

03088

2
2ej.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE
POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

"Clonación y secuenciación de los genes que codifican la
degradación del detergente dodecilbenceno sulfonato de
cadena ramificada en *Pseudomonas aeruginosa* W51D"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA

P R E S E N T A:

M. ENC. JESUS CAMPOS GARCIA

CUERNAVACA, MORELOS

NOVIEMBRE DE 1998.

267700

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

PAGINACION

DISCONTINUA

**ESTE TRABAJO SE REALIZO EN EL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
MOLECULAR DEL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA DE LA U. N. A. M.,
BAJO LA ASESORIA DE LA DRA. GLORIA SOBERON CHAVEZ.**

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Gloria Soberón Chávez, mi mayor agradecimiento por brindarme su apoyo e invaluable asesoría durante la realización de esta tesis y por su contribución en mi formación profesional.

A la participación del comité tutorial Dra. Gloria Soberón Chávez, Dra. E. Guadalupe Espín Ocampo y al Dr. Rafael Vázquez Duhalt, por las aportaciones y sugerencias durante la realización del trabajo experimental.

A los miembros del jurado de examen Dra. Gloria Soberón Chávez, Dra. Alicia González Manjarréz, Dra. Carmen Gómez Eichelmann, Dr. Miguel Lara Flores, Dr. Lorenzo Segovia Forcella, Dr. Enrique Merino Pérez y Dr. Humberto Flores Soto, por su valiosa intervención en la revisión de la tesis.

Al grupo del Dr. Juan Luis Ramos de la Estación Experimental del Zaidin, CSIC, Granada, España; por la ayuda y colaboración en parte de la realización del trabajo experimental.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el otorgamiento de becas para la realización del posgrado. PADEP (030506), CONACyT (91911).

Para no excluir a ninguno, mi agradecimiento a todos mis amigos y compañeros de trabajo.

DEDICATORIAS

A la grandeza de Dios y la naturaleza

A mi querida esposa Martha Patricia Morales Robledo

A mis Padres Joaquín Campos Ochoa y Ma. de Jesús García M.

A mis hermanos, sobrinos y demás familiares

A la luz que se extinguió y a la estrella que alumbrando viene en camino

INDICE

RESUMEN

I.- INTRODUCCION

- 1.- BIODEGRADACION Y RECALCITRANCIA
- 2.- MECANISMOS DE RECALCITRANCIA
- 3.- GENERALIDADES DE SURFACTANTES
 - 3.1 GENERALIDADES
 - 3.2 CLASIFICACION DE SURFACTANTES
- 4.- GENERALIDADES DE ALQUILBENCENO SULFONATOS
- 5.- MECANISMOS DEGRADATIVOS DE ALQUILBENCENO SULFONATOS
 - 5.1 ANTECEDENTES BIODEGRADATIVOS DE ALQUILBENCENO SULFONATOS
 - 5.2 MECANISMO DEGRADATIVO DE ALQUILBENCENO SULFONATOS
 - 5.3 MECANISMO DE DESULFONACION EN ALQUILBENCENO SULFONATOS
 - 5.4 PLASMIDOS EN LA DEGRADACION DE ALQUILBENCENO SULFONATOS
- 6.- DEGRADACION DE ALCANOS
 - 6.1 DEGRADACION DE N-ALCANOS
 - 6.2 DEGRADACION DE ALCANOS RAMIFICADOS
 - 6.3 DEGRADACION DE ISOPRENOIDES ACICLICOS
- 7.- MECANISMOS DEGRADATIVOS DE COMPUESTOS BENZENICOS
 - 7.1 GENERALIDADES DE OXIGENASAS
 - 7.2 HIDROXILASAS Y DIOXIGENASAS DE ANILLOS AROMATICOS
 - 7.3 HIDROXILASAS DE GRUPOS ALQUILO
 - 7.4 DIOXIGENASAS QUE ROMPEN ANILLOS AROMATICOS
- 8.- MECANISMOS DEGRADATIVOS DE DERIVADOS DEL BENCENO

II.- RESULTADOS Y DISCUSIONES

- 9.- ANTECEDENTES EXPERIMENTALES
- 10.- OBTENCION DE MUTANTES
- 11.- AISLAMIENTO DE LOS GENES SILVESTRES
- 12.- ANALISIS DE SECUENCIA NUCLEOTIDICA DE LA CLONA pUCP20:CN8

III.- ANEXO 1

- 13.- DISCUSION Y CONCLUSIONES ADICIONALES DEL ANEXO 1.

IV.- ANEXO 2

- 14.- DISCUSION Y CONCLUSIONES ADICIONALES DEL ANEXO 2.
 - 14.1 EFECTO DE LA MUTACION EN *ctrA* SOBRE LA DEGRADACION DEL DETERGENTE B-DBS.
 - 14.2 CARACTERIZACION DE *CtrA*
 - 14.3 CATABOLISMO DE B-DBS POR *P. aeruginosa* W51D.

V.- ANEXO 3

- 15.- DISCUSION ADICIONAL DEL ANEXO 3.
 - 15.1 CARACTERIZACION DE LA SECUENCIA NUCLEOTIDICA DE LA CLONA pUCP20:PL70

VI.- PERSPECTIVAS EXPERIMENTALES

VII.- BIBLIOGRAFIA

RESUMEN

La biorremediación, uno de los procesos modernos en la remoción de contaminantes, se basa principalmente en el uso de microorganismos ya existentes o bien de organismos transgénicos capaces de eliminar agentes contaminantes, transformándolos en compuestos menos complejos, más biodisponibles y no tóxicos. La ingeniería de proteínas constituye una gran herramienta en el mejoramiento de estos organismos o de sus actividades, permitiendo la manipulación, modificación y mejoramiento de las enzimas degradativas. Los surfactantes, compuestos originados por síntesis orgánica son ampliamente usados en formulaciones de detergentes. En la actualidad, los detergentes biodegradables han desplazado a los surfactantes considerados poco biodegradables o recalcitrantes, excepto en los países subdesarrollados carentes de normas ecológicas estrictas, lo cual ha provocado un incremento en el número de casos de contaminación ambiental por detergentes en estos países. Por lo que el estudio de los mecanismos degradativos de surfactantes recalcitrantes constituye un importante campo de estudio para finalmente llegar a la biorremediación de aguas contaminadas por estos compuestos.

En esta tesis se describe la caracterización genética de la degradación del surfactante dodecilbenceno sulfonato ramificado (B-DBS) considerado recalcitrante, por *Pseudomonas aeruginosa* W51D. Reportamos que el gen *ctrA* codifica para una proteína del tipo oxido-reductasas, involucrada en la asimilación del citronelal. A su vez, la obtención de una mutante de la cepa W51D en el gen *ctrA* mostró una disminución del 40% en la cantidad de B-DBS degradado, indicando la participación de CtrA en la degradación del B-DBS. Por otro lado, basados en el análisis de los productos acumulados en cultivos de la cepa W51D en B-DBS se propone la vía degradativa del B-DBS. Una de las vías es la de degradación del citronelol y la otra parece ser un mecanismo modificado de la β -oxidación. Además, se propone que la asimilación del grupo aromático probablemente ocurre por la vía del protocatecuato hacia la formación de intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos.

Lateralmente, se identificó un gen adyacente a *ctrA*, caracterizado como *rhIG*, el cual se vió involucrado en la síntesis de la fracción hidrofóbica de la molécula de ramnolípido (surfactante biológico), su producto codificado fue involucrado específicamente en la reducción del precursor β -oxoácido de los ramnolípidos. Adicionalmente, el gen *rhIG* también mostró efecto sobre la producción de PHA, aunque no fue indispensable para la síntesis de polímero.

Finalmente, se describe la participación del producto del gen *hscA* en el mecanismo de estabilización de la enzima alcohol deshidrogenasa, funcionando como chaperona molecular cuando el microorganismo es sujeto a estrés térmico y por etanol.

Vo. Bo.



DRA. GLORIA SOBERON CHAVEZ

A B S T R A C T


Bioremediation is a process for pollutant removal, which can use indigenous microbes or genetically engineered microorganisms (GEMs) for elimination of many pollutants. These compounds are converted to less complex, more available and nontoxic metabolites. Protein engineering is used in the improvement of GEMs enzymatic degradative activities.

The surfactant currently used in detergent formulations are produced by organic synthesis. Today, the recalcitrant surfactants have been displaced by biodegradable surfactants on most countries, with the exception of some underdeveloped countries. For this reason, the study of the recalcitrant surfactants degradative pathways is very important and might lead to the use of GEMs in their bioremediation. In this thesis the genetic characterization of the degradation of the recalcitrant surfactant branched-chain dodecylbenzene sulfonate (B-DBS) by *Pseudomonas aeruginosa* W51D is described. We report that the *ctrA* gene encode an oxide-reductase enzyme, involved in citronellal assimilation. A *ctrA* mutant derivative from *P. aeruginosa* W51D was isolated, and we show that CtrA participates in the B-DBS degradation pathway. We also isolated some B-DBS degradation intermediates which were used to propose the complete B-DBS degradation pathway. Part of this route involves the citronellol degradation pathway and another branch seems to involve a modified β -oxidation mechanism. Subsequently, we propose that the aromatic moiety is probably assimilated to produce protocatechuate, which is finally metabolized to yield tricarboxylic acid cycle intermediaries.

Additionally, we identified a gene adjacent to *ctrA* in strain W51D, which was named *rhIG*. The RhIG protein was specifically involved in the reduction of the β -oxoacyl moiety precursor of the rhamnolipid molecule (biological surfactant). The *rhIG* gene product is also involved in PHA production, although it is not essential for the synthesis of this polymer.

Finally, it is describe that the *hscA* gene product is involved in the stabilization of the enzyme ethanol dehydrogenase. We propose that the HscA protein functions as molecular chaperon when *P. aeruginosa* is subject to temperature and ethanol stresses.

Vo. Bo.



DRA. GLORIA SOBERON CHAVEZ

I.- INTRODUCCION

1.- BIODEGRADACION Y RECALCITRANCIA

En años recientes hemos sido testigos de un dramático aumento en la producción de una amplia variedad de químicos, que han sido liberados al ambiente tanto en pequeñas como en grandes cantidades. Una proporción significativa de estos materiales es destruido por actividades catabólicas aportadas por microorganismos del suelo y agua, pero otra gran proporción persiste en el ambiente constituyendo de tal manera, un problema de contaminación ambiental. Tanto las reacciones fotoquímicas como las no enzimáticas son comunes en la naturaleza; estas reacciones causan cambios considerables en muchas sustancias pero raramente se llega a una degradación total. Un efecto contrario ocurre en las reacciones degradativas aeróbicas catalizadas por comunidades microbianas las cuales usualmente logran la conversión de los substratos a CO₂, agua y otros productos orgánicos. Aunque el acoplamiento de los factores físicos, químicos y biológicos en las actividades microbianas favorece grandemente la biodegradabilidad de compuestos recalcitrantes.

Sin embargo, un número muy grande de compuestos sintéticos no son sujetos a biodegradación parcial o total, o bien los productos formados son destruidos a tan bajas proporciones que ocurre una acumulación de sustancias no deseadas en el ambiente. Por otra parte, la resistencia a la degradación de los compuestos es una propiedad poco considerada por la industria inovadora de nuevos productos sintéticos.

La **biorremediación** constituye el uso de agentes biológicos, esencialmente microorganismos, para eliminar o reducir la concentración de sustancias tóxicas presentes en un sitio o en un residuo contaminado (líquido o sólido). La biorremediación es frecuentemente señalado como el proceso más sencillo tecnológicamente y potencialmente el más económico en la eliminación de contaminantes ambientales.

Los criterios para evaluar la contaminación y establecer los objetivos de remediación varían ampliamente entre los países e inclusive entre los gobiernos locales de un país. Debido a la variedad de casos encontrados, si bien algunas autoridades han adoptado guías o estándares para evaluar la contaminación, las acciones de remediación y los niveles de limpieza se determinan específicamente para cada caso en particular, por lo que la contaminación es evaluada sobre la base "caso por caso".

La **biodegradación** se define como el cambio producido por un sistema biológico a una sustancia orgánica hacia la formación de otra, independientemente de la extensión de dicho cambio. Cuando el cambio es pequeño, ésta es transformada en otra molécula estructuralmente relacionada en cuyo caso la sustancia sólo pierde una propiedad específica; a éste proceso se le llama **biotransformación** o bien biodegradación primaria (Cain, 1992). Cuando la biodegradación culmina con la conversión total de los

compuestos orgánicos en biomasa, anhídrido carbónico, agua y sales minerales se denomina **mineralización** o biodegradación final. Desde el punto de vista ambiental interesa que la biodegradación tenga lugar hasta que desaparezcan las propiedades tóxicas indeseables de la sustancia.

Se denomina **persistente** a una sustancia que no muestra biodegradación bajo determinadas condiciones impuestas. Cuando una sustancia es resistente a la biodegradación bajo cualquier condición se denomina **recalcitrante** (Grady, 1985.) En la práctica es difícil distinguir persistencia de recalcitrancia.

Cuando se aumenta la velocidad y/o extensión de la biodegradación por microorganismos autóctonos mediante la optimización de los factores ambientales (aplicación de nutrientes, corrección de pH, aereación, agitación, etc.) el proceso se denomina **biodegradación acrecentada** y la estrategia empleada **bioestimulación**. A la incorporación de microorganismos con capacidad para degradar rápidamente contaminantes en un determinado sitio se llama **bioaumentación**.

Los microorganismos degradan los contaminantes orgánicos básicamente por dos mecanismos: 1) la utilización del compuesto como fuente de carbono y energía para funciones de crecimiento (formación de biomasa) y mantenimiento celular; 2) por co-metabolismo, donde el compuesto es transformado, pero no necesariamente es utilizado para crecimiento. Este último mecanismo es importante en hidrocarburos aromáticos de alto peso molecular. Los géneros bacterianos más comúnmente reportados como organismos degradadores de hidrocarburos aromáticos son: *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Corynebacteria*, *Cyanobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* y *Vibrio*. La biodegradación también es llevada a cabo por hongos y levaduras, pero en este trabajo no serán abordados.

Los factores abióticos como son la volatilización, lixiviación, arrastre superficial y adsorción, pueden reducir el contenido de contaminantes en una matriz dada, pero no lo eliminan realmente del medio ambiente. La biodegradación de compuestos orgánicos ha mostrado ser el principal mecanismo de eliminación real de muchos contaminantes ambientales por lo que el conocimiento de los mecanismos degradativos y de los factores influyentes a estos es de fundamental importancia para lograr una efectiva biorremediación. La biodegradación es influenciada o limitada por factores físicos, químicos y biológicos; en la tabla 1 se muestran los factores con mayor relevancia para cada uno de los encabezados.

Los hidrocarburos aromáticos constituyen un grupo prioritario de contaminantes debido a sus propiedades tóxicas, mutagénicas y cancerígenas, así como su persistencia en el ambiente. Son compuestos escasamente solubles en agua, poseen un alto punto de

ebullición y tienen tendencia a fijarse sobre materia orgánica y partículas pequeñas del suelo, sedimentos y aire. Si bien se han encontrado muchos organismos capaces de degradarlos, su baja solubilidad y su facilidad para ser retenidos contribuyen a su persistencia en el medio ambiente. Adicionalmente, los hidrocarburos aromáticos son formados naturalmente durante reacciones térmicas (procesos geológicos, incendios forestales, etc.) y principalmente son componentes naturales del petróleo. Sin embargo, la mayor cantidad presente en el medio ambiente tiene un origen antropogénico. Una de las causas es la incompleta combustión de materia orgánica en procesos de generación de energía y la obtención o uso de sus derivados.

Tabla 1.- Factores que influyen en la velocidad y extensión de la biodegradación (Ferrari, 1995).

FACTORES FISICOS
<ul style="list-style-type: none"> - Estado físico del contaminante: solubilidad, adsorción, emulsificación - Modelo de flujo, agitación en sistemas líquidos. - Temperatura - Presión
FACTORES QUIMICOS
<ul style="list-style-type: none"> - pH - Nutrientes - Concentración y velocidad de suministro de oxígeno - Salinidad - Concentración del contaminante / Velocidad de aplicación del material contaminado en el sistema de tratamiento - Tipo y cantidad de los contaminantes (componentes principales y asociados) - Humedad - Tipo de suelo: textura, contenido de materia orgánica
FACTORES BIOLÓGICOS
<ul style="list-style-type: none"> - Tipo de microorganismos presentes - Concentración de microorganismos degradadores

La biodegradación de hidrocarburos requiere una capacidad metabólica amplia aportada generalmente por una comunidad microbiana. Dependiendo de la composición de dicha comunidad y de su adaptación a la presencia del o los contaminantes la degradación se verá favorecida en menor o mayor grado. Diferentes estudios han mostrado que la exposición previa de una comunidad microbiana a los contaminantes incrementa la velocidad y extensión de la biodegradación. El aumento del potencial de degradación por exposición se denomina **adaptación**. Existen tres mecanismos relacionados por el cual tiene lugar la adaptación:

1) Inducción o activación de enzimas específicas.

- 2) Cambios genéticos dando como resultado nuevas capacidades metabólicas.
- 3) Enriquecimiento selectivo, donde sólo prevalecen aquellos miembros de la comunidad capaces de degradar los componentes de interés.

Cuando un contaminante ha estado durante un largo período en un medio, los procesos de adaptación y selección microbianos tienen lugar naturalmente. En estos casos es probable que haya una población microbiana con capacidad metabólica adecuada pero que requiere bioestimulación (Leahy & Colwell, 1990).

Otra estrategia para aumentar el potencial de biodegradación disponible es la bioaumentación; esta puede efectuarse de dos maneras:

- 1) Aplicación de microorganismos no autóctonos con capacidad mejorada para degradar algún contaminante de interés.
- 2) Aislamiento de microorganismos indígenas de suelos o residuos contaminados, adaptación, enriquecimiento selectivo, propagación y reincorporación al suelo contaminado o a sistemas similares que requieran de biorremediación.

Una manera adicional comprendería la combinación de las dos estrategias anteriores, en la que organismos autóctonos con capacidades degradativas son mejorados metabólicamente para posteriormente ser liberados en su hábitat natural, tal es el caso de los organismos tratados o mejorados por ingeniería genética (Figura 1).

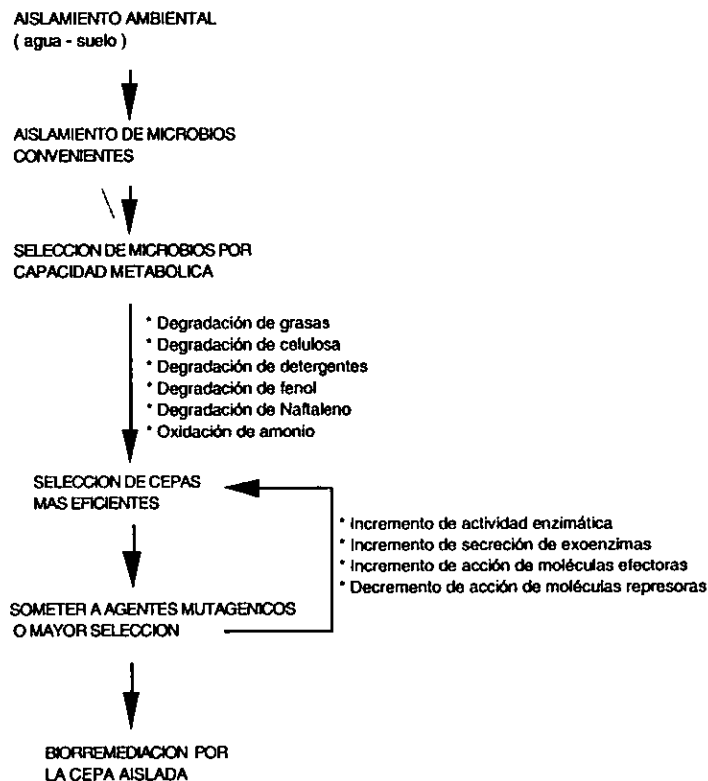


Figura 1.- Esquema seguido en el desarrollo de un organismo biorremediador (Stephenson & Stephenson, 1992).

Se han descrito varias técnicas para la remediación de contaminantes, principalmente hidrocarburos de petróleo, entre las que se encuentra la introducción de cepas bacterianas de origen natural modificadas por ingeniería genética en el área contaminada (Chakrabarty, 1985). Entre las estrategias a seguir para la implementación de sistemas biodegradadores se mencionan a continuación las más importantes:

- 1.- Determinación de factores para optimización de condiciones de biodegradación en laboratorio y posteriormente en campo.
- 2.- Utilización de organismos inmovilizados o de sus enzimas para la biodegradación de compuestos.
- 3.- Desarrollo de biorreactores de campo.
- 4.- Adaptación de tecnologías existentes para producir, distribuir y aplicar grandes lotes de microbios degradadores.
- 5.- Estudio de los mecanismos de biodegradación incluyendo vías metabólicas; identificación, aislamiento y caracterización de enzimas degradativas.
- 6.- Localización, secuenciación y expresión de genes degradativos.
- 7.- Ingeniería genética de microbios detoxificantes.
- 8.- Estrategias para degradación de contaminantes en ambientes naturales y adaptación de nuevas tecnologías para purificación de aguas residuales.

Por otro lado, el proceso degradativo puede ser estimulado por el suplemento de nutrimentos en el medio contaminado. Por ejemplo, en la contaminación por hidrocarburos estaría presente un exceso de fuente de carbono, pero las fuentes de nitrógeno y fósforo son limitadas. Por lo que es necesario el suplemento de nutrientes que restauren o equilibren la proporción C/N y C/P para el adecuado metabolismo de la comunidad bacteriana.

Adicionalmente uno de los factores que afectan considerablemente la degradación de hidrocarburos es la baja hidrosolubilidad de estos. Esta propiedad de los hidrocarburos contribuye a un efecto final de baja disponibilidad de los substratos para las comunidades microbianas degradadoras, causando su persistencia en el ambiente. En consecuencia han sido desarrolladas diversas sustancias cuya función es emulsificar los hidrocarburos y favorecer su biodisponibilidad en el medio acuoso, incrementando fuertemente la velocidad degradativa de los hidrocarburos. Entre los productos usados en casos de contaminación por hidrocarburos que han sido probados en el derrame petrolero del buque Exxon Valdez en las costas de Alaska en 1989 (Rivet et al. 1993), se encuentran sustancias oleofílicas, biosurfactantes, urea, lauril-fosfato, ácido oléico, INPOL EAP22 , etc., los cuales de alguna manera contribuyeron a una mejor remoción del derrame de hidrocarburos, así como a favorecer la degradación de estos.

2.- MECANISMOS DE RECALCITRANCIA

La estructura del compuesto en cuestión es lo que determina que una sustancia sea recalcitante. Los compuestos son clasificados en cuatro categorías en base a su biodegradabilidad o recalcitancia:

1) Los compuestos totalmente recalcitantes que no son atacados bajo ninguna circunstancia. Es difícil precisar cual compuesto cae en esta categoría, pero son candidatos fuertes los polímeros sintéticos como son el nylon, polyester, poly(ethilene-terephthalate), teflon, polyethilene y polystyrene.

2) Compuestos que son degradados, pero nunca a una velocidad rápida en la naturaleza o *in vitro*. Por ejemplo la lignina que aunque es sustrato de muchos hongos, nunca es asimilada rápidamente.

3) Compuestos que son asimilados rápidamente en cultivos microbianos, pero que son desconocidos en un medio biológico natural. Ciertos insecticidas cloro-hidrocarbonados son metabolizados en cultivos, pero su rápida conversión a CO₂, agua y cloro mostrada *in vitro* no es tan eficiente en la naturaleza.

4) Compuestos que son sustratos apropiados para poblaciones microbianas autóctonas, pero que ocasionalmente son considerados persistentes.

Además, hay una serie de condiciones que pueden contribuir a la recalcitancia de compuestos por ejemplo: Un organismo deberá poseer un potencial degradativo para metabolizar los compuestos. Este mismo organismo deberá estar presente en el ambiente o encontrar la vía para llegar a él. Otra condición es la accesibilidad de los compuestos para especies potencialmente activas y la presencia de sustratos que puedan penetrar en la célula si las enzimas involucradas en estados iniciales de la degradación son intracelulares; o bien, la inducción de las enzimas involucradas en la degradación si no son constitutivas.

En algunos otros casos los compuestos son acoplados a sistemas degradativos existentes, tal es el caso de la oxidación de alcanos, los cuales son degradados por acoplamiento a la β -oxidación.

En otro contexto, cuando los compuestos que son metabolizados no sustentan el crecimiento de un organismo, presumiblemente por la insuficiente oxidación de los compuestos, generando productos que no son asimilados por el organismo eficientemente se le ha llamado **cometabolismo**. Como ejemplo se encuentra la degradación del DDT el cual es rápidamente degradado por altas densidades bacterianas (*in vitro*) pero en el ambiente se comporta como un compuesto recalcitante por su incapacidad de promover el crecimiento microbiano.

Las especies activas en la descomposición de muchos productos naturales y sintéticos, frecuentemente requieren de alguno, varios y ocasionalmente de un gran número de

factores de crecimiento. La carencia de cualquier nutriente esencial previene el crecimiento y por lo tanto hace inapreciable la descomposición de cualquier molécula en la naturaleza. Entre alguno de estos factores limitantes del crecimiento está el oxígeno. El oxígeno molecular es importante en la biodegradación por dos razones, éste es el aceptor final de electrones para organismos aeróbios y además es un reactante en ciertos procesos catabólicos. El papel del O_2 como reactante más que como aceptor de electrones en una secuencia oxidativa es fundamental en la asimilación microbiológica de alcanos y de hidrocarburos aromáticos. Las grandes acumulaciones de materiales orgánicos son frecuentes en habitats deficientes de O_2 .

3.- GENERALIDADES DE SURFACTANTES

3.1 GENERALIDADES

A partir de la segunda guerra mundial el desarrollo industrial condujo a la síntesis de una gran cantidad de nuevos químicos, muchos de estos ampliamente usados en actividades industriales y domésticas. Una de las consecuencias de esta revolución química constituyó el reemplazo en una década del jabón por los detergentes sintéticos. El inicio de la producción de surfactantes sintéticos comenzó comercialmente en los años 50s con la introducción al mercado del detergente "tetrapropilen alquilbenceno sulfonato", compuesto favorecido por la expansión de la industria petroquímica. Respecto a las ventajas obtenidas de los detergentes de origen sintético sobre los jabones, se considera el menor costo de producción de los detergentes, además de poseer una mayor actividad de superficie bajo condiciones ácidas y en aguas duras. Posteriormente aparecieron en el mercado un gran número de surfactantes sintéticos tales como alquilsulfatos, alcohol-etoxilatos y alquiletoxi-sulfatos, recibiendo mayor importancia por su uso y consumo los surfactantes alquilbenceno sulfonatos lineales y en segundo término los alquilfenoletoxilatos alfa-olefin-sulfonatos y alcano-sulfonatos.

Los surfactantes presentan una alta actividad de superficie en soluciones acuosas derivada de fuertes motivos hidrofóbicos e hidrofílicos localizados en la misma molécula. Tal actividad permite la agregación de las moléculas tanto en la superficie de la solución acuosa así como en el límite entre fase acuosa y no acuosa (interfase líquido-aire o acuosa-no acuosa); bajando por consiguiente la tensión superficial y aumentando la formación de espuma. Usualmente las formulaciones de detergentes contienen entre 10-30% de surfactante, el resto del material comprende sustancias ablandadoras como sales de polifosfato, blanqueadores, perboratos, silicatos, aromatizantes y colorantes, que colectivamente forman un producto con alta eficiencia limpiadora (Figura 2).

La palabra detergente generalmente es un término mercantil designado a formulaciones

comerciales no jabonosas para uso como agentes limpiadores y de lavanderías. Las propiedades de limpieza, humectantes y emulsificantes de los surfactantes se deben a su naturaleza anfifílica.

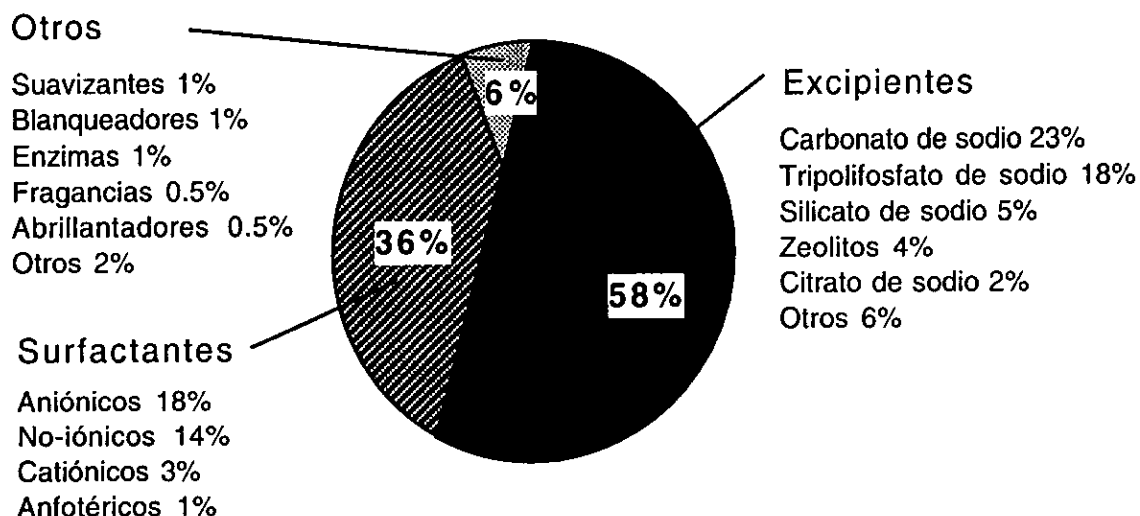


Figura 2.- Proporciones de surfactantes usados en formulaciones de detergentes (Greek & Houston, 1991).

Los surfactantes destacaron en el ámbito ambiental al ser considerados compuestos recalcitrantes, evidenciado por una intensa formación de espuma en plantas de tratamiento de aguas residuales, ríos e incluso en agua potable cercana a los sitios de descarga. Análisis más detallados mostraron que el tipo de compuestos encontrados correspondió a alquilbenceno sulfonatos con alto grado de ramificación en la cadena alquílica (Cain, 1987). El problema disminuyó considerablemente con el reemplazo de los surfactantes de larga vida por los surfactantes menos persistentes o biodegradables, contribuyendo grandemente a la reducción de la polución en mantos acuíferos.

3.2 CLASIFICACION DE SURFACTANTES

Aunque hay una enorme variedad de estructuras químicas que potencialmente pueden poseer propiedades anfifílicas, en la práctica sólo un pequeño número de compuestos poseen alta propiedad emulsificante y limpiadora para ser usada como detergente. De acuerdo al ión producido en soluciones acuosas, los detergentes se clasifican en cuatro grupos (Figura 3):

a) Surfactantes aniónicos: Estos forman iones cargados negativamente en soluciones acuosas, la carga es conferida generalmente por un grupo sulfonato o sulfato. En este grupo se encuentran alquilbenceno sulfonatos lineales (LAS), alquilbenceno sulfonatos ramificados (BAS), alquilsulfatos, alcohol-etoxisulfatos, alfa-olefin-sulfonatos y alcano-sulfonatos. Los surfactantes LAS son el compuesto con mayor producción del total de surfactantes. Estos surfactantes comerciales son generalmente constituidos por mezclas complejas de isómeros y moléculas similares cuyas proporciones dependen de la materia prima y las condiciones de reacción en la síntesis. Los alquiletoxisulfatos por su reducida sensibilidad a la dureza del agua y suavidad a la piel, son los más comunmente usados en detergentes de uso cosmético, tales como los shampoos.

b) Surfactantes catiónicos: Estos producen un ión cargado positivamente en solución acuosa y son principalmente compuestos cuaternarios de amonio, tales como el tetra-alquilamonio $[(RN(CH_3)_4)^+]$ o N-alquilpiridinium $[C_5H_5N(CH_2)_nCH_3^+]$. Estos surfactantes generalmente son costosos, poseen una pobre propiedad detergente, pero tienen excelentes propiedades bacteriostática y bactericida. Son degradados aeróbicamente y es poca la información conocida acerca de las vías catabólicas de los organismos que los degradan.

c) Surfactantes no-iónicos: En este caso, ambos grupos hidrofóbico e hidrofílico son de naturaleza orgánica y no son ionizados aparentemente. Su propiedad de superficie es derivada de un efecto acumulativo de las débiles pero multiples cargas presentes. La relativa insensibilidad de estos detergentes a la dureza del agua y por su baja espuma producida ha promovido su uso popular como constituyentes en formulaciones de detergentes para máquinas lavadoras de ropa y utensilios de cocina. Estos poseen además una amplia variedad de usos en cosméticos, agricultura y textiles donde las propiedades emulsificantes y humectantes son muy importantes y necesarias. Los surfactantes no-iónicos de mayor importancia comercial son los alcohol-etoxilatos y los alquilfenol-etoxilatos que son preparados por reacción del alcohol o el alquilfenol respectivo con óxido de etileno.

d) Surfactantes anfotéricos: Este tipo de surfactantes contiene carga neutra, dada por contener dos iones contrarios en la misma molécula (grupo aniónico y catiónico), estos surfactantes se producen en pequeñas cantidades formando parte de formulaciones cosméticas especiales.

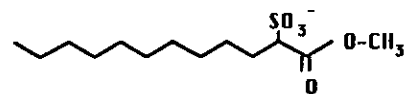
A) Surfactantes aniónicos



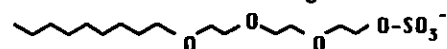
Alquil sulfato



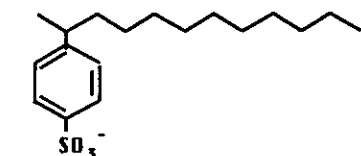
Alcano sulfonato



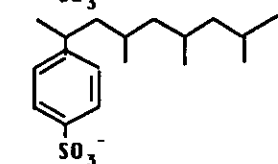
Ester de ácido graso sulfonato



Alquil etoxi sulfato

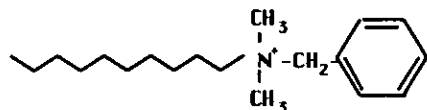


Alquilbenceno sulfonato lineal (LAS)

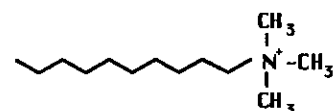


Alquilbenceno sulfonato ramificado (BAS)

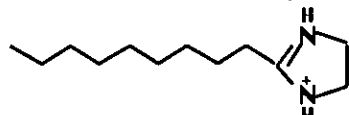
B) Surfactantes catiónicos



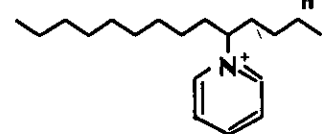
Alquilbenciltrimetilamonio



Alquiltrimetilamonio

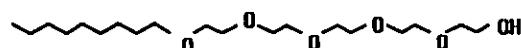


Alquilimidazolinio

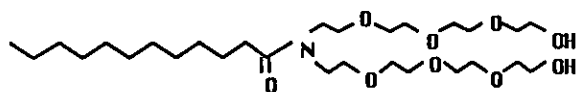


sec-alquilpiridinio

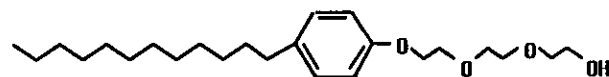
C) Surfactantes no-iónicos



Alquil etoxilato

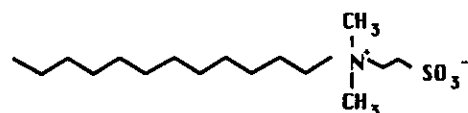


Etoxilato de amina grasa



Alquilfenol etoxilato

D) Surfactantes anfotéricos



Alquilsulfobetaina

Figura 3.- Clasificación de los surfactantes de acuerdo al ión formado en soluciones acuosas (Cain, 1994).

4.- GENERALIDADES DE ALQUILBENCENO SULFONATOS

Los alquilbenceno sulfonatos (LAS) usualmente son sintetizados por alquilación tipo Friedel-Crafts del benceno seguido por la sulfonación del anillo aromático. Por este método se obtienen compuestos con cadenas de C₁₀ a C₁₄ (Marcomini & Giger, 1987); a diferencia, los alquilbenceno sulfonatos ramificados (BAS) se sintetizan a partir de una mezcla de 1-propeno con bencenosulfonato en presencia de ácido hidrofúrico en proporciones estequiométricas adecuadas (Soberón-Chávez, et al. 1996). La cadena alquílica de estos compuestos generalmente es de un promedio de entre 12-18 carbonos.

Después de la introducción de los detergentes sintéticos en los años 50's, se observó una marcada persistencia ambiental, cuya característica más obvia y notable fue la formación de espuma aún a concentraciones tan bajas como 1µg/ml. Se reporta que la concentración de BAS presentes en aguas residuales de origen doméstico oscila entre 1 a 20 ppm; cantidad suficiente para la formación de espuma (Sweeney & Anderson. 1989).

Las estimaciones más recientes reportadas acerca del consumo mundial de surfactantes comprendieron 2.24 millones de toneladas en Estados Unidos y 5.18 millones de toneladas a nivel mundial en 1990; de los cuales los surfactantes aniónicos representan la mayor proporción de surfactantes contenidos en formulaciones comerciales (Figura 4; Greek & Houston, 1991). Estimaciones actuales indican que para el próximo siglo el consumo de surfactantes sobre pasará las 10 millones de toneladas anuales a nivel mundial.

Los surfactantes en general, presentan algunos efectos tóxicos resultado de su fuerte tendencia a ser adsorbidos por las membranas biológicas. Por ejemplo, los surfactantes pueden producir la muerte de peces cuando se encuentran en el agua en niveles entre 1-5 ppm. Los niveles ambientales de detergentes aniónicos raramente exceden 5-10 µg/ml (0.001%).

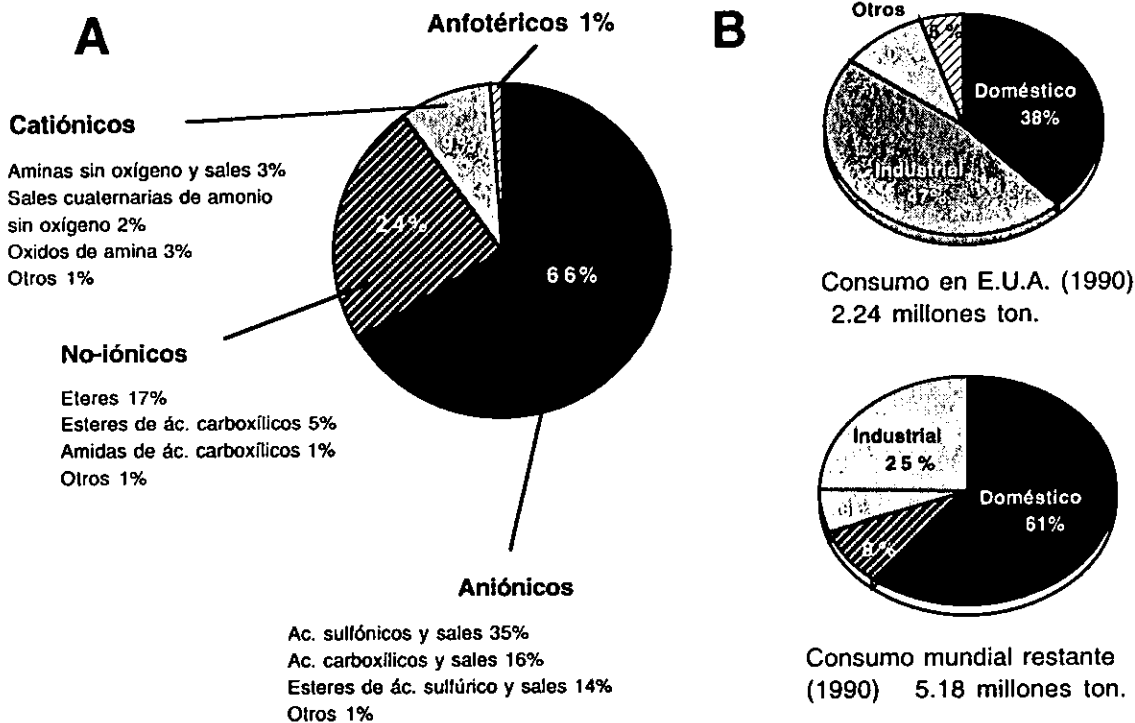


Figura 4.- A) Proporción y tipo de surfactantes usados en formulaciones de detergentes. B) Consumo mundial de surfactantes en 1990 (Greek & Houston, 1991).

5.- MECANISMOS DEGRADATIVOS DE ALQUILBENCENO SULFONATOS

5.1 ANTECEDENTES BIODEGRADATIVOS DE ALQUILBENCENO SULFONATOS

Los alquilbenceno sulfonatos derivados de tetrapropileno (BAS), contienen una cadena alquílica altamente ramificada. Hammerton(1955), Sawyer et al.(1956) y Mackinney & Symons (1959) fueron los primeros en considerar que la recalcitrancia de estas moléculas podría ser atribuida a la estructura ramificada de la parte alquílica del surfactante. Estudios subsecuentes empleando una variedad de modelos de surfactantes con estructuras conocidas confirmaron las sospechas de que la estructura ramificada de la molécula determina grandemente su labilidad biológica. En 1964 Klein & McGauhey identificaron a los alquilbenceno sulfonatos ramificados como el principal surfactante causante de la polución ambiental. Estas observaciones condujeron a mediados de los 60's a la producción industrial de alquilbenceno sulfonatos lineales (LAS). Comparando los derivados tetrapropileno benceno sulfonato (BAS) contra LAS, se encontró que los derivados de LAS fueron más susceptibles a la biodegradación. Esto concuerda con el hecho de que mientras la producción de LAS fue incrementada alrededor de 30 veces a mediados de los 60's, no se encontró un incremento significativo en las cantidades de surfactante acumulado tanto en suelo como en mantos

acuíferos en este periodo. Por el contrario, con el uso de surfactantes del tipo LAS se notó un mejoramiento ambiental en términos de espuma presente y niveles de surfactante residual en mantos acuíferos.

Existe el reporte de un experimento realizado por Sharman (1964) citado en Sweeney & Anderson, (1989); en el que se demuestra la baja biodegradabilidad de BAS. El experimento consistió en el uso de una pecera para simular una pila de tratamiento de aguas residuales que fué inoculada con lodos activados. Se observó una remoción de alrededor del 98% del surfactante BAS en un tiempo de 200 días, comparado con el surfactante LAS, que fue asimilado en menos de 10 días, una observación importante es el hecho de que el surfactante BAS mostró una curva de degradación de primer orden, en la cual se evidencía una asimilación del 85% en los primeros 30 días, siendo asimilado el resto mas lentamente. Una explicación al fenómeno anterior es el hecho de que BAS es sintetizado a partir de moléculas de propileno, produciendo una mezcla de isómeros ramificados con cadenas alquílica de 12 carbonos. De tal manera que se forman moléculas más o menos susceptibles a la degradación. Entre las más fácilmente asimilables se encuentra el 85% de las moléculas, el 15% restante corresponde a moléculas persistentes pero no del todo recalcitrantes ya que son degradadas en períodos de tiempo mayores. Este hecho nos hace ver que al hablar de BAS como un compuesto recalcitrante no es del todo cierto, siendo mas correctamente hablar de BAS como un compuesto persistente.

5.2 MECANISMO DEGRADATIVO DE ALQUILBENCENO SULFONATOS

Existen especies bacterianas que han desarrollado la capacidad de resistir a la lisis y de crecer bajo altas concentraciones de surfactantes. Con excepción a los alquilsulfatos, pocos tipos de detergentes han sido completamente degradados por cultivos puros. Existen algunos reportes de aislados bacterianos, por ejemplo *Bacillus sp.* que pueden mineralizar completamente un alquilbenceno sulfonato lineal de C₁₂ (Willetts & Cain, 1972; Willetts, 1974). Pero frecuentemente, sólo una parte de la molécula (cadena alquílica) es utilizada por un sólo microorganismo siendo el resto degradado por otros que actúan subsecuentemente (Watson and Jones, 1979; Robson, 1986).

Existen variantes que influyen en la degradación de BAS, principalmente en sistemas de tratamiento de aguas, en las cuales se incluyen factores como contenido bacteriano inicial, estación del año, concentración y naturaleza de la bacteria presente, su previa historia de aclimatación, concentración y naturaleza de alimento, nutrientes, oxígeno, materiales adsorbidos, impurezas tóxicas, etc (Tabla 1). Pero los factores que afectan con mayor fuerza la velocidad de degradación es la concentración inicial del surfactante y su estructura química (en general altas concentraciones de surfactantes retardan

considerablemente su desaparición). En la figura 5 se muestra claramente que la estructura del surfactante afecta definitivamente la velocidad de degradación. Por ejemplo, la presencia de un sólo grupo metilo en la porción alquílica de la molécula promueve una mayor durabilidad o resistencia a la degradación, así como las ramificaciones adicionales se asocian con períodos largos de persistencia en el ambiente. De igual manera, compuestos con carbonos cuaternarios adyacentes al extremo final de la cadena son extraordinariamente resistentes (Figura 5). De la misma manera, el efecto de la posición del grupo fenilsulfonato en la cadena alifática modifica el período de inducción y la velocidad de biodegradación del surfactante. La biodegradabilidad de BAS es facilitada con el incremento de la distancia entre el grupo fenilsulfonato y el extremo más remoto de la cadena alquílica. La presencia de un grupo metilo cerca o lejos del extremo de la cadena tiene un ligero efecto de retardo en la biodegradación; pero si existe un grupo cuaternario en el extremo causa un pronunciado efecto de retardación (Figura 5).

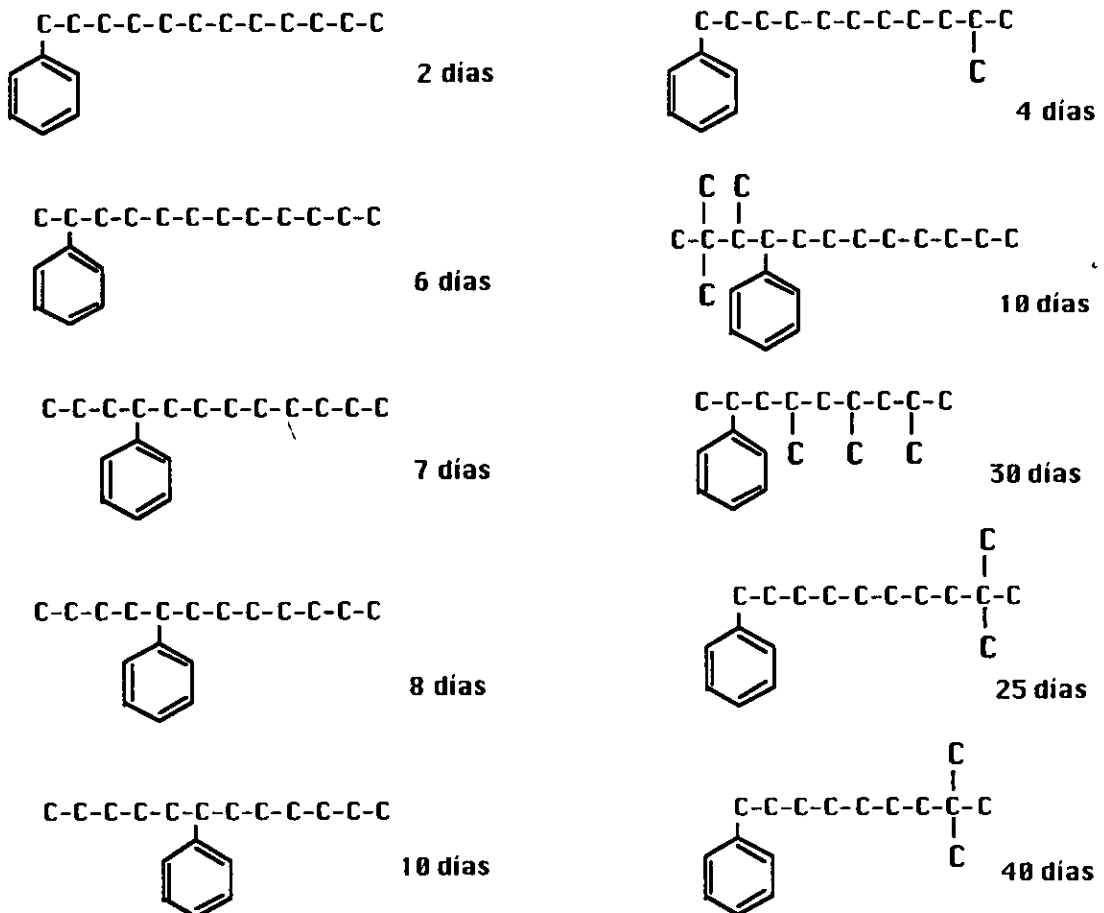


Figura 5.- Efecto de la posición del grupo fenilo y presencia de sustituyentes sobre la cadena alifática en la biodegradabilidad de alquilbenzeno sulfonatos; días indican el tiempo en que fue alcanzado un 90% de degradación del compuesto (Adaptado de Swisher, 1963).

El hecho de que BAS con carbono cuaternario terminal sea degradado es indicio de la existencia de vías metabólicas alternativas. Ryckman & Sawyer en 1957 demostraron que la presencia de ramificaciones en la cadena inhibe la biodegradación de alquilbenceno sulfonatos, también examinaron el efecto en cadenas alquílicas de C₄ a C₁₂; encontrando que los enlaces primarios y secundarios son degradados completamente con la liberación de sulfato, mientras que los enlaces terciarios son más persistentes.

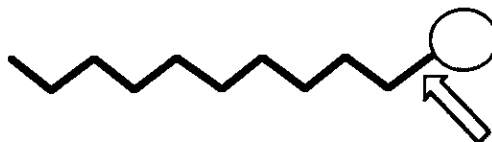
Swisher (1963) demostró que el grupo sulfonato en posición *para* es más rápidamente degradado que el encontrado en posición *orto*. La velocidad de degradación también es dependiente de la longitud de la cadena alquímica así como de la posición del grupo benceno en la cadena. Finalmente la degradación se mejora aumentando la distancia entre el carbono final de la cadena y el grupo sulfonato.

La asimilación de la molécula de LAS revela tres posibles puntos donde el ataque microbiológico puede actuar. Estos son: La cadena alquímica, el anillo bencénico y el grupo sulfonato. Ryckman & Sawyer (1957), Huddleston & Allred (1963), Swisher (1963) y Cain et al. (1972) proporcionaron fuertes evidencias de que el ataque inicial ocurre en el grupo metilo terminal de la cadena alquímica, usualmente por ω -oxidación para producir un ácido carboxílico más susceptible a la degradación vía β -oxidación. La ω -oxidación de la cadena alquímica en la degradación de LAS en algunos organismos es seguida por β -oxidación (Willetts & Cain, 1970, Cain et al. 1972). Huddleston & Allred (1963) aislaron pequeñas cantidades de los derivados sulfonatados (fenil dodecanoato, fenildecanoato, feniloctanoato y fenilhexanoato) durante el crecimiento bacteriano en 2-fenildodecano sulfonato. Bird (1972) encontró sulfofenilhexanoato, sulfofenilbutilato y sulfofenilacetato como productos degradativos de 1-fenildodecano-*p*-sulfonato por un cultivo de *Pseudomonas* crecidas en LB + surfactante. Técnicas de HPLC han demostrado que la oxidación de la cadena alquímica de LAS es usualmente afectada mientras el anillo aromático permanece sulfonatado. Sin embargo, muchas bacterias crecen sólo a expensas de cadenas alquímica C₁₁ o C₁₂ de longitud, asimilando unidades de C₂ vía acetyl-CoA, oxidando el surfactante hasta sulfobenzoato o sulfofenilacetato, respectivamente. El crecimiento en estos compuestos es acompañado por la inducción de enzimas de la vía del glioxilato, enzimas que son rápidamente reprimidas por la asimilación de los carbonos del anillo (Figura 6; Cain, 1987; Cain, 1994).

La β -oxidación involucra una etapa temprana de deshidrogenación en la que es formado un intermediario alquenoil-CoA (Kolbel et al. 1967), primeramente observado por la formación de sulfocinnamato en cultivos incubados con 1-fenildodecano-*p*-sulfonato (aparición de banda de absorción en *uv* a 268 nm). Robson (1986) encontró el mismo producto en cultivos con aislados puros en presencia de undecilbenceno y heptilbenceno sulfonato (λ_{max} 273 nm) y un compuesto similar (263 nm) en cultivos crecidos con LAS. En la degradación de LAS (sulfofenil undecanoato) se encontró la presencia de una serie

de compuestos cuya masa molecular varía por multiples de 2 carbonos, esto es, cada compuesto separado de la siguiente molécula por 28 unidades de masa correspondiente a $(-CH_2)_2$, molécula perdida por sucesivos ciclos de β -oxidación.

A) Ruptura hidrofílica-hidrofóbica



B) Oxidación hidrofóbica

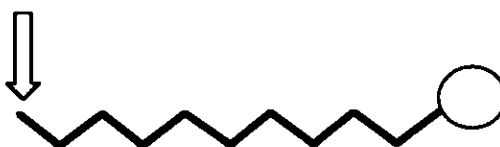


Figura 6.- Estrategia del ataque microbiano en surfactantes aniónicos y probablemente en catiónicos. Las flechas indican los puntos iniciales de ataque (Cain, 1994).

Overath et al. (1969), encontraron que mutantes afectadas en las enzimas Acil-CoA sintasa, acil-CoA deshidrogenasa y en β -hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, simultáneamente pierden la capacidad de crecer en ácidos grasos, fenil alcanos y LAS, por el contrario sus revertantes recuperan las tres capacidades.

Las ramificaciones de la cadena alquílica por si mismas, no necesariamente implican recalcitrancia. La β -oxidación puede acoplarse bastante fácil con grupos metilo en el átomo α , generando simplemente propionil-CoA en lugar de acetil-CoA. La sustitución en un carbono β por un dimetilo o la presencia de un carbono cuaternario en el extremo de la cadena alquílica impiden la clásica oxidación β , la cual requiere un carbono no sustituido en la posición β y al menos un protón en la posición α proximal del tioéster; sin embargo, sus isómeros sufren biodegradación (Swisher, 1969). Una posibilidad es que por α -oxidación un carbono sea removido de la cadena alquílica. Existe la evidencia de que algunos organismos poseen tal capacidad eliminando el carbono acoplado al sustituyente del carbono β de la cadena alquílica como CO_2 , de manera similar al metabolismo ocurrido en mamíferos que asimilan 3,6-dimetiloctanoato (Stokke, 1966) o ácido fitánico (Steinberg et al. 1967), como se muestra en la figura 7.

Las ramificaciones alquílicas en la posición β pueden ser también eliminadas mediante una reacción de carboxilación tal como ocurre en la oxidación de alcohol-isoprenoides como en el caso de *Pseudomonas citronellolis* (Sevbert & Fass, 1964). Se propone que algunos productos análogos ramificados pueden ser degradados por estas enzimas debido a inespecificidad en el reconocimiento del sustrato.

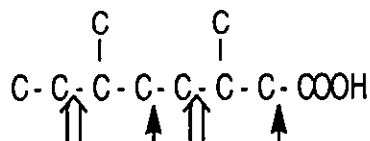


Figura 7.- Sitios de α -oxidación (\uparrow) y β -oxidación ($\uparrow\uparrow$) de dimetiloctanoato (Cain, RB. 1987).

Segun la Organización para la Cooperación Económica y Desarrollo (OECD), se considera un surfactante biodegradable el que es eliminado al menos un 70% en un período de 28 días. Existen ejemplos degradativos en los cuales alquilbenceno sulfonatos con cadenas alquílicas menores de C₆ son asimilados prioritariamente por el anillo aromático, permaneciendo la cadena alquílica intacta hasta su ruptura (Cain,1987; Figura 8).

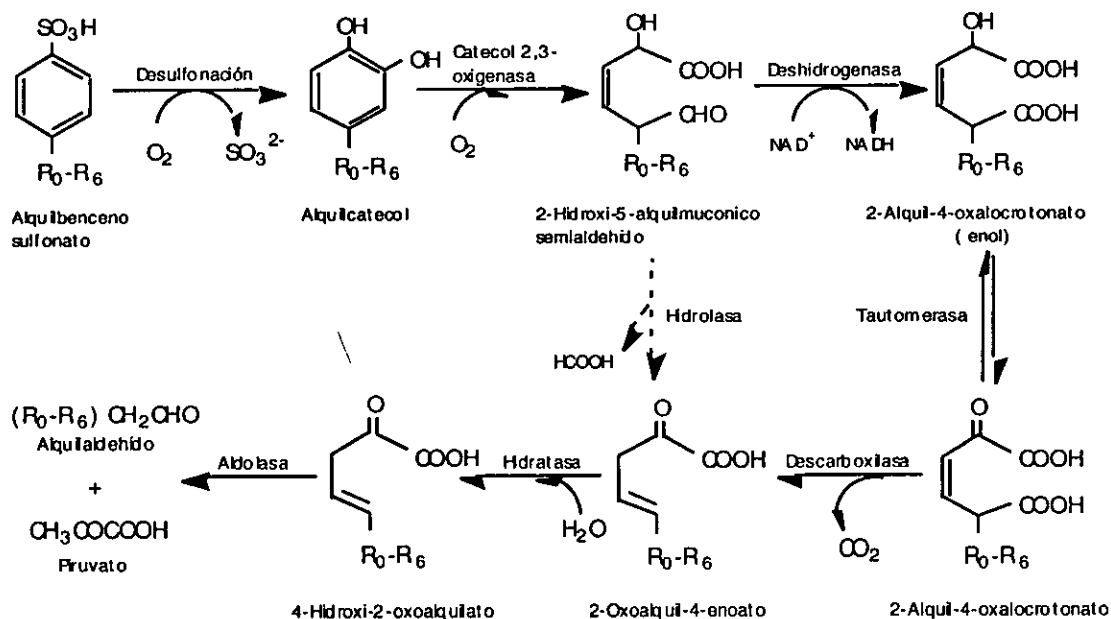


Figura 8.- Secuencia catabólica de alquilbenceno sulfonatos de cadena lineal C₀ - C₆ en *Pseudomonas testosteroni* PtS-1 (Cain, 1987).

Jiménez et al. (1991), reportaron la mineralización aeróbica de LAS por un consorcio bacteriano consistente de cuatro cepas con características de los géneros *Pseudomonas* y *Aeromonas*. Los miembros del consorcio no fueron capaces de degradar LAS por separado y tres de ellas logran la oxidación inicial de la cadena alquílica, pero en conjunto se observó un efecto sinérgico sobre la mineralización de LAS.

Similarmente Sigoillot & Nguyen (1992), demostraron la oxidación completa de LAS por comunidades bacterianas aisladas de aguas residuales en efluentes costeros, concluyendo que la degradación de LAS ocurre por tres procesos; completa oxidación de la cadena alquílica, seguida de la desulfonación de los intermediarios sulfo-alcanóicos y la ruptura del anillo aromático, donde la etapa clave en la mineralización es el ataque al anillo aromático (Figura 9A). Cuando los substratos LAS contenían cadenas con carbonos impares se identificó la acumulación momentánea de los intermediarios ácido 4-hidroxibenzoico y 3,4-dihidroxibenzoico, posteriormente degradado vía ruptura *orto* del anillo. Cuando LAS fue usado como substrato con cadena alquílica de carbonos pares, los intermediarios encontrados fueron los ácidos 4-hidroxifenilacético y 3,4-dihidroxifenilacético, con subsecuente degradación vía ruptura *meta* del anillo (Sigoillot & Nguyen, 1992) (Figura 9B).

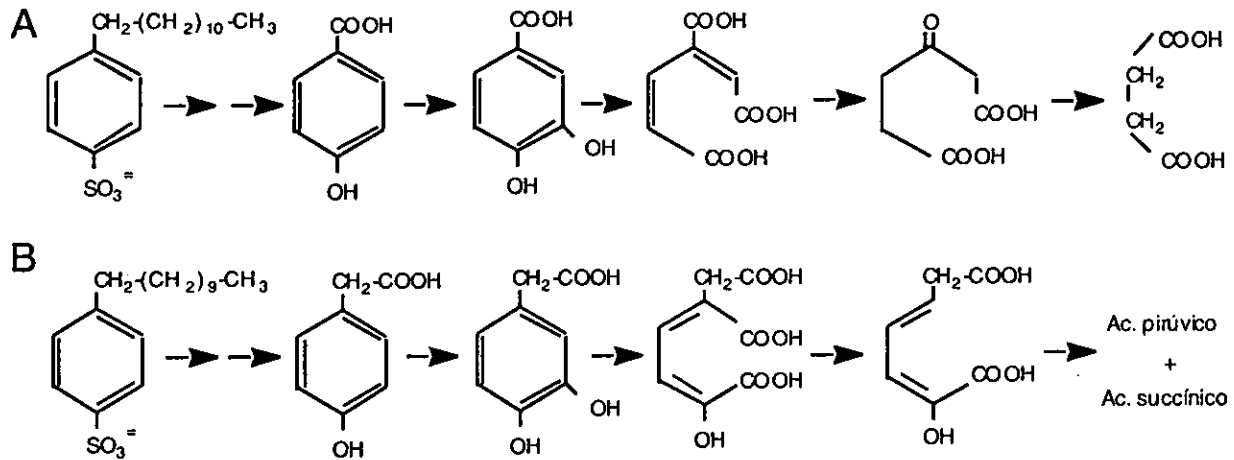


Figura 9.- Degradación de LAS por un consorcio bacteriano. A) LAS con cadena par (ruptura vía *orto*). B) LAS con cadena impar (ruptura vía *meta*) (Sigoillot & Nguyen, 1992).

Kertesz et al. (1994) reportan la identificación directa de productos hidroxilados como resultado de la desulfonación del surfactante LAS. Estos intermediarios se identificaron por espectrometría de masas en cultivos bacterianos de *Pseudomonas putida* S-313, bajo condiciones en que LAS es usado como única fuente de azufre y la presencia de una fuente adicional de carbono y energía, el resultado fue la acumulación de intermediarios del tipo 4-hidroxifenil-undecano y tridecano. Estos compuestos no sufrieron posterior degradación bajo las condiciones usadas, pero al usar un consorcio bacteriano adicional, la asimilación fue total; concluyendo que la desulfonación de LAS es la primer etapa en la mineralización del surfactante. Posteriormente en *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 también fue demostrada la desulfonación de compuestos fenilalcanosulfonatos en medios de cultivo carentes de fuente de azufre (Kertesz, 1994).

El ejemplo contrario fue reportado por Cain, 1994; quien refiere que LAS con cadenas mayores de C₆ sufren inicialmente acortamiento de la cadena alifática hacia la formación de un sulfonil alcanato, el cual posteriormente es desulfonado para producir un intermediario del tipo catecol-alcanato que subsecuentemente es degradado vía ruptura del anillo aromático (Figura 10).

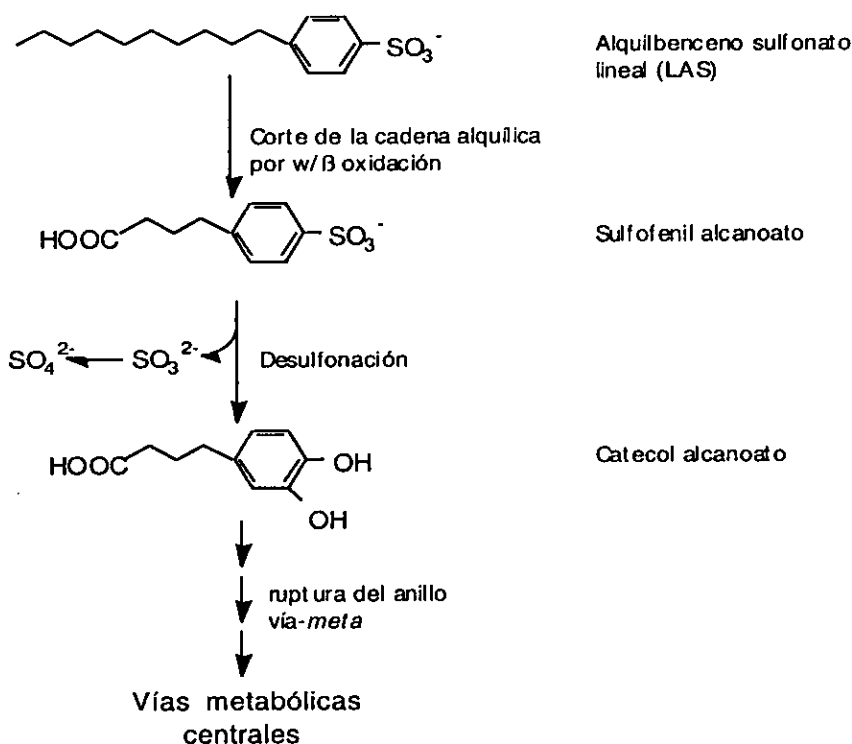


Figura 10.- Biodegradación de alquilbenceno sulfonatos lineales (C₆) por consorcios bacterianos (Cain, 1994).

5.3 MECANISMO DE DESULFONACION EN ALQUIBENCENO SULFONATOS

La unión C-S de un sulfonato aromático es termodinámicamente más estable que la correspondiente unión éster de sulfato (C-O-S). Naturalmente se producen compuestos orgánicos azufrados entre los que se incluyen azúcares sulfonatados de plantas, taurina, Co-M, ciertos aminoácidos y ácidos alquilsulfónicos de cadena corta, algunos de éstos como producto de la oxidación de sulfuros en la atmósfera (Beidlingmaier & Schmidt, 1983). Leidner et al. (1980), demostraron que el reemplazo del grupo sulfonato por un grupo carboxilo aumenta grandemente la biodegradabilidad en compuestos aromáticos. La desulfonación química simplemente remueve el grupo sulfonato sin ocurrir sustitución, un ejemplo biológico similar ocurre en *Cladosporium*

resenae cuando es crecido en 1-fenil-LAS, donde se reporta un tipo de desulfonación sin sustitución alguna (Cain et al. 1972). Focht & Williams (1970) refieren a una cepa de *Pseudomonas* la cual oxida *p*-tolueno sulfonato a un compuesto del tipo catecol sulfonatado antes del evento de desulfonación. En contraste Willetts & Cain, 1972; proponen que el grupo sulfonato es sustituido por un grupo hidroxilo. Investigaciones recientes dilucidan el mecanismo de desulfonación en el que involucran el ataque de una dioxigenasa sobre el grupo sulfonato formando un sulfo-hidrodiol, la pérdida del grupo sulfonato en alquilbenceno sulfonatos ocurre en forma de sulfito, el cual es fácilmente oxidado a sulfato en presencia de metales traza como Fe^{3+} (Figura 7, 9, 10). Esta ruta de eliminación contrasta fuertemente con un grupo similar de compuestos, los aromáticos halogenados. Ambos grupos son propiamente de origen sintético y ambos representan compuestos que recientemente fueron liberados al medio ambiente. El efecto de inducción negativa del halógeno impide el ataque electrofílico de las oxigenasas; como resultado a tal impedimento, prevalece la vía *orto* de ruptura del anillo en el metabolismo microbiano, con la subsecuente etapa de eliminación del halógeno (Knackmuss, 1981). Por otro lado la ruptura del anillo vía *meta* es considerada irreversiblemente inhibida por el cloruro de acilo, el cual es el producto de la oxigenación de los halo-catecoles (Reinecke, 1984). En contraste a la unión C-Cl, la unión C-sulfonato es altamente polar y le proporciona una labilidad mayor para la eliminación anterior a la ruptura del anillo (Knackmuss, 1981).

5.4 PLASMIDOS EN LA DEGRADACION DE ALQUILBENCENO SULFONATOS

Los plásmidos se encuentran en casi todos los géneros de organismos procariotes y en ciertos organismos eucariotes; esto muestra su importancia evolutiva. El hecho de que las vías degradativas para muchos compuestos se encuentren codificadas en plásmidos, sugiere que los plásmidos contienen una gran historia evolutiva y son parte importante en el desarrollo de nuevas rutas metabólicas. La existencia de estos elementos hace suponer su procedencia a partir de plásmidos primitivos que evolutivamente han seleccionado nuevas actividades a través del tiempo. Esta hipótesis se basa en el amplio incremento de las vías degradativas de compuestos relativamente nuevos localizadas en plásmidos. Los genes "ancestrales" de las nuevas rutas catabólicas han evolucionado codificando nuevas actividades. Existe una correlación respecto a una mayor frecuencia de plásmidos en bacterias procedentes de ambientes contaminados que los encontrados en bacterias aisladas de ambientes prístinos. Existen pocas evidencias de plásmidos relacionados con la degradación de surfactantes. Aunque se ha reportado la presencia de plásmidos en bacterias que degradan LAS, su presencia no se correlaciona

extrictamente con el fenómeno degradativo, ya que solo codificaron el catabolismo de la cadena alquílica. Por ejemplo: el plásmido OCT que confiere la oxidación de alcanos de C₆-C₁₀, al ser introducido en cierta bacteria huesped no mejoró la capacidad de degradar el surfactante LAS (Witholt et al. 1990). Hasta ahora la caracterización de los genes que codifican la degradación de surfactantes es extremadamente pobre, sólo existen algunos ejemplos como la degradación del surfactante Twen 80 (monooleato de polietilensorbitol) o la clonación de la alquilsulfatasa de *Pseudomonas* ATCC 19151, involucrada en la degradación de SDS (dodecil sulfato de sódio) (Davison et al. 1992). En la siguiente tabla se listan algunos ejemplos de plásmidos presentes en cepas de *Pseudomonas* que codifican para sistemas biodegradativos (Tabla 2):

Tabla 2.- Presencia de plásmidos en algunos sistemas degradativos de *Pseudomonas* (Witholt et al. 1990).

Plásmido	Substrato	Tamaño (Kb)
TOL (pWWO)	Tolueno, Xileno	115
SAL	Salicilato	85
NAH7	Naftaleno,salicilato	83
CAM	Alcanfor	≥ 300
OCT	n-alcanos (C ₆ -C ₁₂)	≥ 300
NIC-T	Nicotina, Nicotinato	n.d.
pAC25	3-Clorobenzoato	117
pAC21	p-Clorobifenilo	100
pEG	Estireno	37
pCIT1	Anilina	100
pCS1	Paratión	66

6.- DEGRADACION DE ALCANOS

6.1 DEGRADACION DE N-ALCANOS

La β-oxidación como mecanismo catabólico requiere que los substratos de ácidos grasos o en su defecto la porción alquílica de una molécula por lo menos posea un

protón en el carbono α y dos protones en el carbono β . Si un sustituyente tipo metilo se encuentra en una cadena alquímica éste provoca una mayor resistencia a la biodegradación, contrario a lo ocurrido con cadenas alquímicas no sustituidas las que son rápidamente asimiladas. Los sustituyentes pueden incluir grupos metilo, cloro, bromo, fenil y fenoxi, entre otros. Múltiples ramificaciones o la presencia de 2 grupos metilos en el mismo carbono crea un obstáculo mayor para la degradación.

El modelo representativo de la degradación de alcanos esta dado por el sistema del plásmido OCT en *Pseudomonas oleovorans*. Este sistema consiste de un complejo formado por tres enzimas. Una monooxigenasa (AlkB) de 45.7 KDa, una proteína citoplásmica acarreadora de elétrones llamada rubredoxina (AlkG) de 19 KDa y una rubredoxin reductasa citoplásmica (AlkT) de 48 KDa. Después de la oxidación de los alcanos a alcoholes, estos son oxidados por deshidrogenasas codificadas cromosomalmente (AlkJ y AlkH). Los ácidos carboxílicos producidos son posteriormente metabolizados por la vía de degradación de ácidos grasos hacia la formación de energía y otros metabolitos carbonados, de igual manera codificados en cromosoma (Figura 11; Witholt et al. 1990).

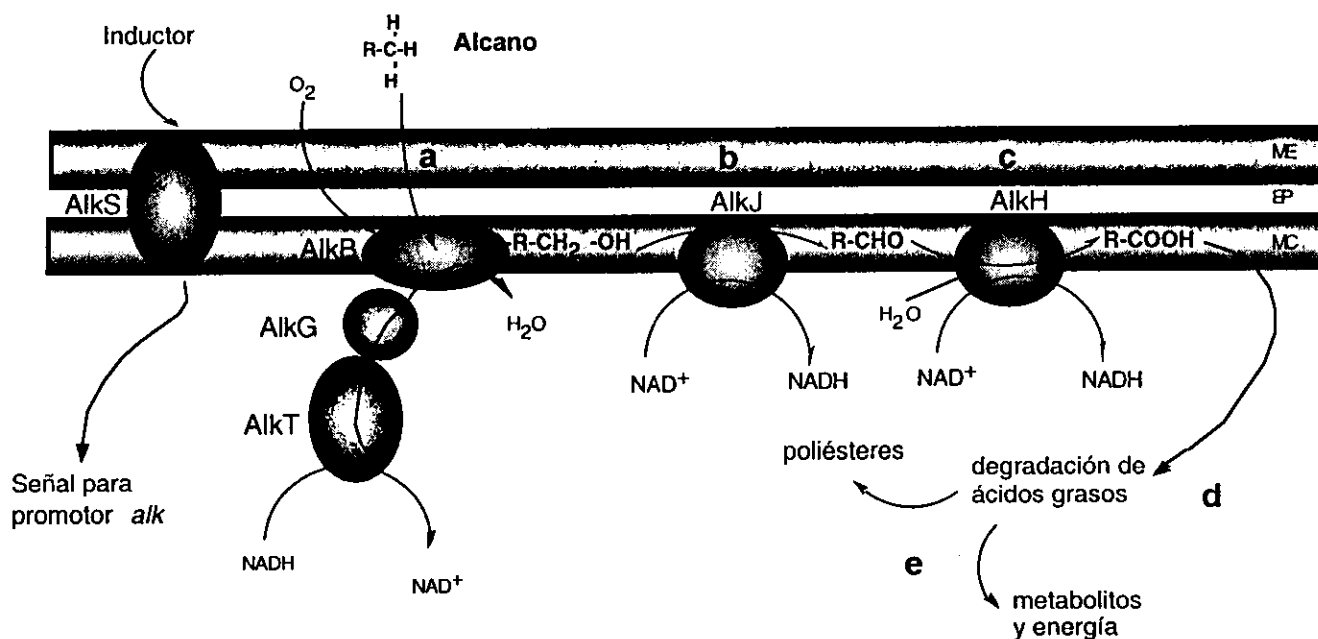


Figura 11.- Sistema degradativo de n-alcanos codificado por el plásmido OCT en *Pseudomonas oleovorans*. a) alcano deshidrogenasa, b) alcohol deshidrogenasa, c) aldehído deshidrogenasa, d) β -oxidación, e) metabolitos energéticos. (Witholt et al. 1990).

6.2 DEGRADACION DE ALCANOS RAMIFICADOS

Si en la degradación de n-alcenos se propone el acoplamiento de la oxidación de ácidos grasos; a diferencia, en los hidrocarburos ramificados los grupos metilo provocan interferencia con el mecanismo de β -oxidación. Sin embargo, en la degradación del pristano (2,6,10,14-tetrametil pentadecano) se involucra la combinación entre ω -oxidación y β -oxidación vía la producción de ácidos dicarboxílicos (McKenna & Kallio, 1971).

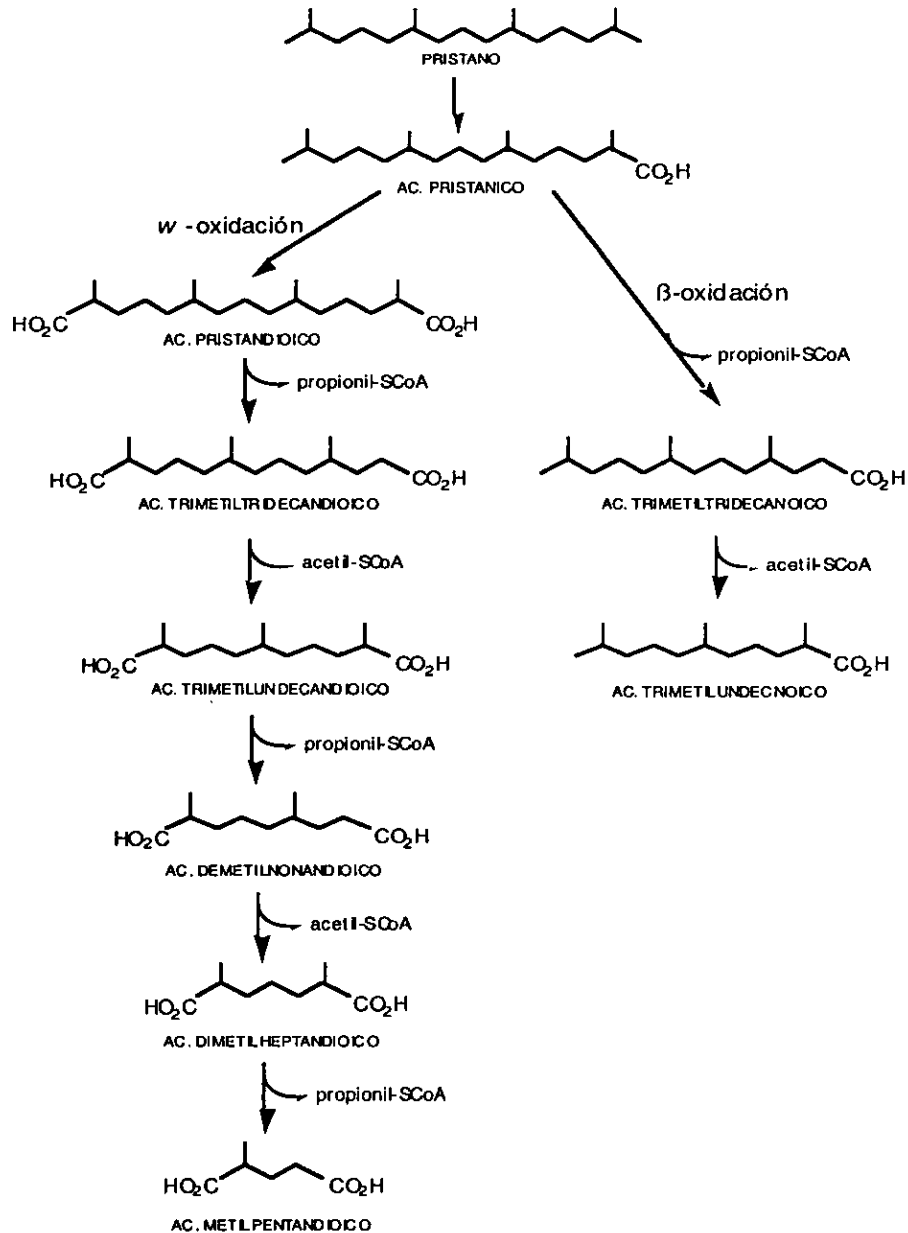


Figura 12.- Mecanismo propuesto en la degradación de pristano por *Brevibacterium erythrogenes*, en base a metabolitos detectados (Pirnik et al. 1974).

En la degradación de pristano por *Brevibacterium erythrogenes* se lleva a cabo una etapa inicial de α -oxidación con la formación del ácido carboxílico correspondiente (ác. pristánico), el cual posteriormente puede sufrir por un lado ω -oxidación para formar ácido pristanodioico y por otro lado vía β -oxidación la producción de ácido trimetiltridecanóico con la eliminación de una ramificación (2-metil) como propionil-CoA (posteriormente asimilado vía ácido metilmalónico o bien hacia la formación de metilcitrate, metabolitos asimilables por el ciclo del ácido cítrico (Figura 12; Pirnik et al. 1974).

Una observación importante producto del estudio de biodegradación de moléculas alcano-ramificadas es que cuando un compuesto posee una metilo en posición α , este puede ser degradado por β -oxidación (aunque con menor velocidad que un isómero lineal) siendo producto final propionil-CoA; pero cuando un producto llega a la formación de un intermediario 3-metilacil-S-CoA (metilo en el carbono β), la β -oxidación es bloqueada. Se han encontrado mecanismos oxidativos alternativos en especies como *Pseudomonas*, en donde los compuestos 3-metilalcanóicos son degradados vía la descarboxilación del grupo metilo (Pirnik & McKenna, 1977).

Además, aparentemente la oxidación de alcanos ramificados es inducida por ácidos dicarboxílicos, vía que es reprimida durante la oxidación de n-alcanos, mostrando por lo tanto la existencia de vías diferentes en la oxidación de n-alcanos y alcanos ramificados.

6.3 DEGRADACION DE ISOPRENOIDES ACICLICOS

La fuente natural de terpenos es procedente de los árboles, la emisión atmosférica de estos compuestos constituye alrededor de 4.8×10^8 toneladas anuales. Una gran proporción de ellos son oxidados abióticamente en la atmósfera por óxido nítrico y oxígeno molecular activados por la luz. Biológicamente la degradación de monoterpenos ha sido estudiada en aerobiosis; sin embargo, algunos ejemplos degradativos involucran metabolismo independiente de oxígeno molecular. En particular la recalcitrancia de los monoterpenos podría deberse en parte a la ausencia de oxígeno, en ambientes altamente anóxicos como el petróleo y sus derivados (Harder & Probian, 1995).

La capacidad de degradar isoprenoides acíclicos como única fuente de carbono es una característica propia de algunas *Pseudomonadaceas*, tal es el caso de los compuestos citronelol y geraniol, implicados como sustancias con efectos tóxicos para la mayoría de los géneros bacterianos, aunado a la alta recalcitrancia que posee su estructura dada por las ramificaciones en el carbono β . El mecanismo tóxico de estos compuestos radica en la facilidad para atravesar las membranas biológicas y provocar inestabilidad estructural (consecuencia de su alta hidrofobicidad), teniendo un efecto final de lisis celular sobre la bacteria. Las bacterias capaces de asimilarlo además de poseer una

mayor tolerancia al efecto lítico de estos isoprenoides, contienen un sistema oxidativo que les permite degradar la molécula. La recalcitrancia parcial de estos compuestos esta dada por la presencia de ramificaciones β -metílicas en la cadena principal. La degradación del citronelol por el sistema de *Pseudomonas citronellolis*, *P. aeruginosa* y *P. mendocina*, es el ejemplo prototipo del mecanismo degradativo de isoprenoides acíclicos. Estas cepas presentan una pronunciada fijación de CO_2 e inducción de acil-CoA carboxilasa; contrario a esto, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. syringae*, *P. cepacia*, *P. caryophilli*, *P. acidovorans* y *P. testosteroni* muestran una actividad traza de fijación de CO_2 (geranil-CoA carboxilasa) y la carencia de la actividad de β -descarboximetilación; dando como resultado la incapacidad de utilizar isoprenoides como única fuente de carbono. La naturaleza de la alcohol deshidrogenasa involucrada en el metabolismo de estos isoprenoides es hasta el momento desconocida (Figura 13; Cantwell et al. 1978). En un estudio fueron probadas una variedad de bacterias y hongos que utilizan n-octano, el estudio mostró que sólo algunas cepas fueron capaces de asimilar compuestos ramificados como el 2,7-dimetiloctano y 2,6-dimetiloctano, mientras que la ramificación en el carbono β (3,6-dimetiloctano) causó un pronunciado efecto de recalcitrancia a la molécula; de 27 cepas degradadoras de n-octano probadas ninguna fue capaz de degradar el 3,6-dimetiloctano (Schaeffer et al. 1979).

Fall et al. (1979) lograron combinar la vía degradativa de isoprenoides (citronelol) con la vía de oxidación de alcanos mediante la introducción del plásmido OCT en una cepa de *P. citronellolis*. El primer resultado fue la ampliación del rango de degradación de n-alcano debido a la sobreexpresión de la ω -hidroxilasa codificada por el plásmido OCT.

Un segundo resultado fue el obtener mutantes capaces de oxidar alcanos ramificados (2,6-dimetil-2-octeno) produciendo un substrato con mayor viabilidad para la vía del citronelol, este mejoramiento se logró mediante la combinación de la ya existente vía del citronelol en *P. citronellolis* y la vía degradativa de n-alcanos (Figura 14).

Rontani et al. (1997), reportan el caso de un microorganismo marino, *Marinobacter sp.* CAB, aislado de sedimentos contaminados por hidrocarburos, cuyo estudio comprende el mecanismo degradativo del compuesto isoprenoide 6,10,14-trimetilpentadecano-2-ona. En este organismo fue observando un metabolismo oxidativo combinado, haciendo mención de que la degradación del isoprenoide representa un mecanismo complejo en el que ocurren reacciones de α -oxidación, β -oxidación (asimilación de C_2 y C_3), fijación de CO_2 , y β -descarboximetilación. Algunas de estas reacciones son aeróbicas y otras anaeróbicas. Este tipo de mecanismos degradativos combinados constituyen una potencial aplicación ambiental, representando la β -descarboximetilación en combinación con α y β oxidación un beneficio adicional en el implemento de sistemas degradativos de hidrocarburos en los cuales la presencia de alcanos ramificados disminuye la velocidad de eliminación de estos contaminantes.

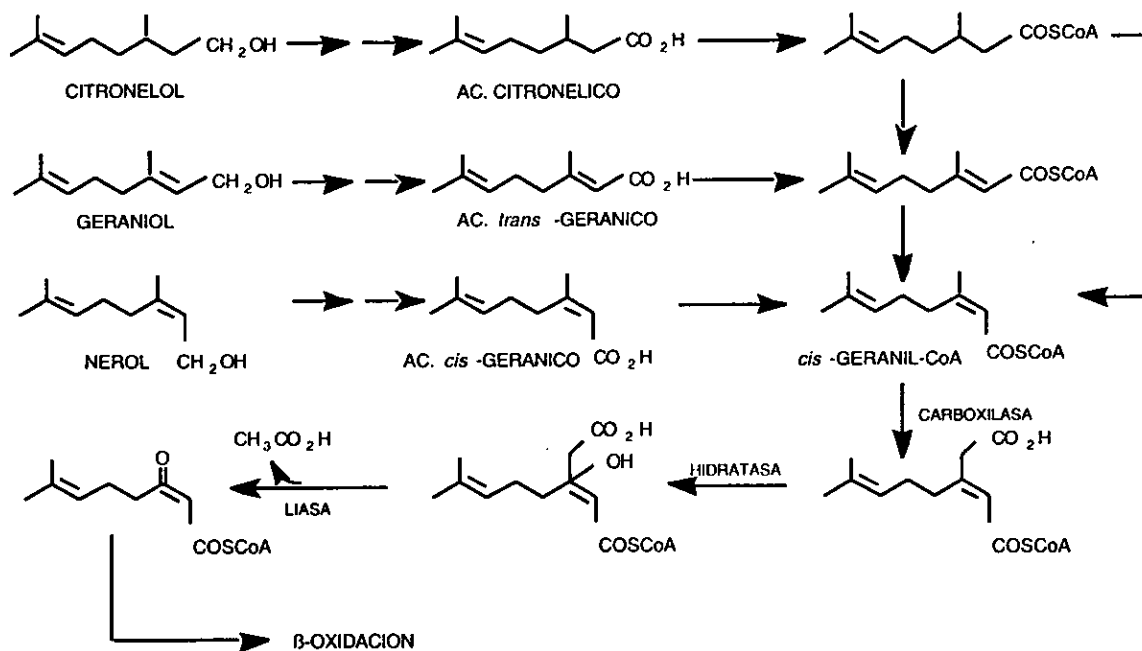


Figura 13.- Mecanismo degradativo de isoprenoides acíclicos en *Pseudomonas citronellolis* (Cantwell et al. 1978).

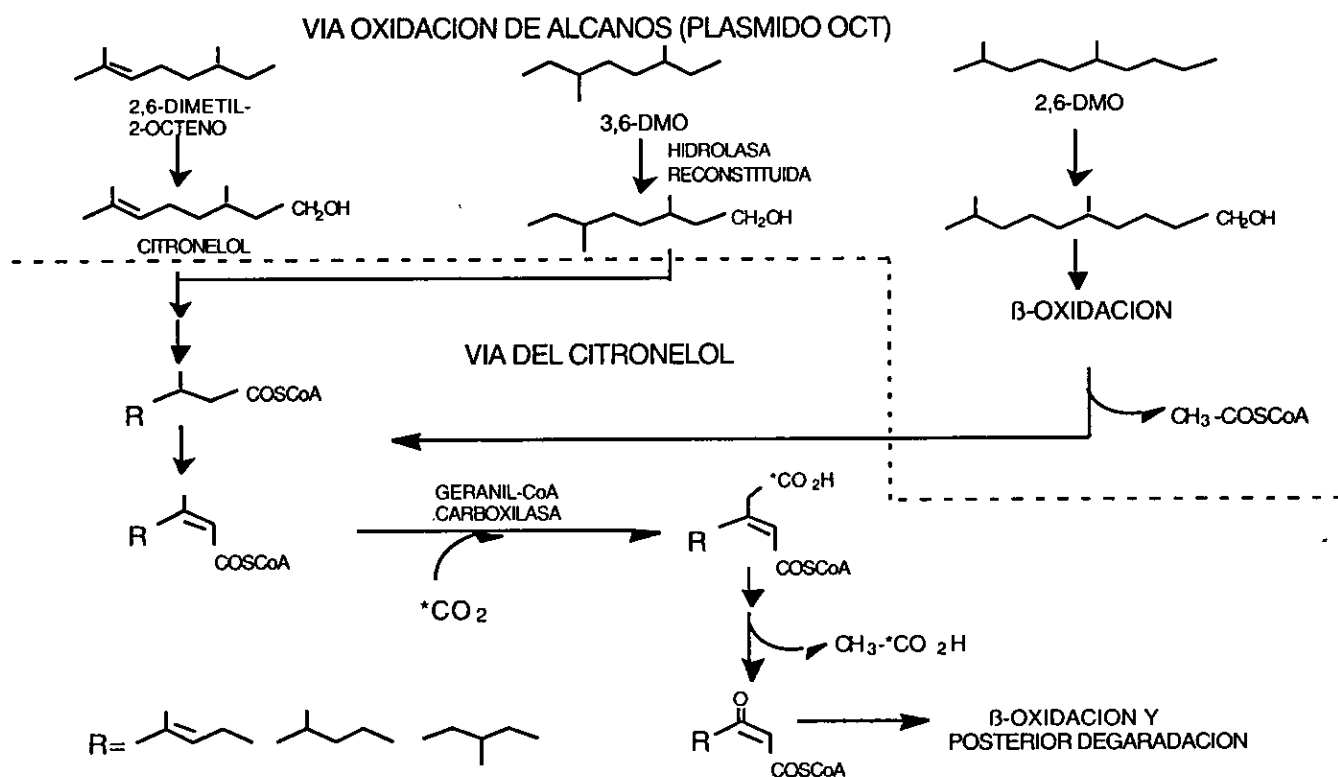


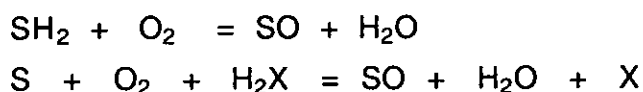
Figura 14.- Combinación de vías metabólicas en la asimilación de hidrocarburos 3-metil ramificados en *Pseudomonas citronellolis* (Fall et al. 1979).

7.- MECANISMOS DEGRADATIVOS DE COMPUESTOS BENCENICOS

7.1 GENERALIDADES DE OXIGENASAS

El oxígeno molecular (O₂) puede ser incorporado directamente a compuestos orgánicos mediante reacciones catalizadas por oxigenasas o hidrolasas. Estas enzimas utilizan metales de transición o flavina/pteridina reducida para activar el O₂ encontrado en un estado no reactivo. En este proceso se forma oxígeno altamente reactivo, tal como un átomo unitario o radicales hidróxilo. Las oxigenasas juegan un papel muy importante en las vías catabólicas microbianas. Ellas inician la degradación de compuestos aromáticos por hidroxilación y catalizan la reacción de ruptura del anillo. La reacción inicial en degradación de alcanos también es catalizada por oxigenasas. Los estudios de los mecanismos de reacción han sido ampliamente estudiados por su relevancia en la utilización de enzimas microbianas con aplicación ambiental así como en biotecnología industrial. Las oxigenasas son menos abundantes e importantes en organismos superiores que en microorganismos. Las oxigenasas de mamíferos son involucradas en la hidroxilación de esteroides, en la síntesis de neurotransmisores y en la destoxificación de compuestos venenosos. La versatilidad catabólica de los microbios juega un papel esencial en el ciclo del carbono que depende sustancialmente del uso de oxigenasas en la mayoría de las vías metabólicas. Esta revisión se enfoca exclusivamente en las oxigenasas involucradas en la utilización de compuestos orgánicos como alcanos y derivados bencénicos.

Las oxigenasas que catalizan la incorporación de sólo un átomo de dioxígeno en un sustrato (S) son llamadas *monooxigenasas*.



Por otro lado, las oxigenasas que catalizan la incorporación de ambos átomos de dioxígeno en un sustrato son conocidas como *dioxigenasas*.

Las mono y di-oxigenasas se encuentran involucradas en la ruptura del anillo aromático (Tabla 3). Las dioxigenasas para anillos aromáticos incorporan dos grupos hidróxilo en el anillo aromático en la presencia de O₂ y NAD(P)H (Figura 15-A).

Las dioxigenasas que rompen un compuesto bencénico abren el anillo aromático por la incorporación de dos átomos de dioxígeno en el sustrato (Figura 15-B).

Ambas mono y dioxigenasas requieren de cofactores capaces de activar la molécula de dioxígeno, los metales de transición tales como el hierro, manganeso, cobre y cobalto funcionan como catalizadores en numerosos sistemas de oxigenasas, algunos otros

usan grupos hierro-azufre o hemo, o bien semiquinonas de flavinas o pteridinas.

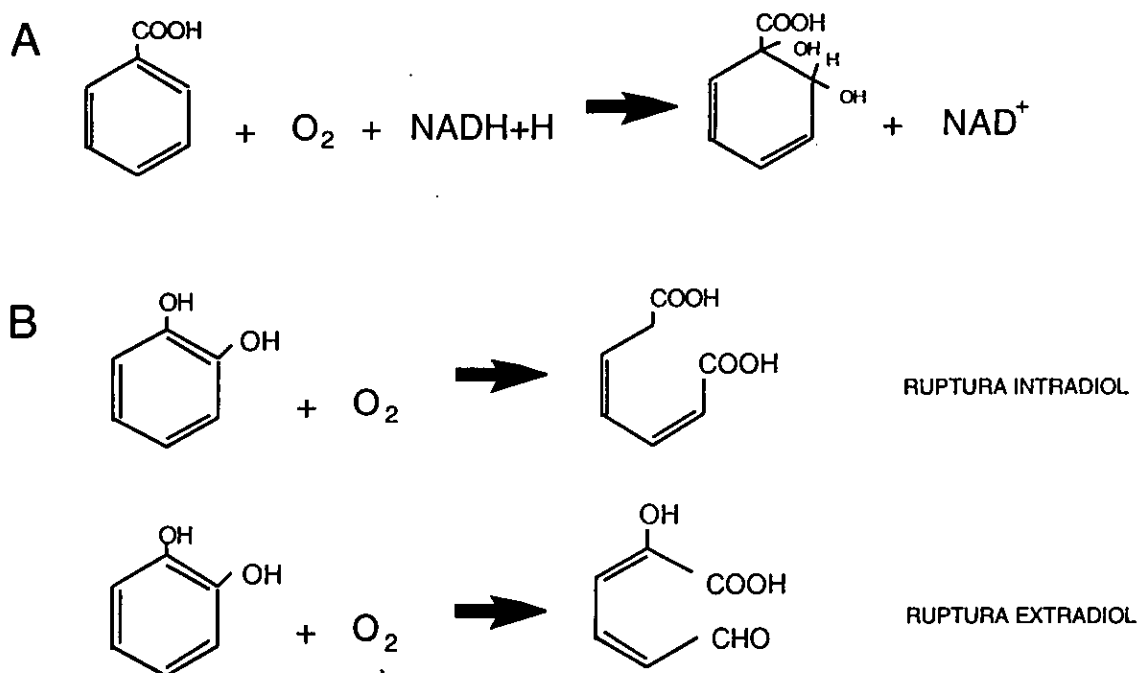


Figura 15.- Representación del mecanismo oxidativo de oxigenasas bencénicas (Harayama et al. 1992).

7.2 HIDROXILASAS Y DIOXIGENASAS DE ANILLOS AROMATICOS

En la degradación aeróbica de hidrocarburos aromáticos, los substratos son degradados vía la ruptura del anillo aromático por dioxigenasas. Las dioxigenasas que rompen el anillo aromático incorporan dos grupos hidroxilo en el anillo, ambos separados en posición *orto* o *para* entre cada uno. Una de las primeras etapas en la degradación de los compuestos aromáticos involucra la introducción de uno o dos grupos hidroxilo en el anillo. La introducción de un sólo grupo es llamado *mono-hidroxilación*, generalmente catalizada por monooxigenasas, mientras que la simultánea introducción de dos grupos hidroxilo es llamado *di-hidroxilación*, catalizada por dioxigenasas. La mayoría de las monooxigenasas pueden ser encontradas como simples enzimas aunque algunas forman multicomponentes enzimáticos como las fenol y tolueno-4-monooxigenasas (Harayama et al. 1992).

Las dioxigenasas bacterianas catalizan la dihidroxilación del anillo aromático. En la reacción de dioxigenación bacteriana ambos átomos de dioxígeno son incorporados simultáneamente en el substrato, como dos grupos hidroxilo en el anillo. El producto formado es un intermediario cis-1,2-dihidrociclohexadieno, que subsecuentemente es

convertido por una deshidrogenasa a un bencen-glicol sustituido. Las dioxigenasas bacterianas requieren de dos componentes adicionales para llevar a cabo su función, un componente de hidroxilasa y un transportador de electrones. El componente de hidroxilasa posee como característica contener dos cofactores, un centro de hierro-azufre [2Fe-2S] (también llamados ferredoxinas) y un hierro mononuclear, ambos asociados a la enzima (Harayama et al. 1992).

7.3 HIDROXILASAS DE GRUPOS ALQUILO

La hidroxilación de un grupo alquilo es esencialmente la primer etapa en la degradación de compuestos orgánicos. Tales reacciones son usualmente catalizadas por monooxigenasas. Las monooxigenasas de este tipo son sistemas de multicomponentes y consisten de la hidroxilasa y uno o dos transportadores de electrones (Harayama et al. 1992) (Figura 16).

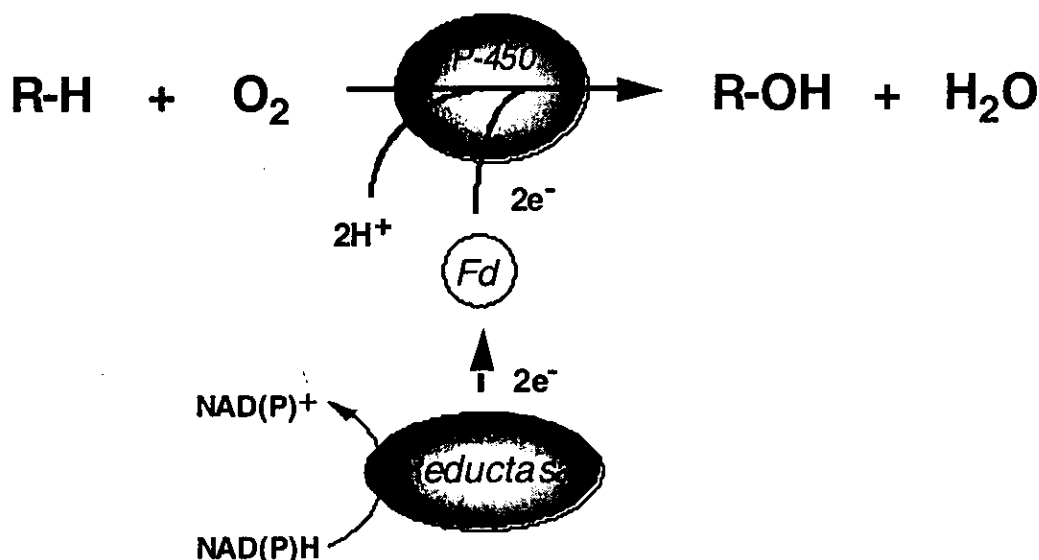


Figura 16.- Mecanismo de reacción de la monooxigenasa involucrada en la degradación de CAM (Keefe & Harder, 1991).

7.4 DIOXIGENASAS QUE ROMPEN ANILLOS AROMATICOS

En la mayoría de los mecanismos bacterianos para la degradación de compuestos aromáticos se transforma el sustrato inicial en intermediarios que llevan dos o más grupos hidroxilo en el anillo. Estos intermediarios son sustratos de las dioxigenasas que rompen anillos aromáticos. Si dos de los grupos hidroxilo en un sustrato se encuentran

en posición *orto* entre ellos, la ruptura del anillo por la dioxigenasa puede ocurrir entre ambos grupos hidroxilo llamandose *ruptura intradiol (orto)*, o bien si ocurre la ruptura en el enlace proximal a uno de los grupos hidroxilo, se le llama *ruptura extradiol (meta)* (Figura 15).

En la tabla 3 se muestra una lista de las diferentes familias en las que se clasifican las oxigenasas e hidroxilasas.

Tabla 3.- Familias de los sistemas de hidroxilasas (Harayama & Kok, 1992).

E N Z I M A	ORGANISMO O PLASMIDO	TAMAÑO
<u>MONOOXIGENASAS DE ANILLO-AROMATICO</u>		
<i>Familia de p-Hidroxibenzoato hidroxilasa</i>		
p-Hidroxibenzoato 3-hidroxilasa	<i>P. fluorescens</i>	45 KDa
Salicilato hidroxilasa	NAH7	
<i>Familia de Fenol 2-hidroxilasa</i>		
2-4-Diclorofenol 6-monooxigenasa	pJP4	
Fenol 2-hidroxilasa	<i>Pseudomonas</i> EST1001	
<i>Flavoprotein-monooxigenasa no clasificadas</i>		
o-Nitrofenol hidroxilasa	<i>P. putida</i> B2	65 KDa
4-Hidroxifenilacetato 3-hidroxilasa	<i>P. putida</i>	44 KDa
2,4-Diclorofenoxiacético monooxigenasa	pJP4	32 KDa
3-Hidroxibenzoato-6-hidroxilasa	<i>P. cepacia</i>	44 KDa
3-Hidroxibenzoato-6-hidroxilasa	<i>Micrococcus</i> sp.	70 KDa
<i>Familia del multicomponente fenol 2-hidroxilasa</i>		
Fenol 2-hidroxilasa	<i>Pseudomonas</i> CF600	34,10,58KDa
Tolueno 4-monooxigenasa	<i>P. mendocina</i>	
<u>DIOXIGENASAS DE ANILLO-AROMATICOS</u>		
<i>Familia de Benceno 1,2-dioxigenasa</i>		
Benceno 1,2-dioxigenasa	<i>P. putida</i>	50, 20 KDa
Tolueno 2,3-dioxigenasa	<i>P. putida</i> F1	
Benzoato 1,2-dioxigenasa	<i>A. calcoaceticus</i>	
Toluato 1,2-dioxigenasa	TOL	
Naftaleno 1,2-dihidroxilasa	NAH	
<i>Dioxigenasa de Anillo-aromáticos no clasificadas</i>		
Ftalato 4,5-dioxigenasa	<i>P. cepacia</i>	50 KDa

4-Sulfobenzoato 3,4-dioxigenasa	<i>C. testosteroni</i>	50 KDa
4-Clorofenilacétato 3,4-dioxigenasa	<i>Pseudomonas CBS</i>	50 KDa

DIOXIGENASAS QUE ROMPEN ANILLOS-AROMATICOS

Familia de Catecol 2,3-dioxigenasa I

Catecol 2,3-dioxigenasa I	TOL	34 KDa
2,3-Dihidroxibifenil dioxigenasa	<i>P. paucimobilis</i>	
1,2-Dihidroxi-naftaleno dioxigenasa	NAH	

Familia del Protocatecuato 4,5-dioxigenasa

Protocatecuato 4,5-dioxigenasa	<i>P. paucimobilis</i>	34, 15 KDa
Catecol 2,3-dioxigenasa II	<i>A. eutropus</i>	34 KDa
Homoprotocatecuato dioxigenasa	<i>E. coli</i>	30 KDa

Familia del Catecol 1,2-dioxigenasa

Catecol 1,2-dioxigenasa I	<i>P. arvilla</i>	32, 30 KDa
Catecol 1,2-dioxigenasa II	pP51	28 KDa
Protocatecuato 3,4-dioxigenasa	<i>A. calcoaceticus</i>	23, 27 KDa
Gentisato 1,2-dioxigenasa	<i>C. testosteroni</i>	40 KDa

GRUPO DE ALQUIL-HIDROXILASAS

Alcano hidroxilasa	ALK	41 KDa
Xileno monooxigenasa	TOL	
Metano monooxigenasa	<i>M. trichosporium</i>	54, 43, 23, 16
Vainillato demetilasa	<i>Pseudomonas sp.</i>	37 KDa
4-Metoxibenzoato monooxigenasa	<i>P. putida</i>	40 KDa
Tolueno sulfonato metil-monooxigenasa	<i>C. testosteroni</i>	43 KDa

FAMILIA DEL CITOCROMO P-450

Alcanfor 5-monooxigenasa	CAM	
P-450 Mitochondrial	Eucariotes	
P-450 Microsomal	Eucariotes	
Citocromo P-450 _{bm-3}	<i>B. megaterium</i>	120 KDa

FAMILIA DE AMINO ACIDOS AROMATICOS HIDROXILASA

Fenilalanina 4-hidroxilasa	Eucariotes	52 KDa
Tirosina 3-hidroxilasa	Eucariotes	59 KDa
Triptofano hidroxilasa	Eucariotes	51 KDa

8.- MECANISMOS DEGRADATIVOS DE DERIVADOS DEL BENCENO

Benceno, tolueno, xilenos, alquilbencenos y estireno estan entre los 50 compuestos químicos de origen industrial con mayor producción mundial, cada uno es producido en millones de toneladas anuales. Son ampliamente usados como combustibles, solventes y como materia prima para la síntesis de resinas, polímeros, plásticos, explosivos, agroquímicos y productos farmacéuticos. La biodegradación de estos compuestos ha sido ampliamente estudiada por la relevancia que representa su remoción del ambiente. Los alquilbencenos son usados como constituyentes de gasolinas, diesel y combustible de jets , llamados aromáticos BTX, mezcla constituida por benceno, tolueno e isómeros de xileno. Respecto al mecanismo degradativo de los derivados bencénicos son bien conocidas las diferentes estrategias por las que los microorganismos llevan a cabo la asimilación del benceno y sus derivados. Generalmente estos derivados son transformados a compuestos hidroxilados por la acción de las oxigenasas cuyos intermediarios convergen en metabolitos mas generales como los hidroxifenilos (protocatecuato, catecol, 4-metilcatecol, etc.). Estos compuestos hidroxilados posteriormente son transformados por las oxigenasas que rompen el anillo aromático a un intermediario acíclico que posteriormente es asimilado hasta su completa mineralización. Existen dos vías generales de ruptura de los compuestos hidroxilados. El mecanismo de fisión de anillos bencénicos mas frecuentemente encontrado en sistemas degradativos es el de ruptura intradiol también llamado *orto* , llevado a cabo por las intradiol dioxigenasas (Figura 17). Generalmente los genes involucrados en la vía de ruptura *orto* son codificados cromosomalmente. La segunda manera por la cual se puede asimilar un intermediario hidroxifenilico es por ruptura extradiol mediante una extradiol dioxigenasa comúnmente llamada ruptura *meta* (Figura 17).

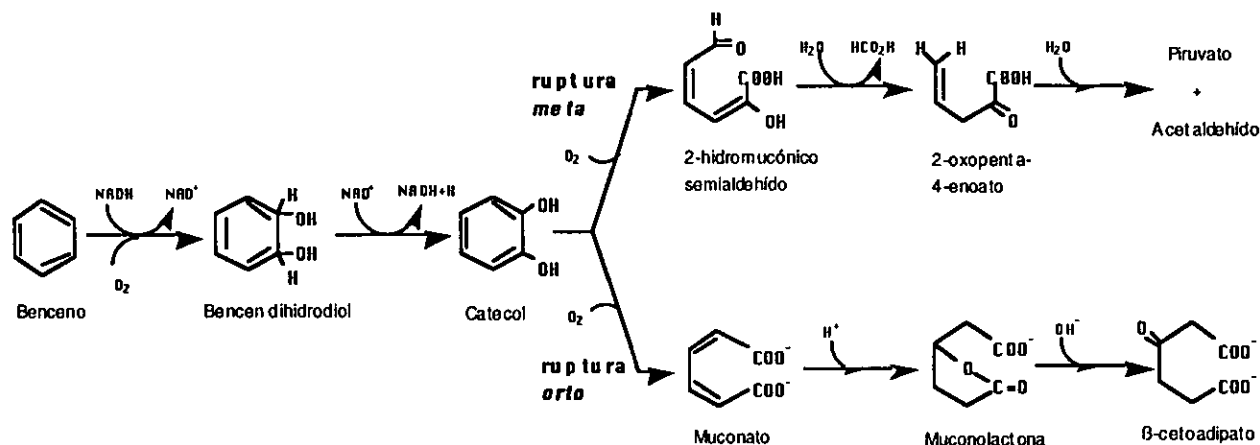


Figura 17.- Rutas biodegradativas del benceno (M.R. Smith, 1990).

Se ha encontrado que generalmente las enzimas involucradas en la vía *meta* se codifican en plásmidos degradativos, aunque existen varios ejemplos de ser codificadas cromosomalmente. Al respecto no se profundizará en el mecanismo de asimilación de compuestos derivados de benceno debido a su gran diversidad y complejidad en mecanismos existentes, así como de la gran convergencia existente hacia metabolitos y rutas de asimilación. Tal convergencia es mostrada en una recopilación de los sistemas degradativos caracterizados hasta el momento (http://www.genome.ad.jp/dbget-bin/get_pathway).

*“La lectura hace al hombre completo,
la conversación, ágil, y el escribir, preciso”*

Francis Bacon

II.- RESULTADOS Y DISCUSION

9.- ANTECEDENTES EXPERIMENTALES

El presente proyecto fue abordado con el antecedente de contar con una cepa aislada de un ambiente seriamente contaminado por detergentes, capaz de degradar el detergente B-DBS (dodecil-benceno sulfonato de cadena ramificada), caracterizada como *Pseudomonas aeruginosa* W51D (Soberón et al. 1996). La cepa prototipo fue aislada de aguas residuales industriales y domésticas procedentes de una planta de tratamiento con evidente contaminación por detergentes. Las muestras colectadas fueron incubadas varias semanas en presencia de 0.2% (w/v) del surfactante. Posteriormente una de las colonias bacterianas aisladas con capacidad de degradar 30% del detergente en medio rico fue sometida a un proceso de bioestimulación en presencia de concentraciones decrecientes de nutrimentos, hasta obtener una cepa capaz de crecer en medio mínimo con 0.2% de B-DBS como única fuente de carbono y energía. Esta cepa fue denominada W51D la cual mostró un perfil degradativo del surfactante del 70% en 48 h; con un tiempo de duplicación de 5 h y una transformación del surfactante de 41% hacia formación de biomasa. Entre otras características, se encontró que la cepa es capaz de resistir y asimilar altas concentraciones de B-DBS (0.5-1%), así como de degradar LAS y el isoprenoide citronelol. Cabe mencionar que la fuente del surfactante utilizado es de procedencia industrial Mexicana cuya pureza representa un 90% en isómeros de p-benceno sulfonato con cadena alquílica ramificada de C₁₂ y un 10% de intermediarios de síntesis de C₄-C₉ (Soberón et al. 1996).

Con este antecedente experimental se procedió a abordar el estudio del mecanismo degradativo de B-DBS en la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* W51D, siendo este trabajo el primer ejemplo de estudio degradativo de un surfactante tipo BAS por un microorganismo unitario. Por otro lado este estudio pudiera llegar a la aplicación posterior de la cepa en procesos de biorremediación de surfactantes importante en países subdesarrollados.

La caracterización planteada consistió en un análisis mutacional de la vía degradativa del detergente usando como indicadores de selección a presuntos compuestos intermediarios de la ruta catabólica. Los objetivos planteados al inicio del proyecto fueron los siguientes:

OBJETIVO GENERAL:

Caracterización de los genes involucrados en la degradación del detergente B-DBS, así como la elucidación de la vía catabólica en *Pseudomonas aeruginosa* W51D.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- 1.- Aislamiento de mutantes de la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* W51D afectadas en la degradación de posibles intermediarios degradativos del surfactante B-DBS, obtenidas mediante la inserción de un transposón.
- 2.- Clonación de los genes interrumpidos por la inserción, aislamiento de gen silvestre y la complementación de las mutantes probando si la degradación del surfactante fue afectada.
- 3.- Subclonación del(os) gen(es) involucrados en la degradación del surfactante B-DBS.
- 4.- Secuenciación y análisis del(os) gen(es) correspondientes.
- 5.- Propuesta de una vía degradativa del surfactante B-DBS mediante el análisis de compuestos acumulados utilizando herramientas como HPLC, EM y RMN.

10.- OBTENCION DE MUTANTES

Para la realización del primero de los objetivos inicialmente se planteó la utilización de una herramienta mutagénica como lo es el transposón pUT/*Tn5*::Hg (sistema de transposición derivado del *mini Tn5*) cuyo gen reportero confiere resistencia a sales de mercurio (Herrero y col. 1990). Con este sistema mutagénico se analizaron alrededor de 2000 colonias mutantes. A las cuales se les probó la capacidad de crecer en los diferentes compuestos hipotetizados como intermediarios de la ruta degradativa del surfactante B-DBS; tales como feniloctano, ácido 2-fenilpropiónico, ácido fenil-acético y citronelol. Los compuestos anteriores fueron utilizados por las siguientes razones: El feniloctano con base en un análisis degradativo de cultivos bacterianos monitoreado en perfiles de HPLC, en los cuales se detectó un metabolito con características de retención similares al dodecilbenceno lineal y ramificado, ambos altamente hidrofóbicos (Soberón et al. 1996), sugiriendo probablemente ser uno de los intermediarios degradativos de B-DBS. El ácido 2-fenilpropiónico fue seleccionado teóricamente por su similitud estructural como un intermediario degradativo de B-DBS (ver estructura del surfactante B-DBS, Anexo 2). El ácido fenilacético fue seleccionado en base al reporte en el cual se identificó como un intermediario en la degradación de LAS (Figura 9, Sigoillot & Nguyen, 1992); así como por ser utilizado por la cepa W51D como única fuente de carbono y energía (Soberón et al. 1996). Por último, el compuesto citronelol fue usado ya que además de ser asimilado por la cepa W51D, también por ser considerado como una molécula recalcitrante prototipo del metabolismo degradativo de alcanos 3-metil-ramificados. Por lo que se hipotetizó por su similitud estructural con la cadena ramificada del detergente estar involucrado con el mecanismo degradativo del detergente B-DBS (Soberón et al.

1996).

Las 2000 cepas mutantes que mostraron fenotipo de transposición fueron probadas para su capacidad de crecer en los compuestos de selección. Del total se identificaron 200 cepas afectadas, 160 presentaron fenotipo de auxotrofia y 40 afectación en el crecimiento para alguno de los compuestos usados como única fuente de carbono y energía. En un segundo evento de selección más riguroso se escogieron 15 cepas que fueron clasificadas en 5 tipos, mutantes para feniloctano con un porcentaje final de 0.4%, mutantes a citrionelol con 0.15%, mutantes a ácido 2-fenilpropiónico con 0.05%, una cepa mutante incapaz de crecer en cualquiera de los anteriores compuestos y dos cepas con mejor crecimiento en el detergente B-DBS (Figura 18). Para comprobar que efectivamente la incapacidad fenotípica estuviera correlacionada con el evento de transposición (pUTTn5::Hg), se realizó una prueba de hibridación tipo Southern Blot. El resultado mostró que todas ellas tienen un solo transposón insertado, mostrando además, una inserción azarosa sobre el ADN genómico de la cepa W51D (Figura 19).

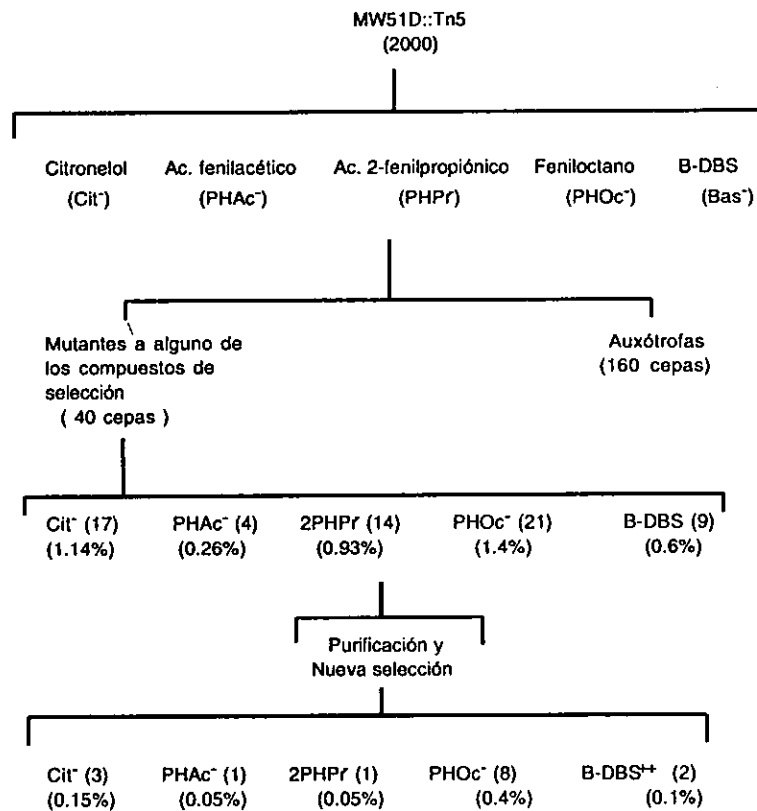


Figura 18.- Diagrama de selección de las mutantes obtenidas por la inserción del transposón *Tn5*/Hg.

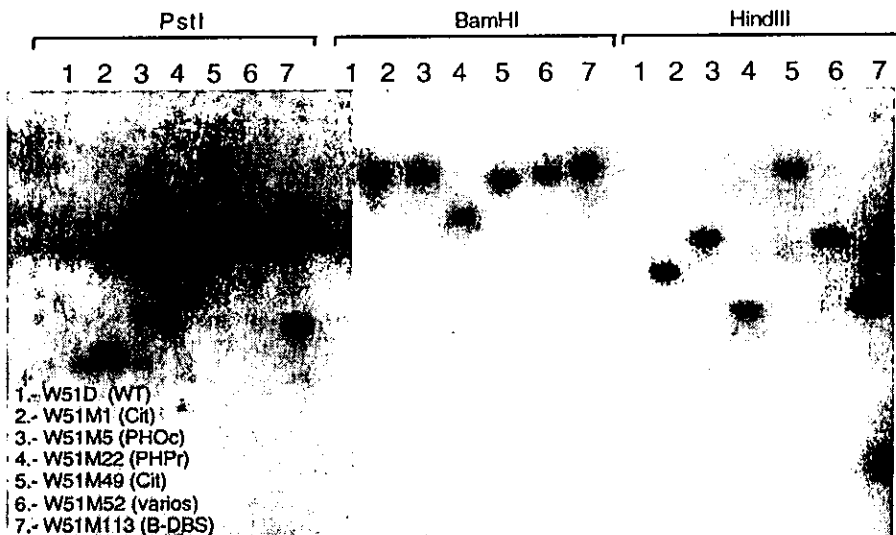


Figura 19.- Hibridación tipo southern blot del ADN de mutantes obtenidas por la inserción del *Tn5::Hg*

La siguiente etapa consistió en la clonación de la región genética interrumpida por la inserción del transposón. En esta etapa se decidió clonar sólo dos de los fragmentos correspondientes a las mutantes a citronelol y ácido 2-fenilpropiónico; W51M1 y W51M22, respectivamente. Estas mutantes cualitativamente mostraron afección en la degradación de B-DBS. La clonación se realizó en el plásmido pKOK4 (plásmido derivado del pBR322, Kokotek & Lotz, 1991). Análisis de restricción e hibridación confirmaron la clonación, denominándose a las construcciones pCM1-33 y pCM22p-1 (Figura 20). Posterior a esto, se prosiguió por un lado al inicio de la secuenciación de los fragmentos clonados y por otro a la obtención de los genes silvestres correspondientes, utilizando como sondas oligonucleótidos específicos de la región interrumpida. Identificando además, los sitios exactos de la inserción del transposón usado en la mutagénesis (Anexo 1 y 2).

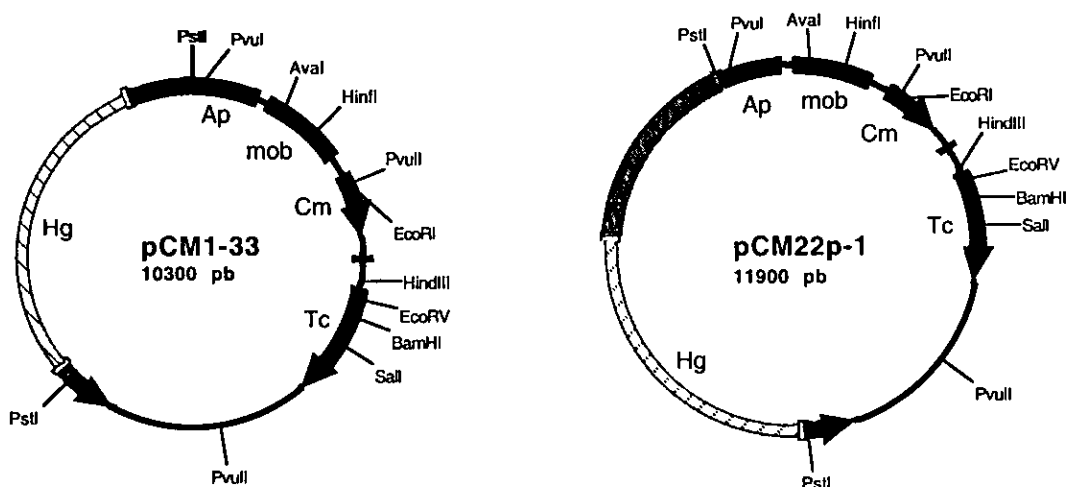


Figura 20.- Representación gráfica de las construcciones con sus respectivas inserciones.

11.- AISLAMIENTO DE LOS GENES SILVESTRES

Para el aislamiento de los genes silvestres se prosiguió a la construcción de una librería genómica de la cepa *Pseudomonas aeruginosa* W51D utilizando el cósmido pCP13 (Friedman et al. 1982). La librería genómica construida fue empacada en cabezas de fagos λ y transfectadas a la cepa de *E. coli* HB101. Una vez contenida la librería en la cepa HB101, las clonas silvestres se identificaron por hibridación usando como sondas oligonucleótidos específicos obtenidos de la secuenciación de los fragmentos contenidos en las construcciones pCM1-33 y pCM22p-1. Los cósmidos identificados posteriormente fueron probados para el restablecimiento del fenotipo degradativo de la mutación causada por la inserción. El resultado mostró que los cósmido pCP13:CN8 y pCP13:PL70 seleccionados, complementaron el fenotipo de las mutantes incapaces de asimilar citronelol y ácido 2-fenilpropiónico; respectivamente (Tabla 4).

Una vez identificados los cósmidos con los genes silvestres, se prosiguió a la subclonación de un fragmento de ADN más pequeño para la secuenciación y posterior caracterización genética. Los fragmentos fueron subclonados en un vector replicable en *Pseudomonas* originando las construcciones denominadas pUCP20:CN8 y pUCP20:PL70; procedentes de los cósmidos complementantes de los fenotipos citronelol y ácido 2-fenilpropiónico, respectivamente. Estas subclonas, fueron utilizadas como templados para la secuenciación de las regiones en estudio. Posteriormente fue probado si estas subclonaciones restablecen el fenotipo de las mutantes a citronelol (W51M1) y ácido 2-fenilpropiónico (W51M22), los resultados al respecto es discutido en los anexos correspondientes.

Tabla 4.- Complementación de las mutantes a citronelol y ácido 2-fenilpropiónico.

CEPA	PIA CmHg	Tetraciclina	Citronelol	Ac. \leftarrow 2-fenilpropiónico
W51D (wt)	-	-	+	+
W51M1	+	-	-	+
W51M22	+	-	+	-
HB101(pCP13:CN8)	-	+	-	-
HB101(pCP13:PL70)	-	+	-	-
W51M1(pCP13:CN8)	+	+	+	+
W51M22(pCP13:PL70)	+	+	+	+

12.- ANALISIS DE SECUENCIA NUCLEOTIDICA DE LA CLONA pUCP20:CN8

El análisis de la secuencia nucleotídica de la subclona pUCP20:CN8 consistió en la búsqueda de los marcos de lectura abierta (ORF's). Para identificar cuales de las secuencias peptídicas eran las mas favorables para ser codificadas por *Pseudomonas*, se usó el programa Codon Preference (UWGCG), el cual fue alimentado con la tabla referida por West & Iglewski (1988), en la que se reporta la preferencia de codones y el sesgo (bias) para una serie de genes caracterizados de *Pseudomonas aeruginosa*. Usando como herramienta esta tabla, se analizaron las secuencias nucleotídicas y las gráficas obtenidas discernieron los marcos de lectura abierta óptimos para ser codificados por *P. aeruginosa* W51D. En base a estos datos, en la figura 21 se muestran los ORF's que podrían codificar proteínas en la secuencia analizada. Como se puede notar los genes probables *flhF*, *ctrA* y *rpoF* son transcritos en sentido opuesto a los genes *rhIG* y *rscF*.

Posteriormente, la siguiente etapa comprendió en analizar por separado cada uno de los marcos de lectura mediante alineamientos tipo BLAST contra las bases de datos de secuencia nucleotídicas y de aminoácidos disponibles en el GENBANK (NCBI). Los resultados serán abordados en los dos primeros anexos, el primero referirá al gen *rhIG* y el segundo al gen *ctrA*.

ESTA TESIS NO DEBE
SER DE LA BIBLIOTECA

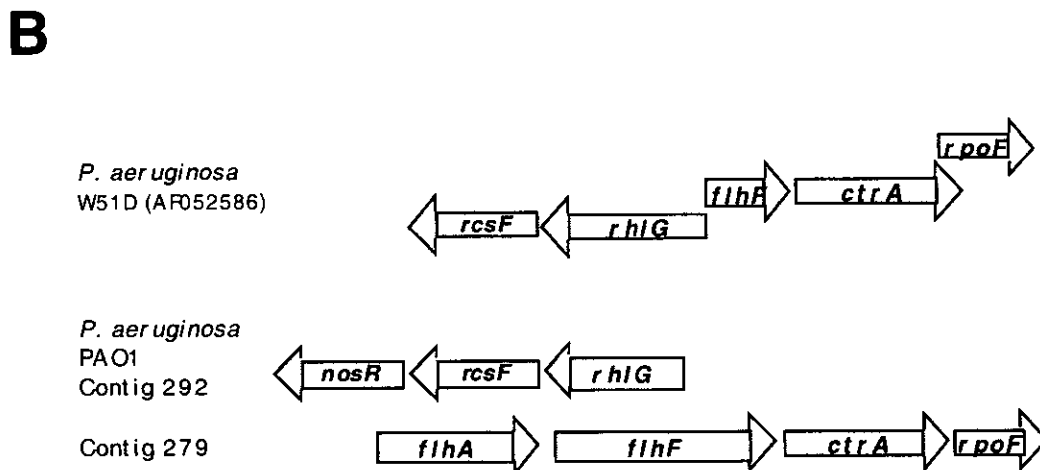
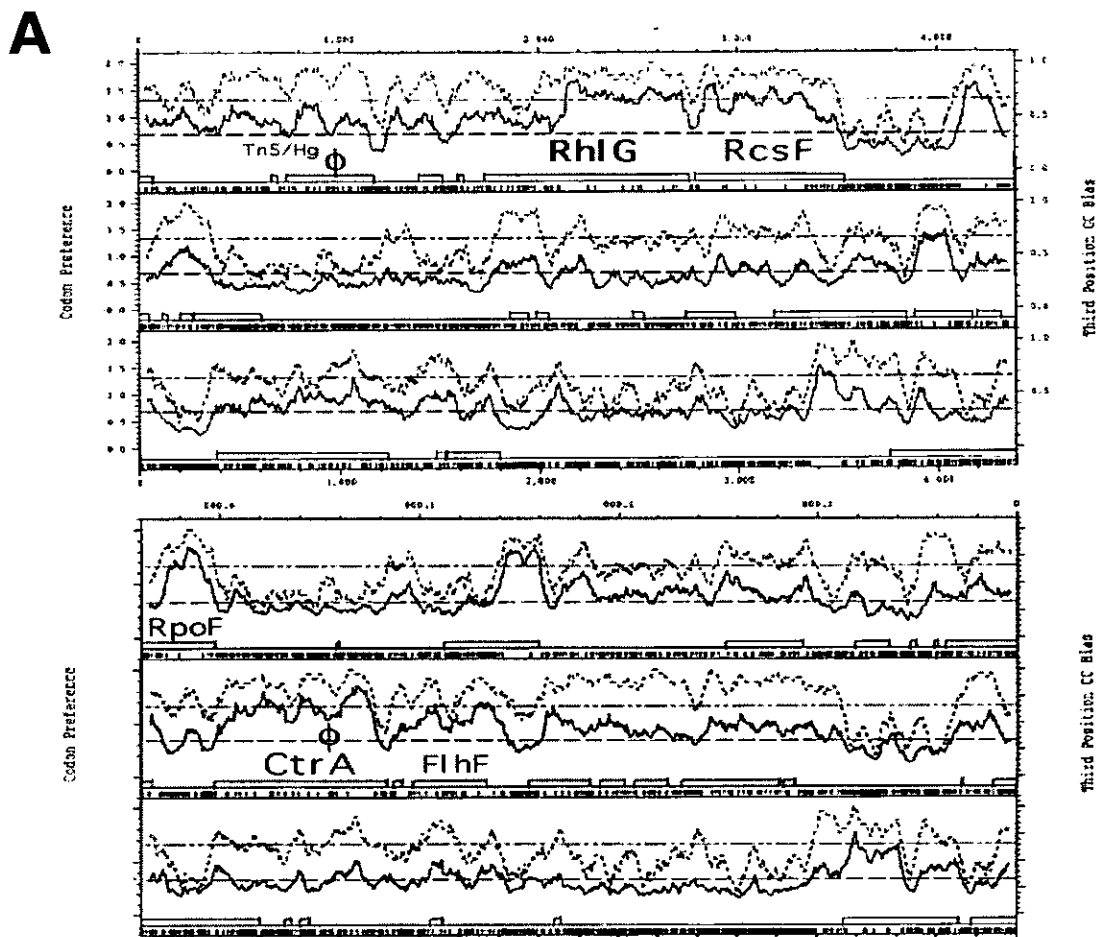


Figura 21.- A) Gráficos obtenidos para la región secuenciada de la cepa W51D; utilizando el programa CODONPREFERENCE (UWGCG), alimentado con la tabla de uso preferencial de codones de *Pseudomonas aeruginosa* (West & Iglewski, 1988). B) Arreglo genético de las regiones involucradas en *P. aeruginosa* W51D y PAO1. (ϕ) Sitio de la inserción Tn5/Hg.

A N E X O 1

The *Pseudomonas aeruginosa* *rhlG* Gene Encodes an NADPH-Dependent β -Ketoacyl Reductase Which Is Specifically Involved in Rhamnolipid Synthesis

JESÚS CAMPOS-GARCÍA,¹ ALMA DELIA CARO,¹ REBECA NÁJERA,¹ RAINA M. MILLER-MAIER,² RAGHEB A. AL-TAHHAN,² AND GLORIA SOBERÓN-CHÁVEZ^{1*}

Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62250, México,¹ and Department of Soil and Water Science, University of Arizona, Tucson, Arizona 85721²

Received 6 April 1998/Accepted 9 June 1998

A *Pseudomonas aeruginosa* gene homologous to the *fabG* gene, which encodes the NADPH-dependent β -ketoacyl-acyl carrier protein (ACP) reductase required for fatty acid synthesis, was identified. The insertional mutation of this *fabG* homolog (herein called *rhlG*) produced no apparent effect on the growth rate and total lipid content of *P. aeruginosa* cells, but the production of rhamnolipids was completely abrogated. These results suggest that the synthetic pathway for the fatty acid moiety of rhamnolipids is separate from the general fatty acid synthetic pathway, starting with a specific ketoacyl reduction step catalyzed by the RhlG protein. In addition, the synthesis of poly- β -hydroxyalkanoate (PHA) is delayed in this mutant, suggesting that RhlG participates in PHA synthesis, although it is not the only reductase involved in this pathway. Traits regulated by the quorum-sensing response, other than rhamnolipid production, including production of proteases, pyocyanine, and the autoinducer butanoyl-homoserine lactone (PAI-2), were not affected by the *rhlG* mutation. We conclude that the *P. aeruginosa* *rhlG* gene encodes an NADPH-dependent β -ketoacyl reductase absolutely required for the synthesis of the β -hydroxy acid moiety of rhamnolipids and that it has a minor role in PHA production. Expression of *rhlG* mRNA under different culture conditions is consistent with this conclusion.

Pseudomonas aeruginosa is a bacterium that can be isolated from many different habitats, including water, soil, and plants (5). *P. aeruginosa* is also an opportunistic human pathogen that causes serious nosocomial infections (8). The secretion of numerous toxic compounds and hydrolytic enzymes has been correlated with its pathogenicity (19). These exoproducts include different proteases, such as elastase, LasA protease, and alkaline protease, as well as phospholipase C, exotoxin A, pyocyanine, and rhamnolipids. The production of these compounds is considered to be a virulence-associated trait and is coordinately regulated by a mechanism called "quorum sensing" (11), which depends on the production of N-acylated homoserine lactones harboring acyl substituents of two different lengths; PAI-1 contains a 12-carbon chain (22), while PAI-2 contains a butanoyl moiety (23). These small diffusible signaling molecules activate gene expression at high bacterial densities through interaction with specific transcriptional activators, LasR (22) and RhlR (20), respectively.

The role of these exoproducts in soil or aquatic habitats has not been determined, but it is clear that environmental and clinical *P. aeruginosa* isolates do not represent different populations, since it has been shown that there is a major clone common to pathogenic and environmental isolates of this bacterium (26).

Rhamnolipids are glycolipids produced by *P. aeruginosa* which reduce water surface tension and emulsify oil. These compounds are biodegradable and have potential industrial and environmental applications (14, 17). Recently, rhamnolipids

have been found to have antagonistic effects on economically important zoospore plant pathogens, thus opening up their use as biocontrol agents (29). The rhamnolipids produced by *P. aeruginosa* in liquid cultures (Fig. 1) are mainly rhamnosyl- β -hydroxydecanoate (monorhamnolipid) and rhamnosyl-rhamnosyl- β -hydroxydecanoate (dirhamnolipid). Rhamnolipid biosynthesis proceeds through two rhamnose transfers from TDP-L-rhamnose (3). For the synthesis of monorhamnolipid, the enzyme rhamnosyltransferase 1 (Rt 1) catalyzes the rhamnose transfer to β -hydroxydecanoate, while Rt 2 synthesizes dirhamnolipid from TDP-L-rhamnose and monorhamnolipid. Genes coding for biosynthesis, regulation, and induction of Rt 1 enzyme are organized in tandem in the *rhlABRI* gene cluster around min 38 of the *P. aeruginosa* chromosome (20). The genes encoding Rt 2 have yet to be described.

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are bacterial storage compounds, which are synthesized by the polymerization of β -hydroxyacids by the PHA synthases (PhaC), with the coenzyme A (CoA)-linked fatty acids as substrates (Fig. 1) (31). The NADPH-dependent β -ketoacyl-CoA reductase (PhaB) is responsible for the reduction step in the production of the β -hydroxyacids. These storage compounds are intracellularly deposited as granules in many species. *P. aeruginosa* mainly produces PHAs consisting of medium-chain-length polymers, mainly poly- β -hydroxydecanoate (30).

The fatty acid synthetase system of *Escherichia coli* as well as that of most bacteria and plants is a dissociated fatty acid type of system (i.e., different reactions are catalyzed by separate proteins encoded by separate genes) (7). This biosynthetic pathway has been widely studied at the molecular level in *E. coli* and is encoded by a cluster of genes called *fab* genes which have been cloned and sequenced. As shown in Fig. 1, each round of elongation requires four chemical reactions.

* Corresponding author. Mailing address: Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62250, Mexico. Phone: (52) (73) 291634. Fax: (52) (73) 172388. E-mail: gloria@ibt.unam.mx.

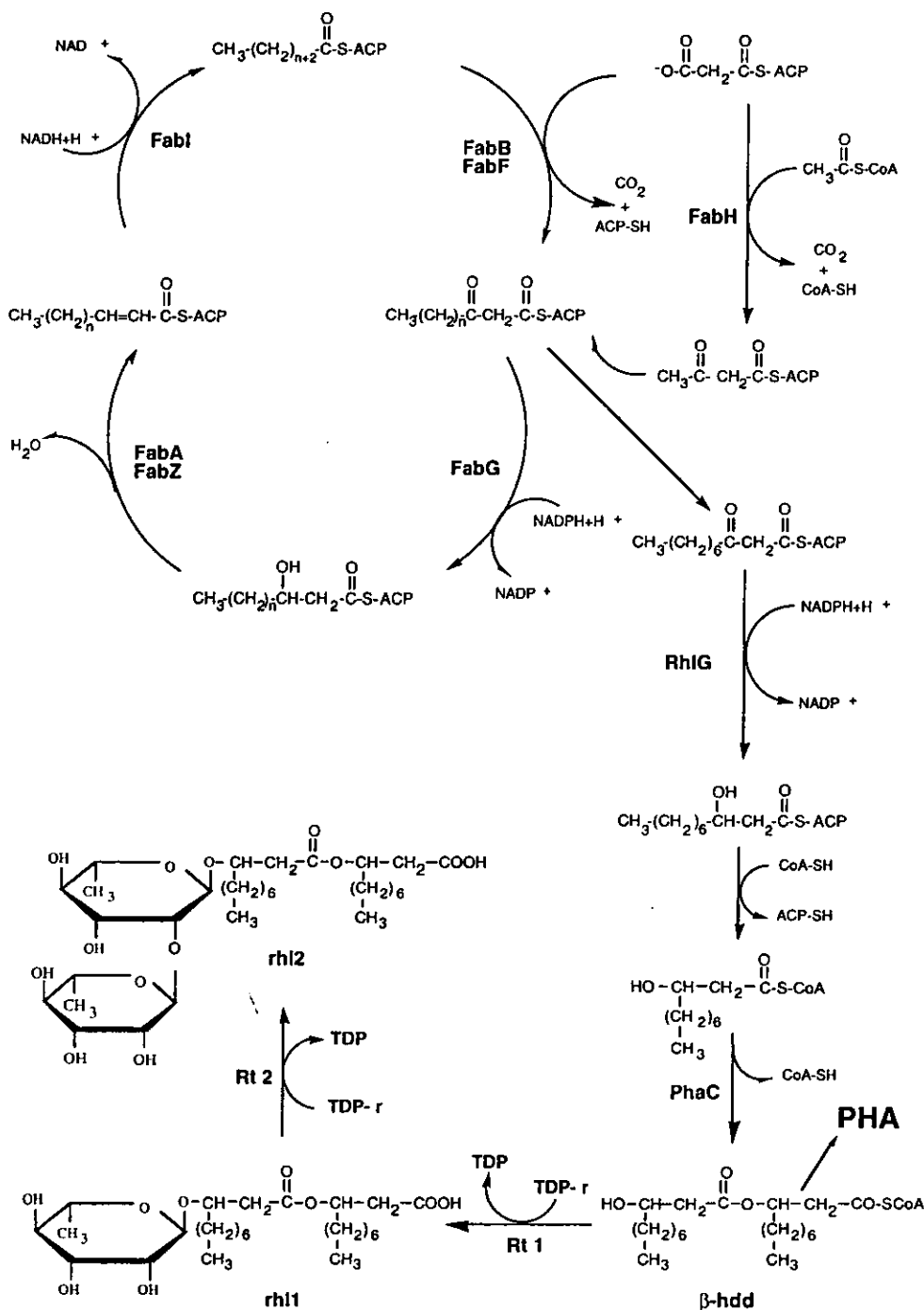


FIG. 1. Schematic representation of the fatty acid biosynthetic pathway showing the deduced role of the RhIG protein in the production of rhamnolipids and PHAs. Initiation of the fatty acid biosynthetic cycle, catalyzed by FabH, requires acetyl-CoA and malonyl-ACP to form aceto-acetyl-ACP. Subsequent cycles are initiated by condensation of malonyl-ACP with acyl-ACP, catalyzed by FabB and FabF. In the second step, the resulting β -ketoester is reduced to a β -hydroxyacyl-ACP by FabG. The third step in the cycle is catalyzed by either FabA or FabZ. The fourth and final step is the conversion of *trans*-2-enoyl-ACP to acyl-ACP, a reaction catalyzed by FabI. TDP-r, thymidine-diphospho-L-rhamnose; PhaC, PHA synthase; rhl 1, monorrhamnolipid; rhl 2, dirhamnolipid; β -hdd, β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoate.

Initiation requires acetyl-CoA and malonyl-acyl carrier protein (ACP) to form aceto-acetyl-ACP. The first cycle is initiated by Kas III (FabH). Subsequent cycles are initiated by condensation of malonyl-ACP with acyl-ACP, catalyzed by Kas I (FabB) and Kas II (FabF). In the second step, the resulting β -ketoester is reduced to a β -hydroxyacyl-ACP by a single, NADPH-dependent β -ketoacyl-ACP reductase (FabG). The third step

in the cycle is catalyzed by either the *fabA*- or *fabZ*-encoded β -hydroxyacyl-ACP dehydratases. The fourth and final step is the conversion of *trans*-2-enoyl-ACP to acyl-ACP, a reaction catalyzed by a single NADH-dependent enoyl-ACP reductase (FabI).

Recently the complete *P. aeruginosa fab* gene cluster sequence was deposited in the GenBank database (accession no.

TABLE 1. Strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant characteristic(s) ^a	Source or reference
Strains		
<i>P. aeruginosa</i>		
W51D	Strain able to degrade surfactants	28
W51D-10	W51D <i>rhlG</i> ::Tc mutant	This work
PAO1	Wild-type strain	B. H. Holloway ^b
ACP5	PAO1 <i>rhlG</i> ::Tc mutant	This work
PAO R1	PAO1 <i>lasR</i> ::Tc mutant	12
<i>C. violaceum</i>		
ATCC 31532	Wild-type strain	16
CV026	ATCC 31532 nonpigmented mutant	16
Plasmids		
pJQ200mp18	Cloning vector Gm ^r , unable to replicate in <i>Pseudomonas</i>	25
pJC1	pJQ200mp18 with a 600-bp <i>rhlG</i> internal fragment	This work
pJC2	pJC1 with a Tc ^r cassette cloned into the single <i>Sma</i> I site of <i>rhlG</i>	This work
pUCP20	pUC19-derived <i>E. coli</i> - <i>Pseudomonas</i> shuttle vector, Cb ^r	33
pJC3	pUCP20 with the PAO1 <i>rhlG</i> gene obtained by PCR	This work
pJC4	pUCP20 with 7 kb of W51D DNA, including the <i>rhlG</i> gene	This work

^a The abbreviations used represent resistance to carbenicillin (Cb^r), gentamicin (Gm^r), and tetracycline (Tc^r).

^b Monash University, Clayton, Victoria, Australia.

U91631). In addition, the *P. aeruginosa* *fabA* and *fabB* genes have been characterized (15). The objective of this work is to present evidence for the existence of a *P. aeruginosa* gene (*rhlG*) encoding a FabG homolog which is specifically involved in the synthesis of the β -hydroxyacid moiety of rhamnolipids. There have been no previous reports on the nature of the enzymes involved in the synthesis of the β -hydroxyacid moiety of rhamnolipids, and it has been assumed that they are the same proteins involved in fatty acid synthesis. Evidence is also presented suggesting that RhlG has a role in PHA synthesis.

MATERIALS AND METHODS

Microbiological procedures. The bacterial strains and plasmids used in this work are shown in Table 1. *P. aeruginosa* strains were routinely grown on Luria-Bertani medium (LB), *Pseudomonas* isolation agar (PIA [Difco]), or PPGAS (the phosphate-limited medium designed for rhamnolipid production) (34) at 29°C. M9 minimal medium supplemented with 0.05% NH₄Cl and gluconate 0.2% (MM + gluconate) was used to induce the production of PHAs. The antibiotic concentrations used for *P. aeruginosa* PAO1 and W51D, respectively, were as follows: carbenicillin, 250 and 50 μ g/ml; gentamicin, 250 and 30 μ g/ml; and tetracycline, 150 and 50 μ g/ml.

Exoproducts and PHA determination. Pyocyanine was extracted with chloroform from the culture supernatant and determined by *A*₆₉₀ as described previously (6). Protease production was measured by halo formation in LB plates containing 1% skim milk and inoculated with 20 μ l of a saturated liquid culture. Total rhamnolipid concentration was determined from culture supernatants of cells grown on PPGAS medium at 29°C for 48 h by measuring the rhamnose concentration after acid hydrolysis by the orcinol method (4). The production of butanoyl-homoserine lactone (PAI-2) by different *P. aeruginosa* strains was determined by using the biosensor developed for the detection of small-chain *N*-acyl-homoserine lactones based on violacein production by *Chromobacterium violaceum* mutant strain CV026 (16). The wild-type *C. violaceum* strain ATCC 31532 produces violacein induced by the autoinducer *N*-hexanoyl-L-homoserine lactone, while mutant CV026 only produces this pigment when given medium supplemented with this autoinducer or related compounds, such as the *P. aeruginosa* PAI-2 autoinducer. PHA was determined after 24 h of growth under nitrogen-deprived conditions (30). Cells were harvested by centrifugation and washed with 100 mM Tris-100 mM NaCl buffer (pH 7). Cells were ruptured by sonication, and the extract was digested with 1.8% sodium hypochlorite for 1 h.

After centrifugation, the pellet was washed twice with ethanol and once with acetone. The PHA concentration is expressed as milligrams of PHA per milligram of protein.

Fatty acid analysis. Total cell lipids were extracted by the method of Folch et al. (10). Briefly, 1 ml of the culture was washed twice and then brought back to the original volume. The following reagents were added with vortexing after each addition: 2 ml of 2:1 methanol-chloroform, 1 ml of 1 N KCl acidified with 0.1 N HCl, and 1 ml of chloroform. In some samples, a white emulsion phase formed between the aqueous and organic phases. In this case, the sample was placed in the refrigerator overnight to allow the emulsion phase to settle. The lower phase (chloroform) was removed and evaporated at 45°C under a nitrogen stream. The fatty acids were analyzed by gas chromatography after methyl esterification (18). Chloroform (0.5 ml) was added, and the sample was vortexed. Two milliliters of BF₃-methanol was added, and the mixture was heated at 80°C for 1 h in an airtight Teflon sealed screw-cap tube (18). The resulting fatty acid methyl esters (FAMES) were extracted three times with 1 ml of hexane, and the three fractions were combined. Finally, the hexane was evaporated at 45°C under a nitrogen stream, and the FAMES were brought to a concentration of 200 μ l with chloroform.

Electron microscopy. PHA production by different *P. aeruginosa* strains was visualized by electron microscopy. Cells were treated for electron microscopic observation as follows. They were washed three times with phosphate buffer at pH 7.2, fixed with 2% glutaraldehyde for 2 h, and washed with phosphate buffer. Further fixation with 2% osmium tetroxide for 2 h was done; all of these procedures were carried out at 4°C. Fixed cells were washed and then dehydrated by passage through a graded ethanol series. After exposure to propylene oxide, samples were placed in L. R. White resin as recommended by the manufacturer. Ultrathin sections were incubated with uranyl acetate, washed with distilled water, treated with lead citrate, washed again, and observed.

Nucleic acid procedures. DNA isolation, cloning and sequencing, Southern and Northern blotting, and nick translation procedures were carried out as described previously (27). RNA was isolated with the RNaid PLUS kit (BIO101, Inc.). Primer extension analysis was done with two primers (R3 and R4 [Fig. 2]), both located in the 5' region of the *rhlG* gene from *P. aeruginosa* PAO1 (*Pseudomonas* Genome Project contig 1780). The templates used for sequencing reactions were obtained by PCR of total DNA from *P. aeruginosa* PAO1 with the oligonucleotides L1 and R3 or R4 (Fig. 2). The sequencing reactions were done with the Thermo Sequenase radiolabeled terminator cycle sequencing kit (Amersham Life Science, Inc.).

Genetic manipulations. *P. aeruginosa* matings (34) and transformation (21) were done as reported previously. The PAO1 and W51D *rhlG*::Tc mutants (ACP5 and W51D-10, respectively [Table 1]) were constructed by selection of double recombination events with plasmid pJC2. This plasmid is a derivative of plasmid pJC1, which contains a 600-bp *rhlG* internal fragment from *P. aeruginosa* W51D. A 1.4-kb tetracycline resistance gene from plasmid pBSL141Tc (1) was cloned on the unique *Sma*I site of the *rhlG* fragment contained in plasmid pJC1, rendering plasmid pJC2 (Table 1). The W51D *rhlG* internal fragment was obtained by PCR with the oligonucleotides L2' (CGAAGCTGTCAGGTACGGC GAGTGCATCGG) and R2' (GATGCTGCAGATGTTGCCGTCATGTAG GC) (corresponding to the positions in the PAO1 *rhlG* gene of the L2 and R2 oligonucleotides shown in Fig. 2), with the recognition site for the *Pst*I endonuclease incorporated on the flanking ends of both of them. Plasmid pJC3 is a pUCP20 (33) derivative containing the PAO1 *rhlG* gene obtained by PCR with oligonucleotides L1 and R1 (Fig. 2). Plasmid pJC4 is a pUCP20 derivative containing a 7-kb *Eco*RI W51D DNA fragment which includes the *rhlG* gene. The sequence of the L1 oligonucleotide is not present in the W51D *rhlG* gene region.

Computer analysis of the DNA and protein sequences. Computer analyses of the sequences were carried out by using the GENE WORKS program (IntelliGenetics, Inc.) and the University of Wisconsin Genetics Computer Group (UWGCG) programs. The sequences of different *P. aeruginosa* PAO1 contigs were obtained from the *Pseudomonas* Genome Project web site (<http://www.pseudomonas.com>).

Nucleotide sequence accession number. The sequence of the W51D *rhlG* gene has been deposited in the GenBank database under accession no. AF052586.

RESULTS AND DISCUSSION

Identification and sequencing of the *P. aeruginosa* W51D *rhlG* gene. *P. aeruginosa* W51D is a bacterium which is able to degrade at least 70% of a branched-chain alkylbenzene sulfonate mixture and is resistant to high concentrations of this surfactant (28). In order to study the W51D surfactant catabolic pathway, we have isolated several transposon mutants affected in the degradation of presumed intermediates of the surfactant degradation (unpublished results). During the DNA sequencing of a mutant unable to degrade citronellol, we detected a linked open reading frame (ORF) which was homologous to the *E. coli* *fabG* gene, having 36% amino acid se-

A

L1*term*.....

GGCTACAGCGCGGCTTCGTCGAGCACTACCTGTTGCCGTGATCTATCCGCCGGCTGACCCCGGGTGAATGGATCCTTGCGGCCATCGTTCCTGC 100

TGGTCAACCTGATCGCCTACCTGTATCTGTGGCATTGCCCGAGTAGCCCGCTGAGCCACGGATGCCACGTCATTCGGTACCTGGATAAATGCTGCGCCGGCA 200

-24 -12 P2
-35 -10 P1

GOGAGGCGAATCGTAGGCTGGTCTCCCTGCCAGCCGGAGTTCATCCCATGCATCCCTATTTTCAGTCTCGCCGGTTCGCATCGCCCTGGTCACCGGGCGG 300

R4
SD *rhIG* M H P Y F S L A G R I A L V T G G

CAGCCCGGGCATCGCCAGATGATCGCCAGGGTCTTCTCGAAGCCGGCCCGCGCTTTCATCTGCGCACGTGACGCAGAGGGCTGCGCCGACACCCGCC 400

R3

S R G I G O M I A Q G L L E A G A R V F I C A R D A E A C A D T A

L2

ACACGCCCTCTGGCCCTACGGCGACTGCCAGGGGATCCCGCCGACCTTTCCAGCGAAGCCGGTGCCTGGCGCAGGCGCTCGGGAAACTCAGCG 500

T R L S A Y G D C Q A I P A D L S S E A G A R R L A Q A L G E L S A

CGCGGCTGGATATCTGGTGAACAACGCCGGCACCAGTGTGGGGCCAGCGCTGGAAAGCTATCCGGTGTCCGGCTGGGAAAAGGTCATGCAGCTCAATGT 600

R L D I L V N N A G T S L G V F A T R A T H R P N G I G Q S V V R L E G F

CACCTCGGTGTTTCTCGATCCAGCAACTGCTGCGCGTGTGCGCGCTCGGCCAGCGCGGAGAACC CGCGCGGGTGTCAACATCGGCTCGGTGGCG 700

T S V F S C I Q Q L L P L L R R S A S A E N P A R V I N I G S V A

L3

GGCATCAGCGCCATGGCCGAACAAGCCTATGGCTACCGGCCAGCAAGCCCGCGCTGCATCAACTGTCCGGATGCTGGCGAAGGAACTGGTCCGGCAGC 800

G I S A M G E Q A Y A Y G P S K A A L H Q L S R M L A K E L V G E H

ACATCAATGTCAATGTGATCGCTCCCGGACGCTTTCGAGCCGCATGACCCGTCACATCGCCAATGACCCGCAGGCACTGGAGGGGACAGCGCGCTCGAT 900

I N V N V I A P G R F P S R M T R H I A N D P Q A L E A D S A S I

R2

TCCCATTGGGCGCTGGGTTCGCGCCGAGGAGATGGCGCGTGGCGATCAGCCCTGGCCCGCACCGCGCGCTACATGACCCGGCAACGTCATCCCATC 1000

P M G R W G N R S L G V F A T R A T H R P N G I G Q S V V R L E G F

GACGGGGTMTTCATCTCTGAGCGCCCAATCCGGTAACATGAGCCCGCGCGCTCGCTCGTCCCGCATGACCCACAGCGTTCCTCCCATCGGC 1100

D G G F H L . *rcsF* M T H S V S P I G

TACATCCGCTCCTGCTTCATGGAGAAGTTCGCCATCCCGGCCAGCCGCTGCTGCGCGCGCGCGCGGGGACCTGGAACTGCTGCGCCGTTCCGACC 1200

Y I R S C F M E K F A I P R Q P L L A P A A R G T L E L L P P F D Q

AGGTGAAGCGCTGGAAGCCTGGAGCAGGTGAGCCATGTCTGGTGTCTTCTCTTCCACCAGGCCCTGGAAGACAAGCCGGCAGTGAAGGTGCCGCC 1300

V E A L E G L E Q V S H V W L L F L F H Q A L E D K P R L K V R P

GCCCGCCTGGCGGCAACCGCTCGCTGGGAGTCTGCGCCACCCCGCCACCATCGCCGAACGGCATCGGCCAGTCCGTTGGTGGCCTGGAGGGCTTC 1400

P R L G G N R S L G V F A T R A T H R P N G I G Q S V V R L E G F

R1

GAAGCGGGCGCCTGTGGTGTCCGGAATCGACCTGCTCGACGGCACCCCGGTACTCGATATCAAGCCCTACGTACCCTACGCCGACCGCTGGCCGACG 1500

E A G R L W L S G I D L L D G T P V L D I K P Y V P Y A D A V A D A

CCCGAACGGCATCGCCGACGCGCGCGCCCGGCATCGCGTGGAGTGGAGCGAGCAGCGCGCGCCAGGCCATGACACCGCCAGCGGTTCGCGGCA 1600

R N G I A D A P P P G I A V E W S E Q A R R Q A H E H G Q R L R Q

GCCGTGGCGGAGTGTGATCGAGCAATGCTGGCGCAGGACCCACGCCCGCCCTACCAGAAGCCAGAGCCCGGGCGCCGCTACGGGGTGGCCCTGTGGAC 1700

P V A E L I E Q C L A Q D P R P A Y Q K P E P G R R Y G V R L W D

CTCGACGTGCATGGCACTACCCCGCCCGGACCTGATCCCGTGTGGACGTGCGCGCGCGGATTCAGCCTTCTCAGCGCAGCGGATTCAGCGCCAGC 1800

L D V H W H Y P R P D L I R V L D V A G G C

GCGTCGCTTCGAAGACTTCCTGTTTCGAGGATCAGCGGCTCGACCAACGGTCCGCTGTCCGGAAATGCGCGGTGCGGGTGTGCGCTCGTAGGCTCGGT 1900

CATCGGATAGACCTCGTAGAGATAGACCAGGTCAGGGTCTGTGCGTTCGCGGAAACGTCGAACACCAGGCAGCCGGCTCGGTGGACACGGAAGCGGC 2000

GGCGTACCTGGATGGCATCGATGAAAGCCCTCGGCGCAGCCGGCCCTGAGGCGGGCCTTGATAAAGATCAGTACACGGAACTTCCTTTTGTTTTGA 2100

term

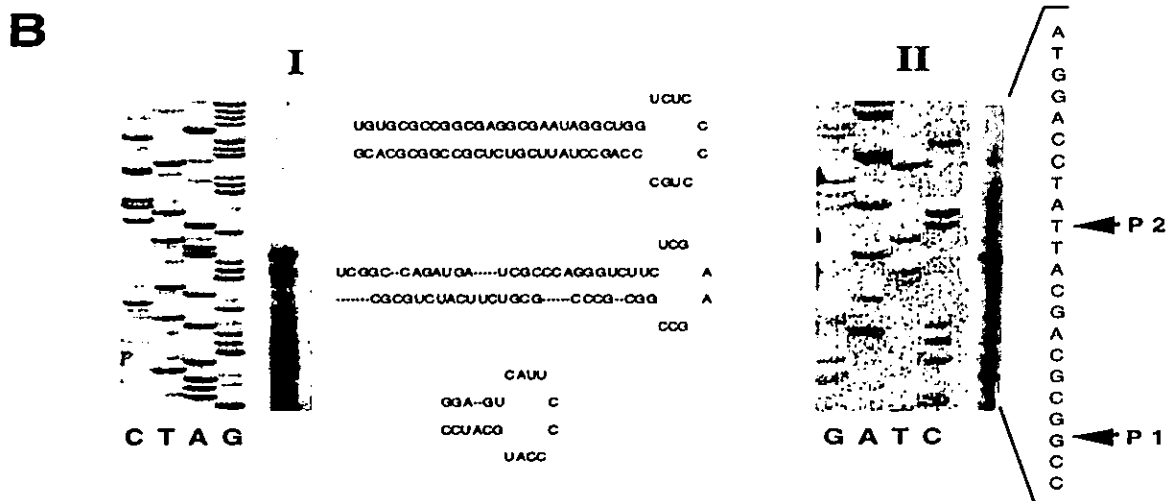


FIG. 2. Characterization of the transcription arrangement of the *P. aeruginosa* PAO1 *rhIG* and *rcsF* genes. (A) Nucleotide sequence of the genes and regulatory sequences. The sequence and position of the oligonucleotides used during this work are shown in the figure and identified as Ln or Rn, depending on their polarity (L oligonucleotides amplify the sequence from 5' to 3', and R oligonucleotides have the opposite polarity). The sequence corresponding to the lux box is double underlined. Arrows indicate the two transcription start sites detected (P1 and P2). SD (Shine-Dalgarno) indicates the ribosome binding site sequence for mRNA translation. The sequences corresponding to putative transcriptional termination sites (*term*) are shown. (B) Primer extension analysis of the *rhIG* gene with two different oligonucleotides as primers. In panel BI, the primer extension analysis was done with oligonucleotide R3 and revealed the existence of the mRNA secondary structures shown. In panel BII, the oligonucleotide R4 was used, and two transcription start points indicated as P1 and P2 were found.

quence identity along the entire length. This ORF, called *rhIG*, has the characteristic codon usage and bias of its GC composition in the third position of each codon of the *Pseudomonas* genes (32). The alignment of the protein deduced from the sequence of the *rhIG* gene with the proteins deposited in the GenBank database confirmed the presence of the characteristic signature for NADPH binding, as well as the characteristic motifs of dehydrogenases. As shown in Fig. 3, these sequences are conserved in all of the sequenced bacterial and plant FabG proteins. However, the chromosomal region surrounding this *fabG* homolog did not show the presence of other *fab* genes, as has been reported for *P. aeruginosa* PAO1 and *E. coli*.

Another ORF encoding a protein with a sequence 44% identical to that of *E. coli* RcsF, which is involved in regulation of capsular production (13), was detected downstream of *rhIG*. This genetic arrangement and the fact that a *fabG* gene has been already described in *P. aeruginosa* PAO1 led us to the hypothesis that this is a novel gene which encoded a second functional NADPH-dependent β -ketoacyl reductase. In order to test this hypothesis, we constructed a *rhIG::Tc* mutant according to the strategy shown in Fig. 4. The inactivation of the W51D *rhIG* gene did not produce a fatty acid auxotrophy or a decrease in growth rate (data not shown). These results showed that the RhlG protein is not responsible for the total cellular fatty acid synthesis, so a FabG protein should also exist in strain W51D. However, this evidence was not enough to determine the expression and functionality of the *rhIG* gene product.

Identification of the *rhIG* gene in the *P. aeruginosa* PAO1 genome. We decided to study the functionality of the RhlG protein in the *P. aeruginosa* PAO1 strain for two reasons: approximately 95% of its genome has been sequenced (<http://www.pseudomonas.com>), and the existence of the *fabG* gene had already been reported in this strain (GenBank database accession no. U91631). We identified the PAO1 *rhIG* gene in contig 1780 of the *Pseudomonas* Genome Project, showing the characteristic codon usage and bias of GC composition in the third position of each codon of the *Pseudomonas* genes (32). The genetic arrangement of PAO1 is similar to that of strain W51D, in which the *rscF* gene is downstream (Fig. 2). The deduced PAO1 RhlG protein consists of 256 amino acids, with a predicted molecular mass of 26,813 Da and has amino acids 54% identical to those of the W51D RhlG protein (Fig. 3). The great divergence between both *rhIG* genes is mainly due to differences in the sequences at their 5' ends. If the sequences are compared after deletion of the first 52 amino acids of the PAO1 RhlG protein and 112 amino acids of the corresponding protein in W51D, they have 91% identical amino acid sequences. Furthermore, both proteins contain the motifs important for their putative catalytic capabilities (Fig. 3). The difference between the amino-terminal sequences of PAO1 and W51D RhlG proteins is striking, considering that both strains belong to the same species. The significance of this variability is not clear to us. The DNA sequence of the first 300 nucleotides of the PAO1 *rhIG* 5' region (Fig. 2) was confirmed by us, and we found only three differences. This result rules out the possibility that the divergence between the *rhIG* genes is due to major inaccuracies in the reported sequence in contig 1780.

We confirmed that the *rhIG* genes were conserved and that *rscF* was present downstream in PAO1 and W51D strains by PCR amplification of total DNA (Fig. 4C). The following oligonucleotides were used as primers: L2 or L2' (the oligonucleotide corresponding to the W51D *rhIG* gene sequence in the same region) and R2, L2 or L2' and R1, and L3 and R1 (Fig. 2A). The amplified product was a DNA band of the same size from either strain (Fig. 4C), thus validating the high degree of

homology between *rhIG* genes and the conservation of the genetic arrangement inferred from the analysis of the sequence obtained from the *Pseudomonas* Genome Project in contig 1780.

The sequences of the PAO1 *fabG* gene from contig 1761 of the *Pseudomonas* Genome Project and GenBank (accession no. U91631) were compared. The two PAO1 *fabG* gene DNA sequences are not identical. This inconsistency may result from inaccuracies in the sequence of the *Pseudomonas* Genome Project. We compared both PAO1 FabG protein sequences to the deduced protein sequences of the PAO1 RhlG protein and found the amino acids were 33 and 34% identical, respectively (Fig. 3). This is further evidence that RhlG is an NADPH-dependent β -ketoacyl reductase. The PAO1 RhlG protein also aligned with FabG proteins of different origin, as well as with PhaB proteins from *Alcaligenes* sp. strain SH-69 and *Acinetobacter* sp. strain RA3849 (Fig. 3). This result is not surprising, since the PhaB proteins are NADPH-dependent acetoacetyl reductases which participate in PHA synthesis. The significance of the RhlG homology with PhaB proteins is discussed below.

Expression of the *rhIG* gene in *P. aeruginosa* PAO1. We carried out primer extension experiments to determine whether the *rhIG* was expressed in strain PAO1 grown for 48 h on PPGAS, a medium designed to increase rhamnolipid production (34). Two oligonucleotides derived from the DNA sequence reported in contig 1780 corresponding to the 5' end of the *rhIG* gene were used as primers (Fig. 2). These experiments revealed the presence of a specific *rhIG* mRNA, confirming that the gene is expressed under these culture conditions (Fig. 2BI and BII). When the R3 oligonucleotide was used, the extension was aborted very near the putative RhlG protein start codon, suggesting the existence of an mRNA region with a secondary structure that prevented DNA polymerization by reverse transcriptase beyond this point (Fig. 2BI). The DNA sequence within this region predicted the formation of several loops in the mRNA (Fig. 2BI), which could play a role in the regulation of the *rhIG* gene expression at the posttranscriptional level.

Two mRNA start sites were observed when the oligonucleotide R4 was used as a primer in extension experiments (Fig. 2BII). R4 is complementary to the mRNA sequence in which the extension of the primer was aborted with oligonucleotide R3 (Fig. 2A). The most frequent mRNA start site seems to be transcribed from a putative σ^{54} type of promoter, although the $-12/-24$ regions do not present all the elements which have been claimed to be important in these promoters. A similar situation has been found in the *rhLAB* σ^{54} promoter (24). The second, less abundant mRNA start site is a typical σ^{70} type of promoter. These two promoters overlap at their respective -24 and -35 regions. Between nucleotides -43 and -63 (with respect to the putative σ^{54} promoter), the sequence ATCTG TGGCATTGCCGAGTA corresponding to a "lux box" is present (Fig. 2A). The presence of this regulatory sequence strongly suggests that the *rhIG* gene is regulated at the transcriptional level by one of the two LuxR homologs forming part of the quorum-sensing type of response in *P. aeruginosa*, LasR or RhlR. The characteristics of the *rhIG* promoter region (two promoters, one of which is a noncanonical σ^{54} type of promoter, and the presence of a lux box) are very similar to those present in the promoter region of the *rhLAB* operon, which encodes the Rt 1 enzyme (24). In the case of this key enzyme for rhamnolipid biosynthesis, RhlR positively regulates its transcription (20), and the alternative sigma factor σ^{54} is involved in its expression (24). As will be shown later, RhlG protein is involved in the synthesis of one of the rhamnolipid

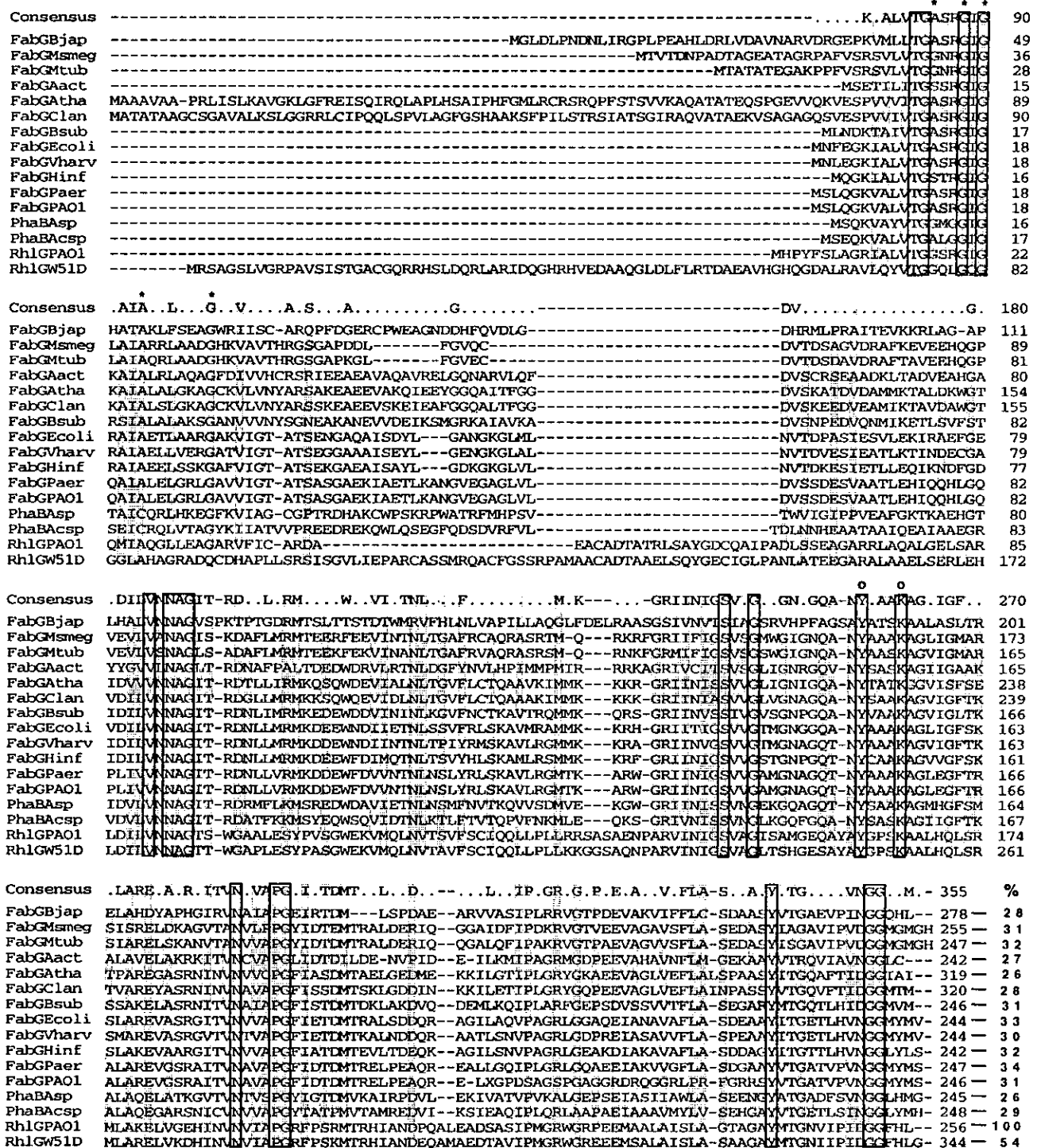


FIG. 3. Multiple alignment of the RhlG deduced amino acid sequence with different NADPH-dependent β-ketoacyl-ACP reductase (FabG) and NADPH-dependent ketoacyl-CoA reductase (PhaB) proteins. Residues within rectangles correspond to identical amino acids, and those shaded are conserved among most of the proteins analyzed. The percentage of identity of the different proteins with PAO1 RhlG is shown in the bottom right column of the figure. Asterisks mark the residues which form the NADPH binding signature, and circles show the amino acids conserved in dehydrogenases. FabGBjap, FabG from *Bradyrhizobium japonicum*; FabGmsmeg, FabG from *Mycobacterium smegmatis*; FabGmtub, FabG from *Mycobacterium tuberculosis*; FabGAact, FabG from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*; FabGatha, FabG from *Arachidopsis thaliana*; FabGclan, FabG from *Cuphea lanceolata*; FabGbsub, FabG from *Bacillus subtilis*; FabGEcoli, FabG from *E. coli*; FabGVharv, FabG from *Vibrio harveyi*; FabGHinf, FabG from *Haemophilus influenzae*; FabGPaer, FabG from *P. aeruginosa* (GenBank database accession no. U91631); FabGPAO1, FabG from *P. aeruginosa* PAO1 (contig 1761); PhaBasp, PhaB from *Alcaligenes* sp. strain SH69; PhaBacsp, PhaB from *Acinetobacter* sp. strain RA3849; RhlGPAO1, RhlG from *P. aeruginosa* PAO1 (contig 1780); RhlGw51D, RhlG from *P. aeruginosa* W51D (GenBank database accession no. AF052586).

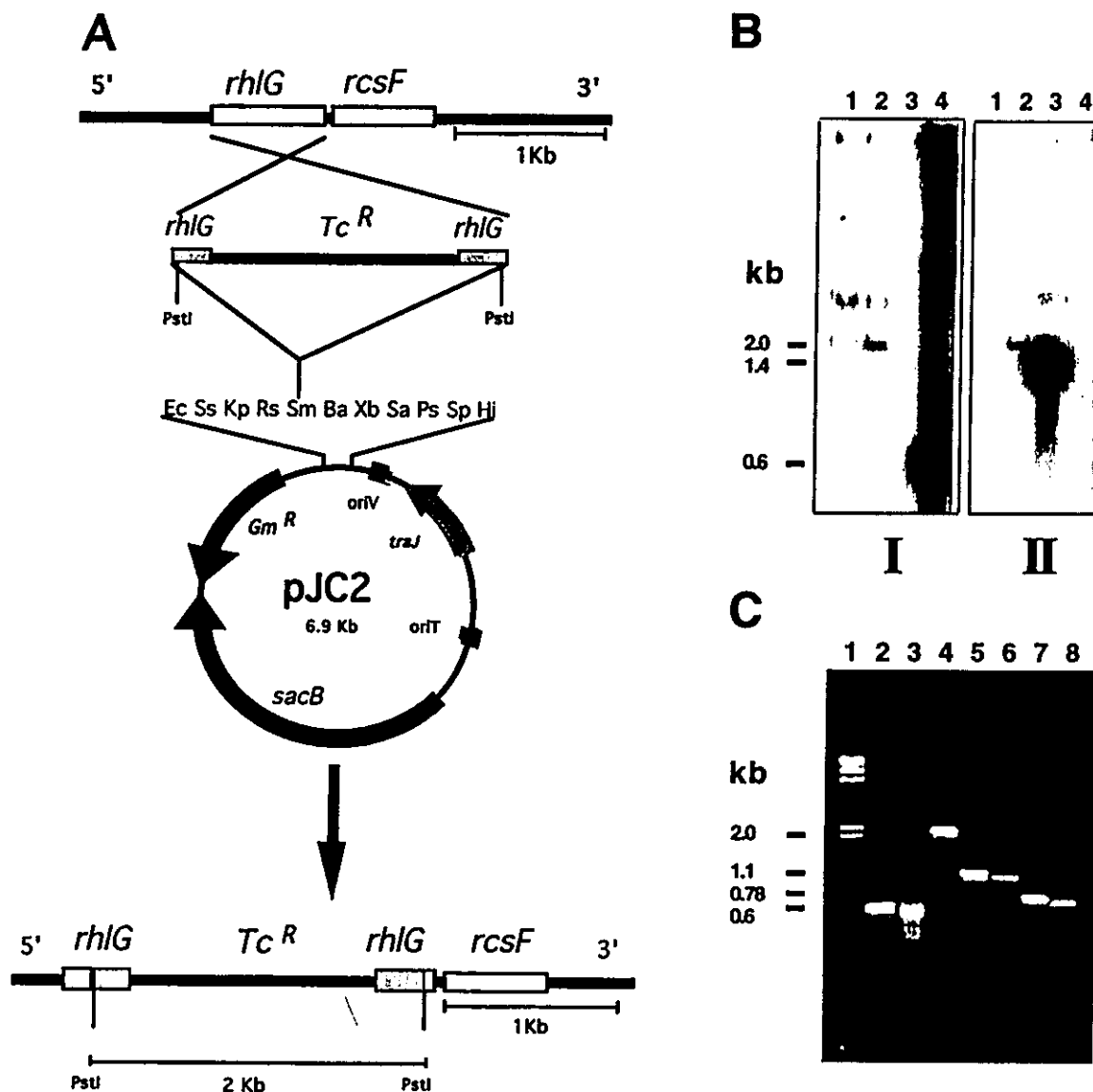


FIG. 4. Molecular characterization of the PAO1 *rhIG* mutant ACP5. (A) Schematic representation of the strategy to construct the *rhIG* mutants (ACP5 and W51D-10). (B) Southern blotting hybridization with the 600-bp insert of plasmid pJC1 (I) and the 1.4-kb *Tc^R* resistance cassette (II) used as probes. Lanes correspond to DNA samples digested with *PstI* endonuclease from the PAO1 genome (lane 1), the ACP5 genome (lane 2), the *Tc^R* cassette (lane 3), and the PCR product of the amplification of the W51D genome with oligonucleotides L2' and R2' (lane 4). (C) Amplification by PCR with different oligonucleotides specific for the *rhIG* and *rscF* genes. Lanes correspond to the following DNA samples: 1, λ phage genome digested with *HindIII*; 2, PCR product with W51D DNA as a template and the L2' and R2 oligonucleotides as primers; 3, PCR product with PAO1 DNA as a template and the L2 and R2 oligonucleotides as primers; 4, PCR product with ACP5 DNA as a template and the L2 and R2 oligonucleotides as primers; 5, PCR product with W51D DNA as a template and the L2' and R1 oligonucleotides as primers; 6, PCR product with PAO1 DNA as a template and the L2 and R1 oligonucleotides as primers; 7, PCR product with W51D DNA as a template and the L3 and R1 oligonucleotides as primers; and 8, PCR product with PAO1 DNA as a template and the L3 and R1 oligonucleotides as primers.

precursors, so it is likely that the structural similarity between the promoter regions of the *rhIG* gene and the *rhLAB* operon reflects that they are subject to similar genetic regulation. This possibility was examined further (see below).

Construction of a *P. aeruginosa* PAO1 *rhIG::Tc* mutant. The high degree of similarity of the PAO1 and W51D *rhIG* genes, excluding their 5' ends (Fig. 3), enabled us to construct a PAO1 *rhIG::Tc* mutant (ACP5 [Table 1]). Plasmid pJC2, which contains a *rhIG* internal fragment from strain W51D with a *Tc^R* cassette insertion, was transferred by transformation to strain PAO1, and *Tc^R* *Gm^R* transformants which were putative double recombinants carrying an interrupted *rhIG* gene were selected (Fig. 4). One of these transformants is the ACP5

mutant (Table 1), which indeed seems to be the product of a double recombination event in which the *rhIG* gene is interrupted by the *Tc^R* cassette; this conclusion is drawn from the analysis by Southern blot hybridization and PCR amplification as shown in Fig. 4B and C, respectively. The Southern blot hybridization analysis (Fig. 4B) shows that mutant ACP5 contains, as expected, a 2-kb *PstI* fragment with homology with both the *rhIG* gene and the *Tc^R* cassette (lanes 2 in Fig. 4BI and BII) and that this fragment is not present in the PAO1 genome (lanes 1, Fig. 4BI and BII). Unexpectedly, however, the ACP5 DNA retained hybridization with the 3.2-kb *PstI* *rhIG* homologous band. This result can be explained by the presence of heterogeneity in the chromosomes of strain ACP5, in which

TABLE 2. Production of rhamnolipids and pyocyanine by mutant ACP5 and its parental strain, PAO1

Strain	Concn (%) of ^a :		
	Rhamnolipid	Pyocyanine	PHA
PAO1	150 \pm 15 (100)	0.59 (100)	311 \pm 13 (100)
ACP5	<2	0.24 (40.6)	87 \pm 4 (27.9)
ACP5/pJC3	125 \pm 25 (83.3)	0.60 (101.6)	243 \pm 30 (78)
ACP5/pJC4	146 \pm 10 (97.3)	0.64 (108.4)	305 \pm 5 (98)
PAO R1	<2	<0.05	ND ^b

^a Rhamnolipid concentration is expressed as micrograms of rhamnose in rhamnolipids per milliliter of culture. The concentration of pyocyanine is expressed as the A_{690} of the chloroform-extracted culture supernatant. PHA was measured after 24 h of growth on MM + gluconate and is expressed as milligrams of PHA per milligram of protein.

^b ND, not determined.

not all of the *rhlG* copies contain a Tc^r cassette, or by the presence in the PAO1 chromosome of an *rhlG* homolog (probably *fabG*), which gives a hybridization signal of the same size when DNA is digested with *Pst*I. In order to distinguish between these possibilities, PCR was performed in which *rhlG*-specific oligonucleotides (L2 and R2 in Fig. 2) were used to amplify the PAO1 and ACP5 genomes. We found that the expected 600-bp DNA fragment is amplified from PAO1, while a single 2-kb band is amplified from the ACP5 genome (Fig. 4C, lanes 3 and 4), these results clearly show that all of the *rhlG* gene copies in ACP5 contain a 1.4-kb insert (the Tc^r cassette), so the most likely explanation is that we are detecting an *rhlG* homologous gene by Southern blot hybridization, probably *fabG*.

Effect of the *rhlG* inactivation in *P. aeruginosa* PAO1. Mutant ACP5 does not have a fatty acid auxotrophy, grows at the same rate as its PAO1 parental strain, and does not show any significant change in its total lipid profile. Furthermore, the total lipid profiles of the parent and mutant strains were identical (data not shown). This suggests that there must be a functional FabG protein that is responsible for the synthesis of total cellular lipids and other essential products which contain a fatty acid moiety, such as the lipid A molecule (9).

P. aeruginosa produces different secondary metabolites which contain a lipid moiety, such as the autoinducers PAI-1 and PAI-2, as well as rhamnolipids and PHAs. Therefore, we investigated whether the production of some of these compounds was affected by the cassette insertion in the *rhlG* gene (mutant ACP5). Mutants affected in the production of any of the autoinducers are defective in total protease production (2, 22). We used this phenotype as a criterion to evaluate autoinducer production. It was found that mutant ACP5 has the same proteolytic activity as the PAO1 parental strain (data not shown), suggesting that autoinducer production is not affected. Rhamnolipid production in mutant ACP5 is completely abrogated (Table 2), suggesting that the RhlG protein is involved in the reaction leading to the production of the β -hydroxydecanoyl precursor of rhamnolipids (Fig. 1). In order to obtain direct evidence of the involvement of RhlG protein in rhamnolipid production and to rule out that the phenotype of mutant ACP5 was due to a polar effect of the Tc^r cassette insertion in *rhlG* (and not to an inactivation of this gene), we complemented in *trans* the ACP5 mutant with plasmid pJC3, which contains the PAO1 *rhlG* gene (Table 1). The results obtained (Table 2) clearly show that the presence in *trans* of the *rhlG* gene is sufficient to restore the ACP5 capability to produce rhamnolipids.

It was apparent that mutant ACP5 produces lower levels of pigment than strain PAO1 (Table 2). It has been reported that



FIG. 5. Electron micrographs of the *P. aeruginosa* strains PAO1 (A), ACP5 (B), and ACP5/pJC4 (C) grown for 24 h on MM + gluconate. Some of the PHA granules are pointed out. Micrographs were taken at a $\times 20,000$ magnification.

production of both rhamnolipids and pyocyanine is induced by PAI-2-mediated activation (20), so we measured PAI-2 production by using the *C. violaceum* CV026 biosensor (16). Mutant ACP5 produced PAI-2 autoinducer at levels similar to those produced by PAO1 (data not shown). At present, we do not have a clear explanation for the reduction in pigment formation by mutant ACP5, but both rhamnolipid production and pyocyanine production are restored upon introduction of a functional *rhlG* gene in plasmid pJC3 (Table 2).

P. aeruginosa is known to produce PHA by using fatty acids from the de novo synthesis as precursors (30). The production of total PHA is reduced in mutant ACP5 at 24 h of growth (Table 2), but reaches the same level as PAO1 after 96 h of growth (data not shown). This defect in PHA synthesis can be observed in the electron micrographs taken after 24 h of growth as a decrease in the number and size of granules in mutant ACP5 (Fig. 5). This deficiency is due to *rhlG* inactivation, since plasmid pJC3 restores PHA production (Table 2). These results suggest that RhlG plays a role in biosynthesis of fatty acids used as substrates for PHA production, but that it is not an absolute requirement.

These findings suggested the existence in PAO1 of other reductases involved in PHA production. As mentioned above, RhlG is homologous to PhaB proteins (Fig. 3), so we decided to search in the *Pseudomonas* Genome Project for PhaB homologs. We found that contig 983 contains an ORF coding for a protein with amino acids 30% identical to those of PhaB from *Acinetobacter* sp. strain RA3849 and 26% identical to those of RhlG from *P. aeruginosa* PAO1. It is very likely that the detected PHA synthesis in mutant ACP5 is due to the presence of an alternative pathway in which the reduction step is catalyzed by the putative acetoacetyl-CoA reductase encoded by the PAO1 *phbB* gene. Since this enzyme is expected to be used in polyhydroxybutanoyl synthesis, it would be interesting to determine whether the lengths of the fatty acid moiety of PHAs produced by mutant ACP5 are different from those of the PHAs produced by the wild-type strain, PAO1.

Plasmid pJC4, which contains 7 kb of the W51D chromosome, including the *rhlG* gene (Table 1), complemented in *trans* mutant ACP5 for rhamnolipid and pigment production and PHA synthesis (Table 2 and Fig. 5), suggesting that this gene has the same function in rhamnolipid and PHA synthesis in both *P. aeruginosa* strains.

Regulation of *rhlG* expression in *P. aeruginosa* PAO1. To obtain additional evidence in support of the involvement of the RhlG protein in rhamnolipid and PHA synthesis, the concentration of *rhlG* mRNA was quantified under different culture conditions. The maximum *rhlG* mRNA concentration is found under conditions in which rhamnolipid production is maximum (that is, the stationary phase of growth on PPGAS medium) (Table 3), but there is also considerable expression when bacteria are grown for 48 h on LB or MM + gluconate medium (Table 3). It is important to point out that in the latter medium, PAO1 also produced rhamnolipids (37 µg/ml after 24 h of growth). The level of expression of the *rhlG* gene in the exponential phase of growth was low under all culture conditions studied (Table 3). These results provide additional evidence of the involvement of RhlG in the production of secondary metabolites, such as rhamnolipids and PHA.

The DNA sequence of the *rhlG* promoter region suggested that the *rhlG* gene was regulated at the transcriptional level by one of the two LuxR homologs forming part of the quorum-sensing type of response in *P. aeruginosa*, LasR or RhlR. To obtain additional evidence in this respect, we determined the *rhlG* mRNA concentration of the PAO R1 strain (a PAO1 *lasR* mutant) grown on PPGAS medium. We used this mutant be-

TABLE 3. Relative concentration of *rhlG* mRNA on different media and time of growth^a

Strain	mRNA concn with growth time given ^a					
	PPGAS		LB		MM + gluconate	
	6 h	48 h	6 h	48 h	6 h	48 h
PAO1	45	417	35	209	24	248
PAO R1	— ^b	365	ND ^c	ND	ND	ND

^a mRNA concentration is expressed as the ratio of the RNA hybridization detected by autoradiography scanning to total RNA concentration used in the experiment.

^b —, not detected.

^c ND, not determined.

cause it has been reported to be defective in both quorum-sensing regulatory circuits present in *P. aeruginosa* (12, 24). Table 2 shows that in agreement with these observations, PAO R1 lacks rhamnolipid and pyocyanine production when grown on PPGAS medium for 48 h. Unexpectedly, the level of PAO R1 *rhlG* mRNA concentration after 48 h of growth on PPGAS is only slightly lower than that of the wild-type PAO1 strain (Table 3), thus ruling out the direct involvement of LasR as the transcriptional activator of the *rhlG* gene. It is still possible that the RhlR protein activates *rhlG* transcription, since it has been shown that *rhlR* mRNA is expressed at a significant level in the PAO R1 mutant (24).

This is the first report of the existence in *P. aeruginosa* of a ramification of the fatty acid biosynthetic pathway specifically involved in rhamnolipid production. Figure 1 shows the proposed role of RhlG protein in the rhamnolipid biosynthesis pathway. At present, we do not know whether the RhlG substrate is β-ketoacyl linked to ACP or to CoA. Our model (Fig. 1) shows the substrate to be β-ketoacyl-ACP, because most of the RhlG homologs are FabG-like enzymes (Fig. 3). We propose that CoA-β-hydroxyacids are the precursors of rhamnolipids, since the PHA synthases only use as a substrate the CoA-linked fatty acids (31), and the lipid moiety of rhamnolipids (β-hydroxydecanoyl-β-hydroxydecanoate) seems to be the product of these enzymes.

In summary, a new gene, *rhlG*, involved in rhamnolipid biosynthesis has been identified. The deduced RhlG protein shows significant sequence homology with numerous NADPH-dependent ketoacyl reductases. Complementation studies and measurement of the *rhlG* mRNA suggest that the RhlG protein is required for rhamnolipid biosynthesis and can be used in PHA production, but is not necessary for fatty acid synthesis.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Paul Gaytán, Eugenio López, and Filiberto Sánchez for technical support.

This research was founded in part by the National Institute of Environmental Health Sciences (grant P42 ES04940). Jesús Campos held a CONACYT scholarship during the development of this work.

REFERENCES

- Alexeyev, M. F., I. N. Shokolenko, and T. P. Croughan. 1995. Improved antibiotic resistance gene cassettes and omega elements for *Escherichia coli* vector construction and in vitro deletion/insertion mutagenesis. *Gene* 160: 63–67.
- Brint, J. M., and D. E. Ohman. 1995. Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is under the control of RhlR-RhlI, another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer-responsive LuxR-LuxI family. *J. Bacteriol.* 177:7155–7163.
- Burger, M. M., L. Glaser, and R. M. Burton. 1963. The enzymatic synthesis of rhamnose-containing glycolipids by extracts of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 238:2595–2602.

4. Chandrasekaran, E. V., and J. N. Bemiller. 1980. Constituent analyses of glycosaminoglycans. *Methods Carbohydr. Chem.* 8:89-96.
5. Costerton, J. W. 1980. *Pseudomonas aeruginosa* in nature and disease, p. 15-24. In C. D. Sabath (ed.), *Pseudomonas aeruginosa: the organism, diseases it causes and their treatment*. Hans Huber Publishers, Bern, Switzerland.
6. Cox, C. D. 1986. Role of pyocyanin in the acquisition of iron from transferrin. *Infect. Immun.* 52:263-270.
7. Cronan, J. E., Jr., and C. O. Rock. 1996. Biosynthesis of membrane lipids, p. 612-636. In F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
8. Döring, G., M. Maier, E. Müller, B. Zoubair, B. Tümmler, and A. Kharazmi. 1987. Virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiot. Chemother.* 39:136-148.
9. Dotson, G. D., I. A. Kaltashov, R. J. Cotter, and C. R. H. Raetz. 1998. Expression cloning of a *Pseudomonas* gene encoding a hydroxydecanoyl-acyl carrier protein-dependent UDP-GlcNAc acyltransferase. *J. Bacteriol.* 180:330-337.
10. Folch, J., M. Lees, and G. H. Sloane Stanley. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J. Biol. Chem.* 226:497-509.
11. Fuqua, W. C., S. C. Winans, and E. P. Greenberg. 1996. Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum sensing transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.* 50:727-751.
12. Gambello, M. J., and B. H. Iglewski. 1991. Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa lasR* gene, a transcriptional activator of elastase expression. *J. Bacteriol.* 173:3000-3009.
13. Gervais, F. G., and G. R. Drapeau. 1992. Identification, cloning, and characterization of *rcsF*, a new regulator gene for exopolysaccharide synthesis that suppresses the division mutation *ftsZ84* in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 174:8016-8022.
14. Herman, D. C., Y. Zhang, and R. M. Miller. 1997. Rhamnolipid (biosurfactant) effects on cell aggregation and biodegradation of residual hexadecane under saturated flow conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:3622-3627.
15. Hoang, T. T., and H. P. Schweizer. 1997. Fatty acid biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: cloning and characterization of the *fabAB* operon encoding β -hydroxyacyl-acyl carrier protein dehydratase (FabA) and β -ketoacyl-acyl carrier protein synthase I (FabB). *J. Bacteriol.* 179:5326-5332.
16. McClean, K. H., M. K. Winson, L. Fish, A. Taylor, S. R. Chhabra, M. Camara, M. Daykin, J. H. Lamb, S. Swift, B. W. Bycroft, G. S. A. B. Stewart, and P. Williams. 1997. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of *N*-acylhomoserine lactones. *Microbiology* 143:3703-3711.
17. Miller, R. M. 1995. Biosurfactant-facilitated remediation of metal-contaminated soils. *Environ. Health Perspect.* 103(Suppl.):59-62.
18. Morrison, W. R., and L. M. Smith. 1964. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J. Lipid Res.* 5:600-608.
19. Nicas, T. I., and B. H. Iglewski. 1985. The contribution of exoproducts to virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Can. J. Microbiol.* 31:387-392.
20. Ochsner, U. A., and J. Reiser. 1995. Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:6424-6428.
21. Olsen, R. H., G. DeBusscher, and W. R. McCombie. 1982. Development of broad-host-range vectors and gene banks: self-cloning of the *Pseudomonas aeruginosa* PAO chromosome. *J. Bacteriol.* 150:60-69.
22. Pearson, J. P., K. M. Gray, L. Passador, K. D. Tucker, A. Eberhard, B. H. Iglewski, and P. Greenberg. 1994. Structure of the autoinducer required for the expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:197-201.
23. Pearson, J. P., L. Passador, B. H. Iglewski, and P. Greenberg. 1995. A second *N*-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:1490-1494.
24. Pearson, J. P., E. C. Pesci, and B. H. Iglewski. 1997. Roles of *Pseudomonas aeruginosa las* and *rhl* quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *J. Bacteriol.* 179:5756-5767.
25. Quandt, J., and M. F. Hynes. 1993. Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in Gram-negative bacteria. *Gene* 127:15-21.
26. Römmling, U., J. Wingender, H. Müller, and B. Tümmler. 1994. A major *Pseudomonas aeruginosa* clone common to patients and aquatic habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1734-1738.
27. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
28. Soberón-Chávez, G., A. Haidour, J. L. Ramos, J. Campos, and J. Ortigoza. 1996. Selection and preliminary characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* strain mineralizing some isomers in a branched-chain dodecylbenzene sulfonate mixture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 12:367-362.
29. Stanghellini, M. E., and R. M. Miller. 1997. Biosurfactants: their identity and potential efficiency in the biological control of zoospore plant pathogens. *Plant Dis.* 81:4-12.
30. Timm, A., and A. Steinbüchel. 1990. Formation of polyesters consisting of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoates acids from gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and other fluorescent pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:3360-3367.
31. Timm, A., and A. Steinbüchel. 1992. Cloning and molecular analysis of the poly(3-hydroxyalkanoates acid) gene locus of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Eur. J. Biochem.* 209:15-30.
32. West, S. E. II., and B. H. Iglewski. 1988. Codon usage in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic Acids Res.* 16:9323-9329.
33. West, S. E. II., H. P. Schweizer, C. Dall, A. K. Sample, and L. J. Runyen-Janecky. 1994. Construction of improved *Escherichia coli*-*Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19 and sequence of the region required for their replication in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* 128:81-86.
34. Wild, M., A. D. Caro, R. M. Miller, and G. Soberón-Chavez. 1997. Selection and partial characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* mono-rhamnolipid deficient mutant. *FEMS Microbiol. Lett.* 153:279-285.

13.- DISCUSION Y CONCLUSIONES ADICIONALES DEL ANEXO 1.

Puesto que el análisis de secuencias mostró que el gen *ctrA* no mostraba homología significativa con alguna proteína que pudiera correlacionar su función con el fenotipo de la mutante, se procedió a la caracterización del gen *rhIG* encontrado adjunto a *ctrA*. Al presentarse la inserción del transposón dentro del gen *ctrA* existía la posibilidad de que la transcripción de *rhIG* fuera impedida (Figura 21). Además, los alineamientos realizados para el gen *rhIG* mostraron una similitud significativa con proteínas del tipo ACP-reductasas, involucradas en la síntesis y degradación de ácidos grasos, por lo que se podría correlacionar la función de la proteína RhIG en la asimilación de citronelol vía mecanismos catabólicos similares. Para demostrar esta hipótesis se prosiguió a la interrupción del gen *rhIG* en la cepa silvestre. Mediante PCR se amplificó un fragmento interno del gen *rhIG*, se clonó en un vector suicida y se le insertó un gen reportero, la construcción resultante se usó para obtener dobles recombinantes de la cepa silvestre, a las cuales les fue probado el fenotipo de incapacidad de degradar citronelol como se había hipotetizado. El resultado mostró que las recombinantes no poseían el fenotipo esperado; concluyendo de esta manera que el gen *rhIG* no estaba involucrado con el mecanismo de asimilación de citronelol. Sin embargo debido a la gran similitud con enzimas involucradas en reacciones de síntesis de ácidos grasos y *pha*'s se probó si la mutante en *rhIG* obtenida podría presentar un fenotipo por el cual fuera relacionado a alguno de estos sistemas. Se encontró que la recombinante de la cepa W51D presentaba un fenotipo de disminución en la producción del biosurfactante ramnolípido, aunque la cepa W51D produce niveles muy bajos de ramnolípidos. Esta diferencia fenotípica respecto a la silvestre nos hizo suponer que probablemente la proteína codificada por el gen *rhIG* podría estar involucrada en la síntesis de la porción hidrofóbica del biosurfactante ramnolípido. El hecho de que la cepa W51D produjera cantidades considerablemente menores de ramnolípidos respecto a otras *Pseudomonas aeruginosa*, así como por conocer la mayor parte de la secuencia del genoma de *P. aeruginosa* PAO1, nos motivó a la obtención de la recombinante interrumpida en el gen *rhIG* en la cepa PAO1. En este caso, el resultado fue satisfactorio, ya que la recombinante presentó un claro fenotipo de incapacidad de producción del biosurfactante ramnolípido (Campos-García et al. 1998; Anexo 1).

Las principales aportaciones y conclusiones de la caracterización del gen *rhIG* por un lado representaron hallazgos interesantes de la región secuenciada entre ambas cepas, haciendo notar que el arreglo genético es diferente entre ellas (Figura 21). El arreglo genético en la cepa PAO1 es *rhIG*, *rscF* y *nosR*; mientras que en otra región cromosomal se encuentran los genes *flhA*, *fhfF*, *ctrA* y *rpoF* (*Pseudomonas* sequencing project). A diferencia, en la cepa W51D el arreglo genético es *rhIG*, *rscF* y en antisentido *fhfF*

(truncado), *crtA* y *rpoF*. La diferencia radica esencialmente en la región 5' del gen *rhlG*. En la cepa PAO1 la proteína RhlG mostró una región amino terminal divergente con respecto al producto de la cepa W51D. Aunque en cierta región ambas secuencias proteínicas son altamente homólogas, esencialmente conservando las regiones implicadas en la función de la proteína (sitio conservado en deshidrogenasas y sitio de unión a NAD(P)H) (Anexo 1). De tal manera, existe la posibilidad de que la diferencia entre ambas regiones sea constituida por la divergencia evolutiva entre ambas cepas; esto basado en el hecho característico del género *Pseudomonas*, en el cual su cromosoma se plantea como dos regiones de importancia, una región altamente conservada donde se encuentran los genes "house keeping" y una región variable destinada a la adquisición y transferencia genética, generalmente encontrándose genes relacionados con metabolismo secundario y sistemas degradativos (Holloway, 1996). La caracterización del gen *rhlG* representa el primer reporte en *Pseudomonas aeruginosa* de una ramificación de la vía biosintética de ácidos grasos específicamente involucrada en la síntesis de ramnolípidos por lo que es considerada una aportación relevante (Anexo 1).

***“ En las ciencias abstractas se va de definición en definición;
en las experimentales se camina de observación en observación.
En las primeras se llega a la evidencia y en las últimas, a la certeza”
George-Louis Leclerc***

A N E X O 2

AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY
Journals Department

1325 MASSACHUSETTS AVENUE, N.W.
WASHINGTON, DC 20005-4171
TEL: (202) 737-3600
FAX: (202) 942-9355

Dr. Gloria Soberon-Chavez
Departamento de Microbiologia
Molecular, Instituto de Biotech.
Univ. Autonoma de Mexico
Apdo. Postal 510-3
Cuernavaca, Morelos, KY 62251
MEXICO

18 September 1998
Received: 09/16/98
Article: AEM 1359-98

Title: Branched-Chain Dodecylbenzene Sulfonate Degradation Pathway of *Pseudomonas aeruginosa* W51D Involves a Novel Route for Degradation of the Surfactant Lateral Alkyl Chain

The above manuscript has been received. It is being referred to Dr. Caroline S. Harwood, Department of Microbiology, 3-450 Bowen Science Building, University of Iowa, Iowa City, IA 52242-1109 (phone (319) 335-7253, fax (319) 335-7679), who will notify you as to its acceptability or suggestions for improvement. In any communications relating to this paper, please refer to the article number shown above.

In submitting this manuscript to *Applied and Environmental Microbiology*, the author(s) guarantees that a manuscript with substantially the same content has not been submitted or published elsewhere.

By publishing in the journal, the authors agree that any plasmids, viruses, and living materials such as microbial strains and cell lines newly described in the article are available from a national collection or will be made available in a timely fashion and at reasonable cost to members of the scientific community for noncommercial purposes.

If "in press" references cited in the submitted manuscript are important for it to be judged, send three copies of each to Dr. Harwood immediately. Failure to do so may delay the review.

If your manuscript is accepted for publication, a condition of acceptance is that you assign copyright to the American Society for Microbiology. A copyright transfer agreement is sent with each letter of acceptance.

If the manuscript is accepted, page charges (subject to change without notice) will be assessed at \$40 per page for the first five pages and \$56 for each page in excess of five. If the research was not supported, you may send a request for a waiver of page charges to the Director, Journals, immediately after receipt of this letter. This request must indicate how the work was financed and should be accompanied by a copy of the Acknowledgments section of the paper.

Thank you for submitting your manuscript for consideration.

John N. Bell
Production Editor
Applied and Environmental Microbiology

cc: All authors

Branched-chain Dodecylbenzene Sulfonate Degradation Pathway of *Pseudomonas aeruginosa* W51D Involves a Novel Route for Degradation of the Surfactant Lateral Alkyl Chain.

Jesús Campos-García¹, Abraham Esteve², Juan Luis Ramos², and Gloria Soberón-Chávez^{1*}.

Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Mor. 62251, México¹. Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Profesor Albareda 1, Granada 18008, España²

*Corresponding author. Mailing address: Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, UNAM. Apdo Postal 510-3, Cuernavaca Morelos 62251, México. Phone : (52) (73) 291634. Fax: (52) (73) 172388. E-mail: gloria@ibt.unam.mx

Branched-chain dodecylbenzene sulfonates (B-DBS) are a series of recalcitrant compounds used as surfactant in some domestic detergents. *Pseudomonas aeruginosa* W51D is able to degrade these compounds even when they are present at relatively high concentrations. As a model compound to study the degradation of the B-DBS branched lateral alkyl chain we used the ramified alkene citronellol (3,7-dimethyl-6-octen-1-ol). Citronellol is used by strain W51D as the sole carbon source upon oxidation to citronellal, citronellic acid and finally converted to geranic acid which is further catabolized to central metabolites. A mini-*Tn5*-Hg mutant derivative of *P. aeruginosa* W51D (W51M1) was isolated as unable to degrade citronellol. Enzymatic determinations showed that mutant W51M1 lacked the citronellal dehydrogenase activity. The mini-*Tn5*-Hg insertion in W51M1 genome was located at the *ctrA* gene which, according with the results shown here, encodes for the citronellal dehydrogenase. Mutant W51M1 exhibited a reduced capacity to utilize B-DBS as carbon source, which suggests that the citronellol pathway is only one of the degradation routes, but not the only one involved, in the degradation of the surfactant alkyl lateral chain. To further learn about the degradation of the B-DBS branched lateral chain we purified from W51D culture supernatants by HPLC the aromatic compounds produced by the surfactant degradation, and determine their structure by gas chromatography and mass spectroscopy. We thus identified 4-hydroxyphenylpropionate and 4-hydroxybenzoate and show that both compounds are used as carbon sources by strain W51D. Thus, both compounds are likely to be B-DBS catabolic intermediates. To explain their production from B-DBS we propose that strain W51D exhibits a β -oxidation pathway that is able to remove two carbon units from the main hydrocarbon chain together with a methyl ramification. The two latter aromatic compounds seem to be oxidized to produce protocatechuate, which is finally metabolized to central metabolites.

INTRODUCTION

Alkylbenzene-sulfonates are the most commonly used surfactants in domestic detergent formulations (10). In the U. S. A. and the European countries linear alkylbenzene-sulfonates (LAS) have been used since the early sixties, when the branched chain alkylbenzene-sulfonates (BAS) were recognized as recalcitrant compounds (2, 3, 4, 10). In some Latin American countries BAS are currently used in different detergent formulations due to their lower costs. Water pollution by BAS is a significant environmental problem in these countries.

We have previously reported the selection of a *Pseudomonas aeruginosa* strain (W51D) which is able to mineralize at least 70% of a BAS commercial mixture and is resistant to high concentrations of these surfactants (20). *P. aeruginosa* W51D is the only reported bacterium able to mineralize BAS at a significant rate. A nutritionally versatile LAS-degrading *Pseudomonas*, strain C12B, barely

degrades BAS (3, 14, 23).

LAS are completely degraded in waste water treatment plants. In their mineralization different organisms participate, each degrading a part of the molecule. A four member consortium was identified as responsible in one study (11), and a larger consortium was found to be involved in mineralization in a marine environment (19). In these consortia, some members attacked the side chain while others degraded the aromatic moiety. No consortium able to degrade BAS has been described.

The biological recalcitrance of BAS is due to the presence of highly branched alkyl groups (2, 22). Branched alkanes are generally less susceptible to biodegradation than are n-alkanes and certain methyl branched alkanes. Specially 3-methyl-branched and quaternary substituted alkyl chains can result in environmental recalcitrance (2, 8, 15, 16, 18, 22). Some *Pseudomonas* strains degrade branched alkanes and alkenes, like 3,7-dimethyl-6-octen-1-ol (citronellol). This compound has been used as a model to study the route of

degradation of branched alkenes (8, 16, 18). The genes encoding the enzymes participating in this pathway have not been reported. We have previously reported that *P. aeruginosa* W51D is able to use citronellol as the sole carbon source (20). Here we report the cloning and sequencing of the W51D gene encoding the enzyme citronellal dehydrogenase (*ctrA*).

The aim of this work was to determine the B-DBS degradation pathway of *P. aeruginosa* W51D evaluating the contribution to this pathway of the reported route for citronellol degradation. The direct identification of the degradation intermediates by mass spectroscopy and the quantification of the B-DBS degradation ability of a mutant unable to use citronellol as carbon source led us to the proposition of a B-DBS catabolic pathway. Our results show that strain W51D posses a novel capability to degrade the B-DBS lateral chain, and that the enzymes involved in citronellol degradation are only one of the pathways involved, yielding 3,4-hydroxybenzoic acid.

MATERIALS AND METHODS

Microbiological methods. Strains and plasmids used in this work are shown in Table 1. *P. aeruginosa* W51D was grown at 30°C on modified M9 minimal medium (1) supplemented with one of the following carbon sources: branched chain dodecylbenzene-sulfonate (B-DBS) 0.2% (wt/vol); glucose 0.2% (wt/vol); phenylacetate 3 mM; cinnamic acid 5 mM; 4-hydroxyphenylpropionate 5 mM. HgCl₂ was used at a concentration of 12 µg/ml. Antibiotic concentrations in µg/ml, used for *P. aeruginosa* strains PAO1 and W51D, respectively, were: carbenicillin (Cb) 250 and 50 and tetracycline (Tc) 150 and 50.

Microaerophilic conditions were achieved by incubating 15 ml of inoculated medium in a 125 ml Erlenmeyer flask without agitation. These conditions were necessary to grow W51D strain on B-DBS, because shaking of these cultures arrested the growth of cells.

Matings were performed mixing a 1:1 proportion donor:recipient strains and incubating them overnight at 30°C onto agar LB medium. Appropriate dilutions were made on selective media in order to isolate transconjugants. Controls were not-mixed donor and recipient strains treated identically to the mixture.

Respiration rate determination was done with cells grown on M9 medium supplemented with B-DBS for 48 or 72 h. The cells were washed twice with 100 mM Tris-HCl buffer pH 7.2 and resuspended in 10 ml of the same buffer. The cell suspension was agitated at a constant rate, setting the electrode at an O₂ initial concentration of 220 µM. A class II-tyr electrode to measure oxygen from Hansatech Instrument LTD Type: CBI-D2, Kings Lynn England, was used. The compound to be tested as substrate was added at a final concentration of 5 mM.

TABLE 1. *Pseudomonas aeruginosa* strains and plasmids used in this study

Strain or Plasmid	Relevant characteristics*	Reference
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> :		
W51D	Strain able to degrade surfactants	20
W51M1	W51D <i>ctrA</i> ::mini- <i>Tn5</i> -Hg mutant	This work
PAO1	Wild type strain	Holloway
Plasmids:		
pUT mini- <i>Tn5</i> -Hg	Suicide vector for mutagenesis with mini- <i>Tn5</i> -Hg unable to replicate in <i>P. aeruginosa</i> , Hgr.	7
pKOK4	pBR325 derived mob ⁺ plasmid, Tcr, Apr, Cmr.	13
pJC5	pKOK4 plasmid with <i>ctrA</i> gene interrupted with mini- <i>Tn5</i> -Hg	This work
pCPI3	RK2 derived cosmid vector, Tcr	6
pJC6	Cosmid containing 20 kb of W51D DNA, with the <i>ctrA</i> , and <i>rhlG</i> genes, Tcr	This work

* Abbreviations used: Resistance to: ampicillin (Apr) chloramphenicol (Cmr), mercury (Hgr) and tetracycline (Tcr).

Analytical methods. The culture supernatant of strain W51D grown for 24 h on B-DBS or on an identified degradation intermediate (such as 4-hydroxyphenylpropionic acid) was obtained by centrifugation of the cultures and was used to analyze the degradation intermediates as follows:

High performance liquid chromatography (HPLC) was used to quantify the B-DBS degradation and to separate the degradation intermediates which were later analyzed by gas chromatography and mass spectroscopy (GC-MS). Fifty microliters of the supernatant were injected on a reverse phase Nova-Pak C18 3.9 x 150 mm. column (WATERS), the elution program was the following: A::B 80::20 (A=CH₃COOH 1%, acetonitrile [ACN] 5%, H₂O 94%; B=ACN 100%) for 3 min, followed by a linear gradient till reaching in 6 min A::B 0::100. The column was recovered for 3 min to the starting solution. The flux used was 1 ml/min and the elution was monitored at 254 nm with a Hewlett Packard 1050 diode array UV detector.

GC-MS was used to identify some of the B-DBS degradation intermediates. A 48 or 72 h culture supernatant of cells grown on B-DBS was acidified with HCl to pH 3 to eliminate the extracellular matrix of the biofilm formed in this condition. The acidified supernatant was centrifuged, the supernatant was extracted three times with ethyl acetate, the organic fraction was concentrated by evaporation and the extracted product was dried with N₂. The dried product was resuspended in methanol at a final concentration of 1 mg/ml. This sample was silylated with ClSi(CH₃)₃ (SIGMA) according to the manufacturers instructions. 1 µl of the silylated sample was injected in a gas chromatograph coupled with a mass spectroscopy selective detector (Hewlett Packard HP6890 GC-MS system).

Enzymatic assays. The enzymes citronellol dehydrogenase and citronellal dehydrogenase were measured by specific NADH production, by the absorbance at 340

nm, of the supernatant of the cell extract centrifugation at 40,000 g.

B-DBS purification. The commercial BAS mixture used as source of B-DBS was obtained from a Mexican detergent manufacturer. It was prepared by mixing 1-propene with benzene-sulfonate in the presence of hydrofluoric acid, at appropriate stoichiometric proportions. The reaction yields a BAS mixture with a high proportion of B-DBS, which eluted as a single peak in HPLC on a semipreparative (250 x 22 mm) ECONOSIL C18 column (Alltech, Ass. Inc.) using the following procedure: starting with 60:40 H₂O:ACN for 10 min and followed by a linear gradient reaching pure ACN in 5 min and keeping this solvent for an additional 2 min. The flux used was 5 ml/min and the elution profile was monitored as described above. The peak corresponding to B-DBS was identified by foam formation. The mass-spectroscopic analysis of the peak eluted from HPLC confirmed that it corresponded to B-DBS (Fig. 1).

Nucleic acid procedures. DNA isolation, cloning and sequencing, Southern blotting and nick translation procedures were carried out as described previously (17). The sequencing reactions were done using *Taq* DNA polymerase and fluorescent dideoxy terminators in a cycle sequencing method; the resultant DNA fragments were separated by electrophoresis and analyzed using an automated Applied Biosystems 377 DNA sequencer.

Total DNA library construction. Total genomic DNA from *P. aeruginosa* W51D was partially digested with *Sau*3A and ligated to cosmid pCP13 (6) digested with *Bam*H1 endonuclease. Cosmids were packaged onto λ heads and transfected as described previously (17). About 5000 clones were obtained, which represent at least 10 times the size of the bacterial genome.

Computer analysis of the DNA and protein sequences. Computer analysis of the sequences were carried out by using GENE WORKS program (IntelliGenetics, Inc.) and the University of Wisconsin Genetics Computer Group (UWGCG) programs. The sequence of the *P. aeruginosa* PAO1 contigs were obtained from the web site "*Pseudomonas* Genome Project" (<http://www.pseudomonas.com>).

Nucleotide sequence accession number. The nucleotide sequence of the *P. aeruginosa* W51D *ctrA* gene encoding for the enzyme citronellol dehydrogenase which is reported here, has been deposited in the GenBank database under accession number AF052586.

RESULTS AND DISCUSSION

B-DBS structure. To study the *P. aeruginosa* W51D pathway for the degradation of branched-chain dodecylbenzene sulfonate (B-DBS), this compound was purified by HPLC from a commercial mixture of branched-

chain alkylbenzene-sulfonates (BAS). The mass spectroscopic (MS) analysis of the purified B-DBS was compatible with the two isomers shown in Figure 1. The gas chromatography (GC) and MS analysis of the detected B-DBS degradation intermediates shown below did not give light on which of the isomer is primary used by strain W51D, but it is clear that whatever the molecule degraded, this strain is able to catabolize the surfactant lateral chain containing at least two methyl ramifications.

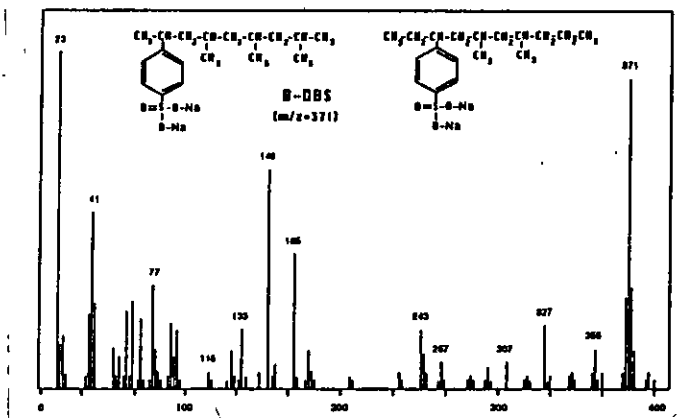


Figure 1. MS spectra of the purified B-DBS, the two possible structures of the molecule are shown.

Isolation and characterization of a W51D mutant (W51M1) unable to degrade citronellol. *P. aeruginosa* W51D is able to degrade the branched alkene 3,7-dimethyl-6-octen-1-ol (citronellol), which has been used as a model to study the route of degradation of branched alkyl chains (8, 15, 16). To determine if the citronellol catabolic pathway was responsible for the degradation of the B-DBS lateral chain, a mutant unable to grow in this compound (W51M1) was isolated after mini-*Tn5*-Hg transposon (7) mutagenesis. Mutant W51M1 seems to be the product of a single transposon insertion. This conclusion is drawn from the analysis by Southern blot hybridization and PCR amplification as shown in Figure 2.

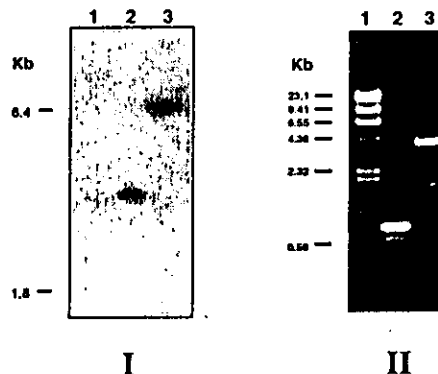


Figure 2. Characterization of mutant W51M1. Panel I) Southern blot analysis of wild type strain W51D and mutant W51M1 using plasmid pUT mini-*Tn5*-Hg as probe. Lanes correspond to: 1) W51D total DNA

digested with *Pst*I endonuclease, 2) W51M1 total DNA digested with *Pst*I endonuclease, and 3) plasmid pUT mini-*Tn*5-Hg digested with *Eco*RI enzyme. Panel II) PCR products amplified with the L1 and R1 oligonucleotides internal to the *ctrA* gene (shown in Figure 4). Lanes correspond to: 1) phage λ DNA digested with *Hind*III enzyme, 2) PCR product using as template the W51D total DNA, and 3) PCR product using as template the W51M1 total DNA. The migration of different DNA size standards in kb is shown.

Mutant W51M1 is unable to use citronellal as well as citronellol as carbon source, but can grow with citronellic and geranic acids as substrates (Table 2). These growth characteristics suggested that strain W51M1 was deficient in the conversion of citronellal to citronellic acid, catalyzed by the enzyme citronellal dehydrogenase, according to the proposed route of citronellol degradation (19). To obtain additional evidence in this respect, the accumulation of the citronellol degradation intermediates were identified by GC-MS analysis (Fig. 3) from the cultures supernatants of strain W51M1 grown for 72 h on M9 + glucose + citronellol, compared to that of the wild type W51D strain. According to our hypothesis, citronellal is much more accumulated in mutant W51M1 than in the wild type strain W51D (Table 3). To further confirm that mutant W51M1 was deficient in the enzyme citronellal dehydrogenase, the activity of this enzyme and that of the citronellol dehydrogenase were determined. As expected, mutant W51M1 has a much lower citronellal dehydrogenase activity than strain W51D, while the citronellol dehydrogenase activities are similar (Table 4). It is interesting that the activities of both the citronellol and citronellal dehydrogenases of strain W51D are induced in the presence of citronellol (Table 4).

TABLE 2. Growth characteristics of strain W51D and mutant W51M1 on M9 medium supplemented with different substrates^a.

Strain	citrol	citral	citrllic ac.	geran ac	B-DBS
W51D	+++	+++	+++	+++	++
W51M1	-	-	++	++	+
W51M1/pJC6	+++	ND	ND	ND	++

^aAbbreviations used are: citrol: citronellol; citral: citronellal; citrllic ac: citronellic acid; geran ac: geranic acid; B-DBS: branched-chain dodecylbenzene sulfonate. The number of + represent the qualitative determination of the amount of biomass produced on each medium, - means no growth detected. ND means not determined.

TABLE 3. Accumulation of compounds in culture supernatants of cells grown for 72 h on medium M9 + glucose + citronellol^a.

Strain	citronellol	citronellal	geranic acid
W51D	25.8	62.4	> 1
W51M1	5.3	92.9	ND

^aThe accumulation is expressed as the % of the area of the peak corresponding to each compound with respect to the addition of the area of all the compounds detected in the gas chromatographic profile. ND means not determined.

TABLE 4. Enzymatic activity of citronellol dehydrogenase and citronellal dehydrogenase of *P. aeruginosa* strains grown on different media^a.

Strain	citronellol dehy ^a		citronellal dehy ^a	
	LB	M9 + citronellol	LB	M9 + citronellol
W51D	0.144	0.128	0.42	0.33
W51M1	0.102	0.012	NA	NA

^aAbbreviations used: citrol dehy for citronellol dehydrogenase, and citral dehy for citronellal dehydrogenase. The enzymatic activity is expressed as NADH produced (absorbance at 340 nm)/min./mg of protein. Cells used for enzymatic determination were harvested at the early-stationary stage of growth. NA means not analyzed, since mutant W51M1 is not able to grow on M9 + citronellol.

Even though mutant W51M1 is unable to use citronellol as carbon source it is still able to grow with B-DBS, albeit to a lesser extent (Table 2). The amount of B-DBS degradation by mutant W51M1 on M9 + glucose + B-DBS is reduced by 40 % compared to that of the wild type strain W51D, as judged by the HPLC analysis of culture supernatants (data not shown). These results show that the enzymes involved in citronellol degradation are involved in B-DBS degradation, but that this catabolic pathway is not the main route involved in B-DBS degradation by strain W51D.

We determined that the wild type strain PAO1 is able to grow with citronellol as the sole source of carbon, but is unable to degrade B-DBS. These results suggest that the capability of strain W51D to degrade B-DBS is mainly due to the presence of a route of degradation of the B-DBS lateral chain different from the citronellol pathway, which is not present in strain PAO1.

Nucleotide sequence of the *P. aeruginosa ctrA* gene coding for citronellal dehydrogenase. To determine the nucleotide sequence of the *ctrA* gene encoding the W51D citronellal dehydrogenase, the DNA sequences flanking the mini-*Tn*5-Hg transposon insertion in strain W51M1 were cloned, rendering plasmid pJC5. The nucleotide sequence showed an open reading frame with the characteristic codon usage and bias of its GC composition in the third position of each codon, of the *Pseudomonas* genes (26) which was named *ctrA*. This gene showed no overall homology with genes present in the GenBank data base, but the deduced amino acid sequence of the CtrA protein presented all the amino acid residues which are known to be involved in NADH binding and in dehydrogenase catalysis (Fig. 4).

The analysis of the 5' *ctrA* regulatory region revealed the presence of a putative σ^{54} promoter, but we detected no sequence resembling an "upstream activator sequence" (UAS) TGTN₁₀ACA, which is known to be recognized by the NtrC family of transcriptional activators that activate transcription at a distance of more than 100 base pairs from

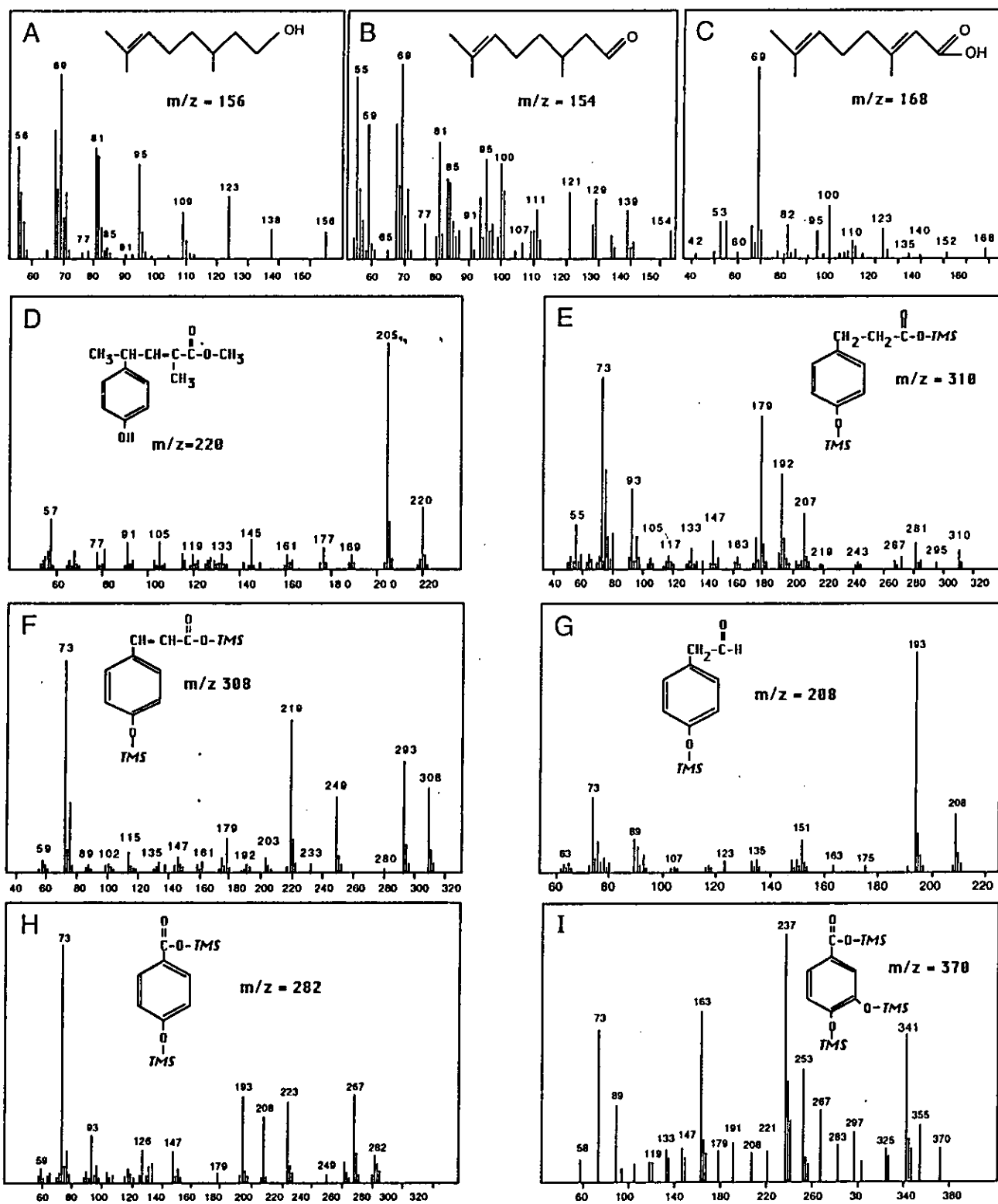


Figure 3. Identification by GC-MS of some of the B-DBS and citronellol degradation intermediates. The structure of the identified compound is shown. TMS stands for the $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ moiety.

A

CAGCCAGCATCTACCGGTAGCCCTATCTGGCTGATGGGCGAAGATCCCGGAGGACCTGCAITGTGGCACGGCGGCAACCAGCTGGTCAGCCCGCGGTGAGC 100
 L1
 CTGCAGTGGCCCGAAGAGCCCTTGGAGGACGCCATGGCGGACATGTTGCCCGGCTTTACCAACAGCCGGTGGGTGGCGCCAGCTGAAGATTGTGAGGCC 200
 -24 σ^{34} -12 LUX BOX
 GGTGTTGGGGGCTGGGTGGCCCGGTGTGAGGCCACCCAGCGATGGGATGCTCTGCAAGACGATCCCGGAGCGCGGAGCGGCTAGAGCACTGCAGCCCGGATT 300
 AGCCGAAAGCCCGATCGGTGACCGTGAACGACGAGACAAGGTATGTGATATGGTATGCAITCCCGTTCAGGTAATCCGAGTCAACCGCGCAAGCCCTGGC 400
 SD M R D G R T T R Q G I D M G M H P V Q V I A V T G **G** **K** **G** **G**
 GTGGCAAGACCAACCTGTGGTGAACCTGTGCTGGGCTGGCCGATCTGGCCGCGCGGTCATGCTGCTGGACGCGGACCTGGGCTGGCCAACTGG 500
 V **G** **K** T N **V** S V N L S L **A** L A D L G R R V M L L D A D L G L A N V D
 AGGTGCTGCTGGGCTGTGGCCCAAGCCACGCTGGCCGAGTCAAGGCAATGGCACTGGCGTGAAGTGTCTCCAGGGGCTGGCCGACATTGG 600
 V L L G L S P K R T L A D V I E G E C D L R D V I L Q G P G G I R
 CATCGTTCGGGCGGCTGGGCAACCAGAGCATGGTGCACCTCAGCGCGATGCAAGCAAGCCCGACTGATCCAGGGGTTTCAGCGACATCAGCGACAACATC 700
 I V P A A S G T Q S M V H_n L T P M Q H A G L I Q A F S D I S D N I
 GATGTTGGTGGTGACACCCCGCCCGCATGGGCGACTGGTGGTGGAGCTTGGTCCGTGCCCGCCAGGAAGTGTGCTGGTGGTGTGTGATGAACCCA 800
 D V L V V D T A A G I G D S V V S F V R A A Q E V L L V V C D E P T
 R1
 CTGCCATCACCGATGCTTACGCTTTGATCAAGCTGCTCAACCGCCACTACGGCATGACCGGTTTCCCGGTGCTGGCGAACATGGCTCAGAGCCCTCAGGA 900
 S I T D A **Y** A L I **K** L L N R H Y G M T R F R V L A N M A H S P Q E
 GGGCCGCAACTGTGTGGCAAGCTGACCAAGGTCAACGACCCCTTCCCTGGATGTGGGCGTGCAGTACGTGGGCGGATTCCTTACGACAGGATGGTGGCC 1000
 G R N L F A K L T K V T D R F L D V A L Q Y V G A I P Y D E S V R
 AAGGCGGTGAGCAAGCAGCGTTGGTGTATCAGCGGTTCGGCGCAGCAAGGCTTCCCTGGCTTCCGTGGGTGGGCGAGAAGGTGACAGCTGGCCGC 1100
 K A V Q K Q R S V Y E A P P R S K A S L A F R A V A Q K V D S W P L
 TGCCCGCCAAACCAAGGGGACCTGGAGTCTTTCGTGGAGCGGCTGGTGCACATCCCAACCGGTTCCCGGATGACCGCGGCTCCGGAGCCCGTATG 1200
 P A N P R G H L E F F V E R L V Q H P T G S A V
 TACAGCAAGGCACAGCGCCACAACCTCCCGGAATTGCTGATCCAGAAACAGCCCGGCTGGTGAAGCGCATCGCTACCACCTGCTGGCCCGGCTGCCCG 1300

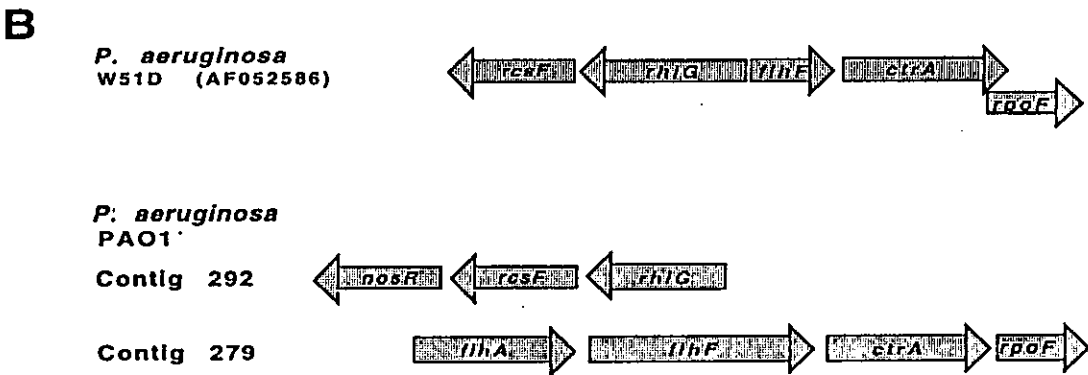


Figure 4. A) Nucleotide sequence of W51D *ctrA* gene and its regulatory sequences. The sequence and position of the oligonucleotides used during this work are shown in the figure and identified as L1 and R1 depending on their polarity (L1 oligonucleotide amplify the sequence from 5' to 3' and R1 has the opposite polarity). A putative σ^{34} promoter is shown. The sequence corresponding to the "lux box" is underlined with two lines. The triangle shows the site of the mini-*Tn5*-Hg insertion in mutant W51M1. SD means the ribosome binding site sequence for mRNA translation. The sequences corresponding to putative transcriptional termination sites (term) are marked by a dotted line. The sequence of the CtrA protein deduced from the DNA sequence is shown, the residues which form the NADPH binding signature are shown within a square, and the amino acids conserved in dehydrogenases are circled. B) Schematic representation of the chromosomal arrangement of *ctrA* and *rhIG* genes and adjacent sequences in the W51D and PAO1 genomes.

σ^{54} promoters, and to be indispensable for transcription of these promoters (25). It is interesting that we detected a sequence showing overall homology to "lux boxes" (9), where transcriptional regulators of the family of LuxR regulators are bound to activate transcription. The functionality of these regulatory sequences remains to be determined.

We identified the PAO1 *ctrA* gene as part of contig 279 of the "Pseudomonas genome project", coding for a protein 91% identical to CtrA of strain W51D. The presence of the *ctrA* gene in PAO1 genome is in accordance with the ability of this strain to degrade citronellol.

Cosmid pJC6 (Table 1), which contains 20 kb of *P. aeruginosa* W51D genome including the *ctrA* gene, complements mutant W51M1 for growth on citronellol and B-DBS as sole sources of carbon (Table 2). We have recently reported the characterization of the *rhlG* gene involved in rhamnolipid production (5) which is closely linked to *ctrA* (Fig. 4). It is interesting to point out that the *rhlG* and *ctrA* genes are not linked in PAO1 chromosome (Fig 4). The fact that two bacterial isolates belonging to the same species and sharing a high degree of DNA sequence homology present a different genomic structure is striking. The significance of this genetic divergence is not clear to us.

Analysis of the W51D pathway for B-DBS degradation. To obtain some information on the W51D route for B-DBS degradation, which is independent of the citronellol pathway, we determined the structure of the degradation intermediates purified by HPLC from culture supernatants of W51D cells grown on M9 + B-DBS using GC-MS analysis. Figure 3 shows the MS data and the deduced structure of some of the compounds thus identified. In some cases after the identification of a degradation intermediate, this molecule was used as carbon source to further identify other intermediates. This was the case of phenylacetate and 4-hydroxyphenylpropionate.

The compounds identified led us to propose the route shown in Figure 5 for one of the B-DBS isomers detected, but both B-DBS molecules could be degraded by the proposed pathway. The first step in the B-DBS degradation is the desulfonation of the benzene ring and its concomitant hydroxylation. This proposition was made based on the finding that all the degradation intermediates detected were hydroxylated derivatives, and no sulfonated molecules were found. Desulfonation with the concomitant hydroxylation of the aromatic ring is the first step in LAS degradation by different bacteria (12)

The GC-MS analysis of the culture supernatants of W51D cells grown on M9 + B-DBS, showed the production of 4-hydroxy phenylpropionate, 4-hydroxybenzoate (Fig. 3 E and H), and 3,4-dihydroxybenzoate. The identification of these compounds as B-DBS degradation intermediates, shows that strain W51D catabolizes the B-DBS lateral

chain, despite the methyl ramifications, prior to the aromatic ring cleavage. We determined that strain W51D is unable to use isophenylpropionate as carbon source, while readily degrades the linear isomer, thus we include the linear 4-hydroxyphenylpropionate as the B-DBS degradation intermediate (Fig. 5).

To explain how strain W51D degrades the B-DBS lateral chain yielding 4-hydroxyphenylpropionate, independently from the citronellol pathway, we propose the presence in strain W51D of a modified β -oxidation degradation of the surfactant lateral chain that removes two carbons from the main alkyl chain together with a methyl-branching (Fig. 5). The existence of this pathway is further supported by the detection by GC-MS of branched-chain 4-hydroxyphenylhexanoate (Fig. 3 D, shows the methyl-ester derivative of this compound produced by the conditions of extraction of the sample that was not silylated), which has three carbon atoms removed from the branched-chain 4-hydroxyphenyl nonanoate, which is the expected previous degradation intermediate (Fig. 5). The proposition that strain W51D has the ability to degrade methyl-branched alkanes removing two carbons from the main hydrocarbon chain together with a methyl ramification remains to be experimentally validated. There is a single previous report suggesting the existence in a unclassified gram-positive bacterium of the modified β -oxidation pathway proposed by us (15), but the only pathway characterized so far for the degradation of branched alkanes is the citronellol pathway. Therefore, whatever route for the degradation of B-DBS is used by strain W51D, its characterization will reveal a novel catabolic pathway.

The proposed route of W51D degradation of 4-hydroxyphenylpropionate (Fig. 5), was elucidated using this compound as carbon source and identifying the intermediates by GC-MS (Fig. 3). We found that the propionate moiety of this molecule is completely oxidized and degraded to 4-hydroxybenzoate, prior to the aromatic ring cleavage.

It has been reported that cinnamic acid is accumulated as a non-metabolized by-product of the degradation of long-chain alkyl-benzenes (22). We determined that *P. aeruginosa* W51D is able to metabolize cinnamic acid to certain extent when bacteria are cultured on M9 + glucose + cinnamic acid, and that it might be an intermediate in B-DBS degradation (Fig. 5). The oxidation of cinnamic acid lateral chain by W51D, as judged by the detected degradation intermediates of cells grown on M9 + glucose + cinnamic acid, is similar to that of styrene lateral chain oxidation by *Pseudomonas* sp. strain Y2 (24).

We have identified 4-hydroxybenzoate as a B-DBS degradation intermediate. To obtain additional information about the position of the hydroxyl-moieties in the last B-DBS aromatic intermediate, we measured the W51D respiration rate using different hydroxylated aromatic

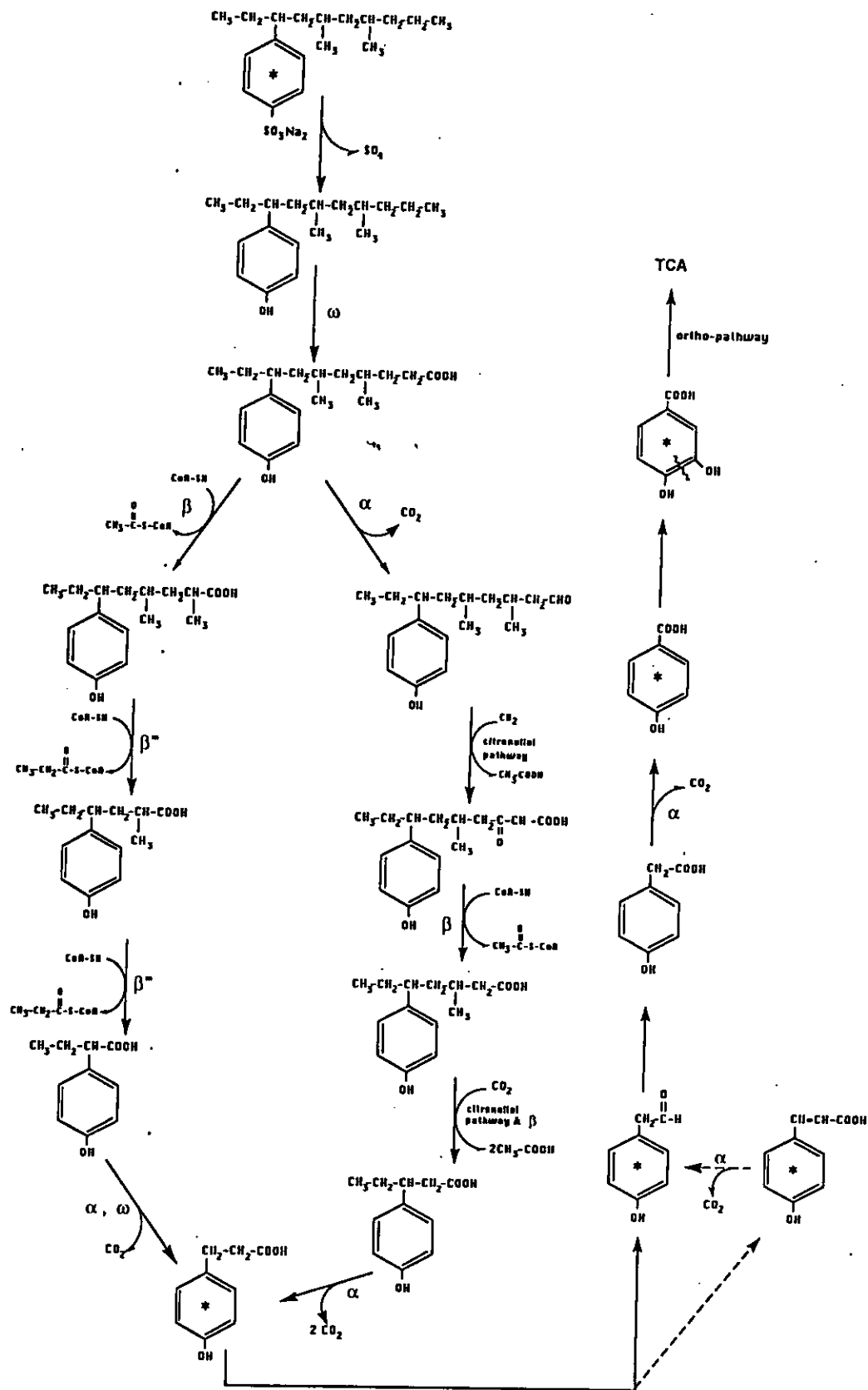


Figure 5. Deduced B-DBS degradation pathway. The compounds showing an * were directly detected in culture supernatants by GC-MS.

compounds (Table 5), and concluded that 3,4 dihydroxybenzoate seems to be the substrate for the oxygenase which cleaves the aromatic ring.

TABLE 5. *P. aeruginosa* W51D oxygen consumption using different compounds as substrates^a.

Substrate	Basal (BOC) ^a	Total (TOC) ^a	TOC/BOC
4-hydroxybenzylaldehyde	242	528	2.1
3-hydroxybenzoate	175	532	3.0
2,4 di-hydroxybenzoate	266	363	1.3
3,4 di-hydroxybenzoate	236	417	1.7
4-hydroxyphenylacetate	254	436	1.7
3,4 di-hydroxyphenylacetate	174	290	1.6
2-hydroxybenzoate	163	163	1.0
2,5-di-hydroxybenzoate	263	263	1.0

^aOxygen consumption is expressed in $\mu\text{M}/\text{mg}$ of protein per hour at 30°C. BOC represent basal oxygen consumption and TOC is the total oxygen consumed.

Thus we conclude that strain W51D presents a novel catabolic capability to metabolize the surfactant branched-chain dodecylbenzene sulfonate. We hypothesize the existence in strain W51D of a modified β -oxidation degradation of the hydrocarbon lateral chain which removes three carbons at each step. The complete elucidation of the novel catabolic pathway present in strain W51D is a matter of great importance which remains to be further analyzed.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Rafael Vásquez-Duhalt for his encouraging discussions. The part of this research done in Spain was founded in part by BIO-CT97-0641. Jesús Campos-García held a CONACyT scholarship during the development of this work and received support from: "Programa de Apoyo al Posgrado PADEP" (UACPyP/UNAM) project number 030506.

REFERENCES

- 1-Abril, M.-A., C. Michán, K. N. Timmis, and J. L. Ramos. 1989. Regulator and enzyme specificities of the TOL plasmid-encoded upper pathway for degradation of aromatic hydrocarbons and expansion of the substrate range of the pathway. *J. Bacteriol.* 171: 6782-6790.
- 2-Alexander, M. 1973. Nonbiodegradable and other recalcitrant molecules. *Biotechnol. Bioeng.* 15: 611-647.
- 3-Cain, R. B. 1987. Biodegradation of anionic surfactants. *Biochem. Soc. Trans.* 15 (suppl): 7-22.
- 4-Cain, R. B. 1994. Biodegradation of detergents. *Curr. Opin. Biotechnol.* 5: 266-274.
- 5-Campos-García, J., A. D. Caro, R. Nájera, R. M. Miller-Maier, R. A. Al-Tahhan, and Gloria Soberón-Chávez. 1998. The *Pseudomonas aeruginosa* *rhlG* gene encodes a NADPH-dependent β -ketoacyl reductase which is specifically involved in rhamnolipid synthesis. *J. Bacteriol.* 180: 4442-4451.
- 6-Darzens, A., and A. M. Chakrabarty. 1984. Cloning of genes controlling alginate biosynthesis from a mucoid cystic fibrosis isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 159: 9-18.
- 7-de Lorenzo, V., and K. N. Timmis. 1994. Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with *Tn5*- and *Tn10*-derived minitransposons. *Methods Enzymol.* 235: 386-405.
- 8-Fall, R. R., J. L. Brown, and T. L. Schaeffer. 1979. Enzyme recruitment allows the biodegradation of recalcitrant branched hydrocarbons by *Pseudomonas citronellolis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 38: 715-722.
- 9-Fuqua, W. C., S. C. Winans, E. P. Greenberg. 1996. Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum sensing transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.* 50: 727-751.
- 10-Greek, B. F. 1991. Sales of detergents growing despite recession. *Chem. Eng. News* 69: 25-52.
- 11-Jiménez, L., A. Breen, N. Thomas, T. W. Federle, and G. S. Saylor. 1991. Mineralization of linear alkylbenzene sulfonate by a four-member aerobic bacterial consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1566-1569.
- 12-Kertesz, M. A., P. Kölbener, H. Stockinger, S. Beil, and A. M. Cook. 1994. Desulfonation of linear alkylbenzene sulfonate surfactants and related compounds in bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2296-2303.
- 13-Kokotek W., and W. Lotz. 1991. Construction of a mobilizable cloning vector for site-directed mutagenesis of Gram-negative bacteria: application to *Rhizobium leguminosarum*. *Gene.* 98: 7-13.
- 14-Payne, W. J. and V. E. Feisal. 1963. Bacterial utilization of dodecyl sulfate and dodecylbenzene sulfonate. *Appl. Microbiol.* 11: 339-344.
- 15-Pirnik M. P. 1977. Microbial oxidation of methyl branched alkanes. *Critical Rev. Microbiol.* 5: 413-422.
- 16-Rontani, J.-F., M. J. Gilewicz, V. D. Michotey, T. L. Zheng, P. C. Bonin, and J.-C. Bertrand. 1997. Aerobic and anaerobic metabolism of 6,10,14-trimethylpentadecan-2-one by a denitrifying bacterium isolated from marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 636-643.
- 17-Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd edition. Cold Spring Harbor, New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 18-Schaeffer T. L., S. G. Cantwell, J. L. Brown, D. S. Watt, and R. R. Fall. 1979. Microbial growth on hydrocarbons: terminal branching inhibits biodegradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 38: 742-746.
- 19-Sigoillot, J.-C. and M.-H. Nguyen. 1992. Complete oxidation of linear alkylbenzene sulfonate by bacterial communities selected from coastal seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1308-1312.
- 20-Soberón-Chávez, G., A. Haidour, J. L. Ramos, J. Campos, and J. Ortigoza. 1996. Selection and preliminary characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* strain mineralizing some isomers in a branched-chain dodecylbenzene sulfonate mixture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 12: 367-362.
- 21-Smith, M. R. 1990. The biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria. *Biodegradation* 1: 191-206.
- 22-Swisher, R. D. 1963. Biodegradation of ABS in relation to chemical structure. *J. Water Pollution Control Federation* 35: 877-892.
- 23-Thomas, O. R. T. and G. F. White. 1991. Immobilization of the surfactant-degrading bacterium *Pseudomonas* C12B in polyacrylamide gel. III Biodegradation specificity for raw surfactants and industrial wastes. *Enzyme and Microbial Technol* 13: 338-343.
- 24-Velasco, A., S. Alonso, J. L. García, J. Perera and E. Díaz. 1998. Genetic and functional analysis of the styrene catabolic cluster of *Pseudomonas* sp. strain Y2. *J. Bacteriol.* 180: 1063-1071.
- 25-Wang, J. C., and G. N. Glaver. 1988. Action at a distance along the DNA. *Science.* 240: 300-304.
- 26-West, S. E. H., and B. H. Iglewski. 1988. Codon usage in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic Acids Res.* 16: 9323-9329.

14.- DISCUSION Y CONCLUSIONES ADICIONALES DEL ANEXO 2.

14.1 EFECTO DE LA MUTACION EN *ctrA* SOBRE LA DEGRADACION DEL DETERGENTE B-DBS

Resultados previos en los que se analizó la degradación en cajas de medio mínimo con B-DBS como fuente de carbono y energía mostraron la presencia de un halo de degradación alrededor de la colonia bacteriana. La mutante a citronelol (W51M1) mostró un halo degradativo menor que el mostrado por la silvestre, cualitativamente este resultado fue un indicio importante en la implicación de la vía degradativa del citronelol sobre la degradación del detergente B-DBS. La caracterización del efecto causado por la inserción en el gen *ctrA* sobre la degradación del detergente B-DBS se realizó mediante estudios degradativos del detergente analizados mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Para lo cual se compararon los porcentajes de surfactante degradado entre las cepas silvestre (W51D) y la mutante a citronelol (W51M1). Los perfiles cromatográficos correspondieron a los sobrenadantes de los cultivos crecidos en medio mínimo con 0.3% de una fracción purificada del detergente B-DBS. Los resultados obtenidos mostraron un porcentaje de degradación para la cepa silvestre de un 35% de B-DBS en 48 hrs de incubación, mientras que el porcentaje de B-DBS degradado por la mutante W51M1 bajo las mismas condiciones mostró un 22% de degradación del detergente; representando una disminución de alrededor del 40% (Anexo 2). Estos datos demostraron que de alguna manera la mutación en el gen *ctrA* afecta considerablemente la degradación del detergente B-DBS.

14.2 CARACTERIZACION DE *CtrA*

Un análisis detallado de la proteína *CtrA* identificó dominios presentes en otras alcohol deshidrogenasas y el sitio de unión de nucleótidos como NAD(P)⁺ (Anexo 2). Este hallazgo hizo suponer que probablemente la actividad de la proteína involucrada en la asimilación del citronelol fuera del tipo oxido-reductasa. Un dato importante que apoyó la anterior suposición fue que la mutante W51M1 además de ser incapaz de crecer en citronelol también presentó afección en la asimilación del aldehído (citroneal), pero el ácido citrónico fue asimilable; lo cual podría indicar que la afección de la cepa W51M1 en la degradación del citronelol sea entre la asimilación del aldehído al ácido. En base a ésto se procedió a identificar la etapa afectada en el sistema, para lo cual se implementó un método de determinación enzimática que nos permitiera monitorear la enzima afectada en el mecanismo de asimilación del citronelol. Tanto la citronelol como la citroneal deshidrogenasa mostraron especificidad por la utilización del cofactor NAD⁺;

además, ambas actividades enzimáticas se encontraron en la fracción citoplásmica del extracto. Los resultados encontrados indicaron que la actividad enzimática afectada en la mutante W51M1 fue la citronelal deshidrogenasa (afección en la conversión de NAD⁺ hacia NADH usando citronelal como sustrato).

Un resultado que apoyó fuertemente a los datos enzimáticos anteriores fue el análisis de los niveles de acumulación de metabolitos en cultivos crecidos en medio mínimo con citronelol suplementado con glucosa (Anexo 2). Por un lado la cepa silvestre mostró acumulación de los compuestos citronelol (25.8%), citronelal (62.4%) y ácido geránico (<1%), mientras que la acumulación por la cepa mutante W51M1 mostró para citronelol (5.3%), citronelal (92.9%) y el ácido geránico no fue detectado. Con estos resultados apoyados con los enzimáticos podemos concluir que la enzima afectada es la citronelal deshidrogenasa (Anexo 2).

14.3 CATABOLISMO DE B-DBS POR *P. aeruginosa* W51D.

Experimentos de protección del grupo sulfonato en la molécula de B-DBS dilucidaron que la primer etapa en la degradación de B-DBS por la cepa W51D consistió en la desulfonación del detergente, formando de tal manera un compuesto p-hidroxifenilalcanoato, semejante al mecanismo referido por Cain, 1987 (figura 8). El intermediario p-hidroxifenilalcanoato subsecuentemente asimilado por las vías del citronelol y oxidación β -modificada hacia la convergencia de un metabolito con el tamaño mínimo en la cadena alquílica; dato apoyado por la identificación de los compuestos 3-metil-4-p-hidroxifenil-2-pentenoato, 4-hidroxifenilpropionato) y p-hidroxifenilbenzoato (Anexo 2). Cabe mencionar que no fueron identificados metabolitos p-fenilhidroxilados con cadenas mayores, probablemente por la extracción poco selectiva de este tipo de compuestos, los cuales podrían encontrarse en concentraciones trazas imperceptibles para el método de separación (cromatografía de gases). Posterior a la identificación de los compuestos p-hidroxifenilalcanoatos se utilizó el ácido 4-hidroxifenilpropiónico (4-OHPHPr) para el estudio de etapas posteriores de degradación. Los resultados encontrados mostraron claramente que el compuesto hidroxilado es asimilado efectivamente por la bacteria, presentando proporciones degradativas de 15% en 48 hrs de cultivo y un 28% al ser utilizada glucosa como suplemento energético. Al analizar éstos extractos mediante perfiles de HPLC se encontró que existe una clara transformación del 4-OHPHPr en por lo menos dos intermediarios degradativos acumulados eventualmente. Por otro lado, se encontró que al utilizar los compuestos B-DBS y 4-OHPHPr como fuentes de carbono y energía en cultivos de la cepa W51D se identificó el ácido p-hidroxibenzoico como metabolito común (Anexo 2). Lo anterior indica

fuertemente que el surfactante B-DBS es degradado hacia la formación del p-hidroxifenilbenzoato, que es semejante a uno de los mecanismos referidos en la degradación de LAS por un consorcio bacteriano (Sigoillot & Nguyen, 1992; Figura 9) y contrario al sistema degradativo de LAS en *Pseudomonas testosteroni* PtS-1 (Cain, 1987; Figura 7).

Aunque el mecanismo de asimilación del anillo aromático no fue dilucidado, se intentaron varias estrategias para lograr identificar el tipo de ruptura del anillo bencénico (*orto* o *meta*). Experimentos tales como la identificación de metabolitos degradativos del tipo 2-hidroximucónico semialdehído evidenciando ruptura *meta* (compuestos que absorben a $\lambda_{MAX} = 375$ nm). De igual manera, la búsqueda de metabolitos producto de actividades *meta* a partir de substratos como catecol, en la cual se esperaría la aparición de compuestos coloridos del tipo HOMODA (2, hidroxí-6-oxo-7-metilocta-2,4-dienoato), o bien, la oxidación de Indol hacia índigo como evidencia de la ruptura *meta* (Pflugmacher et al. 1996; Kohler et al. 1993). Ya que los experimentos realizados mostraron resultados negativos sugerimos que la ruptura del anillo bencénico (asimilación del 3,4-dihidroxibenzoato), probablemente ocurre vía ruptura *orto* por la acción de una intradiol dioxigenasa. Sin embargo, es evidente que son necesarios ensayos enzimáticos específicos que confirmen la ruptura del anillo para cualquiera de las vías de asimilación de compuestos bencénicos.

Finalmente, concluimos que la degradación del detergente B-DBS por la cepa *P. aeruginosa* W51D ocurre por lo menos por dos vías principales que convergen en un metabolito común, en cuyo mecanismo se involucra el sistema de degradación de citronelol y una segunda vía de asimilación basada en una oxidación tipo β -modificada que elimina las ramificaciones de la cadena alquílica como propiolil-CoA, aunque enzimáticamente restan por ser corroboradas (Anexo 2).

“El misterio es la cosa más bonita que podemos experimentar.

Es la fuente de todo arte y ciencia verdaderos.

Albert Einstein

A N E X O 3

(Para ser enviado a la revista Journal of Bacteriology)

Pseudomonas aeruginosa Hsc66, a DnaK/Hsp70 homolog, is functional in enzyme stabilization.

Jesús Campos-García, Leandro G. Ordóñez, and Gloria Soberón-Chávez*.

Addresses: Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Mor. 62250, México.

*Corresponding author. Mailing address: Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, UNAM. Apdo Postal 510-3, Cuernavaca Morelos 62251, México. Phone : (52) (73) 291634. Fax: (52) (73) 172388. E-mail: gloria@ibt.unam.mx

Under heat stress conditions bacteria induce, among other heat-shock proteins, the Hsp70 molecular chaperone (DnaK) which is involved in protein stabilization. It has been shown that some bacteria present a Hsp70 homolog called Hsc66, which in *Escherichia coli* is not induced by heat-shock. We report here the isolation of a *Pseudomonas aeruginosa* W51D mutant (W51M22) by insertion of the mini-*Tn5*-Hg transposon, which was unable to grow on ethanol as sole source of carbon, showing that the transposon insertion in this mutant was located in the *hscA* gene. We report that the *hscA* gene transcription is induced by ethanol and heat shocks and that the NAD dependent ethanol dehydrogenase activity of mutant W51M22 is temperature- and ethanol-sensitive. These results strongly suggest that the *P. aeruginosa* Hsc66 protein is a functional molecular chaperone which is involved in the stabilization of the enzyme alcohol dehydrogenase, and possibly of other proteins, under some stress conditions.

INTRODUCTION

The 70-kDa heat shock proteins (Hsp70) make up an ubiquitous multigene family of highly conserved proteins. In fact, Hsp70 is the most conserved protein known to date which is found in all biota (10). Hsp70 is known to act as a molecular chaperone under normal and stress conditions, stabilizing protein folding intermediates, and to play a major role in thermo-tolerance (25). Eukaryotic organisms have been found to contain multiple Hsp70 family members, while bacteria contain only two (10), and among these, only one, DnaK, has been reported to be functional as a molecular chaperone. The second DnaK homolog, called Hsc66, has been reported in the bacteria *Escherichia coli* (12, 29), *Haemophilus influenza* (9), *Azotobacter vinelandii* (36) and *Pseudomonas aeruginosa* (32). The only case in which there is some evidence suggesting that the Hsc66 protein actually functions as a molecular chaperone is *E. coli*, where it has been purified and shown to have a characteristic ATPase activity (34). The *hscA* gene is also found in a wide range of eukaryotic organisms as yeast, *Drosophila* and mammals (14, 15). In all organisms where the *hscA* gene is found, its complementary DNA strand presents an open reading frame that could encode a protein homologous to the enzyme glutamate dehydrogenase (12, 14, 15, 29). The function of this unusual genetic structure has not been determined. In the case of bacteria, a

ferredoxin is encoded downstream of the *hscA* gene and both genes are transcribed as an operon (9, 12, 16, 29, 32, 36), the functionality of this arrangement is also unknown. In *A. vinelandii* it was suggested that the role of the Hsc66 protein was to stabilize proteins containing an iron-sulfur group, such as one involved in oxygen protection of the nitrogenase enzyme (36).

Induction of heat shock proteins under heat and other stress conditions, as in the presence of ethanol (33), represents an ubiquitous cellular response that occurs at the level of transcription (17). In gram-negative bacteria the *rpoH* gene encoding a σ factor of 32 kDa (σ^{32}) plays a major role in this homeostatic process. In *E. coli* σ^{32} is not only required for recognizing promoters for transcription, but functions as the central regulatory factor in response to heat stress (31). The *P. aeruginosa rpoH* gene has been cloned by its ability to complement an *E. coli rpoH* mutant (3, 21). The high degree of homology between the *P. aeruginosa* and *E. coli* σ^{32} proteins (61% of amino acid sequence identity) and the conservation of certain structural features (21, 22, 23) strongly suggests that in the former bacteria, σ^{32} also has a central regulatory role in heat stress response.

σ^E is an alternative sigma factor involved in heat-shock response at high temperatures (19). In *E. coli* σ^E controls the extracytoplasmic stress response, accordingly its activity is not only induced by ethanol and heat shock, but

also by disruption of protein folding in the periplasm (19). In *P. aeruginosa* and *A. vinelandii* σ^E is involved in the expression of the exopolysaccharide alginate (8, 18, 28), and, in the former bacterium, plays a central role in cyst formation (20). In *E. coli*, σ^E is an essential sigma factor (6).

In *E. coli*, the *hscA* gene transcription has been shown to be induced by cold shock and not by heat shock (16), but the level of the Hsc66 protein is maintained at a high level in all culture conditions tested, including different temperatures (16). An intriguing observation is that an *hscA* mutant has no growth defect phenotype detected (12).

Here we show that in *P. aeruginosa* W51D Hsc66 is induced by the presence of ethanol- and heat-shocks, that an *hscA* mutant (W51M22) is unable to use ethanol and other short chain alcohols as carbon sources, presenting an ethanol- and temperature-sensitive NAD-dependent ethanol dehydrogenase enzymatic activity, and that the inability to use ethanol as substrate of mutant W51M22 is complemented by the *E. coli hscA* gene. Taken together, these results suggest that in *P. aeruginosa* the Hsc66 protein is functional as a molecular chaperone which stabilize the enzyme alcohol dehydrogenase, and possibly other proteins.

MATERIALS AND METHODS

Microbiological methods. Strains and plasmids used in this work are shown in Table 1. *P. aeruginosa* strains were grown at 30°C on one of the following media: LB, Pseudomonas Isolation Agar (PIA Difco), or modified M9 minimal medium (1) supplemented with one of the following carbon sources: glucose 0.2% (wt/vol), ethanol 1% (vol/vol). Mercury (Hg) was used at a concentration of 12 µl/ml. Antibiotic concentrations in µg/ml, used for *P. aeruginosa* strain W51D were: carbenicillin (Cb) 50, gentamicin (Gm) 30, kanamycin (Km) 100, tetracycline (Tc) 50. Chloramphenicol was used at 50 µg/ml in the experiment to test *hscA* mRNA induction. When *hscA* mRNA was quantified, strain W51D was cultivated on LB medium at 30°C and when the culture reached a density of 0.6 at 600 nm, different treatments were applied for 3 additional hours.

Enzymatic assays. Ethanol dehydrogenase was measured as previously reported (13), measuring NADH production at a wave length of 340 nm.

Nucleic acid procedures. DNA isolation, cloning and sequencing, Southern blotting and nick translation procedures were carried out as described previously (27). Primer extension analysis was done with R1 primer (Fig. 1) located in the 5' region of the *hscA* gene from *P. aeruginosa* W51D. The sequencing reaction shown in the

primer extension analysis was done with Thermo Sequenase radio labeled terminator cycle sequencing kit (Amersham Life Science, Inc.). Other sequencing reactions were done using *Taq* DNA polymerase and fluorescent dideoxy terminators in a cycle sequencing method; the resultant DNA fragments were separated by electrophoresis and analyzed using an automated Applied Biosystems 377 DNA sequencer.

TABLE 1. *Pseudomonas aeruginosa* strains and plasmids used in this study

Strain or Plasmid	Relevant characteristics ^a	Reference
W51D	Strain able to degrade surfactants	28
W51M22	W51D <i>hscA</i> ::mini- <i>Tn5</i> -Hg mutant	This work
W51M23	W51D <i>fdxA</i> ::Km mutant	This work
Plasmids		
pUT mini- <i>Tn5</i> -Hg	Suicide vector for mutagenesis with mini- <i>Tn5</i> -Hg unable to replicate in <i>P. aeruginosa</i> , Hg ^r .	7
pJQ200	Cloning vector Gm ^r , unable to replicate in <i>Pseudomonas</i>	24
mp18	RK2 derived cosmid vector, Tc ^r	5
pCP13	Cosmid containing 20 kb of W51D DNA, including <i>hscB</i> , <i>hscA</i> and <i>fdx</i> , Tc ^r	This work
pJC7	pJQ200mp18 with 1223 bp including the <i>fdxA</i> gene and flanking regions	This work
pJC8	pJC8 with a Km ^r cassette cloned in the <i>fdxA</i> gene	This work
pJC9	Cloning vector able to replicate in <i>Pseudomonas</i> , Tc ^r	29
pMP220	pMP220 with kb of <i>E. coli</i> DNA including the <i>hscB</i> , <i>hscA</i> and <i>fdxA</i> genes	This work
pJC10		

^aAbbreviations used: Resistance to: kanamycin (Km^r) gentamicin (Gm^r), mercury (Hg^r) and tetracycline (Tc^r).

Genetic manipulations. *P. aeruginosa* matings (30) and transformation (24) were done as reported previously. The W51D *hscA*::mini-*Tn5*-Hg insertion was constructed using the pUT-Hg plasmid. The *fdxA*::Km mutant was constructed by selection of double recombination events with plasmid pJC9. This plasmid is a derivative of plasmid pJC8 which contains 1223 bp of the W51D DNA amplified by PCR using oligonucleotides L2 and R4 (Fig. 1), with a Km^r cassette (2) cloned in *fdxA* gene. These plasmids include the entire *fdxA* gene and its flanking sequences. The *E. coli hscB*, *hscA*, *fdxA* operon was subcloned from plasmid pTHK100 (12) to the vector pMP220 rendering plasmid pJC10.

L1

GGAGGCTACGGTGCAGGATCCGGAGTTCTCTCTGCAGCAGATGCAGCTGCGCGAGGAAGTGGAGGAGTTGACAGGACAGCGCGGACCTGGCCGGCGTGGCGACCTTCAAGCGTCGGCTCAA 120
E A T V Q D P E F L L Q Q M Q L R E E L E E L Q D S A D L A G V A T F K R R L K
hscB -35

GGCCGCCAGGCGGAGCTGGAGCGTGAGTTCCGCCGCTGCTGGGACGATGCGCAGCGCCGCGAAGAGGCGAAGCGCTGGTCCGTCGCATGCAAGCTGCGACAAGCTGGCGCAGGAAGT 240
A A Q A E L E R E P A A C W D D A Q R R E E A E R L V R R M Q F L D K L A Q E V
-10 ▲ P2 ▲ P1 R1

GCGCCAGCTGGAAGAGGACTCGACGATTAATCCCTGCGGCCCGGCGCCACCCCATAGTTAAGACAGAGCATGGCCCTACTGCAGATCGCCGAGCCCGGTGAGAGTCCCAAGCCCCA 360
R Q L E E R L D D . -35 -10 *hscA* SD M A L L L Q I A E P G Q S P K P H

TGAGCGTCGCTGGCGGTGGGATGACCTGGGTACCAACAAATTCCTGGTCCGCTGCCGTCGCGAGCGGCGTCCGGCTCCGTTGCCGGGACGACCGCGGCGAAGTGATCCTGCCTTCGGC 480
E R R L A V G I D L G T T N S L V A A V R S G V A A P L P D D R G E V I L P S A

GGTGGTACCTTGGCGATGCAATCGAGGTGGGTGAGAGCGTTCGCGCTAACGCCCTCGCAAGACCCGCTGAACTCAATCATCTCGGTCAAGCGCTTCATGGGCGTGGCGTGGAGGACGT 600
V R Y L A D R I E V G E S V R A N A S Q D P L N S I I S V K R F M G R G L E D V

R2

GAAGCAGTTGGGCGGCAATTCGCGTACCGCTTACCCAGGCGGAGTCCGACATGCCCTTCATCGAGACCGTCCAGGCGGCAAAAGTCCGGTGGAAAGTCTCGGCGGAAATCCTCCGTGT 720
K Q L G G Q L P Y R F T Q G E S H M P F I E T V Q G A K S P V E V S A E I L R V

CCTGCGTACGCGCGCAATCCACCTGGGTGGCGAACTGGTGGCGCGGTGATCACCGTTCGCCCTATTTCGACGATGCCAGCGTCCAGCCACTAAGACGCGCGCGTTCGGCCGG 840
L R Q R A E S T L G G E L V G A V I T V P A Y F D D A Q R Q A T K D A A R L A G

TCTGCAGTGCCTGCCCTGCTCAATGAGCCGACCGTCCCGCTGTCGCATACGGTCTGGACAAGAGCGCGCAAGGCTTGGTCCCATCTATGACTTGGGTGGCGGTACATTCGATATCTC 960
L H V L R L L N E P T A A A V A Y G L D K S A E G L V A I Y D L G G G T F D I S

CATCTGCGCTGACCCGTGGCGTCTTCGAAGTCTGGCCACCGGTGGCGACACCGCCCTGGGCGGCGAGACTTCGACCATGCCATTGCCGGCTGGATCATCGACAGCGCGGTATCTC 1080
I L R L T R G V F E V L A T G G D T A L G G D D F D H A I A G W I I E Q A G I S

GGCTGACCTCGATCCGGGTGCCAGCGCGCTGCTGCTGAGACTGCCCTGCGCCGCAAGGAGCGGTGACCGACAGCGCGCGCTGCTGTTCCTTACGACAGCTGGACCGCGGAGCTGAC 1200
A D L D P G A Q R R L L Q T A C A A K E A L T D S A S V A V A Y D S W T G E L T

CCGTGCCAGATGGACTCGTGCATCGATCCGCTGATCCAGCGCAGCTCAAGTCTGCCGCGCGCGGTACGTGATTCTGGCATCGAGCTCGAAGAAGTCAAGTCCCGTGGTTCATGGTCCG 1320
R A Q M D S L I D P L I Q R S L K S C R R A V R D S G I E L E E V S A V V M V G

TGGTTCACCCGAGTGC CGCGGTTCGCGAGCTGGTGGGGAGCTGTTCGGTCCGCGAGCGCTGACCGATATCGACCCGCGACAGGTGGTTCGCCATTGGTCTGCCATCCAGGCGGATGC 1440
G S T R V P R V R E L V G E L F G R E P L T D I D P D Q V V A I G A A I Q A D A

CCTGGTGGCAACAAGCGCGGCAAGAGCTGCTGCTGCTGGATGTGATTCCCTTGTGCTGGCTGGAAACCATGGGCGGGTGGATGGAGAAGGTGATTCGCGCAACACCACCATCCC 1560
L A G N K R G E E L L L L D V I P L S L G L E T M G G L M E K V I P R N T T I P

L2

GGTGGCGTGCAGGAGTTCACACCTACAAGGATGGCCAGCGCCATGATGATTACGCTGCTGCAAGGCGAGCTGAGTGGTCAAGGACTGCGCGTCCCTGGCGGCTTCGAGCT 1680
V A R A Q E F T T Y K D G Q T A H M I H V L Q G E R E L V K D C R S L A R F E L

GCGCGCATTCGCGCATGGTGGCGGGCGCGCAAGATCCGCGTCACTTTCAGGTGACCGCGATGGTCTGCTGGCGTGTCCGCCCGGAGTGTCTCCGCGCTGAGGGGAGCAT 1800
R G I P P M V A G . A A K I R V S F Q V D A D G L L G V S A R E L S S G V E A S I

CCAGTCAAGCGTCTACGGCTGACCGAGCGGCGAGATCCGCCATGCTGTCAGGATTCCTCCAGTACCGCGGTGATGACATGGCCCGCCGACCCCTCGCGCAACAGCAGGTCCGAGGC 1920
Q V K P S Y G L T D G E I A R M L Q D S F Q Y A G D D M A A R T L R E Q Q V E A

CCAGCGTCTGCTCGAAGCCGTGACGTCGCGCGTGGAGCTGATGGCGAGCGTCTGCTGATGCTGACGAGCGTTCGGTTCATCGATGCCGGAATGGACTCGCTGCGGCAACTGGCTACCGG 2040
Q R L L E A V Q S A L D V D G E R L L D A D E R L V I D A G M D S L R E L A T G

CAGCGATGCTCTGCCATCGAACTACAGATCAAGCGTCTGTCAGCTGACCGAGCGCTTTCGCCGCGCGCGTATGGACGCCACCGTCAAAGCCGCACTGGCCGCTGCGCGCTCAACGA 2160
S D A S A I E L Q I K R L S Q L T D A P A A R R M D A T V K A A L A G R R L N E

AATCGAGGAATAAGCGAAGTGC CGCAGATGTCTTCTGCCCCAGCGAGCACTGCCCGAAGGCGCGGTGATCGAAGCCAGCGCGGCAAAACCATCATGAAGCGCGCGCTGCGCAA 2280
I E E . *fdx* M P Q I V F L P H A E H C P E G A V I E A Q P G E T I M K A A L R N

CGGCATCGAGATCGAGCAGCCCTGCGAGATGCTCTGCTGCGTCCACCCTGCCATGTGGTCTGCGCGAAGGTTTCAATTCATGGAAGCCCTCCGACGAGCTGGAAGACGACATGCTCGA 2400
G I E I E H A C E M S C A C T T C H V V V R E G F N S M E A S D E L E D D M L D

CAAGGCTGGGCGCTGGAGCGGATTCGCGCTGCTGCTGCCAGGCGCTGCTGCGCGAGACCGATCGTGGTGGAAATCCCGAAATACACCATCAACCAAGTGTCCGAAGGTCACTGAGA 2520
K A W G L E P D S R L S C Q A V V G E T D L V V E I P K Y T I N Q V S E G H .

R3

CGGAGCGCTACATGAGTCTGAAATGGGTGATGCTCGAAATCGCATCCAGTACCGAAACCAAGCCGACGTCGATCCCGCGTACGTGAATTTCTGTCATGTCACCGCTGGGTGC 2640
TGGCATTGCGGAGTTCAGCGACGATCCGCTCCCGCGCGGAGAAAGTCTGGAGCCATCCAGCGCGCTGGATCGAAGAAGCCGACTAGAGGCGCTCCACCAGAGCCGCTACCCAT 2760
TTGTCATGAACCCGCTATAATTCGCGGTTTATCTTTAGGTGAGCTGTCGAAATTCGCCGAGGATTCGAGTCCCGCGCTGTCGAGTCCGGCGGTTTCGCGCTTGTCTACGGG 2880

R4

Figure 1. Nucleotide sequence of the *P. aeruginosa* W51D *hscA* and *fdxA* genes and regulatory sequences. The sequence of the 3' end of the *hscB* gene is also shown. The sequence and position of the oligonucleotides used during this work are shown in the figure and identified as Ln or Rn depending on their polarity (L oligonucleotides which amplify the sequence from 5' to 3' and the R ones have the opposite polarity). Arrows indicate the two transcription start sites detected (P1 [σ^{32} -dependent] and P2 [σ^E -dependent], respectively). SD means the ribosome binding site sequence for mRNA translation. The triangle shows the site of the mini-*Tn5*-Hg insertion in mutant W51M22.

Computer analysis of the DNA and protein sequences. Computer analysis of the sequences were carried out by using GENE WORKS program (IntelliGenetics, Inc.) and the University of Wisconsin Genetics Computer Group (UWGCG) programs. The sequences of *P. aeruginosa* PAO1 contigs were obtained from the web site "*Pseudomonas* Genome Project" (<http://www.pseudomonas.com>) released at September 15, 1998.

Nucleotide sequence accession number. The sequence of the W51D chromosomal region including the *hscB*, *hscA* and *fdxA* genes which is reported here has been deposited in the GenBank database under accession number AF096864.

RESULTS AND DISCUSSION

Selection and characterization of mutant W51M22. We have previously reported the selection of a *Pseudomonas aeruginosa* strain (W51D) which is able to mineralize at least 70% of a branched-chain alkylbenzene-sulfonate commercial mixture and is resistant to high concentrations of these surfactants (4, 30). In order to determine the surfactants degradation pathway, we selected a mutant (W51M22) by insertion of transposon mini-*Tn5*-Hg, which was unable to grow on 2-phenyl-propionate, a presumed surfactant degradation intermediate. Further characterization of mutant W51M22 showed that it was impaired in ethanol utilization (Table 2), the solvent which was used to solubilize 2-phenyl-propionate. Neither the parental strain W51D, nor the W51M22 mutant were able to use 2-phenyl-propionate as a growth substrate (4). We rule out that mutant W51M22 was ethanol-sensitive, since it is able to grow in the presence of this alcohol on LB media at a concentration of 2.5%, the same concentration which resisted the wild type strain W51D. The inability of mutant W51M22 to degrade ethanol was studied further.

The nucleotide sequence of the W51D genome adjacent to the mini-*Tn5*-Hg transposon insertion allowed the identification of the *hscA* gene and, further downstream, apparently forming part of the same transcriptional unit, the *fdxA* gene (Fig. 1). We found the *hscA* and *fdxA* genes in the PAO1 genome sequence as part of contig 210 of the "*Pseudomonas* Genome Project" (Fig. 2). The W51D and PAO1 *hscA* genes have a sequence 91% identical, and both present the antisense ORF encoding a putative glutamate dehydrogenase. In *E. coli* (16) and *A. vinelandii* (36) the *hscA* gene is the second gene of an operon, *hscB*, a DnaJ homolog, being the first transcribed gene. This genetic arrangement is also conserved in the *P. aeruginosa* genome, since the *hscB* gene is also present in this region (Fig. 2).

The PAO1 genomic structure in this region is very similar to that reported for *A. vinelandii* (36), containing upstream of the *hscBA-fdx* gene cluster, the *iscSUA* genes, which are involved in the formation of the iron-sulfur cluster of a protein involved in nitrogenase protection to oxygen damage (Fig. 2). *P. aeruginosa* is unable to fix nitrogen, so the *iscSUA* genes might participate in the formation of the active site of other proteins containing an Fe-S cluster.

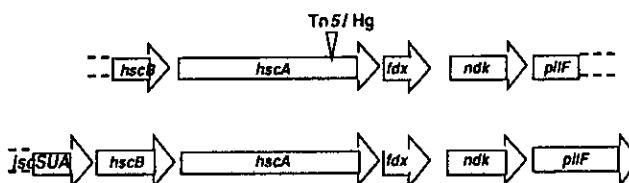


Figure 2. Schematic representation of the *P aeruginosa* W51D (upper) and PAO1 (lower) chromosomal regions where the *hscA* genes are encoded. The site of the transposon mini-*Tn5*-Hg insertion in mutant W51M22 is shown.

The deduced *P. aeruginosa* Hsc66 amino acid sequence shows that it belongs to the family of Hsp70 proteins (Fig. 3), showing 64% sequence identity with the *E. coli* Hsc66 protein.

The mini-*Tn5*-Hg insertion within the *hscA* gene was the only insertion of the transposon in mutant W51M22 (Fig. 4), suggesting that the inability to degrade ethanol was due to inactivation of this gene. This conclusion is sustained further by the complementation of ethanol utilization by introduction of plasmid pJC7 (Table 2).

TABLE 2. Ability to grow on different media.

Strain	LB	M9 medium supplemented with:				
		glu ^a	eth ^a	prop ^a	deca ^a	nona ^a
W51D	+	+	+	+	+	+
W51M22	+	+	-	-	+	+
W51M23	+	+	+	ND ^a	ND ^a	ND ^a
W51M22/pJC7	+	+	+	ND ^a	ND ^a	ND ^a
W51M22/pJC10	+	+	+	ND ^a	ND ^a	ND ^a

^aAbbreviations used: + or - refers to the strain ability or inability to grow. M9 minimal medium was supplemented with glu: glucose, eth: ethanol, prop: propanol, deca: decanol, or nona: nonanol. ND means not determined.

Selection of the *fdxA::Tc* mutant W51M23. Theoretically a ferredoxin could be involved in the mechanism of alcohol degradation by *P. aeruginosa*, and the mini-*Tn5*-Hg insertion within the *hscA* gene could have a polar effect on the expression of the *fdxA* gene. To determine whether the W51M22 phenotype was due to the lack of *fdxA* expression we constructed an *fdxA::Km*

mutant (W51M23) according to the strategy shown in Fig. 5. Mutant W51M23 has not growth defect detected (Table 2), thus the inactivation of the *hscA* seems to be responsible for the mutant W51M22 inability to use ethanol as carbon source. Strain W51D possesses multiple ferredoxins as evidenced by Southern blot hybridization using the *fdxA* gene as probe (Fig. 5, Panel I).

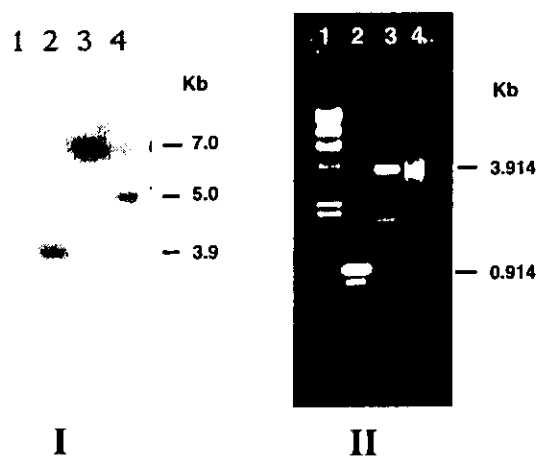


Figure 4. Molecular characterization of the W51D *hscA* mutant W51M22. Panel I) Southern blot hybridization using the mini-*Tn5*-Hg transposon as probe. Lanes correspond to 1) W51D DNA digested with *Eco*R1 enzyme and 2-4) W51M22 DNA digested with the following enzymes 2) *Eco*R1, 3) *Bam*H1, and 4) *Pst*I. Panel II) *hscA* amplification by PCR of W51D (lane 2) and W51M22 (lane 3) DNAs, using L2 and R3 oligonucleotides shown in Fig. 1. Lanes 1 and 4 correspond to DNA size markers.

Expression of the *P. aeruginosa* W51D *hscA* gene. The results presented above led us to the hypothesis that Hsc66 was a functional molecular chaperone which stabilizes the enzyme ethanol dehydrogenase in the presence of its substrate. To obtain evidence which sustained this hypothesis, we measured by Northern blot hybridization in RNA dots, the level of *hscA* expression on different culture conditions. Table 3 shows that the W51D *hscA* mRNA concentration is induced by heat (42°C) and ethanol (325 mM ethanol) shocks, but is unaffected by cold shock (10°C) or chloramphenicol treatment, which is known to induce cold shock genes (16). These results are in agreement with the possible function of Hsc66 as a molecular chaperone, and show that the *E. coli* and *P. aeruginosa* *hscA* genes are regulated in a different manner. It is interesting, though, that the *E. coli* *hscAB-fdxA* genes contained in plasmid pJC10 (Table 1) complemented the

ability of mutant W51M22 to use ethanol as carbon source (Table 2), thus suggesting that the *E. coli* and *P. aeruginosa* Hsc66 proteins have a similar function.

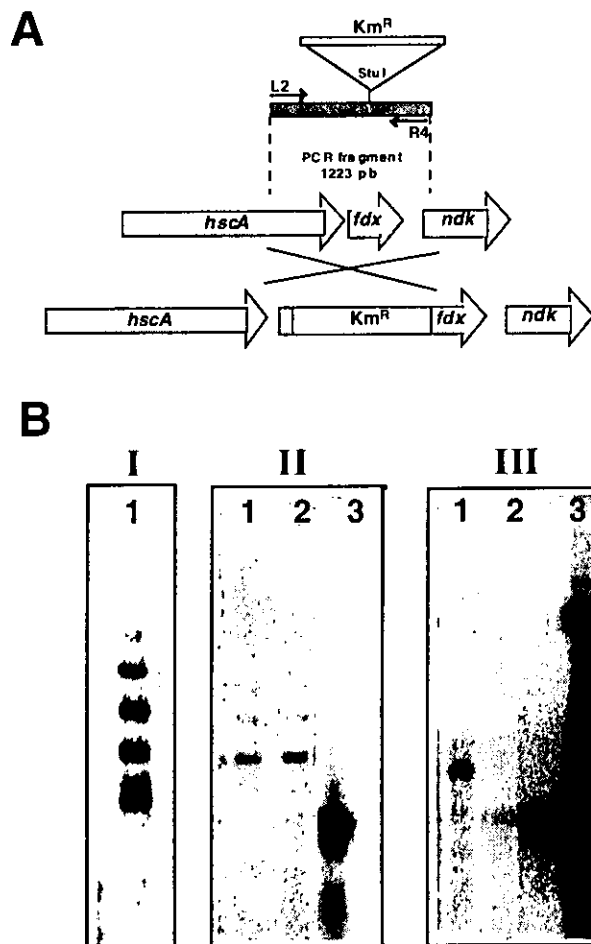


Figure 5. Molecular characterization of the W51D *fdxA* mutant W51M23. A) Schematic representation of the strategy to construct the mutant W51M23. B) Southern blot hybridization of W51D DNA using as probes the W51D *fdxA* internal fragment (Panel I), the W51D chromosomal region cloned in plasmid pJC8 (Panel II), or the *Km^r* resistance cassette (Panel III). Lanes in panels II and III correspond to DNAs from: 1) mutant W51M23, 2) W51D, and 3) plasmid used as probe in each experiment.

Primer extension analysis of the *hscA* gene region revealed the presence of two mRNA start sites (Fig. 6), corresponding to promoters recognized by RNA polymerase containing either σ^{32} (P1) or σ^E (P2) subunits (Fig. 1). The presence of these promoters is consistent with the induction of the *hscA* gene transcription by heat and

ethanol. No sequences with homology to known transcriptional activators binding sites were detected in the *hscA* 5' region (Fig. 1). Besides the mentioned promoters there is also evidence of *hscA* transcription coming from the *hscB* 5' region (data not shown), as has been reported for *E. coli hscBA-fdx* gene cluster (16).

TABLE 3. Relative concentration of *P. aeruginosa* W51D *hscA* mRNA after 3 hours of different treatments^a.

Strain	10°C	30°C	42°C	Cm	Ethanol
W51D	125	120	377	80	225

^a mRNA concentration is expressed as the ratio of the detected RNA hybridization by autoradiography scanning to total RNA concentration used in the experiment. The probe used was the PCR product of the DNA amplified with oligonucleotides L1 and I (Fig. 1).

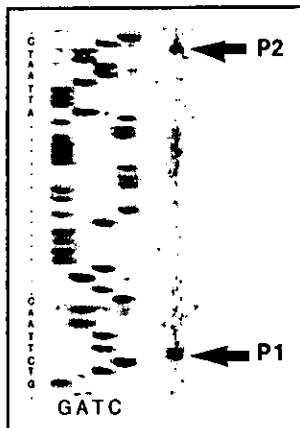


Figure 6. Primer extension analysis of the *hscA* gene using oligonucleotide R1 (Fig. 1), and the DNA sequence ladder made with the same oligonucleotide. The RNA was extracted from *P. aeruginosa* W51D grown on M9 + ethanol.

Stability of the enzyme ethanol dehydrogenase. There are different classes of alcohol dehydrogenase enzymes. The *E. coli adhC* gene encodes an alcohol dehydrogenase of the class-III subfamily which uses NAD as cofactors in the oxidation of simple alcohols and contains an Fe-S cluster (11). This enzyme has a very low affinity for ethanol and other short-chain alcohols (11). We search for homologs of the *E. coli AdhC* enzyme in the PAO1 genome and found a gene in contig 227 which is 72% identical and has a similarity of 85%. Based on the high degree of homology between these genes, we hypothesized that the *P. aeruginosa* Hsc66 protein was

involved in the stabilization of the alcohol dehydrogenase class III (AdhIII) enzyme. If this hypothesis was correct mutant W51M22 should be deficient in the assimilation of other short-chain alcohols, but not of long-chain alcohols, which are much better AdhIII substrates. Accordingly with our prediction mutant W51M22 is unable to grow with C2-C4 alcohols, but can readily use decanol and nonanol (Table 2). These results suggest that AdhIII activity is deficient in mutant W51M22, but it is still possible that a different alcohol dehydrogenase is the one affected in this mutant.

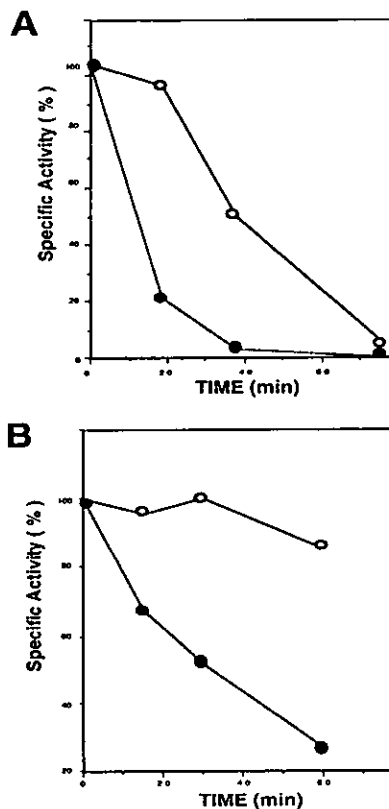


Figure 7. Stability of the enzyme ethanol dehydrogenase of *P. aeruginosa* W51D (○) and mutant W51M22 (●) at 42°C (upper panel) and in the presence of 250 mM ethanol at 25°C (lower panel).

We determine the stability, in the presence of 250 mM ethanol or at 42°C, of the NAD-dependent ethanol dehydrogenase activity of strains W51D and W51M22, grown on M9 + glucose. Both bacteria present a similar specific activity in this medium, but it was apparent that W51M22 enzyme was more sensitive to heat or ethanol treatments than the W51D enzyme (Fig. 7). These results

sustain the hypothesis that Hsc66 stabilizes an alcohol dehydrogenase in the presence of its substrate.

In agreement with its function, the NAD-dependent ethanol dehydrogenase activity of strain W51D is three fold higher when this strain is grown with ethanol as carbon source compared to the activity when glucose is used as substrate.

It has been suggested that in *A. vinelandii* the protein products encoded by the *hscA* and *hscB* genes function as chaperones involved in the maturation of iron-sulfur cluster-containing proteins (36), and, as mentioned above, the enzyme AdhIII contains an iron-sulfur cluster (11). The genetic arrangement of the PAO1 *iscUA* and *hscBA-fdxA* genes (Fig. 2) is consistent with the proposed role of Hsc66 in the stabilization of Fe-S containing proteins.

Taken together the results reported herein, strongly suggest that the *P. aeruginosa* Hsc66 protein is a functional molecular chaperone important for the stabilization of an alcohol dehydrogenase in the response to the stress produced by ethanol. It is tempting to speculate that Hsc66 is specific for the stabilization of proteins containing an Fe-S cluster, but this hypothesis remains to be experimentally validated.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Carmen Gómez for her encouraging discussions. Jesús Campos held a CONACyT scholarship during the development of this work. Jesús Campos-García held a CONACyT scholarship during the development of this work and received support from: "Programa de Apoyo al Posgrado PADEP" (UACPyP/UNAM) project number 030506.

REFERENCES

- 1-Abril, M.-A., C. Michán,, K. N. Timmis, and J. L. Ramos. 1989. Regulator and enzyme specificities of the TOL plasmid-encoded upper pathway for degradation of aromatic hydrocarbons and expansion of the substrate range of the pathway. *J. Bacteriol.* **171**: 6782-6790.
- 2-Alexeyev, M. F., I. N. Shokolenko, and T. P. Croughan. 1995. Improved antibiotic resistance gene cassettes and omega elements for *Escherichia coli* vector construction and in vitro deletion/insertion mutagenesis. *Gene* **160**: 63-67.
- 3-Benvenisti, L., S. Koby, A. Rutman, H. Giladi, T. Yura, and A. B. Oppenheim. 1995. Cloning and primary sequence of the *rpoH* gene from *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* **155**: 73-76.
- 4-Campos-García, J., A. Esteve, J. L. Ramos,

and G. Soberón-Chávez. 1998. Branched-chain dodecylbenzene sulfonate degradation pathway of *Pseudomonas aeruginosa* W51D involves a novel route for degradation of the surfactant lateral alkyl chain. *Appl. Environ. Microbiol.* (submitted).

5-Darzins, A., and A. M. Chakrabarty. 1984. Cloning of genes controlling alginate biosynthesis from a mucoid cystic fibrosis isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **159**: 9-18.

6-de las Peñas, A., L. Connolly, and C. Gross. 1997. σ^E is an essential sigma factor in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**:6862-6864.

7-de Lorenzo, V., and K. N. Timmis. 1994. Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with *Tn5*- and *Tn10*-derived minitransposons. *Methods Enzymol.* **235**: 386-405.

8-Deretic, V., M. J. Schurr, J. C. Boucher, and D. W. Martin. 1994. Conversion of *Pseudomonas aeruginosa* to mucoidy in cystic fibrosis: environmental stress and regulation of bacterial virulence by alternative sigma factors. *J. Bacteriol.* **176**: 2773-2780.

9-Fleischmann, R. D., M. D. Adams, O. White, R. A. Clayton et al. 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* **269**: 496-512.

10-Gupta, R. S., and G. B. Golding. 1993. Evolution of *hsp70* gene and its implications regarding relationships between archaeobacteria, eubacteria and eukaryotes. *J. Mol. Evol.* **37**:573-582.

11-Gutheil, W. G., B. Holmquist, and B. L. Valle. 1992. Purification, characterization, and partial sequence of the glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase from *Escherichia coli*: a class III alcohol dehydrogenase. *Biochem.* **31**: 475-481.

12-Kawula, T. H., and M. J. Lelivelt. 1994. Mutations in a gene encoding a new Hsp70 suppress rapid DNA inversion and *bgl* activation, but not *proU* derepression, in *hns-1* mutant *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **176**: 610-619.

13-Kondo, K., and S. Horinouchi. 1997. Characterization of the genes encoding the three-component-membrane bound alcohol dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans* and their expression in *Acetobacter pasteurinus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1131-1138.

14-Konstantopoulou, I., C. A. Ouzounis, E. Drosopoulou, M. Yiangou, P. Sideras, C. Sander, Z. G. Scouras. 1995. A *Drosophila hsp70* gene contains long, antiparallel, coupled open reading frames (LAC ORFs) conserved in homologous loci. *J. Mol. Evol.* **41**: 414-420.

- 15-LéJohn, H. B., L. E. Cameron, B. Yang, G. MacBeath, D. S. Barker and S. A. Williams. 1994. Cloning and analysis of a constitutive heat shock (cognate) protein 70 gene inducible by glutamine. *J. Biol. Chem.* **269**: 4513-4522.
- 16-Lelivelt, M. J., and T. H. Kawula. 1995. Hsc66, an Hsp70 homolog in *Escherichia coli* is induced by cold shock, but not by heat shock. *J. Bacteriol.* **177**: 4900-4907.
- 17-Mager, W. H., and A. J. J. DeKruiff. 1995. Stress-induced transcriptional activation. *Microbiol. Rev.* **59**: 506-531.
- 18-Martínez-Salazar, J. M., S. Moreno, R. Nájera, C. Boucher, G. Espín, G. Soberón-Chávez and V. Deretic. 1996. Characterization of the genes coding for the putative sigma factor AlgU and its regulators MucA, MucB, MucC and MucD in *Azotobacter vinelandii* and evaluation of their role in alginate biosynthesis. *J. Bacteriol.* **178**: 1800-1808.
- 19-Mecas, J., P. E. Rouviere, J. W. Erickson, T. J. Donohue, and C. A. Gross. 1993. The activity of σ^E , an *Escherichia coli* heat-inducible sigma-factor, is modulated by expression of outer membrane proteins. *Genes Dev.* **7**: 2618-2628.
- 20-Moreno, S., R. Nájera, J. Guzmán, G. Soberón-Chávez and G. Espín. 1998. Role of alternative σ factor AlgU in encystment of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **180**: 2766-2769.
- 21-Naczynski, Z. M., C. Meuller, and A. M. Kropinski. 1995. Cloning the gene for the heat shock response positive regulator (sigma 32 homolog) from *Pseudomonas aeruginosa*. *Can. J. Microbiol.* **41**: 75-87.
- 22-Nakahigashi, K., H. Yanagi, and T. Yura. 1995. Isolation and sequence analysis of *rpoH* genes encoding σ^{32} homologs from gram negative bacteria: conserved mRNA and protein segments for heat shock regulation. *Nucleic Acids Res.* **23**: 4383-4390.
- 23-Nakahigashi, K., H. Yanagi, and T. Yura. 1998. Regulatory conservation and divergence of σ^{32} homologs from gram negative bacteria: *serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **180**:2402-2408.
- 24-Olsen, R. H., G. DeBusscher, and W. R. McCombie. 1982. Development of broad-host-range vectors and gene banks: self-cloning of the *Pseudomonas aeruginosa* PAO chromosome. *J. Bacteriol.* **150**: 60-69.
- 25-Parsell, D. A. and S. Lindquist. 1993. The function of heat shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu. Rev. Genet.* **27**:437-496.
- 26-Quandt J., and M. F. Hynes. 1993. Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in Gram-negative bacteria. *Gene* **127**: 15-21.
- 27-Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual.* 2nd edition. Cold Spring Harbor, New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 28-Schurr M. J., and V. Deretic. 1997. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: co-ordinate regulation of heat-shock response and conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **24**: 411-420.
- 29-Seaton B. L., and L. E. Vickery. 1994. A gene encoding a DnaK/hsp70 homolog in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 2066-2070.
- 30-Soberón-Chávez, G, A. Haïdour, J. L. Ramos, J. Campos, and J. Ortigoza. 1996. Selection and preliminary characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* strain mineralizing some isomers in a branched-chain dodecylbenzene sulfonate mixture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **12**: 367-362.
- 31-Straus, D. B., W. A. Walker, and C. A. Gross. 1987. The heat shock response of *E. coli* is regulated by changes in the concentration of σ^{32} . *Nature (London)* **329**: 348-351.
- 32-Sundin, G. W., S. Shankar, S. A. Chugani, B. A. Chopade, A. Kavanaugh-Black, and A. M. Chakrabarty. 1996. Nucleoside diphosphate kinase from *Pseudomonas aeruginosa*: characterization of the gene and its role in cellular growth and exopolysaccharide synthesis. *Mol. Microbiol.* **20**: 965-979.
- 33-VanBogelen, R. A., P. M. Kelley, and F. C. Neidhardt. 1987. Differential induction of heat shock, SOS and oxidation stress regulons and accumulation of nucleotides in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169**: 26-32.
- 34-Vickery, L. E., J. J. Silberg, and D. T. Ta. 1997. Hsc66 and Hsc20, a new heat shock cognate molecular chaperone system from *Escherichia coli*. *Protein Sci.* **6**: 1047-1056.
- 35-West, S. E. H., H. P. Schweizer, C. Dall, A. K. Sample, and L. J. Runyen-Janecky. 1994. Construction of improved *Escherichia coli*-*Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19 and sequence of the region required for their replication in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* **128**: 81-86.
- 36-Zheng, L., V. L. Cash, D. H. Flint, and D. R. Dean. 1998. Assembly of iron-sulfur clusters. Identification of an *iscSUA-hscBA-fdx* gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. *J. Biol. Chem.* **273**:13264-13272.

15.- DISCUSION ADICIONAL DEL ANEXO 3.

15.1 CARACTERIZACION DE LA SECUENCIA NUCLEOTIDICA DE LA CLONA pUCP20:PL70

El análisis y caracterización de la región de ADN subclonada de la mutante W51M22 (incapaz de asimilar ácido 2-fenilpropiónico) es abordado en el anexo 3; sin embargo se comentaran algunas de las conclusiones finales.

Los resultados obtenidos en la caracterización de la mutante W51M22 mostraron el involucramiento de una proteína con características estructurales y funcionales de chaperona, que probablemente funcional en el plegamiento y estabilidad de proteínas. Para entonces los indicios mostraban que probablemente esta chaperona podría estar involucrada en el mecanismo degradativo de compuestos del tipo fenilalcanoatos de cadena menor de 4 carbonos ya que la cepa crece en los ácidos fenilhexanóico y fenilbutanóico, pero no en el ácido fenilpropiónico. Sin embargo, ensayos finales mostraron que el método de selección no fue el adecuado, ya que el compuesto 2PHPr posee una relativa hidrofobicidad por lo que en la preparación de medios de selección fue necesario disolverlo en pequeñas cantidades de etanol. El resultado final fue el aislamiento de una mutante afectada en la degradación de etanol y no específicamente en la degradación del ácido 2-fenilpropiónico. En presencia tanto de etanol como del ácido 2-fenilpropiónico el fenotipo de la cepa W51M22 fue más claro, por lo que no se descarta la posibilidad de que la proteína HscA esté involucrada en un mecanismo de respuesta a la acción tóxica del ácido 2-fenilpropiónico y compuestos relacionados. Los resultados mostraron una inducción de la expresión del gen *hscA* cuando la cepa W51D fue sometida a un shock de etanol y temperatura (42°C); resultado que está de acuerdo con la función de la HscA como chaperona molecular. El análisis transcripcional mostró dos sitios promotores típicos del reconocimiento de los factores σ^{32} y σ^E que podrían correlacionarse con la inducción por calor y etanol (Anexo 3). Finalmente, concluimos que el producto del gen *hscA* funciona como una chaperona involucrada en el fenómeno de respuesta generado por estrés desnaturalizante causado por calor o compuestos como el etanol y probablemente fenilalcanoatos.

"La tierra es para quien la trabaja"
Emiliano Zapata

VI.- PERSPECTIVAS EXPERIMENTALES

A N E X O 1

- Confirmación de la función de la proteína RhIG mediante el análisis de la actividad enzimática involucrada en la síntesis de ramnolípidos y PHAs en *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.
- Caracterización genética de la afección de producción de ramnolípidos y otros factores en la cepa *Pseudomonas aeruginosa* W51D.

A N E X O 2

- Caracterización de la regulación del gen *ctrA* en *Pseudomonas aeruginosa* W51D.
- Confirmación de la función de la proteína CtrA sobre la degradación del surfactante B-DBS mediante análisis enzimáticos, utilizando sustratos similares a los propuestos en la vía degradativa.
- Caracterización de los genes restantes de la vía degradativa del citronelol.
- Caracterización genética y dilucidación del segundo mecanismo que interviene en la degradación de la cadena alquílica del surfactante B-DBS en la cepa W51D.
- Dilucidación de la asimilación de compuestos bencénicos por la cepa W51D.
- Cuantificación de la virulencia de la cepa W51D que permita potencialmente ser utilizada en procesos de biorremediación de surfactantes y otros hidrocarburos.
- Expresión de los genes involucrados en la degradación del surfactante B-DBS en otros microorganismos heterólogos.
- Caracterización de la formación de biofilm en la cepa *Pseudomonas aeruginosa* W51D.

A N E X O 3

- Estudio de la función de la proteína HscA como chaperona molecular en respuesta a estrés por compuestos aromáticos.
- Caracterización de los genes involucrados en la termosensibilidad a 42°C en la cepa *Pseudomonas aeruginosa* W51D.

VII.- BIBLIOGRAFIA

- 1.-Alexander, M. 1973. Nonbiodegradable and other recalcitrant molecules. *Biotechnol. Bioeng.* 15: 611-647.
- 2.-Beidlingmaier & Schmidt, 1983. En: Cain, 1987.
- 3.-Bird, 1972. En: Cain, 1987.
- 4.-Cain et al. 1972. En: Cain, 1987.
- 5.-Cain, R. B. 1987. Biodegradation of anionic surfactants. *Biochem. Soc. Trans.* 15 (suppl): 7-22.
- 6.-Cain, R.B. 1992. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 55: 411-414.
- 7.-Cain, R. B. 1994. Biodegradation of detergents. *Curr. Opin. Biotechnol.* 5: 266-274.
- 8.-Campos-García, J., A. D. Caro, R. Nájera, R. M. Miller-Maier, R. A. Al-Tahhan, and Gloria Soberón-Chávez. 1998. The *Pseudomonas aeruginosa* *rhlG* gene encodes a NADPH-dependent β -ketoacyl reductase which is specifically involved in rhamnolipid synthesis. *J. Bacteriol.* 180: 4442-4451.
- 9.-Cantwell S. G., Edward P. L., David S. Watt and R. R. Fall. 1978. Biodegradation of Acyclic Isoprenoids by *Pseudomonas* Species. *J. Bacteriol.* 135: 324-333.
- 10.-Chakrabarty, A. 1985. En: *Biotechnology and Biodegradation*. 1989. Ed. D. Kamely, A. Chakrabarty and G. S. Omenn. PPC, Gulf Publishing Company. The Woodlands, Texas.
- 11.-Davison et al. 1990. Genetics of Vanillate and Sodium Dodecylsulfate degradation in *Pseudomonas*. En: *Pseudomonas* Biotransformation, Pathogenesis and evolving biotechnology. Ed. ASM. S. Silver et al. 1990.
- 12.-de Lorenzo, V., and K. N. Timmis. 1994. Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with *Tn5*- and *Tn10*-derived minitransposons. *Methods Enzymol.* 235: 386-405.
- 13.-Fall et al. 1973. En: Cain, R. B. 1987.
- 14.-Fall R. R., J. L. Bromn and T. L. Schaeffer. 1979. Enzyme Recruitment Allows the Biodegradation of Recalcitrant Branched Hydrocarbons by *Pseudomonas citronellolis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 38:715-722.
- 15.-Ferrari M.D., 1995. Preservación del medio ambiente: biodegradación y biorremediación En: Manual práctico de Biocorrosión y Biofouling para la Industria. Centro de investigaciones tecnológicas, Canelones, Uruguay.
- 16.-Friedman, A.M., S.R. Long, S.E. Brown, W.J. Bulkema and F.M. Ausubel. 1982. Construction of a broad host range cosmid cloning vector and its use in the genetic analysis of *Rhizobium* mutants. *Gene* 18: 289-296.
- 17.-Focht and Williams, 1970. En: Cain, 1987.
- 18.-Grady Jr.,1985. *Biotechnol. Bioeng.* 27: 660-674.
- 19.-Greek, B. F. & Houston, 1991. Sales of detergents growing despite recession. *Chem. Engin. News* 69: 25-52.
- 20.-Hammerton, 1955. En: Cain, 1987.
- 21.-Harayama S., M. Kok and E.L. Neidle. 1992. Functional and Evolutionary Relationships Among Diverse Oxygenase. *Ann. Rev. Microbiol.* 46: 565-601.
- 22.-Harder J. and C. Probian. 1995. Microbial Degradation of Monoterpenes in the Absence of Molecular Oxygen. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3804-3808.
- 23.-Holloway B.W. 1996. *Pseudomonas* Genetics and Taxonomy. En: *Molecular Biology of Pseudomonas*. p. 22-32. Ed. ASM -1996.
- 24.-Huddleston and Allred,1963. En: Cain, 1987.
- 25.-Jiménez L., A. Breen, N. Thomas, T. W. Federle and G. S. Saylor. 1991. Mineralization of Linear Alkylbenzene Sulfonate by a Four-Member Aerobic Bacterial Consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1566-1569.)
- 26.-Kamely, D., A. Chakrabarty and G.S. Omenn. 1989. En: *Biotechnology and Biodegradation*.
- 27.-Keefe and Harder,1991. En: Cain, 1994.
- 28.-Kertesz M.A., P. Kölbener, H. Stockinger, S. Bell and A.M. Cook. 1994. Desulfonation of Linear Alkylbenzenesulfonate Surfactants and Related Compounds By Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2296-2303.
- 29.-Knackmuss, 1981. En: Cain, 1987.
- 30.-Kohler HP. E., M. J.E.C. van der Maarel and D. Kohler-staub. 1993. Selection of *Pseudomonas* sp. strain HBP1 Prp for metabolism of 2-Propylphenol and Elucidation of the degradative Pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* 860-866.
- 31.-Kokotek W. and W. Lotz. 1991. Construction of a mobilizable cloning vector for site-directed mutagenesis of Gram-negative bacteria: application to *Rhizobium leguminosarium*. *Gene* 98: 7-13.
- 32.-Kolbel et al. 1967. En: Cain, 1987.
- 33.-Leahy, J.G. & Colwell, R.R. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the Environment. *Microbiol. Rev.* 54: 305-315
- 34.-Leidner et al., 1980. En: Cain, 1994.
- 35.-Mackinney & Symons, 1959. En: Cain, 1987.
- 36.-Marcomini A. & W. Giger, 1987. Simultaneous determination of Linear alkylbenzenesulfonates, alkylphenol polyethoxylates and Nonylphenol by High-performance liquid chromatography. *Anal. Chem.* 59: 1709-1715.
- 37.-McKenna & Kallio, 1971. En: Cain, 1987.
- 38.-Overath et al. 1969. En: Cain, 1987.
- 39.-Owen R.T. and G. F. White. 1991. Immobilization of surfactant-degrading bacterium

- Pseudomonas* C12B in polyacrylamide gel. Enzyme Microbiol. Technol. 13:338-343.
- 40.-Pflugmacher U., B. Averhoff and G. Gottschalk. 1996. Cloning, Sequencing and Expression of Isopropylbenzene Degradation Genes from *Pseudomonas* sp. strain JR1: Identification of Isopropylbenzene Dioxygenase that Mediates trichloroethene oxidation. Appl. Environ. Microbiol. 62: 3967-3977.
- 41.-Pirnik M.P., R.M. Atlas and R. Bartha. 1974. Hydrocarbon Metabolism by *Brevibacterium erythrogenes*: Normal and Branched Alkanes. J. Bacteriol. 119:868-878.)
- 42.-Pirnik M. P. and E.J. MacKenna. 1977. Microbial oxidation of methyl branched alkanes. Critical Rev. Microbiol. 413-422.
- 43.-Reinecke, 1984. En: Cain, 1987.
- 44.-Rivet L., G. Mille, A. Basseres, A. Ladousse and J.C. Bertrand. 1993. N-Alkane Biodegradation by a Marine Bacterium in the presence of an Oleophilic Nutrient. Biotechnol. Lett. 15: 637-640.
- 45.-Robson, 1986. En: Cain, 1987.
- 46.-Rontani J.F., M. J. Gilewicz, V. D. Michotey, T. L. Zheng, P. C. Bonin and J.C. Bertrand. 1997. Aerobic and Anaerobic Metabolism of 6,10,14-trimethylpentadecan-2-one by a Denitrifying Bacterium Isolated from Marine Sediments. Appl. Environ. Microbiol. 63: 636-643.).
- 47.-Ryckman & Sawyer, 1957. En: Cain, 1987.
- 48.-Sawyer et al. 1956. En: Cain, 1987.
- 49.-Schaeffer T. L., S.G. Cantwell, J.L. Brown, D.S. Watt and R. R. Fall. 1979. Microbial Growth on Hydrocarbons: Terminal Branching Inhibits Biodegradation. Appl. Environ. Microbiol. 38: 742-746.
- 50.-Sevbert and Fass, 1964. En: Fall et al. 1979.
- 51.-Sharman, 1964. En: Sweeney & Anderson, (1989)
- 52.-Sigollot J.C. and M.H. Nguyen. 1992. Complete Oxidation of Linear Alkylbenzene Sulfonate by Bacterial Communities Selected from Coastal Seawater. Appl. Environ. Microbiol. 58:1308-1312.).
- 53.-Soberón-Chávez, G, A. Haïdour, J. L. Ramos, J. Campos, and J. Ortigoza. 1996. Selection and preliminary characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* strain mineralizing some isomers in a branched-chain dodecylbenzene sulfonate mixture. World J. Microbiol. Biotechnol. 12: 367-362.
- 54.-Steinberg et al. 1967. En: Cain, 1987.
- 55.-Stephenson & Stephenson, 1992. Bioaugmentation for enhancing biological Wastewater treatment. Biotech. Adv. 10:549-559.
- 56.-Stokke, 1966. En: Cain, 1987.
- 57.-Sweeney & Anderson, (1989). Biodegradability of alkylbenzene sulfonates. JAOCS, 66: 1844-1849.
- 58.-Swisher, R. D. 1963. Biodegradation of ABS in relation to chemical structure. J. Water Pollution Control Federation 35: 877-892.
- 59.-Swisher, R.D.1969. En: Cain, 1987.
- 60.-Smith, M. R. 1990. The biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria. Biodegradation 1: 191-206.
- 61.-Watson & Jones, 1979. En: Cain, R. B. 1987.
- 62.-Robson, 1986. En: Cain, R. B. 1987.
- 63.-West, S.E.H., & B.H. Iglewski. 1988. Codon usage in *Pseudomonas aeruginosa*. Nucleic Acids Res. 16: 9323-9329.
- 64.-Willetts & Cain, 1970. En: Cain, 1987.
- 65.-Willetts & Cain, 1972. En: Cain, 1987.
- 66.-Willetts, 1974. En: Cain, 1987.
- 67.-Witholt B., M.J. de Smet, J. Kingma, J. B. van Beilen, M. Kok, R.G. Lageveen and G. Eggink. 1990. Bioconversion of aliphatic compounds by *Pseudomonas oleovorans* in multiphase bioreactors: background and economic potential. TIBTECH 8:46-52.