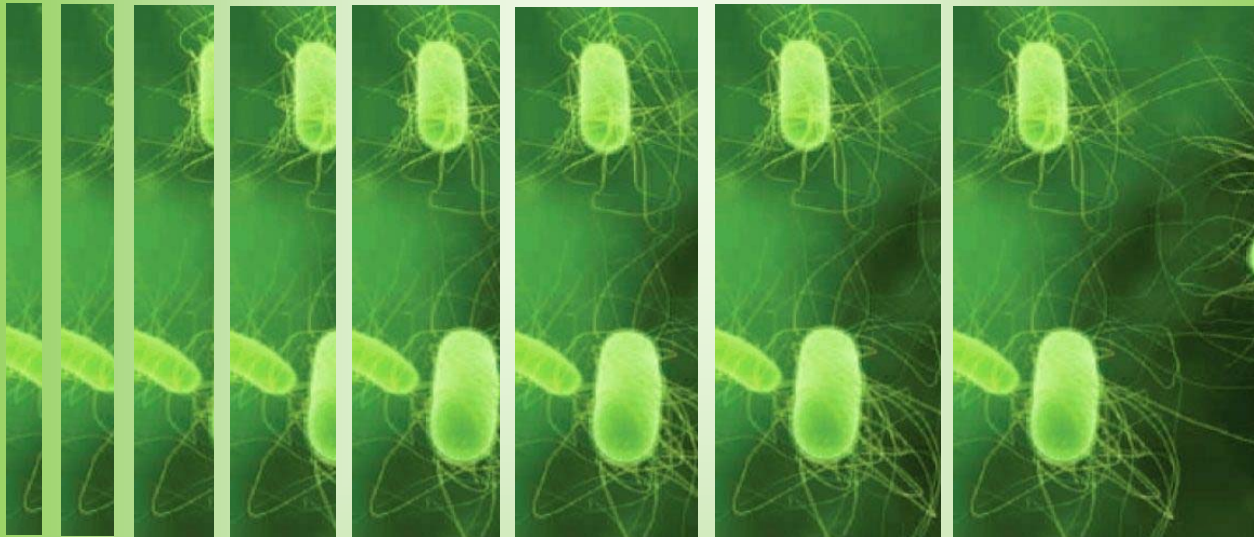




## Mecanismos de tolerancia bacteriana a detergentes catiónicos

Participación de lípidos y ácidos grasos en la respuesta de  
*P. putida* A (ATCC 12633) frente al estrés ocasionado por  
Br-tetradeciltrimetilamonio



Tesis Doctoral

Mic. Romina Heredia

Marzo, 2018

1. Resumen /Abstract	
2. INTRODUCCIÒN.	
2.1- Características generales del Género <i>Pseudomonas</i> .....	1
2.2.- Contaminación ambiental y biorremediación. ....	2
2.3- Contaminantes químicos. Compuestos de amonio cuaternario sintéticos (QACs).....	3
2.3.1- Características y usos de los QACs.....	4
2.3.2- Destino y efecto de los QACs en el ambiente. ....	4
2.4- Membrana celular bacteriana. ....	6
2.4.1- Topología de la membrana celular en bacterias Gram-negativas. ....	6
2.4.2-Biosíntesis de ácidos grasos en bacterias .....	10
2.5- Mecanismos de resistencia bacteriana ante situaciones de estrés. ....	14
2.5.1-Cambios a nivel de lípidos de membrana .....	14
2.5.2- Producción y liberación de vesículas de membrana externa .....	16
2.5.3-Acumulación de polihidroxicanoatos. ....	17
2.5.4. Mecanismos de resistencia bacteriana a QACs .....	19
2.6- Antecedentes específicos y objetivos .....	21
OBJETIVO GENERAL.....	23
OBJETIVOS ESPECIFICOS .....	23
3. MATERIALES Y MÉTODOS.	
3.1-Medios de cultivo.....	24
3.2-Conservación y mantenimiento de las cepas.....	24
3.4- Análisis de lípidos .....	26
3.4.1-Extracción de Fosfolípidos. ....	26
3.4.2-Extracción de Ácidos Grasos. ....	27
1. Análisis de AG por cromatografía gaseosa.....	28
2. Análisis de AG marcados radioactivamente .....	28
3.5.-Exposición de células bacterianas detergentes .....	28
3.6.- Manipulación de ADN .....	29
3.7.- Análisis bioinformático .....	30
3.8.- Búsqueda, amplificación, clonado y secuenciación del gen <i>P. putida A</i> (ATCC12633) homólogo a <i>desA</i> . ....	31
3.9.- Expresión de <i>desA</i> de <i>P. putida A</i> (ATCC 12633) en el huésped heterólogo <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	31
3.10- Determinación de la actividad DesA .....	32
3.11- Determinación de proteínas.....	33
3.12.- Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	33
3.13.- Determinación de la fluidez de membrana.....	35
3.14- Análisis de vesículas de membrana externa de <i>P. putida A</i> (ATCC12633) .....	36
3.14.1-Microscopía electrónica de transmisión (TEM) .....	36
3.14.2- Aislamiento de vesículas.....	36
3.14.3-Determinación del contenido de TDTMA en las MVs.....	37
3.14.4-Obtención del complejo lipoproteína-peptidoglucano .....	37
3.14.5- Extracción de Lipopolisacárido (LPS).....	37
3.14.6-Efecto de TDTMA sobre células de glóbulos rojos.....	38

Desde que leí los agradecimientos de la primera Tesis que cayó en mis manos empecé a escribir mentalmente mis agradecimientos. Ahora me encuentro intentando sacar esas palabras de mi cabeza y plasmarlas en papel, a la vez que termino de cambiar las últimas comas y espacios de mi tesis. Sin embargo, aunque en este momento me invaden los nervios por el tan cercano momento de defender esta tesis, espero que estas palabras expresen mi gratitud hacia todos, los nombrados y los olvidados, a los que tengo que pedir perdón refugiándome en las prisas de última hora.

Quiero agradecer especialmente a Gloria, por darme un lugarcito en el Lab 5 para iniciar, en aquel entonces, mi tesina de grado y por su trabajo en la dirección de esta Tesis Doctoral. Gracias por acompañarme en los primeros pasos de mi camino en la ciencia, por su apoyo, paciencia y dedicación. Por leer mis escritos una y otra vez intentando entender mis ideas, y ayudarme a expresarlas de la manera más correcta posible.

Gracias a Claudia, Nancy y Ma. Angélica, por aceptar ser jurados de esta tesis. Sus aportes y sugerencias han sido muy valiosos para el desarrollo de este trabajo. Además de la dedicación como jurados, quiero agradecerles la buena predisposición y el excelente trato que tuvieron siempre conmigo.

A mis compañeros de Lab (Lifu, Lolis, Femi) que me están enseñando (y aguantando jeje) desde que puse un pie en el laboratorio. Lifu: “el libro gordo de petete”, nuestra fuente de sabiduría y pilar del laboratorio, al que se acude tanto cuando uno no sabe si eran 1 o 100 mM o cuando se quiere saber sobre reglas ortográficas, o el origen griego o latín de alguna palabra (Lifu sabe todo!). Nuestra querida Lolis: (digo nuestra, porque el cariño es de todos) gracias por que uno puede acudir a vos en cualquier momento, no sólo para cuestiones del Lab, sino también cuando uno necesita desahogarse con problemas más profundos. Gracias más todavía por la energía que irradias y que contagias. Femi: la que tira comentarios exagerados y nos hace reír a todos (Aún no te vimos jugar al básquet, pero sabemos que te encanta jaja). Gracias por cada consejo en estos años del Doc y por mostrarme tu practicidad frente a cualquier situación. Les debo mucho de mi formación y voy a estar siempre agradecida por eso. Gracias por la contención y el compañerismo, por hacer de las tardes del lab, un momento agradable. No me olvido de los que pasaron por este Lab y que ya no están, todos dejaron una partecita. A ellos también, gracias! (Gastón, María, Bianca)

A mi familia, mi gran familia! Mis viejos, que siempre están. A mis hermanos, por este lazo inseparable que nos une y que se siente cada vez más fuerte. A los 3 “bodoques”

de la familia: Leo, Bastian y Bauti, porque son ellos los que me desconectan y me transmiten desinteresadamente, la mejor energía.

A mi amor, Jaco. Gracias por todos los momentos en que me acompañaste, buenos y no tan buenos, sos incondicional. Vivís como propios mis logros y mis frustraciones y siempre me das fuerzas para no aflojar. Gracias por ser mi compañero.

A mis amigas/os, los que están dentro y fuera de la uni. Al grupete de microbiólogos que nos seguimos acompañando en este camino de formación doctoral (Sol, Nati, Orne, Fili), a mis compañeros de graduados, a Mery, Ari, Jesi, Lau..a todos...Gracias por estar siempre!

A todos los que forman parte del departamento de Biología Molecular y que me socorrieron con préstamos varios, consejo o sugerencias, entre los que se encuentran: Integrantes del lab 15 (Emi, Ceci, Pao, Diego, Christian), Nati Paulucci, Adri Cesari, Miguel Bueno y a todas aquellas personas con las que compartí momentos en el pasillo de Molecular.

Romi

3.15- Determinación de poli-hidroxicanoatos (PHAs) en <i>P. putida</i> A (ATCC12633) .....	38
3.15.1- Tinción con Nile Blue A .....	38
4.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
CAPÍTULO I: Participación de lípidos en la respuesta de <i>P. putida</i> A (ATCC 12633) frente al estrés ocasionado por Br-tetradeciltrimetilamonio (TDTMA).	
4.1-Composición de AG de <i>P. putida</i> A (ATCC 12633) expuestas o no a TDTMA.....	39
4.2-Cambios en la composición de AG en <i>P. putida</i> A (ATCC 12633) durante la degradación de TDTMA. ....	45
4.3- Variaciones en los AG constituyentes de fosfolípidos individuales en células de <i>P. putida</i> A (ATCC 12633) expuestas o no a TDTMA. ....	46
4.4- Papel de CL en la tolerancia de <i>P. putida</i> A (ATCC 12633) frente al estrés producido por TDTMA. ....	50
CAPÍTULO II: Implicancia de desaturasas en la respuesta bacteriana a TDTMA. Caracterización bioquímica y funcional de la enzima desaturasa ( <i>des</i> ) de <i>P. putida</i> A (ATCC 12633)	
4.5.- Síntesis de AGI en <i>P. putida</i> A (ATCC12633): evidencias de la presencia de actividad desaturasa utilizando como sustrato 16:0-[1- <sup>14</sup> C].....	55
4.6.-Identificación de genes homólogos a <i>desA</i> en <i>P. putida</i> A (ATCC 12633).....	56
4.7.- Expresión de <i>mf539821</i> de <i>P. putida</i> A (ATCC 12633) .....	60
4.8.-Composición de AG de cepas de <i>E. coli</i> transformadas.....	62
4.9.- Determinación <i>in vivo</i> de la actividad desaturasa de células de <i>E. coli</i> transformadas con el gen <i>mf539821</i> .....	67
4.10.- Efecto de detergentes iónicos y no iónicos sobre la actividad desaturasa. ....	69
CAPÍTULO III: Modificaciones ultraestructurales asociadas con el crecimiento de <i>P. putida</i> A (ATCC 12633) en presencia de TDTMA: Liberación de vesículas y acumulación de polihidroxicanoatos	
4.11.- Análisis de las MVs liberadas por <i>P. putida</i> A (ATCC 12633).....	71
4.11.1-TDTMA y su participación en la biogénesis de MVs por <i>P. putida</i> .....	76
4.12- Acumulación de PHAs en el citoplasma de <i>P. putida</i> A (ATCC 12633) crecidas con TDTMA.....	80
5. Conclusiones .....	84
6. Perspectivas .....	86
7. Bibliografía.....	88
8. Trabajos científicos publicados.....	98

## Índice de Tablas y Figuras.

### Introducción

Figura 1: Estructura básica y ejemplos de QACs.....	4
Figura 2: Envoltura celular de bacterias G (-) y G (+).....	6
Figura 3: Estructura general de un glicerofosfolípido.....	7
Figura 4: Estructuras de los grupos de cabeza polar y cadenas acilo de los glicerofosfolípidos de la membrana.....	8
Figura 5: Representación esquemática de las fases de la bicapa lipídica bacteriana.....	9
Figura 6: Biosíntesis anaeróbica de AG en <i>Pseudomonas sp.</i> .....	11
Figura 7: Sustrato y producto de una desaturasa representativa.....	12
Figura 8: Modelos de desaturación aeróbica en <i>P. aeruginosa</i> .....	13
Figura 9: Representación esquemática del gránulo de PHA.....	18
Figura 10: Representación esquemática del mecanismo bactericida de los QACs sobre la membrana bacteriana.....	20

### Materiales y Métodos

Tabla 1: Cepas bacterianas y plásmidos usados en este estudio.....	25
Tabla 2: Oligonucleótidos usados en este estudio.....	30
Figura 11: Esquema del sistema de expresión utilizado, pET15b/pET28a- <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	32
Tabla 3: Composición de geles de poliacrilamida desnaturalizantes SDS-PAGE.....	34
Tabla 4: Composición de soluciones de tinte y destinte para geles de poliacrilamida.....	34

### Resultados y Discusión

#### **CAPÍTULO I: Participación de lípidos en la respuesta de *P. putida* A (ATCC 12633) frente al estrés ocasionado por Br-tetradeciltrimetilamonio (TDTMA).**

Tabla 5: Composición de AG de <i>P. putida</i> A (ATCC 12633) expuestas o no a TDTMA.....	40
Figura 11: Cambios en la composición de AG de células de <i>P. putida</i> A (ATCC 12633) expuestas a diferentes concentraciones de TDTMA.....	42
Figura 12: Polarización de fluorescencia de DPH en células de <i>P. putida</i> A (ATCC 12633) expuestas o no a TDTMA.....	44
Tabla 6: Composición de AG de <i>P. putida</i> A (ATCC 12633) crecida o no con TDTMA.....	45
Tabla 7: Composición de AG de fosfolípidos individuales de <i>P. putida</i> A (ATCC 12633) luego de 15 min de exposición a TDTMA.....	48
Tabla 8: Composición de AG de <i>P. putida</i> RH02 expuesta o no a TDTMA.....	51
Figura 13: Polarización de fluorescencia de DPH en células de <i>P. putida</i> RH02 ( $\Delta$ <i>cls::aacC1,cls2::aph(3')-IIa</i> ) expuestas a o no a TDTMA.....	53

**CAPÍTULO II: Implicancia de desaturasas en la respuesta bacteriana a TDTMA. Caracterización bioquímica y funcional de la enzima desaturasa (*des*) de *P. putida* A (ATCC 12633)**

Figura 14: Secuencia completa del gen <i>desA</i> de <i>P. putida</i> A (ATCC12633).....	54
Figura 15: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de diferentes ORFs de desaturasas.....	57
Figura 16: Análisis de la secuencia de aminoácidos de la proteína MF539821 de <i>P. putida</i> A (ATCC12633).....	59
Figura 17: Análisis de las regiones transmembrana de la proteína MF539821 de <i>P. putida</i> A (ATCC12633).....	60
Figura 18: Expresión de <i>mf539821</i> de <i>P. putida</i> A (ATCC12633).....	61
Tabla 9: Cambios en la composición de AG de células de <i>E. coli</i> RH05 y <i>E. coli</i> BL21/pET28a, expuestas o no, a TDTMA.....	63
Figura 19: Polarización de fluorescencia de DPH en células de <i>E. coli</i> BL21/pET28a y <i>E. coli</i> RH05 expuestas o no a TDTMA.....	66
Figura 20: Determinación <i>in vivo</i> de la actividad desaturasa en células de <i>E. coli</i> RH05 y <i>E. coli</i> BL21/pET28a, expuestas o no a TDTMA utilizando [1-14C]-16:0 como sustrato.....	68
Tabla 10: Cambios en la composición de AG de células de <i>E. coli</i> RH05 y de <i>E. coli</i> BL21/pET28a expuestas a detergentes iónicos y no iónicos.....	70
<b>CAPÍTULO III: Modificaciones ultraestructurales asociadas con el crecimiento de <i>P. putida</i> A (ATCC 12633) en presencia de TDTMA: Liberación de vesículas y acumulación de polihidroxicanoatos</b>	
Figura 21: Microscopía electrónica de transmisión de células de <i>P. putida</i> A (ATCC 12633) y MVs.....	72
Figura 22: Perfil de LPS de MVs.....	73
Tabla 11: Composición de PL y AG de MVs producidas por <i>P. putida</i> A (ATCC 12633) .....	73
Figura 23: Relación entre la formación de MVs y la eliminación de TDTMA.....	75
Figura 24: Lipoproteína aislada de células de <i>P. putida</i> A (ATCC 12633).....	77
Figura 25: Efecto del TDTMA sobre la membrana celular de los glóbulos rojos.....	78
Figura 26: Efecto de clorpromazina sobre células de glóbulos rojos tratadas con TDTMA.....	79
Figura 27: Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	80
Figura 28: Tinción de células de <i>P. putida</i> A (ATCC12633) con Nile Blue A.....	82

**% p/v:** porcentaje peso en volumen.

**% v/v:** porcentaje volumen en volumen.

**μM:** micromolar.

**μCi:** microCurie.

**μgr:** microgramo.

**μm:** micrómetros.

**<sup>14</sup>C:** carbono radiactivo.

**aacC1:** gen codificante para la resistencia a Gm.

**ADN:** ácido desoxirribonucleico.

**AG:** ácidos grasos

**AGI:** ácidos grasos insaturados

**AGS:** ácidos grasos insaturados

**Amp:** ampicilina.

**Amp<sup>R</sup>:** ampicilina resistente.

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

**C:** carbono.

**C<sub>14</sub>BDMA:** tetradecilbencildimetilamonio

**CL:** cardiolipina.

**cls:** gen para cardiolipina sintasa.

**desA:** gen que codifica para desaturasa

**Des A:** Δ9 desaturasa

**DO:** densidad óptica.

**DPH:** 1, 6- difenil- 1, 3,5 hexatrieno

**FAMEs:** ésteres metílicos de ácidos grasos

**G (-):** Gram negativas

**G (+):** Gram positivas

**GC:** cromatografía gaseosa

**Gm:** gentamicina.

**Gm<sup>r</sup>:** gentamicina resistente.

**h o hs:** hora u horas.

**HDTMA:** hexadeciltrimetilamonio

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

**IPTG:** isopropilo-β-D tiogalactosido.

**Kb:** kilo base/s.

**kDa:** Kilo Dalton

**Km:** kanamicina.

**Km<sup>R</sup>:** kanamicina resistente.

**l:** litro.

**LacZ:** promotor inducible por IPTG.

**LB:** medio rico Luria-Broth.

**m:** metros

**M:** molar.

**mg:** miligramo.

**min:** minuto.

**ml:** mililitro.

**mM:** milimolar.

**mm:** milímetros.

**mM:** milimolar.

**mmol:** milimol.

**MVs:** vesículas de membrana externa

**N:** nitrógeno.

**N:** normal.

**nm:** nanómetros.

**nM:** nanomolar.

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

**P:** polarización de fluorescencia

**PA:** ácido fosfatídico.

**pb:** pares de bases.

**PC:** fosfatidilcolina.

**PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa.

**PE:** fosfatidiletanolamina.

**PG:** fosfatidilglicerol.

**P-Gli:** peptidoglicano

**PHAs:** polihidroxicanoatos

**Pi:** fósforo inorgánico.

**PL:** fosfolípidos.

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

**rpm:** revoluciones por minuto.

**SDS:** dodecilsulfato sódico

**SDS-PAGE:** electroforesis desnaturizante

**Sm:** estreptomicina.

**Sm<sup>R</sup>:**estreptomicina resistente.

**Sm<sup>S</sup>:**estreptomicina sensible.

**TAE:** Buffer Tris-Acetato-EDTA.

**TCA:** tricloroacético.

**TDTMA:** tetradeciltrimetilamonio.

**TEM:** Microscopía electrónica de transmisión.

**TLC:** cromatografía en capa delgada.

**Tm:** temperatura de fusión (melting).

**ufc:** unidades formadoras de colonias.

**UV:** luz ultra violeta.

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



*Pseudomonas putida* A (ATCC 12633) responde al estrés generado por el detergente catiónico Br-tetradeciltrimetilamonio (TDTMA) modificando el contenido de las cabezas polares de sus fosfolípidos (PL) aniónicos de membrana, con incremento en el contenido de ácido fosfatídico y fosfatidilglicerol (PG) y disminución de cardiolipina (CL). A nivel de los ácidos grasos (AG) constituyentes de los PL, respecto a células no expuestas al detergente, el contenido de los AG insaturados (AGI) 16:1 $\Delta$ 9 y 18:1 $\Delta$ 11 disminuye el 83% mientras que los AG saturados (AGS) incrementan el 10%. Estos cambios se reflejan en una relación AGS/AGI = 49,74, indicativa de una estructura de membrana celular más rígida y compacta, que contrarresta el efecto fluidificante producido por el detergente. El análisis del tipo y contenido de AG constituyentes de los PL aniónicos de *P. putida* A (ATCC 12633) reveló que CL es rica en AGI, mientras que PG lo es en AGS. Así, en presencia de TDTMA, la respuesta que implica la disminución en los niveles de AGI se asoció al menor contenido de CL, y el incremento de AGS al mayor contenido de PG.

A partir del genoma de *P. putida* A (ATCC 12633) se identificó, clonó y expresó un gen, *mf539821*, que codifica una enzima  $\Delta^9$ desaturasa. En la cepa recombinante, el incremento en el contenido de 16:1 $\Delta$ 9 confirmó la expresión del producto génico. La actividad  $\Delta^9$ desaturasa se detectó *in vivo* utilizando el sustrato radiactivo [1- $^{14}$ C]-16:0. La enzima se inhibe, específicamente, por los detergentes catiónicos TDTMA, tetradecilbencildimetilamonio y hexadeciltrimetilamonio. Esta inhibición se refleja en la disminución de la síntesis de AGI, modificación necesaria para que *P. putida* contrarreste, a nivel de membrana, el efecto fluidificante que ejerce el detergente.

Células de *P. putida* A (ATCC 12633) crecidas con TDTMA como única fuente de C, N y energía, producen y liberan al medio vesículas de membrana externa (MVs), con estructura de bicapa compuesta por proteínas, lipopolisacáridos y PL. Dado que las MVs contienen TDTMA (48 nmol TDTMA/nmol PL), su producción se planteó como un mecanismo por el cual la bacteria elimina detergente al medio. El alto contenido de PL totales detectado en células de *P. putida* crecidas con TDTMA (27,89 nmol PL/mg proteínas) junto al menor contenido de lipoproteína anclada covalentemente al peptidoglicano, generan pérdida de contacto entre éste y la membrana externa. Esto y la capacidad del TDTMA de intercalarse en la membrana celular e inducir curvatura de membrana, son factores que contribuyen a la biogénesis de las MVs.

En su conjunto, los resultados obtenidos permiten concluir que la respuesta de *P. putida* A (ATCC 12633) al estrés generado por detergentes catiónicos es un proceso multifactorial que involucra, a nivel de membrana, cambios en el contenido de PL, AG y la producción y liberación de MVs, modificaciones significativas y necesarias para que las células toleren la presencia de estos compuestos catiónicos.

The response of *Pseudomonas putida* A (ATCC 12633) to cationic surfactant tetradecyltrimethylammonium (TTAB) involves modifications in the polar heads of anionic phospholipids (PL) of the membrane, with increases in the content of the phosphatidic acid (PA), phosphatidylglycerol (PG) and decrease of cardiolipin (CL). Regard to fatty acids (FA) of the PL, in TTAB treated cells with respect to non-treated cells, the content of unsaturated fatty acids (UFA) 16: 1 $\Delta$ 9 and 18: 1 $\Delta$ 11 decreased 83% while the amount of saturated fatty acids (SFA) increased 10%. Given these changes, the SFA/UFA ratio value was 49.74, value indicative of higher membrane rigidity necessary to counteract the effect of the TTAB. The analysis of the type and content of the FA of the anionic PL of *P. putida* A (ATCC12633) showed that CL carried an elevated proportion of UFA while that PG carried the major proportion of SFA. Thus, the increase in PG and consequently in SFA together with the decrease in CL and consequently in UFA content, enables greater membrane resistance reversing the fluidizing effect of TTAB.

The gene *mf539821* coding for a  $\Delta$ 9 fatty acid desaturase enzyme from *P. putida* A (ATCC 12633) was cloned and expressed in *Escherichia coli* BL21. The desaturase activity was detected when assayed *in vivo* with radioactive 16:0 FA as substrate. Also, in the recombinant strain, a significant increase in the content of 16:1 $\Delta$ 9 was indicative of this activity. The  $\Delta$ 9 desaturase activity was inhibited by the cationic surfactants TTAB, tetradecylbenzyltrimethylammonium and hexadecyl-trimethylammonium. This inhibition was reflected in the decrease of the synthesis of UFA, which is a modification necessary in *P. putida* A (ATCC12633) to counteract, at level of membrane, the fluidizing effect exerted by the detergents.

Cells of *P. putida* A (ATCC12633) degrading TTAB produce and release outer membrane vesicles (OMVs) that exhibit a bilayer structure composed of lipopolysaccharides, proteins and PL. Taking into account that TTAB was detected inside the vesicles (48 nmol TTAB/nmolPL), its production was proposed as a system of TTAB elimination. The high content of PL detected in the cells of *P. putida* grown with TTAB (27.89 nmol/mg proteins), together with the lower content of the lipoprotein covalently cross-linked to the peptidoglycan, lead to the loss of contact between the outer membrane and the peptidoglycan. This effect, plus the results that showed that the TTAB induce the curvature of the membrane, contributes to OMVs biogenesis.

Taken together, the results lead us to conclude that the modifications in the contents of PL and FA and the production and release of OMVs contribute to *P. putida* A (ATCC 12633) tolerate the stress produced by TTAB. These modifications leads to the cells overcome the fluidizing effect of the TTAB and probably allow that *P. putida* A (ATCC 12633) to survive in cationic surfactants-contaminated sites.

## 2. Introducción.

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

Las bacterias del género *Pseudomonas* o *Pseudomonas (sensu stricto)*, pertenecen al grupo I de la subclase Gamma Proteobacteria y a la familia *Pseudomonadaceae* (Palleroni, 1992, Palleroni y Moore, 2004; Gomila *et al.*, 2015; Belda *et al.*, 2016; Yonezuka *et al.*, 2017). Incluye a bacilos rectos o ligeramente curvos, Gram negativos, móviles por flagelación polar, no esporulados, quimiorganótrofos, aeróbicos estrictos, que crecen a pH neutro y a temperaturas dentro del rango de la mesofilia (Brock y Madigan, 1993). Los miembros de este género incluyen tanto bacterias inocuas como patógenos oportunistas para plantas y animales, incluido el hombre (Brock y Madigan, 1993).

Las pseudomonas son bacterias ubicuas, que presentan requerimientos nutricionales muy sencillos lo que les brinda gran versatilidad metabólica utilizando una amplia gama de compuestos naturales y artificiales como fuentes de carbono, nitrógeno y energía. Estos microorganismos, además, se distinguen por su gran adaptabilidad a diversos ambientes. Numerosas especies de pseudomonas han sido aisladas desde rizósferas de plantas, ambientes acuáticos y suelos limpios o contaminados por productos xenobióticos y biogénicos (Timmis, 2002; Silby *et al.*, 2011). Otra característica destacable de los miembros del género es su gran plasticidad genética (Clarke y Richmond, 1975; Clarke, 1982), lo que permite que ciertas cepas del género sean tolerantes o resistentes a agentes nocivos presentes en el ambiente, incluyendo antibióticos, desinfectantes, detergentes, metales tóxicos y solventes orgánicos (Appanna *et al.*, 1996; Ramos *et al.*, 1997; Pinkart y White, 1997; Hamel y Appanna, 2003; Martins dos Santos *et al.*, 2004; Boeris *et al.*, 2007, 2009).

Debido a la amplia versatilidad metabólica, inocuidad y a la capacidad de responder a una gran variedad de condiciones adversas del medio ambiente, ciertos miembros del género *Pseudomonas* han sido ampliamente estudiados para su posible aplicación biotecnológica en áreas como la biodegradación/biotransformación, bioaugmentación, biocatálisis, biocontrol y producción de bioplásticos (Silby *et al.*, 201; Belda *et al.*, 2016; Yonezuka *et al.*, 2017). Particularmente *P. putida* tiene potenciales aplicaciones en biorremediación y no es sorprendente que se lo considere un microorganismo clave para lograr la depuración de sitios contaminados (Timmis *et al.*, 1994, Dejonghe *et al.*, 2001, Silby *et al.*, 2011).

En los últimos años se ha secuenciado el genoma de diferentes cepas de *Pseudomonas*: *P. aeruginosa* PAO1 (Stover *et al.*, 2000), *P. syringae* (Buell *et al.*, 2003),

*P. fluorescens* (Paulsen *et al.*, 2005), *P. entomophila* (Vodovar *et al.*, 2006), *P. stutzeri* (Yan *et al.*, 2008) y *P. putida* KT2440 (Nelson *et al.*, 2002, Belda *et al.*, 2016), entre otras. Estas bacterias presentan en promedio 5500 genes en sus genomas, la mitad de ellos de función desconocida.

El secuenciamiento del genoma de *P. putida* KT2440, publicado por primera vez en el año 2002 por Nelson *et al.* (2002) y actualizado por Belda *et al.*, (2016), reveló que esta cepa 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 están ausentes en *P. putida* KT2440 (Nelson *et al.*, 2002). El genoma de *P. putida* KT2440 codifica información para un elevado número de enzimas relacionadas con la protección a sustancias tóxicas, así como rutas para la degradación de diversos compuestos, sistemas de eflujo del tipo ABC, sistemas de eflujo pertenecientes a la familia de los RND y sistemas de exclusión de ácido fusárico, (Nelson *et al.*, 2002; Silby *et al.*, 2011; Yonezuka *et al.*, 2017). Belda *et al.*, (2016) han propuesto la presencia de nuevas vías catabólicas asociadas a la capacidad de *P. putida* KT2440 de utilizar nuevos compuestos como fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo. De los genes identificados hasta el momento, la mayoría codifica para proteínas transportadoras de nutrientes, transportadores de electrones, enzimas involucradas en reacciones redox del ciclo de las pentosas fosfato, en la síntesis y degradación de aminoácidos y en la degradación de sustancias químicas aromáticas.

## **2.2.- Contaminación ambiental y biorremediación.**

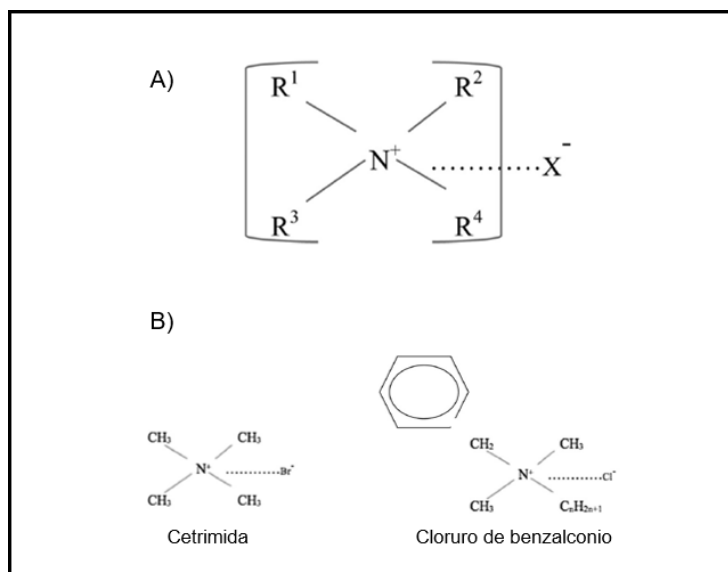
El accionar del hombre ha llevado a graves y variados problemas ecológicos entre los que se destaca la contaminación ambiental. Se denomina contaminación ambiental a la alteración nociva del estado natural de un medio como consecuencia de la introducción de un agente (físico, químico o biológico), causando inestabilidad, desorden, daño o malestar en un ecosistema, en el medio físico o en un ser vivo (Atlas y Bartha, 2001). Las tecnologías orientadas a la limpieza del medio ambiente y a la prevención de su deterioro incluyen la utilización de métodos químicos, físicos (landfilling, incineración, extracciones por solventes, etc) o biológicos (fitorremediación, rizorremediación, micorremediación, vermirremediación, biorremediación) (Suresh y Ravishankar, 2004; Leigh, 2006; Bianchi *et al.*, 2010; Azubuike *et al.*, 2016). El fin que se persigue es el de alterar la composición del contaminante reduciendo su toxicidad, su movilidad o su concentración en el

ambiente (Atlas y Bartha, 2001). En general, los métodos biológicos resultan más económicos que los físico-químicos, más efectivos y ambientalmente aceptables. Dentro de los métodos biológicos, se destaca la biorremediación, término generalmente aplicado al uso de microorganismos en procesos de descontaminación (Atlas y Bartha, 2001, Azubuike *et al.*, 2016). En los procesos de biorremediación se emplean las capacidades metabólicas y enzimáticas de los microorganismos para degradar o modificar contaminantes ambientales, permitiendo su degradación total o la producción de productos finales inocuos (Azubuike *et al.*, 2016; Verma y Jaiswal, 2016).

### **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<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O y compuestos inorgánicos (Atlas y Bartha, 2001). Sin embargo, en muchos casos la velocidad de entrada al ecosistema de estos compuestos es mayor que su remoción, tornándose difícil su completa eliminación.

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 (**Figura 1**). 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).



**Figura 1:** A) Estructura básica de QACs. B) Ejemplos de QACs: Cetrimida y Cloruro de benzalconio.

### 2.3.1- Características y usos de los QACs

Como características destacables de los QACs pueden citarse su solubilidad en agua y alcohol, sus propiedades tensioactivas, su amplio uso en la industria, formando parte de agentes antiespumantes, antiestáticos y cosméticos y sus propiedades fungicidas y bactericidas (McDonnell y Russell, 1999; Gilbert y Moore, 2005; Zhao y Sum 2007). Estas últimas características favorecen el uso de los QACs como componentes en productos de limpieza domésticos y productos para desinfección en plantas procesadoras de carne y alimentos, lecherías e industrias conexas (McDonnell y Russell, 1999; Gilbert y Moore, 2005; Zhao y Sum, 2007; Takenaka *et al.*, 2007; Brycki *et al.*, 2014). La actividad bactericida de los QACs es atribuida a que estos compuestos interaccionan electrostáticamente con las membranas celulares cargadas negativamente. Estas interacciones afectan la permeabilidad de la membrana llevando a una alteración del flujo normal de nutrientes y metabolitos y a la desnaturalización de proteínas (Laopaiboon *et al.*, 2002; Ioannou *et al.*, 2007; Sutterlin *et al.*, 2008).

### 2.3.2- Destino y efecto de los QACs en el ambiente.

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; Martínez-Carballo *et al.*, 2007; Ferrer y Furlong, 2001; Ding y Liao, 2001; Zhang *et al.*, 2015).

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; van Ginkel, 1995; Nishiyama *et al.*, 1995). Estas concentraciones son sumamente variables, dependiendo del origen de la contaminación. Cuando los QACs se usan como desinfectantes, generalmente, la concentración aplicada se encuentra entre 400 y 500 ppm (Tezel y Pavlostathis, 2015). El uso doméstico, hospitalario e industrial de los QACs, da como resultado la presencia de QACs en aguas residuales. Debido a que las plantas de tratamiento de aguas residuales están diseñadas para eliminar las sustancias orgánicas de mayor tamaño y de fácil degradación, la mayoría de los contaminantes trazas, incluidos los QACs, pasan a través de las plantas de tratamiento de aguas residuales sin modificación y se liberan al ambiente. Alrededor del 75% de los QACs utilizados anualmente se liberan en los sistemas de tratamiento de aguas residuales, mientras que el resto se descargan directamente en el medio ambiente. La concentración media de QACs en aguas residuales domésticas, en efluentes hospitalarios, en muestras de sedimentos y en aguas superficiales han sido reportadas en 4-50 mg/l, 6 mg/l, 22-206 mg/kg y hasta 3,8 mg/l, respectivamente (García *et al.*, 1999; Kümmerer *et al.*, 1997; Ferrer y Furlong, 2001; Li *et al.*, 2010; Grabińska-Sota, 2011; Zhang *et al.*, 2015).

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 (Atlas y Bartha, 2001; McDonell y Russell, 1999; Zhang *et al.*, 2015). Además, se los describe como tóxicos para organismos acuáticos, tales como peces, algas y protozoos y para una gran variedad de microorganismos (Sandbacka *et al.*, 2000; Nalecz-Jawecki *et al.*, 2003; Kreuzinger *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2010; Liang *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2014).

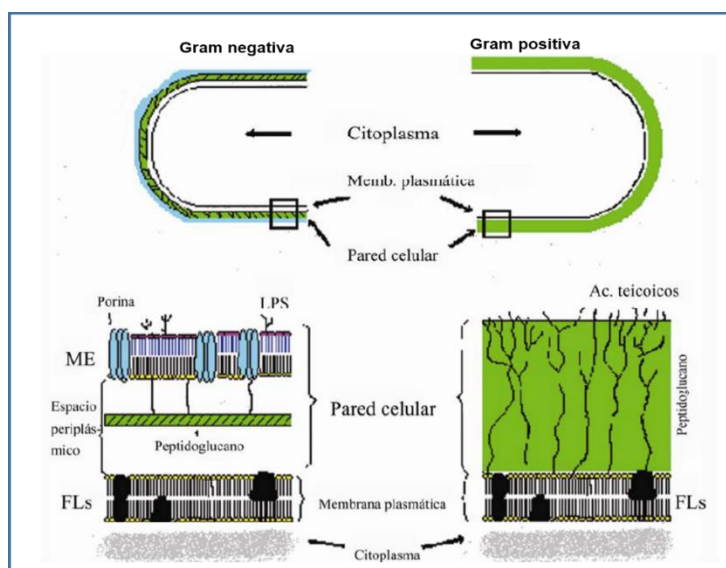
En lo que respecta al riesgo de la salud humana, los QACs se incluyen en la categoría de toxicidad II (moderadamente tóxico; moderadamente irritante) cuando se incorporan por vía oral y/o inhalación y en la categoría de toxicidad III (ligeramente tóxico; ligeramente irritante) cuando lo hacen por vía cutánea (EPA 2006; Zanini *et al.*, 2013).

## 2.4- Membrana celular bacteriana.

### 2.4.1- Topología de la membrana celular en bacterias Gram-negativas.

En bacterias Gram (-), la envoltura celular está formada por la pared celular y una membrana interna o citoplasmática y entre ambas se encuentra el espacio periplásmico donde se localiza el peptidoglicano. La membrana interna es una membrana simétrica constituida por una bicapa fosfolipídica en la que las regiones polares de los fosfolípidos se sitúan en la superficie externa de la bicapa, mientras que las cadenas hidrofóbicas de ácidos grasos se dirigen hacia el centro de la membrana. Las bacterias Gram (+) y Gram (-) difieren considerablemente en la estructura y composición de la pared celular (**Figura 2**). En las bacterias Gram (-) la pared celular se compone de una membrana externa que rodea a una monocapa de peptidoglicano mientras que en Gram (+) no hay membrana externa, sólo peptidoglicano y ácidos teicoicos.

La membrana externa de bacterias Gram (-), a diferencia de la membrana interna, es una membrana asimétrica que contiene fosfolípidos (PL) en su monocapa interna y lipopolisacáridos (LPS) en su monocapa externa. Entre la membrana interna y externa se localiza el espacio periplásmico, que contiene el peptidoglicano, un polímero que mantiene la rigidez y la morfología de la bacteria. La membrana externa se ancla al peptidoglicano a través de las lipoproteínas (**Figura 2**).



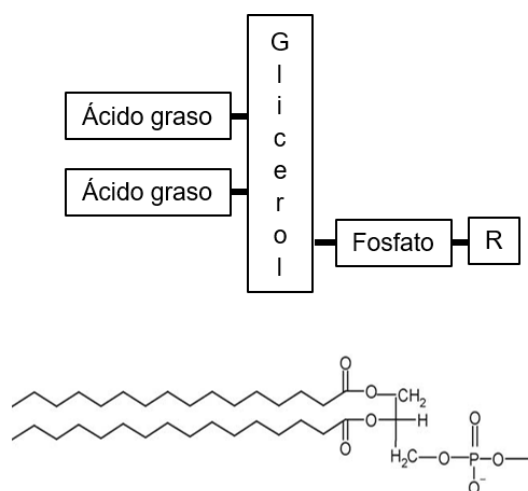
**Figura 2: Envoltura celular de bacterias G (-) y G (+).** FLS: fosfolípidos ME: membrana externa LPS: lipopolisacáridos. (Extraída de Nicolson, 2014)

La composición y estabilidad de las membranas biológicas son aspectos importantes para el correcto funcionamiento celular. Algunas de las funciones destacables de las membranas celulares son: 1) Generación y conservación de energía. La mayoría de los procesos de biosíntesis y transporte en bacterias Gram (-) son impulsados a partir de la energía generada por la hidrólisis de ATP, GTP y



fosfoenolpiruvato o por la fuerza protón-motriz generada a través de las membranas. II) Transporte (sistemas simporte y antiporte, permeasas, ATPasas. III) Translocación de proteínas al espacio periplásmico y a la membrana externa. IV) Señalización (sensores de histidina quinasas y quimiorreceptores localizados en la membrana citoplásmica. V) División celular, numerosas proteínas involucradas en la formación del tabique y en las invaginaciones de la membrana y de las constricciones celulares se encuentran en la membrana. También, algunas proteínas implicadas en la replicación y la segregación del cromosoma se asocian temporalmente con la membrana interna. VI) Capacidad de sensor cambios del medio externo para elaborar respuestas adaptativas reajustando, por ejemplo, la fluidez (Nikaido *et al.*, 2003; Nicolson, 2014; Goñi *et al.*, 2014). Este reajuste se lleva a cabo mediante la modificación de ciertos componentes de membrana, entre los que se destacan los fosfolípidos (PL) (Dowhan, 1997; Baysse *et al.*, 2007; Mykytczuk *et al.*, 2007; de Mendoza y Schujman, 2005; Zhang y Rock, 2008; Rühl *et al.*, 2012).

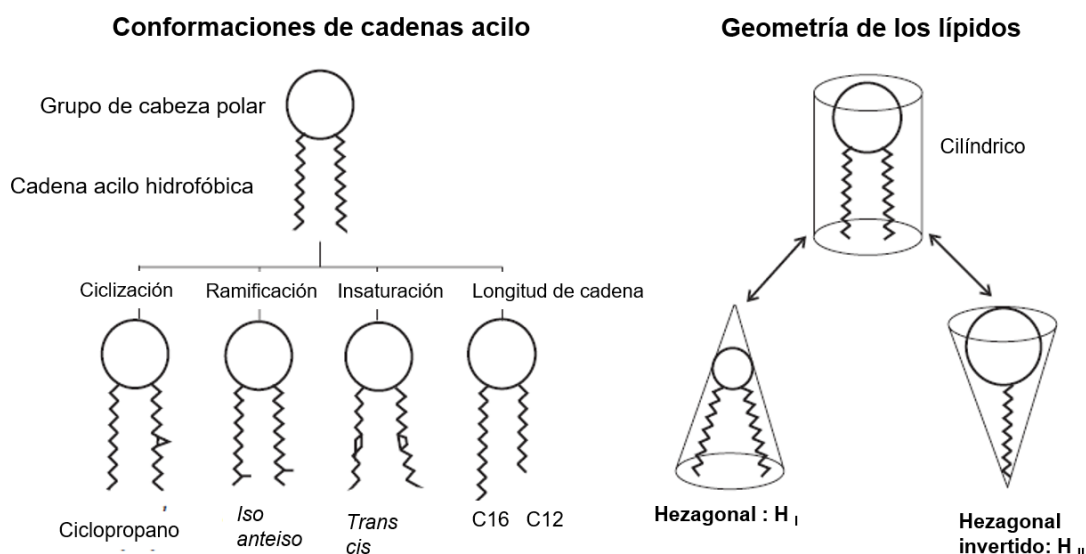
Los PL, componentes principales de la membrana celular, consisten en una cadena principal de glicerol con dos cadenas de ácidos grasos (AG) esterificadas en las posiciones 1 y 2, respectivamente. La cadena principal de glicerol contiene un grupo fosfato en la posición 3, al que se esterifica un grupo hidrófilo (**Figura 3**). La región polar de los PL se orienta hacia la superficie externa, mientras que las cadenas hidrofóbicas de los AG se dirigen hacia el centro de la membrana.



**Figura 3:** Estructura general de un glicerofosfolípido.

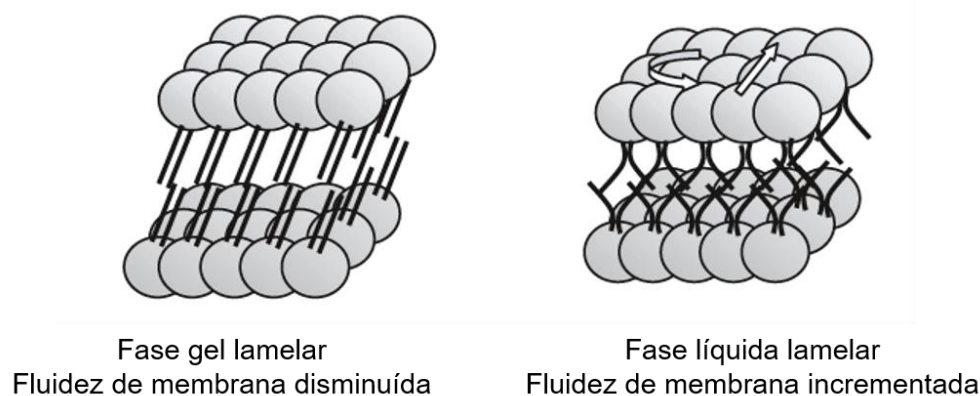
Los PL, son moléculas anfipáticas y pueden autoensamblarse en estructuras supramoleculares como micelas, bicapas y fases hexagonales y cúbicas (**Figura 4**). La estructura supramolecular predominante depende del tipo de molécula lipídica, de su grado de hidratación y de variables ambientales tales como la temperatura, presión,

fuerza iónica y pH (Mykytczuk *et al.*, 2007). Las cadenas acilo y los grupos de cabeza polar de los glicerofosfolípidos de membrana pueden adoptar diferentes conformaciones, las cuales contribuyen a la estructura de la membrana citoplasmática bacteriana. Ha sido descrito que modificaciones en las cadenas acilo constituyen el principal mecanismo que altera el orden de la membrana; mientras que la geometría que adoptan los diferentes lípidos dentro de la bicapa afectan el comportamiento de fase de la membrana (Mykytczuk *et al.*, 2007).



**Figura 4:** Estructuras de los grupos de cabeza polar y cadenas acilo de los glicerofosfolípidos de membrana. (Adaptada de Mykytczuk *et al.*, 2007)

La mayoría de los lípidos de membranas biológicas existen en la fase laminar o bicapa. El empaquetamiento de la bicapa, se encuentra dado principalmente por las interacciones hidrofóbicas de las cadenas acilos de estos componentes y por las repulsiones estéricas y electrostáticas que existen entre los grupos de cabeza polares. Generalmente, la estructura de bicapa lipídica se encuentra en una fase desordenada o líquido lamelar cristalino, donde las cadenas carbonadas contienen insaturaciones con conformaciones *gauche* (pliegues), el grado de empaquetamiento es muy bajo y la molécula lipídica posee movimientos intra e intermolecular. En algunas ocasiones, la bicapa lipídica se encuentra en una fase gel lamelar relativamente ordenada, donde las cadenas carbonadas existen en una conformación extendida o *trans*, donde su estructura es lineal permitiendo un mayor empaquetamiento dentro de la bicapa (Sinensky, 1974, Huijbregts *et al.*, 2000, Mykytczuk *et al.*, 2007) (**Figura 5**).



**Figura 5: Representación esquemática de las fases de la bicapa lipídica bacteriana.** En un estado líquido- lamelar, las moléculas lipídicas se encuentran desordenadas. Luego de una transición al estado gel- lamelar, los fosfolípidos se vuelven en un estado más ordenado, y la frecuencia de rotación y movimiento lateral se ve disminuída. (Adaptada de Mykytczuck *et al.*, 2007)

La estructura de bicapa lipídica laminar posee ciertas propiedades fisicoquímicas como comportamiento de fase, diferentes grados de fluidez/viscosidad, espesor de la membrana y rigidez a la flexión, que están determinadas tanto por la composición molecular como por la curvatura de la membrana (Mykytczuck *et al.*, 2007; Zhang y Rock, 2008).

Los PL tienen un papel fundamental en los procesos de remodelación de la membrana, y la biosíntesis y renovación de estos compuestos están estrechamente regulados (de Mendoza y Schujman, 2005; Zhang y Rock, 2008). Los PL de la bicapa están en continuo movimiento (lateral y/o transversal) y en un estado lamelar (fase líquido-cristalino) necesario para el correcto funcionamiento celular (Sinensky, 1974; Huijbregts *et al.*, 2000; Mykytczuk *et al.*, 2007). Frente a una condición ambiental adversa, puede ocurrir una transición de fase líquido-cristalina a fase gel, donde la frecuencia de rotación de las cadenas acilas se encuentra reducida y la viabilidad celular se ve alterada (Trevors, 2003; Mansilla *et al.*, 2004; Mykytczuk *et al.*, 2007). Para evitar esta situación, las bacterias son capaces de controlar la transición de fase la cual depende tanto del contenido de AG como de las cabezas polares de los PL. Este parámetro aumenta con la longitud de la cadena, el grado de saturación y el incremento de la relación *cis/trans* de los AG (Weber *et al.*, 1993; Mansilla *et al.*, 2004).

Ha sido descrito que la membrana interna de bacterias del género *Pseudomonas* está compuesta principalmente por fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilglicerol (PG) y cardiolipina (CL), siendo PE el PL mayoritario (Cronan, Jr y Rock, 1996; Schweizer, 2004; López *et al.*, 2016). Los componentes lipídicos 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*- $\Delta$  9,10-

16:1) y *cis*-vaccénico (*cis*-11-octadecanoico, *cis*- $\Delta$  11,12-18:1) (Ramos *et al.*, 1997; Schweizer, 2004). Los AGI son comúnmente sintetizados como isómeros *cis*, sin embargo, pueden interconvertirse en sus correspondientes isómeros *trans* (Ramos *et al.*, 1997). En bacterias, modificaciones de la relación de AGI *cis/trans* y de la relación AGS/AGI son mecanismos predominantes para controlar la fluidez de membrana frente a una condición ambiental desfavorable (Russell, 1984; Cronan, 2002; Denich *et al.*, 2003; Chihib *et al.*, 2005). Adicionalmente, algunas bacterias presentan AG ramificados y cíclicos, formados a partir de AG que contienen un solo enlace insaturado en posición *cis* (Cronan y Gelmann, 1975). Particularmente, en *P. putida* DOT-T1E, *P. putida* KT2440, *P. putida* P8 y *P. putida* NYC10936 han sido identificados 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; Hartig *et al.*, 2005; Pini *et al.*, 2009).

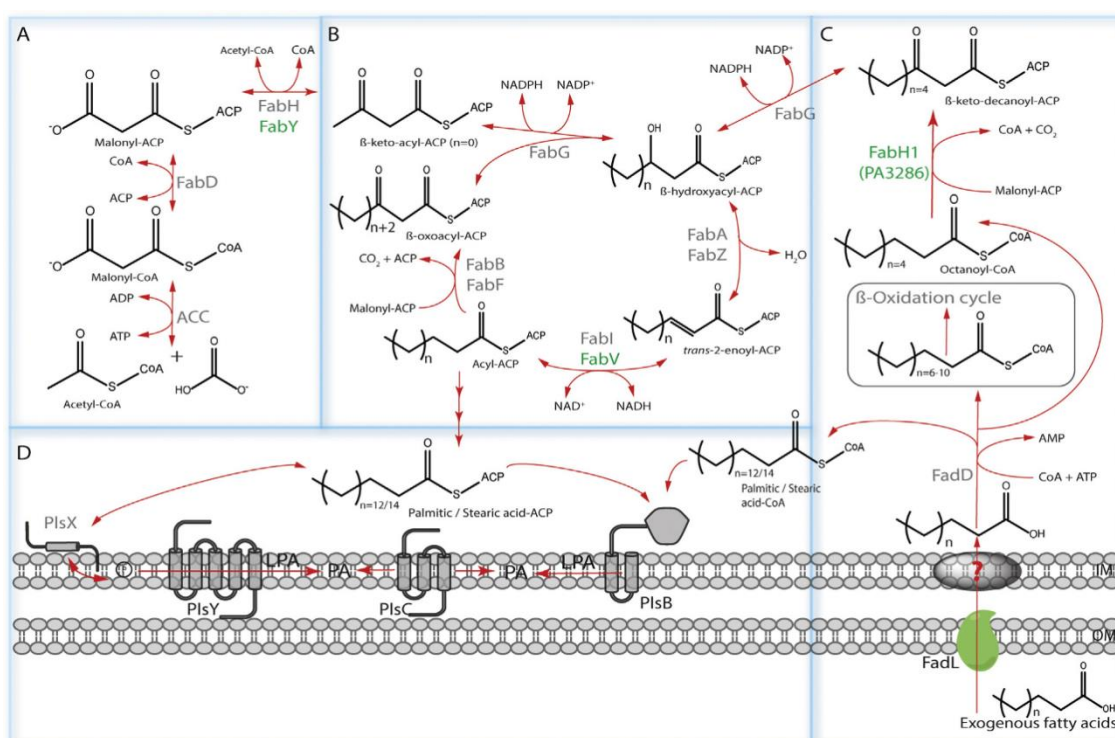
#### 2.4.2-Biosíntesis de ácidos grasos en bacterias

En la mayoría de las bacterias, incluidos los miembros del género *Pseudomonas*, la síntesis *de novo* de ácidos grasos (AG) ocurre por una vía anaeróbica en la que interviene el complejo ácido graso sintetasa o FAS II (de sus siglas en inglés, Fatty Acid Synthetase). El complejo enzimático se caracteriza por ser un complejo disociado, donde cada una de las reacciones se llevan a cabo por proteínas individuales, codificadas por genes únicos, que pueden ser purificadas independientemente de las otras enzimas que componen la ruta de biosíntesis (Campbell y Cronan, 2001; Marrakchi *et al.*, 2002). Si bien hay múltiples proteínas que llevan a cabo la misma reacción, las diferencias en la especificidad de sustrato permiten que cada componente de la vía tenga un papel único en la regulación fisiológica de los productos obtenidos y, por lo tanto, en las propiedades biofísicas de la membrana (Magnuson *et al.*, 1993; Campbell y Cronan, 2001; Marrakchi *et al.*, 2002; White *et al.*, 2005). Mediante esta vía se forman los principales ácidos grasos saturados de bacterias, el 16:0 y el 18:0.

#### A- Biosíntesis anaeróbica de AGI: síntesis *de novo*.

En  $\alpha$  y  $\gamma$  proteobacterias, la síntesis de AG saturados (AGS) e insaturados (AGI) está conectada por la ruta biosintética de AGI anaeróbica (**Figura 6**). En *Pseudomonas*, los AGI se producen por isomerización del doble enlace *trans*-2 a un doble enlace *cis*-3 en la etapa de 10 C en la síntesis, reacción catalizada por FabA o FabZ  $\beta$ -hidroxiacil-ACP deshidratasa (**Figura 6-B**). Aunque FabA y FabZ son isoformas, FabZ cataliza la deshidratación de hidroxiacil-ACP a *trans*-2-ACP. FabA, también lleva a cabo reacciones

de isomerización. Brevemente, cuando la cadena acilo en crecimiento alcanza la etapa de  $\beta$ -hidroxidecanoil-ACP, FabA lleva a cabo reacciones de deshidratación e isomerización para producir *cis*-3-decanoil-ACP, con una doble ligadura en configuración *cis*, desviando así esta cadena acilo hacia la ruta de síntesis de AGI. Este intermediario *cis*-3 se condensa con malonil-ACP para formar  $\beta$ -cetoacil-ACP, evitando la reducción catalizada por FabI y manteniendo así el doble enlace. Luego, este producto monoinsaturado es elongado por FabB hasta obtener, principalmente, ácido palmitoleico (16:1 $\Delta$ 9) y ácido vaccénico (18:1 $\Delta$ 11) (Sajbidor, 1997; Kondakova *et al.*; 2015; Zhu *et al.*, 2016). Las enzimas aciltransferasas transfieren la molécula de ácido graso a la membrana para formar glicerofosfolípidos.



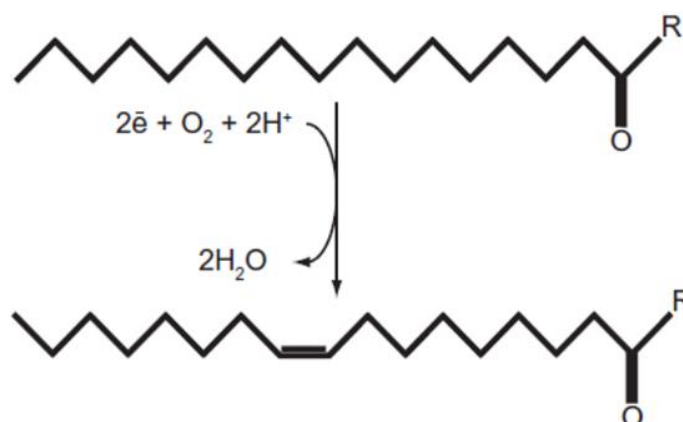
**Figura 6: Biosíntesis anaeróbica de ácidos grasos en *Pseudomonas spp*** (extraído de Kondakova *et al.*, 2015).

## B- Biosíntesis aeróbica de AGI: rol de enzimas desaturasas bacterianas.

Además de la síntesis anaeróbica de AGI, algunos microorganismos poseen una vía alternativa para sintetizar AGI, comúnmente denominada aeróbica. Esta ruta utiliza enzimas desaturasas para introducir dobles enlaces en AG preformados.

Las desaturasas (Des) son enzimas que catalizan reacciones de deshidrogenación dependiente de  $O_2$  dentro de la cadena carbonada de los AG, originando una doble ligadura en la molécula sustrato. En general, son dependientes de hierro (Buist, 2004; Aguilar y de Mendoza, 2008; Mansilla *et al.*, 2008), utilizan oxígeno

molecular y equivalentes de óxido-reducción obtenidos de la cadena de transporte de electrones (**Figura 7**).



**Figura 7: Sustrato y producto de una desaturasa representativa.** Involucra una reacción de deshidratación de la cadena acilo dependiente de  $O_2$  y requiere el aporte de  $2 e^-$  resultando en la formación de un doble enlace. Para acil-lípido desaturadas, R es un PL

Estas enzimas están presentes en animales, plantas, hongos y bacterias (Tocher *et al.*, 1998; Pereira *et al.*, 2003; Sperling *et al.*, 2003; Mansilla *et al.*, 2008), y han sido caracterizadas en diversos microorganismos, tales como *Bacillus subtilis* (Mansilla y de Mendoza, 2005), *B. cereus* (Chazarreta Cifré *et al.*, 2013), *P. aeruginosa* (Zhu *et al.*, 2006) y *Mycobacterium tuberculosis* (Phetsuksiri *et al.*, 2003).

Las enzimas desaturadas presentan cuatro dominios transmembrana, los que les permiten posicionarse particionadas dentro de la bicapa lipídica (Los y Murata, 1998; Murphy, 1999; Alonso *et al.*, 2003; Mansilla *et al.*, 2008). Contienen un motivo consenso, formado por tres regiones ricas en histidinas (“HXXXH”, “HXXHH” y “HXXHH”), involucradas con la unión de un átomo de hierro (Shanklin *et al.*, 1994; Los y Murata, 1998; Murphy, 1999; Alonso *et al.*, 2003; Mansilla *et al.*, 2008). Acorde a su solubilidad, se distinguen dos grupos de desaturadas no relacionados evolutivamente entre sí: desaturadas solubles y desaturadas unidas a membrana (Mansilla *et al.*, 2008). Las desaturadas solubles, introducen dobles enlaces en los acil-ACP (acil-ACP desaturada) y han sido descritas principalmente en plantas superiores (Alonso *et al.*, 2003; Mansilla *et al.*, 2008). Las desaturadas unidas a membrana introducen dobles enlaces en acil-CoA libres (acil-CoA desaturadas) o en aquellos AG esterificados a glicerofosfolípidos de membrana (acil-lípido desaturadas) (Los y Murata, 1998; Alonso *et al.*, 2003; Mansilla y de Mendoza, 2008). Este último tipo de desaturadas predominan en bacterias (Enoch *et al.*, 1976; Aguilar *et al.*, 1998; Mansilla *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2006).

En *P. aeruginosa* la vía anaeróbica de biosíntesis de AG dependiente de *FabA/B*, se suma a dos posibles vías de desaturación aeróbica (**Figura 8**), las cuales proveen un

mecanismo alternativo de respuesta bacteriana rápida frente a condiciones ambientales cambiantes (Zhu *et al.*, 2006; Zhang y Rock, 2008; Ring *et al.*, 2009; Kondakova *et al.*, 2015). En este microorganismo han sido descritas dos enzimas desaturasas unidas a membrana con diferente especificidad de sustrato: *DesA* y *DesBC* (Zhu *et al.*, 2006, Parsons y Rock, 2013, Kondakova, 2015). *DesA* es una  $\Delta 9$ -desaturasa que introduce un doble enlace en la posición  $\Delta 9$  de las cadenas de AG esterificadas en la posición *sn*-2 de glicerofosfolípidos existentes (Zhu *et al.*, 2016). Estudios realizados por Zhu *et al.*, (2016) sugieren que la actividad de *DesA* podría estar regulada por las propiedades biofísicas de la membrana e inhibirse por un alto contenido de AGI en la membrana. En *P. aeruginosa*, la expresión del gen *desA* no es influenciada por cambios de temperatura sino por la disponibilidad de oxígeno; aunque este mecanismo de regulación aún no ha sido descrito en detalle (Zhu *et al.*, 2006; Parsons y Rock, 2013; Kondakova, 2015). El segundo mecanismo aeróbico de síntesis de AGI en *P. aeruginosa* requiere de una acil-CoA  $\Delta 9$ -desaturasa, *DesB*, que puede desaturar estearato y palmitato exógenos, siendo los productos principales 18:1 $\Delta 9$  y 16:1 $\Delta 9$ , respectivamente (Zhu *et al.*, 2006, Subramanian *et al.*, 2010). El gen *desB* se encuentra en un operón junto al gen *desC*, el cual codifica para una oxido-reductasa que probablemente esté involucrada en el transporte de electrones que sustenta las reacciones de desaturación catalizadas por *DesB* (Zhu *et al.*, 2006). Este mecanismo mediado por *DesB* requiere la participación de una Acil-CoA sintetasa (*FadD*), necesaria para la asimilación y el metabolismo de AG exógenos.

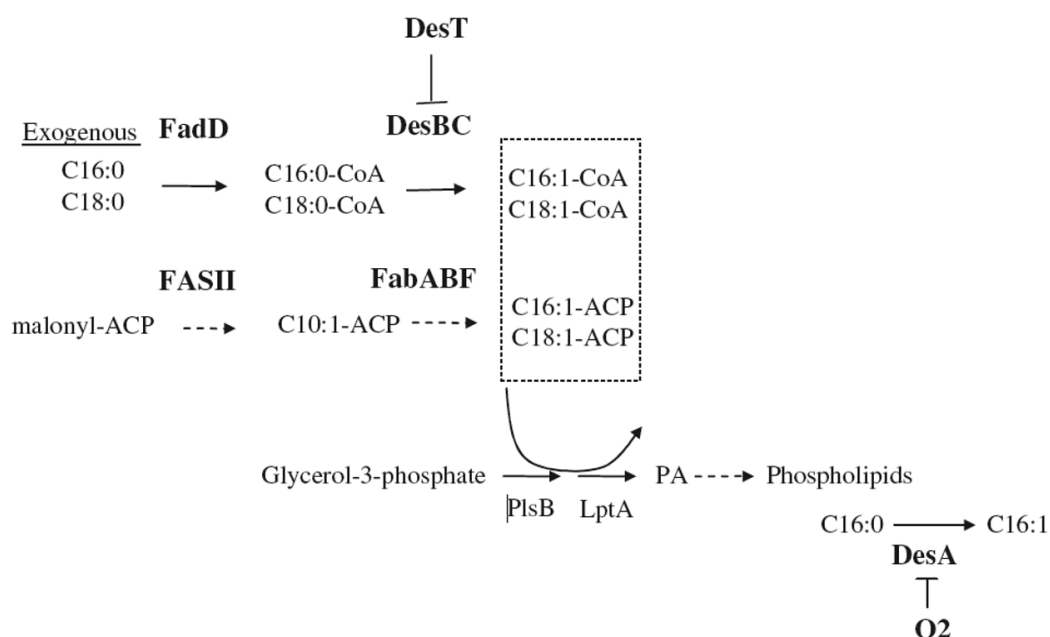


Figura 8: Modelos de desaturación de AG descritos en *P. aeruginosa*.

## 2.5- Mecanismos de resistencia bacteriana ante situaciones de estrés.

Las bacterias han desarrollado diversos mecanismos que le permiten sobrevivir frente a la escasez de algún nutriente y tolerar la exposición a múltiples agentes estresantes que se encuentran en los ambientes naturales.

### 2.5.1-Cambios a nivel de lípidos de membrana

Los PL constituyentes de membranas celulares son moléculas que se adaptan rápidamente a cambios medioambientales. Pequeños cambios en su estructura pueden alterar el empaquetamiento de las bicapas celulares y, en consecuencia, modificar la fluidez de membrana y/o las interacciones lípidos-proteínas (Denich *et al.*, 2003). En relación a ello, y para comprender la reestructuración de membranas frente a cambios ambientales, Sinensky (1974) propuso la teoría conocida como Adaptación Homeoviscosa, donde establece que la fluidez de membrana tiende a mantenerse en un valor constante frente a condiciones externas cambiantes. El mantenimiento de una fluidez de membrana óptima implica un proceso celular multifactorial (Hartig *et al.*, 2005) en donde cambios en los PL de membrana, especialmente en la composición de AG, desempeñan un papel muy importante (Loffhagen *et al.*, 2004, Jones *et al.*, 1989; Mechin *et al.*, 1999; Guerin-Méchin *et al.*, 1999, Loughlin *et al.*, 2002).

Los mecanismos de Adaptación Homeoviscosa pueden incluir:

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 enzimas 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 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; Hartig *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2006; Najjar *et al.*, 2007).

Considerando que la fluidez de membrana es un parámetro importante en el mantenimiento de la homeostasis celular, han sido descritos diversos mecanismos para mantener este parámetro constante frente a diferentes situaciones ambientales adversas.



Entre los factores ambientales que tienen un efecto fluidificante sobre la bicapa lipídica, se destaca el incremento de temperatura. Ha sido descrito que para revertir el efecto fluidificante y compensar los daños ocasionados en la membrana ante esta condición de estrés, *E. coli* incorpora en sus PL AGS y de larga longitud de cadena (Sinensky, 1974; Cronan, 2002). Diversos autores han demostrado que la exposición a solventes orgánicos y a compuestos aromáticos resulta tóxica para muchos organismos debido a que estos compuestos se intercalan entre las cadenas acilo de los PL de membrana, fluidificándola (Heipieper *et al.*, 1991; Heipieper y de Bont, 1994; Sikkema *et al.*, 1994; Denich *et al.*, 2003). Células de *P. putida* S12 y *P. Stutzeri* crecidas en presencia de tolueno o naftaleno, respectivamente, responden a la presencia del solvente incrementando el grado de saturación de los AG y, en consecuencia, la relación AGS/AGI. Debido a que por este mecanismo la membrana bacteriana revierte el efecto fluidificante de solventes, se ha propuesto una correlación entre el incremento en el grado de saturación de AG y la mayor tolerancia a estos compuestos (Heipieper y de Bont, 1994, Mrozik *et al.*, 2004, 2005; Murínová y Dercová, 2014).

Además de los cambios a nivel de los AG de PL, en respuesta a ciertas condiciones de estrés también pueden ocurrir cambios a nivel de las cabezas polares de los PL. Estos cambios pueden afectar las propiedades físico-químicas de la membrana bacteriana debido a diferencias entre las temperaturas de transición ( $T_t$ ) de los PL o por la formación preferencial de fases bicapas/no-bicapas de los lípidos (Trevors, 2003; Mykytczuk *et al.*, 2007; de Mendoza y Schujman, 2009). Los PL pueden organizarse en la membrana formando bicapas, ya sea en un estado gel ordenado o fluido-líquido cristalino. Sin embargo, algunos PL como PE y fosfatidilcolina (PC), pueden asumir naturalmente estructuras no-bicapas en una fase hexagonal invertida(Hii). El balance entre lípidos formadores de bicapa y no-bicapas dentro de la membrana es crucial en el mantenimiento de una integridad estructural y funcional (Denich *et al.*, 2003, Mykytczuk *et al.*, 2007, Markowicz *et al.*, 2010)

El efecto que ejerce el grupo de cabeza polar sobre la  $T_t$  es complejo debido a la carga natural que presentan algunos grupos y a las interacciones iónicas con otros grupos. Varios autores han remarcado la importancia del recambio de PL a nivel de membrana frente a una condición de estrés. Así, por ejemplo, pueden observarse modificaciones en el contenido de los PL aniónicos: ácido fosfatídico (PA), fosfatidilglicerol (PG) y cardiolipina (CL) en varios microorganismos expuestos a condiciones de estrés dadas por la presencia de solventes, QACs o altas concentraciones salinas (Matsumoto, 2001; López *et al.*, 2006; Bernal *et al.*, 2007; Boeris *et al.*, 2007; Ghosh *et al.*, 2008). Ha sido demostrado que células de *P. putida* DOT- T1 expuestas a solventes como el tolueno muestran disminución en el contenido de PE e

incremento en los niveles de CL y PG. Estas modificaciones resultan en una disminución de la fluidez de membrana ya que PG y CL tienen una mayor Tt que PE (Ramos *et al.*, 1997, 2002; Brannigan *et al.*, 2004; Bernal *et al.*, 2007). Similares resultados fueron encontrados para *P. putida* S12 expuesta a tolueno (Weber y de Bont, 1996) y para *P. putida* Idaho expuesta a o-xileno (Pinkart y White, 1997).

### 2.5.2- Producción y liberación de vesículas de membrana externa

La formación y liberación al medio de vesículas de membrana externa (MVs) representa un mecanismo que le permiten a bacterias Gram-negativas adaptarse a cambios ambientales (Kulp y Kuehn, 2010; Tashiro *et al.*, 2011, 2012, Berleman y Auer, 2013; MacDonald y Kuehn, 2013, Deatherage *et al.*, 2009). Las MVs son partículas esféricas de 20-200 nm de diámetro rodeadas por una bicapa, formadas por PL, LPS, proteínas de membrana externa y constituyentes periplásmicos.

Las MVs han sido asociadas a múltiples funciones celulares. En cepas patógenas, la producción de MVs es considerado un factor importante en el establecimiento de interacciones huésped-bacteria ya que transportan factores de virulencia como proteasas, hemolisinas, fosfatasas alcalinas y  $\beta$ -lactamasas, lo que facilita la colonización e invasión del huésped en infecciones (Kadurugamuwa y Beveridge, 1995; 1996; Li *et al.*, 1996; Cota-Gomez *et al.*, 1997, Tashiro *et al.*, 2012, Kim *et al.*, 2015). Las MVs producidas por *P. aeruginosa* juegan un rol importante en las interacciones bacteria-bacteria, transportan en su interior altas concentraciones de autolisina y de quinolonas antibacterianas que lisan el peptidoglicano e inhiben el crecimiento bacteriano, respectivamente (Li *et al.*, 1996; Mashburn y Whiteley, 2005). También la producción de MVs ha sido involucrada en la comunicación intra- e inter- especies, debido a la capacidad de las MVs de transportar moléculas señal y DNA (Berleman y Auer, 2013; Mashburn y Whiteley, 2005). Ante situaciones de estrés, dada por la presencia de agentes nocivos en el medio, la producción de MVs constituye un mecanismo de detoxificación. Por ejemplo, la tolerancia a tolueno de células de *P. putida* IH-2000 involucra principalmente la eliminación de este solvente de la membrana externa por medio de la liberación de MVs (Kobayashi *et al.* 2000).

El mecanismo de biogénesis de MVs no ha sido completamente dilucidado. Sin embargo, se han propuesto diversos factores que pueden estimular la producción de vesículas:

a) Disminución en el número de entrecruzamientos entre membrana externa y peptidoglicano (P-Gli). El análisis de la composición de vesículas liberadas por *E. coli* mostró que éstas estructuras contenían una cantidad relativamente baja de lipoproteínas

(Lpp), compuestos que aseguran, en parte, que la membrana externa esté anclada al PG subyacente, asegurando así la estabilidad de la membrana (Braun, 1975; Braun y Wolff, 1975). Esto permitió sugerir que, en *E. coli*, la formación de MVs es el resultado del crecimiento desigual de la membrana externa en relación con el peptidoglicano, disminuyendo el contacto mediado por Lpp (Schertzer y Whiteley, 2013; Eberlein *et al.*, 2018).

b) Acumulación de diferentes compuestos en el periplasma. Ha sido propuesto que la acumulación de proteínas mal plegadas, fragmentos de PG o LPS indeseables en zonas donde la Lpp no está anclada al PG, es un factor que contribuye a la formación de vesículas (MacDonald y Kuehn, 2013).

c) Curvatura de la membrana. En *P. aeruginosa* y en otros organismos Gram-negativos ha sido descrito que la incorporación exógena de la molécula señal anfifílica quinolona (PQS), promueve la generación de MVs. La PQS potencia la repulsión de cargas aniónicas existente en el LPS de la superficie celular, lo que conduce a la formación de vesículas por expansión de la cara externa en relación de la interna, dando como resultado una curvatura de toda la membrana (Tashiro *et al.*, 2009)

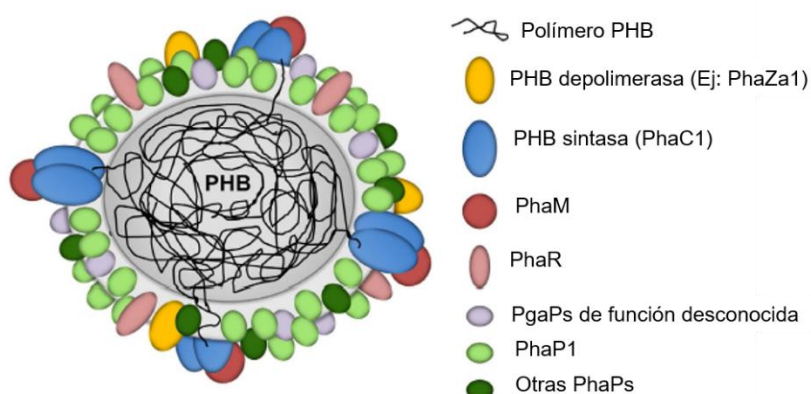
d) Fluidez de la membrana. Las características biofísicas de los lípidos de membrana tienen un rol clave en la biogénesis de MVs. Por ejemplo, en *E. coli*, un aumento en la temperatura de crecimiento (30°C, 34°C y 37°C) ha sido asociado con un incremento en la cantidad de vesículas liberadas al medio, probablemente debido al aumento en la fluidez de membrana (Mc Broom y Kuehn, 2007). Sin embargo, en células de *P. aeruginosa*, este efecto no se pone de manifiesto cuando se aumenta la temperatura de crecimiento de 25°C a 37°C y a 39°C (Macdonald y Kuehn, 2013). En *Shewanella livingstonensis*, *Serratia marcescens* y el patógeno *Bartonella henselae*, descensos en la temperatura de crecimiento aumentan la producción de MVs (Roden *et al.*, 2012; Frias *et al.*, 2012; Tashiro *et al.*, 2012).

### 2.5.3-Acumulación de polihidroxicanoatos.

Los polihidroxicanoatos (PHAs) son biopoliésteres de ácidos 3-hidroxicarboxílicos que se acumulan en forma de gránulos insolubles en el citoplasma bacteriano, con un diámetro de 200-500 nm, aproximadamente (**Figura 9**). Según la longitud de la cadena carbonada, se clasifican en PHAs cadena corta (scl- en inglés) con 3-5 átomos de carbono y de cadena mediana (mcl- en inglés) de 4-16 átomos de carbono (Reddy *et al.*, 2003; Prieto *et al.*, 2015; Keshavarz y Roy, 2010; Wang *et al.*, 2011). *Pseudomonas* produce PHAs con una longitud de cadena media (Prieto *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2011). Sin embargo, diversos autores revelaron que cepas tales como

*Pseudomonas* sp. 61-3, *Pseudomonas oleovorans* B-778, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* YS1 y *Pseudomonas stutzeri* 1317, sintetizan una mezcla de PHAs con longitud de cadena corta y media (Manso Cobos *et al.*, 2015 y citas incluídas).

En bacterias, estas inclusiones de PHAs están rodeadas por una membrana de aproximadamente 15-20 nm de espesor en donde se encuentran embebidas diversas proteínas, tales como: PHA-sintasas, asociadas a la polimerización, PHA-depolimerasas, involucradas en la degradación y movilización del biopolímero, y fasinas, enzimas con funciones regulatorias. En *Pseudomonas*, se encuentra también una acil-CoA sintetasa encargada de activar los productos de la depolimerización, convirtiéndolos en sustrato de la polimerasa o de las enzimas de la  $\beta$ -oxidación. (Reddy *et al.*, 2003; Prieto *et al.*, 2012; 2015; Keshavarz y Roy, 2010; Wang *et al.*, 2011). Estudios recientes han demostrado que la capa superficial que rodea al gránulo de PHAs se encuentra libre de fosfolípidos y solo contiene proteínas (Bresan *et al.*, 2016).



**Figura 9: Representación esquemática del gránulo de PHA.** Los gránulos de PHA están rodeados por una capa superficial libre de fosfolípidos y diversas proteínas de unión a gránulo entre las que se encuentran fasinas, despolimerasas intracelulares, polimerasa, entre otras. Las proteínas asociadas a los gránulos de PHB actualmente conocidas (PgaP) están simbolizadas por glóbulos coloreados diferencialmente. Tomada de Bresan *et al.*, 2016.

La acumulación de PHAs ocurre cuando existe un exceso en la disponibilidad de carbono y otros nutrientes, tales como nitrógeno, sulfuro, hierro, magnesio, potasio u oxígeno, son limitantes (Khanna y Srivastava, 2005; Keshavarz y Roy, 2010; Poblete-Castro *et al.*, 2012; Prieto *et al.*, 2015). En *Pseudomonas* sp. 14-3 la producción de compuestos altamente reducidos como PHAs modulan la disponibilidad de equivalentes de reducción, contribuyendo a aliviar el estrés oxidativo causado por las bajas temperaturas (Ayub *et al.*, 2004, 2009). También ha sido descrito que ciertas bacterias, tales como *Azotobacter vinelandii* UWD, *Alcaligenes eutrophus* y *Alcaligenes latus* son capaces de acumular PHAs bajo condiciones no limitantes de disponibilidad de nutrientes

(Khanna y Srivastava, 2005; Keshavarz y Roy, 2010). Cuando las condiciones ambientales se vuelven desfavorables, los PHAs pueden ser degradados a monómeros correspondientes, que son empleados como fuente de carbono y energía.

La estructura monomérica de los PHAs guarda, en general, una fuerte relación con el sustrato utilizado por la bacteria como fuente de carbono. Hasta el momento, los PHAs identificados son polímeros lineales compuestos de ácidos 3-hidroxicanoicos (HAs) exclusivamente con configuración *R*. Así, por ejemplo, *P. oleovorans*, durante el crecimiento con *n*-octanoato acumula polímeros del tipo 3-hidroxi octanoato y 3-hidroxi hexanoato (Khanna y Srivastava, 2005). Estas variaciones en la composición monomérica del polímero determinan propiedades como rigidez, fragilidad, punto de fusión, temperatura de transición vítrea y resistencia a solventes orgánicos (Prieto *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2011, Khanna y Srivastava, 2005).

Por otro lado, resulta interesante mencionar que la utilización de desechos industriales es una estrategia distintiva que lleva a la producción, a gran escala, de PHAs. En el contexto de la biorremediación, un limitado número de microorganismos han sido descritos que acumulan PHA desde diferentes fuentes tóxicas, tales como hidrocarburos aromáticos (Tobin y O'Connor, 2005), desechos industriales de la industria del aceite de oliva (Cerrone *et al.*, 2010) o colorantes textiles (Tamboli *et al.*, 2010). Por ejemplo, *P. pseudoalcaligenes* CECT5344, un microorganismo modelo degradador de cianida, químico tóxico producido por la actividad antropogénica; es usado en la detoxificación de aguas industriales. Esta bacteria tiene la habilidad de acumular PHAs cuando utiliza estas cianidas o ciano-derivados como fuente de nitrógeno (Manso Cobos *et al.*, 2015).

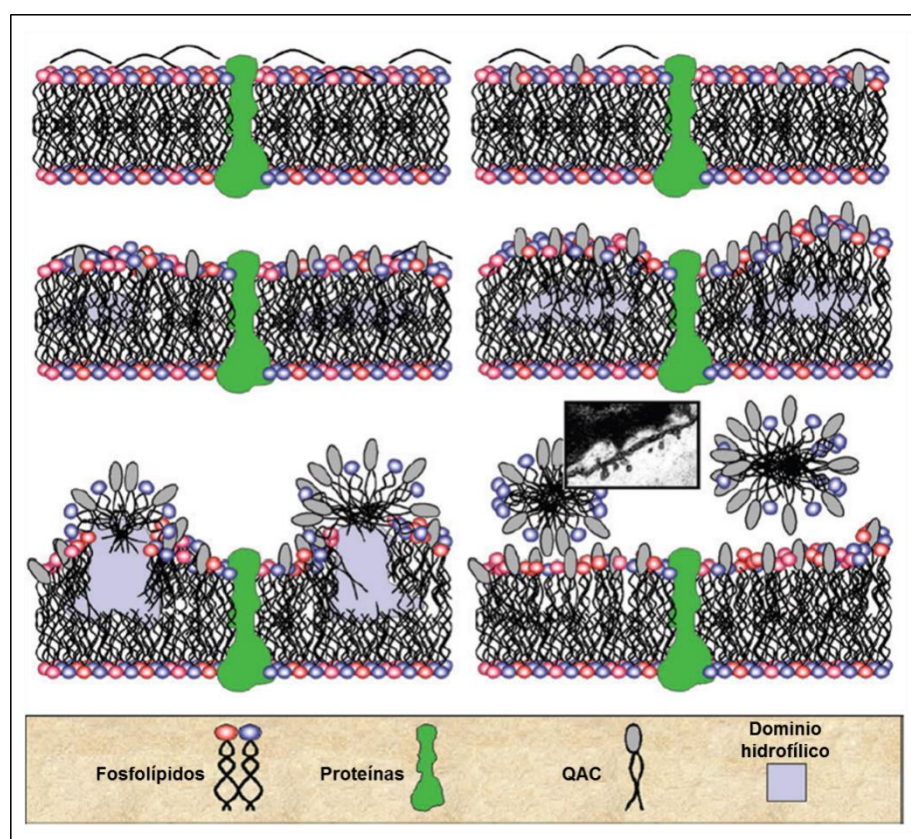
Los PHAs son considerados compuestos biocompatibles que pueden ser totalmente degradados a agua y dióxido de carbono, son producidos a gran escala y constituyen una alternativa a los plásticos convencionales derivados del petróleo, evitando así problemas de contaminación ambiental (Khanna y Srivastava, 2005; Urtuvia *et al.*, 2014; Manso Cobos *et al.*, 2015). Además, dado que pueden modificarse químicamente y originar diferentes tipos de polímeros, son utilizados en diversas aplicaciones, particularmente en el área de salud humana, formando parte de válvulas para el corazón, stents y armazón óseo (Khanna y Srivastava, 2005; Urtuvia *et al.*, 2014)

#### **2.5.4. Mecanismos de resistencia bacteriana a QACs**

Los detergentes catiónicos son comúnmente utilizados como agentes bactericidas (McDonell y Russell, 1999; Gilbert y Moore, 2005; Zhao y Sum, 2007). El mecanismo de acción de los QACs involucra, principalmente, disrupción física y solubilización de la pared y de la membrana celular bacteriana. Según describen McDonell y Russell (1999), el mecanismo incluye:

- 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 10** muestra una representación esquemática del mecanismo de acción bactericida de los QACs sobre la membrana plasmática.



**Figura 10:** 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).

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).

Los QACs tienen un efecto fluidificante sobre las membranas y diversos microorganismos, tales como *Listeria monocytogenes*, *E. coli*, *P. aeruginosa* ATCC 15442 y *P. aeruginosa* ATCC 15692 responden a la presencia de los QACs rigidizando su membrana a partir de un incremento de AGS (Guérin-Méchin *et al.*, 1999; Bisbiroulas *et al.*, 2010; Dubnicková *et al.*, 2006). Ha sido propuesto que el incremento de las cadenas saturadas promueve un empaquetamiento más eficiente y ordenado de la membrana lo cual colabora, no sólo a compensar el efecto fluidificante del detergente sobre la membrana sino también, a bloquear el acceso de las moléculas de QACs al interior de la misma (Russell, 1984, Denich *et al.*, 2003, Dubnicková *et al.*, 2006, Baysse y O'Gara, 2007). Si bien se describen diferentes estudios, el mecanismo de resistencia bacteriana a QACs parece ser un fenómeno múltiple y complejo.

## 2.6- Antecedentes específicos y objetivos

En nuestro laboratorio se estudian, en forma integral, la degradación y los mecanismos de respuesta bacteriana de *P. putida* A (ATCC 12633) a QACs, utilizando como modelo el Br-tetradeciltrimetilamonio (TDTMA). Entre los parámetros que podrían estar relacionados con los mecanismos que le permiten a *P. putida* A (ATCC 12633) tolerar la presencia de TDTMA, se analizaron los cambios a nivel de PL de membrana cuando la cepa fue expuesta durante cortos períodos de tiempo (15 min) al detergente. Bajo estas condiciones de estrés, el contenido de PL totales no presentó diferencias significativas respecto a lo detectado en células no expuestas, 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. Esto indicó que estos PL están involucrados en la respuesta al QAC, utilizando principalmente PA para neutralizar la alta carga positiva de la molécula de TDTMA (Boeris *et al.*, 2007). Aumentos de PA y PG también se detectaron cuando *P. putida* A (ATCC 12633) se hizo crecer en presencia de TDTMA como única fuente de C y N. Sin embargo, estas células no presentaron modificaciones en el contenido de CL, lo que permitió concluir que las variaciones a nivel de CL son importantes sólo en la respuesta rápida de *P. putida* A (ATCC 12633) al detergente (Boeris *et al.*, 2009).

Por estudios moleculares se identificaron dos genes, *cls* y *cls2*, que codifican para cadiolipina sintasas (Cls), enzimas que catalizan la síntesis de CL a través de la condensación de dos moléculas de PG. El análisis de cepas mutantes mostró que 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. Estas células de *P. putida* A (ATCC 12633) con muy bajo contenido de CL en sus membranas son incapaces de tolerar el efecto fluidificante del TDTMA, lo que se reflejó 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 concluyó 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 TDTMA (López *et al.*, 2016)

Además de estos cambios específicos en PL, cuando las células crecen con TDTMA como única fuente de C, N y energía, se detectó un incremento de aproximadamente un 80% en el contenido de PL totales y, por análisis por microscopía, se observó la presencia de pseudovacúolas internas y de vesículas emergiendo de las células, aspectos estructurales que posiblemente guardan relación con el notable incremento de PL totales que se observa en esta condición nutricional. (Boeris, 2011).



**OBJETIVO GENERAL:** Caracterizar los mecanismos de respuesta de *P. putida* A (ATCC 12633) frente al estímulo provocado por detergentes catiónicos y relacionarlos con la capacidad de biodegradar estos compuestos. El objetivo final que se persigue es el de utilizar a *P. putida* como vehículo en procesos de biorremediación.

**OBJETIVOS ESPECIFICOS:**

1) Dado que los AG son marcadores de cambios del estado fisiológico de microorganismos y de la fluidez de la membrana causados por factores externos, se pretende **estudiar el patrón de AG y monitorear la fluidez de la membrana en células de *P. putida* sometidas a condiciones adversas dadas por la presencia de Br-tetradeciltrimetilamonio (TDTMA).**

2) Dado que la respuesta de *P. putida* A (ATCC 12633) frente al estrés por TDTMA implica cambios en el contenido de PL aniónicos de su membrana, se pretende **analizar la composición de AG en cepas mutantes de *P. putida* afectadas en la síntesis de PL aniónicos y determinar si los AG u otros componentes lipídicos de membrana son capaces de reemplazar estas deficiencias en respuesta al detergente.**

3) Conocida la respuesta de *P. putida* A (ATCC 12633) a nivel de lípidos de membrana frente al estrés producido por la exposición a detergentes, se pretende **determinar el/los mecanismos a partir de los cuales se generan los cambios en el contenido de AG de los PL en condiciones estresantes dadas por la presencia de TDTMA.**

4) Debido a que células de *P. putida* A (ATCC 12633) crecidas en presencia de TDTMA producen pseudovacúolas intracelulares y liberan vesículas al medio, se pretende **Caracterizar las pseudovacúolas intracelulares y las vesículas extracelulares producidas cuando *P. putida* degrada TDTMA y determinar la contribución de estas estructuras en los mecanismos celulares de detoxificación del detergente.**

### 3. Materiales y Métodos.

#### 3.1-Medios de cultivo.

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

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

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

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

Las cepas bacterianas fueron conservadas de la siguiente manera: a 0,85 ml de un cultivo líquido en LB crecido durante 10-12 hs se le agregan 0,15 ml de glicerol 87 % (v/v) estéril, se mezcla, se enfría a -20 °C y luego se guarda a -70 °C. Para recuperar la cepa, se raspa la superficie con un palillo estéril y se estría una placa de LB (Sambrook *et al.*, 1989). Las cepas 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.**

**Tabla 1:** Cepas bacterianas y plásmidos usados en este estudio

Cepas o plásmidos	Características relevantes	Referencias
<b>Cepas</b>		
<i>P. putida</i>		
A (ATCC 2633)	Cepa salvaje de colección	Palleroni, 1992
RH02	Mutante de <i>P. putida</i> A (ATCC12633) afectada en los genes homólogos a <i>cls</i> y a <i>cls2</i> ( $\Delta cls::aacC1$ , $cls2::aph(3')-IIa$ . Gm <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> )	López <i>et al.</i> , 2016
<i>E. coli</i>		
DH5 $\alpha$	Cepa de clonado, <i>recA1</i> , $\Phi 80 lacZ\Delta M15$ .	Hanahan, 1983
RH04	DH5 $\alpha$ , conteniendo el gen de <i>P. putida</i> A (ATCC 12633) homólogo a <i>desA</i> clonado en pGem <sup>®</sup> TEasy (Amp <sup>R</sup> ).	Este estudio
BL21 (DE3)	Cepa de clonado para expresión, <i>lon</i> -, <i>ompT</i> -, F- gal-, <i>dcm</i> -, RNAPol T7+	Promega
RH05	Cepa conteniendo el gen de <i>P. putida</i> A (ATCC 12633) homólogo a <i>desA</i> clonado en pET28a (Km <sup>R</sup> ).	Este estudio
BL21/pET28a	Cepa llevando el plásmido pET28a vacío (Km <sup>R</sup> )	Este estudio
<b>Plásmidos</b>		
pGem <sup>®</sup> TEasy	Vector de clonado, (Amp <sup>R</sup> )	Promega
pET28a	Vector de expresión, (Km <sup>R</sup> ).	QiaGen
pRH04	pGem <sup>®</sup> TEasy conteniendo un fragmento de 1,2 kb correspondiente al gen de <i>P. putidaA</i> (ATCC 12633) homólogo a <i>desA</i> , flanqueado por <i>XhoI</i> y <i>EcoRI</i> (Amp <sup>R</sup> ).	Este estudio
pRH05	pET28a conteniendo un fragmento de 1,2 kb correspondiente al gen de <i>P. putidaA</i> (ATCC12633) homólogo a <i>desA</i> flanqueado por <i>XhoI</i> y <i>EcoRI</i> (Km <sup>R</sup> ).	Este estudio

*P. putida* A (ATCC 12633) y *P. putida* RH02 se hicieron crecer, en agitación, a 30°C en medio rico LB o en HPI-BSM con la adición de glucosa 20 mM y NH<sub>4</sub>Cl 18 mM como fuentes de C y N, respectivamente, o con TDTMA 150  $\mu$ M (50 mg/l) como única fuente de C y N.

*E. coli* DH5 $\alpha$  y las diferentes cepas de *E. coli* BL21 (DE3), se hicieron crecer, con agitación, a 37°C en medio rico LB. Cuando fue necesario, se agregaron al medio de cultivo los siguientes antibióticos: ampicilina (Amp) 200  $\mu\text{g/ml}$ , kanamicina (Km) 50  $\mu\text{g/ml}$ .

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 de luz visible.

### 3.4- Análisis de lípidos

#### 3.4.1-Extracción de Fosfolípidos.

Los fosfolípidos (PL) fueron extraídos de las células bacterianas o de las vesículas de membrana liberadas por *P. putida* A (ATCC12633) con una mezcla de cloroformo/metanol/agua según lo descrito por Bligh y Dyer (1959). Las muestras se secaron bajo atmósfera de nitrógeno y se resuspendieron en un volumen mínimo de cloroformo.

##### - 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) (Boeris *et al.*, 2007). 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.

##### - 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.

#### -Cuantificación de PL

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 3.4.1**) 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 min a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se determinó la absorbancia a 660 nm.

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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 N, completando volumen final (1 L) con agua bidestilada.

#### **3.4.2-Extracción de Ácidos Grasos.**

Los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) fueron preparados desde los extractos lipídicos totales con 10% de trifluoruro de boro (BF<sub>3</sub>) en metanol, calentados a

100° C durante 2 hs, extraídos con tres volúmenes de hexano (Morrison y Smith, 1964) y finalmente concentrados bajo atmósfera de N<sub>2</sub>.

Para determinar la composición específica de ácidos grasos de cada PL, los PL fueron separados por TLC y las áreas identificadas en las cromatoplasmas se rasparon y luego fueron metil-esterificadas, como se describió anteriormente, a partir del agregado de 10% de BF<sub>3</sub> en metanol.

### 1. Análisis de AG por cromatografía gaseosa

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, durante 25 min y luego una rampa de 3 °C/min hasta alcanzar 250°C.

Los picos correspondientes a cada ácido graso fueron identificados comparando los tiempos de retención con testigos estándares purificados (Sigma Chemical Co., SL, USA).

El grado de saturación de los extractos fue definido como la relación entre AG saturados (AGS) y AG *cis*-insaturados (AGI).

### 2. Análisis de AG marcados radioactivamente

En experimentos donde se utilizó como sustrato AG 16:0-[1-<sup>14</sup>C] (**Apartado 3.10-b**), los FAMES marcados radioactivamente fueron resueltos de acuerdo al número de dobles enlaces en placas de TLC de sílica gel impregnadas con AgNO<sub>3</sub> en acetonitrilo (10%, p/v) usando hexano/ éter etílico/ ácido acético (94:4:2 v/v/v) como mezcla de solventes. Las bandas de FAMES fueron localizadas bajo luz UV luego de rociar las placas con una solución de 2,7 diclorofluoresceína 0,1 % (p/v) en etanol. Los spots identificados fueron raspados de las placas, eluidos y finalmente secados bajo atmósfera de N<sub>2</sub> en viales de vidrio (Henderson y Tocher, 1992). La radioactividad fue determinada en contador de centelleo líquido (Beckman LS 60001 C).

### 3.5.-Exposición de células bacterianas detergentes

a) Células de *P. putida*A (ATCC 12633) y *P. putida* RH02 (**Tabla 1**) se hicieron crecer en HPi-BSM con la adición de glucosa y NH<sub>4</sub>Cl hasta final de fase

exponencial ( $DO_{660}=0,8$ ). En ese momento las células fueron o no expuestas durante periodos de tiempo variables (1', 5', 15', 30' y 60' min) a TDTMA (10, 25 y 50 mg/l). Luego de cada tiempo de contacto, los cultivos fueron centrifugados y los precipitados obtenidos fueron sometidos al análisis lipídico (**Apartado 3.4**) y fluidez de membrana (**Apartado 3.13**).

b) Células de *E. coli* BL21/pET28 y *E. coli* BL21 RH05 (**Tabla 1**) se hicieron crecer en LB en presencia de 1% lactosa durante 19 hs (**Apartado 3.9**). Luego de ese tiempo, las células fueron expuestas o no a 50 mg/l a cada uno de los siguientes detergentes: TDTMA, tetradecilbencildimetilamonio ( $C_{14}$ BDMA), hexadeciltrimetilamonio (HDTMA), dodecilsulfato sódico (SDS) o Triton X-100. 15 min post-exposición, los cultivos fueron cosechados y las células sometidas a ensayos de actividad desaturasa (**Apartado 3.10**) y fluidez de membrana (**Apartado 3.13**).

### 3.6.- Manipulación de ADN

Las extracciones de ADN, cortes con enzimas de restricción, electroforesis de ADN, PCR, preparación de células competentes con cloruro de calcio, transformación de células de *E. coli* y demás técnicas moleculares se realizaron según se describe en Sambrook *et. al.*, (1989) y 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
<b>Up-pp0217</b>	<b>CGGAATTC</b> ATGTGGTATAACGGCCTGCTCGACC, localizado al inicio del gen de <i>desA</i> ( <i>pp0217</i> ). Sitio de restricción adicionado para <i>EcoRI</i> .
<b>Dn-pp0217</b>	CCG <b>CTCGAG</b> TCAGGCGCCGGTCCGGCGCAGCGAG, localizado al final del gen <i>desA</i> ( <i>pp0217</i> ). Sitio de restricción adicionado para <i>XhoI</i> .
<b>Up2-pp0217</b>	<b>CGGAATTC</b> AAGGGATCGTCAGTCATGCT, localizado a 259 pb corriente arriba de <i>desA</i> ( <i>pp0217</i> ). Sitio de restricción adicionado para <i>EcoRI</i> .
<b>Dn2-pp0217</b>	CCG <b>CTCGAG</b> GCAGGCGATATTCCGGATTC, localizado a 87 pb corriente abajo de <i>desA</i> ( <i>pp0217</i> ). Sitio de restricción adicionado para <i>XhoI</i> .
<b>Up3-pp0217</b>	<b>CGGAATTC</b> GCATTATAAAGGCTGAAACATGTCGTGACCT, localizado a 113 pb corriente arriba de <i>desA</i> ( <i>pp0217</i> ). Sitio de restricción adicionado para <i>EcoRI</i> .
<b>Dn3-pp0217</b>	CCG <b>CTCGAG</b> GGGTGCCGGGAAAATCGTTGGAATGTTCT, localizado a 170 pb corriente abajo de <i>desA</i> ( <i>pp0217</i> ). Sitio de restricción adicionado para <i>XhoI</i> .

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

Los oligonucleótidos o primers se diseñaron a partir del banco de datos de la secuencia completa de *P. putida* KT2440 ([www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com)), utilizando el programa Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). 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 Macrogen (Corea).

### 3.7.- Análisis bioinformático

Para el análisis bioinformático de la secuencia de interés, se llevaron a cabo alineamientos utilizando las herramientas presentes en los programas Clustal W (<http://www.genome.jp/>), Clustal X y del servidor *on line* BLASTP ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)) del National Center for Biotechnology Information (NCBI). La distribución de los aminoácidos hidrofóbicos se analizó utilizando el servidor Prot-Scale con un tamaño de ventana de 19 aminoácidos (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protscale/protscale.pl?1>). El servidor TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) se utilizó para predecir las regiones transmembrana.



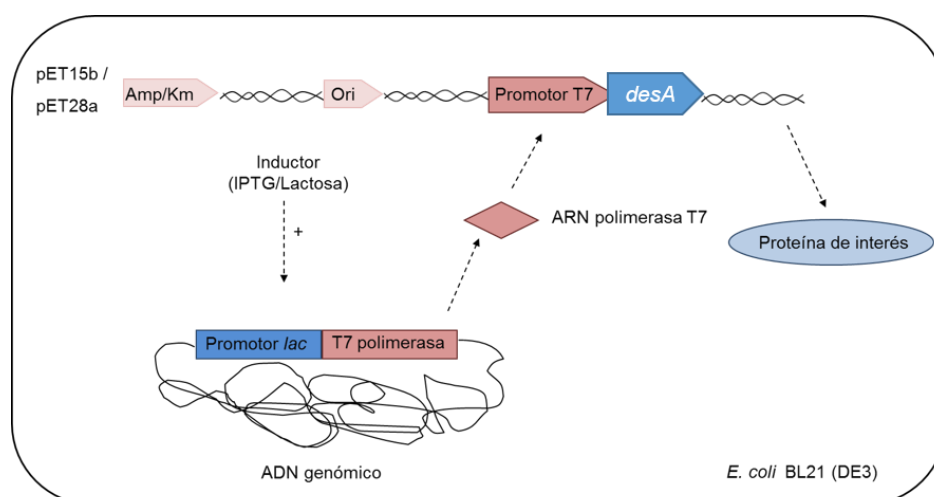
### 3.8.- Búsqueda, amplificación, clonado y secuenciamiento del gen *P. putida A* (ATCC12633) homólogo a *desA*.

Basados en la secuencia de nucleótidos de *desA* (PAO286), una  $\Delta^9$ desaturasa descrita en *P. aeruginosa* PAO1 (Zhu *et al.*, 2006), se examinó el genoma completo de *P. putida* KT2440, cepa de referencia secuenciada (Nelson *et al.*, 2002, Belda *et al.*, 2016) en busca de genes homólogos a esta enzima. Se encontró que en *P. putida* KT2440, el gen *pp0217* es el principal responsable de codificar para una enzima desaturasa, que contiene 394 aminoácidos, con un 84% de identidad con la DesA de *P. aeruginosa* PAO1.

Utilizando ADN genómico de *P. putida A* (ATCC 12633) y a partir de los oligonucleótidos diseñados (**Tabla 2**), se amplificó por PCR el fragmento de aproximadamente 1,2 Kb que contiene el gen homólogo al *orfpp0217*. El producto de PCR fue ligado al vector de clonado pGem<sup>®</sup>TEasy (**Tabla 1**). El nuevo plásmido conteniendo el gen de interés fue denominado pRH04. Células competentes de *E. Coli* DH5 $\alpha$  (**Tabla 1**) fueron transformadas con la mezcla de ligación, generando la cepa RH04. La selección de células portadoras del plásmido de interés se llevó a cabo utilizando placas de LB conteniendo Amp 200  $\mu$ g/ml, 7  $\mu$ l de solución stock (20 %) de isopropilo- $\beta$ -D tiogalactosido (IPTG) y 40  $\mu$ l de X-Gal. Se seleccionaron las colonias blancas, las que fueron sometidas a extracción de plásmidos y posterior mapeo por restricción. Los plásmidos obtenidos conteniendo el gen de interés se enviaron a Macrogen (Corea) para el correspondiente secuenciamiento.

### 3.9.- Expresión de *desA* de *P. putida A* (ATCC 12633) en el huésped heterólogo *E. coli* BL21 (DE3).

La expresión del gen *desA* de *P. putida A* (ATCC12633) se llevó a cabo en el huésped heterólogo carente de actividad DesA, *E. coli* BL21(DE3) (**Tabla 1**). Para ello y a partir del par de oligonucleótidos Up-pp0217/Dn-pp0217 (**Tabla 2**) se amplificó el gen de *P. putida A* (ATCC 12633) homólogo al *orfpp0217* clonado en pRH04 (**Tabla 1**). El fragmento obtenido, de aproximadamente 1,2 Kb, fue subclonado en el vector de expresión pET28a (**Tabla 1**), obteniendo el plásmido pRH05 (**Tabla 1**). De esta manera la expresión del gen *desA* queda bajo la expresión de promotor T7. Posteriormente, células competentes de *E. coli*/BL21 (DE3) (**Tabla 1**) fueron transformadas con pRH05 ó con pET28a carente del fragmento de interés originando las cepas *E. coli*/RH05y*E. coli*/BL21/pET28a (**Tabla 1**), respectivamente. La **Figura 11** esquematiza el sistema de expresión utilizado:



**Figura 11:** Esquema del sistema de expresión utilizado pET28a-*E. coli* BL21 (DE3).

Para los ensayos de expresión, células de *E. coli* RH05 y *E. coli* BL21/pET28a (**Tabla 1**), se hicieron crecer en LB líquido suplementado con Km 50 µg/ml, se incubaron a 37°C en agitación durante 12 hs. Luego de este tiempo, las células fueron nuevamente inoculadas en 10 ml de medio LB con Km 50 µg/ml y se hicieron crecer en idénticas condiciones hasta alcanzar una  $DO_{660}$  de 0,4-0,6. En ese momento se les adicionó IPTG (0,2-0,4 mM) o lactosa (1%). Los cultivos se mantuvieron en agitación (60 rpm) a temperatura ambiente durante 4 y 19 horas. Pasado este tiempo, las células se cosecharon y el precipitado obtenido fue sometido a extracción de proteínas. Para ello, el pellet fue resuspendido en 100 µl de SDS al 1% y se lo llevó a ebullición por 5 min. Posteriormente, se realizaron 5 ciclos de sonicación (Vibracell Sonics & Materials) a 60 amperes, 5 pulsos por segundo durante 1 min. El producto de sonicación fue clarificado por centrifugación durante 5 minutos a 10.000 rpm y el sobrenadante obtenido fue centrifugado a 14.000 rpm durante 60 minutos. El precipitado final obtenido, que contiene la fracción de membrana, fue suspendido en 100 µl de SDS al 1%, y se sometió, al igual que el sobrenadante, a electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) en gel de poliacrilamida al 12% (**Apartado 3.12**).

### 3.10- Determinación de la actividad DesA

La actividad DesA fue determinada utilizando como fuente enzimática células de *E. coli* RH05 y *E. coli* BL21/pET28a (**Tabla 1**) expresando el gen de interés. La inducción del gen *des A* se llevó a cabo con 1% de lactosa durante 19 hs.

La actividad enzimática fue evaluada *in vivo* analizando **a)** la composición de AG por cromatografía gaseosa y **b)** evaluando la capacidad de desaturar aeróbicamente sustratos marcados radioactivamente, según se describe a continuación:

**a)** Posterior a la inducción del gen *desA*, células de *E. coli* RH05 y de *E. coli* BL21/pET28a (**Tabla 1**) se expusieron o no durante 15 min a TDTMA y otros detergentes (**Apartado 3.5**). El perfil de AG fue evaluado de acuerdo a lo descrito en **Apartado 3.4.2- a**

**b)** Para determinar la desaturación exógena de 16:0-[1-<sup>14</sup>C], células de *E. coli* RH05 y de *E. coli* BL21/pET28 se hicieron crecer en LB en presencia de 1μCi de ácido palmítico -[1-<sup>14</sup>C]. Cuando los cultivos alcanzaron una DO=0,4-0,6 se llevó a cabo la inducción del gen de acuerdo a lo descrito previamente. Post-inducción, las células fueron expuestas o no a 50 mg/l de TDTMA (**Apartado 3.5**) y los FAMES marcados radioactivamente fueron analizados (**Apartado 3.4.2-b**). La detección de AGI marcados radiactivamente fueron indicativos de actividad desaturasa.

### 3.11- Determinación de proteínas

La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando albúmina sérica bovina como estándar.

### 3.12.- Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Las muestras de proteínas obtenidas de la sobreexpresión de DesA de *P. putida* A (ATCC 12633) en *E. coli*/RH05 (**Apartado 3.9**), fueron analizadas por electroforesis desnaturante (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 muestras 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 μl de buffer por cada 30 μl de muestra.

**Tabla 3:** Composición de geles de poliacrilamida desnaturalizantes 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 $\mu$ l	5 $\mu$ l
APS 14 %	50 $\mu$ l	80 $\mu$ l
SDS 10 %	50 $\mu$ l	80 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	3ml	2,6ml
Vol. Final	5ml	3ml

#### - Tinción de proteínas en geles

Al finalizar la corrida electroforética, los geles fueron sumergidos en solución de tñido preparada con Coomassie Brilliant Blue R250 durante toda la noche. Posteriormente, los geles se destñeron mediante sucesivas inmersiones en solución de desteñido (metanol:acético:H<sub>2</sub>O, 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	
CoomassieBrilliant Blue R250	1,25 gr
Metanol	250 ml
H <sub>2</sub> O	200 ml
Ácido Acético concentrado	50 ml
Solución de Desteñido	
Metanol	400 ml
Ácido acético concentrado	100 ml
H <sub>2</sub> O	500 ml

Para la preparación de la solución de tinte Coomassie Blue, el colorante se disolvió en metanol y se agitó vigorosamente, luego se adicionó el ácido acético concentrado, se mezcló bien, se agregó agua y finalmente se filtró la solución con papel de filtro Wattman nº54.

### 3.13.- Determinación de la fluidez de membrana

La fluidez de membrana fue determinada en presencia o ausencia de TDTMA utilizando la sonda 1,6-difenil-1, 3,5 - hexatrieno. Para ello, las diferentes cepas de *P. putida* o *E. coli* se hicieron crecer hasta DO correspondiente en las condiciones de crecimiento detalladas en el **Apartado 3.5**. Posteriormente, las células fueron cosechadas, lavadas en buffer Tris-HCl (15 mM, pH 7.0) y resuspendidas en el mismo buffer hasta  $DO_{660nm} = 0,2$ . A 3 ml de esta suspensión celular se les adicionó 1  $\mu$ l de la sonda fluorescente (solución stock de DPH: 12 mM en tetrahidrofurano) para obtener una concentración final de la sonda de 4  $\mu$ M. Los cultivos fueron incubados en oscuridad a temperatura ambiente y en agitación (200 rpm) durante 10 min para lograr la completa incorporación del DPH dentro de la membrana citoplasmática. Luego de ese tiempo, se determinó el grado de polarización (tiempo 0) y posteriormente se adicionó o no 50 mg/l de TDTMA. Se tomaron alícuotas a diferentes tiempos (1-60 min) ya las que se les determinó el grado de polarización en espectrofluorómetro.

Cuando fue necesario, la sonda se utilizó para determinar la polarización de fluorescencia de las vesículas (MVs) liberadas por células de *P. putida* A (ATCC 12633). Para ello, a las MVs purificadas (**Apartado 3.14.2**) se les adicionó DPH 4  $\mu$ M y se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente y en agitación. Luego de ese tiempo se determinó la polarización de fluorescencia.

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).

### 3.14- Análisis de vesículas de membrana externa de *P. putida* A (ATCC12633)

#### 3.14.1-Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Células de *P. putida* A (ATCC 12633) crecidas en HPi-BSM con glucosa y  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ó con TDTMA como fuentes de C y N (**Apartado 3.5**) fueron examinadas por TEM. Para ello, las células fueron fijadas con solución de glutaraldehído 2,5 %, lavadas con solución buffer S-colidina 0,2 M, 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 hs. 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).

Las MVs aisladas a partir de los cultivos (**Apartado 3.14.2**) fueron resuspendidas en 10 mM de  $\text{MgCl}_2$  y teñidas negativamente con solución de ácido fosfotúngstico 2 % (pH 7,3) (Deatherage *et al.*, 2009).

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

#### 3.14.2- Aislamiento de vesículas

La obtención de vesículas (MVs) se realizó según lo descrito por Grenier y Mayrand (1987), con algunas modificaciones realizadas en el laboratorio. Brevemente, 500 ml de un cultivo de células de *P. putida* A (ATCC 12633) crecidas en HPi-BSM con TDTMA como única fuente de C y N ( $\text{DO}_{660} = 0,4$ ) fue centrifugado (20.000 rpm, 15 min) y el sobrenadante obtenido fue tratado con  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  (40% de saturación). Luego de agitar durante 2 h a 4°C, la suspensión fue centrifugada a 4000 rpm durante 40 min, y el pellet obtenido fue resuspendido en 2 ml de buffer HCl-Tris 50 mM (pH 9,5) con ditiotreitol (DTT) 0,5 mM. Luego, la suspensión fue dializada contra el mismo buffer y las MVs fueron recuperadas mediante centrifugación a 20000 rpm por 40 min a 4°C, lavadas con 10 ml de buffer HCl-Tris 50 mM (pH 7,2) conteniendo DTT 0,5 mM. Finalmente, las vesículas fueron resuspendidas en 1,5 ml de buffer HCl-Tris 50 mM (pH 7,2) y almacenadas a -20°C hasta su utilización. Los PL y los FAME de las MVs fueron obtenidos e identificados de acuerdo a lo descrito en **Apartado 3.4**.

### 3.14.3-Determinación del contenido de TDTMA en las MVs.

El contenido de TDTMA en las MVs se determinó por método colorimétrico según describen Tezel *et al.* (2006), con ligeras modificaciones realizadas en el laboratorio. En un tubo que contiene 2,5 ml de buffer acetato 1,4 M pH 5,3 se adicionaron 1 ml de fracción soluble conteniendo MVs obtenidas como se detalló en **Apartado 3.14.2** y 1 ml de colorante Patent Blue Violet 1 mM. Se agitó en vortex y se agregaron 5 ml de cloruro de metileno. Los tubos se dejaron en agitación durante 24 hs con el fin de lograr la completa transferencia del par iónico QAC-colorante a la fase de disolvente. Pasado este tiempo, se extrajo 1 ml de la fase inferior y la intensidad del color se midió espectrofotométricamente a 620 nm. La concentración del detergente se obtuvo por extrapolación utilizando una curva de calibración previamente realizada.

### 3.14.4-Obtención del complejo lipoproteína-peptidoglicano

Células de *P. putida*A (ATCC 12633) crecidas en HPi-BSM con glucosa y NH<sub>4</sub>Cl o con TDTMA como única fuente de C y N (**Apartado 3.5**), fueron cosechadas, lavadas y resuspendidas en HPi-BSM. Las células fueron sonicadas a 20000 Hz usando un procesador de ultrasonidos Vibra Cell (10 ciclos, 10 s por ciclo) y, luego de centrifugar a 20000 rpm durante 10 min a 4°C, se recolectó la fracción soluble conteniendo la pared celular. La suspensión obtenida fue tratada con SDS 4%, calentada a 100°C durante 2 hs y luego mantenida a temperatura ambiente durante 12 hs. Luego de centrifugar a 25000 rpm a 4 °C por 20 min, la suspensión fue lavada con agua destilada al menos 3 veces y el complejo lipoproteína-peptidoglicano obtenido fue resuspendido en buffer HCl-Tris 25 mM (pH 8,0) (100 µl de buffer cada 100 ml de cultivo).

Para lograr solubilizar las lipoproteínas, el complejo lipoproteína-peptidoglicano fue digerido con lisozima 5 mM durante 3 hs y el producto obtenido se sometió a electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida al 15% (SDS-PAGE). Las bandas proteicas correspondientes se visualizaron mediante tinción con Coomassie Blue R-250. Las bandas de interés fueron escindidas del gel y enviadas a su análisis por MALDI-TOF.

### 3.14.5- Extracción de Lipopolisacárido (LPS)

La extracción de LPS se llevó a cabo según lo descrito por Westphal y Jann (1965). Brevemente, 100 ml de una suspensión de vesículas fueron mezclados con 3 ml de fenol: H<sub>2</sub>O (45:55, v/v). La mezcla se incubó a 68 °C en agitador orbital a 160 rpm durante 15 minutos y luego fue centrifugada a 20000 rpm. Se recogió la fase acuosa y se realizó una segunda extracción mediante la adición de 3 ml de agua. La mezcla fue centrifugada nuevamente. Las fases acuosas obtenidas fueron dializadas frente a agua

destilada para eliminar completamente el fenol. El LPS dializado se incubó durante 12 hs a 37 °C en medio Tris /HCl (pH 7) 50 mmol/l / MgSO<sub>4</sub> 10 mmol/l en presencia de RNasa (15 mg/ml), DNasa (15 mg/ml) y proteinasa K (15 mg/ml). Las muestras fueron secadas en rotavapor. El producto obtenido se sometió a electroforesisdesnaturalizante en gel de poliacrilamida al 14% (SDS-PAGE). El gel se colocó durante 12 hs en una solución fijadora (etanol 40%, ácido acético 5% y azul de Alcian 0,005%) y luego se lavó tres veces con agua deionizada. Finalmente, se realizó una tinción de plata para observar el bandeo del LPS fraccionados con SDS-PAGE (Gromova y Celis, 2006).

### 3.14.6-Efecto de TDTMA sobre células de glóbulos rojos.

Para analizar la inducción de la curvatura de la membrana por TDTMA, se utilizaron glóbulos rojos como células modelos y se analizó la crenación de la membrana.

Se obtuvieron muestras de sangre fresca de conejo, a las cuales se les agregó buffer CPD (26,3 g/l de citrato de trisodiodihidratado, 3,27 g/l de ácido cítrico monohidratado, 2,22 g/l de PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>Na 23,2 g/l de dextrosa) en proporción 1:10. Las células de glóbulos rojos fueron lavadas 3 veces y diluídas 400 veces en PBS (10 mM de Tris, 146 mM de NaCl, pH 7,5) hasta conseguir soluciones de trabajo con un hematocrito~0.1% (Schertzer y Whiteley, 2012). Los glóbulos rojos fueron incubados con TDTMA (5 y 10 g/l) durante 30 min a 4°C y luego fueron analizados utilizando un microscopio Modelo H600L, Nikon, Tokyo, Japon con un objetivo de 40x.

Cuando fue necesario, luego del tratamiento con TDTMA, se añadió 0-5 µM de clorpromazina. A partir de las micrografías obtenidas, se determinó el número total células y de equinocitos mediante recuento manual.

## 3.15- Determinación de poli-hidroxicanoatos (PHAs) en *P. putida* A (ATCC12633)

### 3.15.1- Tinción con Nile Blue A.

La identificación de células que acumulan poliésteres se llevó a cabo mediante tinción con una solución acuosa de Nile Blue al 1%. Para ello, células de *P. putida* A (ATCC 12633) crecidas en HPi-BSM hasta DO<sub>660nm</sub>= 0,4 con TDTMA 50 mg/l como única fuente de C y N (**Apartado 3.5**), fueron centrifugadas a 10000 rpm y lavadas tres veces con solución fisiológica. Posteriormente, las células se fijaron sobre un portaobjetos y se tiñeron con solución de Nile Blue A durante 10 min a 55°C en agitación. Los frotis teñidos fueron lavados con agua destilada y con una solución acuosa de ácido acético al 8% para remover el exceso de colorante. La preparación fue examinada usando un microscopio H600L (Nikon, Tokyo, Japón) equipado con una cámara DS-Qi1Mc (Nikon, Tokyo, Japón).



## 4.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### **CAPÍTULO I: Participación de lípidos en la respuesta de *P. putida* A (ATCC 12633) frente al estrés ocasionado por Br-tetradeciltrimetilamonio (TDTMA).**

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio demostraron que *P. putida* A (ATCC 12633) es capaz de tolerar y 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, a nivel de lípidos, 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 detectó un perfil de PL cualitativamente similar al que se detecta cuando *P. putida* no se expone al detergente, pero los PL individuales se modifican identificándose, como cambios más significativos, en células crecidas con TDTMA, aumentos de PG y PA de 6 y 20 veces, respectivamente (Boeris *et al.*, 2009).

Con el objetivo de dilucidar el mecanismo por el cual *P. putida* A (ATCC 12633) modifica sus componentes lípidicos de membrana en respuesta al estrés generado por el TDTMA, se procedió a estudiar el patrón de AG y monitorear la fluidez de la membrana en células de *P. putida* sometidas o no, a condiciones adversas dadas por la presencia de TDTMA. Se utilizaron, además, cepas mutantes de *P. putida* afectadas en la síntesis de PL aniónicos para determinar si los ácidos grasos u otros componentes lipídicos de membrana son capaces de reemplazar las deficiencias en esos PL en respuesta al detergente.

#### **4.1-Composición de AG de *P. putida* A (ATCC 12633) expuestas o no a TDTMA**

La **Tabla 5**, muestra los resultados obtenidos de la composición de AG de células de *P. putida* A (ATCC 12633) enfrentadas o no durante cortos períodos de tiempo a concentraciones no letales (50 mg/l) del QAC TDTMA.

**Tabla 5.** Composición de AG de *P. putida* A (ATCC 12633) expuestas o no a TDTMA

	Control <sup>(*)</sup>	TDTMA (15 min) <sup>(†)</sup>
% AG		
<b>Saturados</b>		
14:0	1,28±0,55 <sup>a</sup>	1,65±0,23 <sup>a</sup>
15:0	0,07±0,02 <sup>a</sup>	0,52±0,21 <sup>b</sup>
16:0	24,88±1,63 <sup>a</sup>	32,66±0,99 <sup>b</sup>
17:0	2,63±0,87 <sup>a</sup>	0,84±0,12 <sup>b</sup>
18:0	62,92±8,33 <sup>a</sup>	62,84±2,08 <sup>a</sup>
Total	88,77±5,02 <sup>a</sup>	97,99±0,87 <sup>b</sup>
<b>Insaturados</b>		
16:1Δ9	6,27±0,14 <sup>a</sup>	0,34±0,17 <sup>b</sup>
18:1Δ9	1,99±0,62 <sup>a</sup>	1,96±0,48 <sup>a</sup>
18:1Δ11	5,83±0,4 <sup>a</sup>	0,14±0,04 <sup>b</sup>
Total	11,20±5,04 <sup>a</sup>	1,97±0,87 <sup>b</sup>
<b>AGS/AGI</b>	<b>7,92<sup>a</sup></b>	<b>49,74<sup>b</sup></b>

Los lípidos fueron extraídos y los AG de los lípidos totales fueron convertidos a metilesteres y analizados por GC, como se describe en la sección de Materiales y Métodos, Apartado 3.4.

El porcentaje de cada AG es relativo al total de AG definido como el 100%. Los valores representan la media de tres experimentos independientes (±SD, n=3).

(<sup>a, b, c</sup>) Valores con la misma letra dentro de una columna no son significativamente diferentes ( $P \leq 0,05$ ).

Las células se hicieron crecer en HPI-BSM con glucosa y NH<sub>4</sub>Cl hasta final de fase exponencial. En ese momento fueron expuestas (<sup>†</sup>) o no (<sup>\*</sup>) durante 15 minutos a 50 mg l<sup>-1</sup> de TDTMA. Posteriormente, las células fueron cosechadas y los lípidos fueron extraídos y analizados.

El análisis de **Tabla 5 (columna I)** muestra que células de *P. putida* A (ATCC 12633) crecidas hasta final de fase logarítmica en condiciones no estresantes de cultivo (glucosa y NH<sub>4</sub>Cl) contienen en su membrana un 88,77% de AG saturados (AGS) y un 11,20% de AG monoinsaturados (AGI). De los AGS identificados, el mayoritario fue el ácido esteárico (18:0), el cual representa el 62,92% del total de AGS, seguido por el ácido palmítico (16:0) que representa el 24,88%. Con respecto a la composición de AGI, los mayoritarios fueron ácido palmitoleico (16:1Δ9) y ácido vaccénico (18:1Δ11), los cuales representaron el 6,27% y 5,83% del total de AGI, respectivamente. Cabe destacar que en todas las condiciones ensayadas (ausencia o presencia de detergente) los AGI identificados se encontraron en configuración *cis*.

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* KT2440, *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*

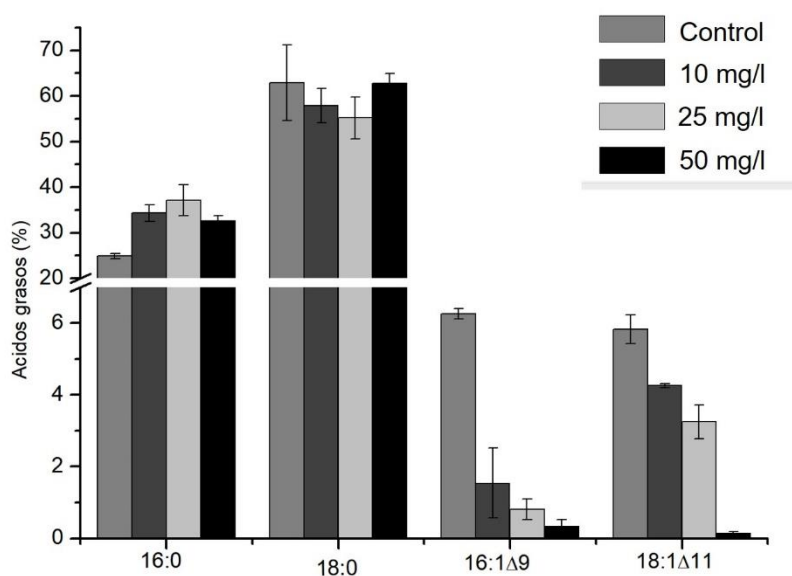
contienen mayor proporción de AGI que los detectados en *P. putida* A (ATCC 12633), como así también la presencia de AG ciclopropano y otros AG hidroxilados (Härtig, *et al.*, 2005, Pini, *et al.*, 2009), los cuales no fueron detectados en *P. putida* A (ATCC 12633).

El estudio de las alteraciones que se producen en los distintos componentes de la membrana en respuesta a diferentes tipos de estrés ambiental es fundamental para comprender la fisiología bacteriana. Entre los mecanismos de adaptación bacteriana estudiados se incluyen modificaciones en la composición de los AG constituyentes de los PL de membrana. En respuesta a sustancias tóxicas, las bacterias pueden responder con: i) cambios en el grado de saturación global de los ácidos grasos y/o modificación de la longitud de las cadenas acilo, ii) formación de ácidos grasos ciclopropanos, iii) isomerización de *cis* a *trans* de los ácidos grasos insaturados y iv) modificación de los grupos de cabeza polar de los fosfolípidos (Denich *et al.*, 2003, Mykytczuk *et al.*, 2007, Markowicz *et al.*, 2010).

Los cambios en la composición de AG provocados por la exposición de *P. putida* A (ATCC 12633) a 50 mg/l de TDTMA durante 15 min se muestran en **Tabla 5, columna II**. En relación a lo detectado en ausencia del detergente (control) (**Tabla 5, columna I**), en presencia de TDTMA se observó una disminución del 83% en el contenido de AGI (de 11,20% a 1,97%). Este cambio estuvo dado, principalmente, por la disminución del contenido del AGI 16:1 $\Delta$ 9 (de 6,27% a 0,34%) y del AGI 18:1 $\Delta$ 11, el cual disminuyó su contenido de 5,83% en ausencia a 0,14%, en presencia del detergente. En adición a estos cambios, en presencia del detergente, se detectó un aumento del 10% en el contenido de AGS, principalmente por cambios a nivel de los AGS 15:0 y 16:0 (**Tabla 5**).

Los cambios detectados en el contenido de los AG identificados para cada condición nutricional se reflejan notoriamente cuando se expresan como la relación AGS/AGI. Como se muestra en **Tabla 5**, en células de *P. putida* A (ATCC 12633) expuestas a TDTMA, la relación AGS/AGI incrementó 6,3 veces respecto a los valores obtenidos en ausencia del detergente, mayormente debido al bajo contenido de AGI detectado en la condición de estrés. Cabe destacar que, bajo las condiciones evaluadas, no se detectaron cambios a nivel de la isomerización *cis* a *trans*, mecanismo que ha sido involucrado en la rigidización de membranas en microorganismos expuestos a diferentes tipos de estrés (Heipieper *et al.*, 2003; Bernal *et al.*, 2009).

Para determinar si los cambios sobre la composición de AG de los PL de membrana dependen o no de la concentración del TDTMA a la que las células son enfrentadas, células de *P. putida* A (ATCC 12633) se hicieron crecer en medio salino con las fuentes preferenciales de C y N hasta final de fase logarítmica y luego se enfrentaron o no a concentraciones crecientes del detergente (10, 25 y 50 mg/ L).



**Figura 11: Cambios en la composición de AG de células de *P. putida* A (ATCC 12633) expuestas a diferentes concentraciones de TDTMA.** Las células se hicieron crecer en HPI-BSM con glucosa y  $\text{NH}_4\text{Cl}$  hasta final de fase exponencial. En ese momento fueron expuestas o no, durante 15 min a 10, 25 y 50 mg/l de TDTMA. Posteriormente, las células fueron cosechadas y los lípidos extraídos. Los AG de los lípidos totales fueron convertidos a metilesteres analizados por GC. El porcentaje de cada AG es relativo al total de AG definido como el 100%. Los valores representan la media de tres experimentos independientes ( $\pm$ DS, n=3)

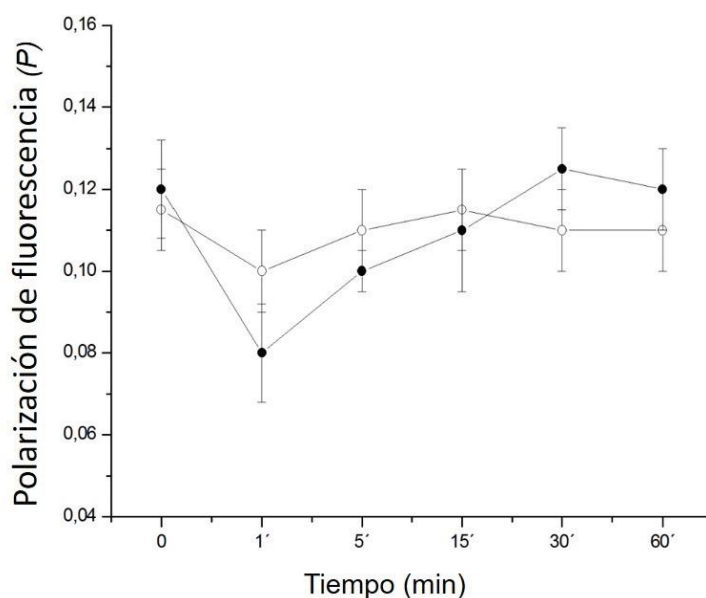
Como se desprende del análisis de la **Figura 11**, para todas las concentraciones de TDTMA utilizadas, los cambios a nivel de AG involucran, principalmente, disminución en el contenido de los AGI 16:1Δ9 y 18:1Δ11 e incremento en el contenido del AGS 16:0. La relación AGS/AGI, mostró incrementos según aumenta la concentración de TDTMA. Así, para una concentración de 10 y 25 mg/l, la relación AGS/AGI fue de 12,46 y 17,21, respectivamente, y para 50 mg/l fue de 49,74. En su conjunto, los resultados obtenidos muestran que la disminución en el contenido de AGI en las membranas, lo que indicaría a su vez una mayor rigidez de la misma, constituye un mecanismo de adaptación de las células de *P. putida* A (ATCC 12633) frente a la exposición a diferentes concentraciones del detergente catiónico. También puede plantearse que existiría un mayor compromiso, a nivel de lípidos de membrana, en la respuesta bacteriana cuando células de *P. putida* son expuestas a concentraciones mayores de detergente. En relación a ello, datos bibliográficos describen que células de *P. aeruginosa* (ATCC 15442) expuestas a concentraciones crecientes de Cl-bencildimetiltetradecilamonio muestran disminución de 6-9 veces en el contenido del AG 16:1Δ9, e incrementos en los niveles de ácido laurico (14:0) y de AG hidroxilados. Estas modificaciones en AG se mantienen y han sido relacionadas con la resistencia adquirida por *P. aeruginosa* ATCC 15442 durante el crecimiento en concentraciones crecientes del detergente. (Guérin-Méchin *et al.*, 1999).

Sin embargo, no es posible generalizar la respuesta ya que, estos mismos autores, no observaron la misma relación cuando esta cepa fue expuesta a otro detergente, al Br-dodecildimetilamonio (Mechin *et al.*, 1999). En otras bacterias, tales como células de *Listeria monocytogenes* expuestas al QAC CI-benzalconio, el mecanismo de adaptación involucra principalmente un notorio incremento en el contenido total de AGS (C16:0 y C18:0), una mayor proporción de AG con cadena acilo de mayor longitud, además de aumento de PL aniónicos (Bisbiroulas *et al.*, 2010). Cambios a nivel de componentes de membrana que involucran aumento en el contenido de los AGS constituyentes de PL, han sido descritos en células de *P. putida* S12 crecidas en presencia de compuestos aromáticos (Heipieper *et al.* 1994) y cuando células de *P. putida* y *P. stutzeri* se hacen crecer en presencia de naftaleno (Mrozika *et al.*, 2005). Ante otras situaciones de estrés, como la presencia de concentraciones variantes de tolueno y manteniendo constante la concentración de arsénico en el medio, células de *Pseudomonas sp.* ORAs5 responden aumentando el grado de saturación de AG y la relación *trans/cis* de AGI (Pepi *et al.*, 2008).

El grado de saturación de los AG que esterifican los PL de membrana es un parámetro muy utilizado para definir la fluidez de la membrana. En diversas publicaciones, el aumento en el grado de saturación de los AG constituyentes de PL ha sido relacionado con la disminución de la fluidez de membrana (Sinensky, 1974, Russell, 1984; Najjar *et al.*, 2007, Mykytczuk *et al.*, 2007). Esta disminución en la fluidez ha sido atribuida, en parte, a que las cadenas acilos lineales pueden empaquetarse herméticamente lado a lado optimizando así las interacciones de Van der Waals e impartiendo un orden lipídico a la membrana bacteriana (Hazel y Williams, 1990).

Para estudiar los cambios en la fluidez de la membrana plasmática ante diferentes condiciones ambientales pueden utilizarse sondas fluorescentes, tal como 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) (Mykytczuk *et al.*, 2007; Loffhagen *et al.*, 2004; Bernal *et al.*, 2007, 2009). Las sondas fluorescentes se insertan en el núcleo hidrofóbico de la membrana orientándose en paralelo a las cadenas laterales de AG sin variar la estructura de la bicapa (Adler y Tritton, 1988; Sklar, 1984; Trevors, 2003). Estas sondas tienen la capacidad de emitir luz polarizada y la relación entre el grado de polarización de la sonda y la fluidez de la membrana citoplasmática es inversa. El movimiento de la sonda dentro de la bicapa está sujeto a la restricción de rotación impartida por el orden de los lípidos. Así, en una membrana en estado líquido- cristalino (fluída) donde las interacciones de las cadenas de acilo se ven disminuídas, se facilita la libre rotación de la sonda emitiendo la luz absorbida en todas las direcciones, lo que resulta en un menor grado de polarización (Trevors, 2003).

El efecto que el TDTMA ejerce sobre la fluidez de la membrana citoplasmática se evaluó determinando, en células de *P. putida* A (ATCC 12633), la polarización de fluorescencia ( $P$ ) utilizando la sonda DPH (**Apartado 3.13**). Siguiendo esta metodología, disminuciones en el valor de  $P$  son indicativas de un estado de mayor fluidez de membrana. Como se desprende del análisis de la **Figura 12**, inmediatamente luego de la adición de TDTMA (1 min de exposición), los valores de  $P$  disminuyeron de  $0,13 \pm 0,03$  en ausencia de detergente a  $0,08 \pm 0,02$  en su presencia, indicando que el TDTMA tiene un efecto fluidificante sobre la bicapa lipídica. Sin embargo, como puede observarse en la **Figura 12**, luego de 15 min de exposición al TDTMA, el valor  $P$  retorna a valores similares a los detectados en ausencia del detergente ( $P= 0,13 \pm 0,01$ ), lo que sugiere la restauración en la fluidez de la membrana.



**Figura 12. Polarización de fluorescencia de DPH en células de *P. putida* A (ATCC 12633) expuestas o no a TDTMA.** Las células se hicieron crecer en medio LB hasta final de fase exponencial donde fueron cosechadas, lavadas y resuspendidas en buffer Tris-CIH ( $OD_{660\text{ nm}} = 0,2$ ). La sonda fluorescente fue añadida al cultivo resuspendido e incubada para lograr la completa incorporación dentro de la membrana citoplasmática. Luego, las células fueron incubadas en ausencia (○) o presencia (●) de TDTMA (50 mg/l de TDTMA). Alícuotas fueron recolectadas a diferentes tiempos (1, 5, 15, 20, 30 y 60 min) y el grado de polarización fue determinado. Los valores representan la media de tres experimentos independientes ( $\pm$ DS,  $n=3$ ).

Los resultados obtenidos muestran que el TDTMA ejerce un efecto fluidificante sobre la membrana celular, reflejado por una inmediata disminución de  $P$  luego del contacto con el detergente y que *P. putida* A (ATCC 12633) es capaz de contrarrestar este efecto, aumentando la rigidez de la membrana, debido a la disminución del contenido de sus AGI (**Tabla 5**), lo que se refleja además en valores de  $P$  similares a los detectados en el control sin tratar.

De lo anterior, se concluye que los cambios a nivel de AGI contribuirían al mecanismo adaptativo que le permite a *P. putida* A (ATCC 12633) tolerar la presencia de

TDTMA. La disminución en el contenido de AGI no solo compensaría el efecto fluidificante producido por el detergente, 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).

#### 4.2-Cambios en la composición de AG en *P. putida* A (ATCC 12633) durante la degradación de TDTMA.

La **Tabla 6**, muestra los resultados obtenidos de la composición de AG de células de *P. putida* A (ATCC 12633) crecidas con TDTMA como única fuente de carbono, nitrógeno y energía. A fines comparativos, se muestra el perfil de AG obtenido en condiciones no estresantes de crecimiento (glucosa/NH<sub>4</sub>Cl).

**Tabla 6.** Composición de AG de *P. putida* A (ATCC 12633) crecida o no con TDTMA.

	Control <sup>(*)</sup>	Crecida con TDTMA <sup>(#)</sup>
	<b>(%) AG</b>	
<b>Saturados</b>		
14:0	1,28±0,55 <sup>a</sup>	1,98±0,28 <sup>a</sup>
15:0	0,07±0,02 <sup>a</sup>	0,15±0,01 <sup>c</sup>
16:0	24,88±1,63 <sup>a</sup>	31,69±3,09 <sup>b</sup>
17:0	2,63±0,87 <sup>a</sup>	1,08±0,43 <sup>b</sup>
18:0	62,92±8,33 <sup>a</sup>	60,35±8,32 <sup>a</sup>
Total	88,77±5,02 <sup>a</sup>	91,78±7,87 <sup>a,b</sup>
<b>Insaturados</b>		
16:1Δ9	6,27±0,14 <sup>a</sup>	5,55±1,03 <sup>a</sup>
18:1Δ9	1,99±0,62 <sup>a</sup>	2,9±1,04 <sup>a</sup>
18:1Δ11	5,83±0,40 <sup>a</sup>	2,89±0,46 <sup>c</sup>
Total	11,20±5,04 <sup>a</sup>	8,22±1,20 <sup>c</sup>
<b>AGS/AGI</b>	<b>7,92<sup>a</sup></b>	<b>11,16<sup>c</sup></b>

Los lípidos fueron extraídos y los AG de los lípidos totales fueron convertidos a metilesteres y analizados por GC, como se describe en la sección de Materiales y Métodos, Apartado 3.4. El porcentaje de cada AG es relativo al total de AG definido como el 100%. Los valores representan la media de tres experimentos independientes ( $\pm$  DS, n=3). (<sup>a</sup>, <sup>b</sup>, <sup>c</sup>) Valores con la misma letra dentro de una columna no son significativamente diferentes ( $P \leq 0,05$ ). Las células se hicieron crecer en HPI-BSM con glucosa y NH<sub>4</sub>Cl <sup>(\*)</sup> o con 50 mg l<sup>-1</sup> de TDTMA <sup>(#)</sup> como única fuente de carbono y nitrógeno hasta final de fase exponencial. Posteriormente, las células fueron cosechadas y los lípidos fueron extraídos y analizados.

Si bien se detectaron e identificaron las mismas especies de AGS y AGI en ambas condiciones nutricionales, en células crecidas con TDTMA el contenido de AGS

representó el 91,78% del total de AG, un valor levemente mayor que lo detectado en células crecidas con fuentes preferenciales de C y N (88,77%) (**Tabla 6, columna II y I**, respectivamente). Los cambios más notables en AGS de células crecidas con TDTMA, respecto a células crecidas con fuentes preferenciales de C y N, fueron el aumento del contenido de 15:0 y 16:0 (50% y 20%, respectivamente).

En células crecidas en presencia de TDTMA se observó, además, respecto a células crecidas en condiciones no estresantes, una disminución del 27% en el contenido de AGI, siendo el cambio más notorio la disminución del contenido del AG 18:1Δ11, que pasó de representar el 5,83% en la condición control al 2,89% en presencia de TDTMA (**Tabla 6**). Como consecuencia de estas modificaciones, en células de *P. putida* A (ATCC 12633) crecidas con TDTMA la relación AGS/AGI incrementó el 30% respecto a los valores obtenidos para células crecidas en su ausencia. La respuesta obtenida es similar a la que se detectó cuando las células fueron enfrentadas al detergente durante 15 min, si bien en este último caso los niveles de AGI disminuyeron notoriamente lo que se reflejó en un mayor incremento de la relación AGS/AGI (**Tabla 5**).

Los valores de polarización de fluorescencia de membrana obtenidos para células crecidas en con glucosa/NH<sub>4</sub> o con TDTMA no mostraron diferencias significativas ( $P= 0,14 \pm 0,01$  y  $P= 0,13 \pm 0,03$ , respectivamente), valores que claramente ponen de manifiesto que el efecto fluidificante del TDTMA (**Figura 12**) fue contrarrestado para que células de *P. putida* puedan crecer en presencia del detergente.

En su conjunto, los resultados obtenidos respecto a las variaciones en el contenido de AG detectados cuando las células bacterianas son crecidas con TDTMA nos permiten plantear que, nuevamente, y como ocurre cuando las células son expuestas al detergente, *P. putida* A (ATCC 12633) modifica los AG constituyentes de los PL de membrana y con ello contribuye a remediar los daños ocasionados por el detergente, de tal manera que la célula sea capaz de tolerar la presencia del mismo.

#### **4.3- Variaciones en los AG constituyentes de fosfolípidos individuales en células de *P. putida* A (ATCC 12633) expuestas o no a TDTMA.**

Como se describió previamente, células de *P. putida* A (ATCC 12633) responden a la presencia de TDTMA incrementando el contenido de PG y PA (120 y 100%, respectivamente) y disminuyendo el contenido de CL (60%) (Boeris, *et al.*, 2007, 2009). Consecuentemente, una de las respuestas utilizadas por el microorganismo para contrarrestar el estrés a detergentes catiónicos es el de generar una membrana cargada negativamente, particularmente dada por el incremento en el contenido de los PL



aniónicos, y así neutralizar la carga positiva de la molécula de detergente (Boeris *et al.* 2007, 2009).

Con el propósito de analizar si existe relación entre los cambios a nivel de PL y sus AG constituyentes cuando las células son expuestas o crecen con TDTMA, se procedió a la extracción y análisis de los AG de los PL mayoritarios de *P. putida* en estas condiciones experimentales. La **Tabla 7**, muestra los resultados obtenidos.

**Tabla 7.** Composición de AG de fosfolípidos individuales de *P. putida* A (ATCC 12633) luego de 15 min de exposición a TDTMA.

Fosfolípidos	PE		PG		CL		PC	
	Control	+ TDTMA	Control	+ TDTMA	Control	+ TDTMA	Control	+ TDTMA
nmol PL por mg prot	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 ± 0,01 (2,32)†	0,13 ± 0,04 (1,76)†	0,11 ± 0,02 (1,59)†
<b>AG (%)</b>								
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
<b>Total AGS</b>	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
<b>Total AGI</b>	13,26 ± 0,36	14,68 ± 0,65	11,24 ± 0,96	10,16 ± 1,05	18,33 ± 1,03	18,32 ± 1,05	21,4 ± 1,20	11,25 ± 1,24

Las células se hicieron crecer en HPI-BSM con glucosa y NH<sub>4</sub>Cl hasta final de fase exponencial. En ese momento fueron expuestas (+ TDTMA) o no (Control) durante 15 minutos a 50 mg/l de TDTMA. Posteriormente, las células fueron cosechadas y los lípidos fueron extraídos y analizados.

Los fosfolípidos fueron resueltos por TLC y los niveles de fósforo inorgánico fueron determinados. † Los números en paréntesis indican el porcentaje del contenido total de fosfolípidos (mol de fósforos). Los AG de los lípidos totales fueron convertidos a metilesteres, separados acorde al grado de insaturación y detectados bajo luz UV. Los spots identificados fueron raspados de las placas y analizados por GC, como se describe en la sección de Materiales y Métodos, Apartado 3.4.

No existen diferencias significativas entre los ácidos grasos de cada fosfolípido expuesto o no a TDTMA ( $P \leq 0,05$ ).

CL, cardiolipina; PG, fosfatidilglicerol, PE, fosfatidiletanolamina, PC, fosfatidilcolina. AGS: ácidos grasos saturados, AGI: ácidos grasos insaturados.

Ha sido descrito que *P. putida* A (ATCC 12633) contiene como PL mayoritarios PE, PG, CL y que PC representa el 1,6% de los PL identificados (Boeris *et al.*, 2007, 2009).

Como puede observarse en **Tabla 7**, para ambas condiciones de cultivo (ausencia o presencia de TDTMA) los AG identificados en cada uno de los PL mayoritarios de *P. putida* fueron los AGS 16:0 y 18:0, y los AGI 16:1 $\Delta$ 9 y 18:1 $\Delta$ 11. También se observa que, de los PL analizados, PG contiene la mayor proporción de AGS (88,77%) mientras que CL y PC, contienen una elevada proporción de AGI (18,33% y 21,44% del total de AGI, respectivamente). Si bien se conoce que cuando las células se exponen o crecen con TDTMA el contenido de PG incrementa el 120% y CL disminuye el 60% (Boeris *et al.*, 2007, 2009), es de destacar que el contenido de AGS y de AGI en PG y en CL no cambió significativamente cuando las células fueron expuestas a TDTMA (**Tabla 7**). Con respecto a células no expuestas, en presencia del detergente, PC contiene aproximadamente un 11% más de AGS y un 48% menos de AGI.

Los resultados que muestran que, en células de *P. putida* A, CL contiene un alto porcentaje de AGI y que este PL disminuye un 60% cuando las células se enfrentan a TDTMA (Boeris *et al.*, 2007) permiten plantear que la disminución observada a nivel de AGI en respuesta a la exposición del detergente (**Tabla 5**) estaría relacionada con la disminución en los niveles de CL. Paralelamente, el incremento en el contenido de PG (120%) puede ser correlacionado con el incremento de AGS detectado en la condición de estrés. De lo que antecede puede concluirse que los cambios en el contenido de CL y PG resultan en una bicapa con un mayor contenido de AGS y menor contenido de AGI, y, por lo tanto, en una estructura de membrana más rígida capaz de contrarrestar el efecto fluidificante del TDTMA. Adicionalmente, teniendo en cuenta que PL tales como PG tienen una alta temperatura de transición (Ramos *et al.*, 2002; Ramos *et al.*, 1997, Brannigan *et al.*, 2004; Bernal *et al.*, 2007), puede plantearse que el incremento de PG contribuye a restaurar la rigidez de membrana necesaria para la sobrevivencia *P. putida* A (ATCC 12633) en presencia de TDTMA. Es de hacer notar que, si bien también se detectaron cambios de nivel de los AG de PC, este PL solo constituye menos del 2% del total de PL identificados en *P. putida* A (ATCC12633) (Boeris *et al.*, 2007) y su contenido no cambia en presencia del QAC, por lo que puede asumirse que la participación de PC en la respuesta bacteriana al detergente no sería tan relevante bajo las condiciones ensayadas.

Cambios en la composición de AG de PL específicos han sido observados en células de *P. putida* Idaho luego de la exposición a solventes (Pinkart y White, 1997). Expuestas a xileno, en estas células se detectó un incremento de AGS principalmente en PG y en menor medida en PA, si bien este PL representa sólo cantidades trazas del total

de PL. En PE se detectaron modificaciones dadas por *cis-trans* isomerización de AG, mientras que en CL no se detectaron cambios significativos en la composición de AG. Diferentes autores indican que el aumento en el contenido de CL en las membranas provocaría un aumento de la fluidez de membrana mientras que otros sugieren lo contrario (Haines y Dencher, 2002). Así, por ejemplo, Bernal *et al.*, 2007, comprobaron que una disminución en el contenido de CL en células de *P. putida* DOT-T1E expuestas a tolueno provoca una disminución de la fluidez de la membrana.

En su conjunto, los resultados obtenidos en este trabajo muestran que tanto la disminución en el contenido de AGI dada, en parte, por la disminución en el contenido de CL, como el incremento en los niveles de PG con su respectivo contenido de AGS, contribuyen a que *P. putida* A (ATCC 12633) tolere el estrés producido por la presencia de TDTMA. Ambas respuestas indican una mutua dependencia y permiten que las células respondan al detergente catiónico.

#### **4.4- Papel de CL en la tolerancia de *P. putida* A (ATCC 12633) frente al estrés producido por TDTMA.**

Con el propósito de analizar en detalle la participación de CL en el mecanismo de adaptación de *P. putida* A (ATCC 12633) a TDTMA, se empleó una cepa mutante afectada en la síntesis de este PL. Dado que en *P. putida* se han descrito la presencia de, al menos, dos *orf* cuyos productos génicos presentan actividad cardiolipina sintasa (*cls*) (López *et al.*, 2016), para estos estudios se utilizó una cepa doble mutante, obtenida en el laboratorio, afectada en los genes *cls* y *cls2*. La cepa mutante, denominada *P. putida* RH02, presenta, cuando crece en medio salino con fuentes preferenciales de C y N, respecto a la cepa salvaje, una fase lag extendida (14 hs) y un notable incremento en el tiempo de generación (cepa salvaje: 4,93 h, *P. putida* RH02: 11,9 h) (López *et al.*, 2016). La cuantificación de PL en condiciones no estresantes de crecimiento mostró que la cepa mutante contiene cantidades muy bajas de CL (1,9% del total de PL) y altas concentraciones de PG (20% del total de PL), mientras que, en la cepa salvaje, en las mismas condiciones de cultivo, el contenido de CL es 11,38% y el de PG 9,60%. 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 (20% del total de PL) y bajo contenido de CL (1,9% del total de PL) (Lopez *et al.*, 2016).

El perfil de AG de células de *P. putida* RH02 crecidas con glucosa y NH<sub>4</sub>Cl hasta final de fase exponencial y expuestas o no a TDTMA se muestra en **Tabla 8**. A fines

comparativos se muestra la composición de AG de la cepa salvaje, *P. putida* A (ATCC 12633) crecida en condiciones no estresantes.

**Tabla 8.** Composición de AG de *P. putida* RH02 expuesta o no a TDTMA.

	<i>P. putida</i> A (ATCC 12633)	<i>P. putida</i> RH02	
	<b>(%) AG</b>		
<b>Saturados</b>	Control(*)	Control(*)	Expuesta a TDTMA (15 min)(†)
14:0	1,28±0,55	2,12±0,45	2,4±0,02
15:0	0,07±0,02	0,13±0,03	0,08±0,01
16:0	24,88±1,63	38,37±2,49	43,82±3,89
17:0	2,63±0,87	2,19±0,12	4,65±0,15
18:0	62,92±8,33	41,84±2,54	44,53±1,31
Total	88,77±5,02	90,14±5,30	83,49±3,06
<b>Insaturados</b>			
16:1Δ9	6,27±0,14	1,64±0,72	4,87±0,85
18:1Δ9	1,99±0,62	1,43±0,05	9,79±1,49
18:1Δ11	5,83±0,42	4,5±1,51	4,73±0,64
Total	11,20±5,04	9,82±5,28	16,45±3,06
<b>AGS/AGI</b>	<b>7,92</b>	<b>9,18</b>	<b>5,07</b>

Células de *P. putida* A (ATCC 12633) y de *P. putida* RH02 se hicieron crecer en HPI-BSM con glucosa y NH<sub>4</sub>Cl hasta final de fase exponencial. En ese momento fueron expuestas (†) o no (\*) durante 15 minutos a 50 mg/l de TDTMA. Posteriormente, las células fueron cosechadas y los lípidos fueron extraídos. Los AG de los lípidos totales fueron convertidos a metilesteres y analizados por GC, como se describe en la sección 3.4 de Materiales y Métodos.

El porcentaje de cada AG es relativo al total de AG definido como el 100%. Los valores representan la media de tres experimentos independientes (± DS, n=3).

Como se desprende del análisis de la **Tabla 8**, células de *P. putida* RH02 presentan, respecto a su cepa parental, cambios en la composición de los AGS, con incremento del 54% en el contenido del AG 16:0 y disminución en el contenido del AG 18:0, el cual decreció de 63% en la cepa salvaje a 41,84 % en la cepa mutante. Sin embargo, a pesar de estos cambios, el contenido total de AGS en *P. putida* RH02 es

similar al detectado en su cepa parental (90,14% y 88,77 %, respectivamente), indicando que la disminución del AG 18:0 estaría compensada por el incremento del AG 16:0 (**Tabla 8, columnas II y I**, respectivamente).

En la cepa mutante el contenido total de AGI disminuyó (12%), representado principalmente por el bajo contenido del AG 16:1 $\Delta$ 9 (que disminuyó su concentración de 6,27% en la cepa salvaje a 1,64% en la cepa mutante) y, en menor medida, por la disminución del contenido del AG 18:1 $\Delta$ 11 (5,83 % en la cepa parental, 4,5 %, en la doble mutante).

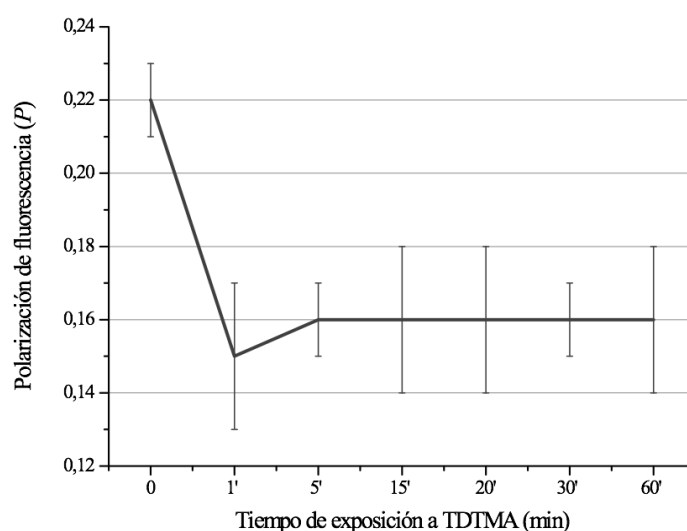
Como se describió previamente, CL es uno de los PL de *P. putida* A (ATCC 12633) que contiene mayor contenido de AGI (**Tabla 7**), por lo que podría asumirse que este PL se comporta como un reservorio de AGI, tal como ha sido descrito en *Streptococcus mutans* (Mac Gilvray *et al.*, 2012). Dado que células de la cepa mutante *P. putida* RH02 contienen en su membrana cantidades muy bajas de CL (1,9%), es de esperar que en esta cepa los niveles de AGI disminuyan considerablemente. Sin embargo, como puede observarse en la **Tabla 8, columna II**, el contenido total de AGI es levemente menor a lo detectado en la cepa parental, lo que indica que en *P. putida* RH02 existe una redistribución de AGI en grupos de cabeza polar diferentes de CL.

Al evaluar el estado físico de la membrana citoplasmática bacteriana mediante ensayos de polarización de fluorescencia se evidenciaron diferencias marcadas en el estado de fluidez de la membrana entre cepa salvaje y mutante. Como se mencionó anteriormente, en condiciones no estresantes de cultivo, en *P. putida* A (ATCC 12633) se detectó un valor  $P = 0,13 \pm 0,03$ , mientras que en la cepa mutante el valor  $P$  alcanzó un valor de  $0,22 \pm 0,03$ , lo que indica una movilidad reducida de los lípidos que se corresponde con una mayor rigidez de membrana. Resultados similares fueron obtenidos en cepas mutantes de *P. putida* DOT-T1E afectadas en el gen *cls*, donde los valores de polarización detectados fueron mayores en la cepa mutante con respecto a la cepa salvaje, indicando una mayor rigidez de membrana (Bernal *et al.*, 2007). Como se mencionó anteriormente, ha sido descrito que una mayor Tt de los PL se correlaciona con disminución de la fluidez de membrana (Heipieper *et al.*, 2003, Mykytczuk *et al.*, 2007). Teniendo en cuenta que el valor de Tt de PG es mayor que la descripta para los otros PL, el alto contenido de PG detectado en la cepa mutante (20 % del total de PL) (López *et al.*, 2016), podría contribuir con la disminución de la fluidez de membrana, lo que se evidencia por el alto valor de  $P$  (0,22).

Cuando células de *P. putida* RH02 fueron expuestas a TDTMA durante 15 min, en relación a células no expuestas, se detectó un incremento del 67% en el contenido total de AGI, debido principalmente a un aumento de 6,8 veces en el contenido del AG 18:1 $\Delta$ 9 y de 3 veces en el AG 16:1 $\Delta$ 9. (**Tabla 8, columna III**). Consecuentemente, en células de

*P. putida* RH02 expuestas a TDTMA, la relación AGS/AGI disminuyó un 36% respecto a los valores obtenidos en ausencia del detergente. Estos resultados difieren de aquellos obtenidos con células salvajes expuestas a TDTMA, donde se observó que el contenido total de AGI disminuye marcadamente (6 veces) (Tabla 5 columna II), conjuntamente con un incremento de 6 veces en la relación AGS/AGI.

El estado físico de la membrana determinado según los ensayos de polarización de fluorescencia de la cepa mutante expuesta a TDTMA se muestran en la **Figura 13**.



**Figura 13: Polarización de fluorescencia de DPH en células de *P. putida* RH02 ( $\Delta$ *cls::aacC1*, *cls2::aph(3')-IIa*) expuestas a o no 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 ( $DO_{660\text{ nm}} = 0,2$ ). La sonda fluorescente fue añadida al cultivo resuspendido e incubada para lograr la completa incorporación dentro de la membrana citoplasmática. Una alícuota fue tomada y la polarización de fluorescencia fue medida como control (ausencia de TDTMA). Luego, 50 mg/l de TDTMA fue agregado y alícuotas fueron recolectadas a diferentes tiempos (1, 5, 15, 20, 30 y 60 min) y el grado de polarización fue determinado. Los valores representan la media de tres experimentos independientes ( $\pm$ DS,  $n=3$ ).

Como se desprende del análisis de la **Figura 13**, 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  $0,13 \pm 0,01$ . Este resultado ratifica que el efecto de TDTMA es el de fluidificar la membrana, tal como se mostró en células salvajes expuestas al detergente (**Figura 12**). Sin embargo, y a diferencia de lo obtenido con la cepa salvaje, en *P. putida* RH02 el valor  $P$  se mantiene prácticamente constante ( $P = 0,13 \pm 0,01$ ), hasta los 60 min de contacto con el detergente. Este resultado claramente muestra que *P. putida* RH02 es incapaz de reestructurar eficientemente su membrana y revertir el efecto fluidificante del TDTMA. De manera similar se evidenció, mediante ensayos de polarización de fluorescencia, que la respuesta adaptativa a solventes orgánicos se ve comprometida en células de *P. putida* DOT-T1E afectadas en la síntesis de CL (Bernal *et al.*, 2007). Si bien hasta el momento

no es posible explicar este comportamiento, cabe mencionar que estudios de viabilidad de *P. putida* RH02 frente a TDTMA muestran que, luego de 90 min de contacto con el detergente, el número de células disminuye 5-6 órdenes de magnitud con respecto al número inicial de bacterias; lo que indica de alguna manera fallas en el mecanismo de adaptación para sobrevivir en presencia del detergente. López *et al.* (2016) sugieren que ciertos niveles de CL son necesarios para garantizar la estabilidad y la funcionalidad de la membrana bacteriana y tolerar el efecto bactericida generado por el detergente. En relación a ello, diversos autores asocian el correcto funcionamiento de ciertas funciones celulares con la presencia de CL en la membrana bacteriana, como por ejemplo, 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). También ha sido descrito que CL interviene en el correcto funcionamiento de transportadores y proteínas reguladoras involucradas en la respuesta al estrés osmótico (López *et al.*, 2006, Romantsov *et al.*, 2007, Tsai *et al.*, 2011).

En resumen, los resultados obtenidos a nivel de los cambios de lípidos de membrana permiten concluir que *P. putida* A (ATCC 12633) responde a TDTMA disminuyendo el contenido de CL, y con ello el contenido de AGI. Al mismo tiempo, incrementa el contenido de PL aniónicos, particularmente PG, y con ello aumenta el contenido de AGS, lo que le permite rigidizar la membrana. De lo anterior surge que la respuesta bacteriana al detergente TDTMA es multifactorial, con modificaciones en distintos componentes de membrana para mantener la misma en óptimas condiciones y garantizar así la viabilidad celular.



## **CAPÍTULO II: Implicancia de desaturasas en la respuesta bacteriana a TDTMA. Caracterización bioquímica y funcional de la enzima desaturasa (des) de *P. putida* A (ATCC 12633)**

En *P. putida* expuesta durante 15 min a TDTMA se observa, respecto a lo detectado en células no expuestas al detergente, 83% de disminución en el contenido de AGI (de 11,20% a 1,97%) y 10% de aumento en el contenido de AGS. El resultado que muestra que la disminución a nivel del AG 16:1 $\Delta$ 9 es acompañada con el incremento del AG 16:0 cuando *P. putida* A (ATCC12633) es expuesta a TDTMA (**Tabla 5**) sugiere la posible inhibición de una actividad desaturasa.

### **4.5.- Síntesis de AGI en *P. putida* A (ATCC12633): evidencias de la presencia de actividad desaturasa utilizando como sustrato 16:0-[1-<sup>14</sup>C]**

En bacterias, la síntesis de AG ocurre mediante un proceso anaeróbico, mediado por el complejo FAS II y originando como productos principalmente AG saturados de número par de C (ácido esteárico y palmítico) con una longitud máxima de 18 átomos de C. A partir de estos productos, la síntesis de AGI ocurre principalmente por acción de la enzima *fabA*, la cual tiene actividad *trans*-2-decenoil-ACP isomerasa. Esta enzima actúa cuando se han sintetizado 10 unidades de carbono, transformando el doble enlace de *trans* 2 a *cis* 3. Las moléculas conservan así la doble ligadura, y sufren procesos de elongación hasta una longitud determinada (Campbell y Cronan, 2001).

Además de esta ruta de biosíntesis de AGI, algunos microorganismos poseen una vía aeróbica que utiliza enzimas desaturasas, las cuales introducen un doble enlace en AG preformados. Particularmente, en varias especies de *Pseudomonas*, la síntesis de AGI ha sido asociada con enzimas desaturasas localizadas en la membrana citoplasmática (Baysse y O`Gara, 2007 y citas incluidas, Zhu *et al.*, 2006).

La actividad desaturasa de *P. putida* A (ATCC12633) se determinó *in vivo* a través de la producción de AGI, teniendo en cuenta la capacidad de estas enzimas de catalizar la desaturación oxígeno dependiente de AGS exógenos marcados radioactivamente. Para ello, células de *P. putida* se hicieron crecer en HPI-BSM con glucosa y NH<sub>4</sub>Cl conteniendo 1  $\mu$ Ci [1-<sup>14</sup>C]-16:0 hasta final de fase exponencial (DO<sub>660</sub>=0,8). Luego, las células se cosecharon y se realizó la extracción, derivatización y separación por TLC de AG de los PL totales. El 80-87% de la marca radiactiva incorporada se detectó en la fracción correspondiente a AGS y el resto en la correspondiente a AGI. Estos resultados sugieren que *P. putida* A (ATCC 12633) es

capaz de utilizar AG 16:0 exógeno y desaturarlo hasta el AGI correspondiente mediante un mecanismo aeróbico, lo que evidenció la presencia de actividad desaturasa y llevó a la búsqueda del ORF correspondiente.

#### 4.6.-Identificación de genes homólogos a *desA* en *P. putida* A (ATCC 12633)

En base a la secuencia génica de la  $\Delta^9$ desaturasa (*desA*) (PAO286) descrita en *P. aeruginosa* PAO1 (Zhu *et al.*, 2006), se analizó el genoma completo de *P. putida* KT2440, cepa de referencia secuenciada (Nelson *et al.*, 2002, Belda *et al.*, 2016) en busca de ORFs homólogos a esta enzima. Este análisis brindó información acerca de un posible ORFs: PP0217.

PP0217 codifica una proteína de 394 aminoácidos, con un 84% de identidad con la *desA* de *P. aeruginosa* PAO1.

A partir de la secuencia de nucleótidos del *orfpp0217* (*desA*) de *P. putida* KT2440, se diseñaron oligonucleótidos específicos (**Tabla 2**) para la amplificación por PCR del gen homólogo a *pp0271* desde *P. putida* A (ATCC 12633).

El fragmento amplificado a partir de genoma de *P. putida* A (ATCC12633) de aproximadamente 1,2 Kb, fue clonado en pGem<sup>®</sup>T Easy (Promega) originando el plásmido pRH04 y se envió a secuenciar a Macrogen (Korea).

La **Figura 14** muestra la secuencia de nucleótidos del fragmento amplificado:

>Seq1 [*Pseudomonas putida* A (ATCC 12633)] Delta9-desaturase (*desA*)

```
TCAGGCGCCGGTTCGGGCGCAGCGAGTAGGTCTTGAGCTGCGCCGCGAAGTCGCGCAGGGCGTGGATGCC
GCTGGTTTCGGCCTCGTGTATCCAGTCCTTCATGGCAGACAGCATGTCGTGGCCGTTGGCGCTGGTGC GCG
CCCGATCTGCTGCGGCCGCGCTTTTCGTAATGGTCTTCCGCTGGCTATGGGCGCATGACTCGATCGCAT
GGTGGCGGTCTTCCGCGCTGGTTTCGCGCGAGGCGGGCGTGGCACGGCGGAAGTGGTGACGCACGACGCA
TCGACGCGGGCCGTTCTGCACGCGGGCCGATCCGCTGCGGTACTGGCCATGATCTGAGCGGTGTGATG
GCATGGCGTGCATGTCCGGCTGGCCTGCCGACGCGTGGGCAATCGGCGCCACGCGCTGCACTGGCCGGC
GCACGGCGACGGCGTATCCGCCCCGATGTCGACTCCCAGCGCTTGACTGAAAGCTTGGCCGAGTTGGGG
TAGGTGTGGTGGTTGTTGTGAAGCTCATCGCTCCGATGACGATGCCCCACGGCACCAGGTTGGTGGCAG
CGTCGCGGCATTGCAAGTTGCGATAGCCGAGCGCGTGGCCAGGCCATTGACCACGCCGGCAGCCCAGAA
CGGGATCCACATCATCTGCACCGCCCAGATGGTGATGCCGATGGTACCAAACAGCAGCAGGTCGATCACG
GCCATCAGGCGATGCCACCCAGCTTGTAGCGCGAGTAGAGTTGCGCTCGATCCAGTCATCCGGGCAGTT
CTTGCCGTAGATGCGCGGGTTTCGGGGTGCCTCTTCGCGGTAGGTTGCGCGCCCTGCGCGCACCGTT
CCCAGGCCCTTGTGCACCGGGCTGTGCGGGTGCCTCGGGGTTTCGCACTTGGCGTGGTGTGCTGCGGTGA
TGGCGGTCCATTCGCGGGTGTCTGCGCCGTGGTCAGCCACAGCCAGAAGCGGAAGAAGTGCTTGAGCGC
GCCATTGAGCTCCAGGGCCCGGTGCGCGGAGTAGCGATGCAGGTAGACCGTGACGCTGACGATGGTTCAC
GTGGGTTCATCAACAAGGTGATGCCGACCAGTTGCCAGGCCGACAGGTCGAGCAGGCCGTTATACCACAT
```

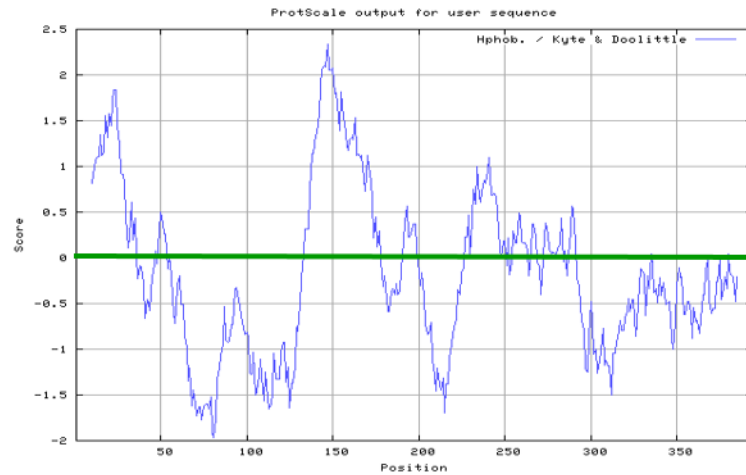
**Figura 14:** Secuencia completa del gen *desA* de *P. putida* A (ATCC12633)



Ha sido descrito que las  $\Delta^9$  desaturasas son proteínas unidas a membrana que poseen diversos dominios transmembrana y tres regiones ricas en histidina (“HXXXH”, “HXXHH” y “HXXHH”), espaciadas apropiadamente (Shanklin *et al.*, 1994; Los y Murata, 1998; Murphy, 1999; Mansilla *et al.*, 2008). Estos residuos de histidina, involucrados en la unión de hierro, se encuentran expuestos sobre la cara citoplasmática de la membrana bacteriana y resultan esenciales para la catálisis enzimática (Shanklin *et al.*, 1994; Diaz *et al.*, 2002). Dado que todos los sustratos de estas enzimas son altamente hidrófobos, estos dominios se encuentran particionados en la bicapa lipídica (Shanklin *et al.*, 1994), aunque los donadores de electrones son proteínas solubles o periféricas como ferredoxina o citocromo b5.

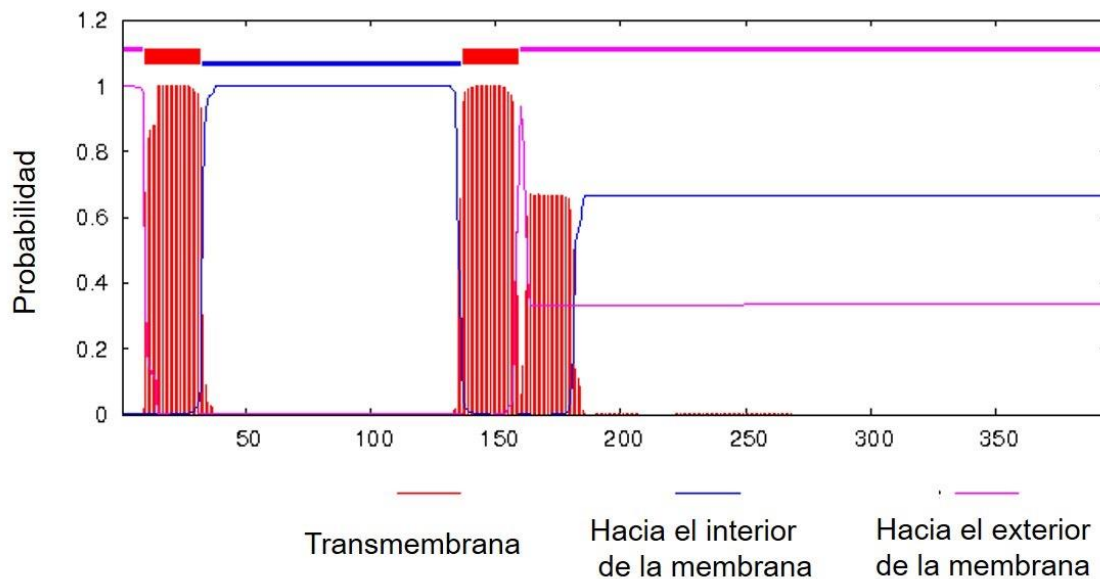
Como se desprende del análisis de la **Figura 15**, en la secuencia de aminoácidos de MF539821 de *P. putida* A (ATCC12633) se identificaron los motivos consenso ricos en histidina característicos de las enzimas desaturasas. Además, dentro de cada motivo de histidina conservado, es posible identificar residuos que se mantienen constante dentro de las  $\Delta^9$ -desaturasas indicando un origen evolutivo común (Box I: HRXXXH; Box II: XWXXXHRXHH; Box III: HNXHHXF) (Mansilla *et al.*, 2008).

Debido a las limitaciones que existen para purificar y obtener grandes cantidades de este tipo de enzimas, los datos bibliográficos referidos a la estructura de las enzimas  $\Delta^9$ -desaturasa son escasos. Sin embargo, en determinadas enzimas unidas a membranas, han sido propuestos modelos topológicos a partir de los cuales es posible predecir la estructura de otras desaturasas unidas a membrana. Estos modelos han sido descritos para  $\Delta^9$  estearoil-CoA desaturasa en rata y levaduras (Stukey *et al.*, 1990, Man *et al.*, 2006), hidroxilasa alcalina en *Pseudomonas oleovorans* (Beilen *et al.*, 1992) y acil-lípido  $\Delta^5$  desaturasa en *B. subtilis* (Diaz *et al.*, 2002). El análisis de la distribución de los aminoácidos hidrofóbicos, parámetro que es único para enzimas de membrana, permite realizar una predicción de la posible topología de esta putativa  $\Delta^9$  desaturasa de *P. putida* A (ATCC 12633). La **Figura 16** muestra el análisis de la distribución de los aminoácidos hidrofóbicos utilizando el método Kyte-Doolittle Hydropathy (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protscale/protscale.pl?1>)



**Figura 16: Análisis de la secuencia de aminoácidos de la proteína MF539821 de *P. putida* A (ATCC12633).** La búsqueda de regiones transmembrana se realizó utilizando el método Kyte-Doolittle Hydropathy y con un tamaño de ventana de 9 aminoácidos. Los picos que sobrepasan la línea verde indican posibles regiones transmembrana.

Con el objetivo de identificar correctamente las regiones transmembrana, se realizó además un análisis utilizando el servidor online TMHMM (transmembrane Hidden Markov Model) (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>).



**Figura 17: Análisis de las regiones transmembrana de la proteína MF539821 de *P. putida* A (ATCC12633) e identificación de las regiones transmembrana utilizando el servidor TMHMM** (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>).

Acorde a los resultados obtenidos para la predicción de las hélices transmembrana, y utilizando ambos servidores, es posible predecir que esta putativa desaturasa de *P.*

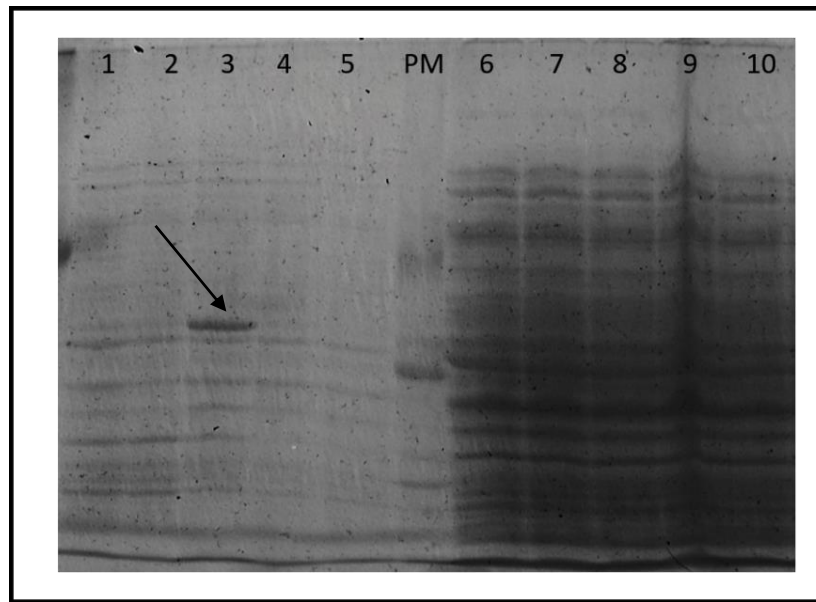
*putida* A (ATCC 12633) presenta dos dominios hidrofóbicos bien definidos localizados entre los aminoácidos 10-33 y 137-60, los cuales tendrían una longitud que les permitiría atravesar la bicapa lipídica dos veces. Esta predicción concuerda con las regiones transmembrana identificadas en  $\Delta 9$  desaturasas de *Pseudomonas* sp. A3 (Garba *et al.*, 2016) y *Pseudomonas* sp. A8 (Garba *et al.*, 2016). Resultados diferentes fueron obtenidos por Li *et al.* (2009), quienes identificaron cuatro dominios hidrofóbicos en la secuencia de aminoácidos de una  $\Delta^9$  AG desaturasa de *Pseudoalteromonas* sp MLY15.

En su conjunto, el análisis realizado muestra que el producto del gen *mf539821* codificaría para una potencial DesA en *P. putida* A (ATCC 12633). Es posible clasificar a esta enzima dentro del grupo evolutivo perteneciente a las desaturasas unidas a membranas

#### 4.7.- Expresión de *mf539821* de *P. putida* A (ATCC 12633)

Con el propósito de asignar la función de este gen, se procedió a la expresión de *mf539821* de *P. putida* A (ATCC 12633) en el huésped heterólogo *E. coli* BL21 (DE3). *E. coli* constituye un excelente sistema para expresar enzimas desaturasas dado que este microorganismo no posee ninguna enzima con capacidad desaturar aeróbicamente AG, aunque sí posee todo el sistema complementario necesario para que esta actividad enzimática se exprese en forma activa (Cao *et al.*, 2010)

Células de *E. coli* BL21 (DE3) (**Tabla 1**) fueron transformadas con el plásmido pRH05 (**Tabla 1**). Se seleccionaron las células transformadas, las que fueron sometidas a ensayos de expresión con dos tipos de inductores, IPTG y lactosa (**Apartado 3.9**). Una vez inducidas, las células fueron procesadas y las fracciones solubles y de membrana obtenidas se evaluaron por PAGE-SDS (**Apartado 3.12**). Se incluyó como control negativo, células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el vector de expresión pET28a vacío (**Tabla 1**). La **Figura 18** muestra los resultados obtenidos:



**Figura 18:** Expresión de *mf539821* de *P. putida* A (ATCC12633). **Fracción de membrana:** Calles 1-3: *E. coli* RH05 inducción con IPTG 0,2 mM (**calle 1**) y 0,4 mM (**Calle 2**), lactosa 1 % (**Calle 3**). Calles 4 y 5: *E. coli* BL21/pET28a inducción con lactosa 1 % (**Calle 4**), IPTG 0,4 mM (**Calle 5**). **Fracción soluble:** Calles 6-8: *E. coli* BL 21 RH05 inducción con IPTG 0,2 mM (**Calle 6**), 0,4 mM (**calle 7**), lactosa 1 % (**calle 8**). Calles 9 y 10: *E. coli* BL21/pET28a inducción con lactosa 1 % (**Calle 9**), IPTG 0,4 mM (**Calle 10**).PM: marcador de peso molecular.

Como se desprende del análisis de la **Figura 18**, luego de la inducción con lactosa al 1 % y utilizando fracción de membrana, se detecta la expresión de una nueva banda proteica de aproximadamente 45 kDa (**Calle 3**, indicado con flecha). Dicha proteína no fue detectada en el patrón de bandas correspondiente a la fracción de membrana del control negativo (**calle 4**), ni en la fracción soluble de células inducidas con lactosa a la misma concentración (**calle 8**). Tampoco se observó expresión de esta banda proteica cuando se utilizó IPTG 0,2 y 0,4 mM.

El tamaño de la proteína expresada se correlaciona con el tamaño esperado, ya que la proteína completa posee 394 aminoácidos y un tamaño aproximado de 45 kDa. El mismo tamaño de proteína fue reportado en enzimas  $\Delta 9$  desaturasas de diferentes microorganismos como *Pseudomonas* sp. A8 y A3 (Garba *et al.*, 2016 a y b), *Pseudoalteromonas* sp. MLY15 (Li *et al.*, 2009) y *E. meliloti* 1021 (Paulucci *et al.*, 2014).

#### 4.8.-Composición de AG de cepas de *E. coli* transformadas

La **Tabla 9**, muestra los resultados obtenidos de la composición de AG de células de *E. coli* RH05 expresando el gen desaturasa y de *E. coli* BL21/pET28a, conteniendo el plásmido vacío, expuestas o no, a concentraciones no letales (50 mg/l) del QAC TDTMA.

Como se desprende del análisis de la **Tabla 9**, células de *E. coli* BL21/pET28a (control) crecidas en condiciones no estresantes de cultivo contienen en su membrana 85,5 % de AGS y 14,33 % de AGI. De los AGI identificados, los principales fueron 18:1Δ9 ( $5,63 \pm 1,2$ ) y 18:1Δ11 ( $5,83 \pm 0,4$ ) y un porcentaje menor de 16:1Δ9. El contenido de AGS estuvo dado principalmente por 16:0 y 18:0. Datos similares en la composición de AG de células de *E. coli* fueron obtenidos por otros autores (Li *et al.*, 2009; Paulucci *et al.*, 2014; Kiseleva *et al.*, 2014; Garba *et al.*, 2016 a y b).

Células de *E. coli* expresando el gen desaturasa presentaron diferencias significativas en el contenido de AG, con respecto a lo detectado en la cepa control *E. coli* BL21/pET28a. *E. coli* RH05 presentó un incremento del 38% en el grado de insaturación de la membrana, dado, principalmente, por un notable aumento (86,7%) en el contenido de 16:1Δ 9, seguido de un leve incremento en el contenido de 18:1Δ11 y 18:1Δ9. Este aumento en los niveles totales de AGI se ve reflejado en una disminución de la relación AGS/AGI (de 5,96 a 4,05), indicando que *E. coli* RH05 posee una membrana más fluída que la de *E. coli* BL21/pET28a.



**Tabla 9:** Cambios en la composición de AG de células de *E. coli* RH05 y *E. coli* BL21/pET28a, expuestas o no, a TDTMA.

Ácidos grasos (%)	Control <sup>(*)</sup>		TDTMA (15 min) <sup>(†)</sup>	
	<i>E. coli</i> BL21/pET28a	<i>E. coli</i> RH05	<i>E. coli</i> BL21/pET28a	<i>E. coli</i> RH05
14:0	3,86±0,9	4,08±0,5	4,16±0,6	5,24±0,3
15:0	5,61±0,1	4,48±0,8	5,6±0,3	5,97±0,1
16:0	32,26±2,2	29,1±1,9	35,96±2,5	36,33±2,6
17:0	8,9±0,9	9,96±0,8	10,12±0,8	9,88±1,2
18:0	34,87±2,8	32,65±2,5	34,2±2,1	35,3±2,7
<b>Saturados</b>	<b>85,5±3,1</b>	<b>80,28±4,2</b>	<b>90,04±3,8</b>	<b>92,72±2,5</b>
16:1Δ 9	2,87±0,6	5,36±1,3	1,87±0,6	1,09±0,3
18:1 Δ 9	5,63±1,2	7,02±0,4	6,16±1,1	1,25±0,5
18:1 Δ 11	5,83 ±0,4	7,43±1,1	3,18±0,2	4,54±0,02
<b>Insaturados</b>	<b>14,33±1,7</b>	<b>19,81±1,5</b>	<b>11,21±1,9</b>	<b>6,88±2,3</b>
<b>AGS/AGI</b>	<b>5,96</b>	<b>4,05</b>	<b>8,03</b>	<b>13,48</b>

Células de *E. coli* RH05 y de *E. coli* BL21/pET28a se hicieron crecer en medio LB suplementado con Km 50 µg/ml a 37°C y en agitación hasta alcanzar una DO<sub>660</sub> de 0,4-0,6. En ese momento, fueron inducidas con 1% de lactosa a temperatura ambiente, en agitación a 60 rpm durante 19 hs. Pasado este tiempo, fueron expuestas<sup>(†)</sup> o no<sup>(\*)</sup> durante 15 minutos a 50 mg/l de TDTMA. Posteriormente, fueron cosechadas y los PL extraídos según Bligh y Dyer (1959). A partir de los mismos se obtuvieron los esteres metílicos de AG (FAME) según Morrison y Smith (1964), los cuales fueron separados e identificados por cromatografía gaseosa (GC), como se describe en Materiales y Métodos, Apartado 3.4.

El porcentaje de cada AG es relativo al total de AG definido como el 100%. Los valores representan la media de tres experimentos independientes (±SD, n=3).

(<sup>a, b, c</sup>) Valores con la misma letra dentro de una columna no son significativamente diferentes (P ≤0,05).

AGS/AGI: ácidos grasos saturados/ ácidos grasos insaturados.

El contenido de AGS en la cepa *E. coli* RH05 fue relativamente menor a lo detectado en la cepa control. Este cambio estuvo dado por una disminución en el contenido de los ácidos grasos 16:0, 18:0 y 15:0. Es de destacar que, si bien el ácido palmítico (16:0) presentó sólo una disminución del 10% en su contenido con respecto a lo detectado en la cepa control, el recambio observado entre los AG 16:0/16:1Δ 9 indica que el ácido palmítico posiblemente está siendo utilizado como sustrato por la enzima

desaturasa para formar ácido palmitoleico (16:1 $\Delta$ 9). Este resultado permite concluir que la enzima desaturasa se expresa de manera activa en *E. coli* BL21 y que, además, se relaciona con la síntesis de AG monoinsaturados en *P. putida* A (ATCC 12633). El hecho de que se haya detectado un leve aumento en el contenido de 18:1 $\Delta$ 11 (**Tabla 9**) puede deberse a que el AGI formado a partir de 16:0, 16:1 $\Delta$ 9, puede sufrir un proceso de elongación por el complejo FAS tipo II y convertirse en *cis*-vaccénico. La conversión de ácido palmítico a palmitoleico también ha sido observada en células de *E. coli* durante la expresión del gen desaturasa en microorganismos como *Ensifer meliloti* 1021 (Paulucci *et al.*, 2014), *Pseudomonas* sp A8 (Garba *et al.*, 2016) y *Pseudoalteromonas* sp MLY15 (Li *et al.*, 2009).

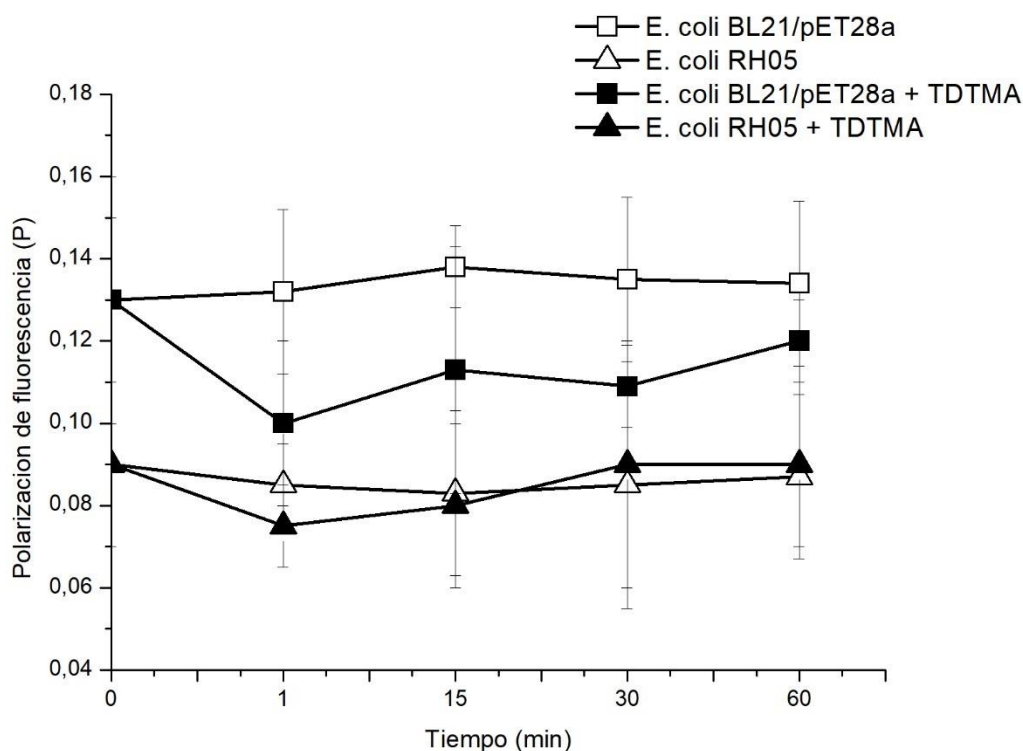
De manera similar a lo descrito anteriormente, también en *E. coli* RH05 se observaron modificaciones en los contenidos de los ácidos grasos 18:1 $\Delta$ 9 y 18:0. Con respecto a lo detectado en *E. coli* BL21/pET28a, *E. coli* RH05 mostró incremento de aproximadamente un 25% en el contenido del AG 18:1 $\Delta$ 9, con la concomitante disminución en los niveles de 18:0 (de 34,87% en *E. coli* BL21/pET28a a 32,65% en la cepa expresando *desA*). Este resultado indica que esta enzima puede también desaturar ácido esteárico para formar el AGI correspondiente.

Los resultados obtenidos hasta el momento permiten asignarle al gen *mf539821* de *P. putida* A (ATCC12633), exitosamente expresado en forma activa en el huésped heterólogo *E. coli* BL21, la función  $\Delta^9$  desaturasa, capaz de sintetizar 16:1 $\Delta$ 9 y 18:1 $\Delta$ 9 a expensas de los AGS correspondientes (16:0 y 18:0, respectivamente), introduciendo una doble ligadura entre el C9 y C10 de la cadena acilo esterificada al PL. Es de hacer notar que en bacterias del género *Pseudomonas*, tal como *P. aeruginosa*, se ha descrito la presencia de dos enzimas con actividad desaturasa; y que una de ellas ha sido caracterizada como una  $\Delta^9$  desaturasa (*desA*) que introduce dobles enlaces en las cadenas acilos esterificadas en la posición 2 de los fosfolípidos (Zhu *et al.*, 2006).

Anteriormente describimos que TDTMA ejerce un efecto fluidificante sobre la membrana de *P. putida* A (ATCC 12633) cuando las células son expuestas durante 15 min al detergente (**Apartado 4.1**). La respuesta bacteriana a nivel de membrana involucró disminución del 83% en el contenido de AGI y aumento del 10% en el contenido de AGS, respecto a lo detectado en células no expuestas al detergente (**Apartado 4.1**). Dado que *P. putida* posee actividad  $\Delta^9$  desaturasa, la disminución del contenido del AG 16:1 $\Delta$ 9 acompañada con el incremento del AG 16:0 detectada en presencia del detergente, podría ser atribuida a la posible inhibición de esta actividad enzimática. La composición de AG de células de *E. coli* BL21/pET28a y *E. coli* RH05 inducidas con 1% de lactosa durante 19 hs y expuestas durante cortos períodos de tiempo al detergente se muestra en **Tabla 9**.

Como se observa en **Tabla 9**, células de *E. coli* BL21/pET28a expuestas a TDTMA, no mostraron diferencias significativas en la composición de AG, respecto a lo obtenido para esta misma cepa en condiciones no estresantes. Sin embargo, células de *E. coli* RH05 que expresan el gen desaturasa expuestas durante 15 min a TDTMA muestran, con respecto a células no expuestas, una marcada disminución en la fracción correspondiente a AGI (19,81 % y 6,88 %, respectivamente). Este cambio estuvo dado, principalmente, por una notable disminución del contenido de los AGI 16:1 $\Delta$ 9 (de 5,36 % a 1,09%) y 18:1 $\Delta$ 9 (de 7,02% a 1,25%). Células expuestas a TDTMA presentan un mayor contenido de AGS en su membrana, el cual se atribuye principalmente a un aumento del 25% en los niveles de (16:0). La relación AGS/AGI en *E. coli* RH05 enfrentada a TDTMA es ampliamente mayor a la determinada en su ausencia (13,48 y 4,05, respectivamente). Este resultado es indicativo de que, en presencia del detergente, la membrana bacteriana está relativamente más rígida debido, principalmente, a la disminución en el contenido de AGI (Sinensky, 1974, Russell, 1984; Najjar *et al.*, 2007, Mykytczuk *et al.*, 2007). La incorporación de un mayor porcentaje de AGI en las membranas disminuye la  $T_m$  de los fosfolípidos de membrana, mientras que la incorporación de AGS tiene un efecto contrario.

Mediante ensayos de polarización de fluorescencia utilizando la sonda DPH se analizó la fluidez de la membrana citoplasmática bacteriana y el efecto del TDTMA en células de *E. coli* BL21/pET28a y *E. coli* RH05 (**Apartado 3.13**). La **Figura 19** muestra los resultados obtenidos:



**Figura 19: Polarización de fluorescencia de DPH en células de *E. coli* BL21/pET28a y *E. coli* RH05 expuestas o no a TDTMA.** Las células se hicieron crecer en medio LB suplementado con Km 50 µg/ml a 37°C y en agitación hasta alcanzar una DO<sub>660</sub> de 0,4-0,6. En ese momento, fueron inducidas con 1% de lactosa a temperatura ambiente, en agitación a 60 rpm durante 19 hs. Pasado este tiempo, fueron cosechadas, lavadas y resuspendidas en buffer Tris-CIH (DO<sub>660 nm</sub> = 0,2). La sonda fluorescente fue añadida al cultivo resuspendido e incubada para lograr la completa incorporación dentro de la membrana citoplasmática. Una alícuota fue tomada y la polarización de fluorescencia fue medida como control (ausencia de TDTMA). Luego, 50 mg/l de TDTMA fue agregado y alícuotas fueron recolectadas a diferentes tiempos (1, 5, 15, 20, 30 y 60 min) y el grado de polarización fue determinado. Los valores representan la media de tres experimentos independientes (±DS, n=3).

Como se desprende del análisis de la **Figura 19**, células de *E. coli* BL21/pET28a tienen un valor (*P*) considerablemente mayor al detectado en células de *E. coli* RH05 que expresan el gen desaturasa ( $0,13 \pm 0,03$  y  $0,09 \pm 0,02$ , respectivamente). Considerando que el grado de insaturación de los AG es el factor más importante que influye en la fluidez de los lípidos de membrana (Mykytczuk *et al.*, 2007, de Mendoza y Schujman, 2005, Zhang y Rock, 2008, Rühl *et al.*, 2012), este resultado es coherente con el perfil de AG detectado en *E. coli* RH05 expresando el gen desaturasa y crecidas en condiciones no estresantes (**Tabla 9, columna II**), donde se detectó incremento en el contenido de AGI, y con ello, una membrana más fluída.

En células de *E. coli* BL21/pET28a, luego de la adición de TDTMA (1 min de exposición), los valores de *P* disminuyeron de  $0,13 \pm 0,02$  en ausencia de detergente a  $0,10 \pm 0,02$  en su presencia, ratificando que el TDTMA tiene un efecto fluidificante sobre la bicapa lipídica. Sin embargo, el valor (*P*) se mantuvo constante durante los 30 min de exposición al TDTMA, indicando que no hay mecanismos que le permitan a

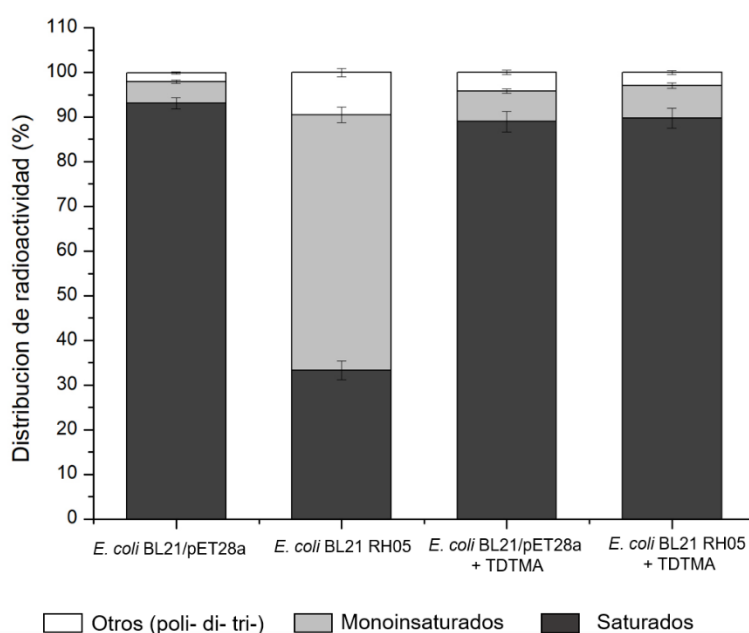
*E. coli* restaurar la fluidez de membrana. Cuando *E. coli* RH05 se expuso a concentraciones no letales de TDTMA, la membrana se mantuvo en un estado fluido durante los 60 min de contacto con el detergente y con un valor *P* similar a lo detectado en la condición no estresante. La incapacidad de restaurar la fluidez de membrana en células expresando el gen desaturasa, indica que el detergente catiónico TDTMA inhibe esta actividad desaturasa.

Los resultados mostrados permiten concluir que para contrarrestar el efecto fluidificante del TDTMA, entre otros mecanismos, *P. putida* A (ATCC 12633) disminuye el grado de insaturación de los AG de los PL preexistentes en su membrana a través de la inhibición de la enzima desaturasa (desA). De esta forma, los cambios detectados en el grado de insaturación de AG constituyen un mecanismo rápido de respuesta al detergente.

#### **4.9.- Determinación *in vivo* de la actividad desaturasa de células de *E. coli* transformadas con el gen *mf539821*.**

La determinación de actividad desaturasa utilizando sustratos radiactivos en experimentos *in vivo* ha sido demostrada con cepas recombinantes de *E. coli* BL21 conteniendo el gen desaturasa de *E. meliloti* 1021 (Paulucci *et al.*, 2014) y de *Pseudoalteromonas sp* (Li *et al.*, 2009).

En este caso, la actividad desaturasa en cepas de *E. coli* transformadas con el gen *mf539821*, se determinó utilizando como sustrato radioactivo ácido palmítico [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ], el cual se agregó al medio desde el inicio del cultivo. Una vez que el cultivo llegó a  $\text{DO}_{660\text{nm}} = 0,4\text{-}0,6$ , se realizó la inducción con 1% de lactosa. Luego de 19 hs de inducción, las células fueron cosechadas y, a partir de los extractos lipídicos totales, se obtuvieron los FAMES, los cuales fueron analizados por TLC. La **Figura 20** muestra la distribución de la marca radioactiva en las diferentes fracciones de AG (monoinsaturados y saturados)



**Figura 20: Determinación *in vivo* de la actividad desaturasa en células de *E. coli* RH05 y *E. coli* BL21/pET28a, expuestas o no a TDTMA y utilizando [1-<sup>14</sup>C]-16:0 como sustrato.** Las células se hicieron crecer a 37°C en medio rico LB suplementado con Km 50 µg/ml, al que se le agregó 1 µCi de [1-<sup>14</sup>C]-16:0, previamente esterilizado. Una vez que el cultivo alcanzó la DO<sub>660nm</sub> = 0,4-0,6, las células fueron inducidas con 1% de lactosa por 19 hs, según lo descrito en Materiales y Métodos (Apartado 3.9). Pasado este tiempo, las células fueron expuestas o no a 50 mg/l de TDTMA durante 15 min. Luego, los lípidos totales fueron extraídos, metanolizados y separados acorde al grado de insaturación en placas de TLC impregnadas con AgNO<sub>3</sub>. Los resultados representan experimentos independientes y se expresan como el porcentaje del total de radioactividad incorporada en cada fracción de ácidos grasos.

En *E. coli* BL21/pET28a, el porcentaje de radioactividad en la fracción correspondiente a AG monoinsaturados fue muy bajo, confirmando que *E. coli* no posee enzimas desaturadas y es incapaz de desaturar el AG saturado incorporado al medio (Magnuson *et al.*, 1993). Por el contrario, células de *E. coli* BL21 RH05, muestran mayor cantidad de radioactividad en la fracción AG monoinsaturados que lo detectado en la cepa control *E. coli* BL21/pET28a (57,16 ± 1,75 % y 4,79 ± 0,34, respectivamente), lo que sugiere la presencia de la actividad enzimática capaz de desaturar el ácido palmítico incorporado exógenamente al AG monoinsaturado correspondiente. En resumen, la producción de AG monoinsaturados marcados radioactivamente a partir de 16:0-[1-<sup>14</sup>C] confirman la presencia de un mecanismo aeróbico de biosíntesis de AG insaturados y nos permiten asignar la función desaturasa al producto del gen *mf539821* de *P. putida* A (ATCC 12366).

Cuando células de *E. coli* RH05 fueron expuestas durante 15 min a TDTMA, se detectó una disminución de 87% la incorporación de la marca radioactiva en la fracción de AG monoinsaturados y un aumento del 170% en la fracción correspondiente a AGS. Ello sugiere que la actividad desaturasa de *P. putida* A (ATCC 12633) determinada *in vivo* con

precursores radioactivos, se inhibe por la presencia del detergente catiónico TDTMA lo que explica, en parte, los cambios detectados en la composición de AG de *P. putida* A (ATCC 12633) expuestas o no a TDTMA (**Apartado 4.1, Capítulo I**).

#### **4.10.- Efecto de detergentes iónicos y no iónicos sobre la actividad desaturasa.**

Con el objetivo de evaluar si la inhibición de la actividad desaturasa por el TDTMA es específica y no sólo una acción detergente, se analizó el efecto de otros detergentes sobre esta actividad. Para ello se emplearon los detergentes catiónicos (HDTMA y C<sub>14</sub>BDMA), iónicos (SDS) y no iónicos (Tritón X-100). Los resultados obtenidos se muestran en **Tabla 10**.

El análisis de la **Tabla 10** muestra que células de *E. coli* BL21/pET28a expuestas a cualquier tipo de detergente contienen el mismo porcentaje de AGI y AGS en su membrana, en relación a lo detectado en las mismas células no expuestas. En todos los casos analizados, la relación AGS/AGI se mantuvo en un valor de aproximadamente 11. Este resultado indica que *E. coli* no modifica el contenido de los AG frente a condiciones de estrés dadas por detergentes catiónicos, iónicos o no iónicos. Excepcionalmente, se detectó un incremento del 50 % en el contenido de AGI con una leve disminución en el nivel de AGS en *E. coli* BL21/pET28a cuando fueron expuestas al detergente catiónico C<sub>14</sub>BDMA.

Un valor similar al detectado en *E. coli* BL21/pET28a para la relación AGS/AGI fue obtenido cuando células de *E. coli* RH05, (expresando el gen desaturasa de *P. putida* A (ATCC 12633)), fueron expuestas a 50 mg/l de SDS y Tritón X-100 (**Tabla 10**). Por el contrario, en presencia de C<sub>14</sub>BDMA y HDTMA, respecto a lo detectado en *E. coli* BL21/pET28a en las mismas condiciones, la relación AGS/AGI incrementó el 43% y 36%, respectivamente. Este resultado indica una inhibición específica y no un efecto detergente general ya que, de los detergentes probados, sólo los catiónicos inhiben la enzima desaturasa.

**Tabla 10:** Cambios en la composición de AG de células de *E. coli* RH05 y de *E. coli* BL21/pET28a dados por le exposición a detergentes del tipo iónico y no iónicos.

	Control		TRITON X-100		C <sub>14</sub> BDMA		SDS		HDTMA	
% Ácidos Grasos	<i>E. coli</i> BL21/pET28a	<i>E. coli</i> BL21/pRH05	<i>E. coli</i> BL21/pET28a	<i>E. coli</i> BL21/pRH05	<i>E. coli</i> BL21/pET28a	<i>E. coli</i> BL21/pRH05	<i>E. coli</i> BL21/pET28a	<i>E. coli</i> BL21/pRH05	<i>E. coli</i> BL21/pET28a	<i>E. coli</i> BL21/pRH05
14:00	3,545	2,24	2,7	3,05	2,98	2,55	3,48	3,81	4,69	4,28
15:00	3,445	3,58	4,48	1,81	1,93	5,34	4,33	3	10,2	5,39
16:00	41,39	34,09	38,19	41,51	35,81	31,95	43,965	43,35	43,83	38,34
17:00	5,105	5,19	3,95	4,51	5,04	6,52	5,54	6,5	4	5,18
18:00	39,07	41,52	43,1	41,83	40,14	45,09	34,465	36,64	32,21	41,49
<b>Saturados</b>	<b>92,555</b>	<b>86,62</b>	<b>92,42</b>	<b>92,71</b>	<b>85,9</b>	<b>91,45</b>	<b>91,78</b>	<b>93,3</b>	<b>94,93</b>	<b>94,68</b>
16:1Δ 9	1,555	2,95	1,62	1,35	4,3	1,57	1,575	1,67	1,45	2,55
18:1 Δ 9	1,28	2,3	1,8	2,09	2,22	2,22	2,165	0,89	1,63	0,45
18:1 Δ 11	4,58	8,11	4,62	3,84	7,58	4,74	4,73	4,97	5,99	2,77
<b>Insaturados</b>	<b>7,415</b>	<b>13,36</b>	<b>8,04</b>	<b>7,28</b>	<b>14,1</b>	<b>8,53</b>	<b>8,47</b>	<b>7,53</b>	<b>9,07</b>	<b>5,77</b>
<b>AGS/AGI</b>	<b>12,48</b>	<b>6,48</b>	<b>11,49</b>	<b>12,73</b>	<b>6,09</b>	<b>10,72</b>	<b>10,83</b>	<b>12,39</b>	<b>10,46</b>	<b>16,41</b>

Células de *E. coli* RH05 y de *E. coli* BL21/pET28a se hicieron crecer en medio LB suplementado con Km 50 µg/ml a 37°C y en agitación hasta alcanzar una DO<sub>660</sub> de 0,4-0,6. En ese momento, fueron inducidas con 1% de lactosa a temperatura ambiente, en agitación a 60 rpm durante 19 hs. Pasado este tiempo, fueron expuestas <sup>(†)</sup> o no <sup>(\*)</sup> durante 15 minutos a 50 mg/l de C<sub>14</sub>, HDTMA, SDS y Triton X-100. Posteriormente fueron cosechadas y los PL extraídos según Bligh y Dyer (1959). A partir de los mismos se obtuvieron los esteres metílicos de AG (FAME) según Morrison y Smith (1964), los cuales fueron separados e identificados por cromatografía gaseosa (GC), como se describe en Materiales y Métodos.

El porcentaje de cada AG es relativo al total de AG definido como el 100%. Los valores representan la media de tres experimentos independientes (±SD, n=3).

<sup>(a, b, c)</sup> Valores con la misma letra dentro de una columna no son significativamente diferentes (P ≤ 0,05). AGS/AGI: ácidos grasos saturados/ ácidos grasos insaturados.



### **CAPÍTULO III: Modificaciones ultraestructurales asociadas con el crecimiento de *P. putida* A (ATCC 12633) en presencia de TDTMA: Liberación de vesículas y acumulación de polihidroxicanoatos**

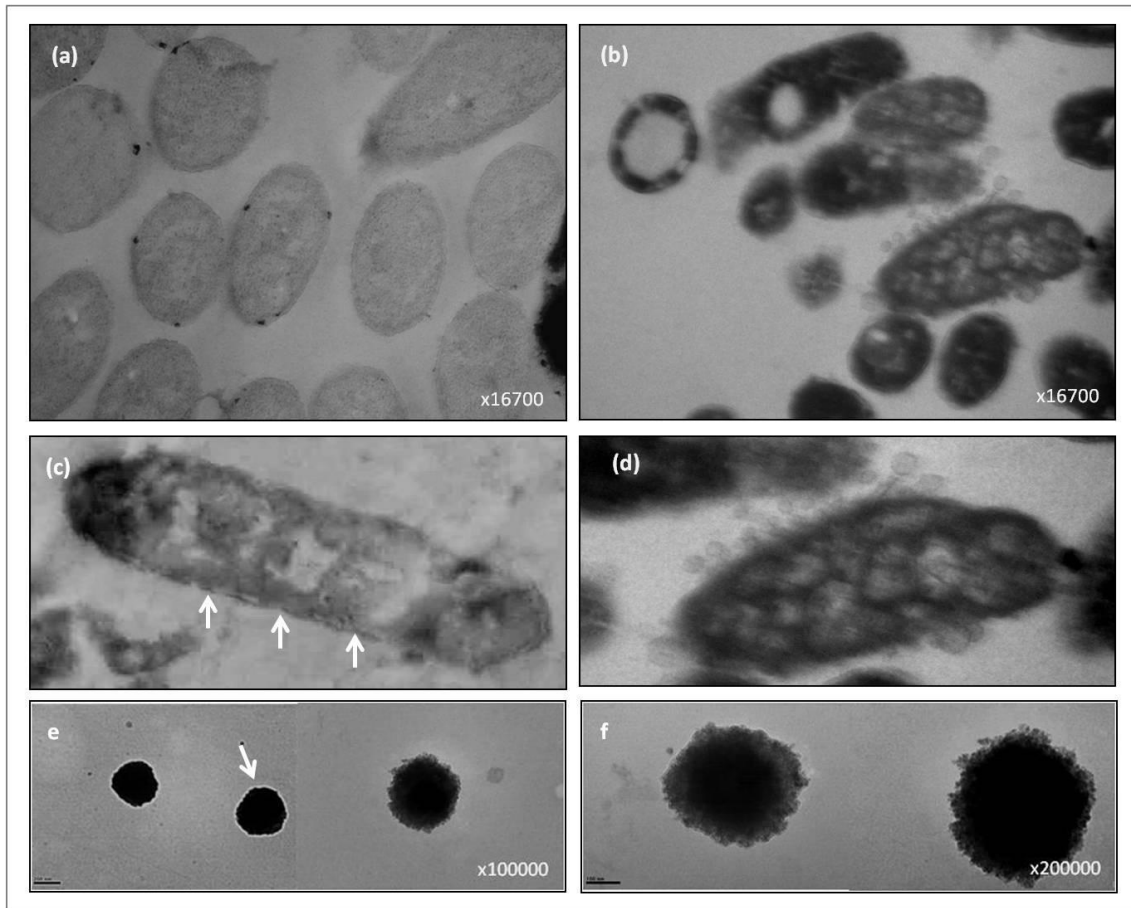
La adaptación bacteriana a diversas condiciones ambientales constituye una estrategia clave de supervivencia, donde la membrana bacteriana juega un papel importante. Anteriormente demostramos que en *P. putida* A (ATCC 12633) la respuesta adaptativa y la resistencia a la actividad bactericida de los QACs, en particular Br-tetradeciltrimetilamonio, involucra cambios en la composición de los PL y AG de la membrana (Boeris *et al.*, 2007, 2009; Heredia *et al.*, 2014).

Además de estos cambios específicos en PL, cuando las células crecen con TDTMA como única fuente de C, N y energía, se detectó un incremento de aproximadamente un 80% en el contenido de PL totales y, por análisis por microscopía, se observó la presencia de pseudovacúolas internas y de vesículas emergiendo de las células, aspectos estructurales que posiblemente guardan relación con el notable incremento de PL totales que se observa en esta condición nutricional. (Boeris *et al.*, 2011).

#### **4.11.- Análisis de las MVs liberadas por *P. putida* A (ATCC 12633).**

La integridad de la membrana de células de *P. putida* A (ATCC 12633) crecidas en un medio salino con y sin TDTMA (50 mg/l) fue analizada utilizando Microscopía electrónica de transmisión (TEM).

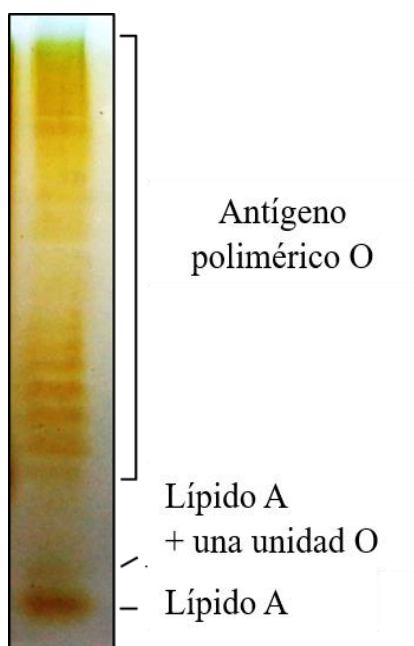
Como puede observarse en la **Figura 21**, las células poseen una envoltura celular intacta, independientemente de la ausencia o presencia del QAC (**Figura 21A** y **21B**, respectivamente). También puede observarse que las células que crecen con TDTMA presentan pequeñas protuberancias o evaginaciones de membrana, las cuales se corresponden con vesículas de membrana (MVs) en formación. Estas MVs se pueden observar, tanto desprendiéndose desde la membrana celular como libres en el medio extracelular (**Figura 21B** y **21D**). Es de destacar que no se observó producción de MVs cuando células de *P. putida* A (ATCC 12633) se hicieron crecer en medio salino con glucosa y NH<sub>4</sub>Cl como fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente (**Figura 21A**). **Figuras 21E** y **F** muestran que las MVs obtenidas de cultivos de *P. putida* crecidos con TDTMA, son estructuras esféricas, rodeadas por una bicapa y con un diámetro aproximado de 200 nm.



**Figura 21: Microscopía electrónica de transmisión de células de *P. putida* A (ATCC 12633) y MVs.** Las células se hicieron crecer en HPI-BSM con glucosa y  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (**Panel A**) o con 50 mg/l de TDTMA (**Panel B, C, D**) como única fuente de carbono y nitrógeno hasta final de fase exponencial. Las flechas indican pequeñas invaginaciones de membrana (**Panel C**). **Panel (E) y (F):** MVs extracelulares aisladas. Barra: 200 nm **Panel (E)** y 100 nm **Panel (F)**.

La caracterización de las MVs mostró que están compuestas por lipopolisacárido (LPS), PL, proteínas y en su interior se detectó la presencia de TDTMA. Estudios de MVs producidas por células de *P. aeruginosa* crecidas hasta fase estacionaria o exponencial en medio Luria-Bertani a 37°C, muestran que la composición de cabezas polares de los PL y de las cadenas acilos es sustancialmente diferente entre MVs y membrana externa bacteriana (Tashiro *et al.*, 2011, 2012).

El análisis por SDS-PAGE de las MVs de *P. putida* A (ATCC 12633), seguido del revelado con tinción con plata permitió identificar las bandas de LPS características de la envoltura celular de bacterias Gram-negativas (**Figura 22**) (Kadurugamuwa y Beveridge, 1995).



**Figura 22: Perfil de LPS de MVs.** El LPS purificado de las MVs fue separado por SDS-PAGE (14 %) y teñidos con tinción de plata como se describe en **Materiales y Métodos**. El gel presentó diferentes bandas correspondientes a: LPS con O-antígeno incompleto, región central unida al lípido A y la región central unida al lípido A más una unidad de antígeno O.

La **Tabla 11** muestra los resultados obtenidos de la composición de PL y AG de las MVs obtenidas a partir de células de *P. putida* A (ATCC 12633) crecidas en medio salino con TDTMA (50 mg/l) como única fuente de carbono y nitrógeno.

**Tabla 11:** Composición de PL y AG de MVs producidas por *P. putida* A (ATCC 12633)

Vesículas		
PL específicos	%	nmol PL mg/proteína
CL	15,03 ± 2,92	83,55 ± 4,25
PG	42,17 ± 2,95	234,20 ± 22,20
PC	24,62 ± 1,98	136,80 ± 8,77
PA	18,16 ± 2,87	101,00 ± 9,17
Ácidos grasos específicos	%	
Saturados		
16:0	35,31 ± 4,44	
18:0	51,85 ± 5,12	
Insaturados		
18:1 Δ9	12,66 ± 1,20	

Células de *P. putida* A (ATCC 12633) se hicieron crecer en HPI-BSM con glucosa y NH<sub>4</sub>Cl o con 50 mg/l de TDTMA como única fuente de carbono y nitrógeno hasta final de fase exponencial (DO<sub>660</sub>=0,4). Las vesículas fueron obtenidas y los PL y AG fueron extraídos y analizados como se describe en la sección de Materiales y Métodos, Apartado 3.4.

El porcentaje de cada PL y AG es relativo al total de AG definido como el 100%. Los valores representan la media de tres experimentos independientes (± SD, n=3).

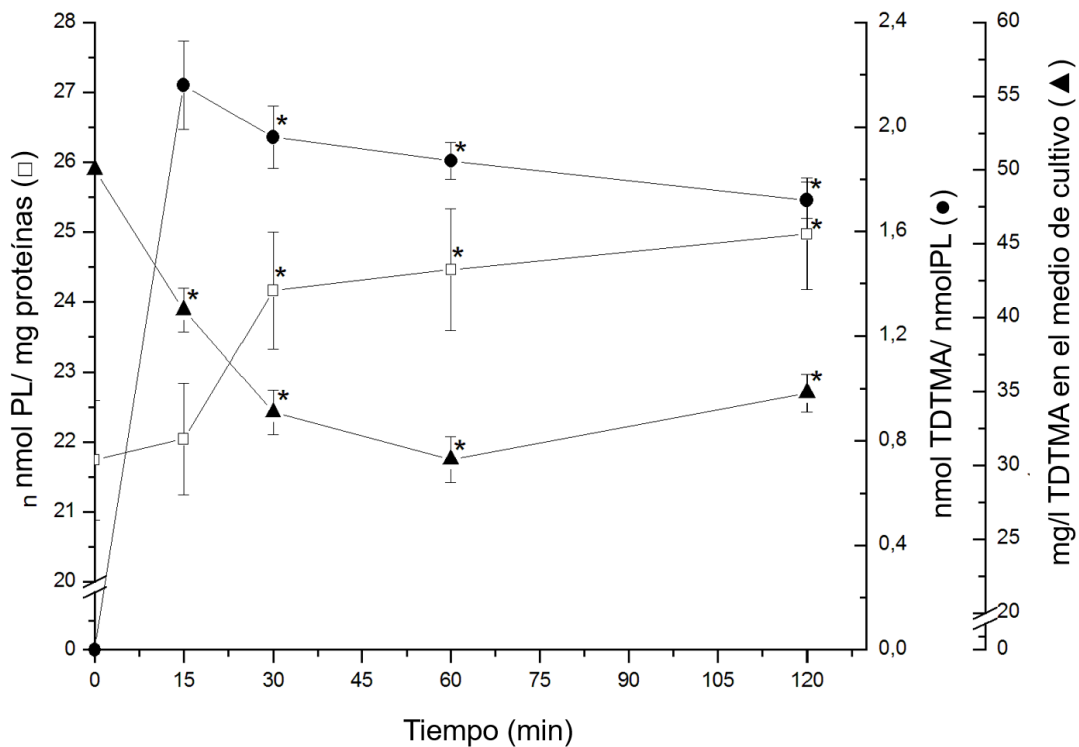
PG, fosfatidilglicerol; CL, cardiolipina; PA, ácido fosfatídico; PC, fosfatidilcolina.

El análisis de PL reveló que las MVs contienen en su membrana principalmente PG ( $42,17 \pm 2,95$ ), seguido de PC, PA y CL. Es de destacar que, si bien en la mayoría de las bacterias del género *Pseudomonas* el principal glicerofosfolípido identificado es PE (Ramos *et al.*, 1997; Pinkart y White, 1997; Bernal *et al.*, 2007, von Wallbrunn *et al.*, 2002; Baysse *et al.*, 2005, Tashiro *et al.*, 2011, Boeris *et al.*, 2007, 2009), este PL no se detectó formando parte de las MVs. Este resultado sugiere que, a diferencia de lo descrito para *E. coli* (Horstman *et al.*, 2000), en *P. putida* A (ATCC 12633) la composición de PL de las MVs es diferente a la descrita para la membrana externa. En concordancia con otros autores que estudiaron la composición de PL de MVs producidas por otras cepas de *Pseudomonas* (Tashiro *et al.*, 2011, 2012), el principal PL detectado en las MVs de *P. putida* A (ATCC 12633) es PG (**Tabla 11**). Parte de la capacidad de *P. putida* de tolerar el estrés producido por el TDTMA ha sido atribuida a la capacidad de PG de neutralizar la carga positiva del motivo trimetilamonio de este detergente (Boeris *et al.*, 2007; 2009). Este hecho, sumado a que PG ha sido asociado con la formación de la correcta curvatura de la membrana para la liberación de vesículas (Tashiro *et al.*, 2012), permitirían explicar porque PG es el principal componente de las MVs liberadas por *P. putida* (**Tabla 11**).

Como se muestra en la **Tabla 11**, el mayor contenido de AG en las MVs se correspondió con AGS, los que representan más del 80% de los AG totales detectados. De manera similar a lo descrito en células enteras de *P. putida* A (ATCC 12633) creciendo con TDTMA (**Apartado 4.2**), los AG predominantes encontrados en las MVs fueron ácido esteárico (18:0) y ácido palmítico (16:0). El contenido de AGI en las MVs fue un 10% mayor a lo detectado en células enteras crecidas con TDTMA, por lo que podría esperarse una mayor fluidez de membrana en las MVs. Sin embargo, cuando se evaluó la fluidez de las MVs midiendo la polarización de fluorescencia de la sonda DPH inserta en la membrana, se encontró un valor *P* de  $0,16 \pm 0,01$ , similar al valor *P* detectado en membranas de células de *P. putida* creciendo con TDTMA ( $P= 0,14 \pm 0,01$ ) (**Apartado 4.2**). Dada la similar proporción de AGS detectado en MVs y en células enteras, estos resultados confirman aquellos estudios que muestran que la composición de AG de los PL contribuye al mantenimiento de la fluidez de membrana (Mansilla *et al.*, 2004, Baysse *et al.*, 2005, Baysse y O'Gara, 2007; Mykytczuk *et al.*, 2007).

El análisis del contenido de las MVs reveló la presencia de TDTMA en las vesículas aisladas. Cuando células de *P. putida* se hicieron crecer en presencia de TDTMA (50 mg/l) como única fuente de carbono y nitrógeno, 18 mg/l de detergente fue detectado en el sobrenadante del cultivo luego de 48 hs de cultivo, de los cuales 9 mg/l de TDTMA fueron detectados en las MVs aisladas (equivalente a 48 nmol de TDTMA por nmol de PL).

Con el objetivo de estudiar la relación entre la formación de MVs y el estrés causado por el detergente catiónico TDTMA, células de *P. putida* A (ATCC 12633) se hicieron crecer hasta final de fase exponencial con fuentes preferenciales de C y N, en ausencia de detergente. Luego, fueron expuestas a 50 mg/l de TDTMA. En estas condiciones el detergente se encuentra presente en el medio de cultivo, pero no es incorporado por las células para ser utilizado como nutriente. Las células fueron cosechadas a diferentes tiempos y se determinó el contenido de proteínas y PL, la cantidad de TDTMA adherido a las células, la cantidad de TDTMA libre en el medio de cultivo y el contenido de TDTMA en las MVs. La **Figura 23** muestra los resultados obtenidos:



**Figura 23: Relación entre la formación de MVs y la eliminación de TDTMA.** Las células se hicieron crecer en medio HPi-BSM con glucosa y  $\text{NH}_4\text{Cl}$  hasta final de fase exponencial ( $\text{DO}_{660} = 0,8$ ). En ese momento, el cultivo se dividió en dos partes: una se mantuvo como control y la otra se trató con 50 mg/l de TDTMA. A diferentes tiempos, se determinó el contenido de PL (□) y la cantidad de TDTMA adherido a las células (●) o libre en el medio de cultivo (▲). Las barras representan la media de tres experimentos independientes ( $\pm$  DS,  $n=3$ ). Los valores con asteriscos son significativamente diferentes ( $P \leq 0,05$ ) de acuerdo con el análisis estadístico ANOVA.

Como muestra la **Figura 23**, el contenido de PL en las células aumentó de 21 a 24 nmol de PL/mg de proteína luego de 30 min de contacto con el detergente, alcanzando un valor máximo de, aproximadamente, 26 nmol de PL/ mg de proteína luego de 120 min

de contacto con el TDTMA. En el período comprendido entre los 15 a 120 minutos post adición de TDTMA al medio, la cantidad de detergente adherido a las células disminuyó de 2,16 a 1,72 nmol de TDTMA/ nmol PL, aproximadamente. Acorde con esta disminución, la cantidad de TDTMA libre detectado en el medio de cultivo incrementó de 30 mg/l a 35 mg/l, luego de 60 y 120 min de exposición al detergente, respectivamente (**Figura 23**). Si consideramos que la aparición de MVs libres en el medio de cultivo se detectaron 60 min post adición del detergente, y que, además, contienen TDTMA en su interior ( $4 \pm 0,2$  mg/l TDTMA a los 120 min), es posible sugerir que las moléculas de TDTMA que se encontraban adsorbidas a la superficie celular fueron eliminadas al medio de cultivo, probablemente, a través de la producción de MVs.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la producción de MVs es una respuesta de *P. putida* A (ATCC 12633) al estrés ocasionado por el detergente que le permite al microorganismo la eliminación de concentraciones de TDTMA que probablemente le sean tóxicas. Ratificando este comportamiento son los diversos estudios que sugieren que las MVs se producen como respuesta al estrés ocasionado en la envoltura celular por el crecimiento en condiciones limitantes de Lisina o por la presencia de compuestos anfifílicos que modifican la estructura de la membrana (McBroom y Kuehn, 2007; Tashiro *et al.*, 2012). Así, por ejemplo, en células de *P. putida* IH-2000, ha sido descrito que la producción de vesículas es un mecanismo de tolerancia a tolueno que involucra la eliminación del solvente intercalado en la membrana (Kobayashi *et al.*, 2000).

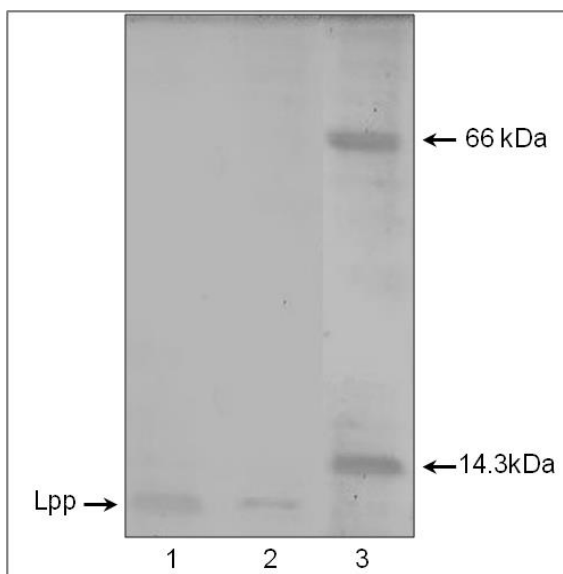
#### **4.11.1-TDTMA y su participación en la biogénesis de MVs por *P. putida***

Diversos modelos han sido propuestos para explicar la formación de MVs en especies de *Pseudomonas* (Mashburn y Whiteley, 2005; Tashiro *et al.*, 2009), en *E. coli* (McBroom *et al.*, 2006; Button *et al.*, 2007; McBroom y Kuehn, 2007) y en *Salmonella typhimurium* (Deatherage *et al.*, 2009). Sin embargo, el mecanismo de formación de vesículas aún no ha sido completamente dilucidado.

En bacterias Gram (-) ha sido descrito que la unión entre la membrana celular y el peptidoglicano mediada por lipoproteínas (Lpp) juega un papel importante en la formación de MVs (Hoekstra *et al.*, 1976). Según este modelo, la formación de vesículas comienza con el desarrollo, hacia el exterior, de protuberancias en la membrana externa, lo cual ocurre principalmente en zonas carentes de Lpp unida al peptidoglicano, lo que causa una unión débil entre la membrana externa y el peptidoglicano.

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio demostraron que células de *P. putida* A (ATCC 12633) crecidas con TDTMA como única fuente de C y N, duplican el

contenido de PL contenidos en su membrana comparado con células crecidas en ausencia del detergente ( $30,00 \pm 5,65$  y  $14,51 \pm 0,76$  nmol PL/mg proteína, respectivamente) (Boeris *et al.*, 2009). Posiblemente, este incremento en el contenido de PL podría llevar a la pérdida de contacto entre la membrana externa y el peptidoglicano debido, principalmente, a la disminución en el contenido de Lpp, lo que facilitaría la formación de MVs en estos sitios específicos. Con el propósito de comprobar este hecho, se procedió al aislamiento de Lpp de células de *P. putida* A (ATCC 12633) crecidas en presencia y ausencia de TDTMA. El complejo Lpp-peptidoglicano fue sometido a tratamiento con lisozima como se describe en la **Sección 3.14.4** de Materiales y Métodos y la fracción soluble obtenida fue resuelta por SDS-PAGE 15%. La tinción con Coomassie Blue R-250 reveló la presencia de una proteína de peso molecular aproximado de 9 KDa (**Figura 24**), la que fue enviada para su análisis por MALDI-TOF. La proteína aislada mostró un 98% de identidad con PP\_5226 (NP\_747327.1), una lipoproteína perteneciente a la familia Lppl de *P. putida* KT2440. (Pseudomonas Genoma Database, www.pseudomonas.com). Se detectó, además, y luego de tratar el complejo Lpp-peptidoglicano con lisozima, una disminución de dos veces del contenido de Lpp para aquellos complejos obtenidos a partir de células crecidas con TDTMA, respecto a lo detectado en complejos obtenidos de células crecidas en ausencia del detergente (**Figura 24** línea 2 y 1, respectivamente). Esta disminución en la cantidad de Lpp podría asociarse con pérdida de áreas de contacto entre la membrana externa y el peptidoglicano, lo que favorecería la producción y liberación de MVs al medio extracelular.



**Figura 24: Lipoproteína aislada de células de *P. putida* A (ATCC 12633).** El complejo LPP-peptidoglicano obtenido de células de *P. putida* A (ATCC 12633) fue digerido con lisozima. La fracción soluble obtenida se sometió a SDS-PAGE y se reveló con Coomassie Blue R-250.

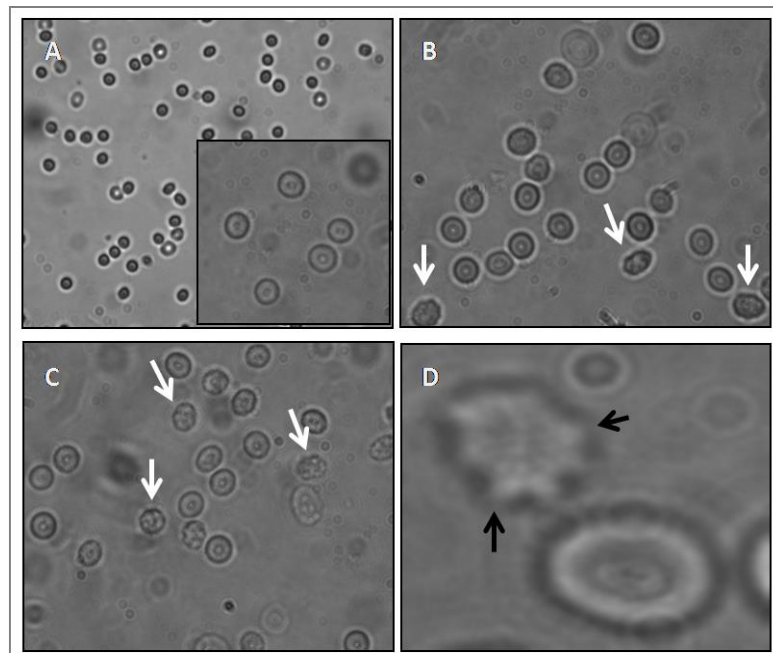
**Línea 1:** Lpp aislada luego del crecimiento con glucosa y  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

**Línea 2:** Lpp aislada luego del crecimiento con TDTMA.

**Línea 3:** marcadores de PM.

La molécula señal 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona (PQS) estimula la producción de MVs a través de la interacción física con la cara externa de la membrana externa, induciendo su curvatura y consecuentemente, la formación de espículas (Schertzer y Whiteley, 2012). Del mismo modo, debido a su naturaleza hidrofóbica y a su capacidad de intercalarse en la membrana celular, el TDTMA podría inducir, de manera exógena, la curvatura de la membrana en células de *P. putida* A (ATCC 12633) y contribuir así a la formación de MVs. Para evaluar esta hipótesis se usó como sistema modelo células de glóbulos rojos (GR), debido a que carecen de núcleo y son incapaces de alterar la expresión génica en respuesta a compuestos exógenos (Schertzer y Whiteley, 2012). Ha sido descrito que las moléculas anfifílicas pueden inducir en los GR crenación (expansion asimétrica de la cara externa de la membrana en relación a la cara interna; formación de espículas) o formación en copa (Sheetz *et al.*, 1976; Sheetz y Singer, 1974; Schertzer y Whiteley, 2012).

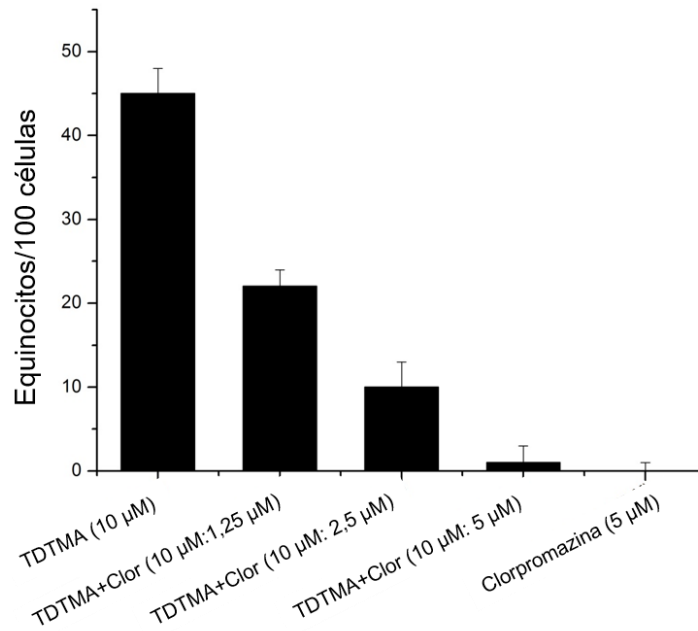
La **Figura 25** muestra los efectos de la adición de TDTMA a una suspensión de GR. Como puede observarse en la **Figura 25A**, 5  $\mu\text{M}$  de TDTMA producen crenación de células de GR dando lugar a la formación de equinocitos (células de GR con protuberancias de la membrana externa). Cuando las células de GR fueron tratadas con 10  $\mu\text{M}$  de TDTMA, se observó una mayor proporción de GR crenados, sugiriendo una respuesta dependiente de la concentración de detergente (**Figura 25B**).



**Figura 25: Efecto del TDTMA sobre la membrana celular de los glóbulos rojos.** Células de GR fueron tratadas o no con TDTMA y observadas por microscopía óptica. **Panel (A):** Suspensión de GR en PBS. **Panel (B) y (C):** GR tratados con 5  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$  de TDTMA, respectivamente. Las flechas blancas señalan los equinocitos. **Panel (D):** Imagen magnificada de células de GR normal y formando equinocitos. Las flechas negras señalan las células con formación de espículas.



La crenación de GR puede ser directamente antagonizada por moléculas que expanden preferencialmente la cara interna de la membrana favoreciendo la formación en copa, tal como la clorpromazina (Sheetz *et al.*, 1976; Schertzer y Whiteley, 2012). La **Figura 26** muestra el efecto que ejerce la clorpromazina sobre células de GR previamente tratadas con TDTMA.

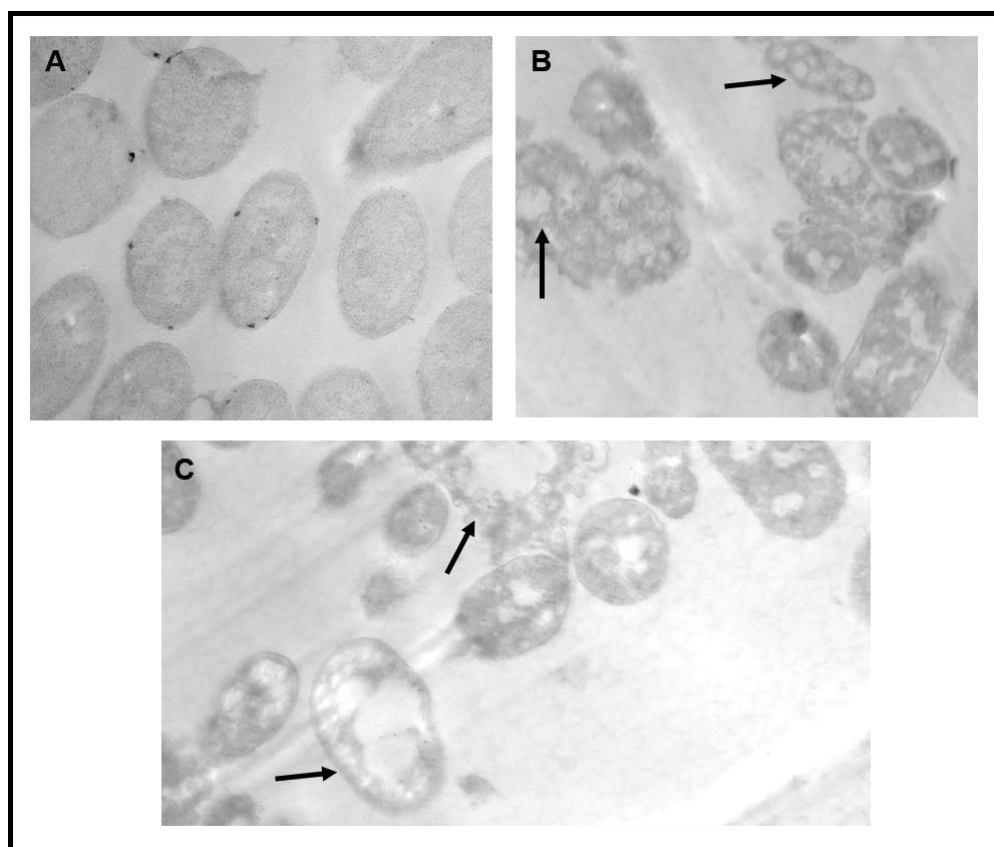


**Figura 26: Efecto de clorpromazina sobre células de glóbulos rojos tratadas con TDTMA.** Células de GR lavadas fueron expuestas a 10 µM de TDTMA con y sin concentraciones variables de clorpromazina (1,25; 2,5 y 5 µM de clorpromazina) y a 5 µM de clorpromazina. Las barras representan el promedio de equinocitos cada 100 células.

Como puede observarse, la adición de este compuesto resultó en un efecto antagonista dependiente de la concentración. La crenación de GR producida por TDTMA fue completamente antagonizada cuando la relación detergente:clorpromazina fue 2:1 (**Figura 26**). Estos resultados demuestran que, por su naturaleza anfifílica, el TDTMA induce la curvatura de membrana, con la consecuente formación de espículas que favorecen la formación de las MVs.

En su conjunto, de acuerdo a los resultados obtenidos, puede concluirse que tanto la disminución en la cantidad de Lpp que lleva a la pérdida de áreas de contacto entre la membrana externa y el peptidoglicano (**Figura 24**), como la capacidad del TDTMA de inducir la curvatura de la membrana (**Figura 25**), contribuyen a la biogénesis de MVs de células de *P. putida* A (ATCC 12633).

#### 4.12- Acumulación de PHAs en el citoplasma de *P. putida* A (ATCC 12633) crecidas con TDTMA.



**Figura 27: Microscopía electrónica de transmisión (TEM).** Células de *P. putida* A (ATCC 12633) se hicieron crecer en HPI-BSM con glucosa y  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (A) o con 50 mg/l de TDTMA (B, C) como única fuente de carbono y nitrógeno hasta final de fase exponencial. Las flechas indican inclusiones intracelulares (B, C).

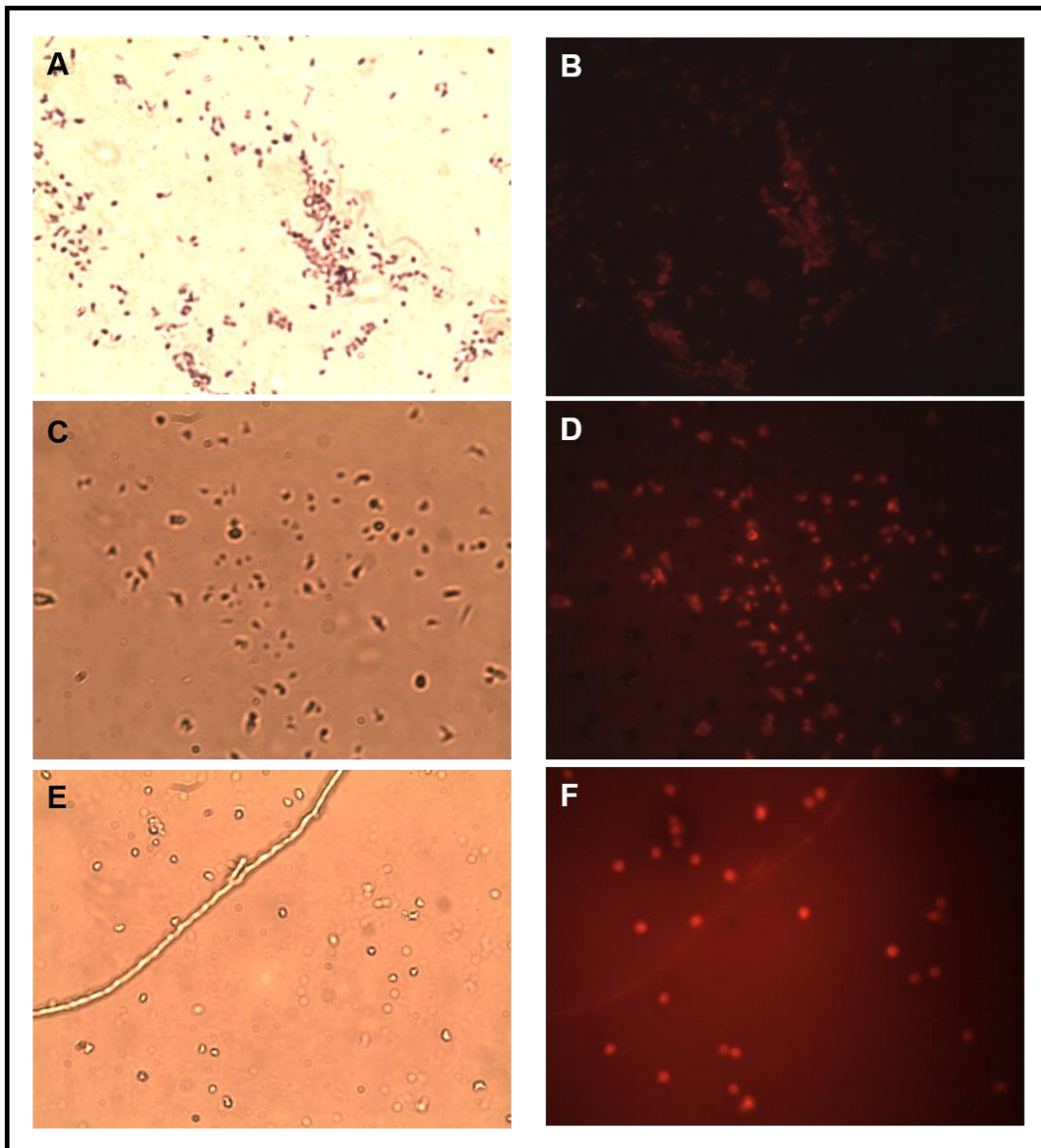
La **Figura 27** muestra las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (TEM) de células de *P. putida* A (ATCC 12633) crecidas en un medio basal con y sin la adición de TDTMA (50 mg/L). En presencia de TDTMA, y como se demostró anteriormente (**Apartado 4.11**), las células presentaron evaginaciones de membrana, las cuales se identificaron como vesículas de membrana externa (MVs) en formación. También se observaron la presencia de inclusiones intracelulares (indicadas con flechas), visualizadas como zonas claras, esféricas y bien delimitadas en el citoplasma (**Figura 27 B y C**). Estas estructuras intracelulares no fueron observadas en células de *P. putida* A (ATCC12633) crecidas con fuentes preferenciales de C y N (**Figura 27, A**).

Este tipo de estructuras intracelulares han sido observadas en células de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 crecidas en presencia de cianida, un compuesto tóxico producido por la actividad minería (Manso Cobos *et al.*, 2015). El estudio y caracterización de estas inclusiones les permitió a estos autores concluir que estas estructuras se corresponden con gránulos de polihidroxialcanoatos (PHAs).

Los PHAs son poliésteres que se acumulan intracelularmente en forma de gránulos con aproximadamente 0,2 mm de diámetro, rodeados por una monocapa de fosfolípidos de 4 nm de espesor con proteínas embebidas (Reddy *et al.*, 2003; Prieto *et al.*, 2012; 2015; Keshavarz y Roy, 2010; Wang *et al.*, 2011).

Con el propósito de determinar si las estructuras intracelulares observadas en *P. putida* A (ATCC 12633) (**Figura 27 B y C**) se corresponden a gránulos de PHAs, se llevaron a cabo tinciones con el colorante fluorescente Nile Blue A. Este colorante presenta gran afinidad por PHAs, y produce fluorescencia naranja cuando se encuentra unido a los gránulos intracelulares del polímero, lo cual se detecta a una longitud de onda de 460nm (Ostle y Holt, 1982; Pierce y Schroth, 1994; Khanna y Srivastava, 2005; Berlanga *et al.*, 2006). Es de hacer notar que las membranas celulares u otros componentes lipídicos no absorben suficiente colorante como para que puedan ser detectados por fluorescencia (Ostle y Holt, 1982; Pierce y Schroth, 1994; Khanna y Srivastava, 2005; Berlanga *et al.*, 2006)

La **Figura 28** muestra células de *P. putida* A (ATCC 12633) crecidas en HPI-BSM con glucosa y NH<sub>4</sub>Cl o con TDTMA (50 mg/L) como única fuente de C y N, teñidas con el colorante Nile Blue A y observadas en microscopio de fluorescencia. Como control (+) de producción de PHAs, las células de *P. putida* A (ATCC12633) se hicieron crecer en LB plus Glucosa 3 % p/v.



**Figura 28:** Tinción de células de *P. putida* A (ATCC12633) con Nile Blue A. Células de *P. putida* A (ATCC 12633) se hicieron crecer en HPI-BSM con glucosa y  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (A, B), en LB plus Glucosa 3 % p/v (control +) (C, D) o en HPI-BSM con 50 mg/l de TDTMA (E, F) como única fuente de C y N hasta final de fase exponencial. Las células se cosecharon y se tiñeron con el colorante Nile Blue A, según lo descrito en Materiales y Métodos (3.15.1). Los preparados fueron visualizados en microscopio de fluorescencia. **Paneles de la izquierda (A, C, E):** Campo claro; **Paneles derecha (B, D, F):** Campo fluorescente.

Como puede observarse, respecto a células crecidas en LB y Glucosa 3 % p/v (control +) (Figura 28, D), las células de *P. putida* A (ATCC12633) crecidas con fuentes preferenciales de C y N (control) (Figura 28, B) mostraron una débil fluorescencia, posiblemente indicativa de una producción basal de los polímeros intracelulares. Sin embargo, en células de *P. putida* A crecidas con TDTMA, se detectan gránulos bien definidos de PHAs que fluorescen de color naranja intenso en el interior celular (Figura 28, F).

Los polímeros de PHAs acumulados intracelularmente constituyen una reserva importante de carbono y energía que permite que las células sobrevivan ante diferentes condiciones de estrés (Khanna y Srivastava, 2005; Keshavarz y Roy, 2010; Poblete-Castro *et al.*, 2012, Prieto *et al.*, 2015). Por ello, es probable que estos compuestos producidos cuando *P. putida* A (ATCC 12633) crece en presencia del detergente formen parte de los mecanismos de adaptación bacteriana que les permiten a las células bacterianas tolerar esta situación de estrés.

## 5. Conclusiones

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

- La respuesta de *P. putida* A (ATCC 12633) frente al estímulo provocado por la exposición, durante cortos períodos de tiempo, al detergente catiónico TDTMA involucra, a nivel de lípidos de membrana, modificaciones en el contenido de PL y en sus AG constituyentes, particularmente con marcada disminución en el contenido de los AGI 16:1 $\Delta$ 9 y 18:1 $\Delta$ 11.

- El detergente catiónico TDTMA ejerce un efecto fluidificante inmediato sobre las membranas bacterianas y *P. putida* A (ATCC 12633) responde a este efecto disminuyendo el contenido de AGI. Esta respuesta no solo contribuye a compensar el efecto fluidificante producido por el detergente, sino también a bloquear el acceso de las moléculas del detergente al interior de la membrana debido a una mayor compactación de la misma.

- El incremento del contenido de PG, con su alto contenido en AGS, y la disminución del contenido de CL, con su elevada proporción de AGI, dan lugar a una estructura de membrana más rígida que le permite a *P. putida* A (ATCC 12633) contrarrestar el efecto fluidificante del TDTMA.

- En *P. putida* A (ATCC 12633), el gen *mf539821* codifica para una actividad  $\Delta^9$  desaturasa. Células de *E coli* BL21 conteniendo *mf539821*, son capaces de desaturar el sustrato exógeno 16:0- [1- $^{14}$ C], confirmando la expresión activa del producto génico. Dado que la actividad enzimática se inhibe por TDTMA, HDTMA y C<sub>14</sub>BDMA, se plantea que, en *P. putida* A (ATCC 12633), el mecanismo aeróbico de síntesis de AGI es específicamente inhibido por detergentes catiónicos.

- *P. putida* A (ATCC 12633) libera vesículas de membrana externa cuando crece en presencia de TDTMA. El incremento en el contenido de PL, y con ello la pérdida de contacto entre la membrana externa y el péptidoglucano, sumado a la capacidad del TDTMA de inducir curvatura de membrana, favorecen la biogénesis de las vesículas. Dado el contenido de TDTMA en el interior de las vesículas, la producción de las mismas constituye un mecanismo de eliminación de detergente.

*En conjunto, los resultados presentados en este trabajo de Tesis profundizan el conocimiento de los mecanismos involucrados, a nivel de membrana, en la respuesta y adaptación de *P. putida* A (ATCC 12633) al estrés generado por detergentes catiónicos.*

*La respuesta de *P. putida* A (ATCC 12633) al detergente catiónico TDTMA es un proceso multifactorial, que involucra cambios en el contenido de fosfolípidos y ácidos grasos de su membrana y modificaciones estructurales, con la producción y liberación de vesículas de membrana externa.*

*La capacidad de *P. putida* A (ATCC 12633) de tolerar y responder al estrés por detergentes catiónicos ponen de manifiesto el potencial de esta cepa para ser utilizada como vehículo en procesos de biorremediación en ambientes que contengan estos compuestos.*

## 6. Perspectivas

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

**Estudios de regulación en la síntesis de AGI en *P. putida* A (ATCC12633):** En *P. aeruginosa*, la síntesis de AGI puede ocurrir por la vía anaeróbica, también denominada biosíntesis *de novo*, o por la vía aeróbica, mediada por enzimas desaturasas. En otras *Pseudomonas*, tal como *P. fluorescens*, sólo ha sido descrito el mecanismo anaeróbico. En este trabajo de tesis se demostró que, en *P. putida* A (ATCC 12633), la inhibición de una actividad  $\Delta^9$ desaturasa, responsable de catalizar la desaturación aeróbica de 16:0 a 16:1 $\Delta^9$ , es en parte, responsable de los cambios observados a nivel del contenido de AGI en respuesta al efecto fluidificante del TDTMA (**Capítulo II** de este trabajo de tesis). Dado que no se conoce, sería apropiado determinar si en *P. putida* A (ATCC 12633), es activa o no la biosíntesis *de novo* de AGI y analizar si este mecanismo de biosíntesis está involucrado, o no, en producir cambios en el contenido de AGI en respuesta a la presencia de detergentes catiónicos. Para ello, alícuotas de células de *P. putida* crecidas con glucosa/NH<sub>4</sub> hasta mitad de fase exponencial, serán incubadas en condiciones anaerobias, bajo atmósfera de N<sub>2</sub>, con sustrato precursor radiactivo ([1-<sup>14</sup>C]-acetato), y se expondrán o no a TDTMA durante diferentes tiempos. Los lípidos serán extraídos y los FAMES obtenidos marcados radioactivamente serán separados de acuerdo al número de dobles enlaces, eluidos de la sílica y cuantificados en contador de centelleo líquido. De acuerdo a los cambios detectados, se procederá al estudio de las actividades enzimáticas claves posiblemente involucradas en este mecanismo de síntesis (Fab A o  $\beta$ -hidroxidecanoil-ACP deshidratasa y Fab B o  $\beta$ -cetoacil-ACP sintasa I).

**Metabolismo de polihidroxicanoatos (PHAs) en células de *P. putida* A (ATCC 12633):** Entre otros aspectos analizados en este trabajo de tesis, cuando *P. putida* A (ATCC 12633) crece en presencia de TDTMA como única fuente de C y N, se detectaron, en el citoplasma celular, zonas claras, bien delimitadas, que posiblemente se corresponden con gránulos de PHAs (**Capítulo III**). Teniendo en cuenta que la presencia de detergentes catiónicos en el medio constituye una situación de estrés para las bacterias, la acumulación de PHAs como reserva de C y energía constituiría una estrategia de supervivencia para los microorganismos, ya que estos gránulos podrían ser movilizados según las necesidades celulares. Por ello, se plantea estudiar el metabolismo de PHAs en *P. putida* A (ATCC 12633) y establecer la relación entre la acumulación y/o



degradación de estos compuestos y los mecanismos de tolerancia bacteriana frente al estrés ocasionado por TDTMA.

**Mecanismos de control en la desaturación de AG en la respuesta al estrés generado por detergentes catiónicos:** Ha sido descrito que la regulación de algunas enzimas desaturadas, tales como la  $\Delta^5$  desaturasa de *Bacillus subtilis*,  $\Delta^9$  desaturasa de *Saccharomyces cerevisiae* y esteroil-CoA desaturasa de ratón, involucra a vías de señalización por sistemas de dos componentes. En estos sistemas, sensores integrados en las membranas celulares convierten la información obtenida de las propiedades físicas de las membranas en señales que controlan la transcripción de los genes que codifican para este tipo de enzimas. Sería apropiado conocer si la expresión de la enzima  $\Delta^9$  desaturasa involucrada en la respuesta de *P. putida* A (ATCC12633) al estrés ocasionado por detergentes catiónicos responde a la regulación mediada por alguno de estos sistemas de dos componentes. Por lo que antecede, se plantea determinar si una proteína sensora (histidin-quinasa) se activa frente al estrés producido por la presencia de detergente catiónico y desencadena la fosforilación del regulador de respuesta (aspartato quinasa) involucrado en activar/inhibir la síntesis de la enzima desaturasa, regulando también, probablemente, otras enzimas involucradas en la síntesis de PL.

## 7. Bibliografía

- Adler, M., Tritton T, R., (1988) Fluorescence depolarization measurements in oriented membranes. *Biophys J.* 53:989–1005.
- Aguilar, P.S., Cronan, J.E., Jr. and de Mendoza, D. A (1998) *Bacillus subtilis* gene induced by cold shock encodes a membrane phospholipid desaturase. *J Bacteriol*, 180:2194–2200.
- Alonso, D.L., García-Maroto, F., Rodríguez-Ruiz, J., Garrido, J.A., Vilches, M.A. (2003) Evolution of the membrane-bound fatty acid Desaturases. *Biochemical Systematics and Ecology* 31:1111–1124.
- Altabe, S.G., Aguilar, P., Caballero, G.M., and de Mendoza, D. (2003) The *Bacillus subtilis* acyl lipid desaturase is a delta5 desaturase. *J Bacteriol* 185: 3228–3231.
- Appanna, V.D., Gzásób, 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. Ed. Prentice Hall.España IV Edición. Capítulo 10.
- Ayub, N.D., Tribelli, P.M., López, N. (2009) Polyhydroxyalkanoates are essential for maintenance of redox state in the Antarctic bacterium *Pseudomonas* sp. 14-3 during low temperature adaptation *Extremophiles* 13:59–66
- Azubuiké, C. C., Chikere, Ch. B. y Okpokwasili, G.Ch. (2016) Bioremediation techniques—classification based on site of application: principles, advantages, imitations and prospects.
- Baysse C. and O’Gara F. (2007) Rol of membrane structure during stress signalling and adaptation in *Pseudomonas*. En: *Pseudomonas*. Juan Luis Ramos and Alain Filloux (eds)193-224.
- Belda, E., van Heck, R.G.A., Lopez-Sanchez, M. J., Cruveiller, S., Barbe, V., Fraser, C., Klenk, H. P., et al (2016) *Environ. Microbiol* 18, 3403–3424
- Berleman J. and Auer M. (2013) The role of bacterial outer membrane vesicles for intra and interspecies delivery. *Environmental Microbiology*. 15: 347–354.
- Bernal, P., Muñoz-Rojas, J., Hurtado, A., Ramos, J. L. and Segura, A. (2007). A *Pseudomonas putidacardioli* synthesis mutant exhibits increased sensitivity to drugs related to transport functionality. *Environ. Microbiol.*9:1135-45.
- Bernal, P., Segura, A. and Ramos, J. L. (2009). Compensatory role of the *cis/trans*-isomerase and cardiolipin synthase in the membrane fluidity of *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *Environ Microbiol*, 9:1658-1664.
- Bianchi, V., Ceccanti, B., Masciandaro, G., Doni, S., Macci, C. and Iannelli, R. (2010) Coupling vermiremediation with phytoremediation technology to enhance the efficiency of reclamation of polluted marine sediments International Journal of Global Environmental Issues. 10:3-4.
- Bisbiroulas, P., Psylou, M., Iliopoulou, I., Diakogiannis, I., Berberi, A. and Mastronicolis, S. K. (2010). Adaptational changes in cellular phospholipids and fatty acid composition of the food pathogen *Listeria monocytogenes* as a stress response to disinfectant sanitizer benzalkonium chloride. *Let Appl Microbiol.*52, 275-280.
- Bligh, E.G. y Dyer, W.J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification *J. Biochem. Physiol.* 37:911-918.
- 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 aluminum. *Applied Microbiology*.49, 491-496.
- Boeris, P.S. (2011) Respuesta de *Pseudomonas* frente al estrés ocasionado por detergentes catiónicos y su relación con la capacidad de biodegradar estos compuestos. Tesis Doctoral. F.C.E.F.Q. y N. UNRC.
- Boeris, P.S., Domenech, C.E. and Lucchesi, G.I.. (2007) Modification of phospholipid composition in *Pseudomonas putida* A ATCC 12633 induced by contact with tetradecyltrimethylammonium *J. Appl. Microbiol.* 4:1048-1054.
- Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*72: 248-254.
- Brannigan, G., Tamboli, A.C., and Brown, F.L.H. (2004) The role of molecular shape in bilayer elasticity and phase behavior. *J Chem Phys*121: 3259–3271.
- Braun, V. (1975). Covalent lipoprotein from the outer membrane of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 415, 335–377
- Braun, V. y 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.

- Bresan, S., Sznajder, A., Hauf, W., Forchhammer, K., Pfeiffer, D. and Jendrossek, D. (2016) Polyhydroxyalkanoate (PHA) Granules Have no Phospholipids. *Scientific Reports*, 6:26612.
- Brock, T.D. and Madigan, M.T. (1993) *Microbiología*. VI edición. Ed. Prentice Hispanoamericana. México.
- Brycki, B., Waligorska M, Szulc A (2014) The biodegradation of monomeric and dimeric alkylammonium surfactants. *J Hazard Mater* 280:797-815.
- Buist, H.P. (2004) Catalytic diversity of fatty acid desaturases. *Tetrahedron: Assimetry*.15: 2779:2785.
- Button, J., Silhavy, T., and Ruiz, N. (2007) A suppressor of cell death caused by the loss of sigmaE downregulates extracytoplasmic stress responses and outer membrane vesicle production in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 189: 1523–1530.
- Cao, Y., Xian, M., Yang, J., Xu, X., Liu, W., Li, L. (2010) Heterologous expression of stearyl-acyl carrier protein desaturase (S-ACP-DES) from *Arabidopsis thaliana* in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 69: 209-14.
- Cerrone, F., Sánchez-Peinado, M.M., Juárez-Jiménez, B., González-López, J., Pozo, C. (2010) Biological treatment of two-phase olive mill wastewater (TPOMW, alpeorujo): polyhydroxyalkanoates (PHAs) production by *Azotobacter* strains. *J Microbiol Biotechnol* 20(3):594–601
- 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.
- Chazarreta Cifré, L., Alemany, M., de Mendoza, D., Altabe, S. (2013) Exploring the Biosynthesis of Unsaturated Fatty Acids in *Bacillus cereus* ATCC 14579 and Functional Characterization of Novel Acyl Lipid Desaturases. *Applied and Environmental Microbiology*. 79: 6271–6279.
- Chen YM, Geurts M, Sjollem SB, Kramer NI, Hermens JL, Droge ST (2014) Acute toxicity of the cationic surfactant C12-benzalkonium in different bioassays: how test design affects bioavailability and effect concentrations. *Environ Toxicol Chem* 33:606-615.
- Chihib N., Tierny Y., Mary P., Hornez J. (2005) Adaptational changes in cellular fatty acid branching and unsaturation of *Aeromonas* species as a response to growth temperature and salinity. *Food Microbiol.*102:113-119
- Clara M., Scharf S., Scheffknecht C. and Gans O. (2007) Occurrence of selected surfactants in untreated and treated sewage. *Water Res.*41:4339-4348.
- Clarke, P. (1982) The metabolic versatility of *Pseudomonas*. *Antonie Van Leeuwenhoek. Biomedical and life sciences* 48:105-130.
- Clarke, P. and Richmond, M.H. (1975) *Genetic and biochemistry of Pseudomonas*. Ed. John Wiley and Sons. New York, USA.
- Cobos, I.M., Ibáñez García, M.I., de la Peña Moreno, F., Paloma Sáez Melero, L., Luque-Almagro, V.M., Castillo Rodríguez, F., Roldán Ruiz, M.D., Prieto Jiménez, M.A., Moreno Vivián, C. (2015) *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344, a cyanide-degrading bacterium with by-product (polyhydroxyalkanoates) formation capacity. *Microb Cell Fact* 14:77
- Cota-Gomez, A., Vasil, A.I., Kadurugamuwa, J., Beveridge, T.J., Schweizer, H.P., and Vasil, M.L. (1997) PlcR1 and PlcR2 are putative calcium-binding proteins required for secretion of the hemolytic phospholipase C of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 65:2904–2913.
- Cristofolini AL, Turiello MP, Sanchis EG, Cufre G, Merkis CI. (2012) Effect of feed restriction and realimentation with monensin supplementation on placental structure and ultrastructure in anglo-nubian goats. *ISRN Vet Sci* 2012:1-10.
- Cronan, J.E., Jr. (2002) Phospholipid modifications in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.*, 5:202-205
- Cronan, J.E., Jr. and Gelmann, E.P. (1975). Physical properties of membrane lipids: biological relevance and regulation. *Bacteriol.*39:232–256.
- Cronan J. Jr y Rock C.O. (1996) Biosynthesis of membrane lipids. En: *E. coli* and *Salmonella*. Cellular and Molecular Biology. Neidhardt F, Curtis R III, Ingraham J, Link E, Low K, Magasanik W, Reznikoff W, Riley M, Schaechter M, Umarger H (eds).
- Cullis PR and Verkleij AJ. (1979) Modulation of membrane structure by Ca<sup>2+</sup> and dibucaine as detected by 31P NMR. *Biochim Biophys.*552:546–551.
- de Mendoza D. and Schujman G.E. (2005) Lipid Biosynthesis. En: *Encyclopedia of Microbiology*. Moselio Schaechter (ed). Oxford, Elsevier. 219-228.
- De Vos, P. y De Ley, J. (1983) Intra- and intergeneric similarities of *Pseudomonas* and *Xanthomonas* ribosomal ribonucleic acid cistrons. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 33, 487–509.
- Deathage, B.L., Lara, J.C., Bergsbaken, T., Barrett, S.L.R., Lara, S., and Cookson, B. (2009) Biogenesis of bacterial membrane vesicles. *Mol Microbiol* 72: 1395–1407.
- 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.

- Deo, A.A., Kulkarni, A.S. y Meshram, S.U. (2010) Monocationic surfactant induced ultra structural changes in antibiotic resistant *Escherichia coli*. Indian J Med Res 131, , pp 825-828
- 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*73:36-40.
- Dowhan W. (1997). Molecular basis for membrane phospholipids diversity: Why are there so many lipids?. *Annu Rev Biochem* 66:199-232.
- Dubnicková M., Rezanka T. and Koscová H. (2006) Adaptive changes in fatty acids of *E. coli* strains exposed to a Quaternary Ammonium Salt and an amine oxide. *Folia Microbiol.* 51: 371-374.
- Eberlein, Ch., Baumgarten, T., Starke, S. y Heipieper, H.J. (2018) Immediate response mechanisms of Gram-negative solvent-tolerant bacteria to cope with environmental stress: cis-trans isomerization of unsaturated fatty acids and outer membrane vesicle secretion. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 102:2583–2593
- Edman, K. and Ericson, I. (1987) Phospholipid and fatty acid composition in mitochondria from spinach (*Spinaciaoleracea*) leaves and petioles *J. Biochem.*243:575-578.
- Enoch, H.G., Catala, A. and Strittmatter, P. (1976) Mechanism of rat liver microsomal stearyl-CoA desaturase. Studies of the substrate specificity, enzyme-substrate interactions, and the function of lipid. *J Biol Chem*, 251:5095–5103.
- Escapa, I.F, García, J.L, Buhler, B., Blank, L.M, y Prieto M.A. (2012) The polyhydroxyalkanoate metabolism controls carbon and energy spillage in *Pseudomonas putida*. *Environmental Microbiology*
- Ferrer I. and Furlong E.T. (2001) Accelerated solvent extraction followed by on-line solid-phase extraction coupled to ion trap LC/MS/MS for analysis of benzalkonium chlorides in sediment samples. *Anal Chem* 74:1275-80.
- Fiske, C.H. and SubbaRow, Y. (1925) Methods in Enzymology. 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 non persistent *Listeria monocytogenes* isolates. *Appl Environ Microbiol*, 77:6559-6569.
- Frias, A., Manresa, A., de Oliveira, E., López-Iglesias, C. y Mercade, E. (2010). Membrane vesicles: a common feature in the extracellular matter of cold-adapted Antarctic bacteria. *Microb. Ecol.* 59, 476–486 .
- Games, L.M., King, J.E. and Larson, R.J. (1982) Fate and distribution of a Quaternary ammonium surfactant, octadecyltrimethylammonium chloride (OTAC), in wastewater treatment. *Enviromen. Sci. Technol.*16:483-488.
- Garcia MT, Campos E, Sanchez-Leal J, Ribosa I (1999) Effect of the alkyl chain length on the anaerobic biodegradability and toxicity of quaternary ammonium based surfactants. *Chemosphere* 38:3473-3483.
- Ghosh, A.K., Ramakrishnan, G. and Rajasekharan, R. (2008) YLR099C (ICT1) encodes for a soluble acylCoA dependent lysophosphatidic acid acyl tranferase responsible for enhanced phospholipid synthesis on organic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 283:24525-24533.
- 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, P. and Moore, L.E. (2005) Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *J. Appl. Microbiol.* 99:703-715.
- Gomila, M., Peña, A., Mulet, M., Lalucat, J. y García-Valdés, E. (2015) Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*
- Goñi, F. (2014) The basic structure and dynamics of cell membranes: An update of the Singer–Nicolson model *Biochimica et Biophysica Acta* 1838.1467–1476
- Gabińska-Sota E (2011) Genotoxicity and biodegradation of quaternary ammonium salts in aquatic environments. *J Hazard Mater* 195:182-187.
- Grenier, D. and Mayrand, D. (1987) Functional characterization of extracellular vesicles produced by *Bacteroides gingivalis*. *Infect. Immun.* 55:111:117.
- Grogan, D.W. and Cronan Jr, J.E. (1997) Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria. *Microbiol. Mol. Rev.*61:429:441.
- Guérin-Méchin L., Dubois-Brissonnet F., Heyd B. and Leveau J.Y. (1999) Specific variations of fatty acid composition of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 induced by Quaternary Ammonium

- Compounds and relation with resistance to bactericidal activity. *Journal of Applied Microbiology*. 18: 735-742
- 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.*1619:70-76.
- Hanahan, D. (1983) Studies of transformation *Escherichia coli* of plasmids. *J. Mol. Biol.* 166:557-580.
- Hartig, C., Loffhagen, N. and Harms, H. (2005). Formation of *trans* fatty acids is not involved in growth-linked membrane adaptation of *Pseudomonas putida*. *Appl Environm. Microbiol.*1915–1922.
- Hazel, J.R., Williams, E.E. (1990). The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment. *Prog. Lipid Res.* 29: 167–227.
- 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. and de Bont J.A.M. (1994) Adaptation of *Pseudomonas putida* S12 to Ethanol and Toluene at the Level of Fatty Acid Composition of Membranes. *Applied and Environmental Microbiology*.4440-4444
- Heipieper, H. J., Meinhardt, F., and 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.
- Heipieper, H.J., Keweloh, H., and Rehm, H.J. (1991) Influence of phenols on growth and membrane permeability of free and immobilized *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1213-1217.
- Henderson, R. and Tocher, D.(1992). Thin layer chromatography. In: Hamilton R, Hamilton S (eds) Lipid analysis a practical approach. Oxford University Press, Oxford-New York-Tokyo.
- Heredia, R.M., Boeris, P.S, Lifourrena A.S., Bergero M.F., López G.A, Lucchesi, G.I. (2016) Release of outer membrane vesicles in *Pseudomonas putida* as a response to stress caused by cationic surfactants. *Microbiology*. 162, 813-822.
- 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.
- Huijbregts, R. P.H., de Kroon, A.I.P.M., de Kruij, B Topology and transport of membrane lipids in bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta* 1469 (2000) 43^61
- Ioannou CJ, Hanlon GW, Denyer SP (2007) Action of disinfectant quaternary ammonium compounds against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Ch* 51:296-306.
- 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.
- Kadurugamuwa, J.L., and 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.
- Kadurugamuwa, J.L., and Beveridge, T.J. (1996) Bacteriolytic effect of membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* on other bacteria including pathogens: conceptually new antibiotics. *J Bacteriol* 178: 2767–2774.
- Keshavarz, T. and Roy, I. (2010) Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. *Current Opinion in Microbiology*. 13:321–326
- 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.
- Kim S., Han Shim J. and Tack Suh Y. (2002) Changes in membrane fluidity and fatty acid composition of *Pseudomonas putida* CN-T19 in response to toluene. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*66: 1945-1950.
- Kobayashi, H., Uematsu, K., Hirayama, H. and Horikoshi, K. (2000) Novel toluene elimination system in a toluene-tolerant microorganism.*Journal of Bacteriology*.182: 6451–6455.
- Kondakova, T., D'Heygère, F., Feuilloley, M.J., Orange, N., Heipieper, H.J. y Poc, C. D. Glycerophospholipid synthesis and functions in *Pseudomonas*. *Chemistry and Physics of Lipids* 190 (2015) 27–42
- 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.

- 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* 215:209-222.
- Kulp A. and Kuehn J.M. (2010) Biological Functions and Biogenesis of Secreted Bacterial Outer Membrane Vesicles. *Annu Rev Microbiol.*64: 163–184.
- Kummerer K, Eitel A, Braun U, Hubner P, Daschner F, Mascart G, Milandri M, Reinthaler F, Verhoef J (1997) Analysis of benzalkonium chloride in the effluent from European hospitals by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with post-column ion-pairing and fluorescens detection. *J Chromatogr* 774:281-286.
- Kusters, R., Dowhan, W. and de Kruijff, B. (1991) Negatively charged phospholipids restore prePhoE translocation across phosphatidylglycerol-depleted *Escherichia coli* inner membranes *J. Biol. Chem.*266:8659-8662.
- 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.
- Laopaiboon L, Hall SJ, Smith RN (2002) The effect of a quaternary ammonium biocide on the performance and characteristics of laboratory-scale rotating biological contactors. *J Appl Microbiol* 93:1051-1058.
- Leigh, M.B. (2006) Methods for rhizoremediation research. In: Phytoremediation and Rhizoremediation. Ed. Mackova M, Dowling, D. and Macek T. Springer, Netherlands. pp 33–52.
- Li X, Brownawell BJ (2010) Quaternary Ammonium Compounds in Urban Estuarine Sediment Environments - A Class of Contaminants in Need of Increased Attention? *Environ Sci Technol* 44:7561-7568.
- Li, Z.S., Clarke, A.J., and Beveridge, T.J. (1996). A major autolysin of *Pseudomonas aeruginosa*: subcellular distribution, potential role in cell growth and division, and secretion in surface membrane vesicles. *J. Bacteriol.*178:2479:2488.
- Liang Z, Ge F, Zeng H, Xu Y, Peng F, Wong M (2013) Influence of cetyltrimethyl ammonium bromide on nutrient uptake and cell responses of *Chlorella vulgaris*. *Aquat Toxicol* 138-139, 81-87.
- 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.
- Loffeld, B. and Keweloh, H. (1996). *Cis/trans* isomerization of unsaturated fatty acids as
- Loffhagen N., Hartig C. y 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 G.A., Heredia, R.M., Boeris, P.S, Lucchesi, G.I. (2016).Content of cardiolipin of the membrane and sensitivity to cationic surfactants in *Pseudomonas putida*. *Journal of Applied Microbiology*. Aceptado. En Prensa.
- 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.
- Los, D.A. and Murata, N. (1998) Structure and expression of fatty acid desaturases. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1394:3-15.
- Loughlin, M. F., Jones, M. V. and Lambert, P.A. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* adapted to benzalkonium chloride show resistance to other membrane-active agents but not clinically relevant antibiotics. *J Antimicrob Agents Chemother.*46: 631-639.
- Lucchesi, G.I., Lisa, A.T. and Domenech, C.E. (1989) Choline and betaine as inducer agents of *Pseudomonas aeruginosa* phospholipase C activity in high phosphate medium *FEMS Microbiol.Lett.*57:335-338.
- MacDonald I. A. and Kuehn J.M. (2013) Stress-Induced Outer Membrane Vesicle Production by *Pseudomonas aeruginosa*.*Journal of Bacteriology*195: 2971–2981.
- 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.
- Magnuson, K., Jackowski, S., Rock, C. O. y Cronan, C. E Jr. *Microbiol. Regulation of fatty acid biosynthesis in Escherichia coli.* Rev. 1993, 57(3):522. MICROBIOLOGICAL REVIEWS, Sept. 1993, p. 522-542 Vol. 57, No. 3
- Mansilla M., Cybulski L., Albanesi D. and de Mendoza D. (2004) Control of membrane lipid fluidity by molecular Thermosensors. *J Bacteriol*186:6681-6688.

- Mansilla, M.C., and de Mendoza, D. (2005) The *Bacillus subtilis* desaturase: a model to understand phospholipid modification and temperature sensing. *Arch Microbiol* 183:229–235.
- Mansilla, M.C., Banchio, C. and de Mendoza, D. (2008) Signalling Pathways Controlling Fatty Acid Desaturation Chapter 3 in *Lipids in Health and Disease*. P.J. Quinn, X. Wang (eds.), 71:99.
- 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.
- Markowicz, A., Plociniczak, T., Piotrowska-Seget, Z. (2010) Response of bacteria to heavy metals measured as changes in FAME profiles *Polish J. of Environ.Stu.*19: 957-965
- Martinez Carballo E., Sitka A., Gonzalez Barreiro C., Kreuzinger N., Furrhacker M., Scharf S., Gans O. (2007) 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. *Environ Pollut*145:489-496.
- Martins dos Santos, V.A.P., Heim, S., Moore, E.R.B., Strätz, M. and Timmis, K.N. (2004) Insights into the genomic basis of niche specificity of *Pseudomonas putida* KT2440 *Environ.Microbiol.*6:1264-1286.
- Mashburn, L.M., and Whiteley, M. (2005) Membrane vesicles traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote. *Nature* 437: 422–425.
- Matsumoto, K. (2001) Dispensable nature of phosphatidylglycerol in *Escherichia coli*: dual roles of anionic phospholipids *Mol. Microbiol.*39:1427-1433.
- McBain A.J., Ledder, R.G., Moore, L.E., Catrenich, C.E. and Gilbert, P. (2004) Effects of quaternary-ammonium-based formulations on bacterial community dynamics and antimicrobial susceptibility *Appl. Environ. Microbiol.* 70:3449-56.
- McBroom, A.J., and Kuehn, M.J. (2007) Release of outer membrane vesicles by Gram-negative bacteria is a novel envelope stress response. *Mol Microbiol* 63: 545–558.
- Mcdonnell, G. and Russell, A.D. (1999) Studies on the biodegradability of some cationic surfactant *Rev. Clin.Microbiol.*12:147-179.
- McElhaney RN. (1982) Current Topics in Membranes and Transport In: Razin S, Rottem R, editors., vol. 17. London, UK: Academic Press; p. 280– 317.
- 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.
- Merino F., Rubio S. and Perez Bendito D. (2003) Solid-phase extraction of amphiphiles based on mixed hemimicelle/admicelle formation: Application to the concentration of benzalkonium surfactants in sewage and river water. *Anal Chem*75:6799-6806.
- Morita, Y., Tomida, J. and Kawamura, Y. (2014). Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials. *Front Microbiol*, 4:422.
- Morrison, W. and Smith, L.(1964).Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride. *J Lipid Res.*5: 600–608.
- Mrozika, A., Piotrowska-Seget, Z., Labuzek, S. (2004) Changes in whole cell-derived fatty acids induced by naphthalene in bacteria from genus *Pseudomonas* *Microbiol. Res.*159:87–95.
- Mrozika A., Labuzek S., Piotrowska-Seget, Z. (2005) Changes in fatty acids composition in *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas stutzeri* during naphthalene degradation. *Microbiological Research*160: 149-157.
- Murínová, S. Y Dercová, K. (2014) Response Mechanisms of Bacterial Degraders to Environmental Contaminants on the Level of Cell Walls and Cytoplasmic Membrane. *International Journal of Microbiology*. Volume 2014, Article ID 873081, 16 pages
- Murphy, D.J. (1999). Production of novel oils in plants. *Curr. Opin. Biotechnol* 10:175–180.
- Mykytczuk, N.C.S., Trevors, J.T., Leduca, L.G. and Ferroni, G.D.(2007).Fluorescence polarization in studies of bacterial cytoplasmic membrane fluidity under environmental stress. *Progress in Biophysics and Molecular Biology.*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.
- 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.
- Nalecz-Jawecki G, Grabinska-Sota E, Narkiewicz P (2003) The toxicity of cationic surfactants in four bioassays. *Ecotoxicol Environ Saf* 54:87-91.397.
- 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., Kabelitz, N. and 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<sup>+</sup>-uptake systems. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*105:585–589.
- Nicolson, G. L. (2014) The Fluid—Mosaic Model of Membrane Structure: Still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years . *Biochimica et Biophysica Acta* 1838. 1451–1466
- Nikaido, H. (2003) Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane permeability Revisited. *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS*, p. 593–656 Vol. 67, No. 4
- Nishiyama N., Toshima Y. and Ikeda Y. (1995) Biodegradation of alkyltrimethylammonium salts in activated sludge. *Chemosphere*30:593-603.
- 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., Kunisawa, R., Contopoulou, R., and Doudoroff, M. (1973) Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *Int. J.Syst. Bacteriol.*, 23, 333–339.
- 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.
- Palleroni, N.J. y Moore, E.R.B. (2004) Taxonomy of pseudomonads: experimental approaches. *Pseudomonas*. I. Genomics, Life Style and Molecular Architecture (Ramos JL, ed), pp. 3–44. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, NY.
- Paulsen, I.T., Brown, M.H. and Skurray, R.A. (1996) Proton-depedent multidrug efflux systems *Microbiology*. 60:575-608.
- Paulucci N. S, Dardanelli M. S y García de Lema M. (2014) Biochemical and molecular evidence of a  $\Delta 9$  fatty acid desaturase from *Ensifer meliloti* 1021. *Microbiological Research*. 169: 463–468
- Pepi, M., Heipieper, H.J., Fischer, J., Ruta, M., Volterrani, M., y Focardi, SE. (2008) Membrane fatty acids adaptive profile in the simultaneous presence of arsenic and toluene in *Bacillus sp.* ORAs2 and *Pseudomonas sp.* ORAs5 strains *Extremophiles* 12:343–349 DOI 10.1007/s00792-008-0147-9
- Pereira, S.L., Leonard, A.E. and Mukerji, P. (2003) Recent advances in the study of fatty acid desaturases from animals and lower eukaryotes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 68: 97-106.
- Phetsuksiri, B., Jackson, M., Scherman, H., McNeil, M., Besra, G.S., Baulard, A.R., Slayden, R.A., DeBarber, A.E., Barry, C.E., 3rd, Baird, M.S., Crick, D.C. and Brennan, P.J. (2003) Unique mechanism of action of the thiourea drug isoxyl on *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem*, 278:53123–53130.
- 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*.2:253–261.
- 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.
- Pinkart, H.C. and White, D.C. (1997) Phospholipid biosynthesis and solvent tolerance in *Pseudomonas putida* strains *J. Bacteriol.*176:4219-4226.
- Poblete-Castro, I., Escapa I.F., Jäger, Ch., Puchalka, J., Ming Chi Lam, C., Schomburg, D., Prieto, M.A., dos Santos, M.V.AP. (2012) The metabolic response of *P. putida* KT2442 producing high levels of polyhydroxyalkanoate under single- and multiple-nutrient-limited growth: Highlights from a multi-level omics approach. *Microbial Cell Factories*, 11:34
- Prieto, A., Escapa, I.F., Martínez, V., Dinjaski, N., Herencias, C., de la Peña, F., Tarazona, N., Revelles, O. (2015) A holistic view of polyhydroxyalkanoate metabolism in *Pseudomonas putida* *Environmental Microbiology*.
- Ramos, J.L., Duque, E., Gallegos, M.T., Godoy, P., Ramos-Gonzalez, M.I., Rojas, A., Teran, W. and Segura, A. (2002). Mechanism 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.
- Reddy, C.S.K., Ghai. R., Rashmi, Kalia, V.C (2003) Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology* 87:137–146
- Renner, L.D. and Weibel, D.B. (2011) Cardiolipin microdomains localize to negatively curved regions of *Escherichia coli* membranes *Proc. Natl. Acad. Sci.*108:6264-6269.
- Ring, M.W., Bode, E., Schwar, G., and Bode, H.B. (2009) Functional analysis of desaturases from the myxobacterium *Myxococcus xanthus*. *FEMS Microbiol Lett* 296:124–130.



- Roden, J. A., Wells, D. H., Chomel, B. B., Kasten, R. W. & Koehler, J. E. (2012). Hemin binding protein C is found in outer membrane vesicles and protects *Bartonella henselae* against toxic concentrations of hemin. *Infect. Immun.* 80, 929–942
- Romantsov, T., Guan, Z. and Wood, J.M. (2009) Cardiolipin and the osmotic stress responses of bacteria *Biochim. Biophys. Acta* 1788:2092-2100.
- Rühl J., Hein E.M, Hayen H., Schmid A. y Blank L.M. (2012) The glycerophospholipid inventory of *Pseudomonas putida* is conserved between strains and enables growth condition-related alterations. *Microbial Biotechnology* 5: 45–58
- Russell N. (1984) Mechanisms of thermal adaptation in bacteria: blueprints for survival *Trends Biochem. Sci* 9:108-112.
- 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.
- Sandbacka M, Christianson I, Isomaa B (2000) The acute toxicity of surfactants on fish cells, daphnia magna and fish-a comparative study. *Toxicol in Vitro* 14:61-68.
- Schertzer, J. W. y Whiteley, M. (2013) Bacterial Outer Membrane Vesicles in Trafficking, Communication and the Host-Pathogen Interaction. *J Mol Microbiol Biotechnol* 23:118–130
- Schertzer, J.W. and Whiteley, M. (2012) A bilayer-couple model of bacterial outer membrane vesicle biogenesis. *MBio* 3, e00297-11.
- Schweizer H.P. (2004). Fatty acid biosynthesis and biologically significant acyl transfer reactions in *Pseudomonas*. En: *Pseudomonas: Biosynthesis of Macromolecules and Molecular Metabolism*. Ramos J (ed).
- Shanklin, J., Whittle, E. and Fox, B.G. (1994) Eight histidine residues are catalytically essential in a membrane-associated iron enzyme, stearyl-CoA desaturase, and are conserved in alkane hydroxylase and xylene monooxygenase. *Biochemistry*, 33:12787–12794.
- Sheetz, M.P. and Singer, S.J. (1974) Biological membranes as bilayer couples. A molecular mechanism of drug-erythrocyte interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 71:4457– 4461.
- Sheetz, M.P., Painter, R.G., Singer, S.J. (1976) Biological membranes as bilayer couples. III. Compensatory shape changes induced in membranes. *J. Cell Biol.* 70:193–203.
- Sikkema, J., de Bont, J.A.M. and Poolman, B. (1994) Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes *J. Biol. Chem.* 269:8022-8028.
- Silby, M. W., Winstanley, C., Godfrey, S. A.C., Levy, S. B. y Jackson, R. W. *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. 2011
- 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.
- Sklar, L.A. (1984). Fluorescence polarization studies of membrane fluidity, where do we go from here. In: Kates, M., Morris, L. (Eds.), *Biomembranes*, vol. 12. Membrane Fluidity. Plenum Press, New York, pp. 99–131.
- Sperling, P., Ternes, P., Zank, T.K. and Heinz, E. (2003) The evolution of desaturases Prostaglandins *Leukot Essent Fatty Acids.* 68: 73-95.
- Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrener, 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.
- Suresh, B. and Ravishankar, G.A. (2004) Phytoremediation: a novel and promising approach for environmental clean-up *Crit. Rev. Biotechnol.* 24:97-124.
- Sütterlin H, Alexy R, Coker A, Kümmerer K (2008) Mixtures of quaternary ammonium compounds and anionic organic compounds in the aquatic environment: Elimination and biodegradability in the closed bottle test monitored by LC–MS/MS. *Chemosphere* 72:479-484.
- 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.
- 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 Environl Microbiol* 73:1797-1802.
- Tamboli, D.P., Kurade, M.B., Waghmode, T.R., Joshi, S.M., Govindwar, S.P. (2010) Exploring the ability of *Sphingobacterium sp.* ATM to degrade textile dye. Direct Blue GLL, mixture of dyes and textile effluent and production of polyhydroxyhexadecanoic acid using waste biomass generated after dye degradation. *J Hazard Mater* 182:169–176

- Tashiro, Y., Inagaki, A., Shimizu, M., Ichikawa, S., Takaya, N., Nakajima-Kambe, T., *et al.* (2011). Characterization of phospholipids in membrane vesicles derived from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biosci Biotechnol Biochem* 75:605–607.
- Tashiro, Y., Uchiyama, H. and Nomura, N. (2012) Multifunctional membrane vesicles in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology* 14: 1349–1362.
- Tezel, U and Pavlostathis, S. G (2015) Quaternary ammonium disinfectants: microbial adaptation, degradation and ecology *Current Opinion in Biotechnology* , 33:296–304
- Tezel, U., Pierson, J.A. and Pavlostathis, S.G. (2006) Fate and effect of quaternary ammonium compounds on a mixed methanogenic culture. *Water Res.* 40: 3660–3668.
- 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
- Tobin, K.M., O'Connor, K.E. (2005) Polyhydroxyalkanoate accumulating diversity of *Pseudomonas* species utilising aromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiol Lett* 253(1):111–118
- Tocher, D.R., Leaver, M.J. and Hodgson, P.A. (1998). Recent advances in the biochemistry and molecular biology of fatty acyl desaturases *Prog Lipid Res.* 37: 73-117.
- Trevors, J. T (2003). Fluorescent probes for bacterial cytoplasmic membrane research. *J Biochem Biophys Methods.* 57: 87-103.
- 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.
- Urtuvia, V., Villegas, P., González, M., Seeger, M. (2014) Bacterial production of the biodegradable plastics polyhydroxyalkanoates. *International Journal of Biological Macromolecules* 70:208–213
- 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.
- vanGinkel C.G., Pomper, M.A., Stroo, C.A. and Kroon. A.G.M. (1995) Biodegradation of fatty amines *Tenside Surfact. Deterg.* 32:355-359.
- Verma, J.P. y Jaiswal, D.K. (2016) Book Review: Advances in Biodegradation and Bioremediation of Industrial Waste.
- 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.
- Vodovar, N., Vallenet, D., Cruveiller, S., Rouy, Z., Barbe, V., Acosta, C., Cattolico, L., Jubin, C., Lajus, A., Seguren, 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.
- VonWallbrunn, 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.
- Wang, H., Zhou, X., Qian Liu, G.Q.Z. (2011) Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate homopolymers by *Pseudomonas putida*. *Appl Microbiol Biotechnol* 89:1497–1507
- Weber F.J., y de Bont J.A. (1996) Adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes. *Biochim. Biophys.* 1286: 225-245.
- Weber, F.J., Ooijkaas, L.P., Schemen, R.M.W., Hartmans, S. and de Bont, J.A.M. (1993) Adaptation of *Pseudomonas putida* to high concentrations of styrene and other organic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:3502-3504.
- White, S.W, Zheng, J., Zhang, Y.M., Rock, C.O. (2005). The structural biology of type II fatty acid biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 74:791– 831.
- 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.
- Yonezuka, K., Shimodaira, J., Tabata, M., Ohji, S., Hosoyama, A., Kasai, D., Yamazoe, A., Fujita, N., Ezaki, T. y Fukuda, M. (2016) Phylogenetic analysis reveals the taxonomically diverse distribution of the *Pseudomonas putida* group. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 63, 1–10.

- Zanini GP, Ovesen RG, Hansen HCB, Strobel BW (2013) Adsorption of the disinfectant benzalkonium chloride on montmorillonite. Synergistic effect in mixture of molecules with different chain lengths. *J Environ Manage* 128:100-105.
- Zhang C, Tezel U, Li K, Liu D, Ren R, Du J, Pavlostathis SG (2011) Evaluation and modeling of benzalkonium chloride inhibition and biodegradation in activated sludge. *Water Res* 45:1238-1246.
- Zhang, Y.M. and Rock, C.O. (2008) Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nat Rev Microbiol.* 6:222–33.
- 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*. *MolMicrobiol*60:260-273.

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

**Heredia R.M.**, Boeris P.S., Biasutti A., Lopéz G., Paulucci N. and Lucchesi G.I. “Coordinated response of phospholipids and acyl components of membrane lipids in *Pseudomonas putida* A (ATCC 12633) under stress caused by cationic surfactants.” (2014) *Microbiology* 160, 2618–2626 (ISSN 1350-0872).

**Heredia, R.M.**, Boeris, P.S, Lifourrena A.S., Bergero M.F., Lòpez G.A, Lucchesi, G.I. “ Release of outer membrane vesicles in *Pseudomonas putida* as a response to stress caused by cationic surfactants” .(2016) *Microbiology*. 162, 813-822. (ISSN 1350-0872).

Lòpez G.A., **Heredia, R.M.**, Boeris, P.S, Lucchesi, G.I.” Content of cardiolipin of the membrane and sensitivity to cationic surfactants in *Pseudomonas putida*”. (2016). *Journal of Applied Microbiology*. 121, 1004-14. (ISSN 1364-5072).

Lucchesi, GI, Bergero, F, Boeris P, Lòpez, G, **Heredia, R**, Liffourrena, A. (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 *Alginic Acid: Chemical Structure, Uses and Health Benefits*. Nova Publishers. EE.UU.