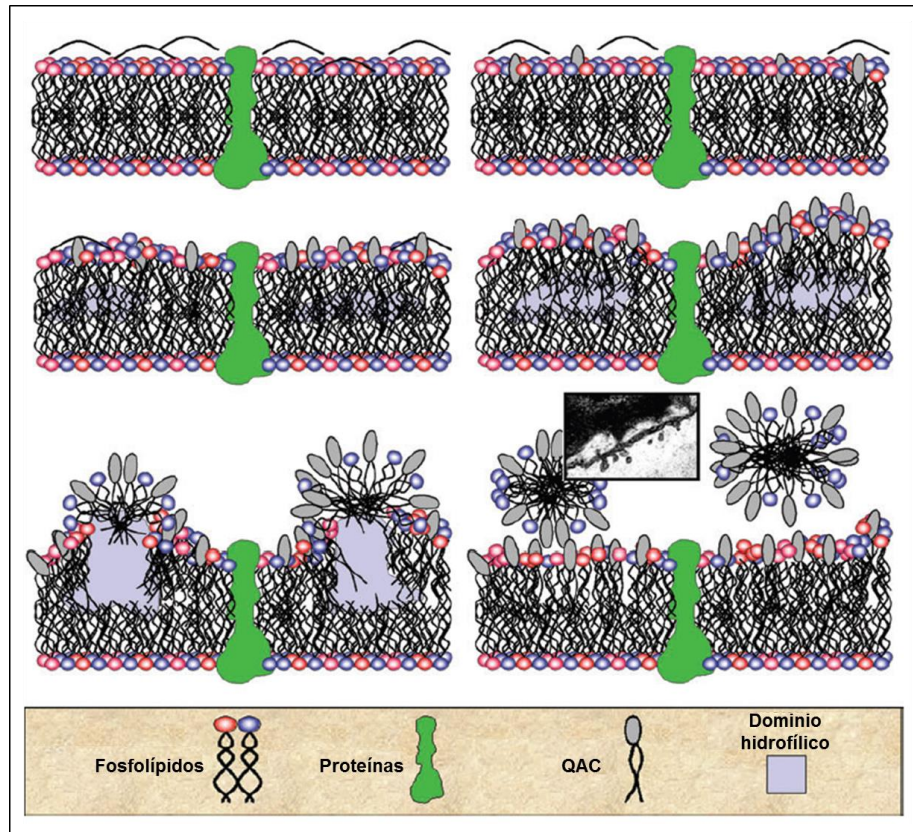


Figura 2: representación esquemática del mecanismo de acción bactericida de los QACs sobre la membrana plasmática (Gilbert y Moore 2005).

Diferentes autores han demostrado que, particularmente las bacterias Gram negativas, presentan resistencia tanto intrínseca como adquirida a los QACs (Szumala y Pernak, 1986; Jones *et al.*, 1989; Langsrud y Sundheim, 1997; Russell, 1998; Hegstad *et al.*, 2010). 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 (McDonell y Rusell, 1999; Tabata, *et al.*, 2003; Machado *et al.*, 2013). 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; Mechín *et al.*, 1999; Nagai *et al.*, 2003; McBain *et al.*, 2004; Simoes *et al.*, 2006).

Entre los distintos mecanismos de resistencia a QACs detectados 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 exopolisacáridos (slime) y formación de colonias más pequeñas (Hoffmann, *et al.*, 1973; Langsrud, *et al.*, 2003), formación de biofilms bacterianos (Pagedar *et al.*, 2012; van der Veen y Abee, 2012; Giaouris, *et al.*, 2012) 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, Guo, *et al.*, 2014, Morita, *et al.*, 2014) y modificaciones a nivel de los fosfolípidos de membrana (Guerin-Méchin *et al.*, 1999; Loughlin *et al.*, 2002; Boeris *et al.*, 2007; Fox *et al.*, 2011). Si bien se describen diferentes estudios, el mecanismo de resistencia bacteriana a QACs parece ser un fenómeno múltiple y complejo.

2.4.- Biosíntesis y funciones generales de los fosfolípidos bacterianos

El metabolismo de lípidos bacterianos ha sido intensamente estudiado utilizando como organismos modelos a *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*. Ambos microorganismos poseen como fosfolípidos (PL) mayoritarios: fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilglicerol (PG) y cardiolipina (CL) (Rock *et al.*, 1996). La **Figura 3** muestra un esquema de las vías de biosíntesis de novo de PL descrita en bacterias Gram positivas y Gram negativas (Wilderman, *et al.*, 2002; Sohlenkamp, *et al.*, 2003 y citas incluidas; Martínez-Morales, *et al.*, 2003).

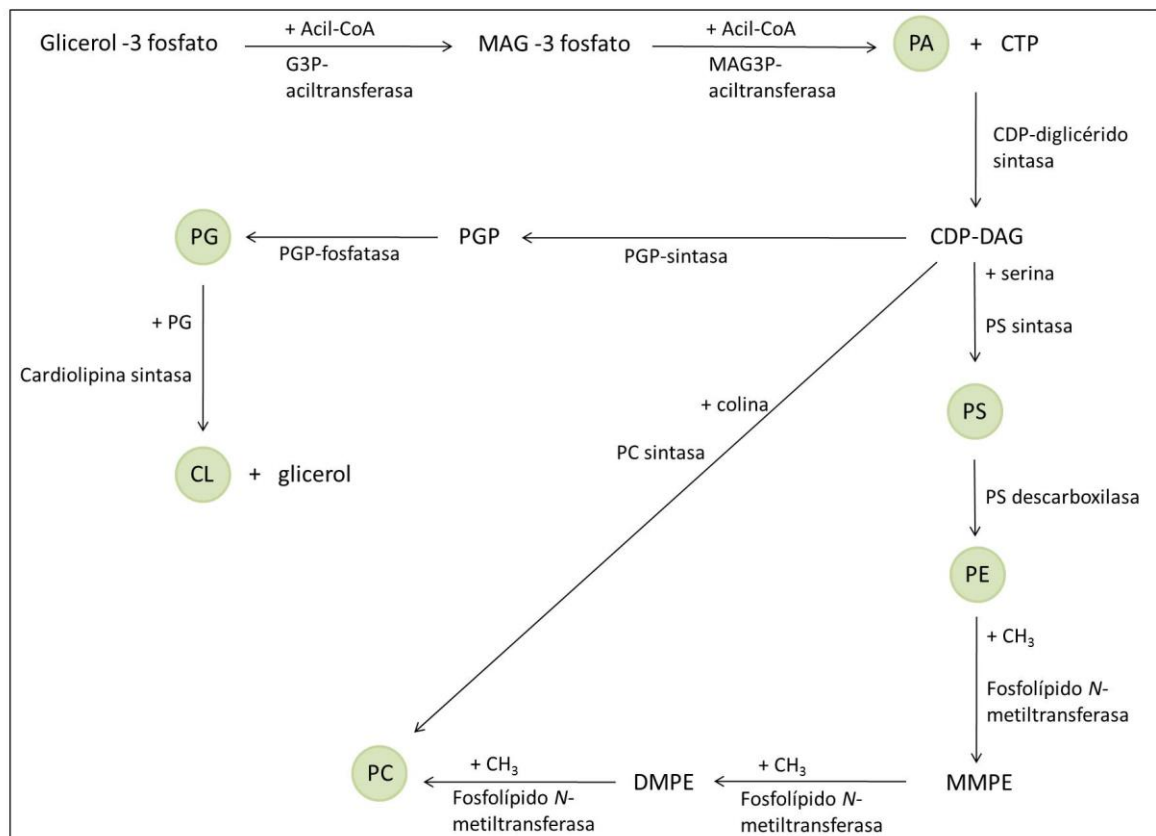


Figura 3: Vía de biosíntesis de PL en bacterias. Referencias: MAG: monoacilglicerol, PA: Ácido fosfatídico, CTP: citidina trifosfato, CDP-DAG: citidina difosfato-diacilglicerol, PS: fosfatidilserina, PE: fosfatidiletanolamina, MMPE: monometilfosfatidiletanolamina, DMPE: dimetilfosfatidiletanolamina, PC: Fosfatidilcolina, PGP: fosfatidilglicerol fosfato, PG: fosfatidilglicerol, CL: Cardiolipina.

PL tales como fosfatidilserina (PS) y los derivados metilados de PE (monometilfosfatidiletanolamina (MMPE) y dimetilfosfatidiletanolamina (DMPE)) actúan generalmente como intermediarios de la biosíntesis de PC y raramente se encuentran formando parte de las membranas bacterianas (Tornabene 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).

CL y PG han sido asociadas al correcto funcionamiento de ciertas funciones celulares, 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 procariotas (Sohlenkamp *et al.*, 2003). Este PL ha sido asociado en la interacción con células eucariotas de bacterias fijadoras de nitrógeno, fitopatógenas y patógenas de animales, (Daiyasu *et al.*, 2005; Comerci *et al.*, 2006; Wessel *et al.*, 2006; Conover *et al.*, 2008). También se ha involucrado a PC en la respuesta ante situaciones de estrés, tales como, altas temperaturas, baja tensión de O₂, concentraciones salinas elevadas, presencia de ácido acético y del metal tóxico aluminio (Hanada *et al.*, 2001; Medeot *et al.*, 2007; Boeris *et al.*, 2009; 2012).

Además de estos glicerofosfolípidos, en algunos microorganismos, ha sido descrita la presencia de otros lípidos. Por ejemplo, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus anthracis*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Clostridium perfringens* contienen O-aminoacil fosfoglicerol derivados de PG, donde un residuo aminoacídico es esterificado en la posición *sn*-3 del glicerol de PG (Nahaie *et al.*, 1984; Op den Kamp *et al.*, 1969; Samant *et al.*, 2009; Fischer y Leopold, 1999; Roy y Ibba, 2008). Los aminoácidos comúnmente detectados 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 a agentes bacterianos catiónicos (Goldfine, 1982). En condiciones limitantes de fósforo, ciertos microorganismos son capaces de sintetizar lípidos sin fósforo, tales como glicolípidos, sulfolípidos y lípidos de ornitina o betaína (López-Lara *et al.*, 2003). También en membranas de *Bacteriodes melaninogenicus*, *Mycobacterium sp.* y *Bradyrhizobium japonicum* se ha detectado la presencia de esfingolípidos y fosfatidilinositol (White *et al.*, 1969, Goren, 1984; Tang y Hollingsworth, 1998; Jackson *et al.*, 2000).

Para bacterias del género *Pseudomonas* ha sido descrito que la membrana interna está compuesta principalmente por PE, PG y CL, siendo PE el PL mayoritario (Schweizer, 2004; Cronan Jr y Rock, 2008). Además, algunas especies de *Pseudomonas* contienen en

sus membranas diferentes niveles de PC. Este un fosfolípido poco común en células procariotas que puede sintetizarse por dos vías diferentes: por sucesiva metilación de PE por medio de una o varias fosfolípido *N*-metiltransferasas dependientes de S-adenosil metionina (Rock *et al.*, 1996).

Diversos autores han descrito, además, la composición de ácidos grasos (AG) de los PL de diferentes cepas de *Pseudomonas*. En la mayoría de estas cepas, los AG saturados (AGS) predominantes son: ácido mirístico (tetradecanoico, 14:0), palmítico (hexadecanoico, 16:0) y esteárico (octadecanoico, 18:0) mientras que la fracción de AG insaturados (AGI) está representada principalmente por: ácido palmitoleico (*cis*-9-hexadecanoico, *cis*- Δ 9,10-16:1) y *cis*-vaccénico (*cis*-11-octadecanoico, *cis*- Δ 11,12-18:1) (Ramos *et al.*, 1997; Schweizer 2004). Los AGI son comúnmente sintetizados como isómeros *cis*, sin embargo, pueden luego interconvertirse en sus correspondientes isómeros *trans* (Ramos *et al.*, 1997). En *P. putida* DOT-T1E, *P. putida* KT2440, *P. putida* P8 y *P. putida* NYC10936 han sido identificados además AG hidroxilados y AG cíclicos tales como: C17: ciclopropano (ácido 9,10-metileno-hexadecanoico) y C19: ciclopropano (ácido 11,12-metileno-octadecanoico) (Diefenbach *et al.*, 1992; Loffeld y Keweloh, 1996; Pinkart *et al.*, 1996; Neumann *et al.*, 2003; Ramos *et al.*, 1997; Schweizer, 2004; Härtig *et al.*, 2005; Pini *et al.*, 2009).

2.4.1.- Papel de los fosfolípidos en la resistencia microbiana a condiciones de estrés ambiental

La membrana bacteriana constituye el primer punto de contacto entre el microorganismo y el medio ambiente. Es una estructura dinámica constituida por una bicapa estable de PL en la cual se insertan proteínas móviles. La bicapa lipídica constituye una barrera para el transporte de moléculas a través de la célula, mientras que ciertos componentes de la fracción proteica, actúan como canales o bombas que permiten el transporte selectivo de moléculas, tanto hacia el interior como hacia el exterior de la célula (Barák y Muchová, 2013).

La composición de la membrana plasmática (dada por el tipo y la cantidad de PL individuales), frecuentemente define la integridad y estabilidad de la célula. Por ello, los microorganismos 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 mejor se adaptan a situaciones desfavorables. Pequeños cambios en sus estructuras pueden alterar el empaquetamiento de las bicapas

celulares y, en consecuencia, modificar la 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 AG y cambios en el nivel de las cabezas polares de PL (Jones *et al.*, 1989; Sakagami *et al.*, 1989; López *et al.*, 1998; Mechín *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 AG de PL, proceso denominado “Adaptación Homeoviscosa” (Sinensky, 1974), constituyen uno de los mecanismos más estudiados de la respuesta bacteriana a condiciones de estrés ambiental.

Los mecanismos de “Adaptación Homeoviscosa” donde participan los AG pueden ser agrupados en dos tipos:

1) Procesos de modificación post-síntesis, considerados los mecanismos más rápidos para ajustar la fluidez de membrana. Ocurren *in situ* e involucran la actividad de desaturasas, *cis-trans* isomerasas y ciclopropano ácidos graso sintetasa (Cronan, 2002; Grogan y Cronan, 1997; Chang *et al.*, 2000; von Wallbrunn *et al.*, 2002). Estos mecanismos *in situ* ocurren a corto plazo y representan la primera línea de defensa de la bacteria contra alteraciones de membrana dadas por una condición de estrés.

2) Procesos de modificación en la síntesis *de novo* que alteran las cadenas acilo y sólo pueden llevarse a cabo durante la nueva formación de lípidos. Estas modificaciones involucran cambios de la longitud de la cadena, ramificación y grado de saturación de los componentes acilo. También están involucrados en este proceso las modificaciones en las cabezas polares de los PL (Ramos *et al.*, 2002; Härtig *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2006; Najjar *et al.*, 2007).

En general, estas alteraciones modifican la fluidez de la membrana, evitando así la entrada del agente tóxico al espacio intracelular. Así, por ejemplo, la conversión *cis*→*trans*, de manera rápida y eficaz, conduce a un aumento en la rigidez de la membrana. Esta conversión se lleva a cabo por una isomerización directa mediada por la *cis*→*trans* isomerasa, enzima descrita en un gran número de microorganismos, incluidas especies de *Pseudomonas* (Holtwick *et al.*, 1997; Ramos *et al.*, 1997; Junker y Ramos, 1999; von Wallbrunn *et al.*, 2002; Bernal *et al.*, 2007).

Ha sido descrito que el contenido de ciertos 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; Koprivnjak *et al.*, 2011).

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 diferentes microorganismos expuestos a situaciones de estrés, tales como la presencia de solventes, altas o bajas temperaturas o concentraciones salinas elevadas se ha observado incremento en los niveles de PL totales (Russell *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). Numerosos autores han destacado el aumento del contenido de los PL aniónicos (PA, PG y CL) en diversos microorganismos expuestos a condiciones estresantes, tales como la presencia de solventes y QACs, elevadas temperaturas y concentraciones salinas o bajos valores de pH (von Wallbrunn *et al.*, 2002; Bernal *et al.*, 2007; Ghosh *et al.*, 2008; Boeris *et al.*, 2007; Matsumoto, 2001; López *et al.*, 1998; Catucci *et al.*, 2004; López *et al.*, 2006; Correa *et al.*, 1999; MacGilvray *et al.*, 2012).

Estudios realizados con cepas de *E. coli*; *B. subtilis* y *P. putida* mutantes para cardiolipina sintasa (Cls), enzima responsable de la síntesis de CL, muestran que estas mutantes presentan en su membrana niveles aumentados en el contenido de PG (precursor inmediato de CL) y niveles bajos de CL (Tropp, 1997, López *et al.*, 2006; Bernal *et al.*, 2007). Cuando estas mutantes son expuestas a condiciones estresantes dadas por altas concentraciones salinas, elevadas temperaturas o presencia de solventes, el contenido de PG aumenta. Adicionalmente, el análisis de una cepa mutante de *B. subtilis* condicional para el gen fosfatidilglicerol sintasa (*pgsA*) (carente de PG y CL), mostró deficiencia en el crecimiento, tanto en condiciones de crecimiento óptimas u estresantes (López *et al.*, 2006). El hecho de que mutantes afectadas en la síntesis de CL contengan niveles incrementados de PG en sus membranas y que la cantidad de este PL se incremente aún más cuando estas mutantes son expuestas a condiciones ambientales desfavorables, llevó a plantear que, posiblemente, PG remplace a CL en algunas de sus funciones subsanando, de esta manera, la carencia de CL (López *et al.*, 2006, Bernal *et al.*, 2007). En relación 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.

2.4.2.- Cardiolipina como componente esencial de membranas bacterianas

Entre los PL que constituyen la membrana plasmática de diferentes microorganismos, CL (1,3-difosfatidil-sn-glicerol) aparece como un componente menor,

representando entre el 5 % al 30 % de los PL totales, dependiendo del microorganismo y de la etapa de crecimiento.

Estructuralmente, CL se diferencia del resto de los glicerofosfolípidos por ser el único PL que posee una estructura dimérica, formada por dos grupos fosfatidil unidos a un glicerol central. Aunque en su estructura CL contiene dos grupos fosfato, a pH fisiológico la molécula no se encuentra completamente ionizada, por lo tanto contiene solo una carga negativa. Esto se debe específicamente a que un protón queda atrapado en una estructura de resonancia bicíclica formada por los dos grupos fosfato y el grupo hidroxilo central del glicerol, neutralizando de esta manera una de las cargas negativas de uno de los grupos fosfato (Kates *et al.*, 1993).

La presencia de cuatro cadenas acilo y la pequeña cabeza polar, dada por la única carga negativa presente en molécula, le dan a este PL una forma cónica. En la **Figura 4 (A)** se observa la estructura química de la molécula de CL. Esta disposición espacial, le permite a CL formar dominios, los cuales constituyen en la membrana zonas de bicapa no lamelar, a las cuales se les han atribuido múltiples funciones.

Por su capacidad de captar protones ha sido propuesto que los dominios de CL actúan como una trampa de protones particularmente en la proximidad de los complejos de fosforilación oxidativa, los cuales generan o consumen gradientes de protones a través de la membrana (Haines y Dencher, 2002).

Debido a su estructura dimérica, las moléculas de CL poseen gran flexibilidad y son capaces de ocupar espacios libres entre subunidades de proteínas oligoméricas que se insertan en la membrana, estabilizando de esta manera las interacciones entre dichas subunidades, como así también entre complejos de múltiples subunidades individuales organizados en estructuras de orden superior (Hunte, 2005).

Debido a sus características estructurales particulares, CL estimula cambios en las propiedades físicas generales de la membrana plasmática, a tal punto que, la presencia de pequeñas cantidades de CL, disminuyen la interacción lateral entre las monocapas de PL, disminuyendo así la energía requerida para estirar la membrana, lo cual favorece la creación de pliegues (Nichols-Smith *et al.*, 2004). Esta es la razón por la cual, los dominios de CL se localizan en las regiones de alta curvatura de la membrana plasmática, como los polos celulares y los septos de división (Kaway *et al.*, 2004; Matsumoto *et al.*, 2006; Bernal *et al.*, 2007; Renner y Weibel 2011). La **Figura 4 (B)** muestra un modelo esquemático de la distribución de CL en la membrana plasmática. La ubicación específica de los dominios de CL generarían tensión en la membrana plasmática, la cual sería indispensable para diferentes procesos tales como, la fusión de membranas, el movimiento de proteínas e incluso la segregación espacial (Huang *et al.*, 2006; Lewis y McElhaney 2009).

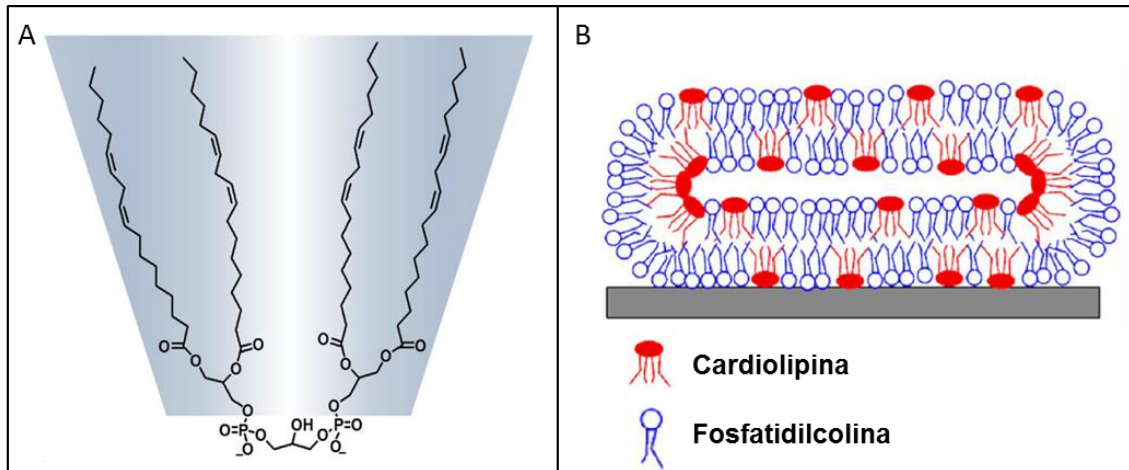


Figura 4: (A) estructura química de CL (B) modelo esquemático de la distribución de CL en una bicapa formada por PC y 20% de CL (Unsay *et al.*, 2013).

Durante muchos años ha sido propuesto que la síntesis de CL, tanto en bacterias Gram negativas, como Gram positivas, es llevada a cabo por las CIs, enzimas que catalizan la condensación de dos moléculas de PG, para formar CL y glicerol (Short y White, 1971; Tropp, 1997, Koprivnjak *et al.*, 2011; Tsai *et al.*, 2011; MacGilvray *et al.*, 2012). Sin embargo, ciertos microorganismos son capaces de sintetizar CL a través de otros mecanismos. Tal es el caso de *Streptomyces coelicolor* y *Xanthomonas campestris*, los cuales sintetizan CL a través del mecanismo característico descrito para células eucariotas que involucra la condensación de una molécula de PG y una molécula de CDP-diacilglicerol (Sandoval-Calderón *et al.*, 2009; Moser, *et al.*, 2014). En *E. coli*, se ha descrito además una actividad CIs que es capaz de sintetizar CL por condensación de una molécula de PG y una de PE (Tan *et al.*, 2012).

La CIs pertenece a la superfamilia de las fosfolipasas D (PLD), que incluye, además de la PLD propiamente dicha, fosfatidilserina sintasa tipo I (PssAI), proteínas de envolturas de poxvirus y endonucleasas (Ponting y Kerr, 1996; Waite, 1999). Los miembros esta superfamilia se caracterizan por tener el motivo consenso denominado 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; Tan *et al.*, 2012).

Diversas especies bacterianas presentan en sus genomas múltiples genes que codifican para potenciales CIs. Se ha descrito que en el genoma de *B. subtilis* existen tres genes *cls* hipotéticos, denominados: *ywiE*, *ywnE* y *ywjE* (López *et al.*, 2006). Sin embargo, la

inactivación de *ywnE* (CLsA, ABS75706), permitió demostrar que sólo éste es el gen responsable de codificar para la síntesis de CL en este microorganismo (López *et al.*, 2006).

Staphylococcus aureus presenta dos *orfs* (*cls1* y *cls2*, NC_002745 y NC_002976) (Tsai *et al.*, 2011) homólogos a las *cls*. Ambos *orfs* codifican para Cls funcionales y sólo la disrupción de ambos genes lleva a la carencia total de CL en la membrana del microorganismo (Koprivnjak *et al.*, 2011).

En *E.coli* ha sido demostrado que tres son los genes que codifican para Cls funcionales (*clsA*, *clsB* y *clsC*). Los productos de los genes *clsB* y *clsC*, (ClsB y ClsC) son activos en la fase estacionaria de crecimiento del microorganismo, contribuyendo a la acumulación de CL. ClsC, a diferencia de las ClsA y ClsB que utilizan dos moléculas de PG, cataliza la síntesis de CL a través de un mecanismo no reportado hasta el momento en otras bacterias, utilizando PE y PG como sustratos (Tan *et al.*, 2012).

Recientemente se ha demostrado que el microorganismo fitopatógeno, *Xantomonas campestris* pv. *campestris*, posee en su genoma seis genes que codifican para Cls putativas (Moser, *et al.*, 2014). La mutación de uno de esos genes (*xc_0186*) produce una disminución del 70% en los niveles de CL, la cual no puede ser compensada en su totalidad, por ninguno de las demás CLs. El producto del gen *xc_0186*, cataliza la síntesis de CL por condensación de una molécula de PG y una de CDP-diacilglicerol y además sintetiza PE utilizando como sustrato etanolamina y CDP-diacilglicerol a través de un mecanismo no descrito en otros microorganismos (Moser, *et al.*, 2014).

2.5.- Antecedentes específicos del grupo de trabajo

En nuestro laboratorio demostramos que un cultivo puro de *Pseudomonas putida* A (ATCC12633) es capaz de tolerar y crecer en presencia de 150 μ M del QAC Br-tetradeciltrimetilamonio (TDTMA) (Liffourrena *et al.*, 2008). Demostramos la vía metabólica por la cual *P. putida* A (ATCC12633) utiliza el TDTMA como fuente de carbono, nitrógeno y energía (Liffourrena *et al.*, 2008; 2009) y los cambios a nivel de PL de membrana que le permiten a esta cepa tolerar la presencia del detergente (Boeris *et al.*, 2007; 2009). Respecto a los mecanismos de resistencia a TDTMA, detectamos, luego de 15 min de contacto con el detergente, que el nivel de PL totales no se modifica respecto a lo detectado en células no tratadas, sin embargo, sí se observaron cambios a nivel de PL individuales. El contenido de CL disminuyó un 60 %, mientras que los niveles de PG y PA incrementaron con valores superiores al 100 %, respecto a lo detectado en células no expuestas a TDTMA. Estos mismos cambios fueron observados en células adaptadas a crecer a concentraciones crecientes del biocida (mayores a la CIM=150 mg/l, 450 μ M), interesantemente, cuando

estas células fueron transferidas y cultivadas en ausencia de TDTMA, los niveles de estos PL retornaron a valores similares a los detectados en ausencia del detergente. Estos resultados permitieron involucrar a estos PL aniónicos en la respuesta adaptativa de *P. putida* A (ATCC 12633) al QAC, utilizando principalmente PG y PA para neutralizar la alta carga positiva de la molécula de TDTMA (Boeris *et al.*, 2007).

En células de *P. putida* A (ATCC 12633) crecidas en presencia de TDTMA como única fuente de C y N se detectó un aumento significativo en la cantidad de PL totales, respecto al contenido detectado en células crecidas con fuentes preferenciales de C y N. En relación a los cambios en PL específicos, se observó un aumento significativo en el contenido de PG y PA (6 y 20 veces, respectivamente) (Boeris *et al.*, 2009).

En base estos antecedentes, en este plan de trabajo se plantearon:

Hipótesis: *el mecanismo de tolerancia de P. putida A (ATCC 12633) al estrés generado por la exposición a cortos periodos de tiempo a TDTMA, estaría mediado por cambios en el contenido de sus fosfolípidos aniónicos, particularmente, en CL y su precursor PG.*

2.6.- OBJETIVO GENERAL

Caracterizar, a nivel de membrana, los mecanismos de respuesta de *Pseudomonas putida* frente al estímulo provocado por el detergente catiónico Br-tetradeciltrimetilamonio y relacionarlos con la capacidad de biodegradar este compuesto. El objetivo final que se persigue es el de utilizar este microorganismo como vehículo en procesos de biorremediación de estos contaminantes.

2.6.1.- OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- 1) Identificar el/los genes homólogos a Cls en *P. putida* A (ATCC 12633).
- 2) Obtener cepas mutantes de *P. putida* A (ATCC 12633) afectadas en el/los genes responsables de codificar para la síntesis de CL.
- 3) Caracterizar fisiológicamente las cepas mutantes obtenidas. Analizar los cambios en la composición de fosfolípidos en ausencia y presencia de condiciones estresantes originadas por el TDTMA.
- 4) Estudiar el patrón de ácidos grasos y monitorear la fluidez de la membrana en células de *P. putida* A (ATCC 12633) y sus mutantes isogénicas sometidas o no a condiciones adversas dadas por la presencia de TDTMA.

- 5) Identificar las posibles actividades enzimáticas relacionadas con la síntesis de CL que podrían estar involucradas en el proceso de adaptación bacteriana al detergente.



3. – MATERIALES Y MÉTODOS

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 salino de alto contenido en fosfato (HPi-BSM): NaCl 8,5 mM, KH₂PO₄ 22 mM, Na₂HPO₄ 17 mM y MgSO₄ 0,8 mM, pH 7,4. Para evitar precipitaciones salinas, se mezclan iguales volúmenes de MgSO₄ 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 h se le agrega 0,15 ml de glicerol 87 % (v/v) estéril, se mezcla, se enfría a -20 °C y luego se conserva a -80 °C. Para recuperar la cepa, se raspa la superficie con un palillo estéril y se estría en 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 1**.

P. putida A (ATCC 12633) y sus mutantes derivadas se hicieron crecer a 30°C en medio rico LB o en HPi-BSM con la adición de glucosa 20 mM y NH₄Cl 18 mM como fuentes de C y N, hasta DO₆₆₀ final de 0,8 y 1,2 respectivamente. Para condiciones de estrés por cortos períodos de tiempo, una vez que el cultivo alcanza una DO₆₆₀ de 0,8, las células se exponen durante 1, 5, 10 y/o 15 minutos a 150 µM de TDTMA.

E. coli DH5α, *E. coli* BL21 (DE3) y *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 se hicieron crecer a 37°C en medio rico LB.

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, con agitación, durante 12 h.

El crecimiento se determinó midiendo la absorbancia a 660 nm en espectrofotómetro (Beckman, DU 640).

Cuando fue necesario, los siguientes antibióticos fueron adicionados al medio de cultivo: para *P. putida*, estreptomina (Sm) 100 µg/ml, kanamicina (Km) 75 µg/ml, Gm 120 µg/ml, cloranfenicol (Cm) 100 µg/ml. Para *E. coli*, ampicilina (Amp) 200 µg/ml, Cm 10 µg/ml, Km 50 µg/ml, Sm 50 µg/ml,

Tabla 1: Cepas bacterianas y plásmidos usados en este estudio

Cepas o plásmidos	Características relevantes	Referencias
Cepas		
<i>P. putida</i>		
A (ATCC 2633)	Cepa salvaje de colección	Palleroni, 1992
GP01	Mutante deletional de <i>P. putida</i> A (ATCC 12633) afectada en el gen homólogo a <i>cls</i> (Δ <i>cls::aacC1</i> , Gm ^R).	Este estudio
RH01	Mutante insercional de <i>P. putida</i> (A ATCC 12633), afectada en el gen homólogo a <i>cls2</i> (<i>cls2::aph(3')-IIa</i> , Km ^R)	Este estudio
RH02	Mutante de <i>P. putida</i> A (ATCC12633) afectada en los genes homólogos a <i>cls</i> y a <i>cls2</i> (Δ <i>cls::aacC1</i> , <i>cls2::aph(3')-IIa</i> . Gm ^R , Km ^R)	Este estudio
RH02/pGL08	<i>P. putida</i> RH02 complementada con el gen homólogo a <i>pp5364</i> clonado en pBBR1MCS-3,(Gm ^R , Cm ^R)	Este estudio
RH02/pGL09	<i>P. putida</i> RH02 complementada con el gen homólogo a <i>pp3264</i> clonado en pBBR1MCS-3,(Gm ^R , Cm ^R)	Este estudio
<i>P. aeruginosa</i>		
PAO1	Cepa salvaje de colección	Palleroni, 1992
<i>E. coli</i>		
DH5 α	Cepa de clonado <i>recA1</i> , Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15.	Hanahan, 1983
BL21 (DE3)	Cepa de clonado para expresión; <i>lon</i> ⁻ , <i>ompT</i> ⁻ , F ⁻ , <i>gal</i> ⁻ , <i>dcm</i> ⁻ , RNAPol T7+	Promega
Plásmidos		
pGem [®] T Easy	Vector de clonado, (Amp ^R)	Promega
pKNG101	Vector suicida, Sac ^S Tra ⁻ Mob ⁺ oriR6K (Sm ^R)	Kaniga <i>et al.</i> ,1991
pBBR1 MCS-3	Vector de clonado, (Cm ^R)	Kovach <i>et al.</i> , 1995
pBBR1MCS-5	Vector de clonado, (Gm ^R)	Kovach <i>et al.</i> ,1995
pET9a	Vector de expresión (Km ^R).	Studier <i>et al.</i> , 1990

pET15b	Vector de expresion, (Amp ^R).	QiaGen
pET28a	Vector de expresion, (Km ^R).	QiaGen
pCR [®] 2.1-TOPO	Vector de clonado, (Km ^R) (Amp ^R)	Invitrogen
pUC18	Vector de clonado, (Amp ^R)	Yanisch-Perron <i>et. al.</i> ,1985
pPB05	pCR [®] 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> (<i>pp5364</i>), flanqueado por <i>Bam</i> HI y <i>Sall</i> ,(Amp ^R).	Este estudio
pPB07	pUC18 conteniendo un fragmento de 1.8 kb correspondiente al gen de <i>P. putida</i> A (ATCC 12633) homólogo a <i>cls</i> (<i>pp5364</i>), flanqueado por <i>Bam</i> HI y <i>Sall</i> ,(Amp ^R).	Este estudio
pPB08	pUC18 conteniendo un fragmento de 1.8 kb correspondiente al constructo <i>Bam</i> HI- Δ <i>cls::aacC1-Sall</i> . (Amp ^R)	Este estudio
pPB09	pKNG101, conteniendo un fragmento de 1.8 kb correspondiente al constructo <i>Bam</i> HI- Δ <i>cls::aacC1-Sall</i> . (Sm ^R).	Este estudio
pPB05	pCR [®] 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> (<i>pp5364</i>), flanqueado por <i>Bam</i> HI y <i>Sall</i> ,(Amp ^R).	Este estudio
pRH01	pGem [®] T Easy conteniendo un fragmento de 1,5 Kb correspondiente al gen de <i>P. putida</i> A (ATCC 12633) homólogo a <i>cls2</i> , flanqueado por <i>Bam</i> HI y <i>Sall</i> (Amp ^R).	Este estudio
pRH02	pGem [®] T Easy conteniendo un fragmento de 2,5 kb correspondiente al constructo <i>Bam</i> HI- <i>cls2::aph(3')-Ila-Sall</i> (Km ^R , Amp ^R).	Este estudio
pRH03	pKNG101 conteniendo un fragmento de 2,5 kb correspondiente al constructo <i>Bam</i> HI- <i>cls2::aph(3')-Ila-Sall</i> (Sm ^R , Km ^R).	Este estudio
pGL07	pET15b conteniendo un fragmento de 1,2 kb correspondiente al gen de <i>P. putida</i> A (ATCC 12633) homólogo a <i>cls</i> (<i>pp5364</i>) deletado 200pb desde el inicio del gen flanqueado por <i>Bam</i> HI y <i>Ndel</i> .(Km ^R)	Este estudio
pGL08	pBBR1-MCS-3 conteniendo un fragmento de 1,4Kb, correspondiente al gen homólogo a <i>pp5364</i> (<i>cls</i>) flanqueado por <i>Bam</i> HI y <i>Sall</i> (Cm ^R).	Este estudio
pGL09	pBBR1-MCS-3 conteniendo un fragmento de 1,2Kb, correspondiente al gen homólogo a <i>pp3264</i> (<i>cls2</i>), flanqueado por <i>Xho</i> I y <i>Sac</i> I (Cm ^R).	Este estudio
pGL10	pET28a conteniendo un fragmento de 1,2 kb correspondiente al gen de <i>P. putida</i> A (ATCC 12633) homólogo a <i>cls2</i> (<i>pp3264</i>) flanqueado por <i>Bam</i> HI y <i>Sall</i> .(Km ^R)	Este estudio

3.4.- Manipulación de ADN

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

Los oligonucleótidos diseñados en este estudio se detallan en **Tabla 2**.

Tabla 2: Oligonucleótidos usados en este estudio

Oligonucleótidos	Secuencias (5`-3`), características relevantes
UpCls4	CGCGGATCCGTTGCAGCATCTGGGCTTGTACCAGTGG, localizado a 202 pb corriente arriba del gen de <i>cls</i> (<i>pp5364</i>). Sitio de restricción adicionado para <i>Bam</i> HI.
DownCls4	ACGCGTTCGACTGAGAAGACCCTGCGGATCTGGCGTTTGT, localizado a 237 pb corriente abajo del gen <i>cls</i> (<i>pp5364</i>). Sitio de restricción adicionado para <i>Sal</i> I.
UpGm	GGGTCCATGGCGATGTTTGATGT, localizado al inicio del gen de resistencia a Gm de pBBR1MCS-5. Sitio de restricción adicionado para <i>Nco</i> I.
DownGm	ATCAGGCCTGCGGCTTGAACGAA, localizado al final del gen de resistencia a Gm pBBR1MCS-5. Sitio de restricción adicionado para <i>Stu</i> I.
oLPB23-3264	CGCGGATCCGATCAATGGCGAGCAGTATT, localizado al inicio del gen <i>cls2</i> (<i>pp3264</i>). Sitio de restricción adicionado para <i>Bam</i> HI
oLPB24-3264	ACGCGTTCGACAGGTTAAAGGCGTAGCACAC, localizado a 267 pb corriente abajo del gen <i>cls2</i> (<i>pp3264</i>). Sitio de restricción adicionado para <i>Sal</i> I
oLPB25-upKm	AAAAGGCCTACGCTCAGTGAACGAAAAC, localizado al inicio del gen de resistencia a Km (<i>aph(3')-IIa</i>) de pET9a. Sitio de restricción adicionado para <i>Stu</i> I.
oLPB26-dnKm	AAAAGGCCTTCATACACGGTGCCTGACTG, localizado al final del gen de resistencia a Km (<i>aph(3')-IIa</i>) de pET9a. Sitio de restricción adicionado para <i>Stu</i> I.
oLGL05	AAAGAATTCCTAAAGAATCGGCGATAT, localizado al final del gen <i>cls</i> (<i>pp5364</i>). Sitio de restricción adicionado para <i>Eco</i> RI.
oLGL07	GGAATTCATATGCTACATCAAGGCTCGGCG, localizado a 200pb hacia el C-terminal del gen <i>cls</i> (<i>pp5364</i>). Sitio de restricción adicionado para <i>Nde</i> I.
oLGL01	ACGCGTTCGACGTGTACTCGGCAAGCAGGAT, localizado al inicio del gen homólogo a <i>cls</i> (<i>pp5364</i>). Sitio de restricción adicionado para <i>Sal</i> I.
oLGL02	CGCGGATCCGGGAAGATTTGTACCGCTGA, localizado al final del gen homólogo a <i>cls</i> (<i>pp5364</i>). Sitio de restricción adicionado para <i>Bam</i> HI.
oLGL12	CCGCTCGAGGTGAACCGACCTTGGGTAGA, localizado al inicio del gen homólogo a <i>cls2</i> (<i>pp3264</i>). Sitio de restricción adicionado para <i>Xho</i> I.
oLGL13	ACGCGTTCGACGCGGCTTGAACGAA, localizado al final del gen homólogo a <i>cls2</i> (<i>pp3264</i>). Sitio de restricción adicionado para <i>Sac</i> 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), utilizando el programa Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). 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. Los primers elegidos fueron sintetizados por IDT (integrated ADN Technologies, Invitrogen).

3.5.- Clonado y secuenciamiento de genes de interés de *P. putida* A (ATCC 12633)

3.5.1.- Amplificación de genes homólogos involucrados en la síntesis de CL

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.*, 2000) y que el gen *pp3264* (*cls2*) está descrito en dicha cepa, por homología de secuencia, como una cardiolipina sintasa dos.

Utilizando ADN genómico de *P. putida* A (ATCC 12633) y a partir de los oligonucleótidos UpCls4/DownCls4 (**Tabla 2**), se amplificó por PCR el fragmento de aproximadamente 1,8 Kb, que contiene el gen homólogo al *orf pp5364*. El producto de PCR fue ligado al vector de clonado pCR[®]2.1-TOPO originando el plásmido pPB05 (**Tabla 1**). Posteriormente, el fragmento fue subclonado en el vector pUC18 obteniéndose el plásmido pPB07. Células competentes de *E. coli* DH5 α (**Tabla 1**) fueron transformadas con pPB07. Para la selección de las colonias portadoras del plásmido de interés se utilizaron placas de LB suplementadas con Amp 200 μ g/ml. Las colonias desarrolladas fueron sometidas a extracción de plásmidos y posterior mapeo mediante enzimas de restricción.

De manera similar a lo descrito anteriormente, se procedió a la amplificación del gen homólogo a *cls2* (*pp3264*). A partir del genoma de *P. putida* A (ATCC 12633) y utilizando los oligonucleótidos oLPB23-3264/oLPB24-3264 (**Tabla 2**), se amplificó por PCR, un fragmento de aproximadamente 1,5 Kb. El producto de PCR fue ligado al vector de clonado pGem[®]-T Easy (**Tabla 1**) originando el plásmido pRH01. Células competentes de *E. coli* DH5 α (**Tabla 1**) fueron transformadas con la mezcla de ligación y la selección de células portadoras del plásmido de interés se llevó a cabo utilizando placas de LB conteniendo Amp 200 μ g/ml, 7 μ l de solución stock (20 %) de isopropilo- β -D tiogalactosido (IPTG) y 40 μ l de X-Gal. Se seleccionaron las colonias blancas, las que fueron sometidas a extracción de plásmidos y posterior mapeo por restricción.

Los plásmidos pPB07 y pRH01 se enviaron a Macrogen (Korea) para el correspondiente secuenciamiento.

3.5.2.- Amplificación de los genes de resistencia a Gm (*aacC1*) y Km (*aph(3')-IIa*)

Los oligonucleótidos, upGm y dnGm (**Tabla 2**), fueron usados para la amplificación del gen de resistencia a Gm (*aacC1*) a partir de pBBR1MCS-5 (**Tabla 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 2**).

De manera similar y a partir de los oligonucleótidos oLPB25-upKn y oLPB26-dnKn (**Tabla 2**) se amplificó un fragmento de 1 Kb, correspondiente al gen de resistencia a Km (*aph(3')-IIa*) usando como molde el vector pPET9a (**Tabla 1**). oLPB25-upKn y oLPB26-dnKn fueron modificados por la adición de sitios de restricción para *StuI*, internos en el gen *cls2* (posición 304).

Los fragmentos de 0,6 Kb (correspondiente a *aacC1*) y el de de 1 Kb (correspondiente a gen *aph(3')-IIa*) obtenidos por PCR, fueron purificados y reservados para llevar a cabo la posterior inactivación de los genes homólogos a *cls* y *cls2* de *P. putida* A (ATCC 12633), respectivamente.

3.6.- Mutagénesis de genes homólogos a *cls* y *cls2* en *P. putida* A (ATCC 12633)

Para lograr las mutaciones de los genes de interés se llevaron a cabo dos estrategias: I) la interrupción del gen homólogo a *cls* (*pp5364*) se llevó a cabo por delección de un fragmento interno del gen y posterior reemplazo del fragmento deleccionado por un cassette de resistencia a antibiótico; II). La inactivación del gen homólogo al *orf pp3264* (*cls2*) se logró por la inserción de un cassette de resistencia a antibiótico. A continuación se detalla la metodología realizada según las estrategias utilizadas.

3.6.1.- Obtención de cepas mutantes de *P. putida* A (ATCC 12633) afectadas en el gen homólogo a *cls* (*pp5364*)

La inactivación del gen homólogo a *cls* de *P. putida* A (ATCC 12633) se realizó mediante la delección de un fragmento interno de 0,6 Kb, el cual fue reemplazado 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 1**) previamente digerido con las mismas enzimas de restricción, generando el plásmido pPB08. Posteriormente, pPB08 fue digerido con *BamHI* y *SalI*, obteniéndose un fragmento de 1,8 Kb, correspondiente al constructo *BamHI-Δcls::aacC1-SalI*. Dicho fragmento, fue subclonado en el plásmido suicida pKNG101 (**Tabla 1**), generando el plásmido pPB09 (**Tabla 1**) el que fue introducido por electroporación (apartado 3.7) en células *P. putida* (A ATCC 12633), a fin de obtener la mutante correspondiente que fue denominada *P. putida* GL01. La **Figura 5** esquematiza la obtención de esta cepa mutante (*Δcls::aacC1*).

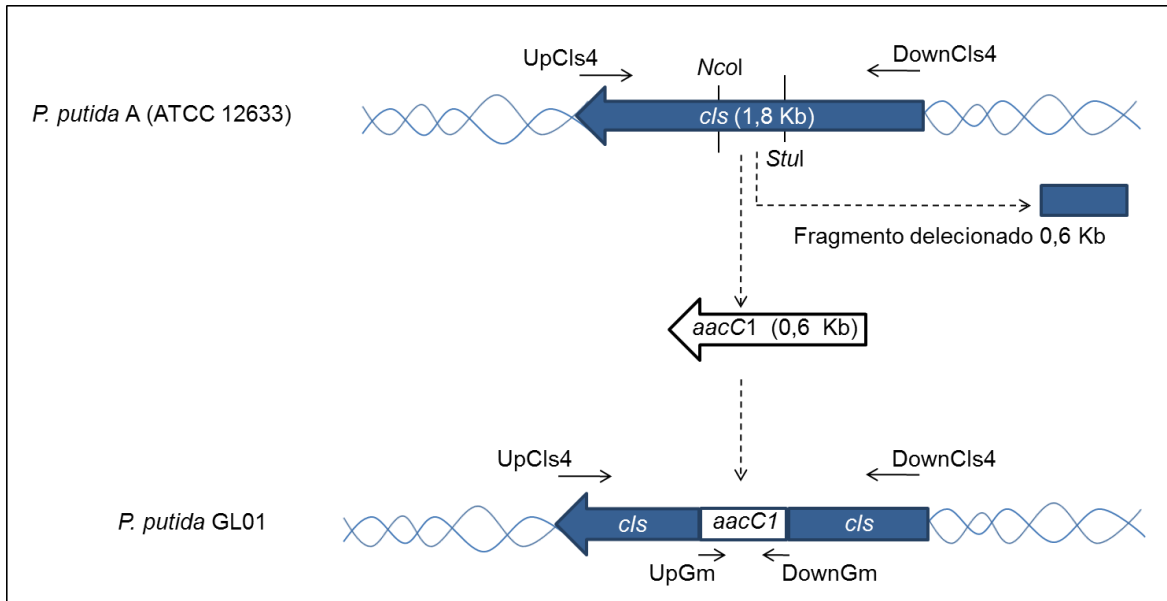


Figura 5: Esquema representativo del genoma de *P. putida* y de su mutante isogénica: gen homólogo a *cls* en la cepa salvaje y la posterior inserción del constructo llevando el gen de resistencia a Gm.

3.6.2.- Obtención de cepas mutantes de *P. putida* A (ATCC 12633) afectadas en el gen homólogo a *cls2* (*pp3264*)

La inactivación del gen homólogo a *cls2* de *P. putida* A (ATCC 12633) (**Tabla 1**), se realizó mediante la inserción de un cassette de resistencia a Km (*aph(3')-IIa*) considerando el sitio de restricción interno para *Stul* (posición 304 del gen a inactivar). El producto de PCR correspondiente al gen *aph(3')-IIa* digerido con *Stul* fue ligado a pRH01 (**Tabla 1**) previamente digerido con la misma enzima de restricción, generando el plásmido pRH02 (**Tabla 1**) en el cual el gen homólogo a *cls2* queda interrumpido por el cassette de resistencia a antibiótico. Posteriormente, pRH02 fue digerido con *Bam*HI/*Sal*I, obteniendo un fragmento de 2,5 Kb, correspondiente al constructo *Bam*HI-*cls2*::*aph(3')-IIa*-*Sal*I. Dicho fragmento, fue subclonado en el plásmido suicida pKNG101 (**Tabla 1**), generando el plásmido pRH03 (**Tabla 1**) el que fue introducido por electroporación (apartado 3.7) en células *P. putida* A (ATCC 12633) a fin de obtener la mutante correspondiente que fue denominada *P. putida* RH01. La **Figura 6** esquematiza la obtención de esta cepa mutante (*cls2*::*aph(3')-IIa*).

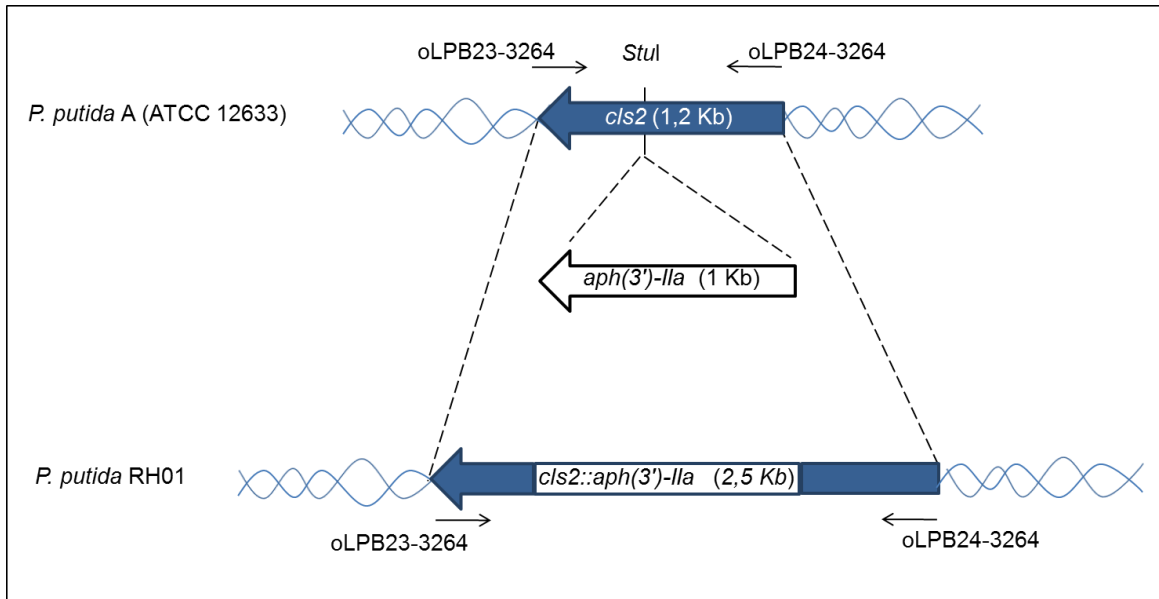


Figura 6: Esquema representativo del genoma de *P. putida* y de su mutante isogénica: gen homólogo a *cls2* en la cepa salvaje y la posterior inserción del constructo llevando el gen de resistencia a Km.

3.6.3.- Obtención de una cepa doble mutante de *P. putida* A (ATCC 12633) afectada en los genes homólogos a *cls* (*pp5364*) y *cls2* (*pp3264*)

Para la obtención de la cepa doble mutante de *P. putida* A (ATCC 12633) afectada en los genes homólogos a *cls* (*pp5364*) y *cls2* (*pp3264*), se procedió a la inactivación del gen homólogo a *cls2* en el genoma de la mutante simple *P. putida* GL01 (apartado 3.6.1) (**Tabla 1**), mediante la introducción, por electroporación, del vector pRH03 portador del constructo *cls2::aph(3')-Ila* (**Tabla 1**).

3.7.- Electroporación de plásmidos en *P. putida* A (ATCC 12633) y selección de dobles recombinantes

La introducción de pPB09 en células de *P. putida* A (ATCC 12633) y de pRH03 en *P. putida* A (ATCC 12633) y *P. putida* GL01 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) y *P. putida* GL01 crecidas en LB durante 12 h. El precipitado obtenido fue lavado 3 veces con 600 μ l de sacarosa 300 mM y resuspendido en 100 μ l de la misma solución. Las células resuspendidas se combinaron con aproximadamente 50 ng de pPB09, o pRH03 (**Tabla 1**), según corresponda, y fueron electroporadas (BioRad GenePulser, programado a: 25 μ F, 200 Ohm, 12,5 kV/cm). Posterior a la electroporación, las células fueron recuperadas en medio LB líquido durante 3 h aproximadamente. Pasado este tiempo, los cultivos fueron suplementados con los antibióticos adecuados (Sm 100 μ g/ml y Gm 120

µg/ml para el caso de la electroporación con pPB09 o Sm 100 µg/ml y Km 75 µg/ml para el caso de la electroporación con pRH03) y se siguió la recuperación de las cepas durante 12 h.

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 µg/ml y Gm 120 µg/ml cuando *P. putida* A (ATCC 12633) fue electroporada con pPB09 (**Tabla 1**) o con Sm 100 µg/ml y Km 75 µg/ml para el caso de la electroporación con pRH03 (**Tabla 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 y pRH03, respectivamente. La pérdida de los plásmidos se basa en la presencia del gen *sacB* en pKNG101. 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 7** muestra el esquema del mecanismo general de doble recombinación homóloga entre el genoma de *P. putida* A (ATCC 12633) y el vector suicida pKNG101.

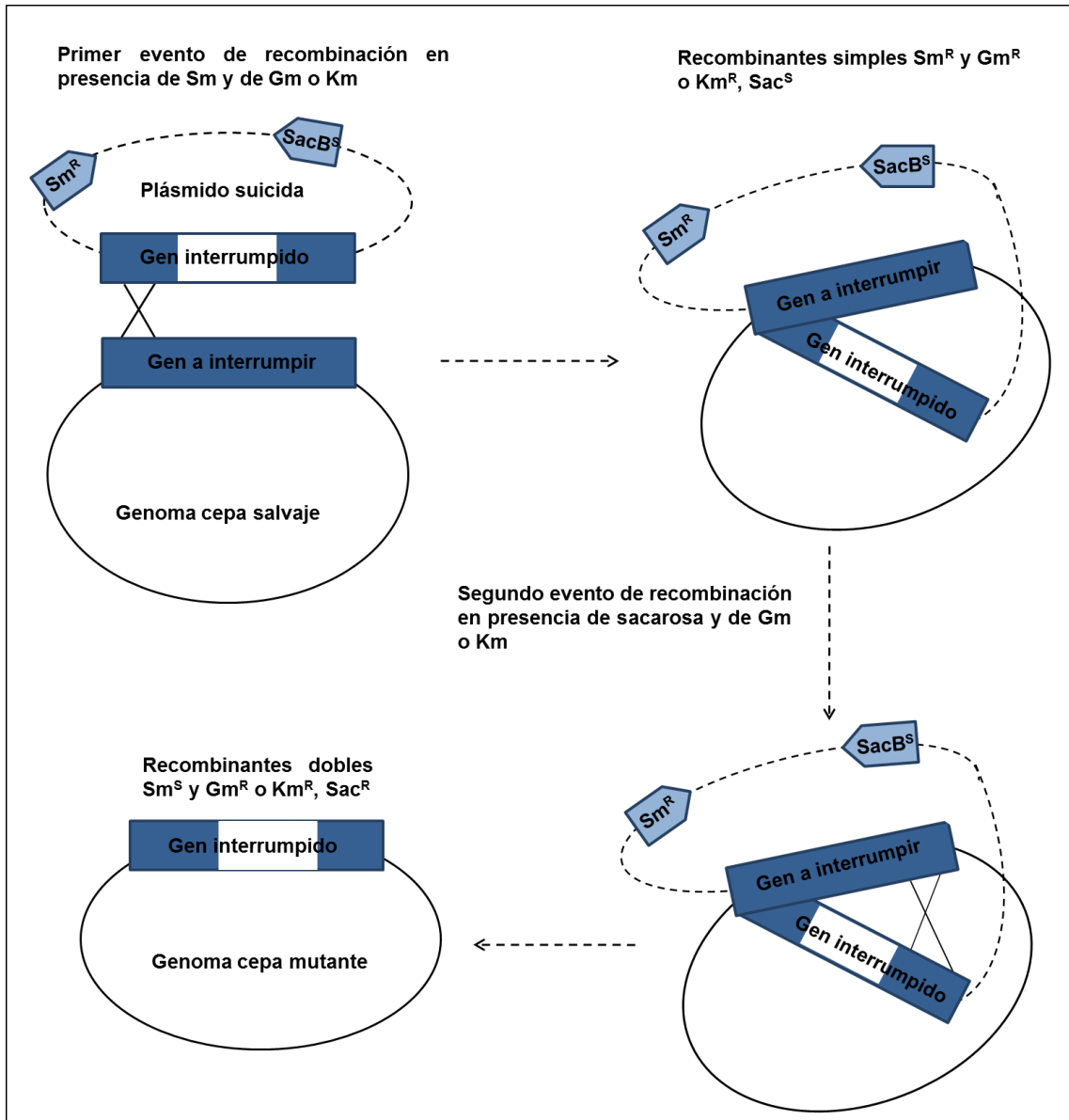


Figura 7: Representación esquemática del mecanismo de recombinación homóloga entre el genoma de *P. putida* A (ATCC12633) y del vector suicida pKNG101 conteniendo el gen de interés interrumpido.

3.8.- Confirmación de la inactivación de genes *cIs* en cepas mutantes

3.8.1.- Confirmación de la mutación deletérea del gen homólogo a *cIs* (*pp5364*)

Las colonias desarrolladas en presencia de sacarosa y Gm obtenidas luego de la doble recombinación homóloga (apartado 3.7) fueron seleccionadas como potenciales mutantes y repicadas en medio rico LB con la adición de Gm 120 $\mu\text{g}/\text{ml}$. A partir de las mismas se confirmó la interrupción del gen mediante PCR. Para ello los oligonucleótidos UpCIs4 y DownCIs4 fueron usados para amplificar el gen homólogo a *cIs* a partir del ADN genómico de *P. putida* A (ATCC 12633) 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 2**). La mutante obtenida fue denominada *P. putida* GL01 ($\Delta cls::aacC1$) (**Tabla 1**)

3.8.2.- Confirmación de la mutación insercional en el gen homólogo al *cls2* (*pp3664*)

Las colonias desarrolladas en presencia de sacarosa y Km obtenidas luego de la doble recombinación homóloga (apartado 3.7) fueron seleccionadas como potenciales mutantes y repicadas en medio rico LB con la adición de Km 75 $\mu\text{g/ml}$. La confirmación de la eventual inactivación del gen homólogo a *cls2* fue realizada por PCR. A partir de ADN de *P. putida* A (ATCC 12633) y de sus posibles mutantes, utilizando el par de oligonucleótidos oLPB23-3264/oLPB24-3264 (**Tabla 2**), se amplificó el gen homólogo a *cls2* (*pp3664*). El producto de amplificación obtenido a partir del genoma de *P. putida* A ATCC 12633 fue de aproximadamente 1,5 Kb, mientras que para las posibles mutantes el tamaño del producto de amplificación fue de aproximadamente 2,5 Kb. Esta diferencia de 1 Kb está dada por presencia del gen *aph(3')-IIa*, lo que permite corroborar la mutación correspondiente. La mutante fue denominada *P. putida* RH01 (*cls2::aph(3')-IIa*) (**Tabla 2**).

De la misma manera, la confirmación de la mutación insercional en el gen homólogo a *cls2*, también fue realizada utilizando como molde el ADN de las potenciales cepas dobles mutantes seleccionadas, luego de la recombinación homóloga del plásmido pRH03 en el genoma de *P. putida* GL01. La cepa doble mutante obtenida fue denominada *P. putida* RH02 ($\Delta cls::aacC1, cls2::aph(3')-IIa$).

3.9.- Complementación de *P. putida* RH02

P. putida RH02 (**Tabla 1**), fue complementada por separado con cada uno de los genes homólogos a *cls* (*pp5364*) y *cls2* (*pp3264*). Para ello, los oligonucleótidos oLGL01 y oLGL02 (**Tabla 2**) fueron usados para amplificar un fragmento *SalI* / *BamHI* de 1,4 Kb, correspondiente al gen homólogo a *pp5364* (*cls*) desde ADN genómico de *P. putida* A (ATCC 12633). De manera similar y partir de los oligonucleótidos oLGL12 y oLGL13 (**Tabla 2**) se amplificó un fragmento *XhoI* / *SacI* de 1,2 Kb, correspondiente al gen homólogo a *pp3264* (*cls2*), usando como molde ADN genómico de *P. putida* A (ATCC 12633). Ambos productos de PCR fueron digeridos y ligados al vector replicativo en *P. putida*, pBBR1MCS-3 (**Tabla 1**). Los plásmidos obtenidos, denominados pGL08 y pGL09 (**Tabla 1**), fueron introducidos, por separado, en *P. putida* RH02, a través de electroporación, siguiendo la metodología descrita por Choi *et al.*, (2003). Las células de *P. putida* RH02 portadoras de

los plásmidos de interés (**Tabla 1**) fueron seleccionadas en medio rico LB con la adición de Cm 100 µg/ml.

3.10.- Análisis bioinformáticos de secuencias

Para el análisis bioinformático de diferentes secuencias de interés, se llevaron a cabo alineamientos utilizando las herramientas presentes en los programas ClustalW (<http://align.genome.jp/>), ClustalX y del servidor on line BLASTP (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) del National Center for Biotechnology Information (NCBI)

3.11.- Sobreexpresión de CIs y CIs2 de *P. putida* A (ATCC 12633)

Utilizando ADN genómico de *P. putida* A (ATCC 12633) y a partir del par de oligonucleótidos oLGL05/oLGL07 (**Tabla 2**) se obtuvo un fragmento de aproximadamente 1,2 Kb correspondiente al gen homólogo a *cls* delecionado en aproximadamente 200 pb desde el inicio de dicho gen. A los pares de oligonucleótidos se les adicionaron sitios de corte para *Bam*HI y *Nde*I. El fragmento amplificado fue digerido con las enzimas de restricción mencionadas y ligado al vector de expresión pET-15b (**Tabla 1**) el cual fue digerido previamente con las mismas enzimas de restricción. El nuevo plásmido obtenido fue denominado pGL07.

De manera similar, utilizando los oligonucleótidos oLPB23-3264/oLPB24-3264 se obtuvo, a partir del genoma de *P. putida* A (ATCC 12633), un fragmento de aproximadamente 1,2 Kb correspondiente al gen homólogo a *cls2*. A los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen, se le adicionaron sitios de corte para *Bam*HI y *Sal*I, para posteriormente clonarlo en el vector de expresión pET28a, el cual fue digerido previamente con las mismas enzimas de restricción (**Tabla 1**). El plásmido obtenido se denominó pGL10.

Células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) (**Tabla 1**) fueron transformadas con los plásmidos pGL07 y pGL10, respectivamente. La selección de las células portadoras de los plásmidos de interés se llevó a cabo utilizando placas de LB suplementadas con Amp 200 µg/ml, (para pGL07) y Km 50 µg/ml (para pGL10). Las colonias desarrolladas fueron sometidas a extracción de plásmidos y posterior mapeo mediante enzimas de restricción.

Para la prueba de sobreexpresión, una colonia transformada con pGL07 o con pGL10, se inoculó en 3 ml de medio LB líquido suplementado con Amp 200 µg/ml o Km 50 µg/ml, respectivamente, se incubó a 37°C en agitación durante toda la noche y se agregó como inóculo al 1 % v/v a Erlenmeyers que contenían 10 ml de LB líquido, Amp 200 µg/ml o Km

50 µg/ml. Los cultivos se incubaron a 37°C en agitación hasta alcanzar una DO_{660} de 0,4-0,6. En ese momento se adicionó IPTG 0,2 mM o 2 mM de lactosa para inducir la sobreexpresión de Cls, mientras que para la inducción de la sobreexpresión de Cls2 se utilizó lactosa al 0,2 %; 0,5 % y 1 %. La **Figura 8** esquematiza el sistema de expresión utilizado

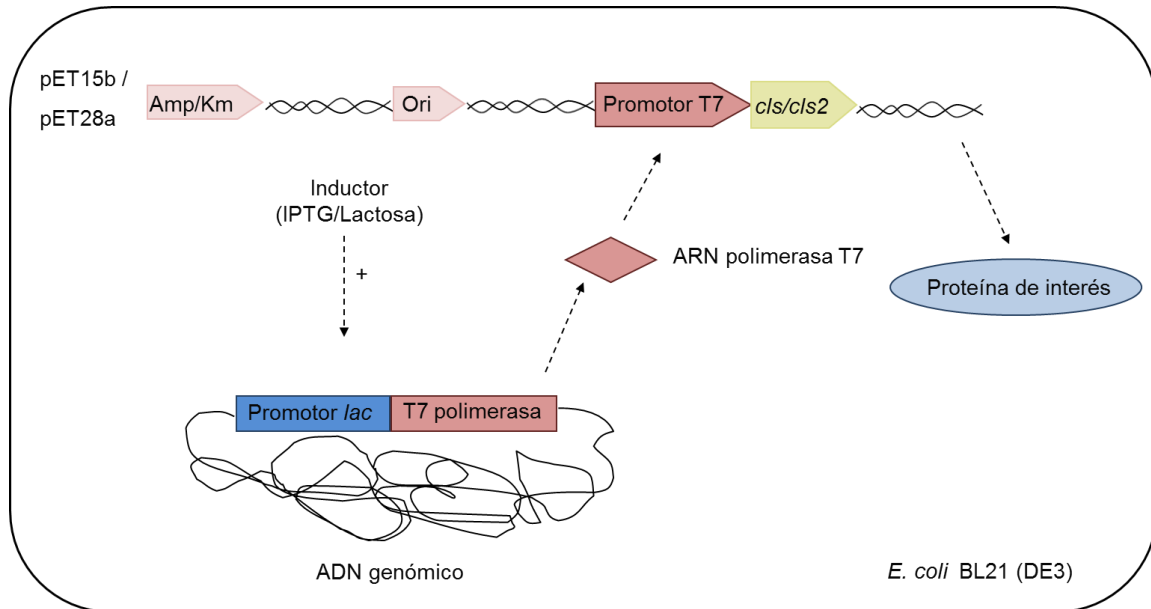


Figura 8: Esquema del sistema de expresión usado, pET15b/pET28a-*E. coli* BL21 (DE3).

Luego de la inducción, los cultivos se incubaron a temperatura ambiente, en agitación a 60 rpm, durante 12 horas. Pasado este tiempo, el cultivo se cosechó por centrifugación a 8000 rpm 5 min. El pellet bacteriano obtenido se resuspendió en 300 µl de SDS al 1 %, se lo llevó a ebullición por 5 minutos y luego se sonicó (sonicador Vibracell Sonics & Materials) a 40 amperes, 5 pulsos por segundo durante 1 minuto. El producto de sonicación fue clarificado por centrifugación durante 5 minutos a 10.000 rpm. El sobrenadante, fue centrifugado a 20.000 rpm durante 60 minutos, con el objetivo de separar la fracción de membrana. El pellet obtenido, conteniendo la fracción de membrana, fue suspendido en 100 µl de SDS al 1 %. Se tomó un volumen determinado de cada una de las fracciones (sobrenadante y fracción de membrana) las que fueron sometidas a electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) en gel de poliacrilamida al 12 % (apartado 3.22).

3.12.- Exposición de células de *P. putida* y sus mutantes isogénicas a TDTMA durante cortos periodos de tiempo

Para los ensayos de exposición a TDTMA durante cortos periodos de tiempo, *P. putida* A (ATCC 12633), *P. putida* GL01, *P. putida* RH01 y *P. putida* RH02 (**Tabla 1**) se

hicieron crecer en HPi-BSM con la adición de 20 mM de glucosa y 18 mM de NH₄Cl hasta final de la fase exponencial (DO₆₆₀=0,8-1). En ese momento se expusieron o no a 150 µM de TDTMA. Luego de 15 min de exposición al detergente, se tomaron alícuotas las que fueron centrifugadas a 8000 rpm por 5 min. Los pellets obtenidos, fueron resuspendidos en solución fisiológica y utilizados para determinación de proteínas (apartado 3.21) y extracción y análisis de fosfolípidos (apartado 3.18).

3.13.- Recuento de células viables

El recuento de unidades formadoras de colonias (ufc), de células de *P. putida* A (ATCC 12633) y *P. putida* RH02 expuestas a 50 mg/l de TDTMA, se llevó a cabo de acuerdo a la técnica de la microgota (Spencer y Ragout, 2001). Básicamente, se tomaron muestras de 10 µl de las condiciones ensayadas y se realizaron diluciones seriadas con solución fisiológica 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 µl de cada una de las diluciones seriadas. Las placas se incubaron durante 24 h en estufa, a 30° C y posteriormente se realizó el recuento de ufc.

3.14.- Ensayo de viabilidad en placa

Los ensayos de eficiencia en placa se llevaron a cabo siguiendo la metodología descrita por Sutterlin *et al.*, (2014), con ligeras modificaciones realizadas en nuestro laboratorio. Básicamente, células de *P. putida* A (ATCC 12633) y *P. putida* RH02 fueron crecidas en medio rico LB durante toda la noche. A partir de ambos cultivos se realizaron diluciones seriadas, las cuales fueron sembradas en placas de HPi-BSM conteniendo 20 mM de glucosa, 18 mM de NH₄Cl, 2 % de agar-agar y concentraciones crecientes de TDTMA (0, 50, 100 y 150 mg/l). Adicionalmente y para el caso particular de *P. putida* RH02, se agregó a las placas 50 µg/ml de CL comercial (Sigma Chemical Co., USA). Posteriormente, las placas fueron incubadas durante toda la noche en estufa a 30°C.

3.15.- Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Células de *P. putida* A (ATCC 12633) y *P. putida* RH02 crecidas en medio rico LB hasta final de fase logarítmica fueron examinadas por TEM. Para ello, las células fueron fijadas con solución de glutaraldehído 2,5 %, lavadas con solución buffer S-colidina 0,2 mol/l, pH 7,4, refijadas con tetróxido de osmio al 1 % (p/v) y lavadas nuevamente con el mismo buffer. La deshidratación se llevó a cabo a través de pasajes sucesivos en

concentraciones crecientes de acetona (1 x 50 %, 1 x 70 %, 1 x 90 %, 3 x 100 %). La preinclusión se realizó en resina epoxy EMBED 812 1:1 en acetona 100 %, durante toda la noche a temperatura ambiente y la inclusión con EMBED 812 a 56 °C, durante 48 h. Se obtuvieron cortes ultrafinos (20-60 nm), los que se contrastaron con acetato de uranilo 50 % durante 8 min y con citrato de plomo durante 30 min (Cristofolini *et al.*, 2012).

Los cortes ultradelgados de las células, fueron observados en microscopio electrónico de transmisión Elmiskop 101 (Siemens) y la adquisición de imágenes fue realizada con el software Digital Micrograph (Gatan, Japón).

3.16.- Tinción de células con 10 *N*-nonil naranja de acridina (NAO)

La visualización de CL en membranas de células de *P. putida* A (ATCC 12633), sus mutantes isogénicas y las cepas complementadas *P. putida* RH02 RH02/pGL08 y *P. putida* RH02 RH02/pGL09 (**Tabla 1**) se llevó a cabo utilizando el colorante fluorescente 10 *N*-nonil naranja de acridina (NAO). Este colorante tiene la particularidad de unirse al grupo polar de PL 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 por otros PL monoacídicos (Mileykovskaya *et al.*, 2000). Básicamente, células de *P. putida* A (ATCC 12633), sus mutantes isogénicas y las cepas complementadas, se hicieron crecer en medio rico LB hasta final de la fase exponencial ($DO_{660}=0,8$). En ese momento los cultivos fueron diluidos hasta alcanzar una $DO_{660}=0,2$ y 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).

3.17.- Obtención de células marcadas con TopFluor-CL

Células de *P. putida* A (ATCC 12633) (**Tabla 1**) fueron crecidas en medio HPi-BSM con la adición de glucosa y NH_4Cl y 100nM de TopFluor-CL (Sigma Chemical Co., USA), desde el inicio del crecimiento hasta una DO_{660} final de 0,8. En ese momento, las células marcadas fueron expuestas durante 1, 5, 10, y 15 minutos a 50 mg/l de TDTMA. Posteriormente, los PL fueron extraídos según Bligh y Dyer (1959) (apartado 3.18.1), separados por TLC, utilizando como mezcla de solventes: cloroformo:metanol:ácido acético (65:25:8) e identificados por Phosphor-Imager (ImageStation 4000MM PRO, Carestream, Molecular Imaging).

Para corroborar la incorporación de TopFluor-CL a las membranas, 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).

3.18.- Análisis de fosfolípidos

3.18.1.- Extracción de fosfolípidos

Se siguió la metodología descrita por Bligh y Dyer (1959). Básicamente, 45 mg de peso seco de células de *P. putida* 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 h 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.

3.18.2.- Cromatografía en placa delgada (TLC)

Los PL se resolvieron por TLC utilizando placas de sílica gel (Analtech, 200 microns). Se realizaron cromatogramas monodireccionales utilizando como mezcla de solventes: cloroformo/metanol/agua (65:25:4, v/v) (Edman y Ericson, 1987).

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.

3.18.3.- 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_f con los testigos correspondientes (Sigma Chemical Co., USA).

Tinción con vapores de yodo: La unión transitoria de las moléculas de yodo a los dobles enlaces de las cadenas carbonadas de los ácidos grasos de los PL permite detectar la aparición de manchas amarillo-pardo, reacción positiva a la presencia de lípidos (Marinetti, 1986). Las placas se colocaron en atmósfera saturada con vapores de yodo, durante 15 min aproximadamente.

Tinción de ninhidrina: 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 (Marinetti, 1986). Solución de pulverización: 0,2 % (p/v) de ninhidrina en acetona.

3.18.4.- Cuantificación de fosfolípidos

La cuantificación de PL se llevó a cabo según Fiske y SubbaRow (1925) con ligeras modificaciones realizadas en el laboratorio. Cada una de las fases clorofórmicas obtenidas previamente (apartado 3.18.1) 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 adicionaron 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, para obtener un volumen final de 900 µl. Se agitaron en vortex y 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 individuales, 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 H₂SO₄ 10 N, completando volumen final (1 l) con agua bidestilada.

3.18.5.- Obtención, identificación y cuantificación de PL marcados radiactivamente

El análisis de PL marcados radiactivamente se realizó luego de incubar células de *P. putida* A (ATCC 12633) y sus mutantes derivadas con [1-¹⁴C]-acetato (60 mCi/mmol, 2,26 Gbq/mmol, New England Nuclear) (de Rudder, *et al.*, 1997). Básicamente, células de *P. putida* A (ATCC 12633), *P. putida* GL01, *P. putida* RH01 y *P. putida* RH02 se hicieron crecer en HPI-BSM con el agregado de glucosa 20 mM y NH₄Cl 18 mM como fuentes de C y N, respectivamente, hasta DO₆₆₀ de 0,2. En ese momento se les adicionó 1μCi/ml de [1-¹⁴C]-acetato y los cultivos se siguieron hasta DO₆₆₀ final de 0,8 y 1,2 respectivamente.

Los PL fueron extraídos según Bligh y Dyer (1959), separados por cromatografía en capa fina monodimensional utilizando como sistema de solventes cloroformo:metanol:agua (65:25:4) (Edman y Ericson, 1987), e identificados por autorradiografía, utilizando placas radiográficas (Agfa-Gevaert film, Mortsel, Belsium. Kodak, Medical X-ray film, MXG Plus) comparando sus R_f con los testigos correspondientes.

Para la cuantificación, 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).

3.19.- Determinación del perfil de ácidos grasos de *P. putida* (A ATCC 12633) y *P. putida* RH02

Para determinar el perfil de ácidos grasos (AG), células de *P. putida* A ATCC 12633 y *P. putida* RH02, fueron crecidas en HPI-BSM con fuentes preferenciales de C y N hasta DO₆₆₀ final de 0,8. En ese momento, fueron expuestas o no a 150 μM de TDTMA durante 15 minutos. Posteriormente, los PL fueron extraídos según Bligh y Dyer (1959) y a partir de los mismos se obtuvieron los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME). Para ello, las fracciones lipídicas fueron metiladas con F₃B en CH₃OH al 14 %, (Morrison y Smith, 1964).

Los FAMES fueron analizados usando un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890, serie II equipado con una columna de metil-silicona (50 m longitud; 0,2 mm diámetro interior; 0,33 μm espesor de la película) y con un detector de ionización de llama. Las condiciones del GC fueron: Temperatura del inyector: 250 °C. Temperatura del detector: 300 °C. Se empleó nitrógeno como gas carrier. La temperatura de la columna se programó a 180

°C, isoterma durante 25 min y luego una rampa de 3 °C/min⁻¹ hasta alcanzar 250 °C. (Heredia *et al.*, 2014).

Los picos correspondientes a cada AG fueron identificados comparando los tiempos de retención con testigos standards purificados (Sigma Chemical Co., SL, USA). Cuando fue necesario, las muestras fueron enviadas para su análisis al Laboratorio de Análisis CG/EM de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario.

3.20.- Determinación de la fluidez de membrana

La fluidez de membrana fue determinada midiendo el grado de polarización de fluorescencia de la sonda 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) inserta en la membrana citoplasmática.

Los métodos de polarización cuantifican el grado de depolarización de la luz emitida por la sonda fluorescente embebida, como una medida del estado de la membrana (Mykytczuk *et al.*, 2007).

Siguiendo el procedimiento descrito por Trevors (2003), células de *P. putida* A (ATCC 12633) y *P. putida* RH02 crecidas en medio LB fueron cosechadas, lavadas en buffer Tris-HCl 15 mM estéril (pH 7.0) y resuspendidas en el mismo buffer hasta DO₆₆₀= 0,2. Posteriormente se agregó, cada 3 ml de cultivo resuspendido, 1 µl de la sonda fluorescente (solución stock: 12 mM en tetrahidrofurano) para obtener una concentración final de la sonda de 4 µM. Los cultivos fueron incubados con agitación a 200 rpm por 10 min, in oscuridad, a temperatura ambiente, para lograr la completa incorporación de DPH dentro de la membrana citoplasmática. Luego de este tiempo, se tomó una alícuota del cultivo y se determinó el valor de la polarización de fluorescencia, valor que se corresponde a la condición control (ausencia de TDTMA). Luego de esto, al resto del cultivo se le agregó 150 µM de TDTMA y se recolectaron alícuotas a diferentes tiempos (1, 5, 15, 20, 30 y 60 min) a las que se les determinó el grado de polarización como se describió anteriormente.

Las medidas de polarización de fluorescencia fueron realizadas en un espectrofluorómetro Hitachi 2500 con un polarizador Glam-Thomson. La longitud de onda de excitación para la sonda DPH fue 358 nm, y el rango de emisión fue tomado entre 400 nm y 500 nm, presentándose el máximo en 428 nm.

El grado de polarización se calculó a partir de la relación de polarización (P) usando la expresión: $P = (I_{VV} - I_{VH}G) / (I_{VV} + I_{VH}G)$ donde, I_{VV} e I_{VH} son las componentes de la intensidad de luz emitidas polarizadas verticalmente y horizontalmente, después de la excitación con luz polarizada verticalmente. G es el factor de sensibilidad de la detección del sistema (Lakowicz *et al.*, 1999).

3.21.- Determinación de proteínas

La concentración de proteínas fue determinada por el método de Bradford (1976). Se empleó albúmina de suero bovino como estándar.

3.22.- Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Las muestras de proteínas obtenidas de la sobreexpresión de Cls y Cls2 de *P. putida* A (ATCC 12633), fueron analizadas por electroforesis desnaturizante (12 % SDS-PAGE) utilizando el kit mini-PROTEAN 3 (Bio-Rad). La **Tabla 3** muestra la composición de los geles utilizados. Antes de la corrida electroforética, a cada una de las muestra se les adicionó β -mercaptoetanol 5 % v/v y Buffer Muestra Laemli (SDS 10 %, glicerol 10 %, azul de bromofenol 0,05 %) manteniendo una relación de 5 μ l de buffer por cada 30 μ l de muestra.

Tabla 3: Composición de geles de poliacrilamida utilizados en SDS-PAGE.

SDS PAGE	Gel concentrador	Gel separador
Tris-ClH 1,5 M pH 8,8	---	2ml
Tris-ClH 0,5 M pH 6,8	1,25ml	---
Acilamida 30 %	0,65ml	3,5ml
TEMED	5 μ l	5 μ l
APS 14 %	50 μ l	80 μ l
SDS 10 %	50 μ l	80 μ l
H ₂ O	3ml	2,6ml
Vol. Final	5ml	3ml

3.22.1.- Tinción de proteínas en geles

Al finalizar la corrida electroforética, los geles fueron sumergidos en 100 ml de solución de tinte *Coomassie Brilliant Blue R250* durante toda la noche. Posteriormente, se procedió a descartar esta solución y los geles se destiñeron mediante sucesivas inmersiones en solución de desteñido (metanol:acético:H₂O, 4:1:5) hasta obtener una óptima visualización de las bandas proteicas. Finalmente los geles fueron lavados y conservados en agua bidestilada. La **Tabla 4** muestra la composición de las soluciones utilizadas.

Tabla 4: Composición de soluciones de tñido y desteñido para geles de poliacrilamida.

Solución de tñido Coomassie Blue	
Coomassie Brilliant Blue R250	1,25 gr
Metanol	250 ml
H ₂ O	200 ml
Acido Acético concentrado	50 ml
Solución de Desteñido	
Metanol	400 ml
Acido acético concentrado	100 ml
H ₂ O	500 ml

El Coomassie se disolvió en metanol y se agitó vigorosamente, luego se adicionó el ácido acético concentrado, se mezcló bien, se agregó el agua y finalmente se filtró la solución con papel de filtro Wattman n°54.

3.23.- Obtención de fuentes enzimáticas

Se utilizaron como fuentes enzimáticas extractos crudos obtenidos por sonicación (3 ciclos de 1 min a 20000 Mhz) de células de *P. putida* A (ATCC 12633), *P. putida* RH01, *P. putida* RH02, *P. putida* RH02/pGL08, *P. putida* RH02/pGL09, *P. aeurginosa* PAO1 y *E.coli* crecidas bajo las condiciones nutricionales detalladas anteriormente (apartado 2.3).

Las células fueron cosechadas, lavadas y resuspendidas en diferentes soluciones amortiguadoras: buffer fosfato de sodio (pH 7.0), buffer fosfato salino (pH 7.4) o HEPES (pH 7.5) con el agregado de 1 µM de PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) y 2 µM de DTT (ditiotreitolo), según fueron utilizadas para determinación de actividad PLD utilizando como sustrato CL (Cole y Proulx 1975; Choi *et al.*, 2006) o actividad Cls utilizando como sustratos PG o PG y PE, respectivamente (Guo y Tropp 2000, Tan *et al.*, 2012).

3.24.- Obtención de [¹⁴C]-PE

Para la obtención del sustrato [¹⁴C]-PE utilizado en la determinación de actividad Cls que cataliza la síntesis de CL utilizando como sustratos PG y PE, células de *P. putida* A (ATCC 12633) se hicieron crecer a, 30°C, en HPI-BSM con la adición de glucosa 20 mM y NH₄Cl 18 mM como fuentes de C y N hasta DO₆₆₀ de 0,2. En ese momento se les adicionó 1 µCi/ml de [1-¹⁴C]-acetato y los cultivos se siguieron hasta DO₆₆₀ final de 0,8. Alcanzado este crecimiento, los cultivos se cosecharon por centrifugación y los PL fueron extraídos según Bligh y Dyer (1959), separados por cromatografía en capa fina monodimensional utilizando como sistema de solventes cloroformo:metanol:agua (65:25:4) (Edman y Ericson, 1987). El

revelado de los cromatogramas se llevó a cabo por tinción con vapores de yodo y la PE fue identificada mediante la comparación de su R_f con el testigo correspondiente.

Una vez identificado, la [¹⁴C]-PE fue extraída luego de raspar los cromatogramas. Para ello, a la sílica se le agregó 500 µl de cloroformo, se agitó en vórtex, se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min y la fase clorofórmica obtenida se secó bajo atmósfera de N₂. La [¹⁴C]-PE se resuspendió en un volumen determinado de cloroformo y se cuantificó en contador de centelleo líquido (Beckman LS 60001 C; Fullerton, CA, USA).

3.25.- Determinación de la actividad cardiolipina sintasa (CIs)

La determinación de la actividad CIs que cataliza la síntesis de CL por condensación de dos moléculas de PG se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito por Guo y Tropp, (2000) con ligeras modificaciones realizadas en nuestro laboratorio. Básicamente, la mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 100 µl, 1 µM de PG-NBD (1-oleoil-2-{12-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il)amino] dodecanoil}-sn-glicero-3-[fosfo-rac-(1-glicerol)] Avanti Polar Lipid), 0.03 % de Tritón X-100, 10 mM de β-mercaptoetanol, 320 mM de buffer fosfato de potasio (pH 7.0) y 1 mg/ml de proteínas. La reacción se inició con el agregado del extracto libre de células. Luego de 3 h de incubación a 30°C, en agitación, la reacción se detuvo por el agregado de 350 µl de metanol:cloroformo (2:1) y se continuó con la correspondiente extracción de PL según Bligh y Dyer (1959). El producto de reacción fue separado por TLC, utilizando como mezcla de solventes: cloroformo:metanol:ácido acético (65:25:8), identificado por Phosphor-Imager (ImageStation 4000MM PRO, Carestream, Molecular Imaging) y cuantificado utilizando el analizador de imágenes ScionImage.

La determinación de actividad CIs que utiliza como sustratos PG y PE, se realizó según la metodología descrita por Tan *et al.*, (2012), con algunas modificaciones. La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 100 µl, 1X de buffer fosfato salino (PBS) (pH 7,4), 10 mM de β-mercaptoetanol, 0,1 % de Triton X-100, 5 µM de PG, 5 µM de PE, 300 nCi/nmol de [¹⁴C]-PE y 1 mg/ml de proteínas. Luego de 60 min de incubación a 30°C, los PL se extraen según describen Bligh y Dyer (1959) y el producto de reacción, [¹⁴C]-CL, es separado por TLC, desarrollada en cloroformo:metanol:ácido acético (65:25:8), e identificado por autorradiografía.

3.26.- Determinación de la actividad Fosfolipasa D

La determinación de la actividad PLD que utiliza como sustrato CL se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito por Cole y Proulx (1975), con ligeras modificaciones realizadas en nuestro laboratorio.

Básicamente, la mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 100 μ l, 1 μ M de TopFluor-Cardiolipina (1,1', 2,2' [4 - (dipyrromethene difluoruro de boro) butanoil]-tetra oleoilcardiolipina, Avanti Polar Lipid), 100 mM de buffer fosfato de sodio (pH 7.0), 2,8 mM de ATP, 10 mM de Cl_2Mg y 1 mg/ml de proteína. La reacción se inició con el agregado del extracto libre de células (1 mg/ml de proteínas). Luego de 3 h de incubación, en agitación, a 30°C para extractos libres de células de *P. putida* A (ATCC 12633) o a 37°C para extractos libres de células de *E coli* y *P. aeruginosa* PAOI, la reacción se detuvo por el agregado de 350 μ l de metanol:cloroformo (2:1). Se continuó con la correspondiente extracción de PL según Bligh y Dyer (1959) y el producto de reacción fue separado por TLC, utilizando como mezcla de solventes: cloroformo:metanol:ácido acético (65:25:8) e identificado por Phosphor-Imager (Image Station 4000MM PRO, Carestream, Molecular Imaging).

Se utilizó además para la determinación de actividad PLD el protocolo descrito por Choi *et al.*, (2006), el cual fue desarrollado para la determinación de actividad de la PLD específica de CL (Mito PLD), presente en células eucariotas.

En un volumen final de reacción de 100 μ l, se colocaron 1 μ M de TopFluor-Cardiolipina, 50mM de HEPES, pH 7,5; 80 mM KCl, 1 mM de DTT, 3 mM de MgCl_2 , 2 mM de CaCl_2 y 1 mg/ml de proteínas de diferentes extractos libres de células obtenidos como se detalló previamente. Luego de 3 h de incubación, en agitación, a 30°C para extractos libres de células de *P. putida* A (ATCC 12633) y a 37°C para extractos libres de células de *E coli* y *P. aeruginosa* PAOI, la reacción se detuvo por el agregado de 350 μ l de metanol:cloroformo (2:1). El producto de reacción fue extraído según Bligh y Dyer (1959) y separado por TLC, monodireccional utilizando como mezcla de solventes: cloroformo:metanol:ácido acético (65:25:8). La identificación de los productos de reacción se llevó a cabo por Phosphor-Imager (Image Station 4000MM PRO, Carestream, Molecular Imaging).



4. – RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Capítulo I: Síntesis de cardiolipina en células de *P. putida* A (ATCC 12633): Aspectos moleculares y bioquímicos

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio demostraron que *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). También se ha demostrado que la exposición de esta cepa durante cortos períodos de tiempo a TDTMA muestra, respecto a células no expuestas, modificaciones en el contenido de sus PL aniónicos, con incremento en el contenido de PG y PA (120 % y 140 %, respectivamente) y disminución en CL (60 %) (Boeris *et al.*, 2007). En células de *P. putida* A (ATCC 12633) crecidas en presencia de TDTMA como única fuente de carbono y nitrógeno, se encontró que, si bien el perfil de PL es cualitativamente similar al que se detecta cuando *P. putida* crece en ausencia del detergente, los PL individuales se modifican detectándose, como cambios más significativos, aumentos de PG y PA de 6 y 20 veces, respectivamente (Boeris *et al.*, 2009).

Los cambios detectados a nivel de PL de membrana cuando *P. putida* A (ATCC 12633) se expone durante cortos períodos de tiempo a TDTMA, llevan a proponer que, posiblemente, cepas de *P. putida* A (ATCC 12633) carentes de CL o con muy bajos niveles de este PL en su membrana y, en consecuencia, con niveles aumentados de su precursor inmediato PG, podrían ser capaces de tolerar y adaptarse a crecer en presencia de elevadas concentraciones de TDTMA.

El recambio de PL aniónicos detectado en la respuesta bacteriana al surfactante, podría ser atribuido a la acción de una actividad PLD que utilice como sustrato CL. La hidrólisis de CL por acción de esta enzima, originaría el incremento de los niveles de PG y PA en la membrana. Además, no es posible descartar que una inhibición de la actividad cardiolipina sintasa (Cls), enzima responsable de catalizar en *P. putida* la síntesis de CL por condensación de dos moléculas de PG (von Wallbrunn *et al.*, 2002, Bernal *et al.*, 2007), esté involucrada en el recambio de PL detectado en presencia del detergente.

En base a estas hipótesis y con el objetivo de dilucidar el mecanismo por el cual *P. putida* A (ATCC 12633) modifica los niveles de sus PL aniónicos en respuesta al estrés generado por el TDTMA, se procedió, en primera instancia, a obtener cepas mutantes de *P. putida* A (ATCC 12633) para los genes homólogos a los descritos en *P. putida* KT2440, como cardiolipina sintasa (*cls*) y cardiolipina sintasa dos (*cls2*) (Nelson *et al.*, 2002).

4.1.1.- Identificación de genes involucrados en la biosíntesis de CL en *P. putida* A (ATCC 12633)

En la cepa de referencia secuenciada, *P. putida* KT2440 (<http://www.tigr.org/tigr-scripts/CMR2/GenomePage3>, Nelson *et al.*, 2002) han sido anotados, por homología de secuencia, dos orfs, *pp5364* (*cls*) y *pp3264* (*cls2*) como responsables de codificar para Cls. El producto deducido del orf *pp5364*, presenta un 99 % de identidad con los productos deducidos de los genes *cls* de *P. putida* DOT T1E (AAY27813, Bernal *et al.*, 2007) y de *P. putida* P8 (CAD29690, von Wallbrunn *et al.*, 2002) Por otro lado, el producto deducido del orf *pp3264* descrito por homología de secuencia en *P. putida* KT2440 como *cls2*, presenta un 52 % de identidad con la *Cls2* de *E. coli* (P0AA84, Guo y Tropp, 2000) y un 26 % de identidad con la *Cls2* de *S. aureus* (Koprivnjak *et al.*, 2011, BAB43175). Dicha comparación de secuencias, se llevó a cabo considerando las secuencias deducidas de los genes *Cls2* de *E. coli* y *S. aureus* ya que, hasta el momento, solo en estos microorganismos la función de dichos genes ha sido corroborada experimentalmente (Guo y Tropp, 2000; Koprivnjak *et al.*, 2011)

En función de ello, y a partir de la secuencia de nucleótidos de los orfs, *pp5364* (*cls*) y *pp3264* (*cls2*) de *P. putida* KT2440 (**Figura 9**), se diseñaron oligonucleótidos específicos (**Tabla 2**) para la amplificación por PCR de genes homólogos a éstos, utilizando como templado ADN genómico de *P. putida* A (ATCC 12633).

```

>pp5364 (cls)
ATGCATATGGATTACCACAGCCCTACTTCTTTGGTTACCTACTCGGCCGTATCCATCTGCTGGGTATTGTCCGGCAGCTGCATGC
GCTGTTACCCTGCGGACAGCCAGGGCGCCATTGCTTGGGGGATGCCTTGTCTTTCATCCCTACCTCACCTTGATCCCTACC
TGATCTTCGGGCCCCGCTCGTTCTATGCCTACATCAAGGCTCGGGCCAGGCCAACAGGAAATGCACGTGGCCATGGCCAACCTC
AACTGGCGGCCCTGGGTGAAGAAGCCCTTACCGCCCGGAGTCGGAAAGCTACACAGCCTTGGCGCCATGCCAAGCTGGGTGG
AATGCCATGCCTGGCAAATAACCAGGTGAAACTGCTGATCAATGGCAAAGCCACCTTCGATGCCATCTTCGCAGCCATCGAAAAAG
CAGCGATGTGGTACTGGTGCAGTTCTTCATCATTTCATGACGACACCCCTCGGCAAGGCACTGCAGCAACTCTTGTGCAAGAGCC
GCCGAAGGCGTGCAGGTGTTCTGCTGTACGACCGTGTCCGGTAGCCATGCCTTGCCGTCCAGCTACAGCCAGGTGCTGCGTGACGG
CGGTGTGCAGATCCATGCATTGCCACAGCTCGCGGTGGTTCACCCGCTTCCAGGTGAACCTCCGCAACCATCGCAAGATTGTGG
TGGTGGATGGCTTGTCTCGGCTTCATCGCGGCCACAATGTGGGAGACGAGTACCTGGGTGAACATCCACAGCTTTCCTTGGCGT
GACACCCAGTACAGATCAGCGGGCCAGTACTGGCCTGCCTCAAGAGTTCGTTCCGCGAGGACTGGTACTGGGCCAGCGCCAGCT
ACCGCCGCTGATCCTGCCGATACATACCCGGATAACGGCGTCTGTGTCAGGCCTTGGCCAGCGGCCCGGCAGACCCACAAGAAA
CCTGCTCGCTGTTCTTCCCTTGAAGCGATTTCATTCGGCCACCCGAGGGTGTGGATCACAGCCGCTACTTCATCCCTGACGAGGCC
GTGTTCCGCGCTTGGCGGTGGCGGTGTACGAGGAGTCGATGTGCGGGTGTGATCCCGTACAGCCCTGACCCGATCGTCTA
CGCCGCTCCAGCCTGTTGCCTTCGAAGCAGTGCAGCGGGGGTACGTATGTTCCGTTACCAACCCGGGTTTCTGCATCAGAAG
TGGTGCCTGGTGCATGATGACGTCAGCGCAATTGGGAGTGCACACCCGCTCGTTCCGCTGAACTTCGAGATTACCCCTG
CTGACAGTCGATCGCGCTTCGCGGACAGGTGCAGCACATGCTCCAGGAAGACTTCGAACAAGCGGGGAAATTAAGTCTGAAGA
CACCAAGATACCCATCGACTGCAGCAATTGGGGATGCGGATTGCGCGCTGATATCGCCGATCTTTAG

>pp3264 (cls2)
GTGAACCGACCTTGGGTAGACGGCAACAGCGTGCAGTTGCTGATCAATGGCGAGCAGTATTACCCCGCGTGTTCGAGGCCATGGC
CCAGGCGCGGAAGAAATATTGCTGGAACCTTCATCATCTTCGACGACAAAAGTGGGCAAGCAATTGCAGCAGGTGTTGATCGAGG
CTGCCCCGGCGGAGTACGCGTGAAGTGGTCCGGATGGCTACGGCACAGCCGAGCTGCCGCTGAATTCATTCAGCGATGACC
GACGCGGTGTGAGCTTTCATCCCTTCGATCCACAACCCGCTTGTGGGCAATGCGCACCAACCTGTTTCGCGCTTTCAGCCGAA
GATCGTGGTGGTGCATGGTGCAGCAGGCCTTCATCGCGGTATCAACTACAGCGCCGACCATTTAGGCGACTTTGGTGCATGGCCA
AGCAGGACTATGCCGTGGAGGTCACTGGGCCGCTAGTGGCGCAGGTACATTCAGCCAGTAAGCGCCTGATGTCCTCCGTGCTGCAG
CCACCCAGTGGCGTACGCCCCGTTACCGAGCCCGCGGTAGCAGCAGTGTGTTGATCGAGCGTGACAACGGCATGCGCAGCAC
CGATATCGAGGCACACTACCTTCAGCGGTTTCGTAAGCCCGGCAACGCATTTGGTGCCTGATTTCTTCCAGGCTACC
GGCTGATGCGTGCAGTGCACAACCGGGCCCGGCTGGCGTGGAGGTTTCGGTTGATTTTGCAGGGCCAGCCGACATGCGCTGGGTA
CGCGCACTGTGCGCCTGCTGTACAACCTACCTGCTGCGGACGCGGTGAAGATTCATGAGTACTGCCAGCGGCGTTCACGGCAA
GGTGGCACTGGTGGACACCAATGGGCCACCGTCCAGCAACCTCGACCCCTGAGCCTGCTGTTCAACCTGGAGGCCAACCC
TGTTTCATTCGTGACCGGCTTCAACCAGCAACTGCACCAGCATCTGCAGACACTGGCCAGCGAGCAATGCAACCCGGTCAACCTG
GAGCGCATGATTCGCGGCTACTGGTGGCGAGCACCGTTGATCTTCGTGTGCTTCCACGTGATCCGCACTTCCCGCGCATTCGCGG
CTGTTCCCTGCGCACCGGCAGCGTTTCGCTCGGTGCAGCCGGAAGCCGAACCCAGGGCAACTTGCAGAGGGCAACTCTCTGA

```

Figura 9: Secuencias completas de los genes *cls* y *cls2* de *P. putida* KT 2440. Se señalan los sitios de restricción internos para *NcoI*, *StuI* (*cls*) y *StuI* (*cls2*), los cuales fueron considerados para la correspondiente inactivación de dichos genes.

El fragmento amplificado a partir del genoma *P. putida* A (ATCC 12633) de aproximadamente 1,8 Kb, homólogo a *cls* (*pp5364*), fue clonado en pCR2.1-TOPO (Invitrogen) y posteriormente subclonado en pUC18 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985). El fragmento de aproximadamente 1,5 Kb, correspondiente al gen homólogo a *cls2* (*pp3264*), fue clonado en pGem[®]T Easy (Promega). Ambas construcciones fueron enviadas a secuenciar a MacroGen (Korea).

Mediante el uso de BLASTN del NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), se obtuvieron los alineamientos de las secuencias de los fragmentos clonados con las secuencias de la base de datos no redundante del GenBank. Dicho alineamiento indicó que el fragmento clonado en pUC18, posee un 88 % de identidad con el gen *cls* de *P. putida* KT2440, un 97 % con el de *P. putida* P8 (von Wallbrunn *et al.*, 2002) y un 86 % de identidad con el de *P. putida* DOT-T1E (Bernal *et al.*, 2007).

Por otro lado, el fragmento clonado en pGem[®]T Easy posee 97 % de identidad con el gen *cls2* de *P. putida* KT2440, un 66 % con el de *E. coli* (Guo y Tropp, 2000) y un 46 % con el *cls2* de *S. aureus* (Koprivnjak *et al.*, 2011).

Las secuencias parciales de los genes *cls* y *cls2* de *P. putida* A (ATCC 12633) fueron anotadas en la base de datos de secuencias no redundante del GenBank. Los números de ID asignados para cada gen fueron: *cls* (*kf835427*) y *cls2* (*kf835428*).

4.1.2.- Obtención de cepas mutantes de *P. putida* A (ATCC 12633) afectadas en *cls* y/o *cls2*

4.1.2.1.- Inactivación del gen homólogo *cls* (*pp5364*) en *P. putida* A (ATCC 12633)

La inactivación del gen *cls* se llevó a cabo mediante la delección de un fragmento interno (0.6 kb aproximadamente) de dicho gen y la posterior inserción de un cassette de resistencia a Gm (*aacC1*), según se describe en Materiales y Métodos (apartado 3.6.1). La cepa mutante obtenida se denominó *P. putida* GL01. La mutación fue corroborada por PCR. La **Figura 10**, muestra los productos correspondientes a las amplificaciones del gen homólogo a *cls* y *aacC1a* partir del genoma de *P. putida* A (ATCC 12633) y *P. putida* GL01. Para ello, los oligonucleótidos UpCls4 y DownCls4 (**Tabla 2**) 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 2**).

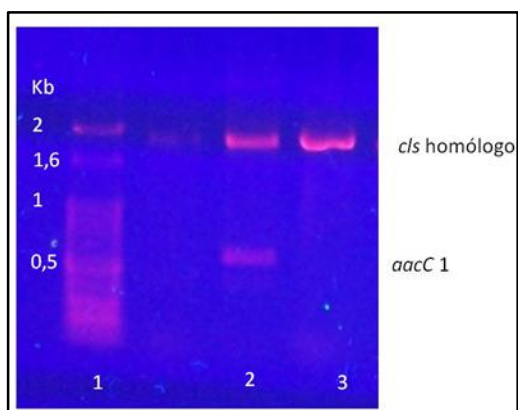


Figura 10: Productos de amplificación obtenidos a partir del genoma de *P. putida* A (ATCC 12633) y *P. putida* GL01. Se amplificó el gen homólogo a *cls* y el producto de amplificación fue utilizado como molde para amplificar el gen de resistencia a gentamicina (*aacC1*). Calle 1: marcador de peso molecular. Calle 2: cepa mutante. Calle 3: cepa salvaje.

Como se desprende del análisis de la **Figura 10**, se obtuvo un fragmento amplificado conteniendo gen homólogo a *cls* (1,8 Kb), a partir del genoma de la cepa salvaje (calle 3), como así también, del genoma de la cepa mutante *P. putida* GL01 (calle 2). Ambos fragmentos fueron utilizados como molde para la amplificación del gen de resistencia a Gm, *aacC1* (0,6 Kb) con el objetivo de corroborar la mutación delecional en *cls*. El fragmento de 0,6 Kb correspondiente al gen *aacC1*, solo fue amplificado a partir del fragmento de 1,8 Kb

correspondiente a la cepa mutante *P. putida* GL01 (calle 2). Este resultado permitió corroborar la inactivación del gen homólogo a *cls* en *P. putida* GL01.

4.1.2.2- Inactivación del gen homólogo a *cls2* (*pp3264*) en *P. putida* A (ATCC 12633)

La inactivación del gen homólogo a *cls2* en *P. putida* A (ATCC 12633), se llevó a cabo mediante la inserción de un cassette de resistencia a Km (*aph(3')-Ila*) (apartado 3.6.2). La cepa mutante obtenida se denominó *P. putida* RH01. La mutación fue corroborada por PCR (**Figura 11**) utilizando los oligonucleótidos oLPB23-3264/oLPB24-3264 (**Tabla 2**) que permitieron la amplificación de un fragmento de 1,5 Kb para la cepa salvaje (calle 2) y de 2,5 Kb para la cepa mutante (calle 3), respectivamente. La diferencia de 1 kB entre los productos de amplificación obtenidos a partir de la cepa salvaje y mutante, se debió a la presencia del gen *aph(3')-Ila* en el producto de amplificación obtenido a partir del genoma de la cepa mutante. Estos resultados confirmaron la inactivación del gen homólogo a *cls2*.

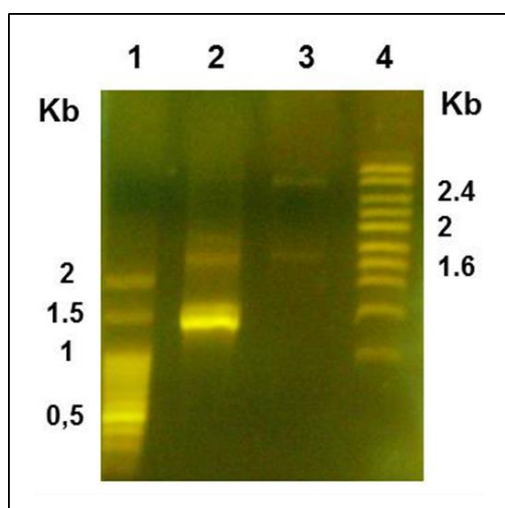


Figura 11: Productos de amplificación obtenidos a partir del genoma de *P. putida* A (ATCC12633) y *P. putida* RH01. Se amplificaron los fragmentos correspondientes al gen homólogo a *cls2* y al constructo *cls2::aph(3')-Ila*, respectivamente. Calle 1: Marcador de peso molecular (100 pb). Calle 2: cepa salvaje. Calle 3: cepa mutante. Calle 4: marcador de peso molecular (400 pb).

4.1.2.3.- Obtención de una cepa doble mutante de *P. putida* A (ATCC12633) afectada en los genes homólogos a *cls* (*pp5364*) y *cls2* (*pp3264*)

Para la obtención de *P. putida* A (ATCC12633) doble mutante en los genes que codifican para Cls y Cls2, el plásmido pRH03 (**Tabla 1**), fue introducido por electroporación en células de *P. putida* GL01 (**Tabla 1**) generando la cepa mutante *P. putida* RH02. La mutación fue corroborada por PCR, de manera similar a lo descrito para *P. putida* RH01 (no mostrado).

4.1.3.- Caracterización fisiológica de *P. putida* GL01, *P. putida* RH01 y *P. putida* RH02

4.1.3.1.- Crecimiento de *P. putida* A (ATCC 12633) y sus mutantes isogénicas en diferentes condiciones nutricionales

Luego de la obtención de cepas de *P. putida* A (ATCC 12633) mutantes en los genes *cls* y *cls2*, se evaluó el comportamiento de las mismas haciéndolas crecer en condiciones no estresantes de cultivo, con el objetivo de determinar si la inactivación de los genes *cls*, *cls2* o de ambos, generaba alguna alteración en el crecimiento bacteriano en estas condiciones de cultivo.

Las curvas de crecimiento de las cepas mutantes *P. putida* GL01, *P. putida* RH01, *P. putida* RH02 y de su cepa parental crecidas en medio rico LB o en HPI-BSM con fuentes preferenciales de carbono y nitrógeno (glucosa y NH₄Cl) se muestran en la **Figura 12**.

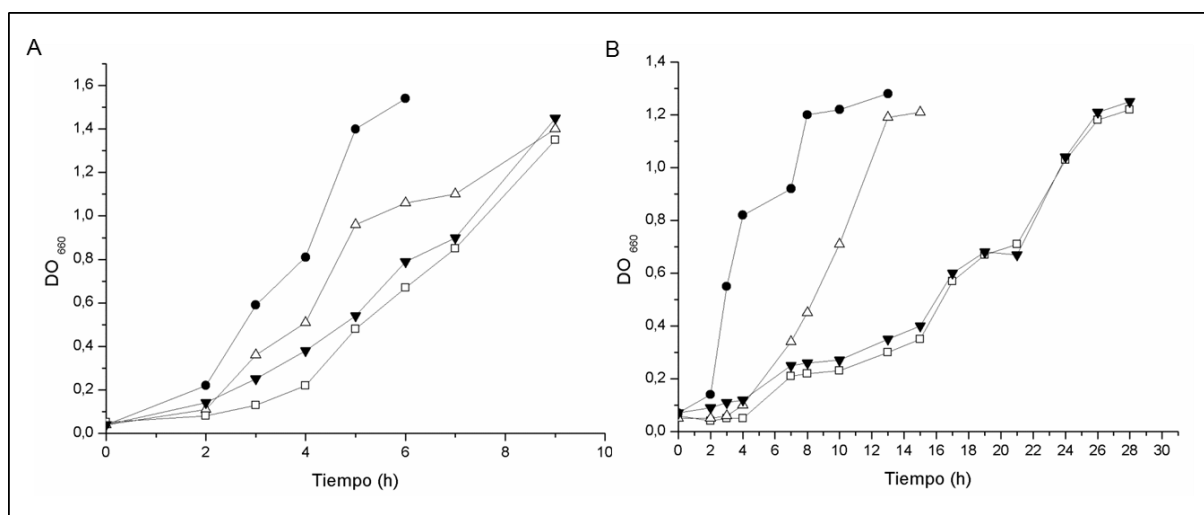


Figura 12: Crecimiento de *P. putida* A (ATCC 12633) (●), *P. putida* GL01 (Δ), *P. putida* RH01 (▼) y de *P. putida* RH02 (□) en: (A) medio rico LB o en (B) HPI-BSM con glucosa y NH₄Cl. Se realizaron extracciones periódicas del cultivo, a las cuales se le determinó el crecimiento por medición espectrofotométrica de la turbidez del cultivo a 660 nm.

Del análisis de la **Figura 12**, se desprende que las mutantes simples *P. putida* GL01 y *P. putida* RH01 crecidas en medio rico (A) presentaron una fase de latencia levemente extendida y un mayor tiempo de generación, respecto a lo detectado para la cepa parental en la misma condición nutricional. Los tiempos de generación (Tg) para *P. putida* GL01 y *P. putida* RH01 fueron de 2,31 h y 4,06 h respectivamente, mientras que para la cepa salvaje el Tg fue de 1,26 h.

A diferencia de lo descrito para las cepas mutantes simples (**Figura 12**), la cepa doble mutante *P. putida* RH02 presentó, durante su crecimiento en medio LB, un tiempo de generación similar al obtenido con la cepa salvaje (1,53 h y 1,03 h, respectivamente) y una

fase de latencia considerablemente más extendida en comparación a la obtenida con dicha cepa.

Cuando se analizó el crecimiento en medio salino con fuentes preferenciales de C y N (**B**), tanto las mutantes simples *P. putida* GL01 y *P. putida* RH01, como la doble mutante *P. putida* RH02, mostraron fases de latencia y Tg considerablemente mayores a los detectados en cepa parental, en las mismas condiciones de crecimiento. *P. putida* GL01 y *P. putida* RH01, presentaron un período de latencia de aproximadamente 5 h y 14 h respectivamente, los cuales fueron más prolongados (en particular el periodo de latencia detectado en *P. putida* RH01) respecto al obtenido con la cepa salvaje (1,3 h). Los Tg detectados fueron de 3,01 h y 4,5 h aproximadamente, para *P. putida* GL01 y *P. putida* RH01, mientras que el detectado para la cepa salvaje fue de 2,03 h aproximadamente.

P. putida RH02 presentó una fase de latencia similar a la detectada en *P. putida* RH01 (aproximadamente de 14 h) y un notable incremento en el Tg en comparación con las demás cepas (11,9 h).

En diferentes cepas mutantes para *cls*, tales como, *P. putida* DOT T1, *P. putida* P8 y *B. subtilis*, 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 no estresantes de crecimiento (Tropp, 1997 y citas incluidas). Por otro lado, considerando que los PL aniónicos, tales como CL y PG, han sido asociados con ciertas funciones celulares, tales como la correcta división celular e inicio de replicación de ADN (Xia y Dowhan, 1995; Kaway *et al.*, 2004; Mileykovskaya y Dowhan, 2005), posiblemente una alteración en los niveles normales de CL en la membrana, generada mediante la inactivación de genes involucrados en la síntesis de este PL, como el que se detecta para *P. putida* RH02, podrían alterar la correcta división celular bacteriana, prolongando así la fase de latencia y los tiempos de generación en diferentes condiciones nutricionales.

Cuando *P. putida* GL01 se hizo crecer en medio salino con TDTMA como única fuente de C y N, se obtuvo un crecimiento similar al que se detectó con la cepa salvaje para esta condición nutricional (no mostrado). Para estas dos cepas, la densidad celular obtenida al final de fase logarítmica es menor que la que se detecta cuando las mismas se hacen crecer en condiciones no estresantes de cultivo ($DO_{660} = 0,4$ luego de 48 h de cultivo). Es de destacar, sin embargo, que cuando *P. putida* RH01 y *P. putida* RH02 se hicieron crecer en HPI-BSM con TDTMA como única fuente de C y N, no se detectó crecimiento, aun manteniendo el cultivo en las condiciones adecuadas de agitación y temperatura durante

más de 5 días (no mostrado). Si bien, a través de estudios de crecimiento, no es posible atribuir a que se debe el comportamiento detectado cuando TDTMA se utiliza como única fuente de C y N, es claro, de los resultados obtenidos a través de la caracterización fenotípica de las diferentes cepas mutantes, que la inactivación de los genes *cls* y/o *cls2* no es letal para el crecimiento de las mismas bajo condiciones no estresantes de cultivo.

4.1.3.2.- Distribución porcentual de los fosfolípidos de *P. putida* A (ATCC 12633) y de sus mutantes isogénicas crecidas en condiciones no estresantes de cultivo

Células de *P. putida* A (ATCC 12633) y sus mutantes isogénicas *P. putida* GL01, *P. putida* RH01 y *P. putida* RH02, fueron crecidas hasta final de la fase exponencial ($DO_{660}=0,8$), en medio mínimo con la adición de glucosa y NH_4Cl . En ese momento las células fueron cosechadas y se procedió al análisis de PL.

En la **Figura 13** se muestran los resultados obtenidos de la composición fosfolípida de células de *P. putida* A (ATCC 12633) y de las mutantes isogénicas crecidas en estas condiciones de cultivo. Cabe destacar que para todas las cepas evaluadas, se detectó un patrón de PL similar identificándose en cada una de ellas: CL, PE, PG, PC, LPE y PA.

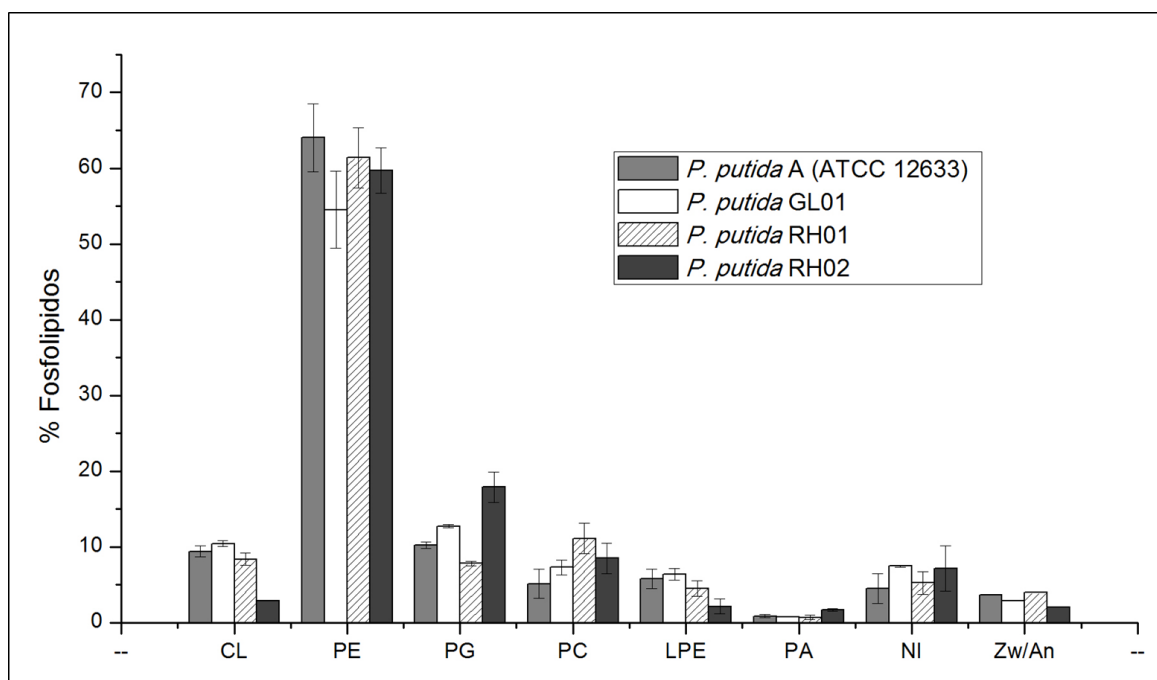


Figura 13: Composición de PL de *P. putida* salvaje y mutantes isogénicas crecidas en HPI-BSM-Glucosa/ NH_4Cl expuestas o no a TDTMA. Las células fueron crecidas en medio HPI-BSM con glucosa y NH_4Cl hasta el final de la fase exponencial. En ese momento las células fueron cosechadas y los PL extraídos, separados en TLC desarrollada con cloroformo:metanol:agua (65:25:4). Los PLs fueron cuantificados por el contenido en Pi luego de raspar los cromatogramas a nivel de cada uno de los PLs identificados. 1 mol de Pi corresponde a 1 mol de PL, excepto para CL (difosfatidilglicerol), donde 2 moles de Pi corresponden a 1 mol de este PL. Los datos representan la media $n = 3 \pm SE$.

Como se desprende del análisis de la **Figura 13**, el perfil fosfolipídico de *P. putida* GL01 y *P. putida* RH01 es similar al detectado en su cepa parental. Particularmente es de hacer notar que no se evidenciaron cambios significativos en el contenido de CL y PG en las cepas mutantes simples en comparación con lo obtenido para la cepa salvaje. Si bien, respecto a la cepa parental, en *P. putida* GL01 se detecta una disminución en los niveles de PE (aproximadamente un 30 %), para ambas cepas PE sigue siendo el PL mayoritario.

Estos resultados, difieren considerablemente a lo descrito para otros microorganismos, los cuales poseen en sus genomas más de un gen que codifica para potenciales Cls. Tal es el caso de *E. coli*, *B. subtilis*, *P. putida* DOT T1 y *X. campestris*, las cuales poseen en sus genomas dos, tres y hasta seis genes que codifican para Cls. En estos microorganismos ha sido descrito que la mutación de sólo uno de los genes que codifican para Cls lleva a una marcada disminución en los niveles de CL en la membrana (López *et al.*, 2006, Bernal *et al.*, 2007, Tan *et al.*, 2012, Moser, *et al.*, 2014).

En *P. putida* RH02 (**Figura 13**), la cuantificación de los PL individuales mostró, respecto a la cepa parental, una disminución del contenido de CL del 60 %, mientras que los contenidos de PG y PA se incrementaron un 100 %.

Las variaciones en el contenido de PL específicos detectadas en *P. putida* RH02 fueron confirmadas utilizando [1-¹⁴C]-acetato para marcar radiactivamente los PL de membrana (apartado 3.18.5). La extracción y posterior cuantificación de los PL identificados (apartado 3.18.5) mostró en *P. putida* RH02, respecto a la cepa salvaje, una disminución en el contenido de CL del 60 % (de 1,68 Bq/mg de proteína a 1,04 Bq/mg de proteína), incremento en el contenido de PG de 120 % (de 14,72 Bq/mg de proteínas a 35,3 Bq/mg de proteínas) y aumento en el contenido de PA de 65% (0,82 Bq/mg de proteínas a 1,36 Bq/mg de proteínas).

Estos resultados indican claramente que en *P. putida* A (ATCC 12633) existen, al menos, dos genes que codifican para Cls funcionales ya que solo la disrupción o inactivación de ambos genes permite la obtención de una cepa con bajos niveles de CL en su membrana (*P. putida* RH02). Un comportamiento similar ha sido descrito en *Staphylococcus aureus*. Este microorganismo posee en su genoma dos *orfs* (*cls1* y *cls2*, NC_002745 y NC_002976), cuya caracterización mostró que codifican para Cls activas. Solo la disrupción de ambos genes lleva a la carencia total de CL en la membrana de este microorganismo (Koprivnjak *et al.*, 2011; Tsai *et al.*, 2011).

La **Figura 14** muestra la distribución de CL, visualizada por el uso del colorante fluorescente 10 *N-nonil* naranja de acridina (NAO) (apartado 3.16), en células de *P. putida* A

(ATCC 12633), *P. putida* GL01, *P. putida* RH01 y *P. putida* RH02 crecidas en HPi-BSM en presencia de fuentes preferenciales de C y N hasta final de la fase exponencial.

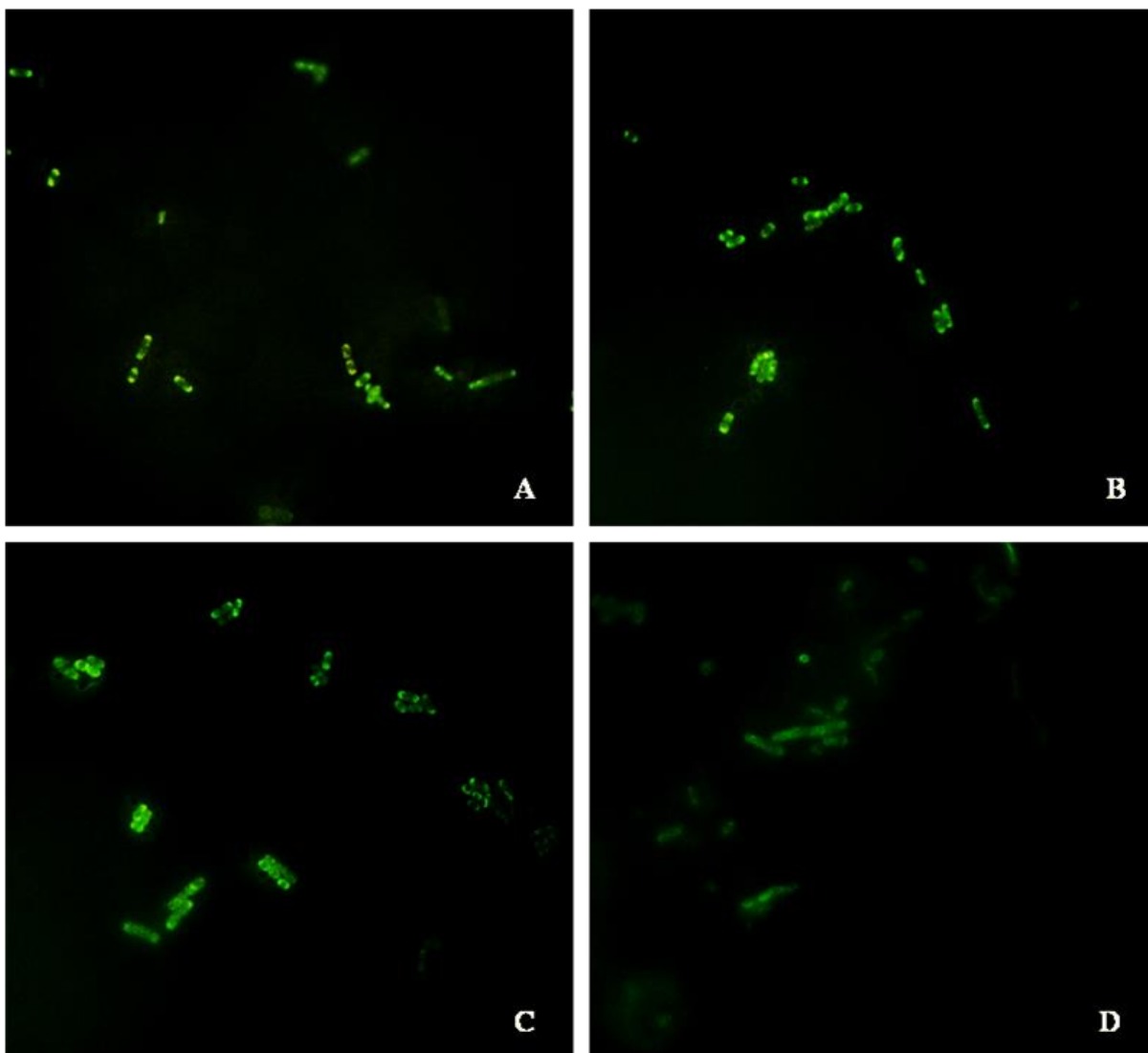


Figura 14: Visualización de CL en membranas. *P. putida* A (ATCC 12633) y sus mutantes isogénicas fueron crecidas en HPi-BSM en presencia de fuentes preferenciales de C y N hasta final de la fase exponencial. En ese momento las células se cosecharon y se tiñeron con NAO, según lo descrito en el apartado 3.16. Los preparados fueron visualizados en microscopio de fluorescencia. A) *P. putida* A (ATCC 12633), B) *P. putida* GL01, C) *P. putida* RH01, D) *P. putida* RH02.

Como puede observarse, no se detectaron diferencias en la distribución de CL entre células de *P. putida* A (ATCC 12633) (**A**) y las mutantes simples *P. putida* GL01 (**B**), *P. putida* RH01 (**C**). Los spots de fluorescencia verde fueron visualizados en los polos de células y otros cercanos al septo de división

En *P. putida* RH02 (**D**) puede observarse una distribución de CL diferente en comparación con su cepa parental. En la cepa doble mutante, no se visualizaron spots de fluorescencia verde en los polos de las células, si no que el remanente de CL detectado, presentó una distribución uniforme a lo largo de la membrana.

La similar distribución de CL detectada en las cepas mutantes simples *P. putida* GL01 y *P. putida* RH01 concuerda con el hecho de que en ambas cepas los niveles de CL detectados son muy similares a los de detectados en su cepa parental (**Figura 13**). Asimismo, la distribución de CL que se detecta en determinadas regiones (polos y septo de división) coincide con lo demostrado en otros microorganismos, tales como *E. coli*, *B. subtilis* y *P. putida* DOT T1 (Mileykovskaya y Dowhan 2000; Bernal *et al.*, 2007; Renner y Weibel, 2011). La existencia de estos dominios de CL en las membranas bacterianas ha sido asociada al correcto funcionamiento de ciertas actividades celulares, como es el caso de la formación del septo de división celular e inicio de replicación de ADN (Renner y Weibel, 2011; Saxena *et al.*, 2013), el ensamblaje y posicionamiento de proteínas de membrana y enzimas involucradas en la síntesis de PL y ácidos grasos (Mileykovskaya y Dowhan 2009), la funcionalidad de bombas de eflujo (Bernal *et al.*, 2007, Renner y Weibel, 2011), la translocación de proteínas de membrana externa (Kusters *et al.*, 1991; Gold *et al.*, 2010), entre otras.

La diferencia en la distribución de CL detectada en la cepa doble mutante *P. putida* RH02, en comparación a su cepa parental y con lo detectado en las mutantes simples, coincide con lo demostrado en una cepa mutante de *P. putida* DOT T1 (Ramos *et al.*, 1995) afectada en genes *cIs*. La caracterización de esta cepa mutante mostró que el remanente de CL que se detecta en la cepa presenta una distribución uniforme a lo largo de la membrana, y que las células poseen un tamaño más pequeño, una membrana plasmática más rígida y mayor sensibilidad al tolueno y a ciertos antibióticos (Bernal *et al.*, 2007).

4.1.3.3.- Microscopía electrónica de transmisión de células de *P. putida* RH02

Con el objetivo de determinar si los bajos niveles de CL detectados en *P. putida* RH02 generaban algún efecto sobre la morfología celular, se procedió a realizar el análisis estructural a través de microscopía electrónica de transmisión (TEM). Mediante esta técnica, se evaluó la morfología de células de *P. putida* RH02, crecidas con fuentes preferenciales de carbono y nitrógeno. Se incluyó, a modo comparativo, el análisis estructural de células de *P. putida* A (ATCC 12633) crecidas bajo las mismas condiciones nutricionales (**Figura 15**).

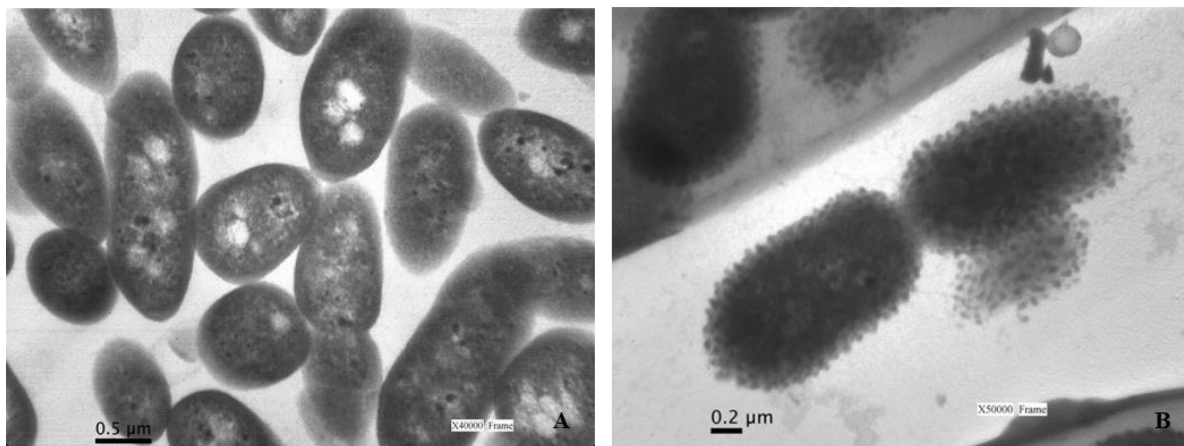


Figura 15: Microscopía electrónica de trasmisión de células de *P. putida* A (ATCC 12633) (A) y *P. putida* RH02 (B). Las células se hicieron crecer en HPI-BSM con glucosa y NH_4Cl hasta final de la fase exponencial. Luego fueron cosechadas, lavadas y observadas al microscopio electrónico de trasmisión (Panel A: 40000x, Panel B: 50000x).

En las imágenes presentadas en la **Figura 15**, se puede observar que las células de *P. putida* RH02 (**B**) muestran una morfología muy diferente a la detectada para su cepa parental (**A**). El cambio más significativo detectado en la cepa doble mutante es la irregularidad de su superficie celular dada por la presencia de estructuras similares a vesículas o evaginaciones distribuidas uniformemente a lo largo de toda la membrana (**B**).

Esta alteración en la estructura celular de la cepa doble mutante *P. putida* RH02 puede ser atribuida específicamente a la distribución uniforme de los bajos niveles de CL que la misma presenta en su membrana. Ha sido descrito que CL juega un doble papel en la modulación de las propiedades físicas de la membrana, debido a que este PL mejora las interacciones laterales entre los lípidos que constituyen las monocapas de la membrana plasmática, mientras que, simultáneamente, genera una disminución de la energía de cohesión de las membranas, lo cual es acompañado por una disminución en la permeabilidad y la creación de pliegues en la membrana (Nichols-Smith *et al.*, 2004). Por estas razones, entre otras, CL se concentra en las regiones polares y próximas a los septos de división celular. Por ello, la distribución uniforme de los bajos niveles de CL en la membrana de la cepa doble mutante, sería crítica para la topología celular, lo cual se ve reflejado en la formación de las estructuras anormales detectadas a lo largo de toda la superficie celular.

4.1.3.4.- Composición fosfolipídica de *P. putida* A (ATCC 12633) y sus mutantes isogénicas en diferentes etapas de crecimiento

Teniendo en cuenta que ha sido descrito en diferentes cepas bacterianas que poseen más de un gen *cls*, que el contenido de CL puede cambiar a lo largo del crecimiento del microorganismo (Mileykovskaya y Dowhan, 2009), por lo que cada una de las CLs pueden contribuir a la síntesis de este PL en distintas etapas de crecimiento, se procedió a determinar la composición fosfolipídica en las diferentes cepas obtenidas en este estudio en distintos estadios de crecimiento.

Para ello, células de *P. putida* A (ATCC 12633) y sus mutantes derivadas, fueron crecidas en HPI-BSM en presencia de glucosa y NH₄Cl hasta DO₆₆₀= 0,2. En ese momento se les adicionó 1 µCi/ml de [1-¹⁴C]-acetato y los cultivos se siguieron hasta DO₆₆₀ final de 0,8 y 1,2 (final de fase logarítmica y fase estacionaria temprana, respectivamente). Los PL fueron extraídos, identificados y cuantificados según se detalla en el apartado 3.18.5 de Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 5**.

Tabla 5: Composición fosfolipídica de *P. putida* A ATCC12633, *P. putida* GL01, *P. putida* RH01 y *P. putida* RH02 en diferentes etapas de crecimiento.

	<i>P. putida</i> A (ATCC 12633)		<i>P. putida</i> RH01		<i>P. putida</i> GL01,		<i>P. putida</i> RH02	
DO ₆₆₀	0,8	1,2	0,8	1,2	0,8	1,2	0,8	1,2
PL	% Fosfolípidos							
CL	15,38 ± 0,70	22,13 ± 0,28	17,18 ± 0,81	24,77 ± 0,96	13,10 ± 0,77	21,34 ± 1,13	1,90 ± 0,58	11,21 ± 0,87
PG	9,60 ± 0,42	4,07 ± 0,17	10,36 ± 0,32	8,60 ± 0,54	10,29 ± 1,03	7,80 ± 0,56	18,94 ± 0,98	12,59 ± 0,39
PE	63,58 ± 2,91	55,80 ± 1,59	48,45 ± 2,75	36,53 ± 2,36	65,01 ± 2,66	57,01 ± 1,87	59,09 ± 1,32	49,93 ± 0,89
PC	8,13 ± 0,92	4,27 ± 0,47	10,16 ± 2,11	8,27 ± 1,56	4,76 ± 1,55	2,62 ± 0,68	8,66 ± 0,93	6,40 ± 1,69
LPE	1,52 ± 0,12	2,07 ± 0,44	1,53 ± 1,03	5,44 ± 0,98	1,57 ± 0,71	4,02 ± 0,79	2,81 ± 0,27	7,14 ± 0,78
PA	0,60 ± 0,21	1,73 ± 0,11	3,62 ± 0,35	5,66 ± 0,55	1,91 ± 0,03	2,57 ± 0,33	1,55 ± 0,77	3,42 ± 0,11
NI	1,19 ± 0,15	9,93 ± 1,35	8,70 ± 1,23	10,73 ± 1,96	3,36 ± 0,23	4,64 ± 0,96	7,05 ± 1,55	9,31 ± 1,89

P. putida A (ATCC12633) y sus mutantes derivadas se hicieron crecer en HPI-BSM con fuentes preferenciales de C y N hasta una DO₆₆₀=0,2. En ese momento las células fueron marcadas con 1 µCi/ml de [1-¹⁴C]-acetato y los cultivos se siguieron hasta DO₆₆₀ de 0,8 y 1,2. Los PL fueron separados por TLC monodireccional (cloroformo:metanol:H₂O 65:25:4) y cuantificados por contador de centelleo líquido Beckman LS 60001 C. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes (±SD, n=3).

Como se desprende de la **Tabla 5**, el perfil fosfolipídico determinado para todas cepas y en todas las condiciones ensayadas, mostró, de los PL identificados, la presencia de CL, PE, PG, PC, LPE y PA. De manera similar a lo detectado previamente en fase

logarítmica tardía ($DO_{660} = 0,8$) para muestras no radiactivas (**Figura 13**), los niveles de CL sólo son bajos en la cepa doble mutante, donde este PL representa aproximadamente un 2-3 %) del total de PL. Sin embargo, como se desprende del análisis de los resultados de **Tabla 5**, en todas las cepas se detectó un aumento en el contenido de CL cuando el microorganismo alcanzó la fase estacionaria temprana ($DO_{660} = 1,2$), siendo particularmente notorio el incremento detectado en la cepa doble mutante.

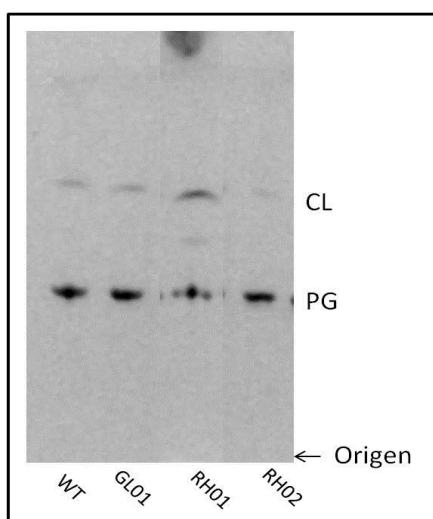
En bacterias ha sido descrito que el contenido de diferentes PL puede variar de acuerdo con la fase de crecimiento en la que se encuentre el microorganismo. Así por ejemplo, PG es más abundante en fase exponencial de crecimiento, mientras que CL se acumula durante la fase estacionaria (Ramos *et al.*, 1997; Bernal *et al.*, 2007; Koprivnjak *et al.*, 2011). En microorganismos tales como *B. subtilis*, *E. coli* y *S. aureus*, se describen aumentos en los niveles de CL durante la fase estacionaria de crecimiento cuando los microorganismos crecen en condiciones de cultivos no estresantes. Si estos microorganismos se someten a condiciones de estrés dadas por alta salinidad, los niveles de CL aumentan aún más en esta misma fase de crecimiento (López *et al.*, 2006; Romantsov *et al.*, 2009; Tsai *et al.*, 2011). Si bien en estos trabajos los autores no determinan específicamente quien es responsable del aumento de CL detectado, atribuyen a CL diversas funciones en la respuesta a la salinidad, tales como el incremento de la carga negativa en la superficie de la membrana, lo cual favorece el transporte de K^+ al citoplasma celular (López *et al.*, 2006), el correcto funcionamiento de transportadores y proteínas reguladoras involucradas en la respuesta al estrés osmótico dependientes de la fracción de lípidos aniónicos (Romantsov *et al.*, 2007) y la de otorgarle a la bacteria una específica conformación física de la membrana, la cual le permite desarrollar formas celulares de resistencia para persistir durante periodos prolongados de tiempo al estrés ocasionado por elevadas concentraciones salinas (Tsai *et al.*, 2011).

Los resultados que muestran, tanto en la cepa salvaje *P. putida* A (ATCC 12633) como en las mutantes isogénicas afectadas en *cls* y *cls2*, aumento del contenido de CL en fase estacionaria (**Tabla 5**), llevan a proponer la existencia de otro gen, además de los dos descritos hasta el momento en *P. putida* A (ATCC 12633), cuyo producto sería funcional para la síntesis de este PL o bien la activación de las CIs descritas según la etapa de crecimiento en la cual se desarrolle el microorganismo. En este aspecto, en *E. coli*, ha sido descrito la presencia de tres enzimas capaces de sintetizar CL denominadas CIsA, CIsB y CIsC (Tan *et al.*, 2012). De estas tres enzimas, CIsA aporta las mayores cantidades de CL durante todo el crecimiento de *E. coli*. CIsB y CIsC solo son capaces de sintetizar CL *in vivo*, cuando el microorganismo se desarrolla en la fase estacionaria de crecimiento. Además de

ello, y a diferencia de las otras Cls descritas, ClsC sintetiza CL utilizando como donador de grupos fosfatidil a PE en lugar de PG (Tan *et al.*, 2012).

4.1.4.- Determinación de la actividad Cls en *P. putida* A (ATCC 12633) y sus mutantes isogénicas utilizando PG como sustrato

La actividad Cls se determinó utilizando extractos libres de células de *P. putida* A (ATCC12633) y sus mutantes isogénicas obtenidos luego del crecimiento de las cepas, hasta fase logarítmica tardía, en HPI-BSM con fuentes preferenciales de C y N. El producto de reacción, CL-NBD, fue identificado por Phosphor-Imager, según se describe en Materiales y Métodos (apartado 3.25). La **Figura 16** muestra una TLC representativa y los valores de actividad Cls expresados como Unidades Arbitrarias (UA).



Cepa	Actividad CLs (UA)
<i>P. putida</i> A (ATCC12633)	14,18 ± 0,16
<i>P. putida</i> GL01	15,09 ± 0,15
<i>P. putida</i> RH01	19,43 ± 0,08
<i>P. putida</i> RH02	1,12 ± 0,12

Figura 16: Determinación de actividad Cls a partir de extractos libres de células de *P. putida* A (ATCC 12633) y sus mutantes isogénicas. Las células fueron crecidas en HPI-BSM con fuentes preferenciales de C y N hasta final de fase exponencial. La reacción fue desarrollada como se detalla en el apartado 3.25. El producto de reacción CL-NBD, fue extraído según Bligh y Dyer (1959), separado por TLC utilizando como sistema de solventes cloroformo:metanol:ácido acético (65:25:4), detectado por Phosphor-Imager y cuantificado por medio del analizador de imágenes Scion Image (1925). UA: unidades arbitrarias correspondientes a intensidad del spot de CL. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes (\pm SD, n=3).

Como puede observarse, los extractos provenientes de células de *P. putida* A ATCC12633 y de sus mutantes isogénicas simples, presentaron valores semejantes de actividad Cls cuando la misma se determinó utilizando PG-NBD como sustrato. En la cepa doble mutante *P. putida* RH02, la actividad Cls fue, prácticamente, no detectable, resultado que guarda una estrecha relación con el bajo contenido de CL detectado en las membranas de esta cepa (1,9 % del total de PL) (**Tabla 5**). Los resultados obtenidos permiten confirmar

que los productos génicos, Cls y Cls2, son funcionales en *P. putida* A (ATCC 12633) para catalizar la síntesis de CL por condensación de dos moléculas de PG.

El hecho de que la cepa doble mutante contenga una baja cantidad de CL plantea la posibilidad de la existencia de otro gen en *P. putida* A (ATCC 12633) cuyo producto sea funcional para la síntesis de este PL. Al respecto, en *S. aureus* y *E. coli*, *X. campestris* se ha demostrado la existencia de 2, 3 y 6 genes, respectivamente, responsables de codificar para Cls funcionales. La carencia total de CL en las membranas de estos microorganismos solo se logra por la inactivación completa de todos los genes responsables de codificar para las Cls (Koprivnjak, *et al.*, 2011, Tsai, *et al.*, 2011, Tan, *et al.*, 2012). Además de la presencia de otro gen que codifique para Cls, no puede descartarse la posibilidad de que CL sea sintetizada por acción de una actividad fosfatidilserina sintasa clase I (PSsAI). Diferentes autores han propuesto que cepas mutantes de *E. coli*, *P. putida* P8, *B. subtilis* Marburg 168 y *P. putida* DOT T1 afectadas en genes *cls* y, por lo tanto carentes de actividad Cls, contienen un remanente de CL en la membrana, la cual sería sintetizada por una actividad PSsAI (Tropp, 1997; von Wallbrun *et al.*, 2002; Kaway *et al.*, 2004; Bernal *et al.*, 2007).

4.1.5.- Complementación de *P. putida* RH02

Con el objetivo de reafirmar la contribución de cada uno de los genes *cls* en la síntesis de CL en *P. putida* A (ATCC 12633), se procedió a complementar la cepa doble mutante con uno u otro gen. *P. putida* RH02 fue complementada por separado con pGL08 y pGL09 (**Tabla 1**) los cuales contienen los genes homólogos a *pp5364* y *pp3264* amplificados desde el genoma de *P. putida* A (ATCC 12633) ligados al plásmido replicativo pBBR1MCS-3 (**Tabla 1**). Utilizando las cepas *P. putida* RH02/pGL08 y *P. putida* RH02/pGL09 se determinó la actividad Cls como se describe en el apartado 2.11, utilizando como sustrato PG-NBD. La **Figura 17** muestra los resultados obtenidos.

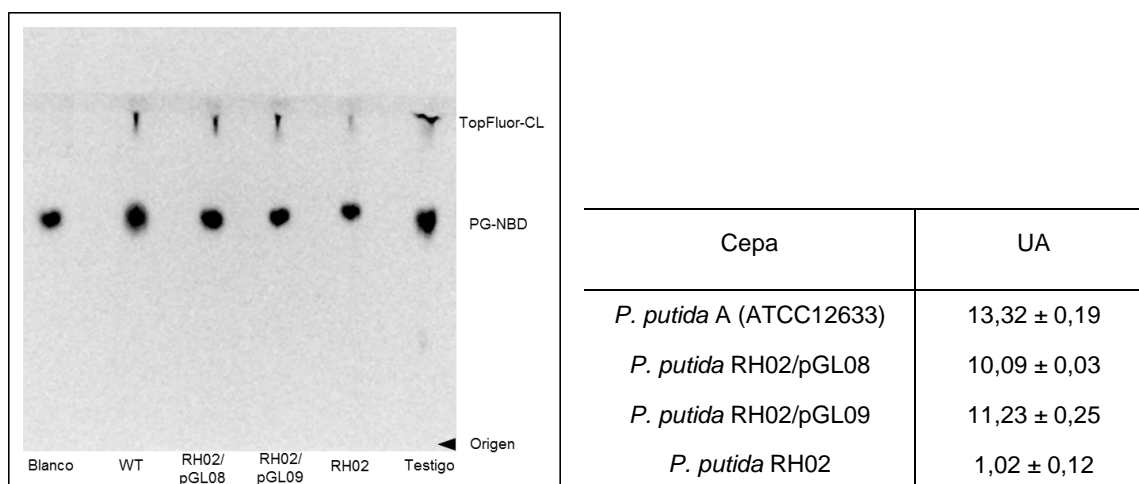


Figura 17: Determinación de actividad Cls con extractos libres de células de *P. putida* RH02, *P. putida* RH02/pGL08, *P. putida* RH02/pGL09 y *P. putida* A (ATCC 12633). La reacción fue desarrollada como se detalla en el apartado 3.25. El producto de la reacción (CL), fue separado por TLC monodireccional utilizando como sistema de solventes cloroformo:metanol:ácido acético (65:25:4), detectado por Phosphor-Imager y cuantificado utilizando el analizador de imágenes SciónImage. UA: unidades arbitrarias. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes (\pm SD, n=3).

Como puede observarse, la cepa doble mutante *P. putida* RH02, produce muy bajos niveles de CL a partir del sustrato fluorescente PG-NBD mientras que las cepas complementadas, *P. putida* RH02/pGL08 y *P. putida* RH02/pGL09, presentaron niveles de CL-NBD semejantes a los detectados en la cepa salvaje.

Los resultados obtenidos no solo permiten reafirmar que los genes homólogos a *cls* y *cls2* codifican, en *P. putida* A (ATCC 12633), para Cls que catalizan la síntesis de CL por condensación de dos moléculas de PG, sino también, que si se afecta uno de estos dos genes, el producto génico de uno de ellos puede compensar la ausencia del otro y viceversa, ya que independientemente de cuál sea el gen con el que se complemente a la cepa doble mutante *P. putida* RH02, la cepa complementada resultante posee niveles de actividad Cls similares a los detectados en la cepa salvaje.

Estos resultados difieren considerablemente de aquellos descritos para otros microorganismos tales como *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* y *X. campestris*, (Lopez *et al.*, 2006; Koprivnjak *et al.*, 2011; Tan *et al.*, 2012; Moser *et al.*, 2014), los cuales presentan en sus genomas múltiples genes que codifican para posibles Cls, y en donde la mutación de uno de estos genes produce cambios en los niveles de CL que no pueden ser compensados en forma significativa por la actividad de las potenciales Cls no afectadas.

La **Figura 18** muestra la distribución de CL, visualizada por el uso del colorante fluorescente NAO (apartado 3.16) en células de *putida* RH02/pGL08 (**A**), *P. putida*

RH02/pGL09 (B) y *P. putida* RH02 (C) crecidas en medio rico LB hasta final de fase exponencial.

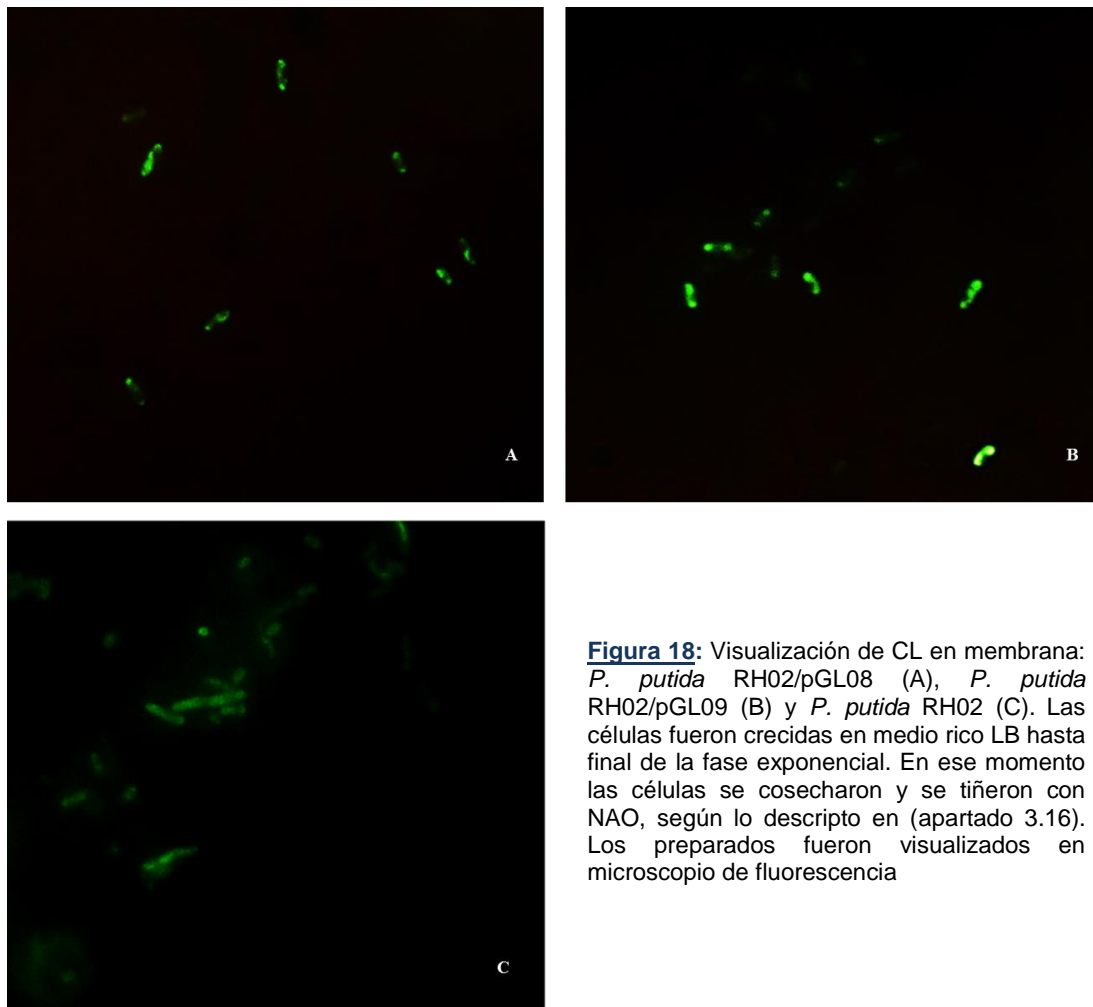


Figura 18: Visualización de CL en membrana: *P. putida* RH02/pGL08 (A), *P. putida* RH02/pGL09 (B) y *P. putida* RH02 (C). Las células fueron crecidas en medio rico LB hasta final de la fase exponencial. En ese momento las células se cosecharon y se tiñeron con NAO, según lo descrito en (apartado 3.16). Los preparados fueron visualizados en microscopio de fluorescencia

Como se observa en esta **Figura 18**, en *P. putida* RH02 (C) se observa una tinción uniforme y la ausencia de señal de fluorescencia verde en los polos de la célula, lo cual se debe a los bajos niveles de CL de su membrana.

Las cepas complementadas *P. putida* RH02/pGL08 (A) y *P. putida* RH02/pGL09 (B) mostraron una distribución de CL muy similar a la detectada en *P. putida* A (ATCC 12633), donde las señales de fluorescencia verde fueron visualizadas en los polos de las células y otros cercanos al septo de división. La semejanza en la distribución de CL en las cepas complementadas en comparación a la cepa salvaje es consistente con el hecho de que las tres cepas contienen similares niveles de CL en su membrana (**Figura 18**).

4.1.6.- Búsqueda en *P. putida* KT2440 de ORFs homólogos a ClsC (NP_415564) de *E.coli* K-12

En *E. coli* se ha demostrado, la presencia de un tercer gen, denominado *ymdC* (renombrado ahora como *clsC*), el cual codifica para una proteína de 437 aminoácidos capaz de sintetizar CL (Tan *et al.*, 2012). Esta enzima, ClsC, se clasifica dentro de la superfamilia de las PLD, por poseer en su estructura el motivo característico HKD repetido dos veces (Ponting y Kerr, 1996). ClsC de *E. coli* tiene la particularidad de ser activa en la fase estacionaria de crecimiento, por lo que es la responsable de los aumentos en los niveles de CL detectados en dicha etapa del crecimiento bacteriano. Mientras que las Cls descritas hasta el momento en microorganismos utilizan PG como sustrato (Short y White, 1971; Tropp, 1997; Koprivnjak *et al.*, 2011; Tsai *et al.*, 2011; MacGilvray *et al.*, 2012), una característica que diferencia a la ClsC de *E. coli* de otras Cls descritas, es la capacidad de sintetizar CL por condensación de una molécula de PE y una de PG (Tan *et al.*, 2012).

Considerando estos antecedentes y con el objetivo de identificar posibles candidatos de codificar para una Cls del tipo ClsC en *P. putida* A ATCC 12633, se llevó a cabo la búsqueda de proteínas homólogas en el genoma de la cepa de referencia secuenciada, *P. putida* KT2440. En base a las secuencias de aminoácidos descrita para ClsC de *E.coli* K-12 (NP_415564), se analizó el genoma de *P. putida* KT2440 en busca de ORFs homólogos a esta enzima. Este análisis brindó información acerca de la existencia de cuatro posibles ORFs: PP_0892, PP_3264 (Cls2), PP_5276 y PP_5364 (Cls), cuyas características más relevantes se resumen en **Tabla 6**. Es de destacar que si bien se incluyen en este análisis los *orfs pp5364* y *pp3264* de *P. putida* KT2440, los genes homólogos a los mismos fueron seleccionados en primera instancia en nuestro laboratorio como candidatos a codificar para Cls en *P. putida* A (ATCC 12633). Mediante la construcción y caracterización de mutantes simples y dobles en dichos genes se ha podido establecer que ambos genes codifican en *P. putida* A (ATCC 12633), para Cls activas (Cls y Cls2, respectivamente).

Tabla 6: ORFs de *P. putida* KT2440 homólogos a ClsC de *E.coli* K-12.

ORFs	PP0892	PP5276	PP5364	PP3264
Nombre	Proteína de la familia de las fosfolipasas	Fosfolipasa D/Transfosfatidilasa	Cardiolipina sintasa	Cardiolipina sintasa 2
Nº de acceso	NP_743053	NP_747377	NP_747465	NP_745407
Nº de AA	358	517	481	400
Max escore	78,2	270	84,3	52,8
% cobertura	77 %	98 %	80 %	84 %
E value	2e ⁻¹⁶	2e ⁻⁸⁴	4e ⁻¹⁸	4e ⁻⁰⁸
% identidad de AA	26 %	37 %	25 %	22 %

A partir de la secuencia de aminoácidos de las ClsC de *E.coli* K-12 se llevó a cabo una búsqueda por BLASTP en el genoma de *P. putida* KT2440

Como se desprende del análisis de la **Tabla 6**, el ORF PP5276 presenta los mejores parámetros bioinformáticos (score, % de cobertura e identidad de AA y E value) respecto a las ClsC descrita en *E. coli* (Tan *et al.*, 2012). El *orf pp5276* codifica una proteína de 517 aminoácidos y está anotado, en *P. putida* KT2440, por homología de secuencia, como hipotética PLD/transfosfatidilasa.

Para continuar con el análisis *in silico* se consideraron los residuos aminoacídicos propios de Cls y de la familia a la cual pertenece esta enzima. Cls forma parte de 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). Además de 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 los aminoácidos conservados y seleccionar un potencial candidato, se llevó a cabo un alineamiento múltiple. La **Figura 19** muestra los resultados obtenidos. A fines prácticos sólo se muestran los residuos pertenecientes a los motivos HKD y las regiones contiguas a los mismos.



Figura 19: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de diferentes ORFs de *P. putida* KT2440 homólogos a ClsC de *E. coli* K-12. Los alineamientos se llevaron a cabo utilizando el programa ClustalX. Los residuos pertenecientes al motivo consenso HKD característicos de las proteínas de la superfamilia de las PLD, están indicados con un recuadro negro. Los residuos descriptos para CLs están indicados con (R:●), (N o Q: ■) y (R:▲).

Como se desprende del análisis de la **Figura 19**, los candidatos PP_0892 y PP_5276, contienen los motivos HKD característicos de los miembros de la superfamilia de las PLD (recuadro). Cuando se analizan los aminoácidos propios de las CLs (indicados con ●, ■ y ▲) (Tropp, 1997) puede observarse que el primer residuo de arginina (R, ●) está presente en todos los ORFs seleccionados de *P. putida* KT2440. El segundo residuo de arginina (R, ▲) está ausente en ClsC de *E. coli* y en PP_5276, siendo remplazado en ambos casos por una N: asparragina. El tercer residuo conservado (N: asparragina ó Q: glutamina, ■) está ausente en todos los ORF seleccionados de *P. putida* KT2440 y también en la ClsC de *E. coli*, en donde dicho residuo es M: metionina, al igual que en PP5276.

En base a este análisis y considerando el hecho de que el ORF PP_5276 presenta los mejores parámetros bioinformáticos respecto a las ClsC descrita en *E. coli* (**Tabla 6**), es muy probable que este ORF, anotado por homología de secuencia como una PLD/Transfosfatidilasa en *P. putida* KT2440, pueda actuar como la ClsC descrita en *E. coli* K-12 y sintetizar CL a partir de PE y PG. Como consecuencia de ello, posiblemente en *P. putida* A (ATCC 12633), el producto del gen homólogo a *pp5276* sería el responsable de la síntesis del remanente de CL (2-3 % del total de PL) detectado en la cepa doble mutante *P. putida* RH02.

4.1.7.- Determinación de la actividad Cls en *P. putida* A (ATCC 12633) y *P. putida* RH02 utilizando PE y PG como sustrato

Con el objetivo de determinar si los bajos niveles de CL detectados en la cepa doble mutante *P. putida* RH02, podían ser generados por la actividad de una Cls del tipo ClsC similar a la descrita para *E. coli* (Tan *et al.*, 2012), se decidió determinar actividad Cls utilizando como sustrato PE radiactivo y como fuentes enzimáticas, extractos libres de células de *P. putida* A (ATCC 12633) y *P. putida* RH02 crecidas hasta final de la fase logarítmica y fase estacionaria tardía.

La **Figura 20** muestra la autorradiografía de una TLC representativa con los resultados obtenidos.

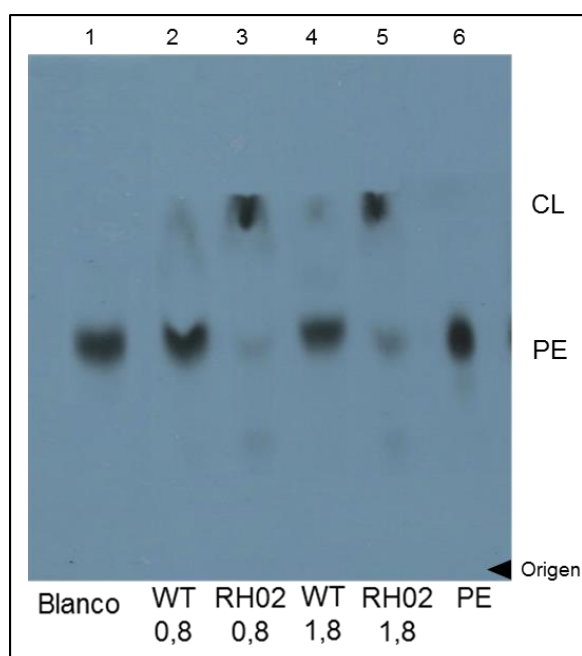


Figura 20: Determinación de actividad Cls utilizando - [¹⁴C]-PE como sustrato. Extractos libres de células de *P. putida* A (ATCC 12633) y *P. putida* RH02 fueron utilizados como fuente enzimática. El producto de reacción [¹⁴C]-CL fue extraído según Bligh y Dyer (1959), separado por TLC, e identificado por autorradiografía. Calle 1: Blanco (sin extracto libre de células); Calle 2: Cepa salvaje crecida hasta DO₆₆₀: 0,8; Calle 3: *P. putida* RH02 crecida hasta DO₆₆₀: 0,8; Calle 4: Cepa salvaje crecida hasta DO₆₆₀: 1,8; Calle 5: *P. putida* RH02 crecida hasta DO₆₆₀: 1,8; Calle 6: testigo, [¹⁴C]-PE

Como se observa en la **Figura 20**, solo se detectaron niveles significativos de producción de [¹⁴C]-CL cuando se utilizaron como fuentes enzimáticas extractos libres de células de *P. putida* RH02 crecidas hasta final de fase logarítmica (calle 3) como así también células crecidas hasta fase estacionaria tardía (calle 5). Cuando se utilizaron como fuentes enzimáticas extractos libres de células de *P. putida* A (ATCC 12633), no se detectaron niveles significativos de producción de [¹⁴C]-CL independientemente de la fase de crecimiento (calle 2 y calle 4). Resultados similares a los obtenidos con extractos libres de células de la cepa parental fueron detectados cuando se utilizaron como fuentes enzimáticas, extractos libres de células de las mutantes simples *P. putida* GL01 y *P. putida* RH01 (no mostrado).

Estos resultados coinciden parcialmente a lo descrito por Tan *et al.*, (2012) para *E. coli*. Estos autores demostraron que el gen *ymdC*, codifica para una tercera Cls a la que denominaron ClsC, que se diferencia de las anteriormente descritas ClsA (Pluschke *et al.*, 1978) y f413 (Guo y Tropp, 2000), en que esta enzima cataliza la condensación de una molécula de PG y una de PE para formar CL y etanolamina, en lugar de catalizar la condensación de dos moléculas de PG para formar CL y glicerol. Además, mediante la complementación por separado en una cepa triple mutante (Δ *clsABC*), de cada uno de los tres genes *cls*, los autores lograron determinar que ClsC solo era activa en la fase estacionaria de crecimiento y que debía ser co-expresada con el gen *ymdB* el cual se encuentra dentro del mismo operón que *ymdC* (Tan *et al.*, 2012).

En *P. putida* A (ATCC 12633), posiblemente el gen homólogo a *pp5276* de *P. putida* KT 2440, codifique para una tercera Cls que, al igual que la ClsC de *E. coli*, utiliza como sustratos para la síntesis de CL, una molécula de PG y una molécula de PE. Sin embargo, el detectar dicha actividad sólo en la cepa doble mutante *P. putida* RH02, sugiere que es necesario la inactivación de los genes *cls* (*kf835427*) y *cls2* (*kf835428*) para que la ClsC se exprese y la enzima catalice la síntesis de CL, independientemente de la fase de crecimiento en la que se encuentre el microorganismo.

4.1.8.- Sobreexpresión de Cls (KF835427) y Cls2 (KF835428) de *P. putida* A (ATCC 12633)

Con el objetivo de determinar, “*in vitro*”, si las modificaciones detectadas en los niveles de PL aniónicos en *P. putida* A (ATCC 12633) en respuesta al estrés generado por la exposición durante cortos periodos de tiempo a TDTMA, se debían específicamente a la inhibición de la actividad Cls por la parte del surfactante, se procedió inicialmente, a la sobreexpresión de Cls (KF835427) y Cls2 (KF835428) de *P. putida* A (ATCC 12633), en el huésped heterólogo *E. coli* BL 21 (DE3). Para la sobreexpresión, células de *E. coli* BL 21 (DE3) (**Tabla 1**) fueron transformadas con los plásmido pGL07 y pGL10 (**Tabla 1**). La selección de las células transformantes se realizó en medio LB con la adición de Amp 200 µg/ml, para las transformantes portadoras del vector pGL07 y con Km 75 µg/ml para las portadoras del vector pGL10. Se seleccionaron las transformantes que incorporaron cada uno de plásmidos, y las mismas fueron sometidas a pruebas de sobreexpresión (apartado 3.11). Se incluyeron como control negativo, células *E. coli* BL 21 (DE3) transformadas con los vectores de expresión pET 15b y pET 28a vacíos (**Tabla 1**) El análisis de expresión de ambas proteínas se realizó por PAGE-SDS (apartado 3.22) utilizando fracción soluble y la fracción de membrana de las células inducidas. La **Figura 21** muestra los resultados obtenidos.

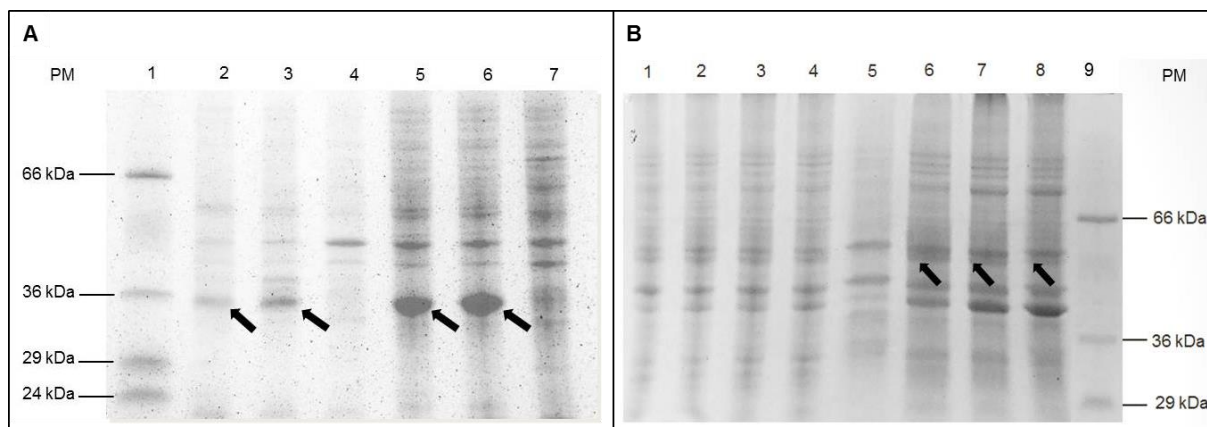


Figura 21: Expresión de Cls (KF835427) y Cls2 (KF835428). Cls (KF835427) **(A)**, Marcador de peso molecular (Calle 1). Fracción de membrana de *E.coli* BL 21 (DE3)/pGL07 inducida con 0,2 mM de IPTG (calle 2), con 2 mM de lactosa (calle 3). Fracción de membrana de *E.coli* BL 21 (DE3)/pET15b inducida con 0,2 mM (calle 4). Fracción de soluble de *E.coli* BL 21 (DE3)/pGL07 inducida con 0,2 mM de IPTG (calle 5), con 2 mM de lactosa (calle 6). Fracción soluble de *E.coli* BL 21 (DE3)/pET15b inducida con 0,2 mM (calle 7). Cls2 (KF835428) **(B)**, Fracción de soluble de *E.coli* BL 21 (DE3)/pET28a inducida con 1 % lactosa (Calle 1). Fracción de soluble de *E.coli* BL 21 (DE3)/pGL10 inducida con 1 % de lactosa (Calle 2), con 0,5 % de lactosa (calle 3) y con 0,2 % de lactosa (Calle 4). Fracción de membrana de *E.coli* BL 21 (DE3)/pET28a inducida con 1 % de lactosa (calle 5). Fracción de membrana de *E.coli* BL 21 (DE3)/pGL10 inducida con 1 % de lactosa (Calle 6), con 0,5 % de lactosa (calle 7) y con 0,2 % de lactosa (Calle 8). Marcador de peso molecular (Calle 9).

Como puede observarse en la **Figura 21 (A)**, el patrón de bandas de las fracciones solubles luego de la inducción de *E. coli* BL 21 (DE3)/pGL07 con 0,2 mM de IPTG (calle 5) o con 2 mM de lactosa, muestran la sobreexpresión de una proteína (marcado con flechas) de aproximadamente 36 kDa, la cual no está presente en la fracción soluble del control negativo (*E. coli* BL 21 (DE3)/pET15b inducida con 0,2 mM de IPTG, calle 7).

El tamaño de la proteína sobreexpresada se correlaciona con el tamaño esperado ya que la proteína completa posee un tamaño aproximado de 48 kDa y la proteína sobreexpresada carece de aproximadamente unos 67 aminoácidos hacia la región N-terminal. Dicha modificación en la secuencia de la proteína fue realizada con el objetivo de eliminar el péptido señal, el cual se encuentra entre los aminoácidos de la posición 30 y 40, según predicción con SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) y dirige la proteína hacia la membrana. La eliminación de péptido señal permitió obtener, luego de la inducción, elevados niveles de expresión de proteína en la fracción soluble. A pesar de que el péptido señal fue eliminado de la secuencia, se observa expresión de la proteína en la fracción de membrana de células inducidas con 0,2 mM de IPTG (calle 2) o 2 mM de lactosa (calle 3), respectivamente. Es de hacer notar que los niveles de expresión detectados en fracción de membrana son muy bajos en comparación a los niveles detectados en la fracción soluble, independientemente del inductor utilizado (calles 5 y 6).

En la **Figura 22 (B)**, se muestra el patrón de bandas de la fracción soluble y de membrana luego de la inducción de *E.coli* BL 21 (DE3)/pGL10 con lactosa al 0,2 %; 0,5 % y

1 %. Específicamente en la fracción de membrana se detecta la sobreexpresión de una proteína (marcado con flechas) de aproximadamente 48 kDa (según el cálculo Rf, en comparación con el marcador de peso molecular utilizado) cuando se indujo la sobreexpresión de dicha proteína con lactosa al 0,2 % (calle 6), al 0,5 % (calle 7) y al 1 % (calle 8). Dicha proteína no fue observada en el patrón de bandas correspondiente a la fracción de membrana del control negativo (calle 5) ni en ninguna de las fracciones solubles de las células inducidas con las diferentes concentraciones de lactosa utilizadas (calles, 2, 3 y 4).

Resultados similares a éstos fueron reportados cuando se determinó la existencia de una segunda proteína con actividad Cls en *E. coli*, denominada f413 (Guo y Tropp, 2000), la que posteriormente fue renombrada como ClsB (Tan *et. al.*, 2013). Esta proteína se caracteriza, por carecer en su estructura de secuencias de aminoácidos específicas para el anclaje a la membrana. Sin embargo, cuando la proteína fue sobreexpresada, solo se detectó en fracción de membrana (Guo y Tropp, 2000). Además, cuando estos mismos autores analizaron la sobreexpresión de dos formas modificadas de la Cls principal de *E. coli*, que carecían del péptido señal que las dirigía a la membrana, al igual que f413, las dos proteínas fueron detectadas en la fracción de membrana. Estos resultados fueron atribuidos a que, posiblemente, estas proteínas están vinculadas a grupos específicos de lípidos que las anclan a la membrana, independientemente de que sean o no dirigidas por un péptido señal (Guo y Tropp, 2000).

Si bien no se muestra, ninguna de las proteínas sobreexpresadas mostró actividad Cls utilizando PG como sustrato. Probablemente la falta de actividad se deba a que, tanto el entorno lipídico aportado por el huésped heterólogo utilizado para la sobreexpresión, como así también las modificaciones postraduccionales generadas en las proteínas, no sean las óptimas para lograr la obtención de Cls activas.

Los resultados obtenidos y mostrados en este capítulo permiten concluir que en *P. putida* A (ATCC 12366) existen dos genes, *cls* y *cls2*, que codifican para Cls activas que catalizan la síntesis de CL por condensación de dos moléculas de PG.

Las secuencias parciales de ambos genes fueron anotadas en la base de datos de secuencias no redundante del GenBank y los números de ID asignados para cada gen fueron: *cls* (kf835427) y *cls2* (kf835428).

El análisis de cepas de *P. putida* A (ATCC 12633) afectadas en uno u otro gen reveló que, bajo condiciones óptimas de crecimiento, la inactivación de uno de los genes puede ser compensada en su totalidad por la actividad del otro gen y viceversa. Sólo la inactivación conjunta de ambos genes, conlleva a la obtención de cepas que contienen muy bajos

niveles de CL en su membrana. Si bien, en comparación con la cepa parental, se observan alteraciones en los parámetros de crecimiento, la mutación por separado de cada uno de los genes o la mutación en simultáneo de ambos genes, no generan un efecto letal en el crecimiento de las células mutantes en condiciones óptimas de crecimiento.

La síntesis de los muy bajos niveles de CL detectados en la cepa doble mutante *P. putida* RH02 pueden ser atribuidos a la actividad Cls que utiliza como sustrato PG y PE. Esta actividad cataliza la síntesis de CL sólo cuando se encuentran inactivas Cls y Cls2. Si bien no se realizaron estudios posteriores, del análisis bioinformático se desprende la existencia de un tercer gen en *P. putida* A (ATCC 12366) que sería el responsable de codificar para esta Cls.

CAPÍTULO II: Respuesta de *P. putida* A (ATCC 12633) frente al estrés ocasionado por TDTMA: cambios en la composición lipídica

4.2.1.- Distribución porcentual de los fosfolípidos en *P. putida* GL01, *P. putida* RH01 y *P. putida* RH02 expuestas a condiciones de estrés por TDTMA

P. putida GL01, *P. putida* RH01 y *P. putida* RH02 fueron crecidas en medios salino con la adición de fuentes preferenciales de C y N hasta final de la fase exponencial. En ese momento, las células fueron expuestas o no, durante 15 min, a 150 μ M de TDTMA y se procedió a la extracción, identificación y cuantificación de PL. A los fines comparativos, se procedió de la misma manera con la cepa parental. La **Figura 22** muestra los resultados obtenidos.

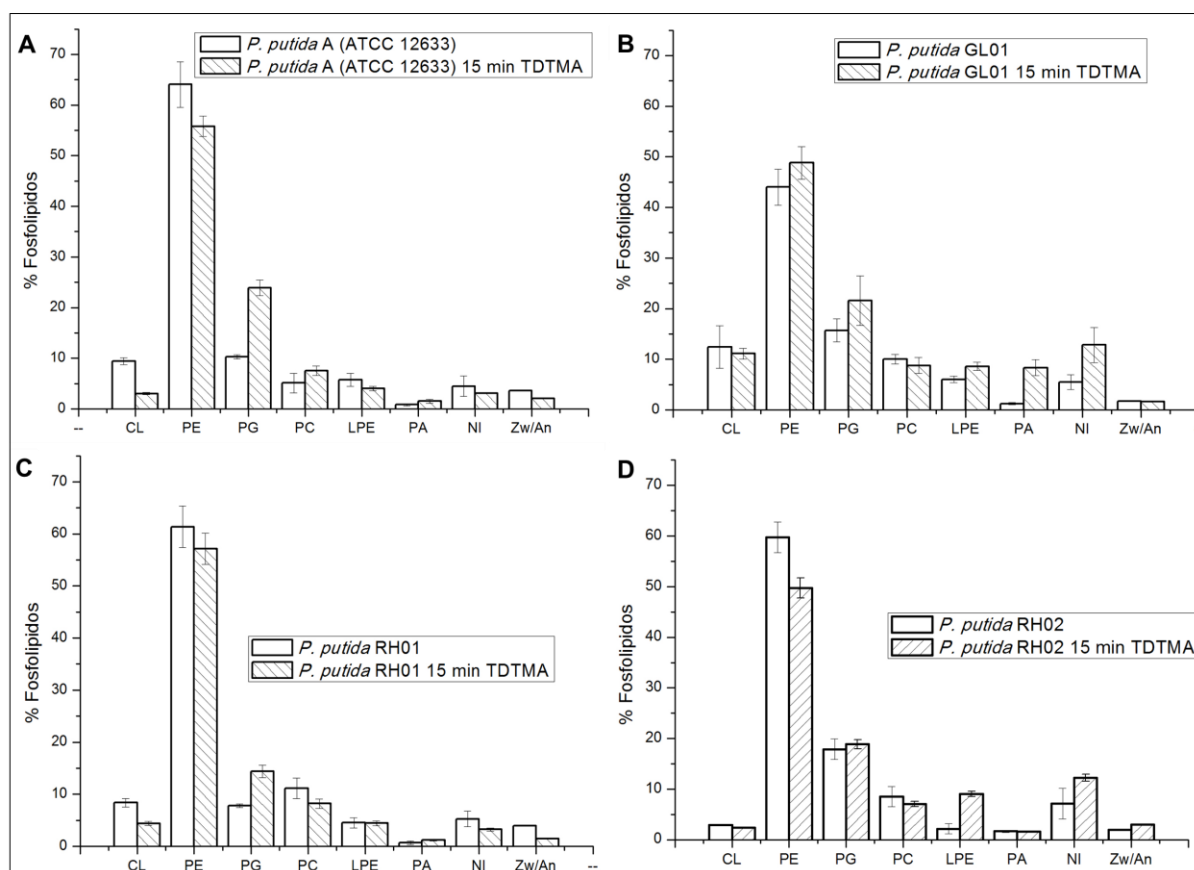


Figura 22: Composición de fosfolípidos de *P. putida* salvaje y mutantes expuestas o no a TDTMA: **A)** *P. putida* A (ATCC 12633). **B)** *P. putida* GL01 **C)** *P. putida* RH01, **D)** *P. putida* RH02. Las células fueron crecidas en HPI-BSM, con la adición de fuentes preferenciales de C y N hasta final de la fase exponencial y en ese momento fueron expuestas o no a TDTMA durante 15 min. Los PL fueron extraídos, separados y cuantificados según Fiske y Subbarow (1925). Un mol de Pi corresponde a 1 mol de PL, excepto para CL (difosfatidilglicerol), donde 2 moles de Pi corresponden a 1 mol de este PL. Los datos representan la media $n = 3 \pm$ SE. Zw/An: Relación PL Zwitteriónicos/PL anicónicos. NI: PL no identificados

Del análisis de los resultados mostrados en la **Figura 22 (B)**, se desprende que la exposición de *P. putida* GL01 a TDTMA durante 15 min provoca un notorio incremento en el contenido de PA (aproximadamente 10 veces) y un leve incremento de PG. A diferencia de lo descrito para la cepa salvaje (Boeris *et al.*, 2007), en *P. putida* GL01 el contenido de CL no se modifica significativamente luego de la exposición al detergente.

La respuesta de *P. putida* RH01 (**Figura 22 C**) a la presencia de TDTMA se refleja en una disminución en el contenido de CL (52 %) y un incremento en el contenido de PG y de PA (100 %). Este comportamiento es muy similar al que se detecta cuando la cepa salvaje se enfrenta al detergente. (**Figura 22 A**).

En la cepa doble mutante *P. putida* RH02 expuesta a TDTMA no se evidencian, respecto a condiciones no estresantes, cambios significativos en el contenido de sus PL individuales. Tanto en ausencia como en presencia del detergente la membrana celular de *P. putida* RH02 contiene altos niveles de PG y PA y bajo contenido de CL (**Figura 23 D**).

4.2.2.- Composición de ácidos grasos de *P. putida* A (ATCC 12633) y *P. putida* RH02 enfrentada o no a TDTMA

Ha sido descrito que ante diferentes condiciones de estrés, numerosos microorganismos responden alterando la estructura de la cadena acilo de los lípidos de membrana lo que, generalmente, se manifiesta en modificación de la relación AG saturados/AG insaturados. Para el caso particular de *P. putida* estas modificaciones de las cadenas acilos pueden involucrar : *i*) cambios en el grado de saturación de los AG (Heipieper, *et al.*, 1992; Loffeld, *et al.*, 1996; Loffhagen, *et al.*, 2004), *ii*) formación de AG ciclopropano (Loffeld, *et al.*, 1996; Muñoz-Rojas, *et al.*, 2006) y *iii*) isomerización *cis-trans* del doble enlace (Diefenbach *et al.*, 1992; Heipieper, *et al.*, 1992; Weber, *et al.*, 1994; Loffeld, *et al.*, 1996; Loffhagen, *et al.*, 2001; Loffhagen *et al.*, 2004; Neumann, *et al.*, 2003; Muñoz-Rojas, *et al.*, 2006).

Por lo que antecede, se procedió a analizar si los AG de los PL participan o no en la respuesta de *P. putida* ante condiciones de estrés dadas por la presencia de detergentes catiónicos. Dado que sólo la cepa doble mutante contiene bajos contenidos de CL, se analizó, además, las variaciones en el contenido y tipo de AG en la cepa doble mutante, en presencia y ausencia de TDTMA.

La composición de AG de *P. putida* A (ATCC 12633) y *P. putida* RH02 crecida en medio salino hasta final de fase exponencial con fuentes preferenciales de C y N se muestra en **Tabla 7**.

Tabla 7: Composición de AG de *P. putida* A (ATCC 12633) y *P. putida* RH02 crecidas con fuentes preferenciales de C y N, expuestas o no a TDTMA.

Cepa	<i>P. putida</i> A (ATCC 12633)		<i>P. putida</i> RH02	
	control	TDTMA	control	TDTMA
% Ácidos Grasos				
n14:0	1,28 ± 0,55	1,65±0,23	39,37 ± 2.71	2,4±0,02
n15:0	0,07 ± 0,02	0,52±0,21	0,13 ± 0,02	0,08±0,01
n16:0	24,88 ± 1,63	32,66±0,99	2,44 ± 0,45	43,82±3,89
n16:1Δ^9	6,27 ± 0,14	0,34±0,17	2,15 ± 0,72	4,87±0,85
n17:0	2,63 ± 0,87	0,84±0,12	2,30 ± 0,10	4,65±0,15
n18:0	62,92 ± 8,33	62,84±2,08	46,64 ± 2,54	44,53±1,31
n18:1Δ^9	1,99 ± 0,62	1,96±0,48a	4,25 ±1,51	9,79±1,49
n18:1Δ^{11}	5,83 ± 0,4	0,14±0,04b	0,23 ± 0,03	4,73±0,64
3-OH tetradecanoato	ND	ND	2,45±0,79	ND
Saturados	88,77 ± 5,02	97,99±0,87b	90,88 ± 3,24	83,49±3,06
Monoinsaturados	11,20 ± 5,04	1,97±0,87b	6,63 ± 0,62	16,45±3,06
AGS/AGI	7,92	49,74	13,71	5,07

Las células fueron crecidas en HPI-BSM con glucosa y NH₄Cl hasta final de la fase exponencial (DO₆₆₀= 0,8). En ese momento fueron expuestas o no durante 15 minutos a 150 μ M de TDTMA. Posteriormente fueron cosechadas y los PL extraídos según Bligh y Dyer (1959). A partir de los mismos se obtuvieron los ésteres metílicos de AG (FAME) según Morrison y Smith, (1964), los cuales fueron separados e identificados por cromatografía gaseosa (GC). Los resultados representan el promedio de tres experimentos independientes (\pm SD,n=3). AGS/AGI: ácidos grasos saturados/ ácidos grasos insaturados.

Entre los AG saturados más abundantes se detectó un 63 % de AG esteárico (18:0), 24 % de AG palmítico (16:0) y 2,6 % de AG 17:0. Entre los AG insaturados se encontró un 5,6 % de *cis* 11-ocadecenoico o *cis*-vaccénico (18:1 Δ^{11}), 2 % de AG oleico (18:1 Δ^9), y 6,2 % de AG palmitoleico (16:1 (Δ^9)). La composición de AG detectada coincide, cualitativamente, con la descrita en la bibliografía para otras especies de *P. putida* cultivadas bajo condiciones no estresantes, tales como *P. putida* KT 2440, *P. putida* P8 y *P. putida* DOT1E (Härtig, *et al.*, 2005; Pini, *et al.*, 2009). Sin embargo, es de destacar que todas estas cepas de *Pseudomonas* contienen mayor proporción de AG insaturados que los detectados en *P. putida* A (ATCC 12633), como así también la presencia de AG ciclopropano y otros hidroxilados no detectados en *P. putida* A (ATCC 12633) (Härtig, *et al.*, 2005, Pini, *et al.*, 2009).

La presencia de AG *cis*-vaccénico (18:1 Δ^{11}) en *P. putida* A (ATCC 12633) sugiere la existencia de una vía anaeróbica para la biosíntesis de AG. Es conocido que para cambiar el grado de saturación de AG presentes en los PL, *P. putida* recurre, preferentemente, a la biosíntesis de novo de AG (Diefenbach *et al.*, 1992) más que a la acción de enzimas,

denominadas desaturasas, que introducen dobles ligaduras a los AG preformados, tal lo descrito para otros microorganismos como *Bacillus subtilis* (Aguilar *et al.*, 1998), *Acinetobacter calcoaceticus* (Härtig *et al.*, 1999) y *P. aeruginosa* (Zhu, *et al.*, 2006).

En la **Figura 23** se observa un cromatograma representativo obtenido por GC, que muestra la composición de AG de *P. putida* A (ATCC 12633), enfrentada durante 15 minutos a 150 μ M de TDTMA.

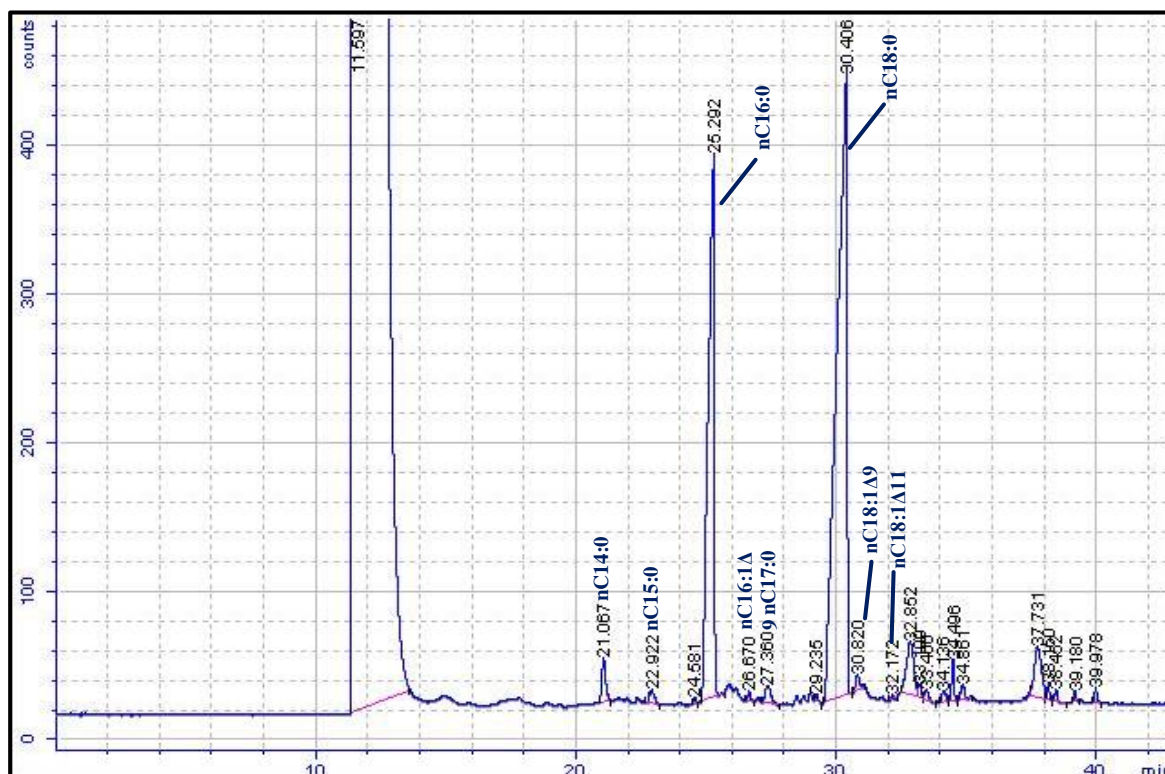


Figura 23: Cromatograma representativo de la composición de ácidos grasos de *P. putida* A (ATCC 12633) obtenido por GC. Las células de *P. putida* A (ATCC 12633) fueron crecidas en HPI-BSM con glucosa y NH₄Cl hasta final de la fase exponencial (DO₆₆₀= 0,8). En ese momento fueron expuestas durante 15 minutos a 150 μ M de TDTMA. Luego, fueron cosechadas y los PL extraídos según describen Bligh y Dyer (1959). A partir de los mismos se obtuvieron los FAME según Morrison y Smith, (1964), los cuales fueron separados e identificados por GC.

Cuando la cepa salvaje se enfrentó a TDTMA durante 15 min, los cambios más importantes observados fueron una disminución de los AG insaturados 16:1 (Δ^9) y 18:1 (Δ^{11}) (97 y 98 %, respectivamente), lo que se refleja en un notorio incremento de la relación AG saturados/AG insaturados que aumenta desde un valor de 7,92 en ausencia de TDTMA a 49,74 en su presencia (**Tabla 7**)

Es conocido que la relación molar PC/PE es indicativa de cambios en el estado de fluidez de la membrana (Senault *et al.*, 1990; Bangur *et al.*, 1995). Previamente en nuestro laboratorio se ha demostrado que en células de *P. putida* A (ATCC 12633) expuestas a

condiciones de estrés dadas por la presencia de TDTMA la relación molar PC/PE prácticamente no se modifica respecto a los valores determinados en ausencia del detergente (Boeris *et al.*, 2007). Sin embargo, en este caso, el incremento detectado en la relación AGS/AGI en esta condición de estrés (**Tabla 7**), refleja un mecanismo adaptativo que implica un aumento de la rigidez de la membrana.

El estado físico de la membrana citoplasmática bacteriana se evaluó mediante ensayos de polarización de fluorescencia (P) (apartado 3.20) la cual guarda una relación inversa con la fluidez de membrana (Litman y Barenholz, 1982).

Como se observa en la **Figura 24** luego de 1 min de exposición de las células a a TDTMA, los valores de P disminuyeron de $0,13 \pm 0,03$ en ausencia de detergente a $0,07 \pm 0,02$ en su presencia, indicando que el TDTMA tiene un efecto fluidificante sobre la bicapa lipídica. Luego de 15 min de exposición al TDTMA, el valor P retorna a valores similares a los detectados en ausencia de TDTMA ($P= 0,13 \pm 0,01$), lo que indica que las células contrarrestan el efecto del TDTMA rigidizando nuevamente la membrana.

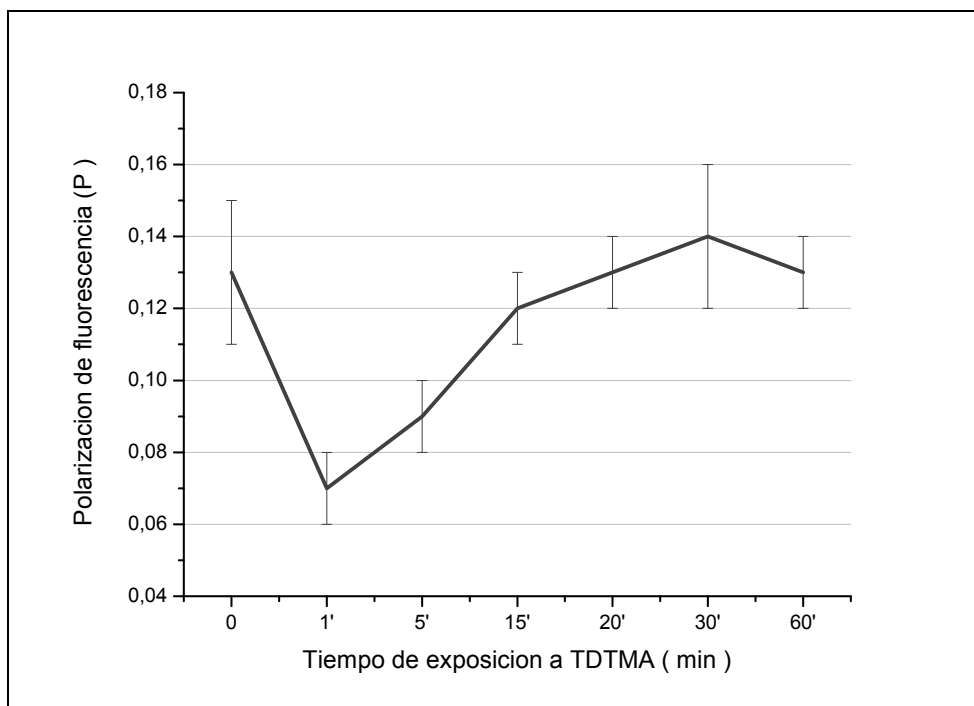


Figura 24: Polarización de fluorescencia de DPH en células de *P. putida* A (ATCC 12633) expuestas a TDTMA. Las células se hicieron crecer en medio LB hasta final de fase exponencial donde fueron cosechadas, lavadas y resuspendidas en buffer Tris-ClH ($OD_{660\text{ nm}} = 0,2$). La sonda fluorescente fue añadida al cultivo resuspendido e incubada para lograr la completa incorporación dentro de la membrana citoplasmática. Los valores representan la media de tres experimentos independientes (\pm SD, $n=3$).

Estos resultados, sumados al comportamiento detectado en relación a las modificaciones AG permiten concluir que el TDTMA ejerce un efecto fluidificante sobre la membrana celular (reflejado por disminución de P) y que *P. putida* A (ATCC 12633) es capaz de contrarrestar este efecto disminuyendo principalmente el contenido de sus AGI, lo que se refleja en un aumento de la rigidez de la membrana (con aumento de P hasta valores similares al control) (Heredia *et al.*, 2014). La disminución de los AGI no solo compensaría el efecto fluidificante del surfactante sino que también, bloquearía el acceso de las moléculas del detergente al interior de la membrana debido a una mayor compactación de la misma (Keweloh *et al.*, 1991).

El análisis de la composición de AG de la cepa doble mutante *P. putida* RH02, en relación a su cepa parental, crecidas en ausencia de TDTMA, muestra una disminución de aproximadamente el 40 % en la fracción correspondiente a AGI (6,63 y 11,20 respectivamente) (**Tabla 7**). Por ello, la relación AGS/AGI en la cepa mutante es mayor a la determinada para la cepa salvaje (13,71 y 7,92, respectivamente) lo que indicaría una cierta rigidización de la membrana. Cuando se evaluó el estado físico de la membrana citoplasmática de *P. putida* RH02 utilizando la sonda DPH (apartado 3.20), se encontró un valor de P de $0,22 \pm 0,01$ (**Figura 24**). Este valor, considerablemente mayor al detectado en

la cepa salvaje ($P= 0,12 \pm 0,02$), refleja una movilidad reducida de los lípidos y se corresponde con una mayor rigidez de la membrana en estas células deficientes en CL.

En *P. putida* RH02 también se detectó la presencia del AG hidroxilado (3-OH tetradecanoato (2,45 %), el cual no se detectó en la cepa salvaje. Considerando que los AG hidroxilados, junto a los AG saturados, son los constituyentes predominantes de los lipopolisacáridos (Nikaido y Vaara, 1985), podría asumirse que los bajos contenidos de CL en la membrana de *P. putida* RH02 se acompañan con modificaciones de la membrana externa del microorganismo. En *B. subtilis* ha sido demostrado que la carencia de CL en la membrana conduce a otras alteraciones adicionales de los componentes de la misma, tal como modificaciones en la composición de AG y glicolípidos (López *et al.*, 2006). Sin embargo, si se tiene en cuenta que CL puede actuar como un reservorio de AG monoinsaturados, tal lo descrito en *Streptococcus mutans* (MacGilvray *et al.*, 2012), puede plantearse que los cambios observados a nivel de AGI podrían estar relacionados con los muy bajos niveles de CL detectados en la cepa doble mutante.

Estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio referidos al análisis de la composición de AG en cada uno de los PL mayoritarios detectados en *P. putida* A (ATCC 12633) (PE, PG, CL y PC), revelaron que PG, cuyo contenido representa el 6.25 % del total de PL, contiene la mayor proporción de AGS (89 % del total de AGS). Por otro lado, CL, que representa aproximadamente el 5,85 % del total de PL de las células, contiene una elevada proporción de AGI (18 % del total de AGI) (Heredia *et al.*, 2014). Por lo tanto, y considerando que CL es un reservorio de AGI, puede relacionarse la alta rigidez de la membrana ($P= 0,22 \pm 0,01$) detectada en la doble mutante *P. putida* RH02 con su muy bajo contenido de CL (1,9 % del total de PL).

Cuando la cepa doble mutante *P. putida* RH02 fue expuesta durante 15 min a TDTMA, el cambio más significativo a nivel de AG se manifestó con el incremento de AG 18:1 (Δ^9) (aproximadamente un 500 % de aumento respecto a células no expuestas), lo que lleva a que la relación AGS/AGI alcance valores semejantes a los obtenidos con la cepa salvaje en condiciones no estresantes de cultivo. El estado físico de la membrana de *P. putida* RH02 expuesta a TDTMA determinado según los ensayos de polarización de fluorescencia se muestran en la **Figura 24**.

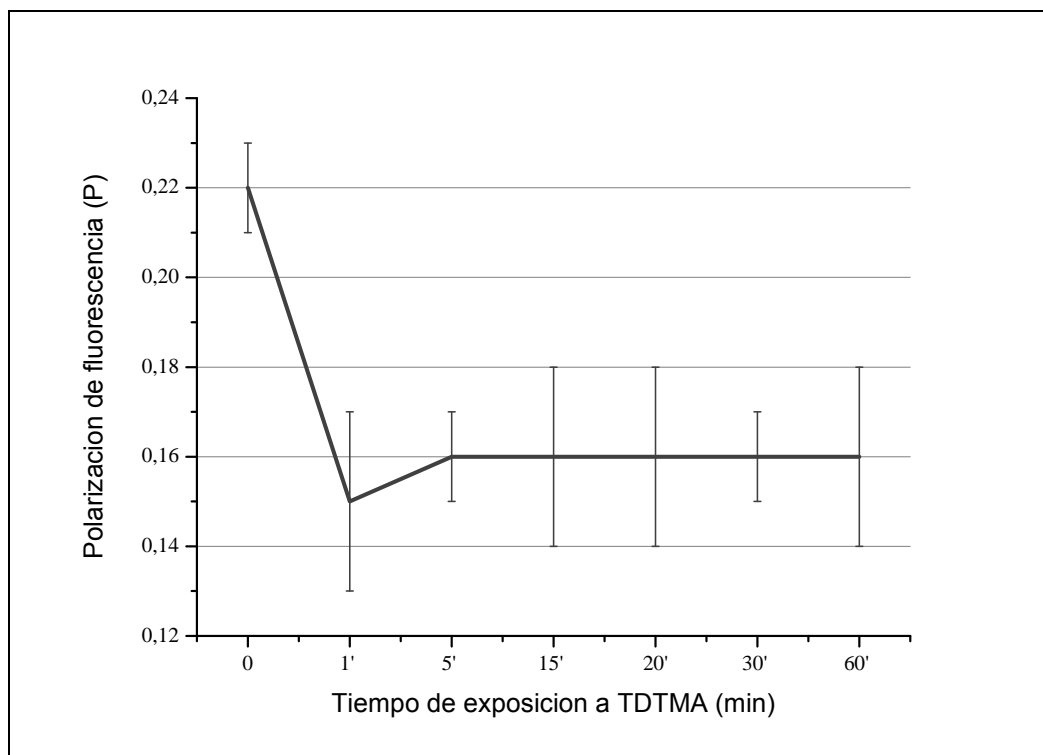


Figura 25: Polarización de fluorescencia de DPH en células de *P. putida* RH02 (Δ *cls::aacC1*, *cls2::aph(3')-IIa*) expuestas a TDTMA. Las células se hicieron crecer en medio LB hasta final de la fase exponencial donde fueron cosechadas, lavadas y resuspendidas en buffer Tris-ClH ($OD_{660\text{ nm}}=0,2$). La sonda fluorescente fue añadida al cultivo resuspendido e incubada para lograr la completa incorporación dentro de la membrana citoplasmática.. Los valores representan la media de tres experimentos independientes (\pm SD, $n=3$).

Como se desprende del análisis de la **Figura 25**, luego de 1 min de exposición al TDTMA los valores de P en células de *P. putida* RH02 disminuyeron de $0,22 \pm 0,03$ a $0,13 \pm 0,01$, resultado que evidencia nuevamente el efecto fluidificante que ejerce el TDTMA sobre la membrana. Sin embargo, en presencia del detergente el valor P se mantiene prácticamente constante ($P= 0,13 \pm 0,01$) hasta los 60 min de contacto con el surfactante, lo que pone de manifiesto que, a diferencia de las cepa salvaje, células de *P. putida* RH02 son incapaces de revertir este efecto fluidificante del detergente. Este resultado evidencia, en parte, la necesidad de que la célula bacteriana debe contener niveles adecuados de CL para contrarrestar el efecto bactericida del detergente.

Es claro del conjunto de los resultados mostrados hasta el momento, que la respuesta de *P. putida* al detergente TDTMA implica modificaciones de los AG lo que, sumado a los cambios detectados en las cabezas polares de los PL (Boeris *et al.*, 2007), permite asumir que la respuesta bacteriana al detergente es multifactorial con modificaciones de distintos componentes de la membrana para mantener la misma en óptimas condiciones y garantizar así la viabilidad celular. Dado que en presencia de TDTMA el contenido de PG incrementa (120 %) mientras que el contenido de CL disminuye (60 %),

puede concluirse que el incremento de PG y en consecuencia de AGS junto con la disminución de CL con sus AGI, otorga a las células resistencia ya que permite contrarrestar el efecto fluidificante del detergente.

4.2.3.- Determinación de la actividad PLD en *P. putida* A (ATCC 12633)

Con el objetivo de determinar en *P. putida* A (ATCC 12633) la posible actividad de una PLD que utilice como sustrato CL se procedió a determinar dicha actividad enzimática utilizando como sustrato Top-Fluor-CL. (Sigma Chemical Co., USA) Utilizando este sustrato, la presencia de actividad PLD se pone de manifiesto por la hidrólisis de la TopFluor-CL que lleva a la producción de PA y TopFluor-PG.

Inicialmente, células de *P. putida* A (ATCC 12633) fueron crecidas en medio HPi con glucosa y amonio en presencia de 100nM de Top-Fluor-CL como se describe en el apartado 3.17. La **Figura 26** muestra la distribución de TopFluor-CL incorporada en las células de *P. putida*.

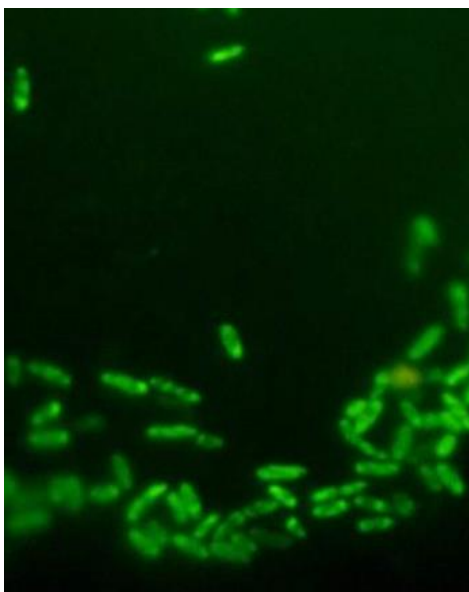


Figura 26: Células de *P. putida* A (ATCC1233) marcadas con TopFluor-CL. Las células fueron crecidas en medio HPi-BSM con la adición de glucosa y NH₄Cl y 100nM de TopFluor-CL, desde el inicio del crecimiento hasta una DO₆₆₀ final de 0,8. La incorporación de TopFluor-CL fue corroborada por visualización de las células en microscopio de fluorescencia (Axiovert 135; Zeiss, Germany, equipado con cámara AxioCam; excitación:

Para determinar actividad de PLD “*in vivo*”, una vez marcadas, las células fueron expuestas o no durante 1, 5, 10, y 15 minutos a 150 μM de TDTMA. Posteriormente los PL fueron extraídos según Bligh y Dyer (1959) y separados por TLC monodireccional. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 27**. El no detectar la presencia del producto de reacción Top-Fluor-PG, pone de manifiesto la ausencia de actividad PLD, en todas las condiciones evaluadas.

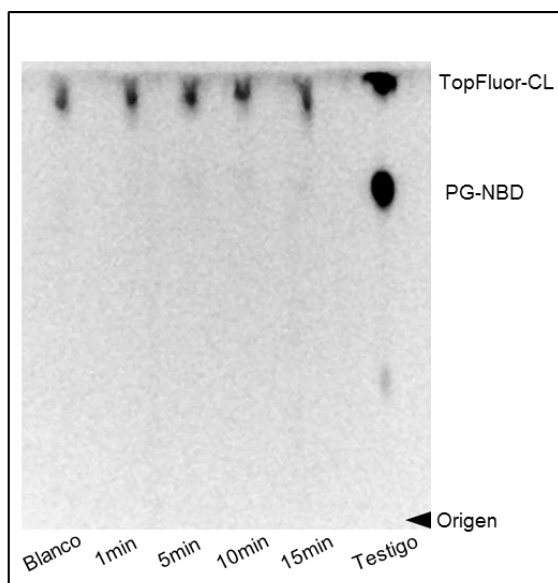


Figura 27: Determinación de actividad PLD en células de *P. putida* marcadas con TopFluor-CL expuestas durante diferentes periodos de tiempo a TDTMA. Las células fueron marcadas con TopFLuor-CL como se describe en el apartado 3.17. y expuestas durante 1, 5, 10 y 15 minutos a 150 μ M de TDTMA. Luego, los PL fueron extraídos, separados por TLC desarrollada con cloroformo:metanol:ácido acético (65:25:8) y detectados por Phosphor-Imager.

Por otro lado, se determinó la actividad de PLD “*in vitro*” siguiendo la metodología descrita por para bacterias Gram negativas y para la PLD específica de CL presente en mitocondrias de células eucariotas (Cole y Proulx, (1975); Choi *et al.*, 2006) (apartado 3.26) Como fuente enzimática se utilizó extractos libres de células de *P. putida* A (ATCC 12633) expuestas o no durante 5, 10 y 15 minutos a TDTMA y como controles positivos de reacción, extractos libres de células obtenidos a partir de células de *E. coli* y *P. aeruginosa* PAO1 crecidas hasta final de la fase exponencial. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 28**.

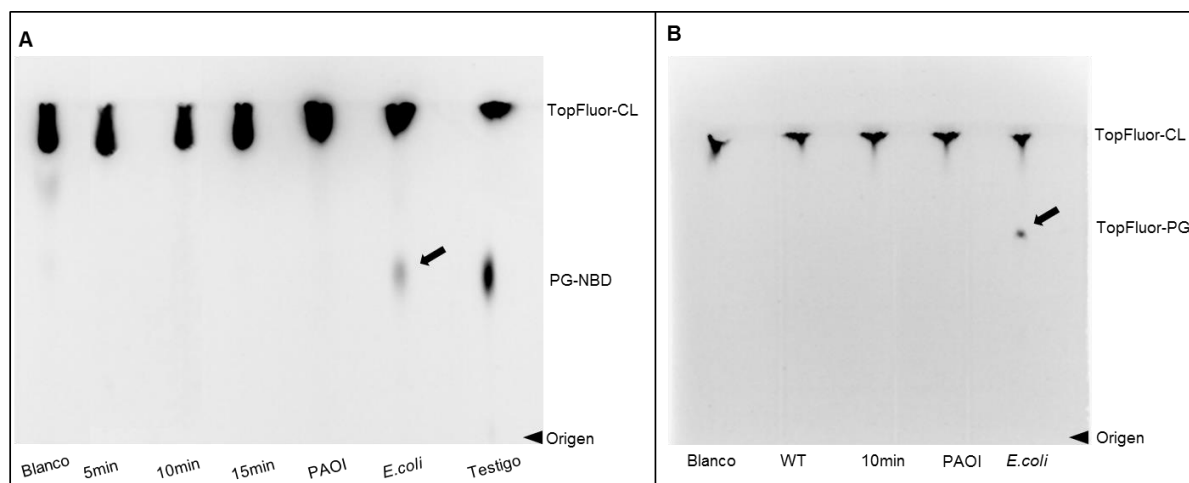


Figura 28: Determinación de actividad de PLD *in vitro* según Cole y Proulx, (1975) (A) y Choi *et al.*, 2006 (B). Células de *P. putida* A (ATCC 12633) fueron crecidas en HPI-BSM con fuentes preferenciales de C y N hasta final de la fase exponencial. En ese momento los cultivos fueron expuestos durante 5, 10 y 15 minutos a 150 μ M de TDTMA. *E. coli* y *P. aeruginosa* PAO1 fueron crecidas en medio rico LB hasta final de la fase exponencial. Las células fueron cosechadas, lavadas y sonicadas y los extractos libres de células se utilizaron como fuente enzimática. El producto de reacción TopFluor-PG, fue extraído según Bligh y Dyer (1959), separado por TLC e identificado por Phosphor-Imager.

Como se desprende de la **Figuras 28 (A) y (B)** no se detectó actividad de PLD específica para el sustrato CL, cuando se utilizaron como fuentes enzimáticas extractos libres de células de *P. putida* expuestas o no al detergente. Es de destacar que tampoco se detectó actividad de PLD capaz de catalizar la hidrólisis de CL cuando se utilizó como fuentes enzimáticas extractos libres de células de *P. aeruginosa* PAO1. Este resultado difiere considerablemente a lo descrito por Cole y Proulx, (1975) quienes determinaron la presencia de actividad PLD específica de CL en un grupo de microorganismos Gram negativos entre los cuales se encuentra *P. aeruginosa*. En este trabajo, sólo se detectó la producción de PG fluorescente (indicado con flecha, **Figuras 28 (A) y (B)**) a partir de TopFluor-CL cuando se utilizó como fuente enzimática, extractos libres de células de *E. coli*.

El no detectar actividad PLD lleva a concluir que la disminución en los niveles de CL y el aumento en los niveles de PG y PA detectados en de *P. putida* A (ATCC 12633) frente a la exposición a TDTMA durante cortos periodos de tiempo, no pueden ser atribuidos a una actividad de PLD específica para CL, tal como se había propuesto. Posiblemente, las modificaciones detectadas en los niveles de los PL aniónicos se deban a que el detergente inhibe alguna de las actividades CIs, lo cual llevaría a un aumento significativo de los niveles de PG y PA (precursores inmediatos de CL) y una marcada disminución de los niveles de CL, mecanismo indispensable en la respuesta de *P. putida* A (ATCC 12633) al TDTMA.

4.2.3.- Acción bactericida del TDTMA sobre células de *P. putida* A (ATCC 12633) y su doble mutante *P. putida* RH02

Con el objetivo de conocer la acción bactericida del TDTMA, se determinó la viabilidad celular, expresada como UFC/ml, a partir del recuento de células de *P. putida* A (ATCC12633) y *P. putida* RH02 obtenidas luego del crecimiento en medios salinos con fuentes preferenciales de C y N y enfrentadas, durante diferentes tiempos, a 150 μ M de TDTMA. La **Tabla 8** muestra los resultados obtenidos.

Tabla 8: Recuento de UFC/ml de *P. putida* A (ATCC 12633) y *P. putida* RH02 crecidas con fuentes preferenciales de C y N, expuestas a 150 μ M TDTMA durante diferentes periodos de tiempo.

Cepas	Tiempo (min)			
	0	5	15	30
<i>P. putida</i> A (ATCC12633)	2,29x10 ¹²	2,15x10 ¹²	1,35 x10 ¹¹	1,17x10 ¹¹
<i>P. putida</i> RH02	2,10x10 ¹²	2,66x10 ⁸	5x10 ⁴	3,1x10 ²

Como se desprende del análisis de los resultados de la **Tabla 8**, la cepa doble mutante *P. putida* RH02 presentó una notable disminución de UFC/ml a partir de los 5 min de contacto con 150 μ M de TDTMA, reduciéndolo en diez órdenes de magnitud a la media hora de contacto con el detergente. Para el caso de la cepa salvaje, el número de UFC/ml disminuye sólo en un orden de magnitud, luego de 30 min de exposición al TDTMA.

En base a estos resultados y considerando el hecho de que los bajos niveles de CL detectados en la cepa doble mutante, podrían estar relacionados con la alta sensibilidad de dicha cepa a la acción del detergente, se decidió determinar mediante un ensayo de viabilidad en placa, si *P. putida* RH02 era capaz de incorporar CL exógena y si dicha incorporación le permitía a esta cepa recuperar la tolerancia al detergente. La **Figura 29** muestra los resultados obtenidos.

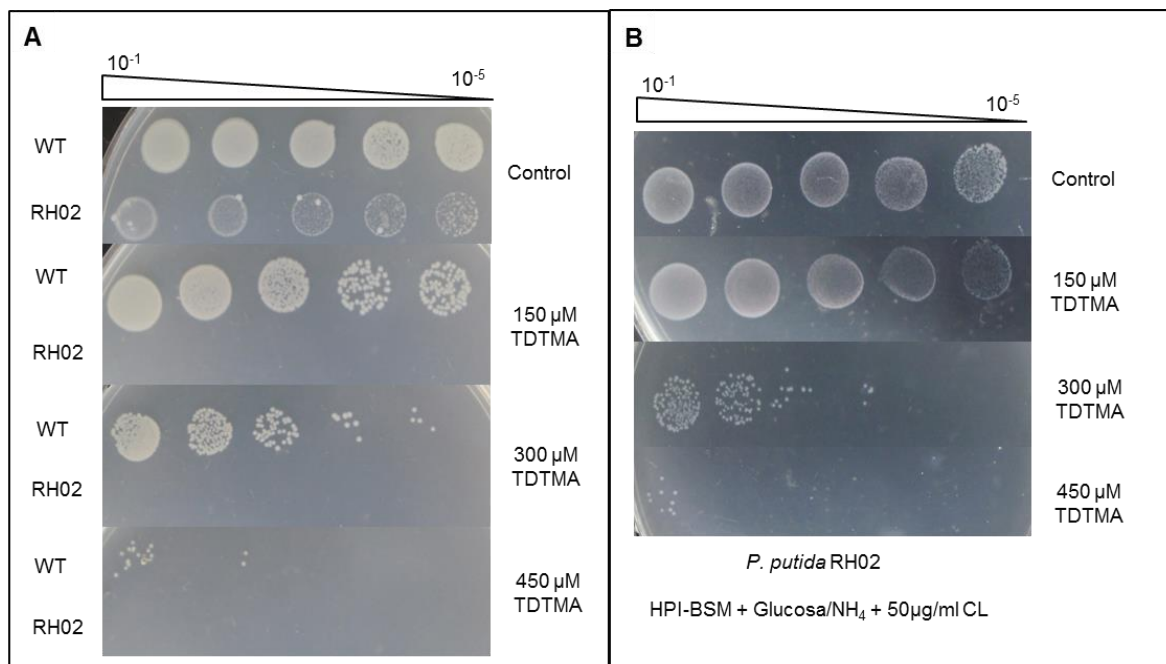


Figura 29: Ensayo de viabilidad en placa. Células de *P. putida* A (ATCC 12633) y *P. putida* RH02, fueron crecidas durante toda la noche en medio rico LB. A partir de los cultivos se realizaron diluciones seriadas las cuales fueron sembradas en placas de medio HPI-BSM, suplementado con 20 mM de glucosa, 18 mM NH₄Cl, 150, 300 y 450 μM de TDTMA (A) y 50 μg/ml de CL comercial (B). Las células fueron incubadas durante toda la noche a 30°C.

Como se desprende del análisis de la **Figura 29 (A)**, *P. putida* RH02 fue incapaz de crecer en medios de cultivo que contienen las fuentes preferenciales de C y N y diferentes concentraciones TDTMA, posiblemente, debido al bajo contenido de CL en su membrana (1,9 %). Sin embargo, la incorporación al medio de cultivo de 50 μg/ml de CL, le permitió a la cepa doble mutante tolerar concentraciones crecientes de TDTMA, de manera similar a lo observado en su cepa parental (**Figura 29 B**). Este resultado claramente pone de manifiesto la importancia de que la membrana de las células de *P. putida* contengan niveles adecuados de CL para tolerar y responder a la presencia de surfactantes catiónicos.

Es conocido que CL presenta características estructurales muy particulares que la diferencian del resto de los glicerofosfolípidos y que, además, este PL se encuentra involucrado en diversos mecanismos esenciales para la homeostasis celular. Tanto los niveles de CL, como así también su distribución espacial estimula cambios muy significativos en las propiedades físicas de la membrana plasmática (Unsay *et al.*, 2013). Como ha sido demostrado, CL es un reservorio de AG insaturados (MacGilvray *et al.*, 2012, Heredia *et al.*, 2014). Por lo tanto, un aumento en los niveles de este PL, produce un aumento en la fluidez de membrana posiblemente por la disminución en el nivel de empaquetamiento de la misma. Además, mediante estudios realizados a partir de monocapas y bicapas lipídicas artificiales, ha sido reportado que bajos niveles de CL, son capaces de disminuir la energía de cohesión entre las monocapas de la membrana, lo cual

favorece la formación de pliegues, disminuyendo de esta forma la estabilidad mecánica de dicha estructura (Nichols-Smith *et al.*, 2004).

Debido al efecto comprobable que ejercen sobre la estabilidad e integridad de las membranas plasmáticas diferentes niveles de CL, es que en bacterias dicho PL se ubica en las regiones de alta curvatura de la membrana, como en los polos celulares y en los septos de división, donde forma zonas de bicapa no lamelar, las cuales son esenciales para el correcto funcionamiento celular (Mileykovskaya y Dowhan 2009).

Por lo tanto, el hecho de que la cepa doble mutante *P. putida* RH02 contenga en su membrana bajos niveles de CL y sobre todo, que dicho PL se distribuya de manera uniforme a lo largo de toda la membrana, generaría a nivel estructural un alto grado de inestabilidad. Esta inestabilidad en la membrana de la cepa doble mutante, se vio evidenciada por una elevada susceptibilidad de dicha cepa a la acción del TDTMA, la cual generó una drástica disminución en las UFC/ml a los pocos minutos de contacto con el detergente (**Tabla 8**).

En su conjunto, los resultados obtenidos referentes al efecto bactericida generado por el TDTMA sobre la cepa doble mutante *P. putida* RH02 llevan a plantear que, si bien en *P. putida* A (ATCC12633) es necesaria la disminución de los niveles de CL y el aumento de los precursores inmediatos PG y PA para responder al efecto bactericida generado por el TDTMA (Boeris *et al.*, 2007), al momento de ponerse en contacto con el surfactante, el microorganismo debe poseer en su membrana ciertos niveles de CL, que garanticen la estabilidad y la funcionalidad de su membrana celular, lo cual le permite a la bacteria tolerar el efecto fluidificante generado por el detergente.



5. - CONCLUSIONES

De este trabajo de Tesis, a través de la combinación de abordajes fisiológicos, moleculares y bioquímicos, se desprenden las siguientes conclusiones:

- En *P. putida* A (ATCC 12633) existen dos genes, *cls* y *cls2*, que codifican para cardiolipina sintasas (Cls) activas. Ambos productos génicos catalizan la síntesis de CL a través de la condensación de dos moléculas de PG.
- El análisis de cepas mutantes de *P. putida* A (ATCC 12633) afectadas en uno u otro gen *cls* y *cls2* reveló que la inactivación de uno de los genes puede ser compensada totalmente por la actividad del producto génico del otro gen y viceversa. Sólo la inactivación simultánea de ambos genes conduce a la obtención de cepas con muy bajos niveles de CL en su membrana.
- En *P. putida* A (ATCC 12633) existe una actividad Cls que cataliza la síntesis de CL utilizando como sustratos PG y PE. Esta Cls es activa en catalizar la síntesis de CL sólo cuando se encuentran inactivas Cls y Cls2.
- El detergente catiónico TDTMA ejerce un efecto fluidificante sobre las membranas bacterianas. *P. putida* A (ATCC 12633) es capaz de contrarrestar el efecto fluidificante provocado por el detergente disminuyendo el contenido de los AGI de sus PL, lo que se refleja en un aumento de la rigidez de la membrana.
- Células de *P. putida* con muy bajo contenido de CL en sus membranas son incapaces de tolerar el efecto fluidificante del TDTMA. Dado que este efecto se revierte con la incorporación a las células de CL agregada exógenamente al medio, se concluye que son necesarios ciertos niveles de CL para garantizar la estabilidad y la funcionalidad de la membrana bacteriana y tolerar el efecto bactericida generado por el detergente.
- En *P. putida* A (ATCC 12633), CL es un reservorio de AGI mientras que PG contiene una alta proporción de AGS. Dado que en presencia de TDTMA el contenido de PG incrementa (120 %) mientras que el contenido de CL disminuye (60 %), se concluye que el incremento de PG y en consecuencia de AGS junto con la disminución de CL con sus AGI, otorga resistencia a las células ya que permite que se contrarreste el efecto fluidificante del detergente.

*Los resultados presentados en este trabajo de Tesis contribuyen a profundizar el conocimiento de los múltiples mecanismos involucrados a nivel de membrana en la respuesta y adaptación de *P. putida* A (ATCC 12633) a los efectos generados por detergentes catiónicos. En su conjunto, muestran que la respuesta de *P. putida* A (ATCC 12633) al estrés generado por el TDTMA es un fenómeno multifactorial que implica modificaciones en el contenido de fosfolípidos y ácidos grasos específicos, donde CL juega un papel significativo. Estas respuestas, sumadas a la capacidad de *P. putida* A (ATCC 12633) de crecer en presencia de altas concentraciones de TDTMA y utilizarlo como única fuente de C y N, pone de manifiesto el potencial de esta cepa para ser utilizada como vehículo en procesos de biorremediación de estos contaminantes ambientales.*



6.- PERSPECTIVAS

De los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis se desprenden las siguientes proyecciones:

Determinar la posible inhibición de las actividades CIs por TDTMA: Como se describió en apartado 4.2.3 de la sección de Resultados y Discusión, el aumento en los niveles de PG y PA y la disminución en los niveles de CL detectados en la respuesta rápida de *P. putida* A (ATCC 12633) a TDTMA, no pueden ser atribuidos a la activación de una PLD que utilice como sustrato CL. Por ello, sería necesario determinar si las modificaciones detectadas en los niveles de los fosfolípidos aniónicos de *P. putida* en respuesta a la acción del TDTMA, se deben específicamente a la inhibición de las actividades CIs por el surfactante. Para ello, sería necesaria la sobreexpresión de CIs activas y realizar posteriores estudios cinéticos en presencia y ausencia de diferentes concentraciones de detergente.

Identificar el gen responsable de codificar para la actividad del tipo CIsC detectada en *P. putida* RH02. En el apartado 4.1.6 de la sección de Resultados y Discusión se determinó, mediante análisis por BLASTP del genoma de *P. putida* KT2440, que el producto deducido del *orf pp5276*, anotado por homología de secuencia como una posible Fosfolipasa D/Transfosfatidilasa, mostraba los mejores parámetros bioinformáticas en comparación con la secuencia de aminoácidos de la CIsC de *E.coli*. Por lo tanto, sería necesario clonar y determinar, luego de la sobreexpresión del producto génico, si el gen homólogo a *pp5276* de *P. putida* A (ATCC 12633), es responsable de codificar para la enzima que cataliza la síntesis de CL utilizando como sustratos PE y PG.

Estudios de regulación de la síntesis de CL en *P. putida* A ATCC 12633: Teniendo en cuenta lo demostrado en este trabajo en cuanto a la presencia de múltiples genes que codifican para *cls* activas en el genoma de *P. putida* A (ATCC 12633), sería apropiado iniciar estudios de regulación de la síntesis de CL, tanto a nivel transcripcional, mediante ensayos de PCR en tiempo real, o a través de la determinación de la actividad promotora de los genes involucrados, en diferentes fases de crecimiento y en presencia o ausencia del detergente.



7. - BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar P., Cronan J., and de Mendoza D.** (1998) "A *Bacillus subtilis* gene induced by cold shock encodes a membrane phospholipid desaturase". *J. Bacteriol* 180:2194-2200.
- Appanna, V.D., Gzásó, L.G. and Pierre, M.St.** (1996) "Multiple-metal tolerance in *Pseudomonas fluorescens* and its biotechnological significance". *J. Biotech.* 52:75-80
- Atlas, R.M. and Bartha, R.** (2001) "Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental". IV Edición. Capítulo 10. Ed. Prentice Hall. España.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J. and Struhl, K.** (1992) "Short protocols in molecular biology". 2^{da} Ed. Nolan, C. Harvard Medical School, New York.
- 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.
- Barák, I. and Muchová, K.** (2013) "The role of lipid domains in bacterial cell processes". *Int J Mol Sci*, 14(2), 4050-4065.
- 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.
- 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. and Lucchesi, G. I.** (2012) "The phosphatidylcholine synthase of *Pseudomonas putida* A ATCC 12633 is responsible for the synthesis of phosphatidylcholine, which acts as a temporary reservoir for Al³⁺". *Microbiology*, 158(5), 1249-1257.
- 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" *Lett. Appl. Microbiol.* 49:491-496.
- 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.
- Campos-García J.** (2001) "Biodegradación de detergentes alquilbenceno sulfonatos" *Ciencia Nicolaita*. 26.
- 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.
- 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.
- Choi, S. Y., Huang, P., Jenkins, G. M., Chan, D. C., Schiller, J. and Frohman, M. A.** (2006) "A common lipid links Mfn-mediated mitochondrial fusion and SNARE-regulated exocytosis". *Nat Cell Biol*, 8(11), 1255-1262.
- Clara, M., Scharf, S., Scheffknecht, C., and Gans, O.** (2007). Occurrence of selected surfactants in untreated and treated sewage. *Water Research*, 41(19), 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.
- 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. and Rock, C. O.** (2008) "Biosynthesis of membrane lipids". *EcoSal Plus*, 3(1).
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

- Diefenbach, R., Heipieper, H.J., and Keweloh, H.** (1992). "The conversion of cis- into trans- unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida* P8: evidence for a role in the regulation of membrane fluidity". *Appl Microbiol Biotechnol* 38:382-387.
- Ding, W. H. and Liao, Y. H.** (2001). "Determination of alkylbenzyltrimethylammonium chlorides in river water and sewage effluent by solid-phase extraction and gas chromatography/mass spectrometry". *Anal Chem*, 73(1), 36-40.
- 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.
- Edward, R. Moore, B., Tindall, B. J., Martins Dos Santos, V. A. P., Pieper, D. H., Ramos J.L. AND Palleroni N. J.** (2006). "Nonmedical: *Pseudomonas*". *Prokaryotes*. 6:646–703.
- 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.** (2001). "Identification of alkyl dimethylbenzylammonium surfactants in water samples by solid-phase extraction followed by ion trap LC/MS and LC/MS/MS". *Environ Sci Technol*, 35(12), 2583-2588.
- 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.
- Fox, E. M., Leonard, N. and Jordan K.** (2011) "Physiological and transcriptional characterization of persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* isolates". *Appl Environ Microbiol*, 77:6559-6569.
- 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" *Environ. Sci. Technol.* 16:483-488.
- Ghosh, A.K., Ramakrishnan, G. and Rajasekharan, R.** (2008) "YLR099C (ICT1) encodes for a soluble acylCoA dependent lysophosphatidic acid acyl transferase responsible for enhanced phospholipid synthesis on organic stress in *Saccharomyces cerevisiae*" *J. Biol. Chem.* 283:24525-24533.
- Giaouris, E., Chorianopoulos, N., Doulgeraki, A., and Nychas, G. J.** (2013). "Co-culture with *Listeria monocytogenes* within a dual-species biofilm community strongly increases resistance of *Pseudomonas putida* to benzalkonium chloride". *PLoS one*, 8(10), e77276.
- 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.
- Gold, V. A., Robson, A., Bao, H., Romantsov, T., Duong, F. and Collinson, I.** (2010) "The action of cardiolipin on the bacterial translocon". *P Natl Acad Sci USA*, 107(22), 10044-10049.
- Goldfine H.** (1982) "Current topics in membranes and transport". In: Razin, S., Rotten, S., editors. New York, NY, USA: Academic Press. pp.1-43.
- Goren, M.** (1984) "The Mycobacteria", part A. In: Microbiology Series. Ed. Kubica, P., Wayne, L.G. New York, USA. pp.379-415.
- 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.
- Guo, D., and Tropp, B.E.** (2000) "A second *Escherichia coli* protein with CL synthase activity" *Biochim. Biophys. Acta.* 1483:263-274.
- Guo, W., Cui, S., Xu, X. and Wang, H.** (2014). "Resistant mechanism study of benzalkonium chloride selected *Salmonella typhimurium* mutants". *Microbial Drug Resistance*, 20(1), 11-16.
- Haines, T. H., and Dencher, N. A.** (2002) "Cardiolipin: a proton trap for oxidative phosphorylation". *FEBS Lett*, 528(1), 35-39.
- 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.
- Härtig, C., Loffhagen, N. and Babel, W.** (1999). "Glucose stimulates a decrease of the fatty acid saturation degree in *Acinetobacter calcoaceticus*". *Arch. Microbiol.* 171:166–172.
- Härtig, C., Loffhagen, N. and Harms, H.** (2005) "Formation of trans fatty acids is not involved in growth-linked membrane adaptation of *Pseudomonas putida*". *Appl. Environ. Microbiol.* 71(4):1915.
- Hegstad, K., Langsrud, S., Lunestad, B. T., Scheie, A. A., Sunde, M., and Yazdankhah, S. P.** (2010). "Does the wide use of quaternary ammonium compounds enhance the selection and spread of antimicrobial resistance and thus threaten our health? ". *Microbial drug resistance*, 16(2), 91-104.

- Heipieper, H. J., R. Diefenbach, and H. Keweloh. (1992). Conversion of *cis* unsaturated fatty acids to *trans*, a possible mechanism for the protection of phenol-degrading *Pseudomonas putida* P8 from substrate toxicity. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:1847–1852.
- Heredia, R.M., Boeris, P.S., Biasutti, M.A., López, G.A., Paulucci, N.S. and Lucchesi, G.I. (2014) Coordinated response of phospholipids and acyl components of membrane lipids in *Pseudomonas putida* A (ATCC 12633) under stress caused by cationic surfactants. *Microbiol-SGM* **160**, 2618–2626.
- Hoffmann, H., Gefitic, 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.
- Huang, K. C., Mukhopadhyay, R. and Wingreen, N. S. (2006). "A curvature-mediated mechanism for localization of lipids to bacterial poles". *PLoS Comput Biol*, **2**(11), e151.
- Hunte, C. (2005) "Specific protein-lipid interactions in membrane proteins". *Biochem. Soc.*
- Jackson, M., Crick, D.C. and Brennan, P.J. (2000) "Phosphatidylinositol is an essential phospholipid of mycobacteria" *J. Biol. Chem.* **275**:30092-30099.
- 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.
- Kates, M., Syz, J. Y., Gosser, D. and Haines, T. H. (1993) "pH-dissociation characteristics of cardiolipin and its 2'-deoxy analogue". *Lipids*, **28**(10): 877-882.
- 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.
- Keweloh, H., Diefenbach, R., and Rehm, H.J. (1991). "Increase of phenol tolerance of *Escherichia coli* by alterations of the fatty acid composition of the membrane lipids". *Arch. Microbiol.* **157**:49-53.
- Koprivnjak, T., Zhang, D., Ernst, C.M., Peschel, A., Nauseef, W.M. and Weiss, J.P. (2011) "Characterization of *Staphylococcus aureus* Cardiolipin Synthases 1 and 2 and Their Contribution to Accumulation of Cardiolipin in Stationary Phase and within Phagocytes" *J. Bacteriol.* **193**, 4134-4142.
- 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 substances—quaternary ammonium compounds as an example". *Desalination*, **215**(1), 209-222.
- 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.
- Lakowicz, J.R. (1999). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 2nd ed., Kluwer Academic, New York.
- 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.
- Lewis, R. N. and McElhaney, R. N. (2009) "The physicochemical properties of cardiolipin bilayers and cardiolipin-containing lipid membranes". *BBA-Biomembranes*, **1788**(10), 2069-2079.
- 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.
- Litman, B.J. and Barenholz Y. (1982) "Fluorescent probe: diphenylhexatriene". *Methods Enzymol* **81**, 678– 685.
- Loffeld, B., and Keweloh, H. (1996). "Cis-trans isomerization of unsaturated fatty acids as possible control mechanism of membrane fluidity in *Pseudomonas putida* P8". *Lipids* **31**:811–815.
- Loffhagen, N., Härtig, C. and Babel, W. (2001). "Suitability of the *trans/cis* ratio of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida* NCTC 10936 as an indicator of the acute toxicity of chemicals". *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **50**:65–71.
- Loffhagen, N., Härtig, C. and Babel, W. (2004). "*Pseudomonas putida* NCTC 10936 balances membrane fluidity in response to physical and chemical stress by changing the saturation degree and the *trans/cis* ratio of fatty acids". *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**:317–323.
- 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" *Microbiology.* **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., 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.
- 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.
- MacGilvray, M. E., Lapek, J. D., Jr, Friedman, A., E. and Quivey, R., G., Jr. (2012) "Cardiolipin biosynthesis in *Streptococcus mutans* is regulated in response to external pH". *Microbiology.* 158:2133–2143.
- Machado, I., Coquet, L., Jouenne, T. and Pereira, M. O. (2013). "Proteomic approach to *Pseudomonas aeruginosa* adaptive resistance to benzalkonium chloride". *J Proteomics*, 89, 273-279.
- 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.
- 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.
- Martínez-Morales, F., Schobert, M., López-Lara, I.M., and Geiger, O. (2003) "Pathways for phosphatidylcholine biosynthesis in bacteria" *Microbiology.* 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.
- 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.
- McDonnell, G. and Russell, A. D. (1999) "Studies on the biodegradability of some cationic surfactant" *Rev. Clin. Microbiol.* 12:147-179.
- Mechín, L., Dubois-Brissonnet, F., Heyd, B. and Leveau, L.Y. (1999) "Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 to didecyldimethylammonium 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.
- Merino, F., Rubio, S., and Pérez-Bendito, D. (2003). Solid-phase extraction of application to the concentration of benzalkonium surfactants in sewage and river water. *Anal. Chem.* 75, 6799-6806.
- Mileykovskaya, E. and Dowhan, W. (2000) "Visualization of phospholipids domains in *Escherichia coli* by using the cardiolipin-specific fluorescent dye 10-N-Nonyl Acridine Orange". *J Bacteriol* 182, 1172–1175.
- Mileykovskaya, E. and Dowhan, W. (2005). "Role of membrane lipids in bacterial division-site selection" *Current Opinion in Microbiology*, 8 (2), p.135-142.
- Morita, Y., Tomida, J. and Kawamura, Y. (2014). "Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials". *Front Microbiol*, 4:422.
- Morrison, W., R. and Smith L., M. (1964). Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *Lipid. Res.* 5:600-608.
- Moser, R., Aktas, M., Fritz, C and Narberhaus, F. (2014) "Discovery of a bifunctional cardiolipin/phosphatidylethanolamine synthase in bacteria". *Molec Microbiol.* 92: 959–972.
- Muñoz-Rojas, J., Bernal, P., Duque, E., Godoy, P., Segura, A. and JL Ramos (2006) Involvement of Cyclopropane Fatty Acids in the Response of *Pseudomonas putida* KT2440 to Freeze-Drying. *Appl Environm Microbiol* 2006 73: 472-477.
- Mykytczuk, N.C.S., Trevors, J.T., Leduc, L.G. and Ferroni, G.D. (2007) Fluorescence polarization in studies of bacterial cytoplasmic membrane fluidity under environmental stress. *Prog Biophys Mol Biol* 95, 60–82.
- 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.
- 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.
- Najjar M., Chikindas M. and Montville T. (2007) "Changes in *Listeria monocytogenes* membrane fluidity in response to temperature stress" *App. Environ. Microbio.* 173:6429-6435.
- 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.

- Neumann, G., N. Kabelitz, and H. J. Heipieper.** (2003). "The regulation of the *cis-trans* isomerase (cti) of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida*: correlation between cti activity and K⁺-uptake systems". *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **105**:585–589.
- Nichols-Smith, S., Teh, S. Y. and Kuhl, T. L.** (2004) "Thermodynamic and mechanical properties of model mitochondrial membranes". *BBA-Biomembranes*, 1663(1), 82-88.
- 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. and Vaara, M.** (1985). "Molecular basis of bacterial outer membrane permeability". *Microbiol. Rev.* **49**: 1-32.
- Nishiyama, N., and Nishihara, T.** (2002). "Biodegradation of Dodecyltrimethylammonium Bromide by *Pseudomonas fluorescens* F7 and F2 Isolated from Activated Sludge". *Microbes Environ*, **17**(4), 164-169.
- 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.
- Pagedar, A., Singh, J and Batish V., K.** (2012). "Adaptation to benzalkonium chloride and ciprofloxacin affects biofilm formation potential, efflux pump and haemolysin activity of *Escherichia coli* of dairy origin". *J Dairy Res*, **79**:383-389.
- 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-depedent multidrug efflux systems" *Microbiology*. **60**:575-608.
- Pini, C. V., Bernal, P., Godoy, P., Ramos, J. L. and Segura, A.** (2009) "Cyclopropane fatty acids are involved in organic solvent tolerance but not in acid stress resistance in *Pseudomonas putida* DOT-T1E". *Microbial Biotechnology*. **2**(2), 253–261
- Pinkart, H.C. and White, D.C.** (1997) "Phospholipid biosynthesis and solvent tolerance in *Pseudomonas putida* strains" *J. Bacteriol.* **176**:4219-4226.
- Pinkart, H.C., Wolfram, J.W., Rogers, R., and White, D.C.** (1996) "Cell envelope changes in solvent-tolerant and solvent-sensitive *Pseudomonas putida* strains following exposure to o-xylene". *Appl Environ Microbiol* **62**: 1129–1132.
- Pluschke, G., Hirota, Y. and Overath, P.** (1978) Function of phospholipids in *Escherichia coli*. Characterization of a mutant deficient in cardiolipin synthesis. *J Biol Chem* **253**:5048–5055.
- 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.
- Ramos, J.L., Duque, E., Gallegos, M.T., Godoy, P., Ramos- Gonzalez, M.I., Rojas, A., Teran, W. and Segura, A.** (2002) "Mechanisms of solvent tolerance in Gram-negative bacteria". *Annu Rev Microbiol* **56**, 743–768.
- 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" *Science*. **235**:593-596.
- Renner, L. D. and Weibel, D. B.** (2011) "Cardiolipin microdomains localize to negatively curved regions of *Escherichia coli* membranes". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **108**(15), 6264-6269.
- 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.
- Romantsov, T., Helbig, S., Culham, D. E., Gill, C., Stalker, L. and Wood, J. M.** (2007) "Cardiolipin promotes polar localization of osmosensory transporter ProP in *Escherichia coli*". *Mol Microbiol*, **64**(6), 1455-1465.
- Roy, H. and Iba, M.** (2008) "RNA-dependent lipid remodeling by bacterial multiple peptide resistance factors" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **105**:4667-72.
- Russell, A., D.** (1998). "Bacterial resistance to disinfectants: present knowledge and future problems". *J Hosp Infect* **43**:S57–S68.
- Russell, A.D., Hammond, S.A. and Morgan, J.R.** (1986) "Bacterial resistance to antiseptics and disinfectants" *J. Hospital Infection*. **7**:213-225.
- 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.
- 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., Fritsch, E. and Maniatis, T.** (1989) "Molecular cloning. A laboratory manual". Second edition. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Appendix A.

- Sandoval-Calderón, M., Geiger, O., Guan, Z., Barona-Gómez, F., and Sohlenkamp, C.** (2009) "A eukaryote-like cardiolipin synthase is present in *Streptomyces coelicolor* and in most actinobacteria". *J Biol Chem* 284: 17383–17390.
- Saxena, R., Fingland, N., Patil, D., Sharma, A. K. and Crooke, E.** (2013) "Crosstalk between DnaA protein, the initiator of *Escherichia coli* chromosomal replication, and acidic phospholipids present in bacterial membranes". *Int J Mol Sci*, 14(4), 8517-8537.
- Schmid, A., Dordick, J.S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M. and Witholt, B.** (2001) "Industrial biocatalysis today and tomorrow" *Nature*. 409:258-268.
- Schweizer, H. P.** (2004). Fatty acid biosynthesis and biologically significant acyl transfer reactions in Pseudomonads. In *Pseudomonas: Biosynthesis of Macromolecules and Molecular Metabolism*, pp. 83–109.
- Senault, C., Yazbeck, J., Gubern, 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.
- 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.
- Short, S.A. and White, D.C.** (1971) "Metabolism of phosphatidylglycerol, lysylphosphatidylglycerol, and cardiolipin of *Staphylococcus aureus*". *J. Bacteriol* 108, 219-226.
- 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.
- 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.
- Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrenner, 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.
- Sutterlin, H. A., Zhang, S. and Silhavy, T. J.** (2014). "Accumulation of phosphatidic acid increases vancomycin resistance in *Escherichia coli*". *J Bacteriol*, 196(18), 3214-3220.
- 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.
- Tabata, A., Nagamune, H., Maeda, T., Murakami, K., Miyake, Y. and Kourai, H.** (2003). "Correlation between resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to quaternary ammonium compounds and expression of outer membrane protein OprR". *Antimicrob Agents Ch*, 47(7), 2093-2099.
- Tan B.K., Bogdanov, M., Zhao, J., Dowhan, W., Raetz, C.R.H., and Guana, Z.** (2012) "Discovery of a cardiolipin synthase utilizing phosphatidylethanolamine and phosphatidylglycerol as substrates". *Proc Natl Acad Sci USA* 109:16504–16509.
- Tang, Y. and Hollingsworth, R.** (1998) "Regulation of lipid synthesis in *Bradyrhizobium japonicum*: low oxygen concentrations trigger phosphatidyl inositol biosynthesis" *Appl. Environ. Microbiol.* 64:1963-1966.
- Tezel, U., Tandukar, M., Martinez, R.J., Sobczyk, P.A., Pavlostathis, S.G.,** (2012). "Aerobic biotransformation of n-tetradecylbenzyl dimethylammonium chloride by an enriched *Pseudomonas spp.* Community". *Environ. Sci. Technol.* 46, 8714–8722.
- 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, M. S., Favrin, S., Romanova, N. and Griffiths, M. W.** (2002). "Postadaptational resistance to benzalkonium chloride and subsequent physicochemical modifications of *Listeria monocytogenes*". *Appl Environ Microbiol* 68, 5258–5264
- Tornabene, T.G.** (1973) "Lipid composition of selected strains of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis*" *Biochim. Biophys. Acta* 306:173-185. *Trans.* 33: 938–942.
- Trevors, J. T** (2003). "Fluorescent probes for bacterial cytoplasmic membrane research". *J Biochem Biophys Methods*. 57: 87-103.
- Tropp, B.E.** (1997) "Cardiolipin synthase from *Escherichia coli*" *Biochim. Biophys. Acta* 1348:192-200.
- Tsai, M., Ohniwa, L.R., Kato, Y., Takeshita, S.L., Ohta, T., Saito, S., Hayashi, H. and Morikawa, K.** (2011) "*Staphylococcus aureus* requires cardiolipin for survival under conditions of high salinity" *BMC Microbiology* 11, 1-13.
- Udaondo, Z., Duque, E., Fernández, M., Molina, L., de la Torre, J., Bernal, P., et al., and Molina-Henares, M. A.** (2012). "Analysis of solvent tolerance in *Pseudomonas putida* DOT-T1E based on its genome sequence and a collection of mutants". *FEBS letters*, 586(18), 2932-2938.

- van der Veen, S. and Abee, T. (2011). "Mixed species biofilms of *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus plantarum* show enhanced resistance to benzalkonium chloride and peracetic acid". *Int J Food Microbiol*, 144:421-431.
- 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 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.
- 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.
- Villasuso, A.L., Aveldaño, 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.
- 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., Lemaitre, 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.
- 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.
- Weber, F. J., Isken, S. and de Bont. J. A. M. (1994). "Cis/trans isomerization of fatty acids as a defence mechanism of *Pseudomonas putida* strains to toxic concentrations of toluene". *Microbiology* 140:2013-2017.
- Wessel, M., Klüsener, S., Gödeke, 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.
- 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 M13mpl8 and pUC19 vectors". *Gen* 33, 103-119.
- Zhang, C., Cui, F., Zeng, G. M., Jiang, M., Yang, Z. Z., Yu, Z. G., Zhu, M. and Shen, L. Q. (2015). Quaternary ammonium compounds (QACs): A review on occurrence, fate and toxicity in the environment. *SciTotal Environ*, 518, 352-362.
- Zhu K, Choi K. H., Schweizer H. P., Rock C. O., Zhang Y. M. (2006) "Two aerobic pathways for the formation of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas aeruginosa*". *Mol Microbiol* 60:260-273.



8.- TRABAJOS CIENTIFICOS PUBLICADOS

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

Heredia, RM, Boeris, PS., Biasutti, MA., **López, GA.**, Paulucci, NS. and Lucchesi, GI (2014). "Coordinated response of phospholipids and acyl components of membrane lipids in *Pseudomonas putida* A (ATCC 12633) under stress caused by cationic surfactants" *Microbiology SGM* 160;2618-2626, (ISSN 1350-0872).

Lucchesi, GI, Bergero, MF, Boeris PS, **López, GA**, Heredia, RM, Liffourrena, AS. (2015). Immobilization of *P. putida* A (ATCC 12633) cells using ca-alginate: environmental applications for the removal of cationic surfactants pollutants in industrial wastewater. Pp 105-117. In *Alginate: Chemical Structure, Uses and Health Benefits*. Nova Publishers. EE.UU. (ISBN 978-1-63463-224-9).

Heredia, RH., Boeris, PS., Liffourrena AS., Bergero MF., **López, GA** and Lucchesi GI (2016). "Release of outer membrane vesicles in *Pseudomonas putida* as a response to stress caused by cationic surfactants". *Microbiology SGM* (En prensa, <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.000265>).

López, GA., Heredia, RH., Boeris, PS. and Lucchesi GI. (2016). "Content of cardiolipin of the membrane and sensibility to cationic surfactants in *Pseudomonas putida*" *Journal of Applied Microbiology* (Bajo revisión).

Coordinated response of phospholipids and acyl components of membrane lipids in *Pseudomonas putida* A (ATCC 12633) under stress caused by cationic surfactants

Romina Marisa Heredia,¹ Paola Sabrina Boeris,¹ María Alicia Biasutti,² Gastón Alberto López,¹ Natalia Soledad Paulucci¹ and Gloria Inés Lucchesi¹

Correspondence

G. I. Lucchesi

glucchesi@exa.unrc.edu.ar

¹Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, CPX5804BYA Río Cuarto, Córdoba, Argentina

²Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, CPX5804BYA Río Cuarto, Córdoba, Argentina

The present study assessed the role of membrane components of *Pseudomonas putida* A (ATCC 12633) under chemical stress conditions originated by treatment with tetradecyltrimethylammonium bromide (TTAB), a cationic surfactant. We examined changes in fatty acid composition and in the fluidity of the membranes of cells exposed to TTAB at a specific point of growth as well as of cells growing with TTAB. The addition of 10–50 mg TTAB l⁻¹ promoted an increase in the saturated/unsaturated fatty acid ratio. By using fluorescence polarization techniques, we found that TTAB exerted a fluidizing effect on *P. putida* A (ATCC 12633) membranes. However, a complete reversal of induced membrane fluidification was detected after 15 min of incubation with TTAB. Consistently, the proportion of unsaturated fatty acids was lower in TTAB-treated cells as compared with non-treated cells. In the presence of TTAB, the content of phosphatidylglycerol increased (120%), whilst that of cardiolipin decreased (60%). Analysis of the fatty acid composition of *P. putida* A (ATCC 12633) showed that phosphatidylglycerol carried the major proportion of saturated fatty acids (89%), whilst cardiolipin carried an elevated proportion of unsaturated fatty acids (18%). The increase in phosphatidylglycerol and consequently in saturated fatty acids, together with a decrease in cardiolipin content, enabled greater membrane resistance, reversing the fluidizing effect of TTAB. Therefore, results obtained in the present study point to changes in the fatty acid profile as an adaptive response of *P. putida* A (ATCC 12633) cells to stress caused by a cationic surfactant.

Received 19 June 2014

Accepted 1 October 2014

INTRODUCTION

Bacteria are commonly exposed to a wide range of stress-inducing conditions and their membranes are the first target able to cope with such alterations. The structural characteristics and fluidity of the membrane change in response to fluctuating environments through changes in the biochemical properties of lipid acyl components. Thus, the predominant response of most bacteria to environmental perturbations is the alteration of the saturated/unsaturated fatty acid ratio (Cronan & Gelmann, 1975; Ingram, 1976; Härtig *et al.*, 1999; Ramos *et al.*, 2002; Mrozik *et al.*, 2004; Bisbiroulas *et al.*, 2011; Paulucci *et al.*, 2011). Other mechanisms, such as isomerization of *cis*/

trans double bonds (Gillan *et al.*, 1981; Okuyama *et al.*, 1991; Diefenbach *et al.*, 1992; Heipieper *et al.*, 2003; Bernal *et al.*, 2007b; Kiran *et al.*, 2005), shortening or elongation of fatty acid chain lengths (Cronan & Gelmann, 1975; Russell, 1984; Diefenbach *et al.*, 1992) and changes in the ratio of terminally branched *iso/anteiso* fatty acids (Kaneda, 1977; Konopásek *et al.*, 2000), have been found to play a role in the fluidity balance within bacteria. Modifications in the polar heads of anionic phospholipids have also been associated with the response to certain types of stress. It has been shown that exposure to stress, such as solvents, cationic surfactants, changes in pH, high temperature and high salinity, causes modifications in the content of phosphatidic acid, phosphatidylglycerol and cardiolipin (Matsumoto, 2001; von Wallbrunn *et al.*, 2002; Catucci *et al.*, 2004; López *et al.*, 2006; Bernal *et al.*, 2007a, Boeris *et al.*, 2007; Ghosh *et al.*, 2008).

Abbreviations: DPH, 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene; FAME, fatty acid methyl ester; TTAB, tetradecyltrimethylammonium bromide; QAC, quaternary ammonium compound.

Quaternary ammonium compound (QAC)-based surfactants are commercially available chemicals frequently used as biocides or disinfectants in a variety of products, including cosmetics, antiseptic solutions, textile finishes, domestic cleaning products and fabric softeners (McDonnell & Russell, 1999; Gilbert & Moore, 2005; Zhao & Sun, 2007). The mode of action of QACs in bacteria relies on the interaction of the surfactant with the lipidic bilayer of the membrane, which leads to the loss of membrane integrity, disruption of transduction energy, disturbance of membrane barrier functions, inhibition of protein action, and subsequent deleterious effects on the growth and viability of microbial cells (McDonnell & Russell, 1999; Gilbert & Moore, 2005). At the molecular level, the action of QACs involves an association between the positively charged quaternary nitrogen and the head groups of acidic phospholipids within the membrane. At high concentrations, QACs solutions form mixed micellar aggregates that solubilize hydrophobic membrane components (i.e. lipid A, phospholipids, etc.) (Gilbert & Moore, 2005). However, some bacterial species, especially species within the genus *Pseudomonas*, have high resistance to QACs and are thought to be capable of degrading these surfactants in activated sludge (Dean-Raymond & Alexander, 1977; van Ginkel *et al.*, 1992; Nishihara *et al.*, 2000; Takenaka *et al.*, 2007). It has been demonstrated that the adaptation of many microorganisms to high concentrations of QACs may include changes in fatty acid composition (Jones *et al.*, 1989; Méchin *et al.*, 1999; Loughlin *et al.*, 2002; To *et al.*, 2002), changes in the acidic phospholipid content of membranes (Nikaido, 1994; Boeris *et al.* 2007, 2009) and the acquisition or hyperexpression of multidrug efflux pumps (Aase *et al.*, 2000; To *et al.*, 2002; Gilbert & Moore, 2005).

Pseudomonas putida A (ATCC 12633) is a ubiquitous Gram-negative bacterium and a potent pollutant degrader that utilizes the QAC tetradecyltrimethylammonium bromide (TTAB) as a carbon, nitrogen and energy source, and was found to be capable of growing in media containing up to 50 mg TTAB l⁻¹ (Liffourrena *et al.*, 2008). In *P. putida* A (ATCC 12633), the adaptive response and resistance to the bactericidal activity of TTAB involves a mechanism that initiates changes to membrane composition, including specific variations in the content of phosphatidic acid, phosphatidylglycerol and cardiolipin (Boeris *et al.*, 2007). In a previous survey, we found that in the presence of 50 mg TTAB l⁻¹, phosphatidic acid and phosphatidylglycerol levels increased 140 and 120 %, respectively, whilst cardiolipin decreased ~60 %. Similar changes were detected in TTAB-adapted bacteria, indicating that these phospholipids were initially and consecutively damaged by TTAB, and needed to be replaced rapidly (Boeris *et al.*, 2009). As we detected such relevant changes in the *P. putida* A (ATCC 12633) phospholipid membrane composition in response to TTAB, our next work aimed at evaluating the change in the content and composition of membrane fatty acids, and its relation with the stability of cell membranes of *P. putida* A (ATCC 12633) under treatment with TTAB.

METHODS

Micro-organisms and culture conditions. *P. putida* A (ATCC 12633) cells were grown aerobically at 30 °C with shaking in a rich Luria-Bertani (LB) medium as well as in a basal salt liquid medium (HPi-BSM) (Lucchesi *et al.*, 1989) with 20 mmol glucose l⁻¹ and 18 mmol NH₄Cl l⁻¹ or 0.15 mmol TTAB l⁻¹ (50 mg l⁻¹) as carbon and nitrogen sources. Growth was evaluated through measurement of culture OD₆₆₀ using a Beckman DU 640 spectrophotometer. In experiments where *P. putida* A (ATCC 12633) was exposed to TTAB, cells were grown in HPi-BSM plus glucose and NH₄Cl until the culture reached late exponential phase (OD₆₆₀ 0.8–1.00). At this point, the culture was divided in two parts: one was kept as a control and the other was treated with 10–50 mg TTAB l⁻¹. After 15 min of exposure to TTAB, cells were harvested by centrifugation at 8000 g for 10 min in a Sorvall RC5C refrigerated centrifuge. The pellets obtained were washed twice with 0.9 % NaCl (w/v) and used for further studies.

Lipid extraction and transesterification. Lipids were extracted from the cells following the Bligh & Dyer (1959) method and separated by TLC (Silica Gel HLF, 250 µm; Analtech) according to Boeris *et al.* (2007). Separated lipids were visualized with iodine vapour and identified by comparison with purified standards (Sigma). All of the different phospholipid classes were scraped from the silica plates and the fractions were quantified by phosphorus determination as described by Fiske & Subbarow (1925).

Fatty acid methyl esters (FAMEs) were prepared from total phospholipid extracts using 10 % BF₃ in methanol (Morrison & Smith, 1964); they were then extracted with hexane and finally concentrated under a stream of N₂ gas.

To determine the fatty acid composition of every specific phospholipid class, the phospholipids were separated as described above, and each spot was scraped from the plates and then methyl-esterified. The resulting FAMEs were resolved according to number of double bonds on TLC plates impregnated with AgNO₃ (10 %, w/v) using hexane/ethyl ether/acetic acid (94 : 4 : 2, by vol.) as solvent. FAME bands were visualized under UV light after spraying the plates with 0.1 % 2,7-dichlorofluorescein in ethanol. Identified spots were scraped from the plates, eluted with hexane and finally dried within conical tubes (Henderson & Tocher, 1992).

Fatty acid analysis. FAMEs were analysed by using a Hewlett Packard 5890 II gas chromatograph equipped with a methyl silicone column (length 50 m; inner diameter 0.2 mm; film thickness 0.33 µm) and with a flame ionization detector. GC conditions were: injector temperature 250 °C; detector temperature 300 °C; nitrogen as carrier gas. Temperature program: 180 °C, 25 min isothermal; 3 °C min⁻¹ to 250 °C. Peak areas of carboxylic acids in total ions were used to determine their relative amounts (Paulucci *et al.*, 2011). Fatty acids were identified by comparison with retention times of purified standards (Sigma).

Replicate determinations indicated that the relative error [(SD/mean) × 100 %] of the values was 2–5 %. Three independent determinations were performed in each case. The SD was <5 %.

The degree of saturation of the extracts was defined as the ratio between the saturated fatty acids and the *cis*-unsaturated fatty acids.

Determination of membrane fluidity. Membrane fluidity was determined by measuring fluorescence polarization of a 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) probe inserted into the cytoplasmic membranes. Fluorescence polarization methods quantify the degree of depolarization of the light emitted by the embedded fluorescence probe, as a measurement of membrane state (Mykytczuk *et al.*, 2007). The relationship between the probe polarization ratio and cytoplasmic membrane fluidity is an inverse one. As the bacterial cytoplasmic

membrane fluidity decreases, the polarization ratio increases and vice versa (Litman & Barenholz, 1982). Following procedures described by Trevors (2003), cells of *P. putida* A (ATCC 12633) grown in HPI-BSM with glucose and NH_4Cl to OD_{660} 0.8–1.00 were harvested, washed in sterile Tris/HCl buffer (pH 7.0; 15 mmol l^{-1}) and resuspended in the same buffer up to OD_{660} 0.2. Then, $1 \mu\text{l}$ fluorescent probe (stock solution 12 mmol l^{-1} in tetrahydrofuran) was added to each 3 ml resuspended culture obtaining a final probe concentration of $4 \mu\text{mol l}^{-1}$. Cultures were incubated with a magnetic stirrer at 200 r.p.m. for 10 min in the dark, at room temperature, to allow DPH incorporation into cytoplasmic membranes. After this time, the culture was divided in two parts: one part was maintained as a control and the other was treated with $50 \text{ mg TTAB l}^{-1}$. Aliquots were collected at different times (1, 5, 15, 30 and 60 min) and their degree of polarization was determined.

Similarly, cells of *P. putida* A (ATCC 12633) grown in HPI-BSM medium with $50 \text{ mg TTAB l}^{-1}$ as the carbon and nitrogen source until the beginning of the stationary phase (OD_{660} 0.4) were incubated with DPH and measurements were performed.

Fluorescence polarization measurements were performed in a Hitachi 2500 spectrofluorometer with a Glam-Thomson polarizer. The excitation wavelength for the DPH probe was 358 nm and the emission wavelength was 428 nm. The slit widths for the excitation and emission beams were 12 and 10 nm, respectively.

The degree of polarization (P) was calculated from the polarization ratio using the expression $P = (I_{VV} - I_{VH}G) / (I_{VV} + I_{VH}G)$, where I_{VV} and I_{VH} are the vertically and horizontally polarized components of light intensities emitted after excitation by vertically polarized light, respectively, and G is the sensitivity factor of the detection system (Lakowicz, 1999).

RESULTS

Changes in fatty acid composition of *P. putida* A (ATCC 12633) cells exposed to TTAB

We demonstrated previously that cells of *P. putida* A (ATCC 12633) grown in basal medium with glucose and NH_4Cl were differentially sensitive to the addition of TTAB: $150 \text{ mg TTAB l}^{-1}$ killed 99 % of the cells, at $100 \text{ mg TTAB l}^{-1}$ the number of cells decreased five to six orders of magnitude compared with the initial number of bacteria, whereas the addition of $10\text{--}50 \text{ mg TTAB l}^{-1}$ resulted in survival of $>99\%$ of the cells (Boeris *et al.*, 2007). As the mechanisms of adaptation of *P. putida* A (ATCC 12633) to TTAB indicated that the tolerance to $50 \text{ mg TTAB l}^{-1}$ is related to changes in phospholipid composition (Boeris *et al.*, 2007, 2009), whole fatty acid profiles of cells grown in glucose and NH_4Cl medium either exposed or not exposed to $50 \text{ mg TTAB l}^{-1}$ for 15 min were compared to assess the influence of the surfactant on the fatty acid composition of *P. putida* A (ATCC 12633) cells.

Fatty acid patterns of *P. putida* A (ATCC 12633) growing exponentially in basal medium with glucose and NH_4Cl as carbon and nitrogen sources are shown in Table 1. The most abundant saturated fatty acid was stearic acid (18:0), representing up to 60 % of the total fatty acids, followed by palmitic acid (16:0), which represented up to 20 % of the total fatty acid content. Palmitoleic acid (16:1 Δ 9) and

vaccenic acid (18:1 Δ 11) were dominant unsaturated fatty acids within the cells (6.27 and 5.83 %, respectively) (Table 1, column 1). All unsaturated fatty acids detected were in the *cis* configuration.

Total fatty acid composition after exposure to TTAB compared with control samples is listed in Table 1 (columns 2). When cells were exposed to $50 \text{ mg TTAB l}^{-1}$, 16:1 Δ 9 fatty acid decreased from 6.27 to 0.34 % and 18:1 Δ 11 fatty acid decreased from 5.83 to 0.14 %, whereas 15:0 and 16:0 fatty acids increased 87 and 24 %, respectively. These results indicated that the degree of saturation of fatty acids was affected. In this sense we also observed that the content of unsaturated fatty acids in TTAB-exposed cells was $\sim 83\%$ lower than in control cells, increasing the saturated/unsaturated fatty acid ratio up to 49.74, whereas in control cells this value was only 7.92. We also detected a TTAB dose-dependent compensatory change in fatty acid composition of *P. putida* A (ATCC 12633) cells in response to increasing TTAB concentrations ($10\text{--}50 \text{ mg l}^{-1}$). For all TTAB concentrations analysed, the decrease in the proportion of both 16:1 Δ 9 and 18:1 Δ 11 fatty acids was accompanied by a significant increase in the proportion of 16:0 fatty acid (Fig. 1). Although the saturated/unsaturated fatty acid ratio always showed an increase in treated cells in response to TTAB (12.46 and 17.21 for 10 and 25 mg TTAB l^{-1} , respectively), a significantly higher ratio was obtained in cells exposed to $50 \text{ mg TTAB l}^{-1}$ (49.74). These results suggested that the reduced content of unsaturated fatty acids in membranes promoted higher rigidity and this modification constituted an adaptive mechanism of *P. putida* A (ATCC 12633) cells to TTAB exposure.

When we evaluated the fluidity of membranes we found that immediately after the addition of $50 \text{ mg TTAB l}^{-1}$, the DPH fluorescence polarization value decreased from 0.12 ± 0.01 to 0.08 ± 0.01 after 1 min exposure to TTAB (Fig. 2), indicating that the surfactant had a fluidizing effect on the hydrophobic core region of the cell membrane. However, as shown in Fig. 2, after 15 min of exposure to TTAB, the DPH fluorescence polarization value returned to a similar value as that obtained in the absence of TTAB (0.11 ± 0.01). Therefore, the early effect of TTAB was an increase in the fluidity of the membrane; *P. putida* A (ATCC 12633) cells seemed to respond by decreasing the degree of unsaturated fatty acids in order to counteract the action of this compound.

Changes in *P. putida* A (ATCC 12633) fatty acid composition during TTAB degradation

P. putida A (ATCC 12633) is able to degrade up to $50 \text{ mg TTAB l}^{-1}$ when used as a sole carbon, nitrogen and energy source (Liffourrena *et al.*, 2008). To identify changes in the cellular fatty acid composition during bacterial degradation of TTAB, fatty acid profiles of control (growing with glucose and NH_4Cl) and TTAB-treated (growing with $50 \text{ mg TTAB l}^{-1}$) cells of *P. putida* A (ATCC 12633) were

Table 1. Effect of TTAB on the fatty acid composition of *P. putida* A (ATCC 12633)

Lipids were extracted and fatty acids of total lipids were converted to FAMES and analysed by GC. Percentage of each fatty acid is relative to total fatty acids defined as 100%. Values represent mean \pm SD of three independent experiments.

Fatty acid	<i>P. putida</i> A (ATCC 12633)		
	Control*	Exposed to TTAB (15 min)*	Grown with TTAB†
Saturated (%)			
14:0	1.28 \pm 0.55 ^a	1.65 \pm 0.23 ^a	1.98 \pm 0.28 ^a
15:0	0.07 \pm 0.02 ^a	0.52 \pm 0.21 ^b	0.15 \pm 0.01 ^c
16:0	24.88 \pm 1.63 ^a	32.66 \pm 0.99 ^b	31.69 \pm 3.09 ^b
17:0	2.63 \pm 0.87 ^a	0.84 \pm 0.12 ^b	1.08 \pm 0.43 ^b
18:0	62.92 \pm 8.33 ^a	62.84 \pm 2.08 ^a	60.35 \pm 8.32 ^a
Total	88.77 \pm 5.02 ^a	97.99 \pm 0.87 ^b	91.78 \pm 7.87 ^{a,b}
Unsaturated (%)			
16:1 Δ 9	6.27 \pm 0.14 ^a	0.34 \pm 0.17 ^b	5.55 \pm 1.03 ^a
18:1 Δ 9	1.99 \pm 0.62 ^a	1.96 \pm 0.48 ^a	2.9 \pm 1.04 ^a
18:1 Δ 11	5.83 \pm 0.4 ^a	0.14 \pm 0.04 ^b	2.89 \pm 0.46 ^c
Total	11.20 \pm 5.04 ^a	1.97 \pm 0.87 ^b	8.22 \pm 1.2 ^c
Saturated/unsaturated fatty acid ratio	7.92^a	49.74^b	11.16^c

Values with the same letter within a row are not significantly ($P \leq 0.05$) different according to the ANOVA test.

*Cultures were grown with glucose and NH_4Cl up to late exponential phase. At this point, the cells were either not exposed (control) or exposed to 50 mg TTAB l^{-1} . After 15 min, the cells were collected.

†Cultures were grown with 50 mg TTAB l^{-1} as the carbon and nitrogen source.

compared. No differences were observed in specific saturated fatty acids and unsaturated fatty acids of *P. putida* A (ATCC 12633) cells grown up to late exponential

phase either with or without TTAB. However, in cells grown with TTAB, the content of 15:0 and 16:0 fatty acids increased 50 and 20%, respectively. The saturated fatty acids represented up to 91.78% of total fatty acids, a value

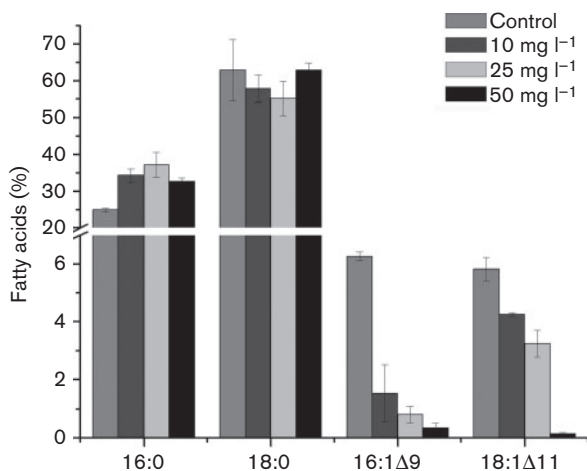


Fig. 1. Changes in fatty acids of *P. putida* A (ATCC 12633) cells following exposure to different TTAB concentrations. Cultures were grown with glucose and NH_4Cl up to late exponential phase. At this point, the cells were exposed or not to 10, 25 and 50 mg TTAB l^{-1} . After 15 min, the cells were collected. Lipids were extracted and fatty acids of total lipids were converted to FAMES and analysed by GC. Percentage of each fatty acid is relative to total fatty acids defined as 100%. Values represent mean \pm SD of three independent experiments.

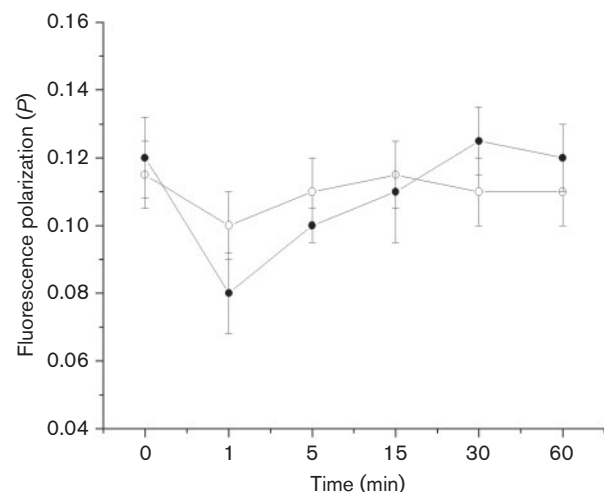


Fig. 2. Fluorescence polarization of DPH in *P. putida* A (ATCC 12633) cells exposed or not to TTAB. Cells were harvested, washed, resuspended in Tris/HCl buffer to OD_{660} 0.2 and then incubated in the absence (○) or presence (●) of 50 mg TTAB l^{-1} after DPH was added. Aliquots were collected at different times and their degree of polarization was determined. Results are the mean \pm SD of three independent determinations.

slightly higher than that detected in cells grown with glucose and NH_4Cl (88.77%) (Table 1, column 3). The total level of unsaturated fatty acids decreased from 11.20% in the control condition to 8.22% in the TTAB medium, mainly by decreasing the content of 18:1 Δ 11 from 5.83 (control value) to 2.89% (TTAB). Consequently, the proportion of the characterized fatty acids expressed as the saturated/unsaturated fatty acid ratio changed in response to TTAB, showing an increase of ~30% in treated cells. For the results obtained after 15 min of exposure of cells to the surfactant (Table 1, column 2), a decrease was observed in the content of unsaturated fatty acids, mostly due to a reduced content of 18:1 Δ 11.

Fluorescence polarization assays showed no differences in membrane states between cells grown with or without TTAB ($P=0.14\pm 0.01$ and 0.12 ± 0.01 , respectively). The results indicated that the fluidizing effect of TTAB (Fig. 2) was counteracted in the membranes of the cells. In spite of the fact that in both assays that included contact of *P. putida* A (ATCC 12633) cells with TTAB (exposure or growing with TTAB) we found an increase in the saturated/unsaturated fatty acid ratio, a significantly higher ratio was obtained in cells exposed for 15 min to TTAB (49.74) compared with cells grown with TTAB (11.16). This suggested that other mechanisms may also be involved in the maintenance of *P. putida* A (ATCC 12633) membrane fluidity, enabling bacterial growth in the presence of TTAB.

Fatty acid composition of specific *P. putida* A (ATCC 12633) phospholipids

We analysed the fatty acid composition in each of the four main phospholipids of *P. putida* A (ATCC 12633), i.e. phosphatidylethanolamine, phosphatidylglycerol, cardiolipin and phosphatidylcholine, after 15 min of exposure to 50 mg TTAB l^{-1} . In each phospholipid, the fatty acid pattern was qualitatively the same as that observed in the absence of TTAB (Table 2). Under both conditions (absence or presence of TTAB) and in each phospholipid class, the identified saturated fatty acids detected were 16:0 and 18:0, whilst the unsaturated fatty acids were 16:1 Δ 9 and 18:1 Δ 11.

It should be noted that phosphatidylglycerol, which represents 6.25% of the total *P. putida* A (ATCC 12633) phospholipid, carries the greater proportion of saturated fatty acids (Table 2). However, cardiolipin and phosphatidylcholine, representing 5.85 and 1.76%, respectively, of total phospholipid carry an elevated proportion of unsaturated fatty acids (18.33 and 21.44% of total unsaturated fatty acids, respectively). The content of saturated fatty acids and unsaturated fatty acids in phosphatidylglycerol and cardiolipin did not change significantly when the cells were exposed to TTAB (Table 2). However, in cells exposed to this surfactant, phosphatidylcholine had ~11% more saturated fatty acids than control cells and also their levels of unsaturated fatty acids decreased ~48% compared with unexposed cells (Table 2).

DISCUSSION

In this work, we studied the modifications in lipid composition of *P. putida* A (ATCC 12633) in relation to TTAB tolerance. In previous studies, we found that this strain was able to modify the phospholipid composition of its membranes in response to stress produced by the presence of 50 mg TTAB l^{-1} (Boeris *et al.*, 2007, 2009). Here, we evaluated in detail the parameters that alter fluidity, as the lipid composition is tightly linked to the state of the membranes. This evaluation was performed through analysis of the degree of saturation in fatty acid alkyl chains of membrane phospholipids. Fatty acid patterns detected in *P. putida* A (ATCC 12633) are consistent with those determined for other *Pseudomonas* species where the predominant fatty acids are saturated (16:0 and 18:0) and monounsaturated (16:1 Δ 9 and 18:1 Δ 11) (Ramos *et al.*, 1997; Schweizer, 2004). However, in contrast to earlier reports related to fatty acid analysis within *P. putida* strains, such as *P. putida* KT2440, *P. putida* DOTT1E, *P. putida* P8 and *P. putida* NYC10936, we have not detected either the fatty acid with a cyclopropane ring (*cis*-9,10-methylenehexadecanoic acid) known as C17:cyclopropane nor the hydroxy fatty acid. Remarkably, *P. putida* A (ATCC 12633) presented a lower proportion of unsaturated fatty acids than found in previously analysed strains (Diefenbach *et al.*, 1992; Loffeld & Keweloh, 1996; Pinkart *et al.*, 1996; Ramos *et al.*, 1997; Neumann *et al.*, 2003; Schweizer 2004; Härtig *et al.*, 2005; Pini *et al.*, 2009). In addition, *trans* unsaturated fatty acids were not found in *P. putida* A (ATCC 12633) during its exponential growth phase, regardless of the presence or absence of QACs in the medium.

The overall results obtained in this work indicate that the content of unsaturated fatty acids in TTAB-exposed cells decreases as a response to an increasing concentration of TTAB in the medium (Table 1, Fig. 1). As a result, the saturated/unsaturated fatty acid ratio always showed an increase in treated cells in response to different TTAB concentrations, although major changes were evident with 50 mg l^{-1} . When *P. putida* A (ATCC 12633) cells were exposed to 50 mg TTAB l^{-1} the content of unsaturated fatty acids was ~83% lower than control values and consequently a 6.3-fold increased saturated/unsaturated fatty acid ratio was obtained under this condition (Table 1). The same response was obtained when cells were grown with 50 mg TTAB l^{-1} as the sole carbon and nitrogen source, although under this condition the saturated/unsaturated fatty acid ratio increased only 1.4-fold compared with the control. Although the addition of this non-lethal concentration of TTAB resulted in the immediate fluidification of *P. putida* A (ATCC 12633) cell membranes, we detected a complete reversal of this fluidification induced by TTAB after long-term incubation with the surfactant. After 15 min of incubation of *P. putida* A (ATCC 12633) cells with TTAB, DPH fluorescence polarization values were similar to those registered in the absence of TTAB (Fig. 2). In this sense, we found a decrease in the content of membrane unsaturated fatty acids that confers a higher rigidity to membranes

Table 2. Fatty acid composition of individual phospholipids of *P. putida* A (ATCC 12633) after 15 min of exposure to TTAB

Phospholipids were resolved by TLC and levels of inorganic phosphorus were determined (Boeris *et al.*, 2007). The fatty acids of total lipids were converted to FAMES, separated according to degree of unsaturation and detected under UV light. The spots identified were scraped off the plates and analysed by GC, as described in Methods.

	Phosphatidylethanolamine		Phosphatidylglycerol		Cardiolipin		Phosphatidylcholine	
	Control	+TTAB	Control	+TTAB	Control	+TTAB	Control	+TTAB
Content [nmol phospholipid (mg protein)⁻¹]*	5.70 ± 0.25 (77.55)	4.95 ± 0.44 (71.84)	0.46 ± 0.14 (6.25)	0.90 ± 0.15 (13.06)	0.43 ± 0.07 (5.85)	0.16 ± 0.011 (2.32)	0.13 ± 0.04 (1.76)	0.11 ± 0.02 (1.59)
Fatty acids (%)								
16:0	36.19 ± 0.89	40.29 ± 0.40	38.09 ± 0.86	40.16 ± 0.97	33.09 ± 0.98	38.07 ± 1.50	30.3 ± 1.18	37.96 ± 2.03
18:0	50.55 ± 1.42	45.02 ± 1.23	50.68 ± 0.95	49.66 ± 0.87	48.57 ± 0.92	43.6 ± 1.20	48.79 ± 1.06	50.78 ± 1.95
Total saturated fatty acids	86.74 ± 1.20	85.31 ± 1.60	88.77 ± 0.69	89.82 ± 0.90	81.66 ± 1.30	81.67 ± 1.36	79.09 ± 1.43	88.74 ± 1.36
16:1Δ9	6.47 ± 0.30	6.22 ± 0.45	3.92 ± 0.29	3.83 ± 0.81	7.80 ± 0.40	8.03 ± 1.02	9.81 ± 1.23	5.27 ± 0.52
18:1Δ11	6.79 ± 0.01	8.46 ± 0.52	7.32 ± 0.68	6.33 ± 1.02	10.53 ± 1.05	10.29 ± 1.05	11.63 ± 1.40	5.98 ± 0.60
Total unsaturated fatty acids	13.26 ± 0.36	14.68 ± 0.65	11.24 ± 0.96	10.16 ± 1.05	18.33 ± 1.03	18.32 ± 1.05	21.44 ± 1.20	11.25 ± 1.24

Control, cultures were grown with glucose and NH₄Cl up to late exponential phase.

+TTAB, cultures were grown with glucose and NH₄Cl up to late exponential phase and 50 mg TTAB l⁻¹ was added. After 15 min, the cells were collected and lipids were extracted and analysed.

*Numbers in parentheses indicate the percentage of the total phospholipid content (mol phosphorus).

(Mykytczuk *et al.*, 2007). This response constitutes an adaptive mechanism of *P. putida* A (ATCC 12633) in the presence of TTAB. As reported by Keweloh *et al.* (1991), the decrease in the content of unsaturated fatty acids probably helps not only to compensate for the fluidizing effect of TTAB, but also to block access of TTAB molecules within the membrane interior due to the greater packing of the saturated chains.

Different reports point out the increasing degree of lipid saturation in membranes as one of the major adaptive mechanisms of bacterial cells to the presence of many toxic compounds (Keweloh *et al.*, 1991; Heipieper *et al.*, 1994; Gutierrez *et al.*, 1999; Cronan, 2002; Denich *et al.*, 2003). It has been reported that aromatic compounds such as benzene, phenol and toluene bring fatty acid alkyl chains of the phospholipid in the cell membrane closer together, increasing the rigidity of the membrane and allowing tolerance to aromatic substrates (Sikkema *et al.*, 1994, 1995). A similar response was activated in *P. putida* A (ATCC 12633) due to the presence of the cationic surfactant TTAB.

Given that all of the unsaturated fatty acids extracted from *P. putida* A (ATCC 12633) cells, either exposed to or grown with TTAB, were in the *cis* configuration, we assume that TTAB did not induce the enzyme responsible for the *cis/trans* isomerization of unsaturated fatty acids – one of the adaptive mechanisms that allows micro-organisms to survive in toxic environments (Heipieper *et al.*, 2003; Bernal *et al.*, 2007b).

Studies on microbial mechanisms of adaptation to QACs include the analysis of changes in the composition of fatty acids and of changes in the polar heads of the phospholipids, separately (Jones *et al.*, 1989; Guérin-Méchin *et al.*, 1999; Méchin *et al.*, 1999; Loughlin *et al.*, 2002; To *et al.*, 2002; Boeris *et al.* 2007, 2009; Bisbiroulas *et al.*, 2011). The purpose of our study was to integrally analyse the adaptation responses of *P. putida* A (ATCC 12633), including the link with the alterations of membranes. It is known that cells of *P. putida* A (ATCC 12633) exposed to TTAB tend to respond by increasing phosphatidic acid and phosphatidylglycerol levels, and decreasing cardiolipin (Boeris *et al.*, 2007, 2009). Consequently, one of the major bacterial responses in TTAB-containing media is to produce a highly negatively charged membrane by increasing the amount of anionic phospholipids, probably to neutralize the positive charge found in the trimethylammonium moiety of TTAB. The fatty acid composition in each of the four main phospholipids of *P. putida* A (ATCC 12633) showed that phosphatidylglycerol carries the greater proportion of saturated fatty acids (Table 2). The content of phosphatidylglycerol increased sixfold when the cells were exposed to TTAB or when they were grown on TTAB as the sole carbon and nitrogen source (Boeris *et al.*, 2009), allowing greater rigidity of membranes. Thus, this alteration resulted in less mobile lipids within the phospholipid bilayer and in a more rigid structure of membranes that is

able to counteract the fluidizing effect of TTAB. However, cardiolipin carried an elevated proportion of unsaturated fatty acids (18.33% of total unsaturated fatty acids) and when *P. putida* A (ATCC 12633) was exposed to TTAB, the levels of cardiolipin decreased up to 60%. Therefore, the decrease detected in the content of unsaturated fatty acids (Table 1) can be associated with the decrease in the content of cardiolipin registered when cells were exposed to TTAB.

Moreover, the presence of TTAB reduced the content of unsaturated fatty acids in phosphatidylcholine (48%) (Table 2). As biosynthesis of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas* is associated with membrane-localized desaturase enzymes (Baysse & O'Gara, 2007), such a reduction of the unsaturated fatty acids in phosphatidylcholine could be explained by inhibition of a Δ^9 desaturase (DesA) that was detected in *P. putida* A (ATCC 12633) and is capable of catalysing the oxygen-dependent desaturation at the *sn*-2 position of existing phospholipids (Nelson *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2006). Whilst further research is required to elucidate the participation of Δ^9 desaturase in the response to TTAB, this assumption is supported by the decrease in the level of 16:1 Δ^9 fatty acid and the concomitant increase in the content of 16:0 fatty acid detected under TTAB stress conditions. However, independent of the desaturase acting on different phospholipid species, it is clear that phosphatidylcholine constituted <2% of the total phospholipids of *P. putida* A (ATCC 12633) cells and its content did not change when cells were exposed to TTAB, indicating its minor participation in the response to QAC.

In summary, both the decrease in the content of unsaturated fatty acids due to the reduction in cardiolipin levels and the increase in phosphatidylglycerol levels, with its major content of saturated fatty acids, contribute to *P. putida* A (ATCC 12633) tolerance to stress resulting from the addition of TTAB. Both responses indicate a mutual dependency and make cells more resistant to the fluidizing effect of the cationic surfactant, and probably allow *P. putida* A (ATCC 12633) to survive in TTAB-contaminated sites.

ACKNOWLEDGEMENTS

G. I. L. and M. A. B. are Career Members of the Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). R. M. H., P. S. B., G. A. L. and N. S. P. are grateful for fellowships from CONICET. This work was supported by grants from CONICET, MCyT Córdoba and SECYT-UNRC of Argentina.

REFERENCES

- Aase, B., Sundheim, G., Langsrud, S. & Rørvik, L. M. (2000). Occurrence of and a possible mechanism for resistance to a quaternary ammonium compound in *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* **62**, 57–63.
- Baysse, C. & O'Gara, F. (2007). Role of membrane structure during stress signaling and adaptation in *Pseudomonas*. In *Pseudomonas*, pp. 193–224. Edited by J. L. Ramos & A. Filloux. New York: Springer.

- Bernal, P., Muñoz-Rojas, J., Hurtado, A., Ramos, J. L. & Segura, A. (2007a). A *Pseudomonas putida* cardiolipin synthesis mutant exhibits increased sensitivity to drugs related to transport functionality. *Environ Microbiol* **9**, 1135–1145.
- Bernal, P., Segura, A. & Ramos, J. L. (2007b). Compensatory role of the *cis/trans*-isomerase and cardiolipin synthase in the membrane fluidity of *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *Environ Microbiol* **9**, 1658–1664.
- Bisbiroulas, P., Psylou, M., Iliopoulou, I., Diakogiannis, I., Berberi, A. & Mastronicolis, S. K. (2011). Adaptational changes in cellular phospholipids and fatty acid composition of the food pathogen *Listeria monocytogenes* as a stress response to disinfectant sanitizer benzalkonium chloride. *Lett Appl Microbiol* **52**, 275–280.
- Bligh, E. G. & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* **37**, 911–917.
- Boeris, P. S., Domenech, C. E. & Lucchesi, G. I. (2007). Modification of phospholipid composition in *Pseudomonas putida* A ATCC 12633 induced by contact with tetradecyltrimethylammonium. *J Appl Microbiol* **103**, 1048–1054.
- Boeris, P. S., Liffourrena, A. S., Salvano, M. A. & Lucchesi, G. I. (2009). Physiological role of phosphatidylcholine in the *Pseudomonas putida* A ATCC 12633 response to tetradecyltrimethylammonium bromide and aluminum. *Appl Microbiol* **49**, 491–496.
- Catucci, L., Depalo, N., Lattanzio, V. M. T., Agostiano, A. & Corcelli, A. (2004). Neosynthesis of cardiolipin in *Rhodobacter sphaeroides* under osmotic stress. *Biochemistry* **43**, 15066–15072.
- Cronan, J. E., Jr (2002). Phospholipid modifications in bacteria. *Curr Opin Microbiol* **5**, 202–205.
- Cronan, J. E., Jr & Gelmann, E. P. (1975). Physical properties of membrane lipids: biological relevance and regulation. *Bacteriol Rev* **39**, 232–256.
- Dean-Raymond, D. & Alexander, M. (1977). Bacterial metabolism of quaternary ammonium compounds. *Appl Environ Microbiol* **33**, 1037–1041.
- Denich, T. J., Beaudette, L. A., Lee, H. & Trevors, J. T. (2003). Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes. *J Microbiol Methods* **52**, 149–182.
- Diefenbach, R., Heipieper, H. J. & Keweloh, H. (1992). The conversion of *cis* into *trans* unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida* P8: evidence for a role in the regulation of membrane fluidity. *Appl Microbiol Biotechnol* **38**, 382–387.
- Fiske, C. H. & Subbarow, Y. (1925). The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem* **66**, 361–375.
- Ghosh, A. K., Ramakrishnan, G. & Rajasekharan, R. (2008). YLR099C (ICT1) encodes a soluble Acyl-CoA-dependent lysophosphatidic acid acyltransferase responsible for enhanced phospholipid synthesis on organic solvent stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **283**, 9768–9775.
- Gilbert, P. & Moore, L. E. (2005). Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *J Appl Microbiol* **99**, 703–715.
- Gillan, F. T., Johns, R. B., Verheyen, T. V., Volkman, J. K. & Bavor, H. J. (1981). *Trans*-monounsaturated acids in a marine bacterial isolate. *Appl Environ Microbiol* **41**, 849–856.
- Guérin-Méchin, L., Dubois-Brissonnet, F., Heyd, B. & 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.
- Gutierrez, J. A., Nichols, P. & Couperwhite, I. (1999). Changes in whole cell-derived fatty acids induced by benzene and occurrence of the unusual 16:1 ω 6c in *Rhodococcus* sp. 33. *FEMS Microbiol Lett* **176**, 213–218.
- Härtig, C., Loffhagen, N. & Babel, W. (1999). Glucose stimulates a decrease of the fatty acid saturation degree in *Acinetobacter calcoaceticus*. *Arch Microbiol* **171**, 166–172.
- Härtig, C., Loffhagen, N. & Harms, H. (2005). Formation of *trans* fatty acids is not involved in growth-linked membrane adaptation of *Pseudomonas putida*. *Appl Environ Microbiol* **71**, 1915–1922.
- Heipieper, H. J., Weber, F. J., Sikkema, J., Keweloh, H. & de Bont, J. A. M. (1994). Mechanisms of resistance of whole cells to toxic organic solvents. *Trends Biotechnol* **12**, 409–415.
- Heipieper, H. J., Meinhardt, F. & Segura, A. (2003). The *cis-trans* isomerase of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas* and *Vibrio*: biochemistry, molecular biology and physiological function of a unique stress adaptive mechanism. *FEMS Microbiol Lett* **229**, 1–7.
- Henderson, R. & Tocher, D. (1992). Thin layer chromatography. In *Lipid Analysis: A Practical Approach*, pp. 65–112. Edited by R. Hamilton & S. Hamilton. Oxford: Oxford University Press.
- Ingram, L. O. (1976). Adaptation of membrane lipids to alcohols. *J Bacteriol* **125**, 670–678.
- Jones, M. V., Herd, T. M. & Christie, H. J. (1989). Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to amphoteric and quaternary ammonium biocides. *Microbios* **58**, 49–61.
- Kaneda, T. (1977). Fatty acids of the genus *Bacillus*: an example of branched-chain preference. *Bacteriol Rev* **41**, 391–418.
- Keweloh, H., Diefenbach, R. & Rehm, H. J. (1991). Increase of phenol tolerance of *Escherichia coli* by alterations of the fatty acid composition of the membrane lipids. *Arch Microbiol* **157**, 49–53.
- Kiran, M. D., Annapoorni, S., Suzuki, I., Murata, N. & Shivaji, S. (2005). *Cis-trans* isomerase gene in psychrophilic *Pseudomonas syringae* is constitutively expressed during growth and under conditions of temperature and solvent stress. *Extremophiles* **9**, 117–125.
- Konopásek, I., Strzalka, K. & Svobodová, J. (2000). Cold shock in *Bacillus subtilis*: different effects of benzyl alcohol and ethanol on the membrane organisation and cell adaptation. *Biochim Biophys Acta* **1464**, 18–26.
- Lakowicz, J. R. (1999). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2nd edn. New York: Kluwer.
- Liffourrena, A. S., López, F. G., Salvano, M. A., Domenech, C. E. & Lucchesi, G. I. (2008). Degradation of tetradecyltrimethylammonium by *Pseudomonas putida* A ATCC 12633 restricted by accumulation of trimethylamine is alleviated by addition of Al³⁺ ions. *J Appl Microbiol* **104**, 396–402.
- Litman, B. J. & Barenholz, Y. (1982). Fluorescent probe: diphenylhexatriene. *Methods Enzymol* **81**, 678–685.
- Loffeld, B. & Keweloh, H. (1996). *cis/trans* isomerization of unsaturated fatty acids as possible control mechanism of membrane fluidity in *Pseudomonas putida* P8. *Lipids* **31**, 811–815.
- López, C. S., Alice, A. F., Heras, H., Rivas, E. A. & Sánchez-Rivas, C. (2006). Role of anionic phospholipids in the adaptation of *Bacillus subtilis* to high salinity. *Microbiology* **152**, 605–616.
- Loughlin, M. F., Jones, M. V. & Lambert, P. A. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* cells adapted to benzalkonium chloride show resistance to other membrane-active agents but not to clinically relevant antibiotics. *J Antimicrob Chemother* **49**, 631–639.
- Lucchesi, G. I., Lisa, T. A. & 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.
- Matsumoto, K. (2001). Dispensable nature of phosphatidylglycerol in *Escherichia coli*: dual roles of anionic phospholipids. *Mol Microbiol* **39**, 1427–1433.

- McDonnell, G. & Russell, A. D. (1999). Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev* **12**, 147–179.
- Méchin, L., Dubois-Brissonnet, F., Heyd, B. & Leveau, J. Y. (1999). Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 to didecyldimethylammonium bromide induces changes in membrane fatty acid composition and in resistance of cells. *J Appl Microbiol* **86**, 859–866.
- Morrison, W. R. & Smith, L. M. (1964). Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J Lipid Res* **5**, 600–608.
- Mroziak, A., Piotrowska-Seget, Z. & Łabuzek, S. (2004). Changes in whole cell-derived fatty acids induced by naphthalene in bacteria from genus *Pseudomonas*. *Microbiol Res* **159**, 87–95.
- Mykytczuk, N. C. S., Trevors, J. T., Leduc, L. G. & Ferroni, G. D. (2007). Fluorescence polarization in studies of bacterial cytoplasmic membrane fluidity under environmental stress. *Prog Biophys Mol Biol* **95**, 60–82.
- 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., Pop, M. & other authors (2002). Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol* **4**, 799–808.
- Neumann, G., Kabelitz, N. & Heipieper, H. J. (2003). The regulation of the *cis-trans* isomerase (*cti*) of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida*: correlation between *cti* activity and K⁺-uptake systems. *Eur J Lipid Sci Technol* **105**, 585–589.
- Nikaido, H. (1994). Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science* **264**, 382–388.
- Nishihara, T., Okamoto, T. & Nishiyama, N. (2000). Biodegradation of didecyldimethylammonium chloride by *Pseudomonas fluorescens* TN4 isolated from activated sludge. *J Appl Microbiol* **88**, 641–647.
- Okuyama, H., Okajima, N., Sasaki, S., Higashi, S. & Murata, N. (1991). The *cis/trans* isomerization of the double bond of a fatty acid as a strategy for adaptation to changes in ambient temperature in the psychrophilic bacterium, *Vibrio* sp. strain ABE-1. *Biochim Biophys Acta* **1084**, 13–20.
- Paulucci, N. S., Medeo, D. B., Dardanelli, M. S. & de Lema, M. G. (2011). Growth temperature and salinity impact fatty acid composition and degree of unsaturation in peanut-nodulating rhizobia. *Lipids* **46**, 435–441.
- Pini, C. V., Bernal, P., Godoy, P., Ramos, J. L. & Segura, A. (2009). Cyclopropane fatty acids are involved in organic solvent tolerance but not in acid stress resistance in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *Microb Biotechnol* **2**, 253–261.
- Pinkart, H. C., Wolfram, J. W., Rogers, R. & White, D. C. (1996). Cell envelope changes in solvent-tolerant and solvent-sensitive *Pseudomonas putida* strains following exposure to *o*-xylene. *Appl Environ Microbiol* **62**, 1129–1132.
- Ramos, J. L., Duque, E., Rodríguez-Herva, J. J., Godoy, P., Haïdour, A., Reyes, F. & Fernández-Barrero, A. (1997). Mechanisms for solvent tolerance in bacteria. *J Biol Chem* **272**, 3887–3890.
- Ramos, J. L., Duque, E., Gallegos, M. T., Godoy, P., Ramos-Gonzalez, M. I., Rojas, A., Teran, W. & Segura, A. (2002). Mechanisms of solvent tolerance in Gram-negative bacteria. *Annu Rev Microbiol* **56**, 743–768.
- Russell, N. J. (1984). Mechanisms of thermal adaptation in bacteria: blueprints for survival. *Trends Biochem Sci* **9**, 108–112.
- Schweizer, H. P. (2004). Fatty acid biosynthesis and biologically significant acyl transfer reactions in Pseudomonads. In *Pseudomonas: Biosynthesis of Macromolecules and Molecular Metabolism*, pp. 83–109. Edited by J. L. Ramos. New York: Kluwer.
- Sikkema, J., Weber, F. J., Heipieper, H. J. & de Bont, J. A. M. (1994). Cellular toxicity of lipophilic compounds: mechanisms, implications, and adaptations. *Biocatalysis* **10**, 113–122.
- Sikkema, J., de Bont, J. A. M. & Poolman, B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol Rev* **59**, 201–222.
- Takenaka, S., Tonoki, T., Taira, K., Murakami, S. & Aoki, 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, M. S., Favrin, S., Romanova, N. & Griffiths, M. W. (2002). Postadaptational resistance to benzalkonium chloride and subsequent physicochemical modifications of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **68**, 5258–5264.
- Trevors, J. T. (2003). Fluorescent probes for bacterial cytoplasmic membrane research. *J Biochem Biophys Methods* **57**, 87–103.
- van Ginkel, C. G., van Dijk, J. B. & Kroon, A. G. M. (1992). Metabolism of hexadecyltrimethylammonium chloride in *Pseudomonas* strain B1. *Appl Environ Microbiol* **58**, 3083–3087.
- von Wallbrunn, A., Heipieper, H. J. & Meinhardt, F. (2002). *Cis/trans* isomerisation of unsaturated fatty acids in a cardiolipin synthase knock-out mutant of *Pseudomonas putida* P8. *Appl Microbiol Biotechnol* **60**, 179–185.
- Zhao, T. & Sun, G. (2007). Antimicrobial finishing of wool fabric with quaternary aminopyridinium salts. *J Appl Polym Sci* **103**, 482–486.
- Zhu, K., Choi, K. H., Schweizer, H. P., Rock, C. O. & Zhang, Y. M. (2006). Two aerobic pathways for the formation of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **60**, 260–273.

Edited by: P. Zuber

Chapter 5

**IMMOBILIZATION OF *P. PUTIDA* A (ATCC 12633)
CELLS USING Ca-ALGINATE: ENVIRONMENTAL
APPLICATIONS FOR THE REMOVAL OF CATIONIC
SURFACTANTS POLLUTANTS IN INDUSTRIAL
WASTEWATER**

***Gloria I. Lucchesi, María F. Bergero, Paola S. Boeris,
Gastón A. López, Romina M. Heredia
and Andrés S. Liffourrena***

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

ABSTRACT

One of the most promising areas of environmental research is using the immobilized cells to reduce environmental pollutions through biodegradation of many toxic compounds. Cross-linked Ca-alginate is one of the most commonly used immobilization polymers due to its highly porous structure that facilitate diffusion of solutes and dissolved gases. Quaternary ammonium based-surfactants (QACs) are commercial chemicals widely used as disinfectant and routinely deposited on land and into water systems, as either part of an intended process or as industrial and household waste. Upon release into the environment, the biodegradability of QACs is limited by their antimicrobial activity and for this reason, the effective degradation of QACs is necessary to protect the environment. *Pseudomonas putida* A (ATCC 12633) is a ubiquitous gram-negative bacterium and a potent pollutant degrader that utilized QACs as a carbon, nitrogen and energy source. This ability has great application for the bioremediation of contaminated sites and biotransformation of industrial wastes. As immobilized microorganism offer several advantages over free cells for the bioremediation of contaminated sites, the present work has been carried out to develop an immobilized bacterial cell system for the degradation of QACs. Accordingly, the performance of the degradation of QACs: tetradecyltrimethylammonium bromide, tetradecylbenzylidimethyl-

Complimentary Contributor Copy

ammonium chloride, hexadecylbenzyltrimethylammonium chloride and benzalkonium chloride by Ca-alginate-immobilized cells of *P. putida* A (ATCC 12633) was compared with that of its free form counterpart. The results revealed that the immobilized cell systems can more efficiently degrade than free cells. Maximum degradation was observed with *P. putida* A (ATCC 12633) cells immobilized in 4% (v/v) Ca-alginate concentration with a bead size of 3.0 mm containing $1-5 \times 10^8$ cfu ml⁻¹ of cells, at 30°C, in buffered medium (pH 7.5), under agitation (100 rpm). The developed system was highly stable and the Ca-alginate entrapped *P. putida* cells can be recycled up to the four cycles without any marked change in their ability to carry out the QACs degradation.

QACs of an industrial effluent were successfully removed more than 90% in 48 h by immobilized cells of *P. putida* A (ATCC 12633). The reduction in the QACs concentration after treatment with immobilized cells can be correlated with the reduction in the phytotoxicity on *Lactuca sativa* seed germination and root elongation. We conclude that the Ca-alginate entrapped *P. putida* A (ATCC 12633) cells can be successfully applied for the remediation of QACs present in industrial wastewater systems.

1. INTRODUCTION

Quaternary ammonium compounds (QACs) are cationic surfactants extensively used in various domestic, industrial, and medical applications, primarily as biocides or disinfectants [1-3]. About 75% of the QACs consumed annually are released into wastewater treatment systems whereas the rest is directly discharged into the environment. As a result, QACs are ubiquitous contaminants found worldwide in both engineered and natural systems [4-7]. The discharge of QACs can disturb the purifying activities of natural aquatic systems or public wastewater treatment plants because of their toxicity to microbial life [8, 9] and, for this reason, the effective degradation is necessary to protect the environment. Compared to physico-chemical methods, biodegradation is regarded as an appealing alternative method to detoxify or remove pollutant chemicals from the environment because of lower costs and the possibility of complete mineralization.

Predominant QACs found in engineered and natural systems are tetradecyltrimethylammonium bromide (TTAB) and benzalkonium chloride (BAC) [6, 7, 10]. Unlike TTAB, BACs contains a quaternary N bound to two methyl groups, a benzyl group, and a straight-chained alkyl group that varies in length (typically, C12, C14, and C16) and it is known that the presence of the benzyl group decreases the biodegradability of these QACs [11, 12]. *Pseudomonas* is frequently reported as the main bacterial genus isolated from QACs contaminated environments and several strain within this genus showed ability to degrade TTAB and BAC [12-17]. However, the use of free microorganisms for the bioremediation of contaminated sites can fail because the inoculants must be able to overcome biotic and abiotic stresses in the environment in which they are introduced. In addition, the free organisms might cause other problems such as secondary pollution due to difficulties in handling and cell separation [18]. The immobilization of microorganisms, both entrapped and/or adsorbed has many advantages for use in effluent treatment. The main advantages of using immobilized cells of microorganisms are their higher operational stability, their increased rate of degradation, their high cell density and that they can be stored for long periods without losing their degradative abilities [19-23]. It has also been reported that immobilization provides a protective environment against predation and competition by populations of microorganisms

Complimentary Contributor Copy

that naturally reside in wastewater [24]. There are several types of immobilization matrices used for bacterial cells. An ideal immobilization matrix would be functional at ambient temperatures, survive harsh wastewater conditions including contaminated water and turbidity, and allow the flow of nutrients and oxygen and analyses through the matrix along with wastes and signal out. Among various anticipated technologies for cell encapsulation, the use of alginate gel beads is the most promising and adaptable method.

Alginates are formed by converting mannuronic and guluronic acid into their salt forms of mannuronate and guluronate. They are linear copolymers consisting of [1-4] linked β -D-mannuronic acid and α -L-guluronic acid [25]. Alginates are ionically crosslinked between the carboxylic acid elements through divalent ions like Ca^{+2} . The method of encapsulation is by itself easy since the immobilization process has one step procedure of bead formation upon dripping alginate into a solution of divalent ions. Thus, calcium-alginate cross-linking is one of the most commonly used immobilization methods because the procedure is simple, relatively mild and does not have any toxic effects on the cells [26-29].

Pseudomonas putida A (ATCC 12633) is able to completely mineralize the QACs TTAB [17, 30] and offers promising opportunities for the efficient biological removal of this or other predominant QACs found in engineered and natural systems. As part of the present study, the optimal entrapping conditions of *P. putida* A (ATCC 12633) in bead of Ca-alginate were determined. Following the aim of searching biological alternatives for the removal of QACs from contaminated environments, the ability of immobilized cells of *P. putida* A (ATCC 12633) to degrade QACs by adjusting various parameters, such as the pH value, temperature and initial concentration of QACs is showed. Also, the advantages of using *P. putida* A (ATCC 12633) immobilized cells for the development of a clean technology to achieve QACs removal from industrial effluent is presented.

2. OPTIMIZATION OF ENTRAPPING CONDITIONS

The mechanical stability of gel beads is largely influenced by their properties of the support material that determine how the beads are able to accommodate the stresses to which are subjected in a biodegradation process. Many studies have focused on mechanical properties, such as stiffness, fracture resistance and the elasticity of the gels-beads. That is, they depend on not only the size, shape, and density of the beads, but also on their roughness, hardness, elasticity and degree of homogeneity.

The optimal conditions to prepare Ca-alginate beads containing *P. putida* A (ATCC 12633) cells for achieving a higher QACs degradation rate were investigated by changing the concentration of alginate (3%, 4% and 5% w/v) [29]. Images scanning electron microscope (SEM) showed that the beads prepared with 4% of alginate exhibited a uniform and crinkled surface structure with good distributions of pores on the surface (Figure 1a) while those prepared with 5% of alginate showed a more compact surface structure with decreased surface roughness and porosity (Figure 1c), characteristics known to increase the mass transfer resistance [31, 32]. The shape of the beads obtained with 3% of alginate was more irregular (Figure 1b) and these beads did not maintain their stability over time with loss of cells into the medium.

Complimentary Contributor Copy

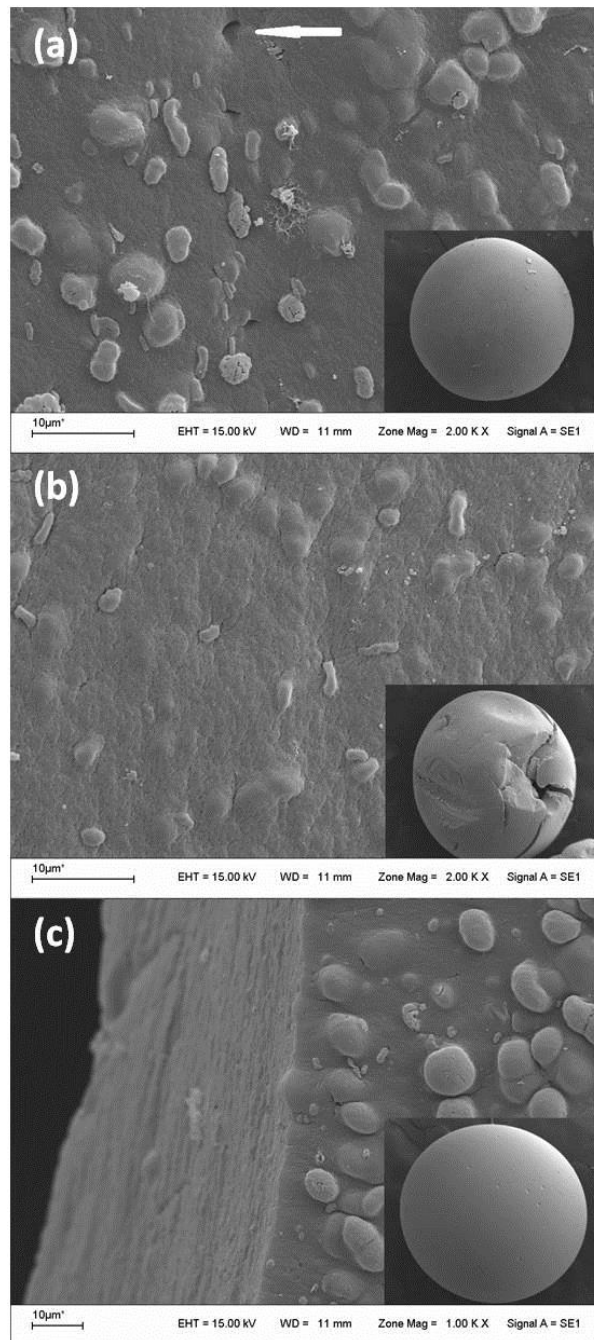


Figure 1. Scanning electron micrographs of the whole beads (inset) and the surface of the beads. (a) Alginate 4%; (b) Alginate 3%; (c) Alginate 5%. Arrow head show the pore.

Beads made with both 4% and 5% of alginate, did not display any structural changes or damage after four days of incubation [29]. Thus, given the porosity, the good mechanical stability and maintenance of cell into the beads, 4% Na-alginate was selected to prepare beads with *P. putida* A (ATCC 12633) cells.

Complimentary Contributor Copy

3. PROCEDURE TO IMMOBILIZATION OF MICROORGANISMS IN Ca^{2+} -ALGINATE BEADS

P. putida A (ATCC 12633) were grown in a rich Luria–Bertani (LB) medium for 12 h at 30°C. The cells were harvested by centrifugation at 8,000 $\times g$ for 10 min at 4°C, washed twice with sterile 0.9% NaCl and resuspended in buffered medium (20 mM Tris–HCl pH 7.4, 44 mM KCl, 85 mM NaCl and 0.8 mM MgSO_4) to a D_{660} of 1.9. Next, 10 ml of this suspension (cell content in terms of wet weight was equivalent to 0.6 g of cells) was added to 20 ml of a 4% w/v sterilized Na-alginate solution (final concentration of alginate being 2.7% w/v). The solutions were subsequently stirred for 10 min, and the resulting alginate/cell mixtures were dripped into ice cold sterile 0.3 M CaCl_2 in 25 mM Tris HCl pH 7.4, 50 mM NaCl, which generated gel beads of approximately 3 mm in diameter. The beads were then hardened in fresh CaCl_2 solution with gentle agitation for 60 min. Finally, the beads were washed several times with 0.9% NaCl to remove excess calcium ions and untrapped cells. Following this procedure 1,4 beads were obtained (equivalent to 16.8 g wet weight) [29]. The content of the cells in the beads were measured by dissolving 10 alginate beads in 0.25 ml of a sterile solution of 0.16 M phosphate buffer, pH 7.4. The suspension was vortexed to achieve a complete dissolution of the alginate, and the number of viable cells (cfu ml^{-1}) was determined by plating serially diluted cell suspensions on LB after 24 h of incubation. The final cell content in the beads reached about 0.036 g g^{-1} beads or 1.0×10^8 cfu ml^{-1} beads.

4. QACs DEGRADATION USING Ca^{2+} -ALGINATE IMMOBILIZED CELLS OF *P. PUTIDA* A (ATCC 12633)

4.1. Effect of Agitation, pH and Temperature on QAC Degradation

It is widely known that the temperature and pH values of the degradation medium can affect the activity of enzymes, microbial growth and the structure of the beads. To determine the optimum pH and temperature for TTAB removal by immobilized *P. putida* A (ATCC 12633) cells, pH values ranging from 6.5 to 8.5 and temperature ranging from 15°C to 40°C were studied. The batch cultures were performed using 250-ml flasks with 50 ml of buffered medium with an initial TTAB concentration of 100 mg l^{-1} and 100 alginate beads containing immobilized *P. putida* A (ATCC 12633) cells ($1\text{--}5 \times 10^8$ cfu ml^{-1}). As the agitation promotes the exchange of oxygen between the beads and the environment and the degradation of TTAB is an aerobic process that involves the oxidation of this substrate [17], the degradation of TTAB was evaluated under controlled conditions of aeration (agitation at 100 rpm).

The optimum pH for the degradation of QAC by immobilized *P. putida* cells is pH 7.4. The removal efficiency was reduced 58% at both pH 8.5 and pH 6.5. We have avoided using pH under than 6.0 since the Ca^{2+} -alginate is sensitive to acid pH [33, 34]. The optimum temperature for degradation was found to be 30°C. As expected, consistent with the mesophyllic characteristic of *P. putida* A (ATCC 12633) and the fact that at a lower temperature the bacterial metabolism is slower, for an initial TTAB concentration of 100 mg l^{-1} at pH 7.4 and 16–18°C, only 40% of the cationic surfactant disappeared from the medium

Complimentary Contributor Copy

after 48 h of incubation. On the other hand, the immobilized cells could be stored for 60 days at 4 °C without losing their degrading ability [29].

4.2. Effect of Initial QACs Concentration

Degradation of TTAB and two components of BAC of different alkyl chain lengths, tetradecylbenzyltrimethylammonium chloride (C_{14} BDMA) and hexadecylbenzyltrimethylammonium chloride (C_{16} BDMA), in concentrations that ranged from 35 to 330 mg l^{-1} were studied using immobilized cells in batch systems. QACs concentrations were analyzed in the supernatants of the batch cultures using a colorimetric method based on the reaction of cationic surfactant with bromothymol blue [35]. According to this method, an anionic dye-QAC ion pair is formed, which is then solvent extracted, and the color intensity is measured spectrophotometrically at 420 nm.

For all the TTAB concentrations evaluated with immobilized cells (50 to 330 mg l^{-1}), the rate degradation was the fastest in the first 2 h and slows down after this period (Figure 2) while the removal of C_{14} BDMA and C_{16} BDMA (35 to 315 mg l^{-1}) was very fast during the first 6 h (Figure 3). While the beads remained intact and cells leakage was slight during the whole experiment, the enhanced degradation in the first time was probably due to the accelerated reaction rates caused by high local cell density in the immobilized matrix [29].

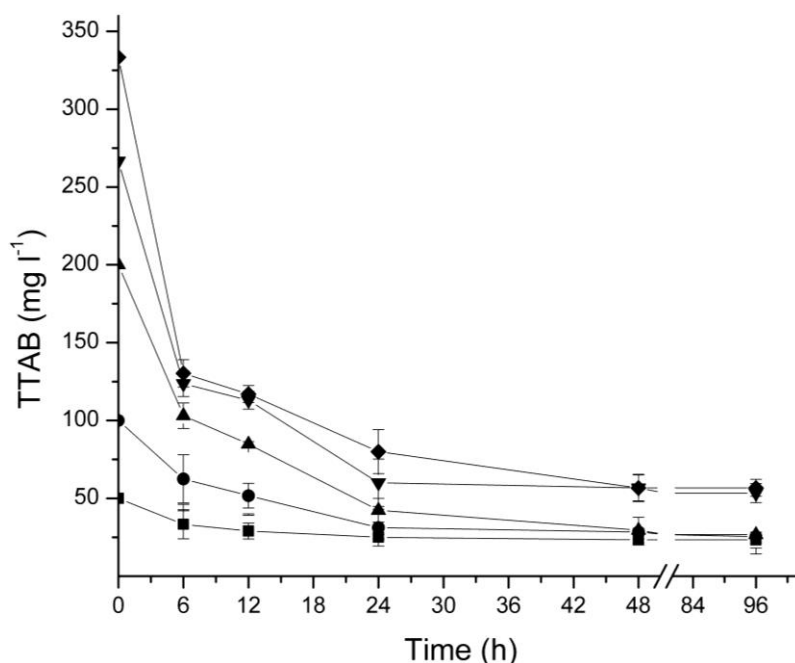


Figure 2. Degradation of different initial concentrations of TTAB by 4% Ca-alginate beads containing *P. putida* A ATCC 12633 cells. The cell content in terms of wet weight in the beads was 0.043 g. TTAB initial concentrations: 50 mg l^{-1} (■), 100 mg l^{-1} (●), 200 mg l^{-1} (▲), 260 mg l^{-1} (▼), 330 mg l^{-1} (◆). Values are the mean \pm SD ($n = 3$).

Complimentary Contributor Copy

The percent of QACs depletion measured in batch system may result from the combination of degradation by immobilized microorganisms and QACs adsorbed by the support. While no degradation was obtained when the process was evaluated using empty beads without microorganisms, we also corroborate that QAC is metabolized by immobilized cells. In cell-free extracts obtained from beads, the specific activity of TTAB-monooxygenase, the first enzyme responsible for catalyzing the breakdown of the C-N bond of TTAB [17, 34], increased after the first 30 min of contact of the beads with 100 mg l^{-1} of the detergent (from 0.083 ± 0.03 ($n = 3$) $\text{nmol TMA min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$ to 1.31 ± 0.13 ($n = 3$) $\text{nmol TMA min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$), which was kept constant during the degradation process. This result shows that the immobilized cells metabolized TTAB once it entered the bead. In addition, no degradation occurred at an initial TTAB concentration of 100 mg l^{-1} when beads were loaded with $2 \times 10^8 \text{ cfu ml}^{-1}$ of *P. putida* knockout-mutant in which the cells lack TTAB monooxygenase activity and are unable to utilize TTAB as a growth substrate [34].

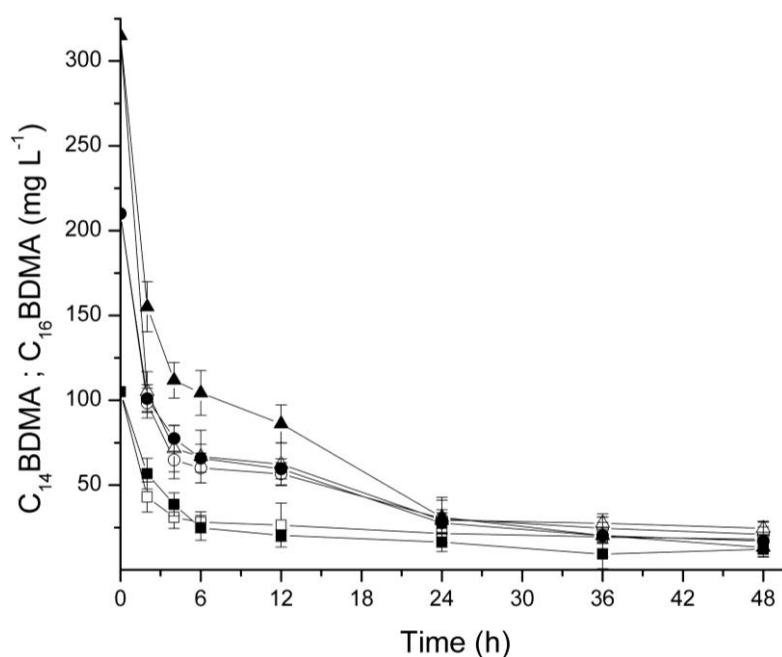


Figure 3. Degradation of different concentrations of QACs by immobilized cells of *P. putida* A (ATCC 12633). Ca-alginate beads containing cells of *P. putida* ($1 \times 10^8 \text{ cfu mL}^{-1}$ of beads) were incubated in buffered medium pH 7.5, at 30°C with shaking in presence of (a): 105 (■, □), 210 (●, ○) and 315 (▲, △) mg L^{-1} of C₁₆BDMA (filled symbols) and C₁₄BDMA (empty symbols). Values are means \pm SD ($n=3$).

It has been suggested that immobilization provides a type of membrane stabilization, which has been assumed to be responsible for cell protection and better degradation rates in immobilized cells compared to free cells [37-39]. Considering that the toxicity of QACs is centered upon the physical disruption and partial solubilization of the cell wall and membrane resulting in the death of the bacterial cell [1], the tolerance of the immobilized cells to higher concentrations of QACs (up 300 mg l^{-1}) can be attributed to the ability of the alginate to protect the cells from the surrounding environment [19, 22, 40-42].

Complimentary Contributor Copy

5. QACs Degradation from an Industrial Effluent by Immobilized *P. Putida* A (ATCC 12633) Cells

As a result of their extensive use in a variety of environmental and clinical settings, QACs are frequently detected in natural environments and in the influent of wastewater treatment plants [4, 7, 43]. Following their primary application, residual QACs typically accumulate in municipal sewage systems [4, 44] and therefore, QACs biodegradation by microorganisms within wastewater treatment plants is a desirable process that could reduce potential risks to public and environmental health. The effluent samples from a poultry industry of Río Cuarto, Córdoba, Argentina, were collected from the discharge channels, before delivery to the rivers. Physico-chemical properties of collected samples were analyzed in the laboratory according to standard methods (APHA 2005) and the values of parameters analyzed were: pH 6.5; Biochemical oxygen demand (BOD): 20 mg l⁻¹; Chemical oxygen demand (COD): 70 mg l⁻¹; oil and grease: 12 mg l⁻¹ and suspended solids: 35 mg l⁻¹. QACs content of the effluent was 28±3 mg l⁻¹. When the effluent was treated with Ca-alginate beads containing *P. putida* cells, the immobilized system degraded, after 48 h of incubation, approximately 85% of QACs presents in the non-sterilized effluent sample (Figure 4).

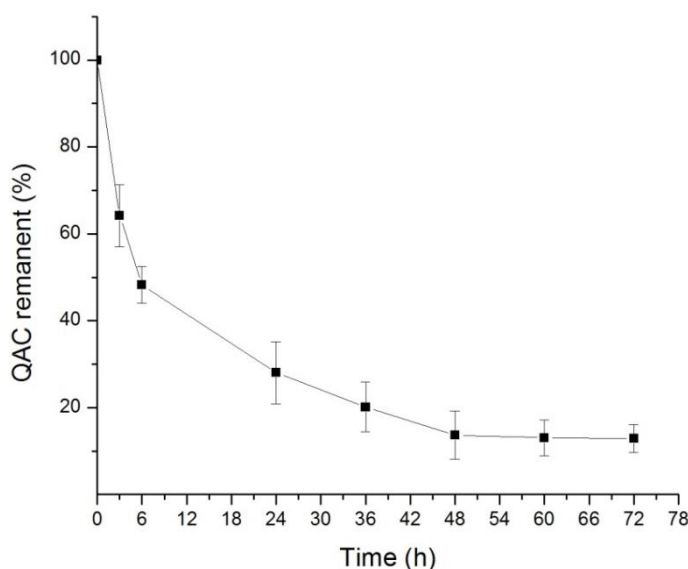


Figure 4. Percentage of removal of QACs in a non-sterilized effluent sample treated with immobilized cells of *P. putida* A (ATCC 12633). Values are means ± SD (n=3).

In addition to this, no degradation was obtained when the process was evaluated using empty beads without microorganisms, indicating newly that the disappearance of QACs from the effluent was not due to a process of adsorption. The toxicity test of QAC to *Lactuca sativa* shown that 25 mg l⁻¹ of surfactant inhibited seed germination and root elongation (Figure 5b) while no significant adverse effects were observed in seeds exposed to 0-10 mg l⁻¹ of QAC (93% of seed germination) (Figure 5a). The assay performed with the effluent samples resulted in a high inhibition of the seed germination (Figure 5c). However, after 48 h of treatment with immobilized *P. putida* cells the toxicity of the non-sterilized effluent

Complimentary Contributor Copy

decreased, obtaining 93.5% of seed germination (Figure 5d). Thus, reduction in the phytotoxicity of QACs can be correlated with their removal after treatment with *P. putida* A (ATCC 12633) immobilized cells due to biodegradation.

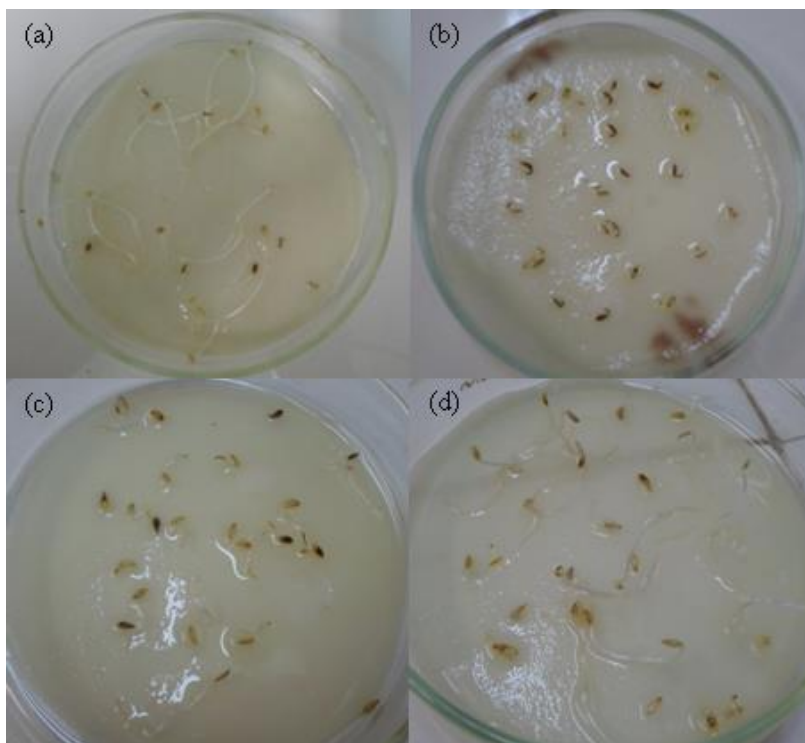


Figure 5. Effect of QACs on germination of *Lactuca sativa* seeds. Seeds were exposed to: (a) Deionized water (control), (b) 25 mg L^{-1} of BAC, (c) effluent samples; (d) effluent samples after 48 h of treatment with immobilized *P. putida* cells.

CONCLUSION

The QACs are extensively used around the world. After use, they are routinely deposited on land and into water systems and can disturb the purifying activities of natural aquatic systems or public wastewater treatment plants because of their toxicity to microbial life. Therefore, it is important that efforts are made for the remediation of contaminated sites. Biodegradation of QACs with specific microorganisms is economic and environmental and socially acceptable. By understanding the mechanism for QACs degradation, it is possible to develop technologies to increase the efficiency of degradation, such as the immobilization of microbial cells in Ca-alginate beads.

In this study we have successfully established the optimal parameters to prepare Ca^{2+} -alginate beads containing *P. putida* A (ATCC 12633) cells. The concentration of 4% w/v Na-alginate was optimal for the effective encapsulation of the cells, resulting in spherical beads of regular size and good mechanical stability, which allows for both diffusion and degradation of the substrate without loss of cell viability.

Complimentary Contributor Copy

The immobilization of *P. putida* A (ATCC 12633) cells in Ca-alginate matrix showed numerous advantages to achieve efficient treatment of industrial wastewater containing QACs contaminant: *i*) The cells are resistant to the toxic effect of different QACs. *ii*) The biodegradative process is very efficient. *iii*) QACs of an industrial effluent were successfully removed. *iv*) The reduction in the phytotoxicity of QACs can be correlated with their removal after treatment with immobilized cells.

REFERENCES

- [1] Macdonnell, G; Russell, AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1999 12, 47-179.
- [2] Gilbert, P; Moore, LE. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *J. Appl. Microbiol.*, 2005 99, 703-715.
- [3] Zhao, T; Sun, G. Hydrophobicity and antimicrobial activities of quaternary pyridinium salts. *J. Appl. Microbiol.*, 2007 104, 824-830.
- [4] Merino, F; Rubio, S; Pérez-Bendito, D. Mixed aggregate-based acid-induced cloud-point extraction and ion-trap liquid chromatography–mass spectrometry for the determination of cationic surfactants in sewage sludge. *J. Chromatogr. A*, 2003 998, 143-154.
- [5] Clara, M; Scharf, S; Scheffknecht, C; Gans, O. Occurrence of selected surfactants in untreated and treated sewage. *Water Res.*, 2007 41, 4339-4348.
- [6] Kreuzinger, N; Fuerhacker, M; Scharf, S; Uhl, M; Gans, O; Grillitsch, B. Methodological approach towards the environmental significance of uncharacterized substances—quaternary ammonium compounds as an example. *Desalination*, 2007 215, 209-222.
- [7] Martinez-Carballo, E; Sitka, A; Gonzalez-Barreiro, C; Kreuzinger, N; Furrhacker, M; Scharf, S; Gans, O. Determination of selected quaternary ammonium compounds by liquid chromatography with mass spectrometry. Part I. Application to surface, waste and indirect discharge water samples in Austria. *Environm. Pollut.*, 2007 145, 489-496.
- [8] Laopaiboon, L; Hall, SJ; Smith, RN. The effect of a quaternary ammonium biocide on the performance and characteristics of laboratory-scale rotating biological contactors. *J. Appl. Microbiol.*, 2002 93, 1051-1058.
- [9] Oh, S; Tandukar, M; Pavlostathis, SG; Chain, PS; Konstantinidis, KT. Microbial community adaptation to quaternary ammonium biocides as revealed by metagenomics. *Environm. Microbiol.*, 2013 15, 2850-2864.
- [10] Hajaya, MG; Pavlostathis, SG. Fate and effect of benzalkonium chlorides in a continuous-flow biological nitrogen removal system treating poultry processing wastewater. *Bioresour. Technol.*, 2012 118, 73-81.
- [11] Ying, GG. Fate, behavior and effects of surfactants and their degradation products in the environment *Environ. Int.*, 2006 32, 417–431.
- [12] Tezel, U; Tandukar, M; Martinez, RJ; Sobecky, PA; Pavlostathis, SG. Aerobic biotransformation of n-tetradecylbenzyltrimethylammonium chloride by an enriched pseudomonas spp. Community. *Environm. Sc. Technol.*, 2012 46, 8714-8722.

- [13] van Ginkel, CG; Van Dijk, JB; Kroon, AG. Metabolism of hexadecyltrimethylammonium chloride in *Pseudomonas* strain B1. *Appl. Environm. Microbiol.*, 1992 58, 3083-3087.
- [14] Nishihara, T; Okamoto, T; Nishiyama, N. Biodegradation of didecyltrimethylammonium chloride by *Pseudomonas fluorescens* TN4 isolated from activated sludge. *J. Appl. Microbiol.*, 2000 88, 641-647.
- [15] Patrauchan, MA; Oriol, PJ. Degradation of benzyldimethylalkylammonium chloride by *Aeromonas hydrophila* sp. K. *J. Appl. Microbiol.*, 2003 94, 266-272.
- [16] 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. Environm. Microbiol.*, 2007 73, 1797-1802.
- [17] Liffourrena, AS; López, FG; Salvano, MA; Domenech, CE; Lucchesi GI. Degradation of tetradecyltrimethylammonium by *Pseudomonas putida* A ATCC 12633 restricted by accumulation of trimethylamine is alleviated by addition of Al^{+3} ions. *J. Appl. Microbiol.*, 2008 104, 396-402
- [18] Gentili, AR; Cubitto, MA; Ferrero, M; Rodriguez, MS. Bioremediation of crude oil polluted seawater by a hydrocarbondegrading bacterial strain immobilized on chitin and chitosan flakes. *Int. Biodeter. Biodegr.*, 2006 57, 222-228
- [19] Moslemy, P; Neufeld, RJ; Guiot, SR. Biodegradation of gasoline by gellan gum-encapsulated bacterial cells. *Biotechnol. Bioeng.*, 2002 80, 175-184.
- [20] Wang, X; Gong, ZQ; Li, PJ; Zhang, LH; Hu, XM. Degradation of pyrene and benzo(a)pyrene in contaminated soil by immobilized fungi. *Environ. Eng. Sci.*, 2008 25, 677-684.
- [21] Liu, YJ; Zhang, AN; Wang, XC. Biodegradation of phenol by using free and immobilized cells of *Acinetobacter* sp. XA05 and *Sphingomonas* sp. FG03. *Biochem. Eng. J.*, 2009 44, 187-192.
- [22] Quek, E; Ting, YP; Tan, HM. *Rhodococcus* sp. F92 immobilized on polyurethane foam shows ability to degrade various petroleum products. *Bioresour. Technol.*, 2006 97, 32-38.
- [23] Zhang, K; Xu, YY; Hua, XF; Han, HL; Wang, JN; Wang, J; Liu, YM; Liu, Z. An intensified degradation of phenanthrene with macroporous alginate-lignin beads immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Eng. J.*, 2008 41, 251-257.
- [24] Covarrubias, SA; de Bashan, LE; Moreno, M; Bashan, Y. Alginate beads provide a beneficial physical barrier against native microorganisms in wastewater treated with immobilized bacteria and microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2011 93, 2669-2680.
- [25] Smidsrød, O. Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends Biotechnol.*, 1990 8, 71-78.
- [26] Gouda, MK. Immobilization of *Rhodococcus* sp DG for efficient degradation of phenol. *Fresen Environ. Bull.*, 2007 16, 1655-1661
- [27] Sergio, AMD; Bustos, TY. Biodegradation of wastewater pollutants by activated sludge encapsulated inside calcium-alginate beads in a tubular packed bed reactor. *Biodegradation*, 2009 20, 709-715.
- [28] Ha, J; Engler, CR; Wild, JR. Biodegradation of coumaphos, chlorferon, and diethylthiophosphate using bacteria immobilized in Ca-alginate gel beads. *Bioresour. Technol.*, 2009 100, 1138-1142.

Complimentary Contributor Copy

- [29] Bergero, MF; Lucchesi, GI. Degradation of cationic surfactants using *Pseudomonas putida* A ATCC 12633 immobilized in calcium alginate beads. *Biodegradation*, 2013 24, 353-364.
- [30] Lucchesi, GI; Liffourrena, A.S., Boeris, P.S., Salvano, M.A. Adaptive response and degradation of quaternary ammonium compounds by *Pseudomonas putida* A ATCC 12633. In: Méndez-Vilas A (ed) *Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology*. Badajoz: Formatex; 2010; 1297–1303.
- [31] Ravichandra, P; Gopal, M; Annapurna, J. Biological sulfide oxidation using autotrophic *Thiobacillus* sp: evaluation of different immobilization methods and bioreactors. *J. Appl. Microbiol.*, 2008 106, 1280-1291.
- [32] Lu, D; Zhang, Y; Niu, S; Wang, L; Lin, S; Wang, C; Ye, W; Yan, C. Study of phenol biodegradation using *Bacillus amyloliquefaciens* strain WJDB-1 immobilized in alginate–chitosan–alginate (ACA) microcapsules by electrochemical method. *Biodegradation*, 2012 23, 209–219.
- [33] Yang, J; Chen, J; Pan, D; Wan, Y; Wang, Z. pH-sensitive interpenetrating network hydrogels based on chitosan derivatives and alginate for oral drug delivery. *Carbohydr. Polym.*, 2013 92, 719-725.
- [34] Liffourrena, AS; Lucchesi, GI. Degradation of trimethylamine by immobilized cells of *Pseudomonas putida* A (ATCC 12633). *Int. Biodet. Biodeg.*, 2014 90, 88-92.
- [35] Cross, JT. A critical review of techniques for the identification and determination of cationic surfactants. In: Jungermann E (ed) *Cationic Surfactants*. New York: Marcel Dekker; 1970; 423-449.
- [36] Liffourrena, AS; Lucchesi, GI. Identification, Cloning and Biochemical Characterization of *Pseudomonas putida* A (ATCC 12633) Monooxygenase Enzyme necessary for the Metabolism of Tetradecyltrimethylammonium Bromide. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2014 173, 552-561.
- [37] Cassidy, MB; Lee, H; Trevors JT. Environmental applications of immobilized microbial cells: a review. *J. Ind. Microbiol.*, 1996 16, 79–101.
- [38] Hall, DO; Rao KK. Immobilised photosynthetic membranes and cells for the production of fuels and chemicals. *Chimica Oggi*, 1989 7, 41-47.
- [39] Manohar, S; Karegoudar, TB. Degradation of naphthalene by cells of *Pseudomonas* sp. strain NGK 1 immobilized in alginate, agar and polyacrylamide. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1998 4, 785-792.
- [40] Kewellow, H; Heipieper, HJ; Rehm, HJ. Protection of bacteria against toxicity of phenol by immobilization in calcium alginate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1989 31, 283-389.
- [41] Chen, YM; Lin, TF; Huang, C; Lin, JC; Hsieh, FM. Degradation of phenol and TCE using suspended and chitosan-bead immobilized *Pseudomonas putida*. *J. Hazard Mater.*, 2007 148, 660-670.
- [42] Tallur, PN; Megadi, VB; Ninnekar, HZ. Biodegradation of p-cresol by immobilized cells of *Bacillus* sp. strain PHN 1. *Biodegradation* 2009 20,79–83.

Complimentary Contributor Copy

-
- [43] Kummerer, K; Eitel, A; Braun, U; Hubner, P; Daschner, F; Mascart, G; Milandri, M; Reinthaler, F; Verhoef, J. 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*, 1997 774, 281-286.
- [44] Sullivan, DE. Biodegradation of a cationic surfactant in activated-sludge. *Water Res.*, 1983 17, 1145-1151.

Complimentary Contributor Copy

Release of outer membrane vesicles in *Pseudomonas putida* as a response to stress caused by cationic surfactants

Romina Marisa Heredia,† Paola Sabrina Boeris,†
Andrés Sebastián Liffourrena, María Fernanda Bergero,
Gastón Alberto López and Gloria Inés Lucchesi

Correspondence

G. I. Lucchesi
glucchesi@exa.unrc.edu.ar

Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, CPX5804BYA Río Cuarto, Córdoba, Argentina

Pseudomonas putida A (ATCC 12633), a degrader of cationic surfactants, releases outer membrane vesicles (OMVs) when grown with tetradecyltrimethylammonium bromide (TTAB) as the sole carbon, nitrogen and energy source. The OMVs exhibit a bilayer structure and were found to be composed of LPSs, proteins and phospholipids (PLs) such as cardiolipin, phosphatidylcholine, phosphatidic acid and phosphatidylglycerol (PG). The OMVs showed a marked increase in the PG content, approximately 43 % higher than the amount registered in the parent cells from which the vesicles derived. After growth of *P. putida* with TTAB, the amount of lipoprotein covalently cross-linked to the peptidoglycan showed a twofold decrease when compared with values found after growth without the surfactant [16 ± 2 and 28 ± 3 μg (mg cell envelope protein) $^{-1}$, respectively]. This decrease in the amount of lipoprotein can be related to areas of loss of contact between the outer membrane and the peptidoglycan and, therefore, to OMV production. In addition, due to its amphiphilic nature, TTAB can contribute to the OMV biogenesis, through a physical mechanism, by induction of the curvature of the membrane. Taking into account that OVMs were produced when the cells were grown under the external stress, caused by the surfactant, and that TTAB was detected in the vesicles [48 nmol TTAB (nmol PL) $^{-1}$], we concluded that this system of TTAB elimination is a mechanism that *P. putida* A (ATCC 12633) would utilize for alleviating stress caused by cationic surfactants.

Received 24 November 2015

Accepted 25 February 2016

INTRODUCTION

Quaternary ammonium compounds (QACs) are molecules with at least one long hydrophobic hydrocarbon chain linked to a positively charged nitrogen atom. The other alkyl groups are mostly short-chain substituents, such as methyl or benzyl groups. Among the QACs, the generic term cetrimide relates to mixtures of n-alkyltrimethyl ammonium bromides, where the n-alkyl group is between

8 and 18 carbons long, whereas cetrimide USP is tetradecyltrimethylammonium bromide (TTAB). Another predominant QAC found in engineered and natural systems is benzalkonium chloride (BAC) (Kreuzinger *et al.*, 2007; Hajaya & Pavlostathis, 2012). Unlike TTAB, BAC contains a quaternary N bound to two methyl groups, a benzyl group and a straight-chained alkyl group that varies in length (typically C12, C14 and C16).

Despite the global trend for the use of non-ionic surfactants, QACs will remain the most widely used surfactants in pharmaceutical and fabric-softener formulations, cosmetics, commercial disinfectants, industrial sanitizers, food preservatives and phase-transfer catalysts (Zhang *et al.*, 2015). After usage, the residual products are discharged to sewage treatment plants or surface waters and finally to coastal waters, in which the biodegradability of QACs is limited, depending on their concentration, chemical structure and antimicrobial activity. Therefore, QACs may persist in natural and engineered biological systems, where they can be toxic for life (van Ginkel & Kolvenbach,

†These authors contributed equally to this work.

Abbreviations: BAC, benzalkonium chloride; CL, cardiolipin; DPH, 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene; OMV, outer membrane vesicle; PA, phosphatidic acid; PC, phosphatidylcholine; PG, phosphatidylglycerol; PL, phospholipid; QAC, quaternary ammonium compound; RBC, red blood cell; SFA, saturated fatty acid; TEM, transmission electron microscopy; TTAB, tetradecyltrimethylammonium bromide; UFA, unsaturated fatty acid.

A supplementary table is available with the online Supplementary Material.

1991; Nishiyama *et al.*, 1995; Oh *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015; Tezel & Pavlostathis, 2015), and for this reason, the effective degradation of cationic surfactants is necessary to protect the environment. In particular, *Pseudomonas putida* A (ATCC 12633) is able to mineralize TTAB and BAC, and offers promising opportunities for the efficient biological removal of these and other predominant QACs found in engineered and natural systems (Liffourrena *et al.*, 2008; Lucchesi *et al.*, 2010; Bergero & Lucchesi, 2013, 2015).

The adaptation of bacteria to a change of environmental conditions constitutes a key survival strategy. The bacterial membrane plays an important role in this process because it is very sensitive to stress. The mode of action of QACs in bacteria relies on the interaction of the surfactant with the lipidic bilayer of the membrane, which leads to the loss of membrane integrity, disruption of transduction energy, inhibition of protein action and subsequent deleterious effects on growth and viability (McDonnell & Russell, 1999; McBain *et al.*, 2004; Gilbert & Moore, 2005). Although the connection between QAC degradation and tolerance is not well known, we have shown that in *P. putida* A (ATCC 12633) the adaptive response and resistance to the bactericidal activity of the QACs TTAB involves a mechanism that initiates changes to membrane composition (Boeris *et al.*, 2007, 2009; Heredia *et al.*, 2014). The addition of a non-lethal concentration of TTAB resulted in the immediate fluidification of *P. putida* A (ATCC 12633) cell membranes. However, after 15 min of incubation with TTAB, a reversal of membrane fluidification was detected. This behaviour was related to a decrease in the proportion of the unsaturated fatty acids (UFAs) that help to compensate the fluidizing effect of TTAB, and also to block the access of TTAB molecules within the membrane's interior. Also, when the cells were exposed to TTAB, the content of phosphatidylglycerol (PG) increased sixfold, and the levels of cardiolipin (CL), with its elevated proportion of UFAs (18.33 % of total UFAs), decreased up to 60 % (Boeris *et al.*, 2007, 2009; Heredia *et al.*, 2014). Thus, the decrease in the content of UFAs, due to the reduction of CL levels, together with an increase of PG levels, with the major content of saturated fatty acids (SFAs), contributes to the tolerance of *P. putida* A (ATCC 12633) to the stress caused by TTAB (Heredia *et al.*, 2014).

Gram-negative bacteria have outer and inner membranes with different compositions and essential biological functions. Consequently, both membranes have to remain functional even under variable conditions. The best-investigated mechanism that involves changes in the outer membrane of Gram-negative bacteria is the formation of outer membrane vesicles (OMVs) (Kulp & Kuehn, 2010; Kulkarni & Jagannadham, 2014; Klimentová & Stulík, 2015). The OMVs are released during all growth phases of the bacterial cultures (Kadurugamuwa & Beveridge, 1995; Manning & Kuehn, 2011); although their amount and composition may vary according to the growing conditions. The structural studies of OMVs invariably

showed that they are small spherical particles, from 50 to 250 nm, enclosed with a membrane bilayer, that contain phospholipids (PLs), LPSs, proteins and in some cases nucleic acids. They are also involved in the transport of metabolites, toxins, signalling molecules and other small molecules (Horstman & Kuehn, 2000, 2002; Dutta *et al.*, 2004; Keenan *et al.*, 2008; Bomberger *et al.*, 2009; Schertzer & Whiteley, 2012; Biller *et al.*, 2014; Klimentová & Stulík, 2015). Furthermore, the formation of OMVs is a crucial part of the bacterial envelope stress response, protecting the bacteria from internal and external stressors (Baumgarten *et al.*, 2012; MacDonald & Kuehn, 2012; Schwechheimer *et al.*, 2013, 2014; Manning & Kuehn, 2011). In the present study, we investigated the formation of OMVs in *P. putida* A (ATCC 12633), in the presence of the QAC TTAB. We show that the release of OMVs containing TTAB is part of the response of *P. putida* to the presence of the surfactant. This mechanism enables bacteria to eliminate the detergent molecules attached to the membrane.

METHODS

Micro-organisms and culture conditions. *P. putida* A (ATCC 12633) cells were grown aerobically at 30 °C, with shaking in a basal salt liquid medium (HPi-BSM) (Lucchesi *et al.*, 1989) with 20 mmol glucose l⁻¹ and 18 mmol NH₄Cl l⁻¹ or 0.15 mmol TTAB l⁻¹ (50 mg l⁻¹) as carbon and nitrogen source. Growth was evaluated through measurement of culture optical density at 660 nm by using a light visible spectrophotometer (Beckman DU 640). In experiments where *P. putida* was exposed to TTAB, cells were grown in HPi-BSM plus glucose and NH₄Cl until the culture reached late-exponential phase (OD₆₆₀ 0.8–1.00). At this point, the culture was divided into two parts: one was kept as a control and the other was treated with 50 mg TTAB l⁻¹. After different times, cells were harvested by centrifugation at 10 000 g for 15 min in a Sorvall RC5C refrigerated centrifuge, and the pellets and supernatants were used for further studies.

Isolation of vesicles. Vesicles were obtained as described by Grenier & Mayrand (1987). Briefly, 500 ml bacterial culture in early stationary growth phase was centrifuged at 10 000 g for 15 min. The supernatants obtained were treated with ammonium sulfate (40 % saturation). After 2 h of stirring at 4 °C, the suspensions were centrifuged at 20 000 g for 40 min, and the pellets obtained were suspended in 2 ml of 50 mmol Tris/HCl buffer l⁻¹ (pH 9.5) plus 0.5 mmol DTT l⁻¹. The suspensions were dialysed against the same buffer and the vesicles were recovered by centrifugation at 27 000 g for 40 min at 4 °C, washed with 10 ml of 50 mmol Tris/HCl buffer l⁻¹ (pH 7.2) plus 0.5 mmol DTT l⁻¹ and finally suspended in 1.5 ml of 50 mmol Tris/HCl buffer l⁻¹ (pH 7.2). The vesicles were stored at -20 °C.

Isolation of the peptidoglycan-lipoprotein complex. Cells of *P. putida* A (ATCC 12633) grown in HPi-BSM with TTAB or glucose and NH₄Cl were harvested at exponential phase (OD₆₆₀ 0.45 and 0.85, respectively), washed and resuspended with HPi-BSM. The cells were disrupted by sonication at 20 000 Hz using a Vibra-Cell ultrasonic processor (10 cycles, 10 s per cycle) and, after centrifugation (16 000 g for 10 min at 4 °C), the soluble fraction containing the cell envelope was collected. The protein concentration of the cell envelope was determined by the Bradford method (Bradford, 1976). Then, a suspension containing 200 mg protein ml⁻¹ was treated with 4 % SDS, boiled for 2 h and then kept overnight at room temperature. The suspension was spun down at 78 000 g at 4 °C for 20 min, washed at

least three times with water and finally the peptidoglycan–lipoprotein complex obtained was suspended in buffer 25 mmol Tris/HCl l⁻¹ (pH 8.0).

To solubilize the lipoproteins, the peptidoglycan–lipoprotein complex was digested with 0.5 μmol lysozyme l⁻¹, for 3 h at room temperature. The reaction was stopped by the addition of 1 % SDS and the protein concentration was determined by the Bradford method (Bradford, 1976). The amount of solubilized Lpp protein was expressed as μg (mg cell envelope protein)⁻¹. After adding Laemmli solution (Laemmli, 1970), the suspension was boiled for 3 min and subsequently submitted to 15 % SDS-PAGE (denaturing PAGE). The protein bands were visualized by staining with Coomassie blue R-250. After visualization, the bands of interest were excised from the gel and sent for analysis by MALDI-TOF.

Echinocytosis experiments. Fresh blood samples were collected from rabbits with a syringe and CPD buffer (26.3 g trisodium citrate dihydrate l⁻¹, 3.27 g citric acid monohydrate l⁻¹, 2.22 g sodium dihydrogen phosphate l⁻¹, 23.2 g glucose l⁻¹) was added to the samples (1 : 10). The red blood cells (RBCs) were washed three times and diluted 400 times in PBS [10 mmol Tris l⁻¹, 146 mmol NaCl l⁻¹ (pH 7.5)] to give working solutions of ~0.1 % haematocrit (Schertzer & Whiteley, 2012). The RBCs were incubated for 30 min at 4 °C with TTAB (5 and 10 g l⁻¹) and they were then observed using a microscope (model H600L; Nikon) with a ×40 objective, and multiple fields were photographed. After TTAB treatment, chlorpromazine (0–5 μmol l⁻¹) was added, when necessary. Micrographs were subsequently analysed by manually counting and recording the total number of cells and the number of echinocytes observed.

Extraction of LPS. Extraction of LPS was carried as described by Westphal & Jann (1965). Briefly, 100 μl vesicle suspension obtained as described above were mixed with 3 ml phenol : H₂O (45 : 55, v/v). The mixture was incubated at 68 °C in an orbital shaker at 160 r.p.m. for 15 min and then centrifuged (9600 g). The aqueous phase was collected. A second extraction was made on the mixture of phenol and vesicles by addition of 3 ml distilled water and centrifuged again. Both aqueous phases were combined and dialysed against distilled water until the phenol was completely eliminated. The dialysed LPS was incubated overnight at 37 °C with RNase (15 μg ml⁻¹), DNase (15 μg ml⁻¹) and proteinase K (15 μg ml⁻¹) in 50 mmol Tris/HCl (pH 7) l⁻¹/10 mmol MgSO₄ l⁻¹. Samples were dried in a Rotavapor and subsequently submitted to 14 % SDS-PAGE. The gel was fixed overnight in fixing solution (40 % ethanol, 5 % acetic acid and 0.005 % Alcian blue) and then washed three times with deionized water. Finally, the SDS-PAGE-fractionated LPSs were stained by silver staining (Gromova & Celis, 2006).

Lipids analysis. Lipids were extracted from the cells and vesicles following the method of Bligh & Dyer (1959); they were later separated using 1D TLC (silica gel HLF, 250 microns; Analtech) and 2D TLC was carried out, when necessary, to discard the co-migration of different lipids (Boeris *et al.*, 2007). The separated lipids were detected with iodine vapours and identified based on comparison with purified standards purchased from Sigma. The spots were scraped off the plates, and the different fractions were quantified by phosphorus determination (Fiske & Subbarow, 1925).

Fatty acid methyl esters were prepared from total PL extracts using 10 % BF₃ in methanol (Morrison & Smith, 1964), they were then extracted with hexane, concentrated under an N₂ gas stream and analysed using a Hewlett Packard 5890 II gas chromatograph equipped with a methyl silicone column (length 50 m, inner diameter 0.2 mm, film thickness 0.33 μm) and with a flame ionization detector according to Heredia *et al.* (2014).

The percentages of lipids and fatty acids reported are relative to the respective total amount, defined as 100 %. Replicate determinations indicated that the relative error [(SD/mean) × 100 %] of the values was from 2 to 5 %. Three independent determinations were performed in each case. The SD was less than 5 %.

Determination of membrane fluidity. Membrane fluidity was determined by measuring the fluorescence polarization of a 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) probe inserted into the membranes of the vesicles, following procedures described by Trevors (2003). Fluorescence polarization measurements were performed with a Hitachi 2500 spectrofluorometer with a Glam–Thomson polarizer. The excitation wavelength for the DPH probe was 358 nm, and the emission wavelength was 428 nm. The slit width for the excitation and emission beams was 12 and 10 nm, respectively. The degree of polarization was calculated from the polarization ratio (*P*) as described by Lakowicz (1999).

TTAB determination. TTAB was determined in the supernatants of the batch cultures or in the vesicles using a colorimetric method based on the reaction of this QAC with Patent Blue Violet (Sigma) (Tezel *et al.*, 2006). According to this method, an anionic dye–TTAB pair is formed, which is then solvent extracted, and the colour intensity in the extracted phase is spectrophotometrically measured at 620 nm. The concentration of TTAB was calculated by using calibration graphs that were previously constructed.

Transmission electron microscopy (TEM). Bacterial pellets were fixed in 2.5 % glutaraldehyde, S-collidine buffer solution (0.2 mol l⁻¹) (pH 7.4) and post-fixed in 1 % osmium tetroxide, S-collidine buffer solution (0.2 mol l⁻¹) (pH 7.4). Cell pellets were then dehydrated in increasing concentrations of acetone (1 × 50 %, 1 × 70 %, 1 × 90 % and 3 × 100 %), embedded in EMBED 812 resin and finally sectioned with an ultramicrotome. The ultrathin sections (±60 nm) were cut and placed on copper grids, counterstained with 50 % saturated uranyl acetate for 8 min and aqueous lead citrate solutions for 30 min (Cristofolini *et al.*, 2012). Vesicles were resuspended in 10 mmol MgCl₂ l⁻¹ and negatively stained with a 2 % phosphotungstic acid solution (pH 7.3) (Deatherage *et al.*, 2009). The sections of the cells or vesicles were examined with an Elmiskop 101 transmission electron microscope (Siemens) and the acquisition of images was performed with Digital Micrograph software (Gatan).

RESULTS AND DISCUSSION

TTAB stress and vesicle production

Using TEM, we analysed the integrity of the membranes when the cells of *P. putida* A (ATCC 12633) were grown in a basal medium with and without 50 mg TTAB l⁻¹. As shown in Fig. 1(a, b), the cells possessed intact cell envelopes, regardless of the presence or absence of this QAC. It should be noted that the cells grown with TTAB exhibited several membrane blebs, emanating from the cell surfaces or free in the environment (Fig. 1b, c). The OMVs presented a refractive envelope that was characteristic of a bilayer structure. Its diameter was approximately 200 nm (Fig. 1d).

The analysis of the structural components of the OMVs showed that LPS, proteins, PL and TTAB were present. After SDS-PAGE of the OMVs fraction of *P. putida* A (ATCC 12633), revealed by silver staining, we found

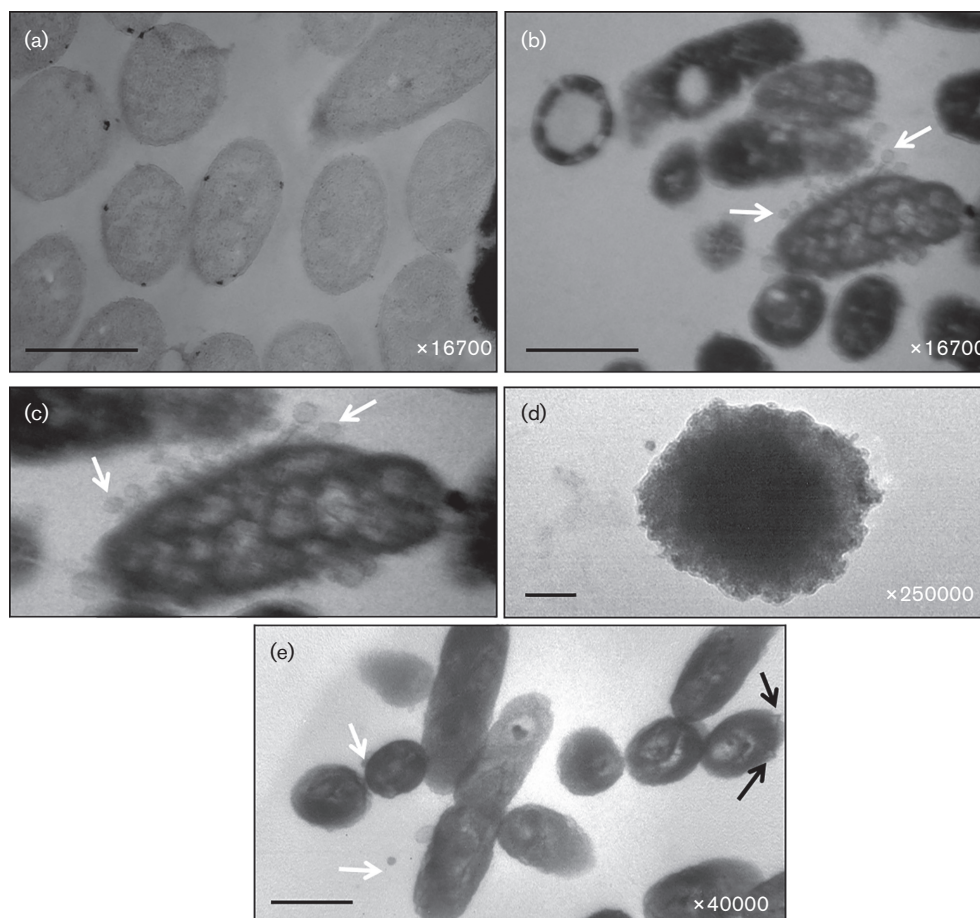


Fig. 1. TEM images of *P. putida* A (ATCC 12633) and its released vesicles. *P. putida* cells were grown until late-exponential phase in HPI-BSM with TTAB (OD_{660} 0.4) or with glucose and NH_4Cl (OD_{660} 0.8) exposed and not exposed to TTAB. The cells were harvested by centrifugation and the vesicles were obtained from the supernatant, as described in Methods. (a) Thin section of *P. putida* A (ATCC 12633) grown with glucose/ NH_4Cl . (b) Thin section of *P. putida* A (ATCC 12633) grown with TTAB. The white arrows indicate OMVs. (c) An enlargement of part of the image in (b) showing the development of OMVs, while they were being released from the cells grown with TTAB. The white arrows indicate OMVs. (d) OMVs isolated and negatively stained. (e) Thin section of *P. putida* A (ATCC 12633) grown with glucose/ NH_4Cl and exposed to TTAB for 60 min. The white arrows indicate OMVs and black arrows point out spicule-containing cells. Bars, 1 μm in (a), (b) and (e); 0.1 μm in (d).

bands of LPS (Fig. 2), characteristic of Gram-negative cell envelopes (Kadurugamuwa & Beveridge, 1995).

In the OMVs, 0.076 mg total proteins ml^{-1} and 0.56 nmol total PL ml^{-1} were registered, equivalent to 7.4 nmol PL (mg protein) $^{-1}$. The analysis of PLs revealed the presence of PG, phosphatidylcholine (PC), phosphatidic acid (PA) and CL (Table 1). PLs are one of the major components of the OMVs produced by different bacteria. In spite of the fact that the relative amount of each PL may change in the OMVs, numerous reports have described that the PL found in OMVs generally resemble the PL composition of the outer membrane from which the vesicles derived (Horstman & Kuehn, 2000; Kato *et al.*, 2002; Tashiro *et al.*, 2011; Chowdhury & Jagannadham, 2013; Kulkarni *et al.*, 2014). Similarly to results found by Tashiro *et al.*

(2011) when studying the OMVs of *Pseudomonas aeruginosa*, we observed that the OMVs produced by *P. putida* A (ATCC 12633) did not contain PE and that PG was the major glycerophospholipid detected (42.17 % of total PL; Table 1). Different facts pointed out PG as the main component of the OMVs released by *P. putida* in the presence of TTAB: the sixfold increase (up to 120 %) in the content of PG (Table S1, available in the online Supplementary Material; Boeris *et al.*, 2007, 2009) and the fact that PG has been associated with the achievement of the proper curvature for the release of membrane vesicles (Tashiro *et al.*, 2012).

The results of the fatty acid methyl ester analysis showed that, similarly to previously obtained data of the membranes of whole cells grown with TTAB (Table S1), stearic

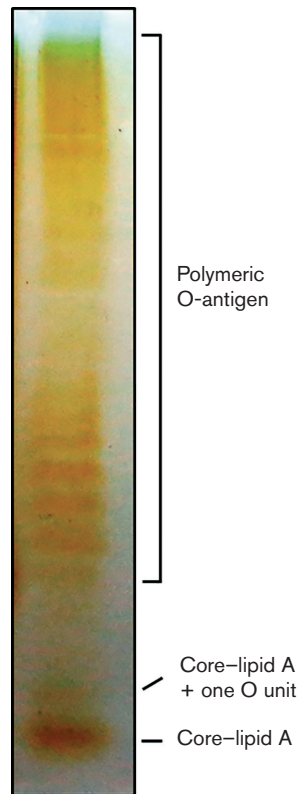


Fig. 2. Profiles of LPS of the OMVs. The purified LPS of the OMVs was separated on SDS-PAGE (14 %) and stained with a silver stain, as described in Methods. The gel displayed different bands corresponding to: LPS with incomplete O-antigen, the core region attached to lipid A and the core region attached to lipid A plus one O-antigen unit.

acid (C18 : 0) and palmitic acid (C16 : 0) were the predominant SFAs of the vesicles (Table 1). We have also found that the amount of UFAs in the vesicles was 10 % higher with respect to the content detected in TTAB-grown cells (Table S1; Heredia *et al.*, 2014). Based on these data, a higher fluidity can be expected in the vesicles, with respect to the parent cells. However, when we evaluated the fluidity of the OMVs by means of DPH fluorescence polarization, a probe that penetrates into the hydrophobic core orienting itself parallel to the fatty acid side chains (Trevors, 2003; Mykytczuk *et al.*, 2007), we found a P value of 0.16 ± 0.01 , while a similar P value (0.14 ± 0.01) was registered for *P. putida* cells grown with TTAB.

One of the most interesting observations was the presence of TTAB in the vesicles. When the cells were grown with $50 \text{ mg TTAB l}^{-1}$ as a sole source of carbon and nitrogen, $18 \text{ mg TTAB l}^{-1}$ was detected in the supernatant of the culture after 48 h. Within this total surfactant content, 9 mg TTAB l^{-1} was detected in the isolated OMVs [equivalent to $48 \text{ nmol TTAB (nmol PL)}^{-1}$].

No production of OMVs was observed when *P. putida* A (ATCC 12633) cells were grown in saline medium with

Table 1. PLs and fatty acid composition of *P. putida* A (ATCC 12633) OMVs

P. putida A (ATCC 12633) was grown in HPi-BSM with TTAB up to late-exponential phase ($\text{OD}_{660} 0.4$). At this point, cells were harvested; the vesicles were obtained from the supernatant. PLs and fatty acid were extracted from OMVs and were analysed, as described in Methods. Percentages of PL and fatty acid are relative to the respective total amount, defined as 100 %. Results are means \pm SDs ($n=3$).

PL/fatty acid	OMV (%)
Specific PL	
CL	15.03 ± 2.92
PG	42.17 ± 2.95
PC	24.62 ± 1.98
PA	18.16 ± 2.87
Specific fatty acids	
SFA	
16:0	35.31 ± 4.44
18:0	51.85 ± 5.12
Total	87.16 ± 2.34
UFA	
18:1/9	12.66 ± 1.20
SFA/UFA ratio	6.88

glucose and NH_4Cl as carbon and nitrogen sources, respectively (Fig. 1a). To evaluate the relationship between OMV formation and the stress caused by TTAB, *P. putida* A (ATCC 12633) cells were grown until late-exponential phase with glucose and NH_4Cl in the absence of TTAB, and they were then treated with $50 \text{ mg TTAB l}^{-1}$. Under these culture conditions, the evaluation of the resistance of *P. putida* to the bactericidal activity of TTAB was possible, since the surfactant was present in the medium but it was not incorporated as a nutrient by the cells. At different times, cells were harvested from the culture. We determined the content of proteins and PLs of the cells, the amount of TTAB adhered to the cells, the amount of free TTAB in the culture medium and the TTAB content of the OMVs. Fig. 3 shows that the amount of PL in the cells increased from 21 to $24 \text{ nmol PL (mg protein)}^{-1}$ after 30 min of contact with the detergent and reached $26 \text{ nmol PL (mg protein)}^{-1}$ after 120 min of contact with TTAB. Also, it can be seen in Fig. 3 that in the period 15 to 120 min after the addition of TTAB, the amount of surfactant adhered to the cells decreased from about 2.16 to $1.72 \text{ nmol TTAB (nmol PL)}^{-1}$. In agreement with this decrease, the amount of TTAB detected in the medium increase from 30 mg l^{-1} at 60 min to 35 mg l^{-1} at 120 min post-exposure to surfactant (Fig. 3). Taking into account that the OMVs begin to be detected free in the culture 60 min after the addition of TTAB (Fig. 1e) and that the surfactant was found in the OMVs ($4 \pm 0.2 \text{ mg TTAB l}^{-1}$ at 120 min), we conclude that the TTAB molecules adsorbed have been removed from the cells, likely due to their elimination through the production of OMVs. Thus, the production of OMVs constitutes a protective

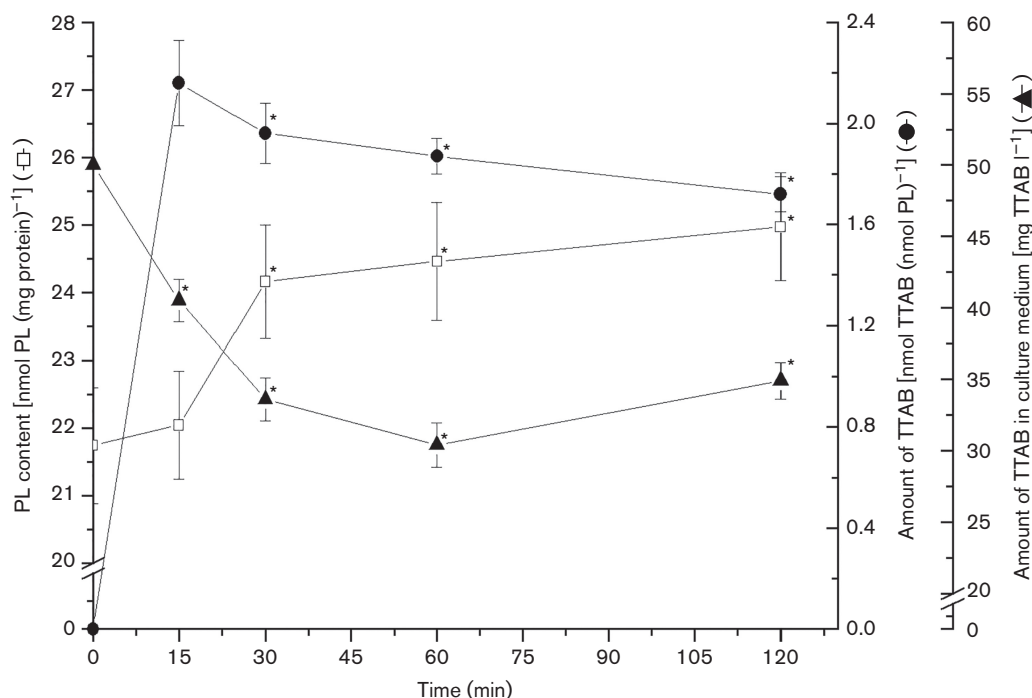


Fig. 3. Relationship between the formation of OMVs and the elimination of TTAB. *P. putida* cells were grown in HPI-BSM with glucose and NH_4Cl until late-exponential phase (OD_{660} 0.8). At this point, the culture was divided in two parts: one was kept as a control and the other was treated with $50 \text{ mg TTAB l}^{-1}$. At different times, the PL content (\square), the amount of TTAB adhered to the cells (\bullet) or free in the culture medium (\blacktriangle) were determined. Error bars show means \pm SDs ($n=3$). Values with the asterisks are significantly different ($P \leq 0.05$) according to the ANOVA test.

mechanism that *P. putida* A (ATCC 12633) uses to eliminate the detergent molecules attached to the membrane.

Factors that contribute to OMV biogenesis in the presence of TTAB

The generation of space between the outer membrane cross-links and the peptidoglycan seems to be a general prerequisite for the creation of OMVs (Schwechheimer *et al.*, 2014; Deatherage *et al.*, 2009). An abundant lipoprotein (Lpp) in *Escherichia coli*, or its counterpart in other Gram-negative bacteria, covalently links the outer membrane and the peptidoglycan (OM-peptidoglycan), providing structural envelope integrity (Braun, 1975; Braun & Wolff, 1975; Deatherage *et al.*, 2009 and citations therein).

It is possible to distinguish between two types the Lpp: the peptidoglycan cross-linked form of Lpp (bound form) and the outer membrane lipid-anchored but uncross-linked form of Lpp (free form). Hoekstra *et al.* (1976) reported that the peptidoglycan binding Lpp plays a crucial role in the production of OMVs in *E. coli*. They have shown that OMV formation starts with an outward bulging event towards the outer membrane, occurring mostly where there is less peptidoglycan binding Lpp, which can cause a weak linkage between the peptidoglycan and the outer

membrane of the bacterium. In our study, the Lpp of *P. putida* A (ATCC 12633) was obtained after the cleaving of the peptidoglycan–Lpp complex, as described in Methods. When the soluble fraction obtained after this treatment was resolved by 15 % SDS-PAGE, a protein with a molecular mass of approximately 9 kDa was revealed (Fig. 4). This band was excised and the MALDI-TOF analysis of the spots showed that the 9 kDa polypeptide shared 98 % sequence identity with PP_5226 (GenBank accession no. NP_747327.1) of *P. putida* KT 2440, a LppI family lipoprotein (Pseudomonas Genome Database). Digestion of the peptidoglycan–Lpp complex with lysozyme showed that the amount of bound form of Lpp (Lpp covalently cross-linked to the peptidoglycan) detected after growth of *P. putida* with TTAB, decreased twofold with respect to the values found after growth without TTAB [16 ± 2 and $28 \pm 3 \mu\text{g (mg cell envelope protein)}^{-1}$ ($n=3$), respectively]. Given the inverse relationship between OMV production and Lpp-cross-linking regardless of the overall amount of Lpp present in the cells (Schwechheimer *et al.*, 2014 and citations therein), we suggested that this decrease in the content of Lpp covalently cross-linked to the peptidoglycan in the presence of the QAC could be related to areas of loss of contact between the outer membrane and the peptidoglycan, facilitating the formation of OMVs. Additionally, TTAB, due to its amphiphilic nature, may

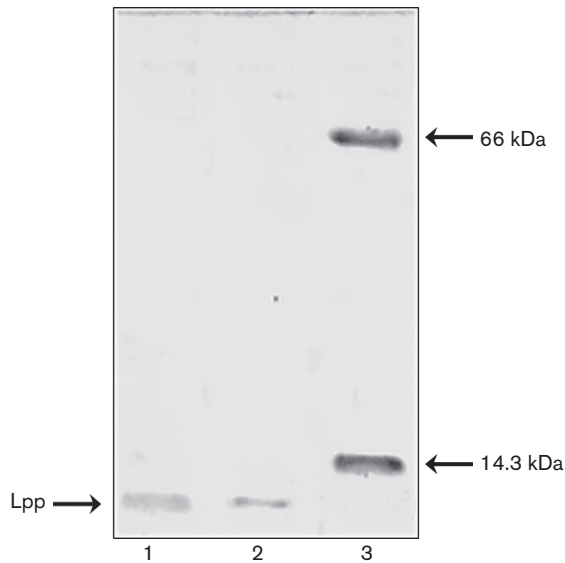


Fig. 4. Isolation of Lpp cross-linked to the peptidoglycan of *P. putida* A (ATCC 12633). SDS-PAGE (15%) of Lpp cross-linked to peptidoglycan extracted by treatment with lysozyme and stained with Coomassie blue R-250. Cells were grown with glucose/ NH_4Cl (lane 1) and with TTAB (lane 2). Molecular mass standards (Bio-Rad): bovine albumin (66 kDa) and lysozyme (14.3 kDa) (lane 3).

contribute to OMV biogenesis when it's added exogenously to the culture medium, by inducing the curvature of the membrane. As shown in Fig. 1(e), the cells of *P. putida* A (ATCC 12633) exposed to $50 \text{ mg TTAB l}^{-1}$ possess intact cell membranes but with outward membrane protrusions that probably result in the formation of membrane blebs. Accordingly, the TTAB could contribute to the formation of these protrusions by interacting directly with the outer membrane and, thus, stimulating the OMV formation. To analyse the induction of the curvature of the membrane by TTAB, we used a RBC model and we analysed the crenation of the membrane produced by the asymmetrical expansion of the outer leaflet relative to the inner one. This model has also been applied to demonstrate the formation of OMVs in *P. aeruginosa* (Schertzer & Whiteley, 2012 and citations therein). As shown in Fig. 5(a, b), $5 \text{ } \mu\text{mol TTAB l}^{-1}$ induced RBC crenation to form echinocytes (RBCs with outward membrane protrusions; Fig. 5d). A higher proportion of RBCs were crenated after treatment with $10 \text{ } \mu\text{mol TTAB l}^{-1}$ (Fig. 5a, c), suggesting a concentration-dependent response.

The crenation of RBCs could be antagonized by compounds, such as chlorpromazine, that expand the inner leaflet of the membrane and induce RBC cup formation (Schertzer & Whiteley, 2012). We detected that increasing amounts of chlorpromazine in samples of TTAB-treated

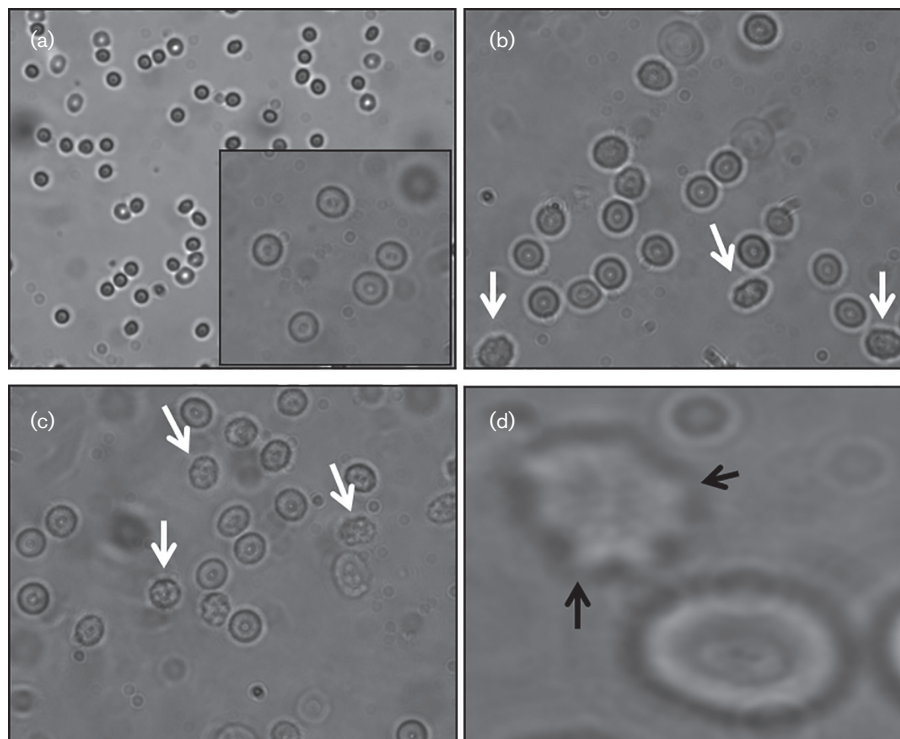


Fig. 5. Effect of TTAB on membranes of RBCs. TTAB was added to washed RBCs and observed using light microscopy. (a) RBCs in PBS. (b, c) RBCs treated with $5 \text{ } \mu\text{mol TTAB l}^{-1}$ and $10 \text{ } \mu\text{mol TTAB l}^{-1}$, respectively. White arrows point out the echinocytes. (d) A magnified image of echinocytes and normal RBCs. Black arrows point out spicule-containing cells.

5

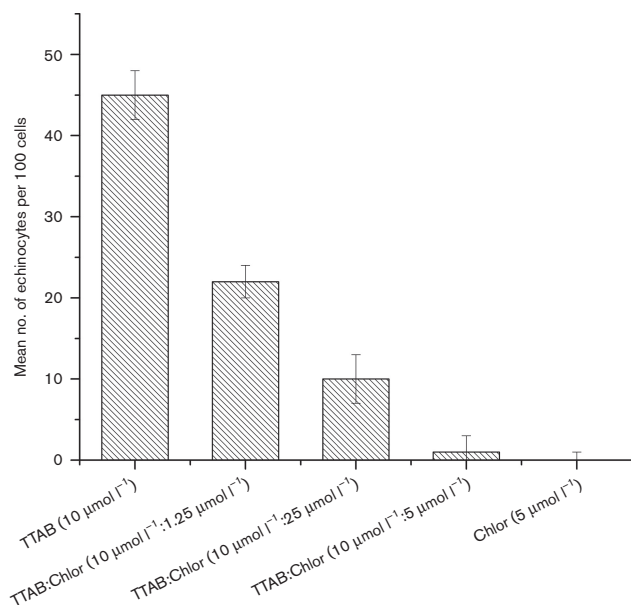


Fig. 6. Antagonization of the TTAB effect by chlorpromazine. Washed RBCs were exposed to 10 μmol TTAB l⁻¹, or to 10 μmol TTAB l⁻¹ plus 1.25–5 μmol chlorpromazine l⁻¹, or to 5 μmol chlorpromazine l⁻¹ alone. Bars represent mean numbers of echinocytes per 100 cells. Means were calculated from at least three independent determinations. Error bars show the SEs. Chlor, Chlorpromazine.

RBCs resulted in a concentration-dependent antagonistic effect, with crenation completely abolished when TTAB was present at a ratio of 2:1 with chlorpromazine (Fig. 6). The fact that the effect of TTAB was successfully antagonized by the addition of chlorpromazine confirms the proposed mechanism. Therefore, the results obtained with the RBC model transferred to what occurs in cells of *P. putida* A (ATCC 12633) exposed to TTAB, lead us to propose that the addition of TTAB contributes to OMV formation, through a physical mechanism that induces the curvature of the membrane. Although the mechanism of OMV biogenesis is not completely known, taken together, our results suggest that the physical process associated with the decrease in the levels Lpp covalently cross-linked to the peptidoglycan, detected in *P. putida* cells grown with TTAB, markedly contributes to the formation of these vesicles.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr Paola Pereira for critical reading of the manuscript. G. I. L., P. S. B. and A. S. L. are Career Members of the Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). R. M. H., M. F. B. and G. A. L. are grateful for fellowships from CONICET. This work was supported by grants from SECYT-UNRC (PPI: 18/C412) and CONICET (PIP: 11220100100212CO) of Argentina.

REFERENCES

- Baumgarten, T., Sperling, S., Seifert, J., von Bergen, M., Steiniger, F., Wick, L. Y. & Heipieper, H. J. (2012). Membrane vesicle formation as a multiple-stress response mechanism enhances *Pseudomonas putida* DOT-T1E cell surface hydrophobicity and biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* **78**, 6217–6224.
- Bergero, M. F. & Lucchesi, G. I. (2013). Degradation of cationic surfactants using *Pseudomonas putida* A ATCC 12633 immobilized in calcium alginate beads. *Biodegradation* **24**, 353–364.
- Bergero, M. F. & Lucchesi, G. I. (2015). Immobilization of *Pseudomonas putida* A (ATCC 12633) cells: a promising tool for effective degradation of quaternary ammonium compounds in industrial effluents. *Int Biodeterior Biodegradation* **100**, 38–43.
- Biller, S. J., Schubotz, F., Roggensack, S. E., Thompson, A. W., Summons, R. E. & Chisholm, S. W. (2014). Bacterial vesicles in marine ecosystems. *Science* **343**, 183–186.
- Bligh, E. G. & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* **37**, 911–917.
- Boeris, P. S., Domenech, C. E. & Lucchesi, G. I. (2007). Modification of phospholipid composition in *Pseudomonas putida* A ATCC 12633 induced by contact with tetradecyltrimethylammonium. *J Appl Microbiol* **103**, 1048–1054.
- Boeris, P. S., Liffourrena, A. S., Salvano, M. A. & Lucchesi, G. I. (2009). Physiological role of phosphatidylcholine in the *Pseudomonas putida* A ATCC 12633 response to tetradecyltrimethylammonium bromide and aluminium. *Lett Appl Microbiol* **49**, 491–496.
- Bomberger, J. M., MacEachran, D. P., Coutermarsh, B. A., Ye, S., O'Toole, G. A. & Stanton, B. A. (2009). Long-distance delivery of bacterial virulence factors by *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane vesicles. *PLoS Pathog* **5**, e1000382.
- Bradford, M. 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.
- Braun, V. (1975). Covalent lipoprotein from the outer membrane of *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **415**, 335–377.
- Braun, V. & Wolff, H. (1975). Attachment of lipoprotein to murein (peptidoglycan) of *Escherichia coli* in the presence and absence of penicillin FL 1060. *J Bacteriol* **123**, 888–897.
- Chowdhury, C. & Jagannadham, M. V. (2013). Virulence factors are released in association with outer membrane vesicles of *Pseudomonas syringae* pv. tomato T1 during normal growth. *Biochim Biophys Acta* **1834**, 231–239.
- Cristofolini, A. L., Turiello, M. P., Sanchis, E. G., Cufre, G. & Merkis, C. I. (2012). Effect of feed restriction and realimentation with monensin supplementation on placental structure and ultrastructure in anglo-nubian goats. *ISRN Vet Sci* **2012**, 490530.
- Deatherage, B. L., Lara, J. C., Bergsbaken, T., Rassouljian Barrett, S. L., Lara, S. & Cookson, B. T. (2009). Biogenesis of bacterial membrane vesicles. *Mol Microbiol* **72**, 1395–1407.
- Dutta, S., Iida, K., Takade, A., Meno, Y., Nair, G. B. & Yoshida, S. (2004). Release of Shiga toxin by membrane vesicles in *Shigella dysenteriae* serotype 1 strains and in vitro effects of antimicrobials on toxin production and release. *Microbiol Immunol* **48**, 965–969.
- Fiske, C. H. & Subbarow, Y. (1925). The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem* **66**, 375–400.
- Gilbert, P. & Moore, L. E. (2005). Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *J Appl Microbiol* **99**, 703–715.
- Grenier, D. & Mayrand, D. (1987). Functional characterization of extracellular vesicles produced by *Bacteroides gingivalis*. *Infect Immun* **55**, 111–117.

- Gromova, I. & Celis, J. E. (2006).** Protein detection in gels by silver staining: a procedure compatible with mass-spectrometry. In *Cell Biology: a Laboratory Handbook*, pp. 219–225. Edited by J. E. Celis, N. Carter, T. Hunter, D. Shotton, K. Simons & J. V. Small. San Diego, CA: Academic Press.
- Hajaya, M. G. & Pavlostathis, S. G. (2012).** Fate and effect of benzalkonium chlorides in a continuous-flow biological nitrogen removal system treating poultry processing wastewater. *Bioresour Technol* **118**, 73–81.
- Heredia, R. M., Boeris, P. S., Biasutti, M. A., López, G. A., Paulucci, N. S. & Lucchesi, G. I. (2014).** Coordinated response of phospholipids and acyl components of membrane lipids in *Pseudomonas putida* A (ATCC 12633) under stress caused by cationic surfactants. *Microbiology* **160**, 2618–2626.
- Hoekstra, D., van der Laan, J. W., de Leij, L. & Witholt, B. (1976).** Release of outer membrane fragments from normally growing *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **455**, 889–899.
- Horstman, A. L. & Kuehn, M. J. (2000).** Enterotoxigenic *Escherichia coli* secretes active heat-labile enterotoxin via outer membrane vesicles. *J Biol Chem* **275**, 12489–12496.
- Horstman, A. L. & Kuehn, M. J. (2002).** Bacterial surface association of heat-labile enterotoxin through lipopolysaccharide after secretion via the general secretory pathway. *J Biol Chem* **277**, 32538–32545.
- Kadurugamuwa, J. L. & Beveridge, T. J. (1995).** Virulence factors are released from *Pseudomonas aeruginosa* in association with membrane vesicles during normal growth and exposure to gentamicin: a novel mechanism of enzyme secretion. *J Bacteriol* **177**, 3998–4008.
- Kato, S., Kowashi, Y. & Demuth, D. R. (2002).** Outer membrane-like vesicles secreted by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* are enriched in leukotoxin. *Microb Pathog* **32**, 1–13.
- Keenan, J. I., Davis, K. A., Beaugie, C. R., McGovern, J. J. & Moran, A. P. (2008).** Alterations in *Helicobacter pylori* outer membrane and outer membrane vesicle-associated lipopolysaccharides under iron-limiting growth conditions. *Innate Immun* **14**, 279–290.
- Klimentová, J. & Stulík, J. (2015).** Methods of isolation and purification of outer membrane vesicles from gram-negative bacteria. *Microbiol Res* **170**, 1–9.
- Kreuzinger, N., Fuerhacker, M., Scharf, S., Uhl, M., Gans, O. & Grillitsch, B. (2007).** Methodological approach towards the environmental significance of uncharacterized substances – quaternary ammonium compounds as an example. *Desalination* **215**, 209–222.
- Kulkarni, H. M. & Jagannadham, M. V. (2014).** Biogenesis and multifaceted roles of outer membrane vesicles from Gram-negative bacteria. *Microbiology* **160**, 2109–2121.
- Kulkarni, H. M., Swamy, Ch. V. B. & Jagannadham, M. V. (2014).** Molecular characterization and functional analysis of outer membrane vesicles from the Antarctic bacterium *Pseudomonas syringae* suggest a possible response to environmental conditions. *J Proteome Res* **13**, 1345–1358.
- Kulp, A. & Kuehn, M. J. (2010).** Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annu Rev Microbiol* **64**, 163–184.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Lakowicz, J. R. (1999).** *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd edn. New York: Springer.
- Liffourrena, A. S., López, F. G., Salvano, M. A., Domenech, C. E. & Lucchesi, G. I. (2008).** Degradation of tetradecyltrimethylammonium by *Pseudomonas putida* ATCC 12633 restricted by accumulation of trimethylamine is alleviated by addition of Al³⁺ ions. *J Appl Microbiol* **104**, 396–402.
- Lucchesi, G. I., Lisa, T. A. & 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.
- Lucchesi, G. I., Liffourrena, A. S., Boeris, P. S. & Salvano, M. A. (2010).** Adaptive response and degradation of quaternary ammonium compounds by *Pseudomonas putida* A ATCC 12633. In *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, pp. 1297–1303. Edited by A. Méndez-Vilas. Badajoz: Formatex.
- MacDonald, I. A. & Kuehn, M. J. (2012).** Offense and defense: microbial membrane vesicles play both ways. *Res Microbiol* **163**, 607–618.
- Manning, A. J. & Kuehn, M. J. (2011).** Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense. *BMC Microbiol* **11**, 258.
- McBain, A. J., Ledder, R. G., Moore, L. E., Catrenich, C. E. & Gilbert, P. (2004).** Effects of quaternary-ammonium-based formulations on bacterial community dynamics and antimicrobial susceptibility. *Appl Environ Microbiol* **70**, 3449–3456.
- McDonnell, G. & Russell, A. D. (1999).** Studies on the biodegradability of some cationic surfactant. *Rev Clin Microbiol* **12**, 147–179.
- Morrison, W. R. & Smith, L. M. (1964).** Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J Lipid Res* **5**, 600–608.
- Mykytczuk, N. C. S., Trevors, J. T., Leduc, L. G. & Ferroni, G. D. (2007).** Fluorescence polarization in studies of bacterial cytoplasmic membrane fluidity under environmental stress. *Prog Biophys Mol Biol* **95**, 60–82.
- Nishiyama, N., Toshima, Y. & Ikeda, Y. (1995).** Biodegradation of alkyltrimethylammonium salts in activated sludge. *Chemosphere* **30**, 593–603.
- Oh, S., Kurt, Z., Tsementzi, D., Weigand, M. R., Kim, M., Hatt, J. K., Tandukar, M., Pavlostathis, S. G., Spain, J. C. & Konstantinidis, K. T. (2014).** Microbial community degradation of widely used quaternary ammonium disinfectants. *Appl Environ Microbiol* **80**, 5892–5900.
- Schertzer, J. W. & Whiteley, M. (2012).** A bilayer-couple model of bacterial outer membrane vesicle biogenesis. *MBio* **3**, e00297-11.
- Schwechheimer, C., Sullivan, C. J. & Kuehn, M. J. (2013).** Envelope control of outer membrane vesicle production in Gram-negative bacteria. *Biochemistry* **52**, 3031–3040.
- Schwechheimer, C., Kulp, A. & Kuehn, M. J. (2014).** Modulation of bacterial outer membrane vesicle production by envelope structure and content. *BMC Microbiol* **14**, 324.
- Tashiro, Y., Inagaki, A., Shimizu, M., Ichikawa, S., Takaya, N., Nakajima-Kambe, T., Uchiyama, H. & Nomura, N. (2011).** Characterization of phospholipids in membrane vesicles derived from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biosci Biotechnol Biochem* **75**, 605–607.
- Tashiro, Y., Uchiyama, H. & Nomura, N. (2012).** Multifunctional membrane vesicles in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol* **14**, 1349–1362.
- Tezel, U. & Pavlostathis, S. G. (2015).** Quaternary ammonium disinfectants: microbial adaptation, degradation and ecology. *Curr Opin Biotechnol* **33**, 296–304.
- Tezel, U., Pierson, J. A. & Pavlostathis, S. G. (2006).** Fate and effect of quaternary ammonium compounds on a mixed methanogenic culture. *Water Res* **40**, 3660–3668.
- Trevors, J. T. (2003).** Fluorescent probes for bacterial cytoplasmic membrane research. *J Biochem Biophys Methods* **57**, 87–103.

van Ginkel, C. G. & Kolvenbach, M. (1991). Relations between the structure of quaternary alkyl ammonium salts and their biodegradability. *Chemosphere* **23**, 281–289.

Westphal, O. & Jann, K. (1965). Bacterial lipopolysaccharides: extraction with phenol-water and further applications of the procedure. *Methods in Carbohydr Chem* **5**, 83–91.

Zhang, C., Cui, F., Zeng, G. M., Jiang, M., Yang, Z. Z., Yu, Z. G., Zhu, M. Y. & Shen, L. Q. (2015). Quaternary ammonium compounds (QACs): a review on occurrence, fate and toxicity in the environment. *Sci Total Environ* **518-519**, 352–362.

Edited by: R. Parales

