

UCH - FC
Biotecnología
M453
C.1

UNIVERSIDAD DE CHILE FACULTAD DE CIENCIAS ESCUELA DE PREGRADO



**“CARACTERIZACIÓN DE LA BACTERIA
PSEUDOMONAS SP. B4 CON NIVELES DEFICIENTES
DE LOS POLIFOSFATOS INORGÁNICOS”**

Seminario de Título
entregado a la Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al Título de
Ingeniera en Biotecnología Molecular



CECILIA RAQUEL MAURIACA FLORES

Director de Seminario de Título: Dr. Carlos A. Jerez Guevara

Co-Director de Seminario de Título: Dr. Francisco P. Chávez Espinosa

Diciembre 2009

Santiago - Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por al Srta. Cecilia Raquel Mauriaca Flores

“CARACTERIZACIÓN DE LA BACTERIA *PSEUDOMONAS SP. B4* CON NIVELES DEFICIENTES DE LOS POLIFOSFATOS INORGÁNICOS”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular.

Dr. Carlos A. Jerez Guevara
Director Seminario de Título

Dr. Francisco P. Chávez Espinosa
Co-Director Seminario de Título



Comisión de Evaluación

Dra. Rosalba Lagos Monaco
Presidente Comisión

Dr. Marcelo Baeza Cancino
Evaluador

Santiago de Chile, Diciembre de 2009

Biografía



Nací en Santiago, el 15 de Abril de 1984. Mi madre es Elisa Flores, y mi padre es Ildelfonso Mauriaca. Soy la hermana mayor (y segunda madre) de dos hermanos, Ildelfonso y Oscar. Hija de dos nortinos y casi sin familia en Santiago, pasé casi todos los veranos en Antofagasta con mis abuelos maternos. Como mis dos padres son trabajadores de tiempo completo, mi crianza durante el día estuvo a cargo básicamente de dos personas maravillosas: Wilma Milla y María Catriquir.

Entré a tercero básico, y terminé mi enseñanza media, en el colegio Altamira. Durante mi tiempo en el colegio participé en variadas actividades sociales y educativas, y hay 3 que especialmente me marcaron: 1) el proyecto de integración Fonadis-Fondeff de mi colegio con un colegio con niños con deficiencia mental; 2) en tercero y cuarto medio fui tutora del club de ciencias para la básica; 3) también durante los últimos años fui monitora de la escuela de verano que se desarrolla en el colegio en enero para integrar a los nuevos alumnos de básica con los antiguos. A partir de ésta última, al finalizar cuarto medio participé también de una escuela de verano organizada por la Fundación Mercator en Salamanca, región de Coquimbo para realizar alfabetización digital y enseñar a emprender a jóvenes de la zona. Esa ha sido posiblemente la experiencia más gratificante que he realizado en mi vida.

El año 2002 entré al Programa de Bachillerato de la Universidad de Chile, con absoluta indecisión acerca de la carrera que elegir. A mediados del primer año de Bachillerato participé activamente del Centro de Estudiantes de Bachillerato (CEBa) inicialmente como secretaria general y posteriormente como vicepresidenta.

El año 2003 comencé a tomar ramos de la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular y en el año 2004 me cambié a esa carrera. Al finalizar el 2004 me gradué como Bachiller con mención en Ciencias Naturales y Exactas.

El año 2005 me gané la Beca Santander-CEAL, y por ello en febrero del 2006 me fui a cursar un semestre en la Universidad Autónoma de Madrid, experiencia académica y culturalmente enriquecedora. El segundo semestre me reincorporé a la carrera y en septiembre de ese mismo año entré al Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología, del Dr. Carlos Jerez a cargo del ahora Dr. Francisco Chávez. El primer semestre del 2007 fue mi último semestre de ramos de la carrera. Ese mismo año, en el segundo semestre realicé mi Seminario de Título.



A mis padres
Con mucho cariño



Agradecimientos

Este seminario de Título es la finalización de una etapa, y por eso quiero agradecer a quienes me acompañaron, ayudaron, estudiaron conmigo, compartimos los recreos, laboratorio, etc durante estos años de universidad.

Mi paso por bachillerato fue importantísimo para llegar a la biotecnología, y por eso no quiero dejar de agradecer a quienes trabajan ahí y me ayudaron en todo lo que necesité, siempre eficientes y preocupados, demostrando que es posible que las cosas funcionen bien en la U. A la tía Bety y su clan de la biblioteca, con quienes nos encontrábamos pidiendo consejos cada vez que había algún problema, se agradece mucho el tiempo dedicado a ayudar incluso es saber qué micro me sirve para llegar a la torre 15. A la Sra Guillermina, quien nos ayudó mucho cuando era parte del centro de estudiantes, y gracias por la confianza depositada para representar al programa en tantas ocasiones. Por supuesto a las secres, la Ange y la Emita, por la eficiencia y la disposición (y los retos cuando era necesario también). Al Dr Babul, a Julio, Alex, y a todos los que trabajan ahí.

A mis amigos de bachillerato: los humanistas, los del D, los bachitecs, mis compañeros del CeBa, y los chicos de fútbol. Especialmente a mis queridas amigas Andrea y Tábata: juntas descubrimos lo que significa ser estudiante universitario, sufrimos con las matemáticas, y descubrí que las ciencias naturales eran lo mío (y no lo de ellas, jajaja). Gracias Andrea por tu preocupación casi maternal, y tu ejemplo de fortaleza a toda prueba. Gracias Tábata por entenderme (y superarme) en esto de hacer mil cosas a la vez, por las chácharas frívolas para olvidarse del mundo, y por hacerte un tiempo cuando parece la agenda está por explotar. Al Pesado, por compartir el estudio de las matemáticas (todo un sufrimiento), economía, y otros ramos siempre con humor (aunque un poco pesimista). A la Daniella, por compartir el gusto por la "clase" de historia, y ser un ejemplo de perseguir lo que te apasiona. Al Iván, por ayudarme todos estos años con las ciencias exactas.

A los bachitecs, que compartimos juntos los horarios extensos, que incluían clases hasta las 9 pm y laboratorios de química orgánica los sábados.

A mis compañeros de carrera con los que compartí casi 5 años de ramos, tardes de estudio, desvelos por informes, etc. Especialmente a la Ine por ser la mejor compañera de informes, tener la película apropiada para cada momento, y porque nos hemos acompañado en todo lo que ha pasado en estos años. A la Pauli por la preocupación, cariño, fortaleza y las comidas que prepara. Al Kuri, por ser un gran compañero de trabajos, y de ayudantía y por ser un gran amigo. Al Vicho, porque compartimos largas jornadas de estudio y muchos proyectos científicos y porque nos conocemos desde el comienzo (bachillerato). A la Dany por las muchas tardes y noches de estudio que compartimos. Y a todos mis otros compañeros que no están nombrados pero que formaron parte de este proceso e hicieron de una u otra manera que recuerde mis años de estudiante de forma muy feliz.

A la beca Santander-CEAL por permitirme cursar un semestre en la Universidad Autónoma de Madrid, y a la gente maravillosa que conocí allá. A las chicas con las que viví, especialmente a la Coni. A mis amigos de la residencia, especialmente al Luis y al Oscar, con los que compartí el tiempo libre, las salas de estudio, los almuerzos, algunas salidas, asados, viajes, cantos, etc. Muy especialmente a Gabriela, por el gran cariño y confianza, te recordaré siempre.

A mis tutores y compañeros de laboratorio. Quiero agradecer la confianza plena que me dio el Fran para trabajar con él. Al profe, por permitirme hacer mi tesis en su laboratorio. Al Felipe, por introducirme en el mundo Pseudomonas. Al Cristian, por el gusto por el orden, sobretodo en el mesón. Al Fernando por compartir las mañas, los lápices, el café y las papitas, y especialmente por la preocupación silente pero constante. A la Rafa, por ser una gran compañera y amiga, por la co-organización de tantos eventos, y por tu la disposición a toda prueba. Al Andrés Lagos, por compartir las mañanas. Al Andrés Villa, con la alegría, la confianza, preocupación y buenas vibras. Al Coto por la compañía, la cooperación en la corrección de la tesis y el trabajo del laboratorio en general, y la complicidad con el orden del laboratorio. Al Simón por la disposición y la buena onda, así como por la pedagogía y el ánimo para enseñar. A la Lissette y Mauricio Acosta, por las enseñanzas cuando entré al laboratorio. Al Álvaro por la buena onda en el lab, compartir el curso de inglés, y aportar al humor en el lab. Claudio, por la ayuda con la biología molecular y enseñarme que la maña está permitida en la ciencia. Rodrigo, por aportar a la buena onda del laboratorio y por cambiar la forma de hablar de futbol en el laboratorio. A las nuevas incorporaciones, con que comparto los días de laboratorio: Camilo, Macarena, Josefina, Daniela, y Cristóbal, gracias por la buena onda. Muchas gracias a Don Juan, por hacer que el laboratorio funcione.

También quiero agradecer a los integrantes del laboratorio de Comunicación Bacteriana. A Nicolás, Alex, Lina, Matías, Álvaro, Pilar, Mauricio, Natalia, Juan José, por las discusiones científicas y los asados y actividades extraprogramáticas. Muy especialmente a mis queridas amigas Vale y Coté, por el cariño, compañía, complicidad, gracias por los paseos, noche de niñas, vacaciones, carretes, etc, las quiero mil.

Y especialmente, y más que un agradecimiento es una dedicatoria, a mi familia. Quienes sin tener mucha idea de qué hago ni cómo, lo encuentran fascinante e interesante. Gracias por el apoyo, la compañía, por compartir las tallas ñoñas. Gracias papás por todo, al Ilde por unirse al lado ñoño de la vida (aunque no lo quieras), al Oscar porque sí, y a Elana porque es la única que entiende lo que hago (y digo, cuando hablo de ciencia). Gracias a mi tío Carlos por todo el cariño. Gracias a mi prima Coté por ser mi confidente. Y a toda mi familia, por el orgullo que esto les significa.



Índice de contenidos



1. Introducción.....	1
1.1. Los polifosfatos (poliP)	1
1.2. Los poliP y la respuesta al estrés y la carencia.....	5
1.3. Los poliPs y su relación con la respuesta a los metales pesados.....	8
1.4. La bacteria <i>Pseudomonas sp</i> B4 es hiperacumuladora de poliP	11
1.5. Hipótesis	16
1.6. Objetivo general.....	16
1.7. Objetivos específicos	16
2. Materiales y métodos	17
2.1. Materiales	17
2.1.1. Cepas bacterianas y plásmidos	17
2.1.2. Medios de cultivo	18
2.2. Métodos	18
2.2.1. Determinación de la MIC de metales	18
2.2.2. Curvas de crecimiento.....	19
2.2.3. Respuesta al Cu	20
2.2.4. Ensayos de estrés por pH	20
2.2.5. Shock térmico	20
3. Resultados	22
3.1. Resistencia a metales pesados	22
3.1.1. Resistencia al Cu	22
3.1.2. Resistencia a otros metales	23
3.2. Curvas de crecimiento.....	24



3.3. Respuesta a un estrés rápido por Cu.....	26
3.4. Ensayo de estrés por pH.....	27
3.5. Estrés térmico.....	28
4. Discusión.....	30
4.1. Efecto de los metales pesados en bacterias <i>Pseudomonas sp. B4</i> con niveles deficientes de poliP.....	30
4.2. Efecto del Cu sobre el crecimiento.....	34
4.3. Estrés y adaptación frente al Cu.....	36
4.4. Efecto del pH sobre la viabilidad.....	37
4.5. Respuesta al estrés térmico.....	38
5. Conclusiones.....	42
6. Bibliografía.....	43



Índice de tablas

Tabla 1. Contenido de poliP que alcanzan algunos microorganismos conocidos.....	4
Tabla 2. Cepas recombinantes y plásmidos utilizados.....	17
Tabla 3. Resumen de las MICs obtenidas para las cepas poliP(-) y poliP(+) de <i>Pseudomonas sp.</i> B4 frente a diferentes metales pesados.....	23
Tabla 4. Tiempos generacionales de crecimiento de las cepas poliP(+) y poliP(-) sin Cu y con 8 mM Cu.....	26
Tabla 5. Número de células viables presentes antes y después de 60 min de incubación a 50 °C	29



Índice de figuras

Figura 1. La molécula de poliP.....	1
Figura 2. Las funciones regulatorias del poliP.....	6
Figura 3. Las dos cepas de <i>Pseudomonas sp.</i> B4 recombinantes tienen distintos niveles de poliP.....	13
Figura 4. Morfología celular y de la colonia de las cepas poliP(+) y poliP(-).....	14
Figura 5. Esquema del ensayo de determinación de la MIC de Cu en placa de 96 pocillos.....	19
Figura 6. Curvas de adaptación de <i>Pseudomonas sp.</i> B4 cepas poliP(+) y poliP(-) a Cu.....	22
Figura 7. Determinación de la inhibición del crecimiento de <i>Pseudomonas sp.</i> B4 en hierro, níquel y cadmio.....	24
Figura 8. Curvas de crecimiento de las cepas de <i>Pseudomonas sp.</i> B4 en ausencia y en presencia de Cu.....	25
Figura 9. Seguimiento de la viabilidad de las cepas poliP(+) y poliP(-) en medio con Cu.....	26
Figura 10. Efecto del pH en el crecimiento de <i>Pseudomonas sp.</i> B4 cepas poliP(+) y poliP(-).....	27
Figura 11. Shock térmico con células en fase exponencial de <i>Pseudomonas sp.</i> B4 cepas poliP(+) y poliP(-).....	28

Lista de Abreviaturas

ADP: Adenosin difosfato

ATP: Adenosin trifosfato

DO: Densidad óptica

GTP: Guanosin trifosfato

LB: Medio Luria Bertani

LBM: Medio LB con MOPS

MIC: Concentración mínima inhibitoria

PCB: Policlorobifenilo

PHB: Poli-(R)-3-hidroxitirato

Pi: Fosfato inorgánico

poliP: Polifosfato

PPK: Polifosfato quinasa

pppGpp: Guanosina pentafofosfato

ppGpp: Guanosina tetrafofosfato

PPX: Exopolifosfatasa

RNA: Ácido ribonucleico

ROS: Especies reactivas de oxígeno

rRNA: RNA ribosomal

T: Trimetoprina

UFC: Unidades formadoras de colonias

Resumen

Los polifosfatos (poliP) son biopolímeros lineales que se han encontrado en todos los seres vivos y están formados por residuos de ortofosfato unidos por enlaces fosfoanhídrido. La importancia de los poliP radica en sus numerosas y variadas funciones que dependen de su localización (especie, célula o compartimiento celular) y cuándo se necesiten. Los poliPs se sintetizan principalmente a partir de ATP por la enzima polifosfato quinasa (PPK) y se degradan a fosfato inorgánico (Pi) por la acción de la exopolifosfatasa (PPX). La regulación de estas dos enzimas es determinante para los niveles de poliP que se encuentren dentro de la célula.

La bacteria *Pseudomonas sp.* B4 es una bacteria degradadora de los contaminantes ambientales policlorobifenilos (PCBs), y es capaz de acumular una gran cantidad de poliP en diferentes condiciones de cultivo. En el laboratorio contamos con dos cepas recombinantes de la bacteria *Pseudomonas sp.* B4, una con el fenotipo silvestre, y la otra con niveles deficientes en los poliP. Estas cepas permiten realizar estudios comparativos, para estudiar el efecto que tiene la carencia de los poliP en la célula frente a diversas condiciones. Anteriormente se vio que las células en carencia de poliP sufren cambios en la morfología de la colonia, a la vez que se alargan en la fase estacionaria. El objetivo de esta investigación fue estudiar la respuesta diferencial de las dos cepas ante diversas situaciones de estrés como los causados por metales pesados, pH y altas temperaturas.

En este Seminario de Título se vio que la presencia del poliP en la célula es importante para la resistencia a los metales pesados como el Cu, Fe y Cd. Sin embargo, esto no sería un fenómeno generalizado para todos los metales, como se vio en el caso del Ni. La presencia de Cu desde el comienzo del crecimiento, fenómeno de adaptación, genera una prolongación de la fase de latencia, que es incluso mayor para

la cepa con niveles deficientes de poliP. Además las dos cepas alcanzan densidades ópticas menores en cultivos con Cu. Cuando se agrega Cu a cultivos en activo crecimiento, (shock del metal) ocurre una baja considerable del número de células viables en el cultivo. Posteriormente ocurre una recuperación del título del cultivo, cuya rapidez dependería de los niveles de los poliP en la célula previo al estrés inducido por el metal.

Las dos cepas en estudio no mostraron cambios detectables en su crecimiento a diferentes valores de pH. Por otro lado, se realizaron experimentos de estrés por temperatura, demostrando que las cepas con contenido normal de poliP pueden sobrellevar mejor las altas temperaturas.

Los resultados de esta investigación apoyan la participación de los poliP como una molécula protectora frente a diversos tipos de estrés, y en particular en la resistencia frente a los metales pesados.

Abstract

Polyphosphates (polyP) are linear biopolymers that have been found in all living organisms. They are formed from residual orthophosphates connected by phosphoanhydride bonds. The importance of polyP lies in its numerous and varied functions which are dependent upon its location (species, cell or cellular compartment) and under what circumstances it is needed. PolyP is principally synthesized from ATP by polyphosphate kinases (PPKs) and is degraded to inorganic phosphate (Pi) by exopolyphosphatase (PPX). The regulation of the two aforementioned enzymes is a determinant factor for the levels of polyP found in a cell at any given time.

The microorganism *Pseudomonas sp.* B4 is a bacterium with the ability of degrading the environmental contaminants, polychlorobiphenyls (PCBs). It is also able to accumulate a significant amount of polyP under different culture conditions. In our laboratory two recombinant strains of *Pseudomonas sp.* B4 were studied, one with the wild-type phenotype, and the other with deficient levels of polyP. These strains allowed us to perform comparative studies of the effects on polyP deficiency in cells under a variety of conditions.

The aim of this investigation was to find out if the two strains responded in a similar manner when faced with diverse situations of stress represented by heavy metals, pH variation, and high temperatures.

In this work it was shown that the presence of polyP in the cell is important for its resistance to heavy metals studies, Cu, Fe and Cd. However, this was not a generalized phenomenon for all heavy metals, as illustrated by the results obtained with Ni. The presence of Cu in the culture from the beginning of growth, as an adaptive phenomenon, caused a delay in the lag phase. This lag phase was more extended in the strains lacking polyP. Both strains reached lower optical densities in cultures in the

presence of Cu, compared to those grown in the absence of Cu. When cultures previously grown in the absence of Cu were faced with this metal, a considerable loss of viable cells was seen in the culture. This was followed by a recovery whose speed was dependent on the levels of polyP existing in the cell previous to the stress induced by the metal.

The two *Pseudomonas sp.* B4 strains used in this study showed no detectable changes in their growth in response to different levels of pH. On the other hand, cells subjected to higher temperatures showed that strains containing normal levels of polyP better overcome these conditions of stress.

The results of this investigation support the hypothesis for the role of polyP as a molecule capable of protecting the cells from diverse types of stress, and in particular the resistance to heavy metals.

1. Introducción

1.1. Los polifosfatos (poliP)

El fósforo es un elemento esencial del metabolismo celular, e indispensable para la energía, y la biosíntesis del DNA, el RNA, las proteínas, y los fosfolípidos. Es por ello que las células deben asegurar un nivel estable de fosfato inorgánico (Pi) o de nutrientes que contienen fósforo. Una forma de acumular Pi es mediante el biopolímero denominado polifosfato (poliP). El poliP es un polímero lineal formado por centenas de residuos de ortofosfato que se encuentran unidos mediante los enlaces fosfoanhídrido (Figura 1) (Kornberg, 1995). Este polímero se ha encontrado en todos los tipos celulares, desde arqueas hasta eucariontes superiores (Kornberg y col., 1999), y presenta variadas y diferentes funciones.

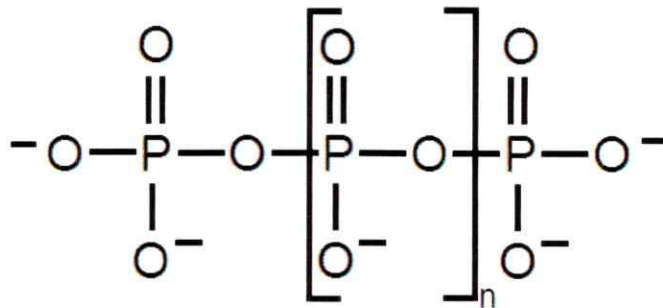


Figura 1. La molécula de poliP.

El poliP alcanza niveles importantes en algunos organismos, especialmente en las vacuolas de las levaduras, organismo donde incluso alcanza hasta un 10-20 % del peso seco celular (Kornberg y col., 1999). En *Escherichia coli* los niveles de poliP no llegan a ser tan altos con respecto a otras bacterias, sin embargo son sumamente fluctuantes, llegando incluso a aumentar 1000 veces durante la fase estacionaria de crecimiento, respecto de la fase exponencial (Kuroda y Ohtake, 2000).

Entre las funciones que se le han adjudicado a este polímero en los microorganismos estudiados están: 1) fuente de energía para la síntesis del ATP; 2) sustituto del ATP en la fosforilación de la glucosa y algunas proteínas; 3) reserva de Pi; 4) quelante de los cationes divalentes; 5) amortiguador intracelular frente al álcali; 6) regulador del desarrollo celular, y finalmente 7) regulador de los ajustes celulares ante condiciones de carencia y estrés (Kornberg, 1995; Kornberg y col., 1999; Chávez y col., 2004). Numerosas enzimas son capaces de utilizar directamente los poliP, lo que contribuye a su participación en diversos procesos celulares. Entre ellas están: la polifosfato depolimerasa, la NAD quinasa dependiente de poliP, la polifosfato fructoquinasa, la polifosfato monoquinasa y la polifosfato glucoquinasa (Nesmeyanova, 2000).

Adicionalmente, se ha visto la asociación de este polímero con otro polímero celular, el poli-(R)-3-hidroxi-butirato (PHB). El PHB es un polímero lineal de (R)-3-hidroxi-butirato, de bajo peso molecular (<14 kDa) y que, al igual que el poliP, parece ser un constituyente universal de las células. El complejo que se genera a partir de estos dos polímeros forma canales dependientes del voltaje, selectivos a cationes divalentes (Reusch, 2000).

El metabolismo del poliP en las células es dinámico, y su nivel celular está determinado principalmente por la acción de dos enzimas: la polifosfato quinasa (PPK1) y la exopolifosfatasa (PPX). Los genes de estas dos enzimas, se han estudiado por su influencia en el metabolismo de los poliP, y en *E. coli* se encuentran formando un operón (Akiyama y col., 1993).

La enzima PPK1 cataliza la polimerización del poliP, y realiza la transferencia del fosfato terminal del ATP al poliP. Esta reacción es reversible, dando lugar a la síntesis de ATP desde ADP y poliP, lo que sólo ocurre ante un exceso de ADP (Ahn y Kornberg,

1990). En algunas bacterias existe una segunda polifosfato quinasa (PPK2), la que en condiciones normales cumple funciones esencialmente distintas. Esta enzima se encontró en mutantes nulos del gen *ppk1* en *Pseudomonas aeruginosa*, y es la responsable del 20 % del poliP que se encuentra en dichos mutantes que no poseen la PPK1 (Zhang y col., 2002). La cinética de la PPK2 favorece 75 veces la reacción de síntesis del GTP a partir de los poliP; y para la síntesis de los poliP puede utilizar tanto ATP como GTP, a diferencia de la PPK1 que sólo utiliza ATP (Zhang y col., 2002).

Por otro lado, existen básicamente 2 enzimas que degradan el poliP: la exopolifosfatasa, que hidroliza los extremos de las cadenas de poliP, liberando Pi y la endopolifosfatasa, que cliva el poliP internamente, generando cadenas cortas (Kornberg y col., 1999). De estas dos, la más importante respecto de la influencia que ejerce sobre los niveles de poliP es la PPX. En *Saccharomyces cerevisiae* se han encontrado varias exopolifosfatasas, siendo la mejor caracterizada la citoplasmática, que se denomina PPX1; esta enzima tiene una tasa de degradación de los poliP más alta que la de *E. coli* (Akiyama y col., 1993; Wurst y Kornberg, 1994).

Los niveles del poliP pueden ser manipulados genéticamente a través de mutantes y recombinantes en los que las enzimas involucradas en el metabolismo de dicho polímero se encuentren alteradas. Los mutantes de *E. coli* obtenidos al escindir el gen *ppk1* retienen sólo un 2 % de la actividad PPK1, comparados con la cepa silvestre. A su vez, la sobreexpresión del gen *ppk1*, mediante un plásmido de alto número de copias resulta en un aumento de 100 veces en los niveles de los poliP, lo que incluso puede llevar a una pérdida de la viabilidad, lo cual también puede ocurrir al sobreexpresar la PPX (Kornberg y col., 1999). Otra aproximación fue la elaboración de mutantes en los que estos genes son inducibles de forma independiente. Con ello se comprobó que al inducir el gen *ppk1* ocurre una sobreproducción de la PPK1, y consecuentemente una

gran acumulación de poliP. La inducción del gen *ppx* libera Pi desde el poliP (Van Dien y col., 1997). El fosfato liberado del poliP permitió el crecimiento de células en carencia de fosfato y fue secretado al medio, produciendo una regulación negativa de la respuesta a la carencia de fosfato (Van Dien y col., 1997).

Los niveles de los poliP fluctúan enormemente según el estado celular, el medio de cultivo utilizado y la fase del crecimiento (Kornberg y col., 1999). Esto generalmente se condice con los cambios en la actividad de las respectivas enzimas que lo producen y lo consumen. Por ejemplo, en *E. coli* los niveles más altos de actividad PPK1 se alcanzan cuando las células están en el inicio de la fase estacionaria, momento en el cual la actividad PPX es menor (Kornberg y col., 1999). Adicionalmente a las variaciones mencionadas arriba, existe una variación intrínseca del nivel estacionario del poliP (concentración estable de poliP dentro de la célula) que en *E. coli* llega ser de un 20 % en idénticas condiciones de crecimiento (Van Dien y col., 1997). En la tabla 1 se pueden ver los niveles de poliP que pueden alcanzar algunas especies de microorganismos.

Tabla 1: Contenido de poliP que alcanzan algunos microorganismos conocidos.

Especie	poliP (nmoles de Pi / mg de proteína)	Referencia
<i>Pseudomonas sp. B4</i>	400-500	Chávez y col., 2004
<i>Escherichia coli</i>	50	Rao y col., 1998
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	300-400	Kim y col., 1998
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	300-400	Alvarez y Jerez, 2004
<i>Sulfolobus metallicus</i>	200	Remonsellez y col., 2006

1.2. Los poliP y la respuesta al estrés y la carencia

En ciertas condiciones de estrés y carencia el poliP tiene una función regulatoria muy importante. Un ejemplo es la adaptación a la fase estacionaria; donde se observó que las células con los niveles deficientes de los poliP no poseen una fase estacionaria extendida (Crooke y col., 1994). Adicionalmente se vio que los mutantes carentes del poliP (por interrupción del operón *ppk1-ppx*) mostraron un gran retraso en la reanudación del crecimiento, respecto de la cepa silvestre (Crooke y col., 1994).

En condiciones normales, las células de *E. coli* silvestres al entrar a la fase estacionaria desarrollan una pronunciada tolerancia al calor entre 55 y 57 °C (Jenkins y col., 1990). Sin embargo, se ha visto que los mutantes con los niveles deficientes de poliP en esta bacteria presentan una alta sensibilidad al calor (Crooke y col., 1994; Rao y Kornberg, 1996). En general, las células que se encuentran en fase estacionaria resisten mejor las condiciones adversas, y es por ello que se dice que los mutantes de *E. coli* carentes de poliP son deficientes en las funciones celulares expresadas en la fase estacionaria del crecimiento (Rao y Kornberg, 1996). Por lo tanto, se ha propuesto que los poliPs participan en la reprogramación genética desde el crecimiento exponencial al de sobrevivencia en las condiciones de la fase estacionaria (Kulaev, 2000).

Por otra parte, en *E. coli* como respuesta a la carencia de los aminoácidos, aumentan los niveles de los poliPs, y de los nucleótidos ppGpp y pppGpp, que participan en la respuesta frente a la escasez de aminoácidos. En las células que sufren esta carencia, los niveles de dichos nucleótidos aumentan, alcanzando concentraciones que *in vitro* son inhibitorias para la enzima PPX (Kuroda y col., 1997) (Figura 2). Esta inhibición no afecta a la PPK1 y podría explicar los altos niveles de poliP que se alcanzan frente a ciertas condiciones celulares de estrés, como las mencionadas antes

(Kuroda y Ohtake, 2000), y pese a que ambos genes se encuentran formando un operón. Para la respuesta a la carencia de los aminoácidos es necesaria la detención de la síntesis de ciertas proteínas y la activación de la degradación intracelular de otras, lo que sucede en presencia de altos niveles de poliP (Figura 2). Primero ocurre la producción de los nucleótidos ppGpp y pppGpp por la proteína asociada al ribosoma RelA, en respuesta a la presencia de tRNAs no aminoacilados. Esta proteína produce ppGpp desde pppGpp, lo que conlleva una alteración en la transcripción, debido a que se une ppGpp a la RNA polimerasa, suspendiendo la producción de rRNA, y de esta forma se evita que la célula ocupe energía en la generación innecesaria de ribosomas (Farr y Kogoma, 1991; Magnusson y col., 2005). Por otro lado, la unión del poliP a la proteinasa Lon lleva a la degradación de determinadas proteínas ribosomales libres, de

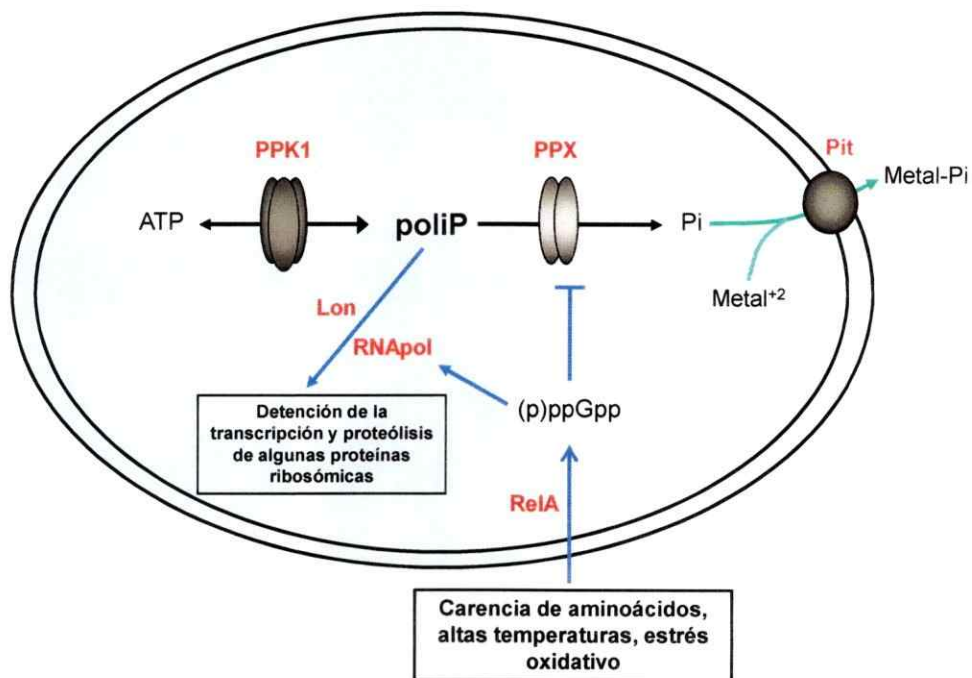


Figura 2. Las funciones regulatorias del poliP. Los niveles celulares de los poliPs están principalmente determinados por las enzimas PPK1 y PPX (flechas negras). La respuesta celular debido a situaciones de estrés y carencia se encuentra esquematizada con flechas azules. El modelo propuesto de interacción de los cationes metálicos con el poliP está con flechas verdes. Adaptado de Kuroda y Ohtake (2000) y van Veen (1997).

manera de liberar aminoácidos para las funciones celulares indispensables ante una situación de carencia celular de aminoácidos (Kuroda y col., 2001; Kuroda, 2006). Sin embargo, también se observó la acumulación del poliP de forma independiente a los nucleótidos pppGpp y ppGpp (Kuroda y Ohtake, 2000).

Por otro lado, se ha observado una protección por parte del poliP sobre el estrés oxidativo. Una célula puede desencadenar una respuesta al estrés oxidativo ya sea por la presencia de moléculas reactivas del oxígeno (ROS) o por una disminución de las moléculas antioxidantes propias de la célula. Una respuesta de este tipo puede ocurrir tanto debido a la presencia de moléculas redox, metales y a otros agentes que puedan producir radicales libres que lleven al agotamiento del poder reductor de la célula. Las moléculas reactivas del oxígeno causan daño al DNA, al RNA, a las proteínas y a los lípidos (Farr y Kogoma, 1991). Es por ello que la protección de las ROS resulta vital para la célula. Interesantemente, el ppGpp también se produce durante el estrés térmico, así como durante la exposición a algunos agentes inductores de estrés oxidativo, como el H₂O₂ (VanBogelen y col., 1987) (Figura 2). En ocasiones el estrés oxidativo afecta a la maquinaria transcripcional, y en ese caso la respuesta desencadenada por los nucleótidos ppGpp y pppGpp sirve para limitar la producción de RNAs, de manera que la célula detenga o disminuya la síntesis de las proteínas durante el estrés (Farr y Kogoma, 1991).

Las bacterias mutantes *ppk1* deficientes del poliP presentan una gran sensibilidad al agente oxidante H₂O₂ (Crooke y col., 1994; Rao y Kornberg, 1996), al agente redox ciclante (menadiona) y a los cambios osmóticos (Rao y Kornberg, 1996). La alta sensibilidad al H₂O₂, a la menadiona, y al paraquat (VanBogelen y col., 1987), sugiere una posible función protectora de los poliP frente al estrés oxidativo.

Respuestas similares a las obtenidas en los mutantes *ppk1* de *E. coli* se obtuvieron en las bacterias patógenas *Shigella flexneri* y *Salmonella enterica*. En dichas bacterias mutantes *ppk1* ocurren defectos celulares como: 1) problemas en el crecimiento, 2) problemas en la respuesta al estrés y la carencia nutricional, 3) pérdida de la viabilidad, 4) sensibilidad a la polimixina, 5) intolerancia al ácido y al calor, 6) infectividad disminuida a las células epiteliales (Kim y col., 2002). Resultados similares se han encontrado en otras bacterias como *P. aeruginosa* (Rashid y Kornberg, 2000). Todos estos defectos celulares que tienen los mutantes *ppk1* conllevan a una disminución de la virulencia de estos microorganismos patógenos. Estos resultados, encontrados en bacterias de diferentes especies y nichos ecológicos apuntan a la importancia funcional de los poliP en la célula bacteriana. Esto podría tener implicancias en el desarrollo de fármacos antimicrobianos.

1.3. Los poliPs y su relación con la respuesta a los metales pesados

Se consideran metales pesados aquellos metales que tienen una densidad mayor de 5 g/cm^3 , siendo la mayoría metales de transición con orbitales d incompletos (Nies, 1999). Varios metales de transición esenciales, como el Cu, el Zn, el Fe, el Co y el Mn, participan en el control de varias vías metabólicas y de señalización (Valko y col., 2005). Sin embargo, muchos de estos metales en altas concentraciones son sumamente tóxicos, por lo que en la célula diversas familias de proteínas se encargan de su homeostasis. Entre ellas hay transportadores integrales de membrana, sensores metalorreguladores y proteínas chaperonas citoplasmáticas difusibles, que protegen y guían el metal a su blanco molecular (Finney y O'Halloran, 2003).

Muchos metales deben su toxicidad a la generación de estrés oxidativo celular. Una vez dentro de la célula, los metales pesados, especialmente los de alto número atómico,

tienden a unirse a los grupos SH. Los metales pesados pueden unir glutatión (un antioxidante celular) y el complejo resultante de bisglutionato tiende a reaccionar con oxígeno molecular para formar bisglutatión oxidado (GS-GS) (Kachur y col., 1998), el catión metálico libre y H_2O_2 . El bisglutatión debe ser reducido nuevamente, en una reacción dependiente de NADPH, pero el metal une rápidamente otras moléculas de glutatión; esto lleva a la formación de un ciclo fútil, lo que disminuye el poder reductor intracelular. Es por ello que los cationes de metales pesados son considerados productores de estrés oxidativo dentro de la célula (Nies, 1999). Sin embargo, los metales pueden causar aún más daño: metales como el Cu, Cd, Cr, Hg, Ni, y el Fe, poseen la habilidad de producir radicales reactivos, lo que lleva a un daño en el DNA, peroxidación de los lípidos, disminución de sulfhidrilos, entre otros efectos (Valko y col., 2005).

Por ello, el control celular de la concentración de los metales, y la existencia de mecanismos apropiados para evitar grandes daños celulares, son muy importantes. Es por esto que las bacterias, como por ejemplo *E. coli*, están equipadas con múltiples sistemas para un manejo seguro de los metales en variadas condiciones ambientales (Rensing y Grass, 2003). La detoxificación de los metales pesados y la homeostasis de los cationes intracelulares se llevan a cabo por diferentes mecanismos celulares como: la exclusión, la precipitación, la reducción y el transporte activo (Williams y Silver, 1984; Keasling, 1997). Como parte de estos mecanismos, y dada su naturaleza polianiónica, se ha propuesto que el poliP "secuestra" los metales pesados, reduciendo de esa forma su concentración intracelular. Otra propuesta es que la hidrólisis de los poliP ayuda a la detoxificación intracelular de los metales (Figura 2) (Keasling, 1997, Alvarez y Jerez, 2004; Remonsellez y col., 2006). Además, hay evidencia que los poliP asociados a la

superficie celular podrían tener importancia para la quelación de los metales pesados (Tijssen y van Steveninck, 1984).

Diversos resultados, obtenidos por distintos investigadores, coinciden en un cambio del metabolismo del poliP frente a la presencia de ciertos metales. El poliP puede asociarse con relativa facilidad a los compuestos de bajo peso molecular y cargados positivamente (cationes o aminoácidos) (Urech y col., 1978). Los cationes más comunes son Ca^{+2} , K^+ y Mg^{+2} , aunque se han encontrado una gran diversidad de metales en los gránulos de poliP, como Pb, Cd, Fe, Co Zn, entre otros (Keasling, 1997). Se ha propuesto que las células usan el poliP para detoxificar metales pesados dentro de la célula (Rachlin y col., 1982). Esto ha encontrado apoyo en otros resultados, como el descubrimiento que el Pi liberado luego de la rápida hidrólisis del poliP es expulsado fuera de la célula al enfrentarse a altas concentraciones de Cu (Alvarez y Jerez, 2004; Remonsellez y col., 2006), o de otros metales pesados, como Cd y Pb (Keasling, 1997).

Los resultados indican que los poliPs son capaces de interactuar con ciertos metales para proteger a la célula. Sin embargo, su sola presencia en grandes cantidades no es suficiente. Es necesario tener la capacidad metabólica para sintetizarlo y degradarlo (Keasling y Hupf, 1996). En el trabajo de Keasling y Hupf (1996), se estudió la relación del Cd con el poliP y se encontró que el poliP tendría un efecto indirecto sobre la tolerancia a los metales, y más que los niveles de poliP, lo esencial sería la capacidad de hidrolizarlo. Estos resultados se condicen con los resultados de Hashemi y colaboradores (1994), quienes no encontraron metales asociados a los gránulos de poliP, a pesar que las células con niveles normales de poliP sobreviven mejor que las deficientes en poliP.

Otra evidencia de la participación del poliP en la resistencia a metales consiste en el descubrimiento que la actividad PPX se incrementa al aumentar la concentración de

cationes libres (Keasling y col., 1993), lo cual ha sido probado por nuestro grupo para la PPX de *A. ferrooxidans* frente al Cu (Alvarez y Jerez, 2004). Adicionalmente, algunos microorganismos que naturalmente están expuestos a altas concentraciones de metales, como los que participan en el proceso de biolixiviación, son capaces de acumular grandes cantidades de poliP (ver *A. ferrooxidans* y *S. metallicus* en la tabla 1). Todos estos resultados apuntan a una función del poliP ampliamente distribuida en los microorganismos.

Los resultados arriba presentados han sentado la base para un modelo en el cual la resistencia a los metales pesados puede estar mediada, en parte, por el poliP (Rachlin y col., 1982; Keasling, 1997). Un gran avance en este aspecto es el trabajo de van Veen (1997), en el cual demuestra que el sistema de transporte de fosfato inorgánico (Pit) puede transportar en *E. coli* y *Acinetobacter johnsonii* reversiblemente complejos de metal-fosfatos, en particular se probó Mg^{+2} , Ca^{+2} , Co^{+2} y Mn^{+2} . A partir de estos resultados Keasling (1997) propuso que también ocurriría con Cd^{+2} . Sin embargo, queda por saber si esto sería un mecanismo celular para sacar elementos tóxicos de la célula, o una consecuencia del transporte del fosfato inorgánico.

1.4. La bacteria *Pseudomonas sp* B4 es hiperacumuladora de poliP

Los microorganismos capaces de acumular poliP tienen una función importante en los problemas ambientales y biotecnológicos, como la destoxificación de los metales pesados (Alvarez y Jerez, 2004), y la remoción de fósforo, un tratamiento utilizado para las aguas residuales. *Pseudomonas sp.* B4 es una bacteria que es capaz de acumular grandes cantidades de poliP (Tabla 1), la cual incluso ha sido clasificada como hiperacumuladora de poliP, dependiendo del medio de cultivo y de la fase de crecimiento en que se encuentre (Chávez y col., 2004). Se caracterizó como una γ -

proteobacteria con actividad glutatión S transferasa, y que posee los genes del operón *bph* (Bartels y col., 1999), para la degradación de los PCBs. Esta bacteria forma parte de un aislado ambiental del río Elba en Alemania, el cual se encontraba enriquecido con sedimentos contaminados. Es capaz de crecer en clorobifenilos como única fuente de carbono (Bartels y col., 1999), lo que la hace atractiva biotecnológicamente, como un potencial microorganismo biorremediador.

Las bacterias del género *Pseudomonas* tienen una gran versatilidad metabólica y genética. El tamaño promedio de los genomas secuenciados de las bacterias de este género es superior al de muchas enterobacterias. En el caso de *P. aeruginosa*, su genoma cuenta con aproximadamente 1000 genes más que *E. coli* (Stover y col., 2000). Esta característica le otorga grandes potencialidades genéticas y de adaptación a distintos ambientes. Si bien la bacteria *Pseudomonas sp.* B4 no tiene su genoma secuenciado, sí se sabe que posee en su genoma rutas degradativas que le permiten ocupar distintas fuentes de carbono. Esto indica que es una bacteria versátil, capaz de adaptarse al medio.

Para estudiar las funciones de los poliP es necesario contar con cepas que tengan afectados los niveles de éste. Existen dos formas de obtener bacterias con niveles deficientes de poliP. La primera es mediante la interrupción o eliminación del gen *ppk1*, para evitar que la bacteria sintetice el poliP. La segunda es mediante la sobreexpresión de la enzima que degrada los poliP, la PPX, lo cual se realiza mediante la inserción de dicho gen en un vector de expresión que se clona en la bacteria de interés.

Debido a que no se conoce el genoma de la bacteria *Pseudomonas sp.* B4, y a la existencia de ortólogos a la PPK2 en los genomas de especies del mismo género, la estrategia que se usó para generar células recombinantes con los niveles deficientes de poliP fue la sobreexpresión del gen de la exopolifosfatasa citoplasmática de *S.*

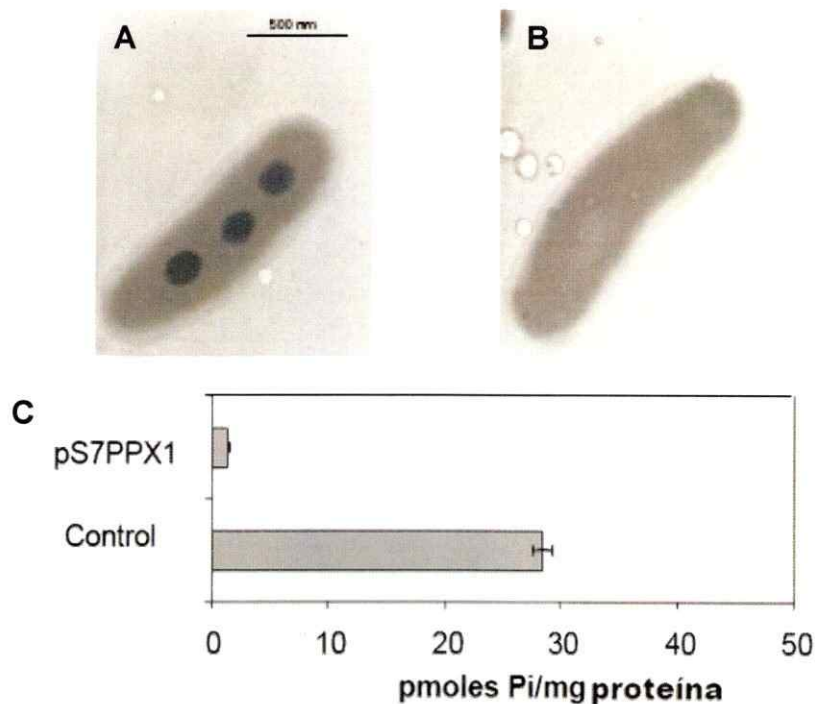


Figura 3. Las dos cepas de *Pseudomonas sp.* B4 recombinantes tienen distintos niveles de poliP. Fotografía al microscopio electrónico de transmisión de *Pseudomonas sp.* B4 cepa control (fenotipo silvestre) (A) y cepa incapaz de acumular poliP (B) (Chávez y col., 2009). Contenido de poliP en las cepas control y sin poliP (pS7PPX1) en medio LB (Chávez, 2006).

cerevisiae (PPX1). Este gen se incorporó en un vector de expresión constitutiva, y se demostró que esta estrategia remueve más de un 95% del poliP en la célula, respecto a la cepa silvestre (Chávez, 2006, Chávez y col., 2009) (Figura 3).

Nuestro grupo cuenta con dos cepas recombinantes de *Pseudomonas sp.* B4, que llevan el plásmido pMLS7 (cepa poliP(+)) o pS7PPX1 (cepa poliP(-)). El plásmido pMLS7 es un vector estable de amplio rango de huésped, que se mantiene en un número de copias entre 20 y 30 en la célula, tiene el gen de resistencia al antibiótico trimetoprina (*dhfr*), y adicionalmente tiene el promotor constitutivo de la proteína ribosómica S7 (P_{S7}) (Lefebre y Valvano, 2002). El plásmido pS7PPX1 es un derivado del pMLS7, que lleva bajo el control del promotor P_{S7} el gen de la exopolifosfatasa de *S. cerevisiae*, *ppx1* (Chávez, 2006). Un estudio previo en estas cepas recombinantes

mostró que el nivel celular de los poliP afecta la morfología, la motilidad, la quimiotaxis, y la capacidad de formar biopelículas, entre otros defectos estructurales y funcionales (Chávez y col., 2006; Chávez y col., 2009). Adicionalmente, mediante esta aproximación se detectaron defectos producidos por la carencia del poliP, como el cambio en la morfología de la colonia y problemas en la división celular (Figura 4) (Varela y col., manuscrito en prensa). Estos fenotipos no habían sido reportados anteriormente en los mutantes *ppk1*, posiblemente debido a la diferencia en la forma de remover el poliP en la célula.

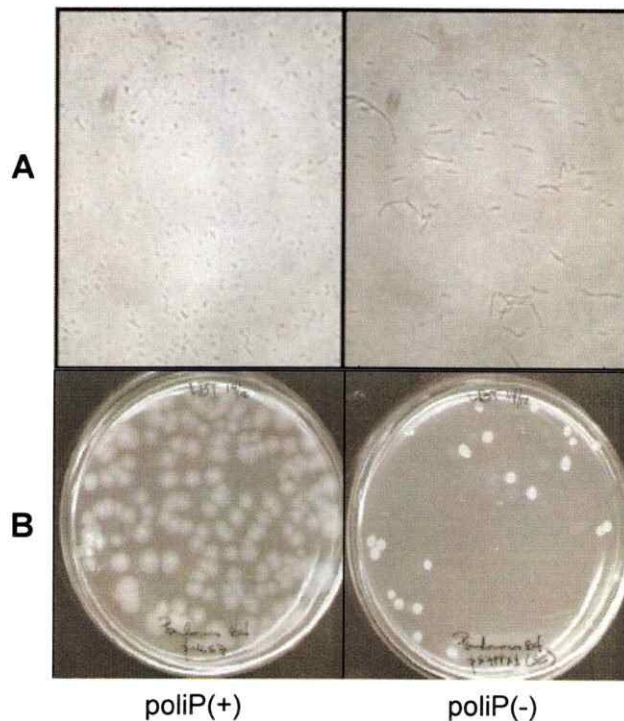


Figura 4. Morfología celular y de la colonia de las cepas poliP(+) y poliP(-). Fotografías al microscopio óptico de contraste de fases de cultivos en fase estacionaria (A), modificado desde Varela y col., manuscrito en prensa. En B placas LB-TMP de cada cepa, modificado desde Chávez y col., 2009.

Teniendo en cuenta los defectos funcionales y la relación que tienen los poliP con la respuesta a diferentes tipos de estreses, es que planteamos en este Seminario de Título estudiar el comportamiento diferencial de las bacterias deficientes en los poliP frente a

diversos tipos de estrés, y en particular a los metales pesados. Las cepas recombinantes de *Pseudomonas sp.* B4 se estudiaron para determinar si los niveles celulares de poliP son influyentes en la respuesta que se desencadena debido a diversos tipos de estreses como la temperatura, pH y la presencia de metales pesados.

Los PCBs son contaminantes ambientales altamente tóxicos y recalcitrantes. *Pseudomonas sp.* B4 puede ocupar algunos de estos compuestos como única fuente de carbono, lo cual la hace un potencial organismo biorremediador. Considerando que estos contaminantes ambientales suelen encontrarse en ambientes donde también hay contaminación por metales pesados, resulta interesante conocer si esta bacteria puede ser usada para la biorremediación de estos compuestos, lo que requiere que tenga alta resistencia a los metales pesados.

Como se dijo anteriormente, se han encontrado altos niveles de poliP (Tabla 1) en microorganismos capaces de resistir altas concentraciones de Cu, y por lo tanto, con importancia para la biominería. Los niveles de poliP de *A. ferrooxidans* (bacteria) y *S. metallicus* (arquea), varían según la concentración de dicho metal (Alvarez y Jerez, 2004; Remonsellez y col., 2006). Sin embargo en estos microorganismos aún no se cuenta con metodologías apropiadas para generar mutantes que permitan estudiar la importancia del poliP en la resistencia a los metales. En este contexto, las cepas recombinantes de *Pseudomonas sp.* B4 pueden servir como un modelo de estudio para dilucidar estos tópicos.

Por lo tanto, la presencia de poliP en la bacteria *Pseudomonas sp.* B4 debería ser importante para la resistencia a los metales pesados. De la misma forma, y al igual que en otras bacterias mutantes *ppk1*, se espera que los estreses afecten diferencialmente a una cepa con niveles normales y deficientes de los poliPs en *Pseudomonas sp.* B4.

1.5. Hipótesis

Una reducción significativa de los niveles de poliPs en las células de *Pseudomonas sp. B4* afecta la capacidad bacteriana para sobrevivir y adaptarse a diversos tipos de estreses.

1.6. Objetivo general

Estudiar la respuesta diferencial de las bacterias silvestres y con niveles deficientes de poliP frente a diversos tipos de estreses, con especial énfasis en el estrés inducido por los metales pesados, particularmente por el Cu.

1.7. Objetivos específicos

1. Analizar el efecto de la carencia de poliP en *Pseudomonas sp. B4* ante estreses por temperatura y pH.
2. Determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) de diversos metales pesados en las dos cepas, recombinantes con niveles normales y deficientes de los poliPs.

2. Materiales y métodos

2.1. Materiales

2.1.1. Cepas bacterianas y plásmidos

Las cepas y plásmidos utilizados en la realización de este Seminario de Título se encuentran en la tabla 2. Las bacterias recombinantes utilizadas se encontraban en el laboratorio, diseñadas a partir de la bacteria *Pseudomonas sp.* B4 que fue gentilmente donada al laboratorio por el Prof. Kenneth Timmis, desde un aislado ambiental del río Elba, en Alemania (Bartels y col., 1999). Las cepas de *Pseudomonas sp.* B4 que portan el plásmido pMLS7 y pS7PPX1 serán llamadas en adelante como cepa poliP(+) y cepa poliP(-), respectivamente.

Tabla 2. Cepas recombinantes y plásmidos utilizados.

Cepa o plásmido	Característica	Fuente
Cepas		
<i>Pseudomonas sp.</i> B4+pMLS7 [poliP(+)]	<i>Pseudomonas sp.</i> B4 transformada con plásmido pMLS7	Chávez, 2006
<i>Pseudomonas sp.</i> B4+pS7PPX1 [poliP(-)]	<i>Pseudomonas sp.</i> B4 transformada con plásmido pS7PPX1	Chávez, 2006
Plásmidos		
pMLS7	Vector de expresión constitutiva con amplio rango	Lefebre y Valvano, 2002
pS7PPX1	Vector derivado del pMLS7, con inserción del gen <i>ppx1</i> de <i>S. cerevisiae</i>	Chávez, 2006

2.1.2. Medios de cultivo

Las bacterias se crecieron en medio Luria Bertani (LB), que contiene por triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l y NaCl 5 g/l. La concentración del antibiótico trimetoprina utilizado fue de 100 µg/ml (medio LBT). Para la elaboración de placas con medio sólido, se utilizó LBT con agar al 1,5 % (p/v). Para los experimentos en que se ocuparon metales, el medio de cultivo utilizado fue LBT con ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico (MOPS) 100 mM (LBTM).

2.2. Métodos

2.2.1. Determinación de la MIC de metales

La MIC es la concentración mínima de metal que permite un crecimiento visible del cultivo (Bou, 2007), y en este Seminario de Título se definió cuantitativamente como la concentración que permite un crecimiento de un 35 % respecto del cultivo de las células crecidas sin metal. El ensayo para determinar la MIC se realizó en placas de 96 pocillos (Teitzel y Pársec, 2003). En cada pocillo se agregaron 100 µl de medio LBTM, 10 µl de células provenientes de un cultivo fresco (de las cepas poliP(+) o poliP(-)) y 10 µl de la solución patrón del metal a estudiar. Las placas se incubaron a 37 °C con agitación (aproximadamente 100 rpm) por 16 h y se les midió la densidad óptica 600 nm (DO_{600}). La columna 1 de la placa no lleva metales (control positivo), mientras que el control negativo, sin células, se realiza en la columna 12. En cada placa se obtienen los resultados en cuadruplicado cuando se ponen en 4 filas cada cepa. Los metales utilizados fueron $CuSO_4$, $FeSO_4$, $NiSO_4$ y $CdSO_4$ (en adelante Cu, Fe, Ni y Cd respectivamente), los cuales se prepararon en agua y se esterilizaron por filtración. Para determinar si el contraión (sulfato) es importante en la caída de la viabilidad celular al

enfrentarse con los metales pesados, se utilizó el mismo procedimiento ya descrito con el MgSO_4 (Mg), como control del contraión sulfato. Debido a que el Cu presenta coloración azul, que absorbe a la longitud de onda indicada, se realizó un segundo control negativo, pero esta vez de color. De esta forma se resta a cada medición el valor de DO_{600} que aporta el azul del Cu.



Figura 5. Esquema del ensayo de determinación de la MIC de Cu en placa de 96 pocillos. Cada columna de la placa tiene una concentración diferente de Cu: 0, 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15 mM.

2.2.2. Curvas de crecimiento

Matraces Erlenmeyer de 125 ml (Pyrex), con 25 ml de medio LBTM se inocularon 25 μl de un cultivo en fase estacionaria de células poliP(+) o poliP(-) y se incubaron a 37 °C con agitación a 200 rpm. Se tomaron muestras de 500 μl hasta las 46 h, en intervalos de 2 ó 3 h, y se midió la DO_{600} . Al mismo tiempo se realizó el mismo experimento, pero

con Cu 8 mM. Para cada cepa, y cada condición, se hicieron triplicados. Se realizaron controles negativos para restar el efecto del color azul sobre la DO_{600} .

2.2.3. Respuesta al Cu

Sobre dos cultivos en fase exponencial, uno de células poliP(+) y otro de células poliP(-), se adicionó un volumen de $CuSO_4$ 1 M para lograr una concentración final de 8 mM. A los tiempos 0, 20, 40 y 60 min se tomaron muestras de 100 μ l para realizar diluciones seriadas y plaquear en placas con agar LBT. Posteriormente se hizo un recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) y se calculó el título de cada cultivo a los distintos tiempos.

2.2.4. Ensayos de estrés por pH

Se prepararon medios LB a distintos pHs para estudiar su efecto en el crecimiento de ambas cepas. Los medios LB ácidos se acidificaron con H_2SO_4 , mientras que los básicos se alcalinizaron con NaOH. Para este ensayo se ocuparon las placas de 96 pocillos, y a cada pocillo se agregaron 110 μ l de medio y 10 μ l de células provenientes de un cultivo fresco crecido durante la noche. Las placas se crecieron a 37 °C con agitación (aproximadamente 100 rpm) y se midieron a las 16 h con un lector de placas de 96 pocillos Tecan Sunrise a 600 nm. El porcentaje de sobrevivencia se calculó como el cociente entre la DO_{600} a cualquier pH y la DO_{600} a pH 7, multiplicado por 100.

2.2.5. Shock térmico

Para realizar el shock térmico largo, se crecieron las células hasta la fase exponencial y se cambiaron de 37 °C a un baño con agitación a 50 ó 55 °C. Se tomaron alícuotas a los tiempos 0, 20 y 40 y 60 min y se les midió la DO_{600} . Los datos se

normalizaron calculando el cociente entre el valor de DO_{600} a cada tiempo medido y la DO_{600} al tiempo 0, lo que se llamó cociente de cambio de densidad óptica.

Con el fin de estudiar el efecto inmediato que tiene en la viabilidad celular en fase estacionaria, se realizó un shock térmico corto (hasta 5 min). Para esto, se tomaron cultivos de las dos cepas en fase estacionaria y se diluyeron hasta aproximadamente 5000 células/ml en NaCl 0,85 % (Crooke y col., 1994). Se agregó 2 ml del cultivo diluido de cada cepa a tubos de 5 ml con aireación, y se llevaron a un baño con agitación a temperaturas de 50 ó 52 °C. Se tomaron 100 μ l a los tiempos 0, 1, 2, 3, 4 y 5 min y se plaquearon en placas de agar LBT, las cuales se incubaron a 37 °C durante 18 hrs. Al día siguiente se realizó el recuento de las UFC, y se determinó el título de cada cultivo. Adicionalmente se dejó una alícuota (sin diluir) del cultivo en fase estacionaria por 60 min a 50 °C y luego se plaquearon 100 μ l en placas agar LBT y se incubaron a 37 °C. Al día siguiente se realizó un recuento de UFC.

3. Resultados

3.1. Resistencia a metales pesados

3.1.1. Resistencia al Cu

Para determinar si la ausencia de los poliP afecta la resistencia a los metales pesados, se determinó la MIC para ciertos metales con interés biológico, presentados en el punto 2.2.1. El experimento consistió en el crecimiento de las dos cepas de *Pseudomonas sp.* B4, poliP(+) y poliP(-) frente a distintas concentraciones de Cu. Luego de 16 h se midió la DO_{600} de la placa en un lector de placas de 96 pocillos.

Los resultados de los ensayos con distintas concentraciones de $CuSO_4$ se presentan en la figura 6A. La mayor diferencia entre las dos cepas se encontró a 8 mM de Cu, en donde la cepa poliP(+) tuvo una sobrevivida promedio de 50 %, mientras que la poliP(-) 33 %. Se realizó un test estadístico de tipo T pareado, donde se comparó los resultados

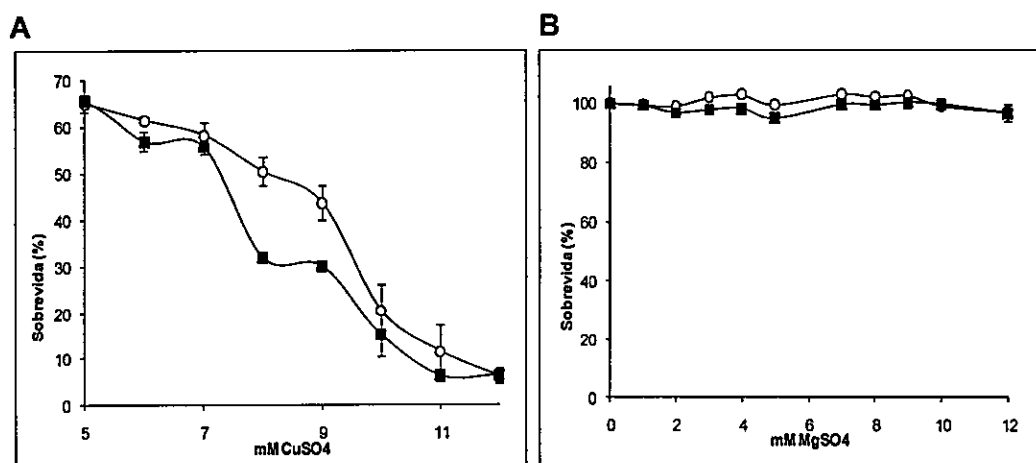


Figura 6. Curvas de adaptación de *Pseudomonas sp.* B4 cepas poliP(+) y poliP(-) a Cu. El porcentaje de sobrevivida de las células crecidas en placas de 96 pocillos con distintas concentraciones de Cu (A) o $MgSO_4$ (B), mantenidas con agitación a 37°C, se determinó luego de 16 h, para las células poliP(+) (o) y las células poliP(-) (■). La barra de error indica la desviación estándar calculada a partir de doce (A) y cuatro (B) mediciones.

de sobrevivida de ambas cepas a ésta concentración, y resultó ser significativamente diferentes entre ellos, con un valor P menor que 0,0001. Por lo tanto, la MIC determinada de Cu para la cepa poliP(+) es de 10 mM, mientras que para la poliP(-) es 8 mM (Tabla 3).

Este experimento fue realizado 3 veces en cuadruplicado. Para confirmar que la inhibición del crecimiento se debe al Cu y no a la presencia del contraión sulfato, se realizó un control con Mg (Figura 6B). Los resultados muestran que en presencia de este compuesto no existe inhibición del crecimiento celular.

3.1.2. Resistencia a otros metales

Se probó con otros metales para determinar si el efecto observado con Cu es generalizado para los metales pesados. Las dos cepas se crecieron en presencia de Fe, Ni y Cd (Figuras 7A, 7B y 7C respectivamente).

El resumen de los resultados de la MIC de todos los metales estudiados se muestran en la tabla 3. La diferencia más importante se obtuvo con el Fe, donde a 0,5 mM la cepa poliP(+) tiene una sobrevivida de aproximadamente 45% más que la cepa poliP(-).

Tabla 3. Resumen de las MICs obtenidas para las cepas poliP(-) y poliP(+) de *Pseudomonas* sp. B4 frente a diferentes metales pesados.

Metal	MIC (mM)	
	<i>Pseudomonas</i> sp. B4 cepa poliP(+)	<i>Pseudomonas</i> sp. B4 cepa poliP(-)
Cu	10	8
Fe	1,7	0,4
Ni	3	3
Cd	0,5	0,1

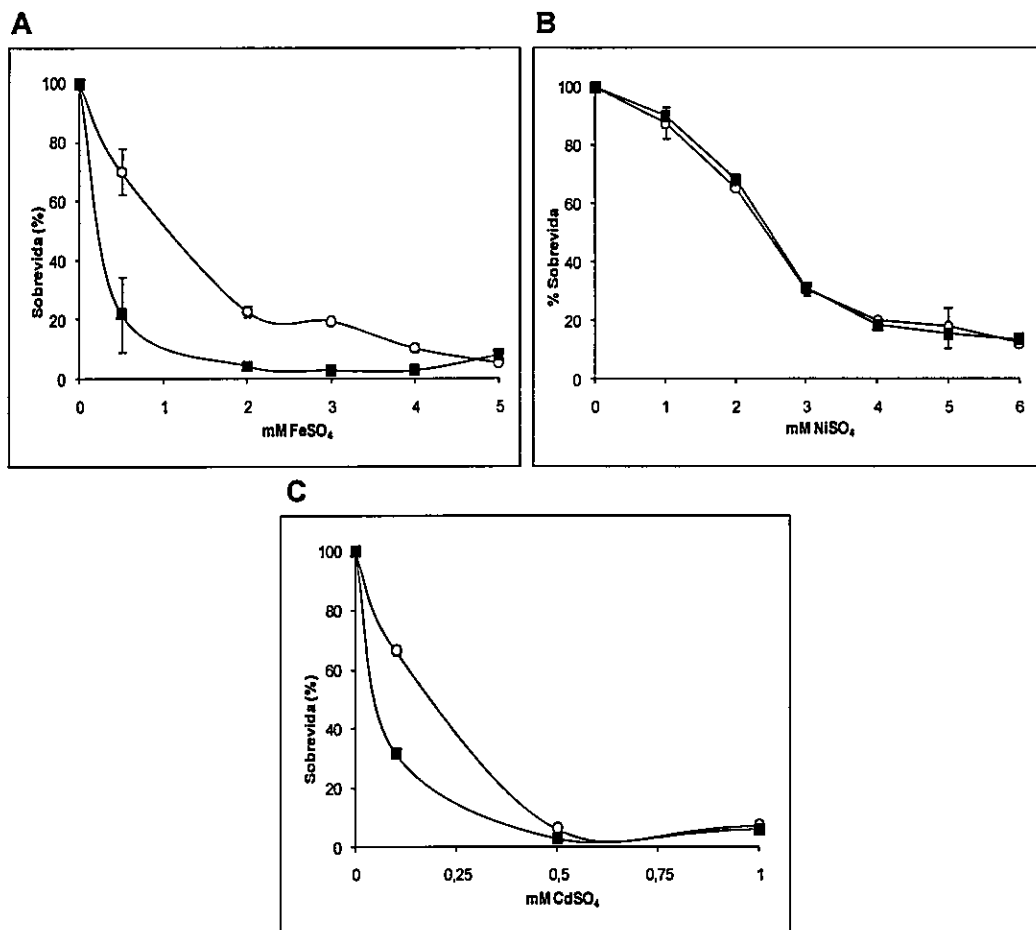


Figura 7. Determinación de la inhibición del crecimiento de *Pseudomonas sp. B4* en hierro, níquel y cadmio. En placas de 96 pocillos se crecieron células recombinantes poliP(+) (○) y poliP(-) (■) frente a distintas concentraciones de sulfato de hierro (A), sulfato de níquel (B), sulfato de cadmio (C), y se dejaron a 37 °C con agitación por 16 h. La DO₆₀₀ se determinó con un lector de placa de 96 pocillos Tecan Sunrise.

3.2. Curvas de crecimiento

En el punto anterior se observa una comparación de las dos cepas luego de 16 hrs de crecimiento. Con el objetivo de saber qué ocurre durante todo el crecimiento y determinar en qué momento del crecimiento se producen las mayores diferencias entre las dos cepas en estudio cuando se enfrentan al Cu, se realizaron curvas de crecimiento de las cepas poliP(+) y poliP(-), en ausencia y presencia de Cu (0 u 8 mM) (Figura 8). Cada experimento se realizó en triplicados, y a cada uno se le calculó el tiempo generacional (Tabla 4).

En la curva control (sin cobre) es posible observar que el crecimiento inicial y la fase exponencial de ambas cepas tienen el mismo comportamiento. Por otro lado, en los cultivos sometidos a 8 mM de Cu se retrasa notablemente el crecimiento, respecto de las curvas sin Cu, y la cepa poliP(-) tiene un retraso aún mayor, iniciando su crecimiento casi 4 h después que la cepa poliP(+). Esta diferencia en la fase de latencia también se vio a 1 mM y 5 mM de Cu (resultados no mostrados). Las curvas de las cepas se separan en fase estacionaria, en las dos condiciones, debido a que la cepa poliP(-) alcanza densidades ópticas mayores. En presencia del Cu las dos cepas tienen un tiempo generacional mayor, y entre ellas no existen diferencias significativas para las dos condiciones.

Además de la diferencia de crecimiento respecto del tiempo, se puede ver que los cultivos en presencia de Cu alcanzan la fase estacionaria a densidades celulares menores. La diferencia es de aproximadamente una unidad de DO_{600} respecto de los cultivos control (Figura 8).

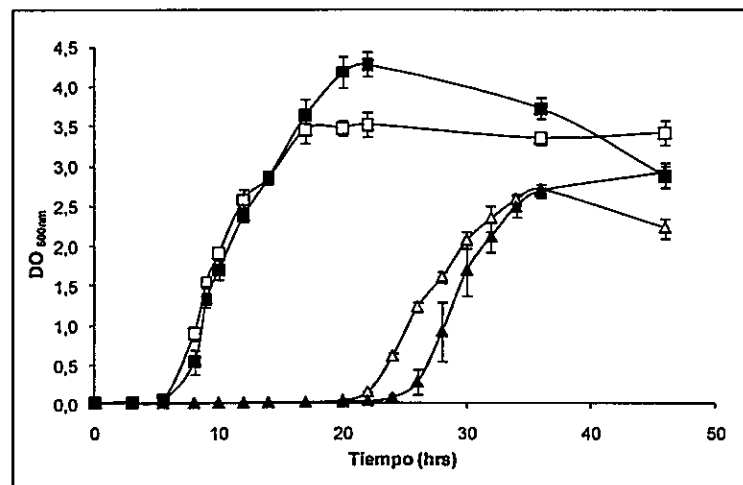


Figura 8. Curvas de crecimiento de las cepas de *Pseudomonas sp. B4* en ausencia y en presencia de Cu. Se siguieron cultivos en medio LBMT (cuadros) y con LBMT Cu 8 mM (triángulos) de las cepas poliP(+) (□,△) y poliP(-) (■,▲), crecidos a 37 °C con agitación, mediante medición de DO_{600} .

Tabla 4. Tiempos generacionales de crecimiento de las cepas poliP(+) y poliP(-) sin Cu y con 8 mM Cu.

	0 mM Cu		8 mM Cu	
	poliP(+)	poliP(-)	poliP(+)	poliP(-)
Tiempo generacional (hr)	2,03±0,23	1,98±0,24	2,58±0,12	2,34±0,36

3.3. Respuesta a un estrés rápido por Cu

En los experimentos anteriores el Cu estaba presente en el medio de cultivo desde el inicio del crecimiento. En este experimento se buscaba evidenciar qué sucede cuando las células en activo crecimiento se enfrentan bruscamente al metal. Para esto a los cultivos con cada cepa en fase exponencial se les agregó Cu y cada 20 min se tomaron alícuotas a las que se les determinó título del cultivo a cada tiempo mediante el conteo de las UFC.

A los 20 min, el cultivo ya había experimentado una caída en la viabilidad de aproximadamente 3 órdenes de magnitud (Figura 9). Dicha caída es similar en las dos cepas, sin embargo lo más llamativo es la recuperación que les sigue. A los 60 min la

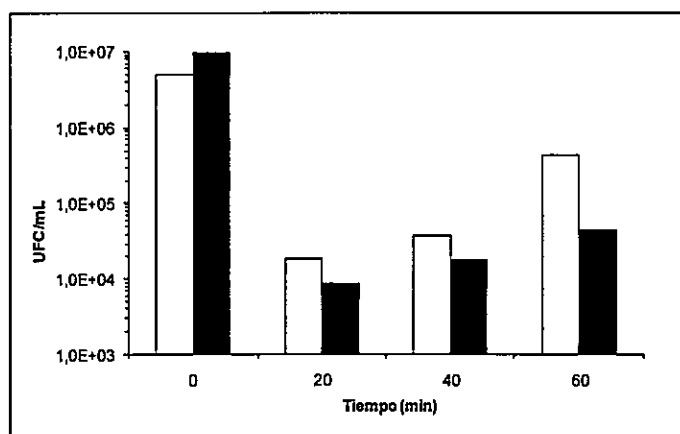


Figura 9. Seguimiento de la viabilidad de las cepas poliP(+) y poliP(-) en medio con Cu. Sobre cultivos celulares de las cepas poliP(+) (barras blancas) y poliP(-) (barras negras) en fase exponencial media se agregó Cu para alcanzar una concentración de 8 mM. Mediante recuento de UFC se determinó la concentración celular a los tiempos indicados.

cepa poliP(+) presenta una fuerte recuperación del título del cultivo, de más de un orden de magnitud en comparación a la cepa poliP(-).

3.4. Ensayo de estrés por pH

Este experimento se realizó para determinar si la carencia de poliP afecta la capacidad de la bacteria *Pseudomonas sp.* B4 de crecer sobre distintos pH del medio de cultivo, tal como se ha reportado para otros microorganismos. Para ello las dos cepas se inocularon en placas de 96 pocillos a partir de cultivos frescos crecidos durante la noche. En las distintas columnas de la placa se inoculó el medio LBT a pH entre 3 y 14.

Los resultados obtenidos están expresados como un porcentaje de sobrevivida respecto al crecimiento que ocurre a pH 7 (Figura 10). Es posible evidenciar que la bacteria es capaz de crecer en un amplio rango de pH, y particularmente entre los pH 5 y 11,5 la bacteria no ve afectado su crecimiento respecto al pH 7. Sin embargo este patrón es igual en ambas cepas.

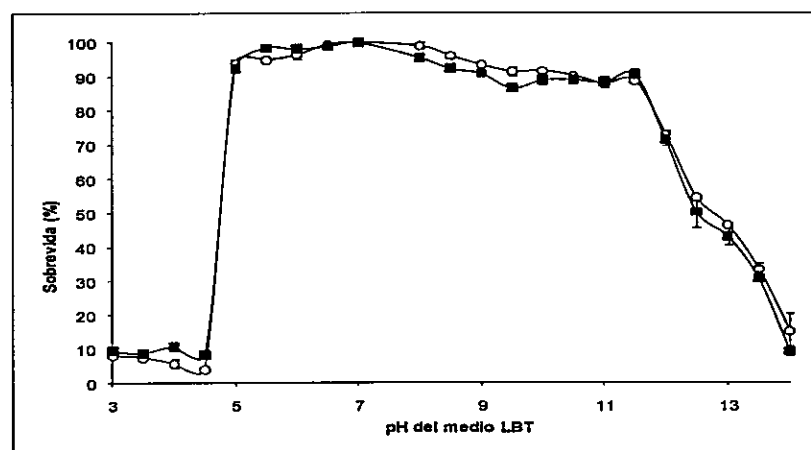


Figura 10. Efecto del pH en el crecimiento de *Pseudomonas sp.* B4 cepas poliP(+) y poliP(-). En placas de 96 pocillos se crecieron células provenientes de cultivos frescos en fase estacionaria de las cepas poliP(+) (o) y poliP(-) (■) en medio LBT a distintos valores de pH, y se dejaron a 37 °C con agitación. La medición se realizó a las 16 h. Cada medición se realizó en cuadruplicado.

3.5. Estrés térmico

Con el fin de estudiar si los poliP afectan diferencialmente la adaptación a las altas temperaturas, los cultivos de ambas cepas se sometieron a un cambio en la temperatura de incubación. El estrés térmico con células en fase exponencial se realizó cambiando la temperatura de incubación desde 37 °C a 50 °C (Figura 11A) ó 55 °C (Figura 11B), y luego se midió la DO_{600} del cultivo durante 80 min a cada cepa. Fue posible observar que las altas temperaturas frenan rápidamente el crecimiento de la cepa poliP(-), no así a la cepa poliP(+). A ambas temperaturas es posible ver que en la cepa poliP(+) hay un crecimiento hasta los 20 min, que no se ve mermado por las altas temperaturas. Existe un leve decrecimiento de los cultivos en ambas temperaturas a tiempos más largos, lo que se ve reflejado en una disminución del cociente de cambio de densidad óptica. Dado que los resultados se basan en cambios en la DO_{600} , no es posible determinar el grado de muerte celular, sin embargo es posible evidenciar diferencias importantes entre las cepas entre los 0 y 20 min. Ninguna de las cepas retomó el crecimiento a estas altas temperaturas.

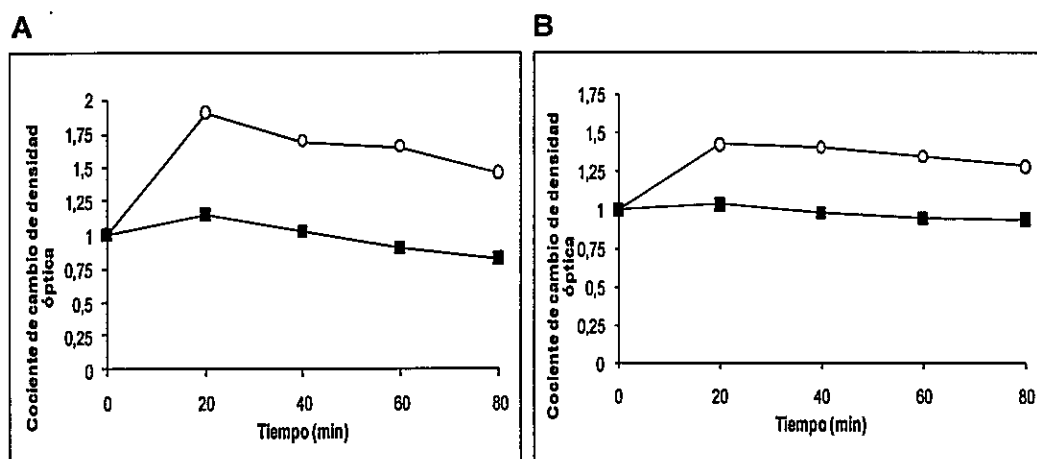


Figura 11. Shock térmico con células en fase exponencial de *Pseudomonas sp. B4* cepas poliP(+) y poliP(-). Cultivos en fase exponencial de las cepas poliP(+) (○) o poliP(-) (■) a los cuales se les cambió la temperatura de incubación de 37 °C a (A) 50 °C o (B) 55 °C, y el cultivo se siguió por la medición de DO_{600} . De la relación de la densidad óptica a tiempo cero y a cada tiempo se calculó el cociente de cambio de densidad óptica.

Por otra parte, se estimó la respuesta de las células frente a un shock térmico con células en fase estacionaria a tiempos cortos, de 5 min a 50 ó 52 °C. Los resultados de estos experimentos muestran una pronta caída del número celular, siendo la viabilidad casi cero a los 5 min (datos no mostrados). La respuesta al shock térmico a tiempos cortos no fue consistente en las réplicas entre las dos cepas en estudio, debido a la alta variabilidad experimental. Por lo tanto, mediante esta aproximación experimental no se detectaron diferencias significativas. Sin embargo, al plaquear células de los mismos cultivos en fase estacionaria, pero sin diluir, luego de incubarlas por 60 min a 50 °C se encontró un césped sólo en las placas con las células poliP(+) (Tabla 5).

Tabla 5. Número de células viables presentes antes y después de 60 min de incubación a 50 °C

	Células viables	
	t = 0 min	t = 60 min
poliP(+)	10^8	$>10^4$
poliP(-)	10^8	<10

Cultivos de ambas cepas en fase estacionaria se sometieron a un estrés térmico a 50 °C durante una hora, se plaquearon y se realizó un recuento de UFC. Resultados similares se obtuvieron a 52 °C (resultados no mostrados)

4. Discusión

4.1. Efecto de los metales pesados en bacterias *Pseudomonas sp.* B4 con niveles deficientes de poliP

Los resultados obtenidos a partir de los estudios de las MIC indican que las dos cepas en estudio se ven afectadas de distinta manera frente a los metales pesados.

Los metales utilizados: Cu, Fe, Cd y Ni son divalentes y considerados metales pesados (Nies, 1999), pudiendo ser tóxicos para la célula (Valko y col., 2005). Todos ellos se analizaron con el mismo contraión, y se comprobó que éste no afecta la sobrevivencia de las células. La sal utilizada para el control del contraión fue el $MgSO_4$ debido a que se ha reportado que el magnesio no provoca muerte celular a las concentraciones ensayadas (Gadd y Griffiths, 1977).

En medio rico (LB) los niveles de los poliP en la bacteria *Pseudomonas sp.* B4 son menores que, por ejemplo, los que se alcanzan en medio mínimo M9 con bifenilo o con glucosa en fase estacionaria (Chávez y col., 2004). Se intentó utilizar este último medio, sin embargo la alta concentración de fosfato que contiene produjo la precipitación de complejos metal-fosfato, tal como se ha descrito en la literatura (Keasling y Hupf, 1996). Por ello decidimos trabajar en medio LB.

Con los metales plomo y cobalto, no se pudo realizar el ensayo ya que precipitaron en el medio LB.

Se ha reportado que las bacterias del género *Pseudomonas* tienen una MIC mayor que las enterobacterias como *E. coli* (Teitzel y col., 2006). Resultados similares obtuvimos con las cepas de *Pseudomonas sp.* B4, que presentaron una MIC mayor que el de otras bacterias para los metales probados. Por ejemplo, en el caso del Cu, *E. coli* posee una MIC de 1 mM (Nies, 1999) y *Pseudomonas sp.* B4 de 10 mM, comparando

los fenotipos silvestres. En el resumen comparativo de las MICs entre las dos cepas de *Pseudomonas sp.* B4 (Tabla 3) se evidencia que la cepa con niveles deficientes de poliP tiene una resistencia menor a los metales. Estos antecedentes muestran que esta bacteria posee una alta resistencia intrínseca a los metales pesados, comparado con otras bacterias estudiadas.

Si bien el análisis realizado con otros metales distintos del Cu fue preliminar, el interés era conocer si el efecto visto con el Cu ocurría para otros metales pesados. Los resultados apuntan a que es un mecanismo que influye para otros metales además del cobre, pero que no sería igual de importante para todos los metales pesados. Esto es importante para posibles aplicaciones, debido a que en los lugares donde es posible encontrar Cu (sólido en los minerales o soluble en los drenajes ácidos de las minas) también hay otros metales pesados presentes, especialmente el Fe. Por ejemplo, se encontró en los drenajes de las minas abandonadas en Avoca (Irlanda) concentraciones de 248 µg/l de Cd, 4,9 mg/l de Cu y 165 mg/l de Fe (Gray, 1998). Por otro lado, el Río Tinto (España) contiene en los drenajes ácidos una concentración promedio de 2.261 mg/l de Fe, 109 mg/l de Cu, y 2,6 mg/l de Ni, entre otros (López-Archilla y col., 2001). El caso del río Tinto es particularmente interesante porque los drenajes ácidos son el producto de la actividad microbiana sobre el mineral presente y, a pesar de que existe una alta concentración de variados metales pesados, es un ecosistema donde se encuentran gran cantidad de especies de microorganismos (López-Archilla y col., 2001). También es posible encontrar al Cd en este sistema: en 1998 el río Tinto tenía una concentración de 1,53 µM de Cd disuelto (Achterberg y col., 2003). Por lo tanto, para que un microorganismo tenga aplicación en la biominería del Cu debe resistir altas concentraciones del Cu, así como de los otros metales presentes en el mineral, especialmente el Fe.

La determinación de la MIC es una herramienta ampliamente usada para encontrar cepas más resistentes o sensibles a químicos, antibióticos o metales. La comparación de los valores de la MIC ha permitido aislar y caracterizar cepas resistentes (o sensibles), lo que constituye la primera aproximación en la búsqueda de los genes responsables de estos fenotipos. Muchos genes que participan en la captación o el eflujo de los metales se han caracterizado a partir de las diferencias en la MIC, y pese a que en general cambios de dos veces la MIC del control se consideran significativos, muchos estudios se han interesado en cepas con pequeños cambios de la MIC respecto de la cepa silvestre.

Un ejemplo del uso de esta metodología para caracterizar genes de resistencia al Cu es el estudio de Grass y Rensing (2001a, 2001b). Para determinar que los genes *cueO* y *cusCFBA* de *E. coli* participaban en la resistencia de la bacteria al Cu realizaron mutantes y se midió la MIC. Una diferencia de 0,75 mM entre la cepa silvestre y la $\Delta cueO$ y 1,45 mM entre la cepa $\Delta cueO$ y la cepa $\Delta cueO\Delta cusCFBA$ permitió determinar que los genes en estudio participan en la resistencia al Cu en esta bacteria (Grass y Rensing, 2001a). Posteriormente se caracterizó la proteína CueO de *E. coli* como una oxidasa de Cu gracias a que se encontró una diferencia en la MIC de Cu de 1,5 mM cuando se expresaba la proteína CueO silvestre, respecto de una recombinante que tenía mutado 2 de los 4 sitios hipotéticos de oxidación al Cu. Esto permitió concluir la importancia de dichos sitios en la función enzimática de la proteína (Grass y Rensing, 2001b).

Sin embargo, la determinación de la MIC también ha sido usada para encontrar genes de sensibilidad a metales. Beard y colaboradores (2000) caracterizaron una cepa mutante cuya MIC era 0,5 mM mayor que la cepa silvestre y encontraron que el gen

mutado era *pitA*, un transportador de fosfato inorgánico de baja afinidad. Este es el primer trabajo que vincula a PitA con la homeostasis de metales.

Con estos antecedentes, podemos ver que las diferencias de las MICs reportadas en este Seminario de Título son suficientes para continuar con una investigación más molecular que logre determinar cómo actúan los poliP para otorgar mayor resistencia a algunos metales pesados. Debido a que la bacteria *Pseudomonas sp* B4 es un aislado ambiental y su genoma no se encuentra secuenciado, tratar de hacer ingeniería genética requeriría invertir muchos esfuerzos. Sin embargo, al esclarecer la existencia de una conexión entre los poliP y la resistencia a los metales, es posible proponer cambiarse a otro modelo bacteriano. En dicho microorganismo sería interesante hacer mutaciones, por lo tanto es importante que esté disponible información de su genoma, y se conozca sus niveles de acumulación del poliP, como es el caso de *E. coli* o *Pseudomonas* PAO1.

Nuestro grupo cuenta con diversos microorganismos que participan en la biolixiviación. Interesantemente estos microorganismos (bacterias y arqueas) son capaces de acumular grandes cantidades de poliP (Alvarez y Jerez, 2004; Remonsellez y col., 2006). De estas observaciones surgió la hipótesis que el poliP sería importante para la resistencia a cobre, sin embargo como en estos organismos no es posible hacer mutantes ni transformantes, era necesario un modelo distinto para hacer los estudios. Los resultados de este Seminario de Título sugieren fuertemente que los poliP actúan como un determinante de resistencia a cobre en *Pseudomonas sp*. B4, y propone que lo mismo sucedería en otros microorganismos. Estos resultados son interesantes porque, con más estudios, podría llevar a una mejora en la biolixiviación que se desarrolla en el norte del país.

4.2. Efecto del Cu sobre el crecimiento

La curva control presentó una cinética de crecimiento, sin contar la fase estacionaria, equivalente para las cepas poliP(+) y poliP(-). Esto concuerda con los resultados de la bibliografía en que las cepas de *E. coli* mutantes en el gen *ppk1*, y por lo tanto con niveles deficientes de poliP, no presentaron diferencias en las tasas de crecimiento en medio rico, ni en medio mínimo (Crooke y col., 1994).

Curiosamente, en las curvas de crecimiento sin Cu, la cepa poliP(-) alcanza una densidad óptica mayor que la poliP(+). Este mismo fenómeno se ha evidenciado en el laboratorio con las cepas mutantes de *E. coli* que carecen del operón *ppk-ppx* (resultados no publicados). En dicho trabajo se construyeron diversas cepas que carecen de éste operón, y de otros genes, y en todos los casos las cepas alcanzaron densidades ópticas mayores que la cepa silvestre. Las razones de este fenómeno son desconocidas, sin embargo una explicación posible es que la acumulación del poliP ocurre en fase estacionaria, por lo tanto la bacteria ocupa ATP en este proceso, dejándolo de usar en otros procesos, como el crecimiento.

A partir de las curvas de crecimiento se calcularon los tiempos generacionales para las dos cepas en ambas condiciones (Tabla 4). Los tiempos generacionales para la condición con Cu difieren levemente entre las dos cepas, pero esta diferencia no es significativa. Por lo tanto, la ausencia del poliP no afecta la velocidad del crecimiento en las condiciones ensayadas.

Por otro lado, la cepa poliP(+) se mantiene constante durante toda la fase estacionaria, mientras que la poliP(-) alcanza una DO₆₀₀ mayor, para luego disminuir hasta valores inferiores a los de la poliP(+). Se han reportado problemas en adaptaciones de la fase estacionaria en mutantes *ppk1* de *E. coli*, los que mueren prontamente tras alcanzar la fase estacionaria (Kornberg, 1995). Adicionalmente, se ha

visto que las células de la cepa poliP(-) se alargan en fase estacionaria (Chávez y col., 2006), lo cual podría aumentar la DO_{600} pero no el número de células, una posible explicación para que la cepa poliP(-) alcance una DO_{600} mayor en esta fase del crecimiento.

Las bacterias crecidas en Cu no se encontraban adaptadas a dicho metal (Figura 8). Por ello, estas células tuvieron un retraso en el crecimiento mayor que las crecidas sin Cu. Sin embargo, las aproximadamente 4 h de retraso de la cepa poliP(-) respecto de la poliP(+) pueden atribuirse a una mayor dificultad para adaptarse a la presencia del Cu (Figura 8).

Las bacterias crecidas en presencia de Cu alcanzaron la fase estacionaria a una menor DO_{600} , lo que evidencia el efecto inhibitorio que es este metal produce en el crecimiento de las dos cepas en estudio.

Los resultados obtenidos en este Seminario de Título que relacionan al poliP con la resistencia a Cu coinciden con los resultados anteriores del laboratorio con *A. ferrooxidans*. En ese estudio se determinó que en presencia del Cu a altas concentraciones las células utilizan el poliP, degradándolo y aumentando el eflujo de éste (Alvarez y Jerez, 2004), lo cual sería un mecanismo de resistencia al Cu. Resultados equivalentes se obtuvieron desde la arquea *S. metallicus* (Remonsellez y col., 2006). Sin embargo, aún no se encuentra definido qué función tiene el poliP en la célula. La evidencia experimental ha dado lugar a tres posibles funciones: 1) suministro de fosfato inorgánico, 2) fuente de energía, ya sea para generar de ATP o como para energizar ciertas proteínas o procesos, y 3) molécula regulatoria.

4.3. Estrés y adaptación frente al Cu

En los experimentos anteriores, se trabajó con células adaptadas a este metal, pero en este experimento lo que se provoca es un shock. Experimentalmente se ha probado que el shock y la adaptación producen respuestas celulares distintas. En *P. aeruginosa* se estudió el perfil transcripcional de células adaptadas a Cu (crecidas siempre en presencia del metal) y de células sometidas a un shock a Cu (el metal se agrega cuando las células se encuentran en crecimiento activo, y se mantiene por 45 min). Se encontró que dentro de los genes que se encienden como respuesta al shock por el Cu se encuentran muchos que codifican proteínas de estrés oxidativo, las que no se encienden en células adaptadas a Cu. Por otro lado, en células adaptadas a Cu se encuentra apagada la expresión de las porinas y sistemas que permiten el transporte pasivo del metal hacia dentro de la célula, los que se encuentran encendidos en condiciones normales. En ambas condiciones se activan transportadores de eflujo que ocupan ATP, que son capaces de sacar el metal desde el citoplasma al periplasma o al espacio extracelular (Teitzel y col., 2006).

Por lo tanto, en este experimento lo que se buscaba era diferenciar la respuesta celular de estrés y de adaptación. Se estudió el fenómeno de estrés al Cu a tiempos más cortos, cuando las células se encuentran en crecimiento activo. Estos resultados dan cuenta que las cepas poliP(+) y poliP(-) no reaccionan de forma diferente al enfrentarse con el Cu, puesto que ambas tienen una caída importante en la viabilidad celular. La diferencia entre ellas parece estar más bien a tiempos más largos: en la recuperación y posterior crecimiento en presencia del metal.

De estos resultados podemos decir que los poliPs no actuarían evitando que el Cu entre a la célula. Si ese fuera el caso deberíamos ver que la caída en la viabilidad celular fuera distinta entre las dos cepas. Sin embargo lo que es distinto es la

recuperación luego del shock, lo que habla de la participación de los poliP cuando el Cu se encuentra dentro de la célula. Es posible que la cepa que tiene niveles normales de poliP pueda utilizar dicho polímero como una fuente de energía para activar más rápidamente los mecanismos necesarios para soportar dicho estrés.

Debido a que la adaptación y el shock son fenómenos diferentes, los resultados deben ser analizados de manera individual, dado que la forma de actuar del poliP en cada caso puede ser diferente. Sin embargo, los datos de *P. aeruginosa* arriba presentados, sugieren que hay dos niveles en los cuales podrían actuar los poliP para mediar la resistencia a Cu: a nivel de la respuesta al estrés oxidativo, que es el efecto inmediato, así como a nivel de adaptación. Serán necesarios más experimentos para poder dilucidar cómo es el mecanismo por el cual los poliP ayudan a la célula a resistir mayores concentraciones de metales pesados. Algunos de éstos están siendo abordados en *E. coli* en mi tesis de Magíster.

4.4. Efecto del pH sobre la viabilidad

Algunos organismos como el alga *Dunaliella salina* (Pick y Weiss, 1991), o la levadura *S. cerevisiae* (Castro y col., 1995) utilizan el poliP como un tampón frente a la alcalinización del medio. En ellos, se encontró que cuando la célula se enfrenta a un pH alcalino, la hidrólisis de los poliP ayuda a estabilizar el pH citoplasmático (Pick y Weiss, 1991; Castro y col., 1995). En estos organismos el poliP es almacenado en vacuolas, y es debido a esta compartimentalización que posiblemente este mecanismo no se ha descrito en procariontes.

Por otro lado, también se ha visto un efecto del pH ácido sobre la viabilidad y los niveles de los poliP. Las bacterias *S. flexneri* y *Salmonella typhimurium* mutantes, sin los genes *ppk1* y *ppx*, presentan una disminución de la viabilidad mayor que las

silvestres cuando se enfrentan en un medio con pH ácido (Kim y col., 2002). En cambio, en *Candida humicola* (levadura) se induce la acumulación de poliP a pH 5,5, y no a pH neutro (McGrath y Quinn, 2000), al igual que en la bacteria *Burkholderia cepacia* (Mullan y col., 2001), lo cual no ha sido confirmado como parte de algún mecanismo de protección celular, sino más bien estaría relacionado con una mayor actividad de la PPK1 a ese pH. Sin embargo, *E. coli* no ve afectados sus niveles de poliP ante cambios en el pH del medio (Ault-Riché y col., 1998), lo que indicaría que estos mecanismos arriba mencionados serían propios de cada especie.

Con los datos obtenidos en *Pseudomonas sp.* B4 es posible proponer que el poliP presente en la célula no tiene un papel esencial para la adaptación a los cambios del pH extracelular. Sin embargo, queda por conocer si el cambio de pH del medio extracelular produce o no una acumulación o hidrólisis de los poliP, y el mecanismo de control del pH intracelular.

4.5. Respuesta al estrés térmico

Los resultados obtenidos apuntan a que existe una función probable de los poliP en la tolerancia a la temperatura, ya sea en células en crecimiento activo o en células en la fase estacionaria de crecimiento.

Al observar las curvas de crecimiento presentadas en el punto 3.2 se evidencia que en condiciones normales, las dos cepas tienen un comportamiento equivalente en la fase exponencial. Sin embargo al cambiar los cultivos en fase exponencial desde los 37°C a altas temperaturas, se ve que la cepa poliP(-) frena rápidamente su crecimiento, sin embargo la cepa poliP(+) continúa duplicándose durante los primeros 20 minutos. Esto da cuenta de mecanismos presentes en la cepa poliP(+) que le permiten hacer frente al estrés térmico de mejor manera que en la cepa poliP(-). Ninguna de las cepas

es capaz de reanudar el crecimiento luego de una hora de estímulo. Esto evidencia que la acción del poliP sería una forma de sobrellevar el estrés producido por las altas temperaturas, más que generar una adaptación a él.

Una posible explicación a este fenómeno tiene relación con el metabolismo energético. Se ha visto por experimentos de proteómica en *Pseudomonas sp.* B4 (Varela y col., manuscrito en prensa) y por microarreglos de DNA de *E. coli* (resultados no publicados) que durante la carencia de los poliPs, el metabolismo energético se encuentra aumentado, específicamente el ciclo de Krebs y la beta-oxidación. Esto sugiere que la ausencia del poliP en la célula produce un déficit de ATP, y por lo tanto la célula trata de compensarlo mediante el incremento del flujo en estas vías. Considerando que los mecanismos celulares para soportar el estrés térmico demandan gran cantidad de ATP, es posible que la presencia de poliP en la célula sea una ayuda importante para enfrentar el estrés térmico.

Se encontró mediante el plaqueo luego de 60 min de incubación, que las células poliP(+) en fase estacionaria soportan mejor las altas temperaturas que las poliP(-). Esto evidencia una mayor adaptación a la temperatura de las células en fase estacionaria con niveles normales de poliP a tiempos largos, lo que da cuenta de mecanismos diferenciales existentes en dicha fase de crecimiento entre las dos cepas. Estos resultados están en concordancia con lo reportado por Kornberg en *E. coli* (1999), acerca de la ausencia de los poliP y su perjuicio en las funciones típicas de la fase estacionaria, como lo es la tolerancia al calor.

La cantidad de células encontradas al plaquear varió en aproximadamente un orden de magnitud en las distintas réplicas. Las variaciones encontradas van aproximadamente desde un césped (>1000) a 100 para la cepa poliP(+), y menos de 10 a 0 para la cepa poliP(-). Al plaquear directamente el cultivo en fase estacionaria sin

diluir, la caída del título del cultivo es de aproximadamente 4 órdenes de magnitud. Es por esto que posiblemente el efecto no se vio tan marcado en el experimento de shock por 5 min, debido a que por el tamaño muestral la mayoría de las células se morían.

Durante la realización de los experimentos con las altas temperaturas encontramos problemas con la reproducibilidad de los resultados. Si bien la mayoría del tiempo se obtuvo resultados similares, los valores eran fluctuantes, llegando incluso en algunos casos a ser bastante distintos, particularmente en el caso del shock corto. Por ello, estos experimentos se realizaron múltiples veces, y siempre algún porcentaje de los experimentos entregaban resultados con escasa diferencia entre las cepas. Una de las posibles causas por la que el comportamiento de la cepa poliP(-) fuera muy similar a la de la poliP(+) es que le ocurran mutaciones o algún arreglo génico que modifique en cierta manera el fenotipo de la respuesta a la temperatura de ésta. Se ha reportado en cepas de *E. coli* mutantes *ppk1* la aparición de un fenotipo diferente, de colonia pequeña, el cual es estable en el tiempo, lo que da cuenta de cambios a nivel genético (Rao y Kornberg, 1996). Este fenotipo nuevo aparece en las células estresadas, y presenta una mayor resistencia frente al calor y al peróxido de hidrógeno, lo que no se debe a una restauración de los niveles del poliP o de la actividad PPK1 (Rao y Kornberg, 1996). Estudios de estas cepas proponían que una selección alélica o mutación en el gen *rpoS* sería responsable de dicho fenotipo, pero se comprobó que si bien dicho gen tiene cierta influencia, no es el responsable exclusivo (Rao y Kornberg, 1996). Es posible pensar que algunas mutaciones o arreglos a nivel del cromosoma puedan hacer que el fenotipo de la cepa poliP(-) cambie, teniendo entonces una mayor resistencia al calor. Esto podría explicar porqué a veces ocurre una similitud en la respuesta frente al estrés térmico, dado que las mutaciones tienen un factor de aleatoriedad.

Otro factor a considerar es la estabilidad de los plásmidos utilizados en las cepas recombinantes. La estabilidad del plásmido pMLS7 es de un 92%, que se determinó en *E. coli* DH5 α luego de 20 generaciones sin selección del antibiótico, según la razón entre las células que crecen en ausencia y en presencia del antibiótico (Lefebre y Valvano, 2002). Sin embargo no se sabe cuál es su valor para la bacteria en estudio, y si el valor para *E. coli* es similar a las dos cepas de la bacteria *Pseudomonas sp.* B4 utilizadas. Adicionalmente el valor podría modificarse debido a las condiciones de estrés a las que se ha sometido la célula. Si bien las bacterias en todo momento se mantuvieron en medio con el antibiótico, en experimentos a altas temperaturas es posible una degradación de éste, y con ello la pérdida del plásmido.

Cabe mencionar que los niveles estacionarios del poliP en *E. coli* son muy variables, de incluso un 20 % (van Dien y col., 1997). Si aquello también sucede en *Pseudomonas sp.* B4, y la resistencia a la temperatura depende de los niveles de poliP que posea la célula, podría ser que los resultados de la cepa poliP(+) sean variables en función de los niveles de los poliP presentes en la célula previo al estrés.

La molécula de poliP es ancestral y se encuentra en todos los seres vivos, por lo tanto debiera tener una función importante en la célula. Estudios en bacterias patógenas han demostrado que la ausencia del poliP en la célula produce una pérdida en la virulencia, así como una sensibilidad a diversos estreses, tal como lo evidenciamos en este Seminario de Título. Esto hace que el estudio de los efectos de la carencia de esta molécula sea interesante con vistas a una posible aplicación en el área médica.

5. Conclusiones

1. La concentración mínima inhibitoria (MIC) de *Pseudomonas sp.* B4 para los metales Cd, Fe, y Cu es de 0.2, 1 y 8 mM respectivamente.
2. La ausencia de los poliP afecta la MIC de *Pseudomonas sp.* B4 para estos metales.
3. El crecimiento en la presencia del Cu produce un retardo mayor en las células carentes de poliP.
4. La recuperación luego de un estrés causado por Cu es más lenta cuando hay una ausencia de los poliP.
5. La presencia de poliP no es esencial para que ocurra el crecimiento a distintos valores de pH en el medio de cultivo.
6. La cantidad de poliP que posea *Pseudomonas sp.* B4 sería importante para sobrellevar y recuperarse de un estrés térmico.

6. Bibliografía

- Achterberg E.P., Herzi V.M.C, Braungardt C.B., y Millward G.E.** 2003. Metal behaviour in an estuary polluted by acid mine drainage: the role of particulate matter. *Environ. Pollut.* **121**:283-292.
- Ahn K. y Kornberg A.** 1990. Polyphosphate kinase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **265**:11734-11739.
- Akiyama M., Crooke E., y Kornberg A.** 1993. An exopolyphosphatase of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **268**:633-639.
- Alvarez A. y Jerez C.A.,** 2004. Copper ions stimulate polyphosphate degradation and phosphate efflux in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:5177-5182.
- Ault-Riché D., Fraley C.D., Tzeng C., y Kornberg A.** 1998. Novel assay reveals multiple pathways regulating stress-induced accumulations of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **180**:1841-1847.
- Bartels F., Backhaus S., Moore E.R.B., Timmis K.N., y Hofer B.** 1999. Occurrence and expression of glutathione-S-transferase-encoding *bphK* genes in *Burkholderia* sp. Strain LB400 and other biphenyl-utilizing bacteria. *Microbiology.* **145**:2821-2834.
- Beard S.J., Hashim R., Wu G., Binet M.R.B., Hughes M.N., y Poole R.K.** 2000. Evidence for the transport of zinc (II) ions via the Pit inorganic phosphate transport system in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **184**:231-235.
- Bou G.** 2007. Minimum inhibitory concentration (MIC) analysis and susceptibility testing of MRSA. Ji Y. (ed), *Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus (MRSA) Protocols.* pp. 29-30. Humana Press, Minnesota.

- Castro C.D., Meehan A.J., Koretsky A.P., y Domach M.M.** 1995. In situ ^{31}P nuclear magnetic resonance for observation of polyphosphate and catabolite responses of chemostat-cultivated *Saccharomyces cerevisiae* after alkalization. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:4448:4453.
- Chávez F.P., Lünsdorf H., y Jerez C.A.** 2004. Growth of polychlorinated-biphenyl-degrading bacteria in the presence of biphenyl and chlorobiphenyls generates oxidative stress and massive accumulation of inorganic polyphosphate. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:3064-3072.
- Chávez F.P.** 2006. Estudio del metabolismo de los polifosfatos en la bacteria degradadora de policlorobifenilos *Pseudomonas sp.* B4: Posibles implicancia en los ajustes fisiológicos de las bacterias ante la presencia de estos compuestos organoclorados. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Chávez F.P., Gordillo F., y Jerez C.A.** 2006. Adaptive responses and cellular behavior of biphenyl-degrading toward polychlorinated biphenyls. *Biotechnol. Adv.* **24**:309-320.
- Chávez F.P., Mauriaca C., y Jerez C.A.** 2009. Constitutive and regulated expression vectors to construct polyphosphate deficient bacteria. *BMC Res. Notes* **2**:50.
- Crooke E., Akiyama M., Rao N.N., y Kornberg A.** 1994. Genetically altered levels of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **269**:6290-6295.
- Farr S.B. y Kogoma T.** 1991. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol. Rev.* **55**:561-585.
- Finney L.A. y O'Halloran T.V.** 2003. Transition metal speciation in the cell: insights from the chemistry of metal ion receptors. *Science.* **300**:931-936.
- Gadd G.M. y Griffiths A.J.** 1977. Microorganisms and heavy metal toxicity. *Microb. Ecol.* **4**:303-317.

- Grass G. y Rensing C.** 2001. Genes involved in copper homeostasis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183**:2145-2147.
- Grass G. y Rensing C.** 2001. CueO is a multi-copper oxidase that confers copper tolerance in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **286**:902-908.
- Gray N.F.** 1998. Acid mine drainage composition and the implications for its impact on lotic systems. *Wat. Res.* **32**:2122-2134.
- Hashemi F., Leppard G.G., y Kushner D.J.** 1994. Copper resistance in *Anabaena variabilis*: effects of polyphosphate nutrition and polyphosphate bodies. *Microb. Ecol.* **27**:159-176.
- Jenkins D.E., Schultz J.E., y Matin A.** 1990. Starvation-induced cross protection against heat or H₂O₂ challenge in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **170**:3910-3914.
- Kachur A.V., Koch C.J., y Biaglow J.E.** 1998. Mechanism of copper-catalyzed oxidation of glutathione. *Free Radical Res.* **28**:259-269.
- Keasling J.D., Bertsch L., y Kornberg A.** 1993. Guanosine pentaphosphate phosphohydrolase of *Escherichia coli* is a long-chain exopolyphosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**:7029-7033.
- Keasling J.D. y Hupf G.** 1996. Genetic manipulation of polyphosphate metabolism affects cadmium tolerance in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:743-746.
- Keasling J.D.** 1997. Regulation of intracellular toxic metals and other cations by hydrolysis of polyphosphate. *Ann. NY. Acad. Sci.* **829**:242-249.
- Kim K., Schlichtman D., Shankar S., Xie Z., Chakrabarty A.M. y Kornberg A.** 1998. Alignate, inorganic polyphosphate, GTP and ppGpp synthesis co-regulated in *Pseudomonas aeruginosa*: implications for stationary phase survival and synthesis of RNA/DNA precursors. *Mol. Microbiol.* **27**:717-725.

- Kim K., Rao N.N., Fraley C.D., y Kornberg A.** 2002. Inorganic polyphosphate is essential for long-term survival and virulence factors in *Shigella* and *Salmonella* spp. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **99**:7675-7680.
- Kornberg A.** 1995. Inorganic polyphosphate: toward making a forgotten polymer unforgettable. J. Bacteriol. **177**:491-496.
- Kornberg A., Rao N.N., y Ault-Riché D.** 1999. Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. Annu. Rev. Biochem. **68**:89-125.
- Kornberg A.** 2001. Role of inorganic polyphosphate in promoting ribosomal protein degradation by the Lon protease in *E. coli*. Science. **293**:705-708.
- Kuroda A., Murphy H., Cashel M., y Kornberg A.** 1997. Guanosine tetra- and pentaphosphate promote accumulation of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **272**:21240-21243.
- Kuroda A. y Ohtake H.** 2000. Molecular analysis of polyphosphate accumulation in bacteria. Biochem. (Mosc). **65**:362-367.
- Kuroda A., Nomura K., Ohtomo R., Kato J., Ikeda T., Takiguchi N., Ohtake H., y Kuroda A.** 2006. A polyphosphate-Lon protease complex in the adaptation of *Escherichia coli* to amino acid starvation. Biosci. Biotechnol. Biochem. **70**:325-331.
- Kulaev I.S.** 2000. Biochemistry and biotechnology of inorganic polyphosphates. Biochem. (Mosc). **65**:269-270.
- Lefebvre M.D., y Valvano M.A.** 2002. Construction and evaluation of plasmid vectors optimized for constitutive and regulated gene expression in *Burkholderia cepacia* complex isolates. Appl. Environ. Microbiol. **68**:5956-5964.
- López-Archilla A.I., Marin I., y Amils R.** 2001. Microbial community composition and ecology of an acidic aquatic environment: the Tinto River, Spain. Microb. Ecol. **41**:20-35.

- Magnusson L.U., Farewell A., y Nyström T.** 2005. ppGpp: a global regulator in *Escherichia coli*. Trends Microbiol. **13**:236-242.
- McGrath J.W. y Quinn J.P.** 2000. Intracellular accumulation of polyphosphate by yeast *Candida humicola* G-1 in response to acid pH. Appl. Environ. Microbiol. **66**:4068-4073.
- Mullan A., Quinn J.P., y McGrath J.W.** 2001. Enhanced phosphate uptake and polyphosphate accumulation in *Burkholderia cepacia* grown under low-pH conditions. Microb. Ecol. **44**:69-77.
- Nesmeyanova M.A.** 2000. Polyphosphate and enzymes of polyphosphate metabolism in *Escherichia coli*. Biochem. (Mosc). **65**:309-314.
- Nies D.H.** 1999. Microbial heavy-metal resistance. Appl. Microbiol. Biotechnol. **51**:730-750.
- Pick U. y Weiss M.** 1991. Polyphosphate hydrolysis within acidic vacuoles in response to amine-induced alkaline stress in the halotolerant alga *Dunaliella salina*. Plant Physiol. **97**:1234-1240.
- Rao N.N. y Kornberg A.** 1996. Inorganic polyphosphate supports resistance and survival of stationary-phase *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **178**:1394-1400.
- Rao N.N., Liu S. y Kornberg A.** 1998. Inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*: the phosphate regulon and the stringent response. J. Bacteriol. **180**:2186-2193.
- Rachlin J.D., Jensen T.E., Baxter M., y Jani V.** 1982. Utilization of morphometric analysis in evaluating response of *Plectonema boryanum* (Cyanophyceae) to exposure to eight heavy metals. Arch. Environ. Contam. Toxicol. **11**:323-333.
- Rashid M.H. y Kornberg A.** 2000. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. PNAS. **97**:4885-4890.

- Remonsellez F., Orell A., y Jerez C.A.** 2006. Copper tolerance of the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus metallicus*: possible role of polyphosphate metabolism. *Microbiology*. **152**:59-66.
- Rensing C. y Grass G.** 2003. *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**:197-213.
- Reusch R.N.** 2000. Transmembrane ion transport by polyphosphatase/poly-(R)-3-hydroxybutyrate complexes. *Biochem. (Mosc)*. **65**:280-295.
- Stover C. K., Pham X. Q., Edwin A. L., Mizoguchi S. D., Warrenner P., Hickey M. J., Brinkman F.S. L., Hufnagle W. O., Kowalik D. J., Lagrou M., Garber R. L., Goltry L., Tolentino E., Westbrook-Wadman S., Yuan Y., Brody L. L., Coulter S. N., Folger K. R., Kas A., Larbig K., Lim R., Smith K., Spencer D., Wong G. K.-S., Wu Z., Paulsen I. T., Reizer J., Saier M. H., Hancock R. E. W., Lory S., y Olson M. V.** 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*. **406**:959-964.
- Teitzel G.M. y Parsek M.R.** 2003. Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:2313-2320.
- Teitzel G.M., Geddie A., De Long S.K., Kirisits M.J., Whiteley M., y Parsek M.R.** 2006. Survival and growth in the presence of elevated copper: transcriptional profiling of copper-stressed *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **188**: 7242-7256.
- Tijssen J.P.F. y van Steveninck J.** 1984. Detection of a yeast polyphosphate fraction localized outside the plasma membrane by the method of phosphorus-31 nuclear magnetic resonance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **119**:447-451.
- Urech K., Durr M., Boller T., y Wiemken A.** 1978. Localization of polyphosphates in vacuoles of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* **116**:275-278.

- Valko M., Morris H., y Cronin M.T.D.** 2005. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* **12**:1161-1208.
- VanBogelen R.A., Kelley P.M. y Neidhardt F.C.** 1987. Differential induction of heat shock, SOS, and oxidative stress regulons and accumulation of nucleotides in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169**:5589-5593.
- van Veen H.W.** 1997. Phosphate transport in prokaryotes: molecules, mediators and mechanisms. *Antonie van Leeuwenhoek.* **72**:299-315.
- Van Dien S.J, Keyhani S., Yang C., y Keasling J.D.** 1997. Manipulation of independent synthesis and degradation of polyphosphate in *Escherichia coli* for investigation of phosphate secretion from the cell. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:1689-1695.
- Varela C., Mauriaca C., Paradela A., Albar J.P., Jerez C.A., y Chávez F.P.** 2009. New structural and functional defects in polyphosphate deficient bacteria: A cellular and proteomic study. *BMC Microbiol.* Manuscrito en prensa.
- Williams J.W. y Silver S.** 1984. Bacterial resistance and detoxification of heavy metals. *Enzyme Microb. Technol.* **6**:530-537.
- Wurst H. y Kornberg A.** 1994. A soluble exopolyphosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **269**:10996-11001.
- Zhang H., Ishige K., y Kornberg A.** 2002. A polyphosphate kinase (PPK2) widely conserved in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**:16678-16683.