

Tesis de Licenciatura

Supervivencia y desarrollo de resistencia al estrés en Pseudomonas oleovorans productoras de polihidroxialcanoatos (PHAs) en aguas naturales

Ruiz, Jimena A.

Tesis presentada para obtener el grado de Licenciado en
Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis de licenciatura de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Six-Year Bachelor's Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Ruiz, Jimena A.. (). Supervivencia y desarrollo de resistencia al estrés en Pseudomonas oleovorans productoras de polihidroxialcanoatos (PHAs) en aguas naturales. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000648_Ruiz

Cita tipo Chicago:

Ruiz, Jimena A.. "Supervivencia y desarrollo de resistencia al estrés en Pseudomonas oleovorans productoras de polihidroxialcanoatos (PHAs) en aguas naturales". Tesis de Licenciado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. .

http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000648_Ruiz

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

FCEyN BIBLIOTECA

Tesis de Licenciatura

Supervivencia y desarrollo de resistencia
al estrés en *Pseudomonas oleovorans*
productoras de polihidroxialcanoatos
(PHAs) en aguas naturales

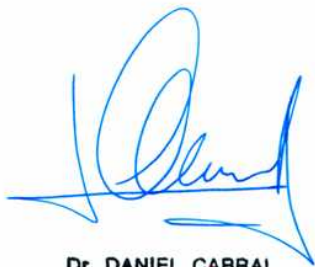
Nº 0648E

Autora: Jimena Ruiz

Directora: Dra. Beatriz Méndez

Co-Directora: Dra. Nancy López

**Lugar de trabajo: Laboratorio de Genética Bacteriana,
Depto. de Química Biológica - FCEyN- UBA**



Dr. DANIEL CABRAL
Sub-Director "PRHIDEB"



E. D. AMONTE



ALBERTO VIALE



Nancy I. Lopez



B. HENDEZ



Jimena Ruiz

El presente trabajo está especialmente dedicado:

A mis padres
A Lorena, Mara y Vanesa
A Sergio.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Beatriz Méndez, por darme la oportunidad de realizar este trabajo. Por todo lo aprendido durante estos años en su laboratorio y por su constante apoyo y estimulación.

A la Dra. Nancy López por su infinita paciencia para responder todas mis preguntas. Por el tiempo y la dedicación que me brindó durante la realización de la presente tesis.

A Julia Pettinari, Gustavo Vázquez, Mirtha Floccari, Daniel Silberschmidt, Mónica Giacomodonato y Laura Raiger, por las horas compartidas en el laboratorio y por estar siempre dispuestos a ayudarme o aconsejarme cuando lo necesité.

A los integrantes de los Laboratorios del Departamento de Química Biológica, por brindarme su colaboración en todo momento. A la gente de Virología además por permitirme utilizar el microscopio de UV.

A Sandra Weicman, por los litros de Caldo Nutritivo de cada semana y a Francisca Caruso por las decenas de placas para autoclavar.

A todos mis compañeros de cursada por los días de estudio, apuntes e informes compartidos. Gracias a todos, y muy especialmente a: Sonia, por las partidas de rol (aunque sea mala jugadora); Romina, por estar siempre dispuesta a escucharme; Irma, por aguantarme (que no es fácil).

A mis padres por confiar en mí y apoyarme durante estos siete años.

A mis hermanas, por el cariño que me brindan todos los días.

A Sergio, por bancarme durante estos meses, por ayudarme y estar siempre a mi lado.

INDICE

INDICE	4
ABREVIATURAS UTILIZADAS	7
RESUMEN	8
INTRODUCCIÓN	9
I. Los POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs)	10
II. <i>Pseudomonas oleovorans</i> Y LA PRODUCCION DE PHA.	10
III. IMPORTANCIA DE LA ACUMULACION DE PHA EN LA SUPERVIVENCIA BACTERIANA.	12
IV. MECANISMOS DE RESISTENCIA AL ESTRES.	13
IV.A) DESARROLLO DE MECANISMOS DE RESISTENCIA ADAPTATIVOS	13
IV.B) DESARROLLO DE MECANISMOS DE RESISTENCIA EN FASE ESTACIONARIA	14
V.) EVALUACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA BACTERIANA EN AMBIENTES NATURALES.	16
OBJETIVOS E HIPÓTESIS DEL TRABAJO	17
MATERIALES Y MÉTODOS	19
I) MEDIOS DE CULTIVO, CEPAS Y PLÁSMIDOS UTILIZADOS	20
II) CURVA DE CRECIMIENTO Y ACUMULACIÓN DE PHA DE <i>P. oleovorans</i> GPo1 Y GPo500.	22
II.A) CONDICIONES DE CULTIVO Y TOMA DE MUESTRAS	22
II.B) CUANTIFICACIÓN DE PHA	22
A. Preparación y metanólisis de las muestras	22
B. Análisis por cromatografía gaseosa	22
III) TINCIONES ESPECÍFICAS PARA DETERMINAR LAS INCLUSIONES DE PHA	23
Coloración fluorescente con Azul del Nilo A (Nile Blue A)	23
Procedimiento	23
IV) OBTENCIÓN DE LAS CEPAS DE <i>P. oleovorans</i> DERIVADAS DE GPo1 Y GPo500 RESISTENTES A KANAMICINA, MEDIANTE LA INSERCIÓN DEL TRANSPOSÓN Tn5.	23
V) EXPERIMENTOS DE SUPERVIVENCIA EN MICROCOSMOS DE AGUA.	24
V.A) MUESTRAS DE AGUA	24
V.B) PREPARACIÓN DE LOS MICROCOSMOS	24
V.C) EXPERIMENTOS DE SUPERVIVENCIA DE <i>E.coli</i> EN MICROCOSMOS DE AGUA DE POZO.	24
V.D) EXPERIMENTOS DE SUPERVIVENCIA DE <i>P.oleovorans</i> EN MICROCOSMOS DE AGUA DE RÍO ESTÉRIL.	25

V.E) EXPERIMENTOS DE SUPERVIVENCIA DE <i>P. oleovorans</i> EN MICROCOSMOS DE AGUA DE RÍO CONTENIENDO LA COMUNIDAD MICROBIANA NATURAL.	25
VI) EXPERIMENTOS DE RESISTENCIA AL ESTRÉS EN <i>P. oleovorans</i> GPo1 Y GPo500.	26
VI.A) EXPOSICIÓN AL ETANOL Y A LA ALTA TEMPERATURA DE <i>P.oleovorans</i> EN FASE DE CRECIMIENTO EXPONENCIAL.	26
VI.B) EXPOSICIÓN AL ETANOL Y A LA ALTA TEMPERATURA DE <i>P. oleovorans</i> EN CONDICIONES DE ACUMULACIÓN DE PHA.	26
VI.C) EXPOSICIÓN AL ETANOL Y A LA ALTA TEMPERATURA DE <i>P. oleovorans</i> EN MICROCOSMOS DE AGUA DE RÍO ESTÉRIL.	27
RESULTADOS	28
I) SUPERVIVENCIA DE <i>E. coli</i> DH5α Y <i>E. coli</i> UBA 3-22 EN MICROCOSMOS DE AGUA DE POZO.	29
II) CARACTERIZACION DE <i>P. oleovorans</i> GPo1 Y GPo500 EN CUANTO AL CRECIMIENTO: VERIFICACIÓN DE LAS CEPAS Y DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES DE ACUMULACIÓN.	30
III) SUPERVIVENCIA DE <i>P. oleovorans</i> GPo1 Y GPo500 EN MICROCOSMOS DE AGUA DE RIO.	31
III.A) CONDICIONES EXPERIMENTALES	31
III.B) MICROCOSMOS DE AGUA DE RÍO ESTÉRIL	32
III.b.1) Supervivencia en condiciones de esterilidad	32
III.b.2) Observación de la morfología celular	33
III.C) MICROCOSMOS DE AGUA DE RÍO NO ESTÉRIL.	36
III.c.1) Obtención de <i>P. oleovorans</i> transconjugantes de Tn5.	36
III.c.2) Supervivencia en presencia de las bacterias autóctonas del río.	36
IV) RESISTENCIA A DISTINTOS AGENTES DE ESTRÉS EN <i>P. oleovorans</i> GPo1 Y GPo500.	37
IV.A.) EFECTOS DEL SHOCK TÉRMICO Y DE LA EXPOSICIÓN AL ETANOL EN CULTIVOS DE <i>P. oleovorans</i> EN FASE DE CRECIMIENTO EXPONENCIAL.	38
IV.B.) EFECTOS DEL SHOCK TÉRMICO Y DE LA EXPOSICIÓN AL ETANOL EN CULTIVOS DE <i>P. oleovorans</i> EN CONDICIONES DE ACUMULACIÓN DE PHA.	38
IV.C.) EFECTOS DEL SHOCK TÉRMICO Y DE LA EXPOSICIÓN AL ETANOL EN <i>P. oleovorans</i> GPo1 Y GPo500 EN MICROCOSMOS DE AGUA DE RÍO ESTÉRIL.	40
DISCUSIÓN	44
I. SUPERVIVENCIA DE <i>P. oleovorans</i> EN MICROCOSMOS DE AGUA DE RÍO	45
II. CAMBIOS EN LA MORFOLOGÍA CELULAR Y DESARROLLO DE MECANISMOS DE RESISTENCIA EN <i>P. oleovorans</i> EN MICROCOSMOS DE AGUA DE RÍO ESTÉRIL.	46
III. CONCLUSIONES	50
IV. INVESTIGACIONES FUTURAS	51
BIBLIOGRAFÍA	52

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLA 1. CEPAS BACTERIANAS Y PLÁSMIDOS UTILIZADOS.	21
FIGURA 1	29
FIGURA 2	30
FIGURA 3	32
FIGURA 4	34
FIGURA 5	37
FIGURA 6	39
FIGURA 7	40
FIGURA 8	41
FIGURA 9	42

ABREVIATURAS UTILIZADAS

Amp: Ampicilina

Cm: cloranfenicol

D.O.: densidad óptica

Km: kanamicina

min.: minutos

O.N.: overnigth

PHB: polihidroxibutirato

PHAmcl: polihidroxialcanoatos de longitud de cadena mediana

PHAs: polihidroxialcanoatos

Tet: tetraciclina

ufc.: unidades formadoras de colonias

RESUMEN

En la naturaleza, las bacterias se encuentran con una gran variedad de condiciones ambientales, donde la más frecuente es la escasez de uno o más nutrientes esenciales. En general, ante esta situación la expresión coordinada de mecanismos de protección les permite tolerar la exposición a múltiples formas de estrés. Comprender el comportamiento bacteriano en ambientes naturales es de gran importancia para analizar la capacidad de las bacterias de responder y sobrevivir ante condiciones limitantes para el crecimiento.

Las *Pseudomonas* fluorescentes, pertenecientes al grupo de homología rRNAI son bacterias Gram-negativas, quimioheterótrofas y productoras de pigmentos verde amarillentos. Debido a que estas bacterias tienen requerimientos nutricionales muy simples, puede encontrárselas en una amplia variedad de ambientes naturales. Por este motivo, y debido a que existe una gran conservación en la información genética y organización de la misma entre las distintas especies pertenecientes a este grupo, las *Pseudomonas* fluorescentes resultan adecuadas para el estudio de la supervivencia en el ambiente.

Los polihidroxialcanoatos (PHAs) son polímeros de reserva bacterianos cuya acumulación ha sido considerada una estrategia para aumentar la supervivencia en ambientes cambiantes. En el presente trabajo se utilizaron microcosmos de agua de río (estériles y no estériles) para analizar la supervivencia de una cepa mutante de *Pseudomonas oleovorans* (especie perteneciente al grupo de las *Pseudomonas* fluorescentes) incapaz de degradar el PHA acumulado, y compararla con la supervivencia de una cepa salvaje. Debido a que, en los microcosmos las bacterias se encontrarían ante condiciones de escasez de nutrientes, es de esperar que las mismas desarrollen respuestas de protección contra distintos agentes de estrés. Por otro lado, la incapacidad para utilizar el PHA acumulado, podría llegar a tener alguna influencia en el desarrollo de las respuestas de resistencia. Para comprobarlo, ambas cepas se sometieron a tratamientos de exposición al etanol y a shock térmico. Los resultados obtenidos mostraron que la cepa mutante tenía una menor supervivencia en microcosmos de agua de río estéril y no estéril y, además, desarrollaba menor resistencia contra los dos agentes de estrés utilizados, en particular contra el shock térmico.

INTRODUCCIÓN

I. LOS POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs)

Los poli(3-hidroxicanoatos) (PHAs) son poliésteres de 3-hidroxiácidos sintetizados por una gran variedad de bacterias como material de reserva energética. Estos polímeros se depositan intracelularmente en forma de cuerpos de inclusión y pueden llegar a representar más del 90% del peso seco celular.

El PHA más estudiado es el poli(3-hidroxibutirato) (PHB), un homopolímero lineal de D(-)-3-hidroxibutirato que fue aislado y caracterizado por Lemoigne en 1925. El PHB fue detectado por primera vez en *Bacillus megaterium*, encontrándose luego en distintas especies de los géneros *Alcaligenes*, *Azotobacter* y *Pseudomonas* (Dawes y Senior, 1973).

II. *Pseudomonas oleovorans* Y LA PRODUCCION DE PHA.

Las *Pseudomonas* fluorescentes constituyen un grupo de bacterias que se caracterizan por su capacidad para producir pigmentos verde amarillentos. Son bacilos Gram-negativos, quimioheterótrofos con flagelo polar y pertenecen al grupo I de homología de rRNA (Palleroni y col., 1973). Debido a su capacidad para utilizar una gran variedad de compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía, estas bacterias pueden encontrarse en una amplia diversidad de hábitats en la naturaleza. Son microorganismos de gran importancia ecológica en el suelo y en el agua, ya que son responsables de la degradación de muchos compuestos solubles derivados de la descomposición de plantas y animales. Además, poseen características que las hacen adecuadas como agentes de control biológico, como por ejemplo la producción de antibióticos, la liberación de sideróforos al medio y la síntesis de CNH, entre otras (O' Sullivan y O' Gara, 1992).

En el año 1983, se encontró que *Pseudomonas oleovorans*, una bacteria perteneciente al grupo de las *Pseudomonas* fluorescentes, era capaz de sintetizar poli(3-hidroxiocanoato) cuando crecía utilizando octano como fuente de carbono (DeSmet, 1983). Luego, mediante una investigación más detallada, se descubrió que el polímero acumulado estaba formado por (R)-3-hidroxiocanoato y (R)-3-hidroxihexanoato como componentes mayoritarios y minoritarios, respectivamente (Lageveen y col., 1988). Posteriormente, se encontró que, además de *P. oleovorans*, otras *Pseudomonas* fluorescentes, como *P.putida* y *P.aeruginosa*, sintetizaban y acumulaban en grandes cantidades poli(3-hidroxicanoatos) de cadena de longitud mediana formados por monómeros de 6 a 14 átomos de carbono (PHA mcl), cuando se cultivaban en un medio con alcanos, alcoholes o ácidos alcanóicos como fuente de carbono (Haywood y col., 1988;

Huisman y col., 1989). En estas bacterias, los productos intermediarios de la β - oxidación de ácidos grasos se derivan hacia la biosíntesis de PHA.

Algunas especies de *Pseudomonas* fluorescentes - como *P. putida* y *P. aeruginosa* - son capaces de sintetizar PHAmcl compuestos principalmente de 3-hidroxidecanoato, utilizando gluconato como única fuente de carbono (Haywood y col., 1990; Timm y Steinbüchel, 1990). En estas especies, la síntesis *de novo* de ácidos grasos produce un derivado del 3-hidroxidecanoato que se utiliza como sustrato para la síntesis de PHA. En un trabajo realizado recientemente en *P. putida* se logró clonar el gen *phaG*, que codifica para la proteína intermediaria entre la síntesis *de novo* de ácidos grasos y la síntesis de PHA (Bernd y col., 1998). La expresión heteróloga de *phaG* en *P. oleovorans*, que es incapaz de sintetizar PHA a partir de gluconato, posibilitó la síntesis de este poliéster mediante la utilización de dicho azúcar como única fuente de carbono.

En la mayoría de las cepas de *Pseudomonas*, la biosíntesis y acumulación de PHAmcl ocurre cuando se les provee de un exceso en la fuente de carbono y, además, se restringe la proliferación celular mediante la limitación de nutrientes esenciales para el crecimiento, como el nitrógeno, el azufre, el fosfato o el oxígeno. (Lageveen y col., 1988; Kessler y col., 1998). Si las condiciones cambian, permitiendo nuevamente la proliferación, o si la fuente de carbono externa se agota, los PHAmcl son degradados por depolimerasas intracelulares y metabolizados como fuente de carbono y energía.

El PHA puede degradarse tanto en forma intracelular, por depolimerasas intracelulares de cepas productoras, como extracelularmente, mediante depolimerasas extracelulares específicas. Las depolimerasas extracelulares son secretadas por muchos microorganismos para la utilización del PHA que permanece en el ambiente luego de la muerte de las bacterias productoras.

Los PHAs poseen propiedades biotecnológicas de interés, pues a partir de estos polímeros pueden elaborarse plásticos biodegradables rígidos o flexibles. De acuerdo al número de carbonos de las unidades que los componen varían las propiedades físicas de los plásticos. La composición de los monómeros de los PHAmcl sintetizados por las *Pseudomonas* está influenciada por el sustrato agregado al medio de cultivo (Preusting y col., 1990). La capacidad de estas bacterias para incorporar una importante cantidad de grupos funcionales diferentes a los PHAs extiende el rango de propiedades físicas y de potenciales aplicaciones de estos poliésteres.

III. IMPORTANCIA DE LA ACUMULACION DE PHA EN LA SUPERVIVENCIA BACTERIANA.

En la naturaleza, existe una gran variedad de recursos y condiciones que pueden influenciar el crecimiento bacteriano, como ser la temperatura, el pH, la presencia de sustancias tóxicas, la concentración y disponibilidad de nutrientes. Como consecuencia, las bacterias han desarrollado diversos mecanismos de adaptación que les permiten sobrevivir a un amplio rango de condiciones ambientales.

La acumulación y posterior degradación de polímeros de reserva intracelulares, tales como los PHA, ha sido considerada una estrategia utilizada por las bacterias para incrementar su supervivencia en ambientes cambiantes. Los PHAs son utilizados como fuente de carbono y energía en condiciones de escasez de nutrientes (Matin y col., 1979; Kjelleberg y col., 1993) para el enquistamiento y la esporulación (Anderson y Dawes, 1990) y también como fuente de poder reductor (Henrysson y McCarty, 1993).

En caso de agotamiento de la fuente de carbono externa, tanto las *Pseudomonas* como aquellas otras bacterias capaces de sintetizar PHA pueden recurrir a la degradación del polímero previamente acumulado. Hayward y col. (1959) observaron que el contenido intracelular de PHA de especies de *Pseudomonas*, *Rhizobium* y *Spirillum* alcanzaba un máximo y luego disminuía cuando la bacteria alcanzaba la fase estacionaria del crecimiento.

Inicialmente, la ventaja en la acumulación de PHAs ante condiciones nutricionales desfavorables se demostró comparando células con grandes cantidades de PHA con células sin PHA acumulado (Dawes y Senior, 1973; Okon e Itzigsohn, 1992) y especies capaces de acumular el polímero con aquellas deficientes en su síntesis (Matin y col., 1979). Sin embargo, las condiciones que llevan a la acumulación o el agotamiento de PHA determinan que la bacteria se encuentre en diferentes condiciones fisiológicas, mientras que la comparación de diferentes especies no proporciona resultados concluyentes. La disponibilidad de mutantes deficientes en la síntesis de PHA en nuestro laboratorio nos permitió resolver estos problemas. Trabajos previos, realizados con cepas salvajes y deficientes en la síntesis de PHB de *Alcaligenes eutrophus* y *Bacillus megaterium* en aguas naturales, demostraron que aquellas cepas capaces de sintetizar el polímero de reserva tenían mayor supervivencia y capacidad de competencia con las bacterias autóctonas que sus correspondientes mutantes (López y col., 1995). Resultados similares fueron obtenidos cuando se comparó la supervivencia de las mismas cepas de *B. megaterium*, utilizando microcosmos de suelo (López y col., 1998). Estos resultados sugieren que la ausencia de los genes

involucrados en la síntesis de PHA disminuye la supervivencia y la capacidad de competencia bacteriana en ambientes naturales.

IV. MECANISMOS DE RESISTENCIA AL ESTRÉS.

IV.A) DESARROLLO DE MECANISMOS DE RESISTENCIA ADAPTATIVOS

Otra característica destacable con relación a la supervivencia bacteriana en ambientes naturales es el desarrollo de mecanismos de protección contra la exposición a varios agentes de estrés. Estudios realizados principalmente en *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* demostraron que las bacterias son capaces de responder a distintas formas de estrés físico y ambiental mediante la inducción de un set específico de proteínas características de cada tipo de estrés (Gottesman, 1984). Las proteínas dentro de cada set y los genes que las codifican constituyen sistemas globales de control; ejemplos bien caracterizados incluyen la respuesta al shock térmico (Neidhardt y col., 1984), la respuesta SOS (Walker, 1984), el estrés oxidativo (Christman y col., 1985) y la “respuesta estricta” (Gallant, 1979).

En algunos casos, las proteínas asociadas con la respuesta a un agente estresante pueden ser inducidas durante la exposición a otros agentes. Por ejemplo *S. typhimurium* sintetiza algunas proteínas de respuesta a shock térmico cuando se expone a agua oxigenada (Christman y col., 1985; Morgan y col., 1986) y etanol (Morgan y col., 1986). En *E. coli* tanto la exposición a altas temperaturas como al etanol ocasionan la inducción de las proteínas de shock térmico (Van Bogelen y col., 1987). Resultados obtenidos más recientemente en *P. putida* sometida a dosis subletales de agua oxigenada demostraron que se inducían proteínas que también se encontraban en respuesta a altas temperaturas y alta osmolaridad (Givskov y col., 1994).

Asimismo, se ha demostrado un efecto de protección cruzada para algunos sistemas globales de control que comparten proteínas en común. Experimentos realizados en *E. coli*, mostraron que esta bacteria desarrollaba resistencia contra el estrés térmico ante la exposición a dosis adaptativas (no letales) de agua oxigenada o etanol (VanBogelen y col., 1987); igualmente *S. typhimurium* adaptada al estrés oxidativo mostraba un incremento en la resistencia contra temperaturas elevadas (Christman y col., 1985). Finalmente *P. putida* era resistente al etanol y al estrés oxidativo cuando era sometida a altas temperaturas (Givskov y col., 1994)

IV.B) DESARROLLO DE MECANISMOS DE RESISTENCIA EN FASE ESTACIONARIA

El crecimiento bacteriano en el laboratorio es una situación idealizada que raramente ocurre en la naturaleza debido principalmente, a la escasez de nutrientes necesarios para el crecimiento. Por este motivo, las condiciones que los microorganismos encuentran en sus ambientes naturales son semejantes a las de la fase estacionaria en el laboratorio.

La mayoría de las bacterias han desarrollado diversos mecanismos que les permiten sobrevivir a la escasez de nutrientes esenciales, para poder reiniciar el crecimiento cuando la situación es nuevamente propicia. Dichos mecanismos involucran cambios secuenciales en la fisiología celular (Dow y col., 1983; Morita, 1985) y cambios menores en su ultraestructura (Morita, 1985; Kjelleberg y col., 1987).

En algunas bacterias, condiciones nutricionales desfavorables inducen una serie de estadios morfológicos de diferenciación que finalizan con la formación de estructuras de resistencia al estrés, como por ejemplo la formación de cistos en *Azotobacter* sp. o endosporas en *Bacillus* sp. Los mecanismos de adaptación en bacterias no-diferenciadas ocurren en ausencia de cambios morfológicos tan fácilmente detectables, sin embargo, las mismas también desarrollan respuestas de resistencia. Dichas respuestas son el resultado de la inducción de un set de proteínas comúnmente denominadas: “proteínas de estrés” (Matin, 1991). Estas proteínas se inducen en *E. coli* y otras enterobacterias durante la entrada a la fase estacionaria del crecimiento.

La técnica de electroforesis de proteínas en dos dimensiones se utiliza para revelar el perfil global de síntesis de proteínas de las células (O’Farrel, 1975). La misma se ha aplicado para el estudio de la respuesta generada ante la escasez de nutrientes (condiciones que se encuentran durante la fase estacionaria del crecimiento) en *E. coli*, *S. typhimurium* y ciertas bacterias marinas, entre las que se incluyen *Vibrio* sp. En respuesta al agotamiento de la fuente de carbono, se inducen en *E. coli* al menos 30 polipéptidos, y dicha inducción ocurre en forma secuencial (Groat y Matin, 1986; Groat y col., 1986). Algunas de estas proteínas son sintetizadas en forma transitoria durante las fases tempranas del proceso, mientras que otras tienen un patrón de síntesis más persistente con picos a distintos tiempos.

En *E. coli* y *S. typhimurium* se hicieron los primeros y más completos estudios sobre la regulación de los genes que estarían involucrados en la adquisición de resistencias durante la fase estacionaria o en condiciones de escasez de nutrientes. Estos estudios demostraron que la mayoría de estos genes se encuentran bajo control de *rpoS* (Groat y col., 1986; Lange y Hengge-Aronis, 1991; McCann y col., 1991). Este gen codifica para una subunidad sigma alternativa de la RNA polimerasa (σ^S), cuya expresión se induce durante la fase estacionaria del crecimiento.

Dentro de los genes que se encuentran bajo su regulación podemos mencionar:

- El gen *katE*, que codifica para la catalasa HP_{II}, una de las dos catalasas estructuralmente diferentes que se encuentran en *E. coli*. Esta enzima previene el daño oxidativo, ya que actúa destruyendo las moléculas reactivas del oxígeno, evitando así que reaccionen con componentes celulares. La catalasa HP_{II} se induce aproximadamente 30 veces durante la entrada a la fase estacionaria, y dicha inducción es dependiente de *rpoS* (Schellhorn y Hassan, 1988; Mulvey y col., 1990).
- Genes involucrados en la reparación del daño al DNA, por ejemplo el gen que codifica para la exonucleasa III (*xth A*). Esta enzima es esencial en la reparación del DNA dañado como consecuencia del estrés oxidativo, o cualquier otro estrés que cause lesiones similares. Su expresión es enteramente dependiente de *rpoS*, ya que en mutantes para este gen no se detecta actividad de exonucleasa III (Sak y col., 1989).
- Genes responsables de la síntesis de protectores de membrana, como por ejemplo *ostA* y *ostB*, que codifican para la síntesis de trehalosa. Este disacárido se une a las cabezas polares de los fosfolípidos (Lee y col., 1986) y de esta forma protege a las membranas celulares de los daños provocados por el shock térmico y el estrés osmótico. Cepas deficientes en la síntesis de trehalosa no poseen termotolerancia en fase estacionaria (Lange y Hengge-Aronis, 1991; McCann y col., 1991).
- El gen *bolA*, involucrado en el cambio de morfología hacia células más pequeñas y esféricas, que se evidencia durante la entrada a la fase estacionaria. Experimentos previos realizados en *E. coli* demostraron que el principal promotor de este gen se encuentra regulado por la fase del crecimiento y es responsable de una inducción de 10 órdenes en el gen *bolA* durante la entrada a la fase estacionaria (Aldea y col., 1989) Además la sobreexpresión artificial de este gen causa morfología esférica en células en crecimiento (Aldea y col., 1988).

La inactivación de *rpoS* lleva a un descenso en la viabilidad durante la fase estacionaria o en condiciones de agotamiento de la fuente de carbono (Lange y Hengge-Aronis, 1991; McCann y col., 1991). Debido a los genes que se encuentran bajo su regulación, la actividad de RpoS es necesaria para que las células en condiciones nutricionales desfavorables desarrollen protección cruzada contra agentes estresantes tales como la alta temperatura, el daño oxidativo y el estrés osmótico. (Lange y Hengge-Aronis, 1991; McCann y col., 1991). En el caso de *E. coli* existe un desarrollo de resistencia dependiente de *rpoS* a altas dosis de etanol, acetona y tolueno (Henneberg y Henge Aronis, resultados no publicados).

La resistencia al estrés de fase estacionaria se desarrolla en células que nunca fueron expuestas a algunas de las condiciones de estrés específicas. Por lo tanto los mecanismos regulatorios involucrados en la inducción de sistemas adaptativos y de fase estacionaria deben ser diferentes. Por ejemplo, mutantes *rpoS* de *E. coli* son deficientes en termotolerancia de fase estacionaria (Lange y Hengge-Aronis, 1991; McCann y col., 1991), pero pueden desarrollar

termotolerancia adaptativa normalmente. Esto indicaría que al menos la regulación, y tal vez los genes estructurales involucrados en estos dos tipos de termotolerancia son diferentes.

Las respuestas generadas ante condiciones de escasez de diversos nutrientes fueron analizadas más recientemente en *P. putida*. Estas bacterias resultaron capaces de desarrollar un estado de resistencia que las protegía contra la exposición a altas y bajas temperaturas, alta osmolaridad y dosis letales de etanol y agua oxigenada. Además, conforme las células permanecían durante más tiempo en condiciones de escasez de nutrientes se encontró un incremento en el grado de protección cruzada. La observación microscópica de la células mostró que las mismas cambiaban su morfología de cilíndrica a esférica (Givskov y col., 1994a). Resultados similares fueron obtenidos en *P. fluorescens* mantenida durante varios días en un medio sin fuente de carbono (van Overbeek y col., 1995). Al igual que lo demostrado previamente para *E. coli*, mediante electroforesis de proteínas en dos dimensiones se encontró que en *P. putida* existía una expresión temporal de dos clases de proteínas como respuesta al agotamiento de carbono. Entre estas proteínas se identificaron algunas que también eran inducidas como respuesta al estrés térmico y estrés osmótico. Sin embargo, no encontraron solapamiento entre las proteínas inducidas como respuesta a condiciones deficientes de carbono y las inducidas como respuesta al estrés oxidativo (Givskov y col., 1994b).

En un trabajo realizado en 1998 se clonó un gen homólogo al gen *rpoS* de *E. coli* en *P. putida*. La expresión de este gen, era capaz de suprimir la sensibilidad a ácidos y a estrés oxidativo de una mutante *rpoS* de *E. coli* y de estimular la expresión del promotor del gen *bolA* (Ramos González y Molin, 1998).

V.) EVALUACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA BACTERIANA EN AMBIENTES NATURALES.

El estudio de la supervivencia bacteriana en ambientes naturales es un problema complejo. No obstante, puede llevarse a cabo mediante distintas aproximaciones, ya sea directamente en el ambiente mediante experimentos de campo o en sistemas de laboratorio. En este último caso la utilización de microcosmos, constituye una herramienta adecuada para este tipo de estudios. Un microcosmos se define como un sistema en el cual se intentan simular las condiciones encontradas en el ambiente o parte del ambiente bajo estudio (Wagner-Dobler y col., 1992). Las ventajas de utilizar microcosmos residen en que son más simples que los experimentos a campo y evitan la complejidad no manejable. A su vez permiten controlar algunos parámetros ambientales y manipular ciertos rasgos del ecosistema como por ejemplo, la presencia o eliminación de

organismos autóctonos. En este trabajo utilizamos microcosmos para estudiar la supervivencia bacteriana en agua de río. De acuerdo con nuestros propósitos, los mismos fueron diseñados de manera tal de poder controlar la temperatura y el contenido de oxígeno y la presencia o ausencia de la comunidad microbiana natural.

OBJETIVOS E HIPÓTESIS DEL TRABAJO

Los objetivos particulares de la presente tesis de licenciatura se encuentran dentro de un plan general mediante el cual se pretende analizar genéticamente la supervivencia bacteriana en ambientes naturales. Para ello es necesario disponer de mutantes adecuadas que nos permitan utilizar ciertas metodologías tales como IVET (in vivo expression technology) (Mahan y col., 1993) o STM (signature-tagged transposon method) (Strauss y Falcow, 1997), que pueden ser aplicadas para identificar aquellos genes cuya expresión es esencial para la supervivencia.

Debido a las características previamente mencionadas, y a la abundante información sobre la organización molecular de sus genomas, las *Pseudomonas* fluorescentes pertenecientes al grupo de homología rRNAI resultan adecuadas para realizar estudios de supervivencia en el ambiente.

Además, dado que existe una gran conservación en cuanto a la información genética y organización de la misma entre las distintas especies pertenecientes a este grupo (Morgan y Dean, 1985; Christensen y col., 1994), es de esperar que los genes implicados en la supervivencia se encuentren altamente conservados.

Las *Pseudomonas* fluorescentes son microorganismos de gran importancia en diversas áreas tales como la medicina, el control biológico y el tratamiento de desechos; por lo tanto, la comprensión que se logre en cuanto a su supervivencia tiene consecuencias útiles en distintos campos de aplicación.

Dentro de este marco, los objetivos del presente trabajo fueron:

- 1) Analizar una mutante de *P. oleovorans* incapaz de depolimerizar PHA para establecer si constituye el sistema adecuado para estudiar, desde el punto de vista genético, la supervivencia en ambientes naturales. Para ello, se comparó la supervivencia de esta cepa con otra cepa salvaje de *P. oleovorans* en microcosmos de agua de río. De acuerdo con lo mencionado en la Introducción y con los resultados previos de nuestro laboratorio, es lógico suponer que la incapacidad para degradar el PHA acumulado represente una desventaja para la supervivencia bacteriana. Por otra parte - a diferencia de las cepas de *A. eutrophus* y *B. megaterium* deficientes en la síntesis de PHB, previamente utilizadas en los experimentos de supervivencia

- la utilización de estas cepas permite controlar las condiciones de acumulación del polímero, posibilitando determinar más precisamente la influencia del mismo en nuestros resultados.

- 2) Debido a que, en los microcosmos, las bacterias se encuentran con condiciones semejantes a la fase estacionaria del crecimiento, es de esperar que las mismas desarrollen respuestas de protección contra distintos agentes de estrés. Además, la presencia de PHA o su capacidad de degradación podría llegar a tener alguna relación con el desarrollo de este tipo de respuestas. Con el objetivo de comprobarlo, las cepas presentes en los microcosmos fueron sometidas a distintos tratamientos de estrés para estudiar la aparición de fenotipos característicos de resistencia durante el período de permanencia en los microcosmos.

MATERIALES Y MÉTODOS

I) MEDIOS DE CULTIVO, CEPAS Y PLÁSMIDOS UTILIZADOS

Las características de las cepas de *E. coli* y *P. oleovorans*, así como de los plásmidos utilizados en este trabajo se describen en la **Tabla 1**.

Dado que los experimentos realizados requerían distintas condiciones de crecimiento bacteriano, se utilizaron diferentes medios de cultivo. Las condiciones de crecimiento necesarias para cada experimento se mencionan en el apartado correspondiente y la composición de los medios de cultivo utilizados se detalla a continuación.

Caldo nutritivo (por litro) (Merck)

peptona de carne.....	5 g
extracto de carne.....	3 g

A este medio se le agregó caprilato de sodio a una concentración final de 0,5% cuando se requerían condiciones de acumulación de PHA.

LB (por litro) (Maniatis y col., 1982)

triptona.....	10 g
ClNa.....	10 g
extracto de levadura.....	5 g

Medio E (por litro) (Vogel y Bonner, 1956)

ácido cítrico .1 H ₂ O	2 g
K ₂ HPO ₄ anhidro	10 g
NaH ₂ NH ₄ PO ₄ . 4 H ₂ O	3,5 g

Luego de autoclavar se agregaron:

MgSO ₄ . 7 H ₂ O.....	0,2 g
MT microelementos*.....	1 ml

*MT microelementos (por litro) (Lageveen y col., 1988)

FeSO ₄ . 7 H ₂ O	2,78 g
MnCl ₂ . 4 H ₂ O	1,98 g
CoSO ₄ . 7 H ₂ O.....	2,81 g
CaCl ₂ .2 H ₂ O	1,47 g
CuCl ₂ . 2 H ₂ O	0,17 g
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O.....	0,29 g en 1N HCl.

Medio EC

Medio E conteniendo caprilato de sodio 0,5% concentración final.

Medio NE₂ (por litro) (Huisman y col., 1992)

NaH ₂ NH ₄ PO ₄ · 4 H ₂ O	1,75 g
K ₂ HPO ₄ · 3 H ₂ O.....	7,5 g
KH ₂ PO ₄	3,7 g
extracto de levadura.....	1 g

Luego de autoclavar se agregaron:

MgSO ₄ · 7 H ₂ O.....	2 mM
MT microelementos.....	1 ml

Medio NE₂C

Medio NE₂ conteniendo caprilato de sodio 0,5% concentración final.

Medios sólidos

Se agregaron a los medios anteriormente descriptos 15 g de agar por cada litro de medio.

Tabla 1. Cepas bacterianas y plásmidos utilizados.

Cepa	Características relevantes	Referencia
<i>P. oleovorans</i>		
GPO1	plásmido OCT, PHA ⁺	Schwartz y McCoy (1973)
GPO500	mutante NTG de GPO1. No degrada PHA	Huisman y col. (1991)
UBA 50-6	derivada de GPO1 Tn5 insertado en el cromosoma	Este trabajo
UBA 50-7	derivada de GPO500 Tn5 insertado en el cromosoma	Este trabajo
<i>E. coli</i>		
DH5α	<i>recA1</i> , <i>ΔlacU169</i> , <i>φ80dlacΔ(lacZ)M15</i>	Bethesda Research Laboratories
UBA 3-22	DH5α / pTZ18U-PHB	Este laboratorio
S17-1	<i>recA</i> , <i>pro</i> , <i>thi</i> . Contiene los genes <i>tra</i> del plásmido RP4 integrados al cromosoma.	Simon y col. (1983)

OCT: plásmido natural que permite el crecimiento con alcanos de 6 a 12 carbonos.

NTG: nitrosoguanidina

Plásmido	Característica relevante	Referencia
pSUP1021	pACYC184-RP4 <i>mob</i> Cm ^R Tet ^R Tn5	Simon y col. (1986)
pTZ18U-PHB	Posee un fragmento de 5.5 kb. que contiene los genes <i>phaA</i> , <i>phaB</i> y <i>phaC</i> de <i>A. eutrophus</i> . Amp ^R	Slater y col. (1988)

II) CURVA DE CRECIMIENTO Y ACUMULACIÓN DE PHA DE *P. oleovorans* GPo1 Y GPo500.

II.A) CONDICIONES DE CULTIVO Y TOMA DE MUESTRAS

Se utilizaron como inóculo 2 ó 3 colonias crecidas en una placa de Agar Nutritivo que fue incubada durante toda la noche (O.N.) para realizar un precultivo en 25 ml de medio mínimo EC en erlenmeyers de 250 ml. Luego de 24 horas de incubación a 30°C, estos precultivos fueron utilizados para comenzar con los experimentos de crecimiento y acumulación de PHA, los cuales se llevaron a cabo en erlenmeyers de 1 litro con 250 ml de medio NE₂C, con agitación constante a 30°C durante 3 días. El medio NE₂C posee una concentración de nitrógeno limitante, lo cual junto con la utilización del caprilato de sodio como única fuente de carbono favorece la acumulación de PHA. Aproximadamente cada 3 horas se tomaron muestras de 5 ml de cultivo, a las cuales se les determinó la D.O._{600 nm}, y posteriormente se centrifugaron para obtener los pellets de células que se guardaron a -70°C hasta su liofilización.

II.B) CUANTIFICACIÓN DE PHA

Para cuantificar el contenido de PHA de las muestras previamente obtenidas, las mismas fueron sometidas a metanólisis para formar los correspondientes monómeros esterificados, y luego analizadas mediante cromatografía gaseosa (Braunegg y col.,1978).

A. Preparación y metanólisis de las muestras

Los pellets de las muestras a analizar fueron liofilizados, realizándose luego el cálculo del peso seco para cada uno de ellos. A las muestras así preparadas se les agregó 1 ml de una solución de metanol 15% H₂SO₄ y luego 1 ml de cloroformo. Esta mezcla se incubó durante 140 minutos a 100°C, luego de lo cual se agregaron 0,5 ml de agua destilada y se mezcló agitándose vigorosamente durante 20 segundos. Se dejó en reposo hasta que se separaron las fases y se transfirió la fase orgánica a otro tubo, que se guardó a -20°C hasta el momento de la corrida cromatográfica.

B. Análisis por cromatografía gaseosa

Los productos de la metanólisis fueron analizados por separación isotérmica en columna de vidrio de 1,80 m rellena con 10% Carbowax 20M-TPA en Chromosorb W-AW de malla 80/100.

Se utilizó un cromatógrafo Gow-Mac serie 550, equipado con ionizador de llama. Como gas transportador se empleó nitrógeno a un flujo de 25 ml/min., siendo las temperaturas del inyector, columna y detector 180°C, 150°C y 210°C, respectivamente. Los datos fueron analizados mediante un integrador Spectraphysics. La cuantificación se realizó por comparación de las áreas de los picos obtenidos en las muestras y en soluciones patrón de concentraciones conocidas.

III) TINCIONES ESPECÍFICAS PARA DETERMINAR LAS INCLUSIONES DE PHA

Coloración fluorescente con Azul del Nilo A (Nile Blue A)

El colorante Azul del Nilo A es una oxazina básica soluble en agua y en alcohol etílico. La forma oxazona (Nile pink) se forma por la oxidación espontánea del Azul del Nilo A en solución acuosa, y es soluble en lípidos neutros que se encuentran en estado líquido a la temperatura de la coloración (Ostle y Holt, 1982).

Procedimiento

Se coloreó con una solución acuosa al 1% de Azul del Nilo A (Sigma) un extendido de células, sumergiendo el portaobjetos en jarritos “coplin” con el colorante a 55°C durante 10 minutos.

Luego de eliminar con agua corriente el exceso de colorante se lavó con solución acuosa de ácido acético al 8% durante 1 minuto y se dejó secar. Se observó el preparado rehidratado y cubierto con cubreobjeto al microscopio bajo una longitud de onda de 460 nm.

Los gránulos de PHA se observaron como partículas fluorescentes de color naranja brillante.

IV) OBTENCIÓN DE LAS CEPAS DE *P. oleovorans* DERIVADAS DE GPo1 Y GPo500 RESISTENTES A KANAMICINA, MEDIANTE LA INSERCIÓN DEL TRANSPOSON Tn5.

Se realizaron cultivos O.N. de *E. coli* S17-1/pSUP1021 en LB caldo suplementado con kanamicina 25 µg/ml y de *P. oleovorans* GPo1 y GPo500 en medio EC. Al día siguiente se determinó la D.O._{600 nm} de cada uno de los cultivos y se titularon haciendo diluciones seriadas y

sembrando en placas con el medio correspondiente. Las bacterias fueron mezcladas en relaciones dador: receptor de 1:1, 1:5 y 5:1, luego de lo cual se sembraron 0,3 ml de esta mezcla en placas de Agar Nutritivo que fueron incubadas O.N. Al día siguiente el césped de células se resuspendió en 3 ml de solución fisiológica (NaCl 0,9 g/l) y se seleccionaron las transconjugantes sembrando 0,1 ml de dicha resuspensión en medio EC conteniendo kanamicina 50 µg/ml. Se hicieron controles con células dadoras y receptoras que se trataron de la misma manera. Las transconjugantes aparecieron luego de 2 días de incubación a 30°C, y luego se probaron para verificar la pérdida de la resistencia a tetraciclina, mediante su réplica en placas de Agar Nutritivo conteniendo tetraciclina 20 µg/ml.

V) EXPERIMENTOS DE SUPERVIVENCIA EN MICROCOSMOS DE AGUA.

V.A) MUESTRAS DE AGUA

Los experimentos se realizaron utilizando muestras de agua de pozo de la Provincia de Buenos Aires y agua recolectada de la superficie del Río de la Plata.

V.B) PREPARACIÓN DE LOS MICROCOSMOS

Para los experimentos de supervivencia de *E. coli* DH5α y *E. coli* UBA 3-22 los microcosmos consistían en 100 ml de agua de pozo en erlenmeyers de 500 ml.

Los experimentos de supervivencia de *P. oleovorans* se realizaron en dos tipos de microcosmos; uno de ellos conteniendo 100 ml de agua de río y el otro conteniendo 100 ml de agua de río sin la comunidad microbiana natural, para lo cual el agua fue esterilizada mediante el pasaje por un filtro de 0,22 µm (Millipore).

V.C) EXPERIMENTOS DE SUPERVIVENCIA DE *E. COLI* EN MICROCOSMOS DE AGUA DE POZO.

Las bacterias se cultivaron en 120 ml de LB caldo a 37°C, con agitación hasta la fase exponencial (D.O._{600 nm} = 0,6), para evitar las condiciones de escasez de nutrientes que llevarían a la acumulación de PHB y, por lo tanto a distintas condiciones fisiológicas iniciales.

El título de los cultivos se determinó mediante su siembra en placas de LB agar, obteniéndose valores de aproximadamente 2.10⁸ ufc/ml. Las células fueron recolectadas por centrifugación de 100 ml de cultivo a 10000 rpm durante 10 minutos y lavadas dos veces con solución fisiológica. Los pellets así obtenidos fueron resuspendidos en los microcosmos de agua de

pozo, los cuales se incubaron a 30°C, con agitación constante durante 10 días. El recuento de células viables se realizó periódicamente, tomando muestras de 1 ml de los microcosmos, y haciendo diluciones seriadas que se sembraron por triplicado en placas de LB agar. Al día siguiente se determinó el número de unidades formadoras de colonias (ufc).

V.D) EXPERIMENTOS DE SUPERVIVENCIA DE *P.oleovorans* EN MICROCOSMOS DE AGUA DE RÍO ESTÉRIL.

Las cepas utilizadas en estos experimentos fueron *P.oleovorans* GPo1 y *P.oleovorans* GPo500. Ambas cepas son capaces de acumular PHA, siendo la última de ellas incapaz de degradarlo.

Las células se cultivaron en 120 ml de Caldo Nutritivo suplementado con caprilato de sodio 0,5% a 30°C hasta comienzos de la fase estacionaria ($D.O_{600\text{ nm}} = 1,0$). A continuación se verificó la presencia de inclusiones de PHA mediante tinción con Azul del Nilo. Los títulos de los cultivos fueron determinados mediante su siembra en placas de Agar Nutritivo, obteniéndose valores de $9 \cdot 10^7$ ufc/ml, aproximadamente. El procedimiento que se siguió para la incorporación de las células en los microcosmos de agua de río estéril fue idéntico al mencionado en la sección V.C. Luego de su inoculación, los microcosmos fueron incubados a 30°C, con agitación constante durante aproximadamente 25 días. La población bacteriana fue monitoreada periódicamente, tomando muestras de 1 ml de los microcosmos y haciendo diluciones seriadas que eran sembradas por triplicado en placas de Agar Nutritivo. El recuento de colonias se realizó al día siguiente para obtener el número de ufc/ml. Este experimento fue realizado por duplicado.

Al mismo tiempo se tomaron muestras de los microcosmos para hacer extendidos de células y teñirlos con Azul del Nilo, a fin de realizar un seguimiento de los cambios morfológicos y del contenido de PHA en las células bacterianas al microscopio óptico.

V.E) EXPERIMENTOS DE SUPERVIVENCIA DE *P. oleovorans* EN MICROCOSMOS DE AGUA DE RÍO CONTENIENDO LA COMUNIDAD MICROBIANA NATURAL.

Para la realización de estos experimentos se utilizaron las cepas resistentes a kanamicina derivadas de GPo1 y GPo500. Las condiciones de crecimiento para estas cepas fueron similares a las mencionadas en la sección V.D., con la diferencia de que las mismas se cultivaron en Caldo Nutritivo suplementado con 0,5% caprilato de sodio y kanamicina 50 µg/ml. Los títulos de los cultivos se determinaron mediante su siembra en medio EC suplementado con kanamicina 50 µg/ml, obteniéndose valores de aproximadamente $6 \cdot 10^7$ ufc/ml. Las células fueron introducidas en

los microcosmos, utilizando el mismo procedimiento que en las secciones V.C y V.D. Una vez inoculados, los microcosmos fueron incubados a 30°C, con agitación constante durante 10 días. Las células fueron sembradas en medio EC más kanamicina 50 µg/ml, cada 2 días aproximadamente y el recuento de colonias se realizó luego de 48 horas de incubación determinándose así el número de ufc/ml.

VI) EXPERIMENTOS DE RESISTENCIA AL ESTRÉS EN *P. oleovorans* GPo1 Y GPo500.

VI.A) EXPOSICIÓN AL ETANOL Y A LA ALTA TEMPERATURA DE *P.oleovorans* EN FASE DE CRECIMIENTO EXPONENCIAL.

Precultivos O.N. de *P. oleovorans* GPo1 y GPo500 crecidos en Caldo Nutritivo a 30°C, se utilizaron como inóculo para otro cultivo en el mismo medio, de manera que la D.O._{600 nm} inicial fuese < 0,1. Dichos cultivos se incubaron a 30°C con agitación hasta una D.O._{600 nm} = 0,5 (título del cultivo aproximadamente $5 \cdot 10^7$ ufc/ml). Luego se tomó 1 ml de cada cultivo, y se diluyó 10^2 y 10^3 veces en solución fisiológica. Al tiempo cero del experimento, los cultivos fueron diluidos diez veces más en solución fisiológica con 20% de etanol o en solución fisiológica precalentada a 47°C. La exposición al etanol fue realizada a 25°C. Alícuotas de 0,1 ml de dichas diluciones se tomaron a distintos tiempos y se sembraron por triplicado en placas de Agar Nutritivo que fueron incubadas a 30°C. Al día siguiente, se realizó el recuento de células viables a partir del número de unidades formadoras de colonias (ufc). Este procedimiento es similar al realizado por Givskov y col. (1994a), con algunas modificaciones. Este experimento fue realizado por duplicado.

VI.B) EXPOSICIÓN AL ETANOL Y A LA ALTA TEMPERATURA DE *P. oleovorans* EN CONDICIONES DE ACUMULACIÓN DE PHA.

Precultivos de *P. oleovorans* GPo1 y GPo500 crecidos durante 24 horas en medio EC a 30°C, se utilizaron como inóculo para otros cultivos en medio NE₂C que fueron incubados O.N. a 30°C, hasta comienzos de la fase estacionaria. Al día siguiente, se verificó la presencia de inclusiones de PHA mediante tinción con Azul del Nilo. Se tomó 1 ml de cada cultivo (título aproximado: $3 \cdot 10^8$ ufc/ml) y se diluyó 10^4 veces en solución fisiológica. Al tiempo cero fueron diluidos diez veces más en solución fisiológica con 20% de etanol o en solución fisiológica precalentada a 47°C, para luego proceder como en la sección VI.A. Este experimento fue realizado por duplicado.

VI.C) EXPOSICIÓN AL ETANOL Y A LA ALTA TEMPERATURA DE *P. oleovorans* EN MICROCOSMOS DE AGUA DE RÍO ESTÉRIL.

Al tercer, décimo y vigésimo primer día del comienzo del experimento de supervivencia de *P. oleovorans* GPo1 y GPo500 en microcosmos de agua de río estéril, las muestras de 1 ml que fueron tomadas de los microcosmos se diluyeron 10^2 ó 10^3 veces en solución fisiológica, de acuerdo al número estimado de ufc/ml. Al tiempo cero fueron diluídas diez veces más en solución fisiológica con 20% de etanol o en solución fisiológica precalentada a 47°C. Luego se procedió como en las secciones VI.A y VI.B. Este experimento fue realizado por duplicado.

RESULTADOS

I) SUPERVIVENCIA DE *E. coli* DH5 α Y *E. coli* UBA 3-22 EN MICROCOSMOS DE AGUA DE POZO.

Resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio con cepas de *A. eutrophus* y *B. megaterium* salvajes y deficientes en la síntesis de PHB, demostraron que la presencia del polímero incrementaba la supervivencia en aguas naturales. (López y col., 1995). Sin embargo, podríamos suponer que la presencia de PHB *per se* no constituye ninguna ventaja para la supervivencia en el caso de que la bacteria sea incapaz de degradar el polímero acumulado. Con el objetivo de comprobar esta hipótesis decidimos realizar experimentos de supervivencia en microcosmos de agua de pozo, comparando la supervivencia de dos cepas de *E. coli*. Las cepas utilizadas fueron *E. coli* DH5 α , incapaz de sintetizar PHB y *E. coli* UBA 3-22, que lleva el plásmido pTZ18U-PHB que posee los genes intervinientes en el camino de biosíntesis de PHB de *Alcaligenes eutrophus* pero no los genes necesarios para su degradación.

Los microcosmos fueron inoculados con células en fase de crecimiento exponencial (en un rango de D.O. 600 nm = 0,6 a 0,7) a pesar del bajo contenido de PHB, para evitar las condiciones de escasez de fósforo y nitrógeno que llevarían a la acumulación del polímero, lo cual determinaría que las células se encontrasen en distintas condiciones fisiológicas al comienzo del experimento.

Según se puede observar en la **Figura 1**, no existen diferencias en la supervivencia de *E. coli* DH5 α y su correspondiente variante isogénica UBA 3-22 en agua de pozo.

Figura 1

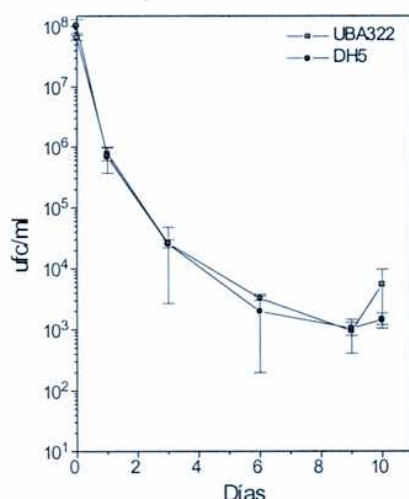


Figura 1. Supervivencia de *E. coli* DH5 α y UBA 3-22 en microcosmos de agua de pozo. Los valores representan las medias de tres recuentos \pm 1 SD.

De acuerdo con lo esperado, el hecho de poseer los genes involucrados en la biosíntesis de PHB, pero no aquéllos necesarios para su degradación no otorga ninguna ventaja para la supervivencia en un medio donde los nutrientes son limitantes (López y col., 1995) y el polímero acumulado no puede ser utilizado. Este resultado constituye la primera evidencia de la importancia de la depolimerasa en la supervivencia bacteriana, por lo cual proseguimos nuestros experimentos con las cepas de *P. oleovorans* elegidas como modelo para analizar la supervivencia.

II) CARACTERIZACION DE *P. oleovorans* GPo1 Y GPo500 EN CUANTO AL CRECIMIENTO: VERIFICACIÓN DE LAS CEPAS Y DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES DE ACUMULACIÓN.

Este experimento se realizó con el objetivo de verificar las cepas GPo1 y GPo500 de *P. oleovorans*. Era esperable que para la cepa GPo1 fuera posible observar una rápida disminución del polímero acumulado durante el crecimiento, mientras que para la cepa GPo500 el nivel de PHA se mantuviera estable. En la **Figura 2** se muestra la curva de crecimiento obtenida para estas cepas, crecidas en condiciones de acumulación de PHA.

Figura 2

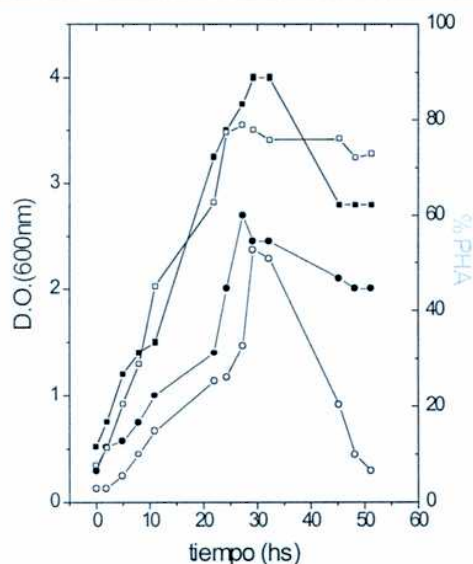


Figura 2. Curva de crecimiento y acumulación de PHA de *P. oleovorans* GPo1 y GPo500. (Según se describió en la sección II. A. en Materiales y Métodos) Las células se cultivaron en medio NE₂ suplementado con 0,5% caprilato de sodio durante 3 días. Se representan los valores de D.O. 600 nm (● : GPo1 ■ : GPo500) y el contenido de PHA (△ : GPo1 ○ : GPo500) de las muestras tomadas a distintos tiempos. El contenido de PHA fue calculado como el porcentaje del peso seco celular.

El porcentaje de PHA acumulado aumenta con el crecimiento para ambas cepas, obteniéndose los máximos porcentajes de acumulación del polímero durante la fase estacionaria, como está descrito por Lageveen y col., (1988).

Al observar la curva de acumulación de PHA de la cepa GPo1 puede verse que el máximo porcentaje de acumulación ocurre a las 30 horas de haberse iniciado el experimento y que el mismo corresponde a un valor de 50 % del peso seco, aproximadamente. A partir de ese momento la cantidad de PHA comienza a disminuir hasta alcanzar un valor de 6% del peso seco, muy similar al encontrado al inicio del experimento. Esto se debe a que el polímero acumulado es utilizado como fuente de carbono y energía en la fase estacionaria tardía.

Para la cepa GPo500 el máximo porcentaje de PHA alcanzado corresponde a casi un 80% del peso seco, manteniéndose aproximadamente constante hasta el final del experimento. Estos resultados coinciden con lo esperado, teniendo en cuenta que esta cepa es deficiente en la síntesis de depolimerasa de PHA, por lo que el polímero acumulado no puede ser utilizado, y de esta manera sus niveles permanecen constantes.

Los contenidos de PHA alcanzados no corresponden a experimentos destinados a lograr una máxima acumulación del polímero, sino solo a verificar la cinética de su degradación.

III) SUPERVIVENCIA DE *P. oleovorans* GPo1 Y GPo500 EN MICROCOSMOS DE AGUA DE RÍO.

III.A) CONDICIONES EXPERIMENTALES

Para el estudio de la supervivencia en agua de río se utilizaron dos métodos diferentes. En el primero se utilizó agua de río estéril a fin de evaluar el efecto de la disponibilidad de nutrientes en la supervivencia bacteriana; en el segundo, los experimentos se realizaron con agua de río conteniendo los microorganismos autóctonos con el objetivo de determinar la influencia de las interacciones biológicas sobre la supervivencia. En este caso se utilizaron cepas resistentes a kanamicina derivadas de *P. oleovorans* GPo1 y GPo500, para poder seguir la dinámica de la población bacteriana a lo largo del experimento mediante su siembra en un medio de selección, evitando así el crecimiento de las bacterias autóctonas del río.

A diferencia del experimento de supervivencia en *E. coli*, donde las bacterias se cultivaron hasta la fase exponencial, en el caso de este experimento las células fueron inoculadas a los

microcosmos en condiciones de acumulación de PHA, con el objetivo de determinar si la incapacidad para degradar el polímero resulta en una menor supervivencia.

III.B) MICROCOSMOS DE AGUA DE RÍO ESTÉRIL

III.b.1) Supervivencia en condiciones de esterilidad

En la **Figura 3 (A y B)** se muestran los resultados obtenidos al comparar la supervivencia de las cepas GPo1 y GPo500 en microcosmos de agua de río estéril. De acuerdo con estos resultados, la supervivencia de la cepa GPo500 incapaz de utilizar el PHA previamente acumulado resultó menor que la de su cepa parental GPo1. En las Figuras se observa que existe un incremento inicial en el número de ufc/ml para ambas cepas. Aproximadamente 10 días después del comienzo del experimento, la mutante deficiente en la síntesis de depolimerasa mostró una gran disminución en su supervivencia, mientras que los recuentos de la cepa salvaje disminuyen mucho más lentamente (**Figura 3A**) o bien permanecen constantes (**Figura 3B**). Al finalizar los experimentos la diferencia entre los recuentos para ambas cepas fue de aproximadamente un orden de magnitud.

Figura 3

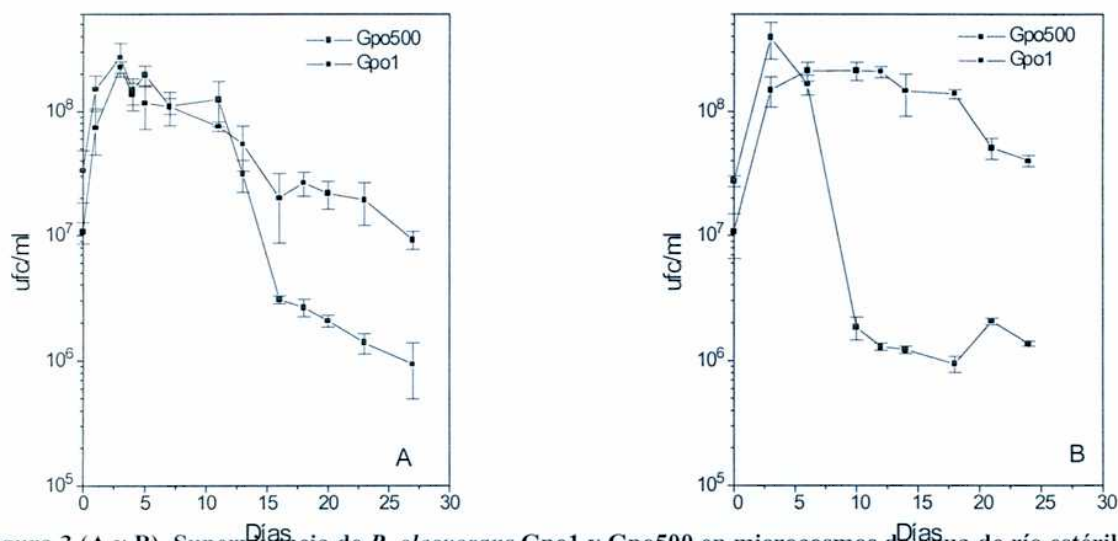


Figura 3 (A y B). Supervivencia de *P. oleovorans* Gpo1 y Gpo500 en microcosmos de agua de río estéril. Los valores representan las medias de tres recuentos \pm 1 SD. Se muestran los resultados obtenidos de dos experimentos independientes.

III.b.2) Observación de la morfología celular

Como lo habíamos adelantado en la Introducción, las bacterias cambian su forma haciéndose más pequeñas y esféricas durante la entrada a la fase estacionaria. En *E. coli*, el gen *bolA* que se encuentra regulado por *rpoS* sería el responsable de este cambio de forma (Aldea y col., 1988) Debido a las condiciones que las bacterias encontrarían en los microcosmos, es probable suponer que las mismas desarrollen un cambio en su morfología celular.

En la **Figura 4 (A y B)** se puede observar el cambio gradual de forma que experimentan las células de *P. oleovorans* GPo1 (**Figura 4A**) y GPo500 (**Figura 4B**) desde células largas y cilíndricas a células más pequeñas y redondeadas, durante su permanencia en los microcosmos. Las fotos de la primera fila (**a**) muestran la morfología celular antes de su inoculación en los microcosmos. En función de la intensidad de fluorescencia GPo500 (**Figura 4B.a**) parece acumular más PHA que GPo1 (**Figura 4A.a**). Esta observación coincide con los resultados mostrados en la **Figura 2**, donde el porcentaje de PHA acumulado por la mutante en la fase estacionaria, era mayor que el acumulado por su cepa parental.

Para ambos tipos de cepas, las células que se encontraban en los microcosmos al día 3 (**Figura 4A.b y 4B.b**) presentaban una forma alargada y cilíndrica, similar a la que adoptaban en cultivo. Hacia el décimo día del experimento la cepa GPo500 (**Figura 4B.c**) mostró un gran cambio en su morfología celular, pudiéndose observar mucho más pequeña y esférica, mientras que la cepa salvaje pareció haber disminuido un poco su tamaño, pero no experimentó un cambio tan evidente en su morfología (**Figura 4A.c**). Después de 21 días, ambos tipos de células se veían pequeñas y redondeadas (**Figura 4A.d y 4B.d**). De acuerdo con estos resultados, el cambio gradual que experimentan las células hasta hacerse más pequeñas y redondeadas ocurre más tempranamente en aquellas deficientes en la síntesis de depolimerasa.

Los resultados de las tinciones realizadas con Azul del Nilo mostraron que 24 horas después de iniciado el experimento la cepa salvaje no tenía gránulos de PHA. Las tinciones realizadas en esta cepa dieron negativas durante todo el transcurso del experimento.

Como puede verse en la **Figura 4B**, de acuerdo con lo esperado, en la cepa mutante siempre se observaron gránulos de PHA.

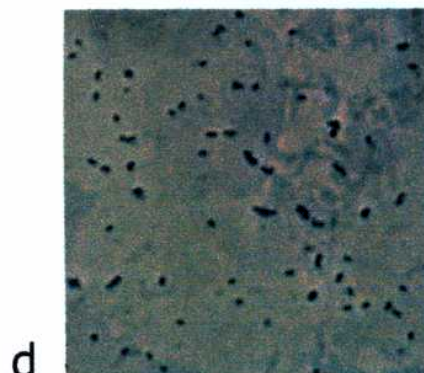
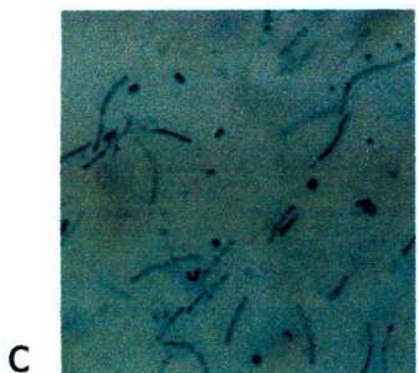
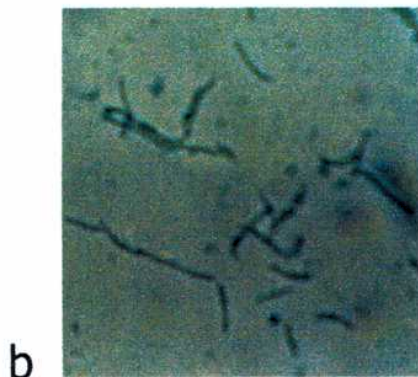
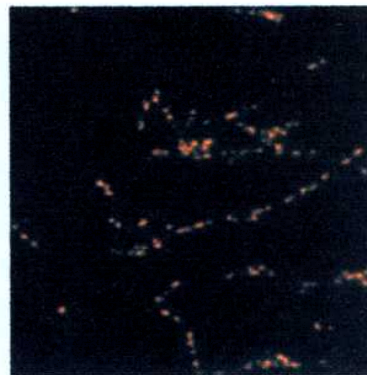
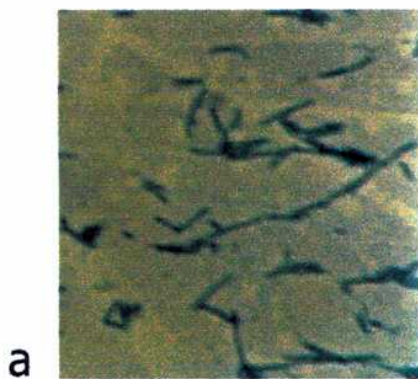


Figura 4A. Observación microscópica de los cambios en la morfología celular en *P. oleovorans* Gp01 durante el experimento de supervivencia en microcosmos de agua de río estéril.

Las células fueron teñidas con Azul del Nilo y observadas al microscopio a un aumento de 1000x.

a. Cultivos de *P. oleovorans* Gp01 crecidos en Caldo Nutritivo suplementado con 0,5% caprilato de sodio antes de su inoculación en los microcosmos. A la izquierda se muestra el preparado visto con luz blanca y a la derecha el mismo preparado visto con luz ultravioleta con la cual los gránulos de PHA fluorescen.

b a d. Células después de 3 días (**b**), 10 días (**c**) y 21 días (**d**) de permanencia en los microcosmos. En ninguno de estos casos se visualizaron gránulos de PHA.

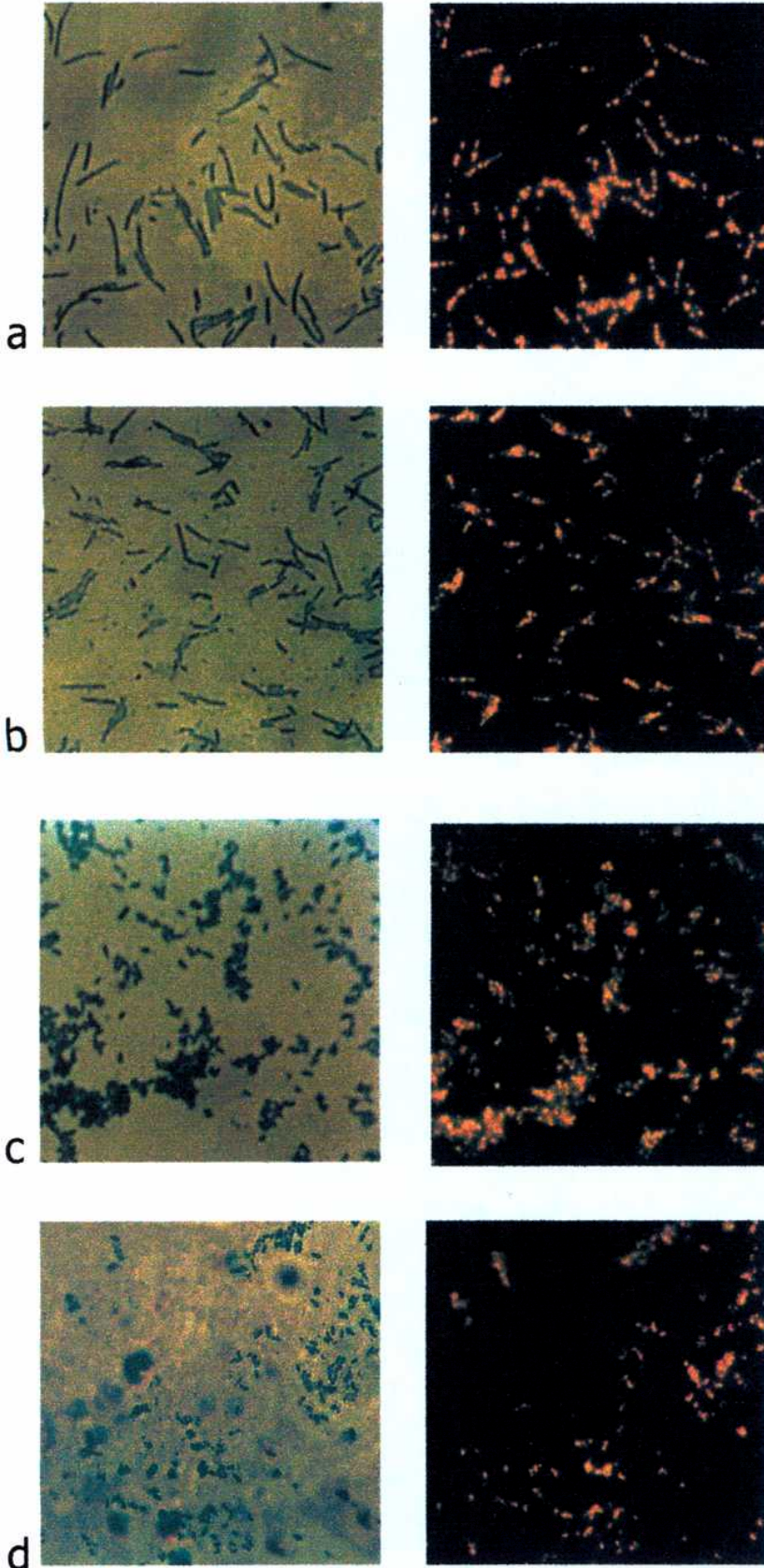


Figura 4B. Observación microscópica de los cambios en la morfología celular de *P. oleovorans* Gpo500 durante el experimento de supervivencia en microcosmos de agua de río estéril.

Las células fueron teñidas con Azul del Nilo y observadas al microscopio a un aumento de 1000x. En la columna de la izquierda se muestran los preparados vistos con luz blanca y en la columna de la derecha los preparados vistos con luz ultravioleta, con la cual los gránulos de PHA fluorescen.

a. Cultivos de *P. oleovorans* Gpo500 crecidos en Caldo Nutritivo suplementado con 0,5% caprilato de sodio antes de su inoculación en los microcosmos.

b a d. Las células luego de 3 días (**b**), 10 días (**c**) y 21 días (**d**) de permanencia en los microcosmos.

III.C) MICROCOSMOS DE AGUA DE RÍO NO ESTÉRIL.

III.c.1) Obtención de *P. oleovorans* transconjugantes de Tn5.

Las cepas de *P. oleovorans* marcadas con resistencia a antibióticos utilizadas en los experimentos de supervivencia en agua de río no estéril fueron obtenidas mediante conjugación con la cepa de *E.coli* S17-1 portadora del plásmido pSUP1021 según como se describió la sección IV en Materiales y Métodos. El plásmido pSUP1021 es incapaz de replicar en *Pseudomonas* y contiene un Tn5 que confiere resistencia a kanamicina.

Se obtuvieron, aproximadamente, 700 transconjugantes para *P.oleovorans* GPo1 y 200 para *P. oleovorans* GPo500. Con el objetivo de seleccionar aquellas colonias que perdieron el vector de transposición, se eligieron al azar unas 20 transconjugantes de cada cepa y las mismas se repicaron en medio EC conteniendo kanamicina 50 µg/ml y en placas de Agar Nutritivo más tetraciclina 20 µg/ml. Luego de seleccionar aquellas colonias que resultaron Km^R Tet^S, a cada una de ellas se les realizó una curva de crecimiento en Caldo Nutritivo conteniendo kanamicina 50 µg/ml, y finalmente se eligieron dos transconjugantes (una para cada cepa) en base a la comparación de sus velocidades de crecimiento con las previamente obtenidas para GPo1 y GPo500 en Caldo Nutritivo. Posteriormente, las mismas se utilizaron para inocular cultivos en medio EC suplementado con kanamicina 50 µg/ml, que fueron incubados O.N. A continuación se realizaron extendidos de células que fueron teñidos con Azul del Nilo y observados al microscopio para verificar la presencia de inclusiones de PHA. Las transconjugantes de Tn5 así seleccionadas fueron denominadas UBA 50-6 y UBA 50-7 derivadas de GPo1 y GPo500 respectivamente, y se utilizaron para la realización del experimento de supervivencia en agua de río no estéril.

III.c.2) Supervivencia en presencia de las bacterias autóctonas del río.

Para determinar cuál era el medio de selección adecuado tal que impidiera el crecimiento de la comunidad bacteriana natural del río, permitiendo así evaluar la supervivencia de las cepas inoculadas en los microcosmos, se sembraron 100 µl de las muestras del río en distintos medios: Agar Nutritivo, Agar Nutritivo conteniendo kanamicina 50 µg/ml y medio mínimo EC más kanamicina 50 µg/ml. Los valores de ufc/ml obtenidos fueron: 5.10⁴ para Agar Nutritivo, 6.10² para Agar Nutritivo más el antibiótico y no se observó ninguna colonia en medio mínimo suplementado con kanamicina. Por este motivo las muestras extraídas de los microcosmos fueron sembradas en medio EC conteniendo kanamicina 50 µg/ml.

En la **Figura 5**, se muestran los resultados obtenidos en cuanto a la supervivencia de las cepas UBA 50-6 y UBA 50-7 en agua de río.

Luego de 12 días de incubación en los microcosmos, se observaron grandes diferencias en la supervivencia de la cepa salvaje y su correspondiente mutante deficiente en la síntesis de depolimerasa. Estas diferencias eran aún mayores que las obtenidas para GPo1 y GPo500 en microcosmos de agua de río estéril (**Figura 3 A y B**).

A diferencia de lo que ocurría en agua de río estéril (**Figura 3 Ay B**), en este caso no se observó un aumento en el recuento de células durante los primeros días del experimento. Tanto la cepa capaz de degradar PHA como su mutante mostraron menor supervivencia que la obtenida en microcosmos de agua de río estéril.

Figura 5

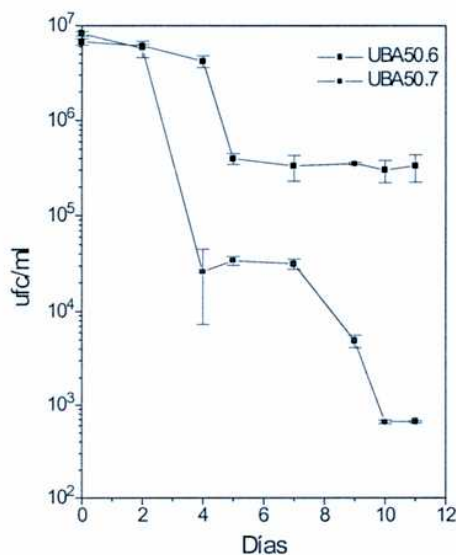


Figura 5. Supervivencia de *P. oleovorans* UBA 50-6 y UBA 50-7 en microcosmos de agua de río no estéril. Los valores representan las medias de tres recuentos \pm 1 S.D.

IV) RESISTENCIA A DISTINTOS AGENTES DE ESTRÉS EN *P. oleovorans* GPo1 Y GPo500.

Considerando que en los microcosmos las bacterias se encuentran con condiciones de escasez de nutrientes semejantes a la fase estacionaria de crecimiento, es de esperar que las mismas

sean capaces de desarrollar mecanismos de protección cruzada contra distintos agentes de estrés, como se describió previamente en la Introducción de este trabajo. Con el objetivo de corroborar esta suposición, se decidió someter a las células de *P. oleovorans* GPo1 y GPo500 a los tratamientos de shock térmico y exposición al etanol.

IV.A.) EFECTOS DEL SHOCK TÉRMICO Y DE LA EXPOSICIÓN AL ETANOL EN CULTIVOS DE *P. oleovorans* EN FASE DE CRECIMIENTO EXPONENCIAL.

Las condiciones a utilizar en los experimentos de exposición a los distintos agentes de estrés, que serían posteriormente aplicadas a las células que se encontraban en los microcosmos y a cultivos crecidos en condiciones de acumulación de PHA, fueron establecidas sometiendo a cultivos de ambas cepas en fase de crecimiento exponencial a una temperatura de 47°C y a etanol 20% durante distintos tiempos. Los tiempos de exposición que fueron elegidos para realizar el experimento fueron aquellos que causaban una notable disminución en la supervivencia del cultivo de células en crecimiento.

En las **Figuras 6 y 7** se representan los resultados obtenidos luego de exponer a *P. oleovorans* GPo1 (**Figuras 6A y 7A**) y GPo500 (**Figuras 6B y 7B**) en fase de crecimiento exponencial a etanol 20% y a una temperatura de 47°C, respectivamente. En ambos casos existe una rápida disminución en el número de células viables tanto para la cepa salvaje como para la mutante. Luego de 25 minutos de exposición a etanol 20%, el porcentaje de supervivencia para ambas cepas se encuentra alrededor del 0,4% (**Figura 6 A y B**). En el caso del shock térmico el porcentaje de células viables luego de 30 minutos a 47°C resultó ser de, aproximadamente, 0,2 % para ambas cepas (**Figuras 7 A y B**).

IV.B.) EFECTOS DEL SHOCK TÉRMICO Y DE LA EXPOSICIÓN AL ETANOL EN CULTIVOS DE *P. oleovorans* EN CONDICIONES DE ACUMULACIÓN DE PHA.

Debido a que el desarrollo de los mecanismos de protección cruzada contra distintos agentes de estrés tiene lugar durante la fase estacionaria del crecimiento, al igual que la acumulación de PHA y con el objetivo de determinar si la acumulación del polímero tendría alguna influencia en el desarrollo de estos mecanismos, se aplicaron tratamientos de exposición al etanol y a alta temperatura a cultivos de *P. oleovorans* GPo1 y GPo500 crecidos en condiciones de acumulación del polímero hasta comienzos de la fase estacionaria, según se describió en la sección IIA. en Materiales y Métodos.

En la **Figura 6 A y B** se observa que ambas cepas desarrollaban resistencia al tratamiento con etanol, ya que en ambos casos el porcentaje de supervivencia, luego de 25 minutos de exposición, se encontraba alrededor de 10%, es decir: mucho mayor que el obtenido para las células en fase de crecimiento exponencial. Sorprendentemente, para el estrés térmico (**Figura 7**), los resultados para ambas cepas fueron diferentes. La cepa salvaje (**Figura 7A**) mostró un incremento en la resistencia a la temperatura: el porcentaje de células viables luego de 30 minutos a 47°C fue del 4%, mientras que para la mutante (**Figura 7B**) la curva de supervivencia es muy similar a la obtenida para el cultivo en crecimiento exponencial.

Figura 6

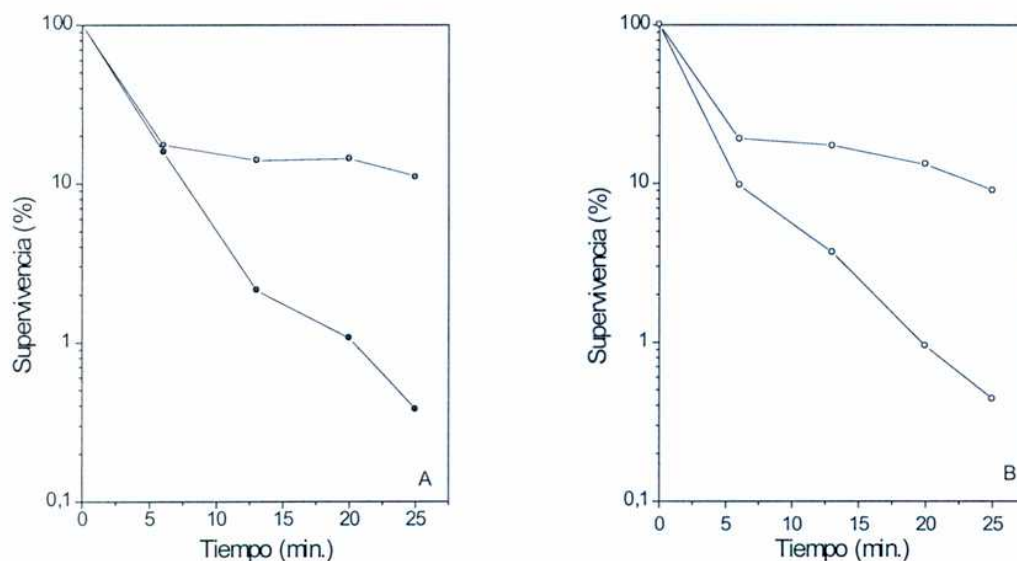


Figura 6. Resistencia al etanol de cultivos de *P. oleovorans* GPo1 (A) y GPo500 (B) en fase de crecimiento exponencial (○, ●) y crecidos en condiciones de acumulación de PHA hasta comienzos de la fase estacionaria (◐, ◑) según se describió en **Materiales y Métodos**. Las células fueron expuestas a etanol 20% durante distintos tiempos luego de lo cual se determinó el número de células viables mediante la siembra por triplicado en placas de Agar Nutritivo. El porcentaje de supervivencia se determinó como el número de células viables para cada tiempo de exposición, dividido por el número de células viables antes de la exposición al etanol. Para cada caso, los datos representan las medias de dos experimentos independientes.

Figura 7

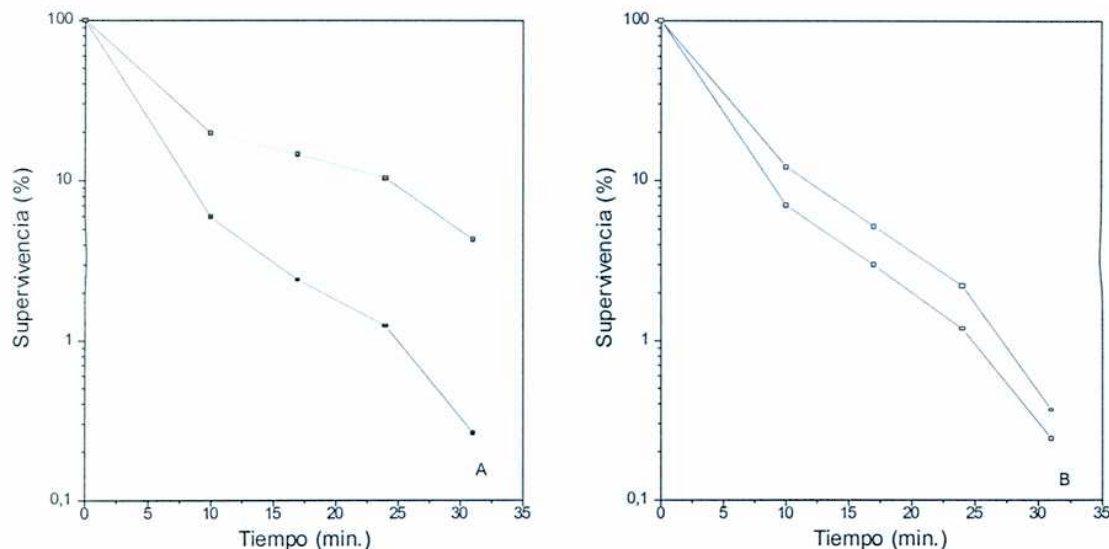


Figura 7. Resistencia al shock térmico de cultivos de *P. oleovorans* GPo1 (A) y GPo500 (B) en fase de crecimiento exponencial (■, —) y crecidos en condiciones de acumulación de PHA hasta comienzos de la fase estacionaria (●, —) según como se describió en Materiales y Métodos. Las células fueron expuestas a una temperatura de 47°C durante distintos tiempos luego de lo cual se determinó el número de células viables mediante la siembra por triplicado en placas de Agar Nutritivo. El porcentaje de supervivencia se determinó como el número de células viables para cada tiempo de exposición, dividido por el número de células viables antes de la exposición a alta temperatura. Para cada caso, los datos representan las medias de dos experimentos independientes.

IV.C.) EFECTOS DEL SHOCK TÉRMICO Y DE LA EXPOSICIÓN AL ETANOL EN *P. oleovorans* GPo1 Y GPo500 EN MICROCOSMOS DE AGUA DE RÍO ESTÉRIL.

En base a la observación de los cambios producidos en la morfología bacteriana para ambas cepas de *P. oleovorans* (Figura 4), y suponiendo que dichos cambios podrían tener relación con el desarrollo de estados de resistencia al estrés, se realizaron los experimentos de shock térmico y exposición al etanol al tercer, décimo y vigésimo primer día del experimento de supervivencia.

Los resultados obtenidos luego de la exposición al etanol de GPo1 y GPo500 a los días 3, 10 y 21 del experimento de supervivencia en microcosmos de agua de río estéril se muestran en la página siguiente, en la Figura 8.

Figura 8

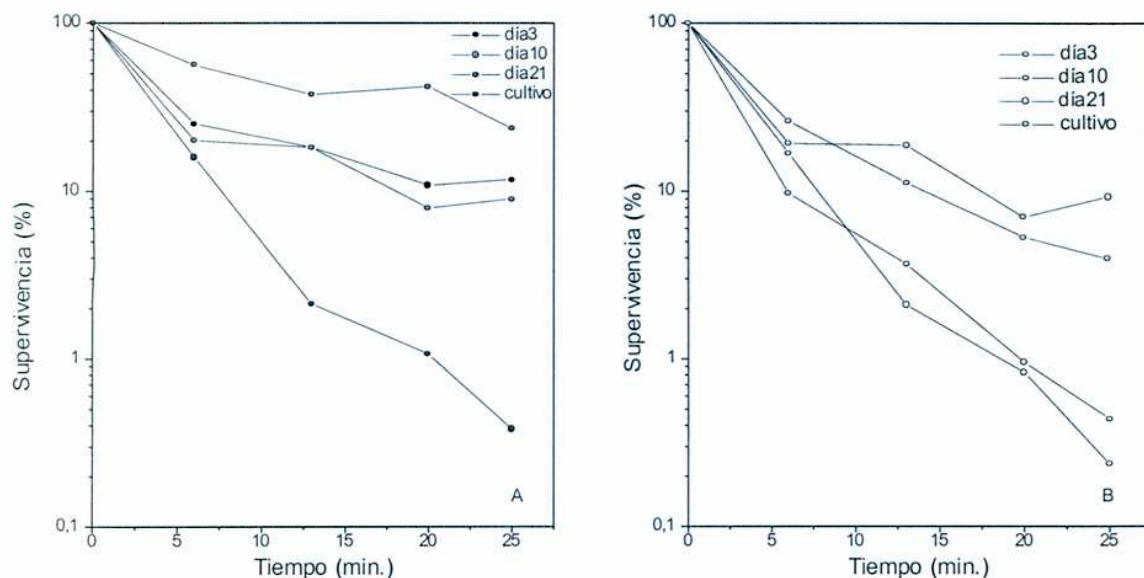


Figura 8. Resistencia a etanol de *P. oleovorans* GPo1 (A) y GPo500 (B) al tercer, décimo y vigésimo primer día del comienzo del experimento de supervivencia en agua de río estéril. Las células que se encontraban en los microcosmos fueron expuestas a etanol 20% durante distintos tiempos, luego de lo cual se determinó el número de células viables mediante la siembra por triplicado en placas de Agar Nutritivo. En ambos gráficos también se representan los porcentajes de supervivencia obtenidos para el cultivo de células en crecimiento expuestos al mismo tratamiento. El 100% de supervivencia corresponde al número de células viables para los días 3, 10 y 21 antes de la exposición al etanol. Los datos representan las medias de dos experimentos independientes.

Al tercer y décimo día del experimento la cepa salvaje muestra una incrementada resistencia al etanol con respecto al cultivo en crecimiento. Luego de 25 minutos de exposición, el porcentaje de células viables se encuentra alrededor del 10% (**Figura 8A**). Muy distinto es lo que se observa con *P. oleovorans* GPo500. Los resultados de la **Figura 8B** indican que al tercer día del experimento las células todavía no habían desarrollado una resistencia al etanol, debido a que los porcentajes de supervivencia obtenidos resultaron muy similares a los observados para el cultivo de células en crecimiento.

La cepa mutante muestra resistencia al etanol recién al décimo día del experimento. El porcentaje de células viables a los 25 minutos de exposición resultó igual al 4%, mucho mayor que el obtenido al día 3 (**Figura 8B**). Este incremento en la resistencia coincidió con el cambio observado en su morfología hacia células más pequeñas (**Figura 4B.c**).

Al día 21 del experimento, tanto para la cepa salvaje como para la mutante, se observa un aumento en la protección desarrollada contra el etanol, con respecto a los días anteriores. Los

porcentajes de supervivencia luego de 25 minutos de exposición fueron de 23 % para GPo1 y 9% para GPo500 (**Figura 8 A y B**).

En la **Figura 9 (A y B)** que se muestra a continuación, se observan los resultados de la exposición a 47°C para GPo1 y su correspondiente mutante deficiente en la síntesis de depolimerasa a los días 3, 10 y 21 del experimento de supervivencia.

Figura 9

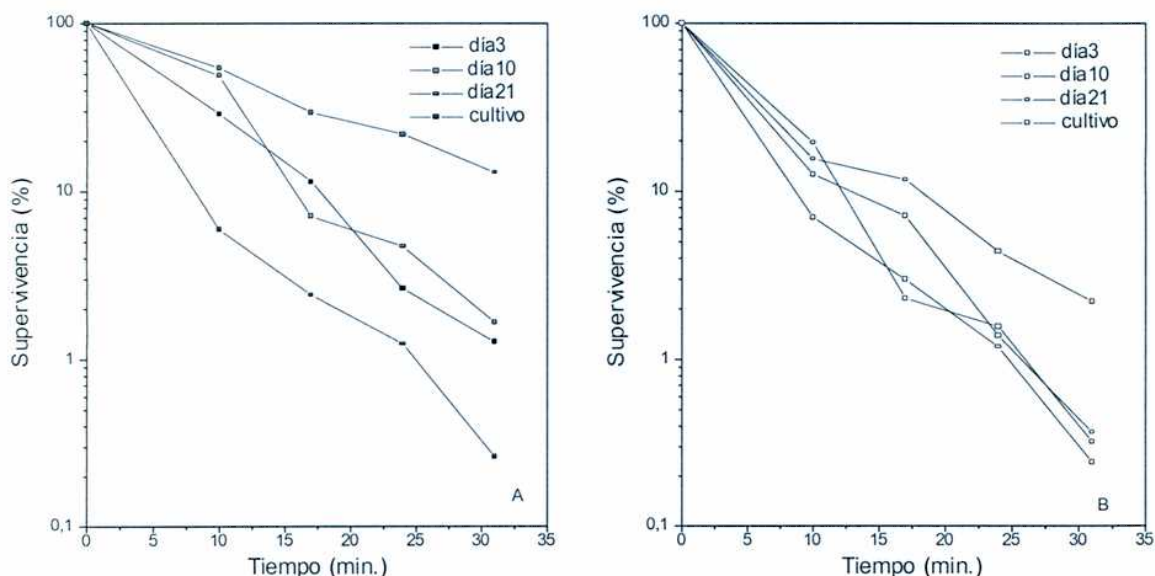


Figura 9. Resistencia al shock térmico de *P. oleovorans* GPo1 (A) y GPo500 (B) al tercer, décimo y vigésimo primer día del comienzo del experimento de supervivencia en agua de río estéril. Las células que se encontraban en los microcosmos fueron expuestas a una temperatura de 47°C durante distintos tiempos luego de lo cual se determinó el número de células viables mediante la siembra por triplicado en placas de Agar Nutritivo. En ambos gráficos también se representan los porcentajes de supervivencia obtenidos para el cultivo de células en crecimiento expuestos al mismo tratamiento. El 100% de supervivencia corresponde al número de células viables para los días 3,10 y 21 antes de la exposición a 47°C. Los datos representan la media de dos experimentos independientes.

En el caso de la cepa salvaje se observa un incremento gradual de la resistencia al estrés térmico conforme aumenta el tiempo de permanencia en los microcosmos. Para el tercer y décimo día del experimento el número de ufc obtenidas respecto al inicial, luego de 30 minutos a 47°C se encuentra alrededor del 2%, mientras que para el cultivo ese valor era de 0,2 %. Al día 21 el porcentaje de supervivencia se incrementa al 13%. (**Figura 9 A**).

La cepa deficiente en la síntesis de depolimerasa no desarrolla protección contra el estrés térmico durante el tercer y décimo día, ya que el porcentaje de células viables luego de 30 minutos de exposición es menor del 1% (**Figura 9 B**), al igual que lo obtenido para el cultivo de células en crecimiento. Finalmente, al día 21 del experimento existe un leve incremento en la protección contra el estrés térmico; luego de 30 minutos el porcentaje de supervivencia resultó aproximadamente del 2% (**Figura 9B**).

DISCUSIÓN

I. SUPERVIVENCIA DE *P. oleovorans* EN MICROCOSMOS DE AGUA DE RÍO

Mediante la realización de diversos experimentos, y utilizando distintos enfoques, se han intentado evaluar los factores determinantes de la supervivencia bacteriana en el ambiente. En la mayoría de estos experimentos, las bacterias se mantienen en condiciones limitantes de uno o más nutrientes esenciales para el crecimiento, con el objetivo de simular las condiciones que los microorganismos encuentran en su ambiente natural. En un experimento de supervivencia realizado en *P. putida*, se encontró que la misma permanecía totalmente viable luego de veinte días en un medio sin fuente de carbono. Después de seis meses, la viabilidad del cultivo había disminuido dos órdenes de magnitud (Givskov y col., 1994a). Resultados semejantes se encontraron en *P. fluorescens* (van Overbeek y col., 1995). En cambio, tanto *E. coli* K-12 (Reeve y col., 1984) como una cepa de *S. typhimurium* (Spector, 1992) sometidas a condiciones similares perdieron viabilidad en el rango de 1 a 2 órdenes de magnitud durante la primera semana del experimento.

En este trabajo, a diferencia de los mencionados en el párrafo anterior, no se intentan simular las condiciones que la bacteria encuentra en el ambiente, sino que los experimentos son realizados directamente en agua de río, utilizando microcosmos.

En agua de río estéril los recuentos de células viables de *P. oleovorans* disminuyen, como máximo, casi dos órdenes de magnitud (para el caso de la cepa GPo500) luego de 25 días en los microcosmos. Este resultado, al igual que los obtenidos para *P. putida* y *P. fluorescens*, demuestra la capacidad que tienen las *Pseudomonas* fluorescentes para hacer frente a extensos períodos en condiciones nutricionales desfavorables, particularmente a condiciones de escasez de carbono. En base a estas observaciones, estos microorganismos resultan adecuados para el estudio de la supervivencia en el ambiente.

La cepa de *P. oleovorans* incapaz de degradar el PHA acumulado muestra una capacidad de supervivencia menor que su correspondiente cepa parental, tanto en microcosmos de agua de río estéril, como en aquellos que incluyen la comunidad bacteriana autóctona. Estos resultados coinciden con los obtenidos con cepas salvajes y deficientes en la síntesis de PHB, de *A. eutrophus* y *B. megaterium* (López y col., 1995). Se ha demostrado que los polímeros de reserva, retrasan la degradación de RNA que es utilizado como fuente de energía en condiciones nutricionales desfavorables (Hippe, 1967); por este motivo, debido a las condiciones de escasez de nutrientes encontradas en los microcosmos (López y col., 1995), la incapacidad para degradar el PHA acumulado tiene un efecto negativo sobre la supervivencia.

La tinción con Azul del Nilo de las células de *P. oleovorans* GPo1 realizada 24 horas después de iniciado el experimento de supervivencia en agua de río estéril demostró que no se evidenciaban gránulos de PHA, es decir que el polímero ya había sido degradado y utilizado durante las primeras horas del experimento. Trabajos previos realizados con células de *Vibrio cholerae* en microcosmos de agua artificial de mar demostraron que estas bacterias utilizaban sus reservas enteras de PHB durante los primeros 7 días. (Hood y col.,1986). De acuerdo con estos resultados, los polímeros de reserva serían utilizados por la célula como fuente de energía durante los estadios iniciales de los experimentos de supervivencia.

En las células de *P. oleovorans* GPo500 se evidenciaron gránulos de PHA durante todo el transcurso del experimento, indicando que en ausencia de la depolimerasa no existiría ninguna vía de degradación alternativa.

Las diferencias encontradas en cuanto a la supervivencia en microcosmos estériles y no estériles, probablemente se deban a la influencia de interacciones biológicas, representadas por la competencia con las bacterias del río y otros microorganismos y la predación. La marcada disminución en la viabilidad de la población bacteriana en microcosmos no estériles para ambas cepas también podría sugerir una desventaja en la supervivencia de microorganismos de laboratorio, comparada con microorganismos autóctonos. Estos resultados coinciden con los previamente obtenidos en el laboratorio en microcosmos de agua de río (López y col., 1995) y en microcosmos de suelo (López y col.,1998).

El patrón de la curva de supervivencia en agua de río no estéril, el cual muestra una rápida disminución en el recuento de células desde los primeros días del experimento coincide con lo encontrado para otros microorganismos cuando son sometidos a condiciones de escasez de nutrientes (Morita, 1993).

II. CAMBIOS EN LA MORFOLOGÍA CELULAR Y DESARROLLO DE MECANISMOS DE RESISTENCIA EN *P. oleovorans* EN MICROCOSMOS DE AGUA DE RÍO ESTÉRIL.

La mayoría de las bacterias encontradas en el suelo y en el agua miden entre 0,4 y 0,8 μm y (Bae y col., 1972; Zimmerman y Meyer-Reil,1974) por este motivo son denominadas ultramicrocélulas. En ambientes naturales, este tamaño celular reducido tiene sus ventajas, ya que proporciona a la bacteria más superficie por unidad de volumen, de manera tal que la captación de sustratos resulta más eficiente y disminuye la probabilidad de predación.

La observación microscópica de las células de *P. oleovorans* demostró que ambas cepas experimentaban un cambio en su morfología durante el transcurso del experimento, y que las células se hacían más pequeñas conforme aumentaba el tiempo de permanencia en los microcosmos. Novitsky y Morita (1976) observaron los mismos resultados cuando células de *Vibrio* sp. se mantenían durante varias semanas en un medio salino sin nutrientes. De la misma manera, estos cambios morfológicos también se encontraron en *P. putida* sometida a condiciones de escasez de diversos nutrientes (Givskov y col., 1994a) y en *P. fluorescens* introducidas en microcosmos de suelo (van Overbeek y col., 1995).

La disminución en el tamaño celular es consistente con el aumento observado en el número de células viables durante los primeros días del experimento, ya que el mismo podría ser el resultado de una división reductiva (división celular sin un aumento concomitante de la biomasa bacteriana), que daría como resultado células más pequeñas. Este incremento inicial en el recuento de células fue observado previamente tanto para *P. putida* KT2442 (Givskov y col., 1994a) como para algunas especies de *Vibrio* (Novitsky y Morita, 1977) en medios pobres en carbono, y para cepas de *Rhizobium* sp. en microcosmos de suelo (Postma y col., 1991), y es considerada una estrategia para la supervivencia de las especies.

Si bien ambas cepas de *P. oleovorans* experimentan una disminución en su tamaño celular, dicha disminución se observó más tempranamente en la cepa deficiente en la síntesis de depolimerasa. Debido a que la incapacidad para degradar el PHA acumulado, impide que el mismo sea utilizado como fuente de carbono y energía, la bacteria se vería obligada a desarrollar otros mecanismos que le permitan hacer frente a las condiciones encontradas en los microcosmos. La disminución de tamaño y el cambio en la forma celular, le permitiría poder captar los sustratos en forma más eficiente.

Los resultados obtenidos al utilizar cultivos de *P. oleovorans* crecidos en condiciones de acumulación de PHA mostraron que ambas cepas desarrollaban una marcada resistencia al etanol. Dado que los cultivos se hicieron crecer hasta comienzos de la fase estacionaria es de esperar que los mismos desarrollen mecanismos de resistencia que estarían mediados por *rpoS*. Sorprendentemente, cuando estos cultivos fueron sometidos a estrés térmico, a diferencia de la cepa salvaje, la cepa deficiente en la síntesis de depolimerasa no mostró protección contra la temperatura. De acuerdo con estos resultados, la capacidad de degradación del polímero acumulado influye de alguna forma en las respuestas de resistencia contra el estrés térmico.

Las condiciones encontradas en los microcosmos son capaces de inducir en ambas cepas el desarrollo de mecanismos de resistencia a estrés. Esto es particularmente evidente, para el caso de

la protección desarrollada contra el etanol, que siempre resultó mayor que la desarrollada contra la temperatura. Las resistencias desarrolladas contra el estrés térmico recién se hacen notorias al día 21 del experimento. Estos resultados son similares a los obtenidos con una cepa de *P. fluorescens* introducida en microcosmos de suelo. En este caso se demostró que las bacterias desarrollaban una gran resistencia contra etanol, estrés osmótico y oxidativo, un día después de ser inoculadas en los microcosmos. Sin embargo, la resistencia a altas temperaturas recién se observó luego de cinco días (van Overbeek y col., 1995).

Para ambas cepas de *P. oleovorans* se evidencia un incremento en el grado de protección cruzada contra el etanol y la temperatura conforme aumenta el tiempo de permanencia en los microcosmos. Este incremento en el desarrollo de resistencias coincide con el cambio de morfología y la disminución en el tamaño celular. Para la cepa salvaje se observó un evidente cambio de morfología en el día 21, lo que coincidió con un incremento en el desarrollo de resistencias tanto para la temperatura como para el etanol. Igualmente, la cepa deficiente en la síntesis de depolimerasa de PHA disminuyó significativamente su tamaño en el décimo día del experimento, incrementándose conjuntamente la resistencia contra el etanol.

Es posible asumir que también en *P. oleovorans* la regulación de las formas de resistencia de la fase estacionaria tengan lugar por mecanismos similares a los mediados por *rpoS* en enterobacterias y en la especie altamente similar *P. putida*. Por lo tanto, debido a que la expresión del gen *rpoS* sería necesaria para el desarrollo de mecanismos de resistencia y para el cambio en la morfología celular, es lógico encontrar que estos efectos se desarrollen en forma coincidente.

Las resistencias desarrolladas contra el etanol por la cepa deficiente en la síntesis de depolimerasa fueron siempre menores que las desarrolladas por su cepa parental durante todo el transcurso del experimento en los microcosmos. La diferencia más notoria se encontró al tercer día del experimento, debido a que la cepa salvaje mostró una marcada resistencia, mientras que su correspondiente mutante resultó sensible a la exposición al etanol. Al igual que los resultados obtenidos al utilizar cultivos en condiciones de acumulación, la cepa GPo500 es incapaz de desarrollar protección contra el estrés térmico, a excepción de una leve resistencia el día 21. Estos resultados indicarían que la deficiencia en la síntesis de depolimerasa de PHA modifica de alguna manera el desarrollo de respuestas de resistencia a estrés, y en particular el desarrollo de protección cruzada contra el estrés térmico.

Estos resultados podrían explicarse teniendo en cuenta una observación realizada por VanBoegelen y col. (1987) en un trabajo realizado en *E. coli*, sobre respuestas globales inducibles. En ese trabajo se compararon las proteínas involucradas en dichas respuestas, que incluían la

respuesta a shock térmico y a etanol. Las proteínas inducidas ante la exposición a ambos agentes de estrés eran las mismas; sin embargo, la única diferencia entre ambas respuestas era el nivel del nucleótido guanosina tetrafosfato (ppGpp), que se encontraba más elevado en la respuesta al etanol. Los niveles intracelulares de este nucleótido aumentan en respuesta a la limitación de aminoácidos u otros nutrientes, lo cual se correlaciona con cambios fisiológicos que forman parte de la llamada “respuesta estricta” (Cashel y Rudd, 1987). Gentry y col. (1993) demostraron que el ppGpp es esencial en la activación de *rpoS*. Por lo tanto, teniendo en cuenta estos resultados es probable que ambos tipos de agentes de estrés induzcan diferencialmente la expresión del gen *rpoS* debido a la diferencia en los niveles de ppGpp intracelulares. Como - de acuerdo con lo observado por estos autores - no existe acumulación de este nucleótido en respuesta al estrés térmico, es de esperar que exista una menor protección contra la temperatura que la encontrada contra el etanol.

Es posible considerar que la degradación de PHA podría aportar parte de la energía necesaria para la síntesis de proteínas intervinientes en los mecanismos de protección. Otra posibilidad es que la energía proveniente de la degradación del polímero sea utilizada para la síntesis de nucleótidos, tales como el ppGpp que se encuentra involucrado en la inducción del factor sigma *rpoS*. Si esta hipótesis fuera cierta, aquellas células incapaces de degradar el polímero de reserva, como la cepa de *P. oleovorans* GPo500, deberían tener niveles más reducidos de ppGpp, lo que resultaría en una menor supervivencia ante condiciones de escasez de nutrientes y una mayor sensibilidad a los agentes de estrés, debido a una menor inducción de *rpoS*. De acuerdo con lo mencionado anteriormente, el desarrollo de respuestas de protección contra el estrés térmico se vería particularmente afectado.

Experimentos previos realizados con *S. typhimurium* (Spector y col.,1988) y *E. coli* (Jenkins y col.,1988; Jenkins y col.,1990; Matin,1991), bacterias incapaces de sintetizar PHA, indican que cuando las mismas son sometidas a condiciones de escasez de nutrientes desarrollan resistencias contra estrés térmico, estrés oxidativo, estrés osmótico y etanol. A diferencia de esto, los experimentos realizados con bacterias capaces de acumular y degradar PHA no muestran resultados concluyentes. En *P. putida* se obtuvieron resultados similares a los encontrados en enterobacterias (Givskov y col., 1994). Sin embargo en *Vibrio vulnificus* se demostró que existía un efecto significativo de protección contra la exposición al etanol, mientras que no se observó desarrollo de resistencia contra el estrés oxidativo y el estrés térmico, cuando las células se sometían a escasez de múltiples nutrientes (Weichart y Kjelleberg, 1996). Por otro lado, *P. fluorescens* mantenida en un medio sin fuente de carbono durante varias horas, desarrolló muy

poca resistencia contra la alta temperatura, pero resultó muy resistente al etanol, estrés osmótico y oxidativo.

Según nuestros resultados, la capacidad para degradar el polímero acumulado influye en la adquisición de resistencias contra los distintos agentes de estrés. Por este motivo las diferencias encontradas entre *P. putida*, *V. vulnificus* y *P. fluorescens* podrían deberse a la presencia o ausencia del polímero en las células, que en ninguno de los experimentos realizados es tomada en consideración.

III. CONCLUSIONES

En vista de los resultados obtenidos, podemos concluir:

- ♦ Las cepas de *Pseudomonas oleovorans* utilizadas poseen una gran capacidad para sobrevivir largos períodos ante las condiciones de escasez de nutrientes encontradas en los microcosmos.
- ♦ Estas cepas constituyen un sistema adecuado para el estudio de la supervivencia en el ambiente mediante métodos de expresión *in vivo*. Además, resultan más adecuadas que las cepas de *A. eutrophus* y *B. megaterium* deficientes en la síntesis de PHA anteriormente utilizadas en los estudios de supervivencia, debido a que en este caso se pueden controlar las condiciones que llevarían a la acumulación de PHA.
- ♦ La supervivencia de ambas cepas es menor cuando se incluye la comunidad bacteriana natural del río, probablemente debido a los efectos de la competencia con otros microorganismos y la predación.
- ♦ La incapacidad para degradar el PHA acumulado constituiría una desventaja en la supervivencia tanto en los microcosmos de agua de río estéril, como en aquellos de agua de río con los microorganismos autóctonos.
- ♦ Las condiciones encontradas en los microcosmos de agua de río son capaces de inducir en ambas cepas de *P. oleovorans* el desarrollo de mecanismos de resistencia a etanol y estrés térmico. Dichas resistencias se incrementan conforme aumenta el tiempo de permanencia en los microcosmos y los recursos se vuelven más limitantes. Este incremento en el desarrollo de resistencias coincide con un cambio en la morfología celular hacia células más pequeñas y redondeadas.
- ♦ La deficiencia en la síntesis de depolimerasa de PHA disminuye el desarrollo de resistencias contra el estrés en respuesta a condiciones de escasez de nutrientes, en particular el desarrollo de respuestas de protección contra el estrés térmico.

IV. INVESTIGACIONES FUTURAS

Los resultados obtenidos aquí indican que la deficiencia en la síntesis de depolimerasa de PHA disminuye tanto la supervivencia bacteriana como el desarrollo de respuestas de protección. Una estrategia que permitiría continuar con estos estudios consistiría en restaurar el fenotipo de la cepa mutante en la síntesis de depolimerasa, mediante la complementación de dicha mutación y verificar si se obtienen resultados similares a los encontrados para la cepa salvaje.

Asimismo, con el objetivo de determinar la influencia de *rpoS* en los resultados obtenidos, se podría mutar el gen homólogo al gen *rpoS* de *E. coli* en *P. oleovorans* GPo1 y GPo500 y, una vez hecho esto, observar si existen cambios en cuanto a la supervivencia y la resistencia al estrés de las mutantes *rpoS* con respecto a sus cepas parentales.

Para investigar más profundamente la influencia de la capacidad de degradación de PHA sobre las respuestas de resistencia desarrolladas ante condiciones de deficiencias nutricionales, sería conveniente también determinar cuales serían las respuestas desarrolladas por la cepa salvaje y la deficiente en la síntesis de depolimerasa cuando son expuestas a otras condiciones de estrés, como por ejemplo estrés oxidativo o estrés osmótico.

BIBLIOGRAFÍA

- **Aldea, M., Garrido, T., Hernández-Chico, C., Vicente, M. y Kushner, S. R.** 1989. Induction of a growth-phase-dependent promoter triggers transcription of *bolA*, an *Escherichia coli* morphogene. *EMBO J.* **8**: 3923-3931.
- **Aldea, M., Hernández-Chico, C., de la Campa, A. G., Kushner, S. R. y Vicente, M.** 1988. Identification, cloning and expression of *bolA*, an *fisZ*-dependent morphogene of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **170**: 5169-5176.
- **Anderson, A. J. y Dawes, E. A.** 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial use of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.* **54**: 450-472.
- **Bae, H. C., Cota-Robles, E. H. y Casida, L. E.** 1972. Microflora of soil as viewed by transmission electron microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* **23**: 637-648.
- **Braunegg, G., Sonnleitner B. y Lafferty, R.M.** 1978. A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **6**: 29-37.
- **Cashel M. y Rudd, K. E.** 1987. The stringent response. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology, en Neidhardt F.C., Ingraham, J.L., Low, K.B., Magasanik, B., Schaechter, M. y Umberger, H.E. (eds.). vol. 2. pág: 1410-1438. American Society for Microbiology. Washington DC. EEUU.
- **Christensen, H., Boye, M., Poulsen, L. K. y Rasmussen, O. F.** 1994. Analysis of fluorescent *Pseudomonas* based on 23S ribosomal DNA sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 2196-2199.
- **Christman, M. F., Morgan, R. W., Jacobson, F. S. y Ames B. N.** 1985. Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimurium*. *Cell* **41**:753-762.
- **Dawes, E. A. y Senior, P. J.** 1973. The role and regulation of energy reserve polymers in micro-organisms. *Adv. Microb. Physiol.* **10**: 135-266.
- **De Smet, M. J., Eggink, B., Witholt, B., Kingma J. y Wynberg, H.** 1983. Characterization of intracellular inclusions formed by *Pseudomonas oleovorans* during growth on octane. *J. Bacteriol.* **154**: 870-878.
- **Dow, C. S., Whittenbury, R. y Carr, N. G.** 1983. The 'shut down' or 'growth precursor' cell. An adaptation for survival in a potentially hostile environment, en: *Microbes in Their Natural Environments*. Slater, J. H, Wittenbury, R. y Wimpenny, J. W. T.(eds.). vol. 34.Cambridge University Press, Londres, pág: 187-247.
- **Gallant, J.** 1979. Stringent control in *E. coli*. *Annu Rev. Genet.* **13**: 393-415.
- **Gentry, D. R., Hernandez, V. J., Nguyen, L. H., Jensen, D. B. y Cashel, M.** (1993). Synthesis of the stationary-phase sigma factor σ^S is positively regulated by ppGpp. *J. Bacteriol.* **175**: 7982-7989.
- **Givskov M., Eberl L., Moller, S., Kongbak Poulsen, L. y Molin S.** 1994a. Responses to nutrient starvation in *Pseudomonas putida* KT2442: Analysis of general cross-protection, cell shape, and macromolecular content. *J. Bacteriol.* **176**: 7-14.
- **Givskov M., Eberl L., Moller, S., y Molin S.** 1994b. Responses to nutrient starvation in *Pseudomonas putida* KT2442: Two-dimensional electrophoretic analysis of starvation- and stress- induced proteins. *J. Bacteriol.* **176**: 4816-4824.
- **Gottesman, S.** 1984. Bacterial regulation: global regulatory networks. *Annu. Rev. Genet.* **18**:

415-441.

- **Groat, R. G. y Matin A.** 1986. Synthesis of unique proteins at the onset of carbon starvation in *Escherichia coli*. *J. Ind. Microbiol.* **1**: 69-73.
- **Groat, R. G., Schultz, J. E., Zychlinsky, E., Bockman A. y Matin A.** 1986. Starvation proteins in *Escherichia coli*: kinetics of synthesis and role in starvation survival. *J. Bacteriol.* **168**: 486-493.
- **Handrick, R. y Jendrossek, D.** 1998. Extracellular and intracellular polyhydroxyalkanoate depolymerases: Homologies and differences, en *Biochemical principles and mechanisms of biosynthesis and biodegradation of polymers. Proceedings of an International Symposium held at the Westfälische Wilhelms- Universität, Münster, Alemania.* Alexander Steinbüchel, eds. Wiley. UCH.
- **Hayward, A. C., Forsyth, W. G. C. y Roberts, J. B.** 1959. *J. Gen. Microbiol.* **20**: 510-518.
- **Haywood, G. W., Anderson A. J. y Dawes E. A.** 1989. A survey of the accumulation of novel polyhydroxyalkanoates by bacteria. *Biotechnol. Lett.* **11**: 471-476.
- **Haywood, G. W., Anderson A. J., Ewing, D. F. y Dawes E. A.** 1990. Accumulation of a polyhydroxyalkanoate containing primarily 3-hydroxydecanoate from simple carbohydrate substrates by *Pseudomonas* sp. strain NCIMB 40135. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 3354-3359
- **Henrysson, T. y McCarty, P. L.** 1993. Influence of the endogenous storage lipid poly- β -hydroxybutyrate on the reducing power availability during cometabolism of trichloroethylene and naphthalene by resting methanotrophic mixed cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1602-1606.
- **Hippe, H.** 1967. Abbau und Wiederverwertung von Poly- β -hydroxybuttersäure durch *Hydrogenomonas* H16. *Arch. Mikrobiol.* **56**: 248-277.
- **Huisman, G. J., de Leeuw, O., Eggink, G. y Witholt, B.** 1989. Synthesis of poly-3-hydroxyalkanoates is a common feature of fluorescent pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 1949-1954.
- **Huisman, G. W., Wonink, E., Meima, R., Kazemier B., Terpstra, P. y Witholt B.** 1991. Metabolism of poly(3-hydroxyalkanoates) (PHAs) by *Pseudomonas oleovorans*. **266**: 2191-2198.
- **Jenkins, D. E., Chaisson, S. A. y Matin, A.** 1990. Starvation-induced cross protection against osmotic challenge in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172**: 2779-2781.
- **Jenkins, D. E., Schultz, J. E., y Matin, A.** 1988. Starvation-induced cross protection against heat or H₂O₂ challenge in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **170**: 3910-3914.
- **Kessler, B., Kraak, M. N, Ren, Q., Klinke, S., Prieto, M. y Witholt B.** 1998. Enzymology and molecular genetics of PHA₁ biosynthesis, en *Biochemical principles and mechanisms of biosynthesis and biodegradation of polymers. Proceedings of an International Symposium held at the Westfälische Wilhelms- Universität, Münster, Alemania.* Alexander Steinbüchel, eds. Wiley. UCH.
- **Kjelleberg, S., Albertson, Flardh, N., Holmquist, L., Jouper-Jaan, A., Marouga, R., Ostling J., Svenblad, B. y Weichart, D.** 1993. How do non-differentiating bacteria adapt to starvation?. *Antonie van Leeuwenhoek.* **63**: 333-341.
- **Kjelleberg, S., Hermansson, M., Mardén, P. y Jones, G.W.** 1987. The transient phase between growth and nongrowth of heterotrophic bacteria, with special emphasis on the marine

environment. *Annu. Rev. Microbiol.* **41**: 25-49.

- **Lageveen, R. G., Huisman G. W., Preusting, H., Ketelaar, P., Eggink G. y Witholt B.** 1988. Formation of polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: effect of substrates on formation and composition of poly-(R)-3-hydroxyalkanoates and poly-(R)-3-hydroxyalkenoates. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 2924-2932.
- **Lange, R., y Hengge-Aronis, R.** 1991. Identification of a central regulator of stationary phase gene expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **5**: 49-59.
- **Lee, C. W. B., Waugh, J. S., y Griffin, R.G.** 1986. Solid-state NMR study of trehalose/1,2-dipalmitoyl-*sn*-phosphatidylcholine interactions. *Biochemistry.* **25**: 3737-3742.
- **Lemoigne, M.** 1926. Produits de déshydratation et de polymérisation de l'acide β -oxybutyrique. *Bull. Soc. Chim. Biol.* **8**: 770-782.
- **López, N. I., Floccari, M. E., Steinbuchel A., García, A. F. y Méndez B. S.** 1995. Effect of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) content on the starvation- survival of bacteria in natural waters. *FEMS. Microbiol. Ecol.* **16**: 95-112.
- **López, N. I., Ruiz, J. A. y Méndez, B. S.** 1998. Survival of poly-3-hydroxybutyrate - producing bacteria in soil microcosms. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **14**: 681-684.
- **Mahan, M. J., Slauch, J. M. y Mekalanos, J. J.** 1993. Selection of bacterial virulence genes that are specifically induced in host tissues. *Science.* **259**: 686-688.
- **Maniatis, T., Fritsch, E. F. y Sambrook, J.** 1982. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York.
- **Matin, A.** 1991. The molecular basis of carbon-starvation induced general resistance in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **5**: 3-10.
- **Matin, A., Veldhuis, C., Stegeman, V. y Veenhuis, M.** 1979. Selective advantage of a *Spirillum* sp. in a carbon-limited environment. Accumulation of poly- β -hydroxybutyric acid and its role in starvation. *J. Gen. Microbiol.* **112**: 349-355.
- **McCann, M. P., Kidwell, J. P. y Matin A.** 1991. The putative σ factor KatF has a central role in development of starvation-mediated general resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **173**: 4188-4194.
- **Morgan, A. F. y Harley, F. D.** 1995. Chromosomal map of *Pseudomonas putida* PPN, and a comparison of gene order with the *Pseudomonas aeruginosa* PAO chromosomal map. *J. Gen. Microbiol.* **131**: 885-896.
- **Morgan, R. W., Christman, M. F., Jacobson, F. S., Storz G. y Ames, B. N.** 1986. Hydrogen peroxide-inducible proteins in *Salmonella typhimurium* overlap with heat shock and other stress proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**: 8059-8063.
- **Morita, R.Y.** 1985. Starvation and miniaturisation of heterotrophs, with special emphasis on maintenance of the starved viable state, en: *Bacteria in Their Natural Environments*. Fletcher, M. M. y Floodgate, G. D. eds. Academic Press. New York. pág: 111-130.
- **Morita, R. Y.** 1993. Bioavailability of energy and the starvation state, en: *Starvation in Bacteria*. Kjelleberg, S. eds. Plenum Press. New York. pág: 1-23.
- **Mulvey, M. R., Switala, J., Borys, A. y Loewen, P. C.** 1990. Regulation of transcription of *katE* and *katF* in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172**: 6713-6720.
- **Neidhardt, F. C., VanBogelen, R. A. y Vaughn V.** 1984. The genetics and regulation of heat-

shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* **18**: 295-329.

- **Novitsky, J. A. y Morita, R. Y.** 1976. Morphological characterization of small cells resulting from nutrient starvation in a psychrophilic marine vibrio. *Appl. Environ. Microbiol.* **32**: 619-622.
- **O' Farrel, P.** 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**: 4007-40021.
- **Okon, Y. e Itzigsohn, R.** 1992. Poly- β -hydroxybutyrate metabolism in *Azospirillum brasilense* and the ecological role of PHB in the rhizosphere. *FEMS Microbiol. Rev.* **103**: 131-141.
- **Ostle, A. y Holt, J. G.** 1982. Nile Blue A as a fluorescent stain for poly- β -hidroxybutyrate. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**: 238-241.
- **O'Sullivan, D. J. y O'Gara, F.** 1992. Traits of fluorescent *Pseudomonas* sp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiol. Rev.* **56**: 662-676.
- **van Overbeek, L. S., Eberl, L., Givskov, M., Molin, S. y van Elsas, J. D.** 1995. Survival of, and induced stress resistance in, carbon-starved *Pseudomonas fluorescens* cells residing in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 402-4208.
- **Palleroni, N. J., Kunisawa R., Contopoulou R. y Doudoroff, M.** 1973. Nucleic-acid homologies in genus *Pseudomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **23**: 333-339.
- **Postma, J., Hok-A-Hin, C. H., Schotman, J. M. T., Wijffelman, C.A. y van Veen, J. A.** 1991. Population dynamics of *Rhizobium leguminosarum* Tn5 mutants with altered cell surface properties introduced into sterile and nonsterile soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 649-654.
- **Preusting, H., Nijenhuis, A. y Witholt., B.** 1990. Physical characteristics of poly (3-hydroxyalkanoates) and poly (3-hydroxyalkenoates) produced by *Pseudomonas oleovorans* grown on aliphatic hydrocarbons. *Macromolecules.* **23**: 4220-4224.
- **Ramos-González, M. I. y Molin S.** 1998. Cloning, sequencing, and phenotypic characterization of the *rpoS* gene from *Pseudomonas putida* KT2440. *J. Bacteriol.* **180**: 3421-3431.
- **Reeve, C. A., Amy P. S. y Matin, A.** 1984. Role of protein synthesis in the survival of carbon-starved *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **160**: 1041-1046.
- **Rehm, B. H. A., Kruger, N. y Steinbuchel, A.** 1998. A new metabolic link between fatty acid *de novo* synthesis and polyhydroxyalkanoic acid synthesis. *J. Biol. Chem.* **273**: 24044-24051.
- **Schellhorn, H. E. y Hassan, H. M.** 1988. Transcriptional regulation of *katE* in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **170**: 4286-4292.
- **Schwartz, R. D. y Mc Coy, C. J.** 1973. *Pseudomonas oleovorans* hydroxylation-epoxidation system: additional strain improvements. *Appl. Microbiol.* **26**: 217-218.
- **Simon, R., O' Connell, M., Labes, M. y Pühler, A.** 1986. Plasmid vectors for the genetic analysis and manipulation of Rhizobia and other Gram-negative bacteria. *Methods Enzymol.* **118**: 640-65
- **Simon, R., Priefer, U. y Pühler, A.** 1983. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Bio/Technology.* **1**: 784-791.
- **Slater, S. C., Voige, W. H. y Dennis, D. E.** 1988. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Alcaligenes eutrophus* H16 poly- β -hydroxybutyrate biosynthetic pathway. *J. Bacteriol.*

170: 4431-4436.

- **Spector, M. P. y Cubbitt, C. L.** 1992. Starvation-inducible loci of *Salmonella typhimurium*: regulation and roles in starvation survival. *Mol. Microbiol.* **6**: 1467-1476.
- **Spector, M. P., Park, Y. K., Tirgari, S., Gonzalez, T. y Foster, J. W.** 1988. Identification and characterization of starvation-regulated genetic loci in *Salmonella typhimurium* by using Mud-directed *lacZ* operon fusions. *J. Bacteriol.* **170**: 345-351.
- **Strauss, E. J., Falkow, S.** Microbial Pathogenesis: Genomics and beyond. 1997. *Science*. **276**: 707-712.
- **Timm, A. y Steinbüchel, A.** 1990. Formation of polyesters consisting of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and other fluorescent pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 3360-3367.
- **VanBogelen, R.A., Acton, M.A. y Neidhardt, F.C.** 1987. Induction of the heat shock regulon does not produce thermotolerance in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* **1**: 525-531.
- **VanBogelen, R.A., Kelley P.M. y Neidhardt, F.C.** 1987. Differential induction of heat shock, SOS, and oxidation stress regulons and accumulation of nucleotides in *Escherichia coli*. **169**: 26-32.
- **Vogel, H. J. y Bonner, B. N.** 1956. Acetyl-ornithinase of *Escherichia coli*: partial purification and some properties. *J. Biol. Chem.* **218**: 97-106.
- **Wagner-Dobler, I., Pipke, R., Timmis, K. N. y Dwyer, D. F.** 1992. Evaluation of aquatic sediment microcosms and their use in assesing possible effects of introduced microorganisms on ecosystem parameters. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1249-1258.
- **Walker, G. C.** 1984. Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **48**: 60-93.
- **Weichart, D. y Kjelleberg, S.** 1996. Stress resistance and recovery potential of culturable and viable but nonculturable cells of *Vibrio vulnificus*. *Microbiology*. **142**: 845-853.
- **Zimmerman, R. y Meyer-Reil, L. A.** 1974. A new method for fluorescence staining of bacterial populations on membrane filters. *Kiel. Meeresforsch.* **30**: 24-27.