



**Academia de Ciencias Matemáticas,
Físico-Químicas y Naturales de Granada**

**UN VIAJE POR EL MUNDO DE LA MICROBIOLOGÍA
DE PSEUDOMONAS EN GRANADA**

DISCURSO LEÍDO EN EL ACTO DE SU RECEPCIÓN
COMO ACADÉMICO NUMERARIO POR EL

ILMO. SR. D. JUAN LUIS RAMOS MARTÍN

Granada, 2019



**Academia de Ciencias Matemáticas,
Físico-Químicas y Naturales de Granada**

**UN VIAJE POR EL MUNDO DE LA MICROBIOLOGÍA
DE *PSEUDOMONAS* EN GRANADA**

DISCURSO LEÍDO EN EL ACTO DE SU RECEPCIÓN
COMO ACADÉMICO NUMERARIO POR EL

ILMO. SR. D. JUAN LUIS RAMOS MARTÍN

Granada, 2019

**UN VIAJE POR EL MUNDO DE LA MICROBIOLOGÍA DE
PSEUDOMONAS EN GRANADA**

JUAN LUIS RAMOS MARTÍN

**Excmo. Sr. Presidente de la Academia de Ciencias Matemáticas,
Físico-Químicas y Naturales de Granada,
Excelentísimos e Ilustrísimos Señoras y Señores Académicos,
Queridos compañeros y amigos,
Señoras y Señores,**

La carrera científica es una carrera de fondo, no interesa ni ir muy rápido ni demasiado lento; para llegar a la meta lo importante es mantener el ritmo, como hacen los maratonianos. Mi maratón se inició en Sevilla a finales de 1978. Tras terminar mis estudios de Biología me incorporé al Departamento de Bioquímica de la Facultad, donde trabajé bajo la dirección de los Profesores Manuel Losada Villasante y Miguel García Guerrero - mis maestros - que tanto influyeron en mi formación inicial en la bioquímica y fisiología de las cianobacterias. Ellos me

animaron a continuar mi formación posterior en la Unidad de Fijación de Nitrógeno en la Universidad de Brighton (Reino Unido), donde trabajé dos años con el Prof. Robert Robson, que me introdujo en el mundo de la genética molecular a través de la fijación de nitrógeno por bacterias del género *Azotobacter*. A finales de 1984 no estaban los tiempos para la lírica en España y me trasladé al Departamento de Bioquímica Médica de la Facultad de Medicina (CMU) de la Universidad de Ginebra en Suiza, donde trabajé en el laboratorio de Kenneth N. Timmis hasta 1987 iniciándome en el estudio de la biología molecular y de la regulación transcripcional de las rutas catabólicas de degradación de tolueno por bacterias del género *Pseudomonas* (93, 94). Este periodo post-doctoral ha marcado notablemente mi carrera de fondo y las bacterias de este género me han acompañado en este maratón científico, siendo su biología, en parte, la responsable de este discurso. Granada, ha sido testigo de algo más de 30 años de “carrera” y el aliento y el apoyo para mantener el ritmo ha venido de todas aquellas personas que han pasado por el grupo, en particular los estudiantes de doctorado, post-doctorales y los técnicos de laboratorio, cuyos nombres he relacionado como Anexo a este discurso. También mi familia – incluida mi madre que tanto disfrutaba cuando visitaba la EEZ y hablaba con las estudiantes del grupo y mi hermana, que sigue con interés los avances del grupo – que han participado de mis desvelos por la ciencia. Tampoco hubiese podido mantener el ritmo sin el apoyo de colaboradores nacionales y extranjeros, entre los que quiero destacar a Kenneth N. Timmis, que me apoyó en Ginebra y cuando regresé a Granada, compartiendo ideas, colaborando en proyectos europeos y muy estrechamente con una ayuda de la Fundación Volkswagen. A Ken le tengo que agradecer además que fuese un maestro para todos los que hemos querido gestionar equipos de personas; sus dotes de líder y su forma de dirigir y supervisar la investigación han creado escuela por todo el mundo. Fruto de estas colaboraciones es también la estrecha amistad que tejimos y que persiste hoy. Nuestro contacto es también estrecho gracias a las

revistas científicas que editamos conjuntamente. Con Søren Molin, mi mejor amigo vikingo, he colaborado con y sin dinero – como a él le gusta decir - y ha sido siempre una fuente de inspiración. Søren despertó en mi el gusanillo por la ciencia aplicada cuando me hizo partícipe de su empresa GX-Biosystems. Antes de que este discurso se iniciara, Estrella siempre ha estado presente apoyando aquellos inicios de mi carrera científica – terminar la Tesis en Sevilla, las estancias post-doctorales en Brighton, Ginebra, Braunschweig y Copenhague. Estrella es mi compañera de camino, sus pasos discretos pero firmes han creado grupo, han facilitado el trabajo del laboratorio, han iniciado líneas nuevas – sin miedo al fracaso, y ha cedido con generosidad cepas y vías de desarrollo a los que nos han acompañado en nuestros y vuestros estudios. Hoy este discurso es un recorrido por la biología de *Pseudomonas* y, más en concreto, del camino que Estrella y yo hemos andado con los estudiantes de Tesis, los post-doctorales y los técnicos de laboratorio en Granada. No esperéis un orden cronológico en el relato porque los hechos tienen lugar cuando ocurren, pero en Ciencia la historia se puede contar de otra manera. Estas reflexiones y agradecimientos iniciales a mis maestros, mentores y colaboradores vienen al caso en este momento, porque quiero expresar el reconocimiento por haber sido propuesto para ser miembro de la Academia de Ciencias Matemáticas, Físico-Químicas y Naturales de Granada, un hecho muy relevante en mi carrera científica. Por ello, Señor Presidente y Distinguidos Señores Académicos, mi más sincero agradecimiento por el gran honor que me hacen habiendo aceptado mi candidatura para ser nombrado Académico de Número de esta Academia en la sección de Ciencias Naturales. Cuenten con mi compromiso y colaboración para conseguir los objetivos de esta Institución. Mi más sincero agradecimiento a D. José Olivares Pascual, ilustre miembro de esta Academia por animarme a presentar mi candidatura y por aceptar responder a este discurso. Quisiera mencionar que D. José Olivares ha intervenido en cuatro momentos claves de mi carrera científica, y quizás para un “chico” de San Juan de

Aznalfarache (Sevilla) como yo no deje todavía de ser una sorpresa. El primero es que D. José Olivares fue miembro del Tribunal que juzgó mi Tesis Doctoral “Bioconversión de Energía Solar en Energía Química: Fotoproducción de Amoniac por Cianobacterias”, que dirigieron los Profesores Manuel Losada Villasante y Miguel García Guerrero y que defendí en la Universidad de Sevilla a finales de 1981. Por avatares de la vida también fue miembro del Tribunal que me juzgo cuando obtuve una Plaza de Colaborador Científico del CSIC en el curioso y arcaico – hoy aún persistente - sistema español de Concurso-Oposición que se celebró en Madrid en 1986. Un año más tarde Estrella y yo nos trasladamos a Granada. Al incorporarme a la Estación Experimental del Zaidín, Pepe Olivares también fue pieza clave en convencer a Marian Abril, que había realizado su Tesina de Licenciatura en su grupo, para que se incorporase al grupo que yo empezaba a formar, y, por último, es quien me ha propuesto para ser miembro y compañero en esta Academia. Querido Pepe Olivares mis más sinceras gracias y mi eterna gratitud. A mis compañeros de los Departamentos de Bioquímica y Protección Ambiental de la Estación Experimental del Zaidín les agradezco que siempre me apoyasen y que hayan sido motivo de inspiración y fuente de aliento. Quiero recordar a Julio López Gorgé (qepd) que aceptó que yo iniciase la línea de *Pseudomonas* en el Departamento de Bioquímica y a José Miguel Barea Navarro (qepd) – Ilustre Miembro que fue de esta Academia - que desde la dirección del centro me animó a estudiar las interacciones de *Pseudomonas* con las plantas, un pequeño universo que se conoce como la rizosfera y que es la fracción del suelo en íntimo contacto con las raíces, José Miguel me explicó que así podría integrarme mejor en las líneas directrices del centro.

Con Julio Lopez Gorgé, Ana Chueca, Charo Hermoso y Juanjo Lázaro inicié varios trabajos de fotosíntesis, tema relacionado con el de mi Tesis doctoral. Sin embargo, mi paso por el laboratorio de Ken Timmis, me había atrapado en el mundo de la regulación transcripcional en *Pseudomonas*, y se convirtió en la

simiente de mi trabajo futuro en Granada. El trabajo con este microorganismo se inició con la incorporación simultánea de Carmina Michán y Marian Abril que, como veréis más adelante, pusieron en marcha el laboratorio para estudiar el control genético de las rutas de degradación del tolueno. Poco después se incorporó Estrella – que tanto me había ayudado en el laboratorio en Brighton y en Ginebra. Estrella empezó a estudiar el comportamiento de *Pseudomonas* en el suelo, un área a la que también se incorporaría Maribel Ramos-González y Asunción Delgado. Esos estudios iniciales fueron la base de gran parte del conocimiento actual de la fisiología, bioquímica, genética y biología molecular de *Pseudomonas putida*, tanto a nivel de laboratorio como en el medio ambiente y, en particular, en la rizosfera de las plantas. Los trabajos, en principio dispares, nos dirigieron a bucear en el metabolismo de *Pseudomonas* y en parte se deben a nuestro interés por entender las respuestas de estos microorganismos a distintos nutrientes, a condiciones de estrés y a las interacciones entre seres vivos de distintos Reinos. No cabe duda que el principio de diseñar los experimentos, ejecutarlos e interpretarlos – los tres elementos que no me he cansado de repetir a todos los que han hecho su Tesis Doctoral conmigo o han trabajado como post-doctorales - están en la esencia de los caminos que hemos recorrido. Por ello Señores Académicos este discurso versará sobre “Un viaje por el mundo de la microbiología de *Pseudomonas* en Granada”. He de añadir que no sólo ha sido la Estación Experimental del Zaidín la que me ha deparado alegrías al respecto sino también la empresa Bio-Iliberis R&D, de la que fui socio fundador y que nos ha permitido poner en el mundo de la agricultura distintas cepas beneficiosas para promover el crecimiento vegetal (102). Sin duda el alma de esos avances ha sido Amalia Roca Hernández, la “doctoranda” que creyó en un proyecto de biotecnología aplicada. Esta vocación hacia lo aplicado se concretó con mi paso durante 4 años por el Departamento de Biotecnología de Abengoa Research en Sevilla donde tuvimos (Estrella, Ana Segura, Ali Daddaoua, Carlos Molina-Santiago y Zulema Udaondo)

la oportunidad de desarrollar estrategias para convertir *Pseudomonas* en una factoría celular y chasis en el que ensamblamos genes heterólogos para sintetizar nuevos productos de valor añadido. Este paréntesis del camino en Sevilla ha servido para plantear nuevos retos científicos a nuestra vuelta a Granada – todavía queda camino en el maratón para nuevas ambiciones científicas. No quiero olvidar en este discurso a aquellas personas que también me ayudaron desde la Universidad de Granada en mis inicios: Alejandro Fernández-Barrero y Eduardo Cabrera – que me dieron un “barniz” en química orgánica; Antonia Aránega, que compartió con su equipo la ilusión de explotar biotecnológicamente los genes suicidas. También a Federico Garrido y Paco Ruiz-Cabello, del Hospital Virgen de las Nieves, que nos ayudaron con los anticuerpos monoclonales. Gracias a todos por compartir vuestro entusiasmo y conocimiento conmigo.

El género *Pseudomonas* y la especie *Pseudomonas putida*

A estas alturas las personas asistentes a este discurso querrán conocer de dónde viene la palabra clave del mismo, *Pseudomonas*. El vocablo *Pseudomonas* literalmente significa “falsa unidad” y deriva del griego pseudo (“falso”) y monas (“unidad”). El término “monada” se usaba en la microbiología antigua para nombrar a los organismos unicelulares. El género *Pseudomonas* fue durante muchos años un cajón de sastre, hasta que en 1984 el insigne microbiólogo argentino Norberto Palleroni definió, en base a la secuencia del gen que codifica el ARN ribosómico 16S, que las bacterias encuadradas en este género pertenecían a 5 grupos taxonómicos distintos (89). De hecho, las verdaderas “*Pseudomonas*” han permanecido encuadradas en el grupo I de ARN 16S que definió Norberto, mientras que los grupos II a V derivaron en un buen número de nuevos géneros bacterianos. El trabajo de Norberto apareció en el primer volumen del manual Bergey’s. En 2006 tuve el honor de ser co-autor con él, Ed Moore, Vitor Santos y

Dietmar Pieper de un artículo cuyo objetivo fue actualizar la especie *Pseudomonas putida* (75).

A pesar de la diversidad que indica su nombre, hay algo común a las *Pseudomonas* y es su enorme capacidad de adaptación: *Pseudomonas* es un género con múltiples especies, que se caracterizan por utilizar una amplia gama de compuestos orgánicos e inorgánicos y ser capaces de desarrollarse en muchas condiciones ambientales. Se han aislado bacterias del género *Pseudomonas* de suelos, aguas dulces y saladas, superficies de plantas y animales y en algunos casos, particularmente cepas de las especies *P. aeruginosa* y *P. syringae*, se han descrito como patógenos de animales y plantas, respectivamente. Las *Pseudomonas* son bacterias gram-negativas que al microscopio óptico aparecen como bastoncillos alargados de 1,5 a 3 micras de largo por 0,5-1 micras de diámetro. Al microscopio electrónico de transmisión las membranas citoplasmáticas y la pared celular son obvias junto con puntos electrodensos que representan los ribosomas, más abundantes en células que crecen muy rápido. En la mayoría de las cepas hemos observado la acumulación de gránulos de poli-beta hidroxibutirato si se someten a situaciones de hambre de nitrógeno. Al microscopio electrónico de barrido aparecen como bastoncillos que interaccionan entre si o con superficies subyacentes (Figura 1). Las *Pseudomonas* son móviles y presentan un número variable de flagelos que suelen ser polares. En general, llevan a cabo respiración oxigénica, aunque algunas *Pseudomonas* son capaces de crecer en condiciones anaeróbicas respirando nitrato como aceptor final de electrones.

Los análisis de las secuencias de los genes que codifican el ARN 16S se convirtieron en esenciales para identificar las cepas pertenecientes al género *Pseudomonas*, cuya alta identidad confirmó que todas las bacterias de este género estaban filogenéticamente relacionadas. Así, *Pseudomonas* es un gran ejemplo de lo difícil que resulta establecer claramente los límites para distinguir entre especies

o cepas de la misma especie, y encontramos que la secuencia del gen 16S rRNA, el estándar para la clasificación taxonómica de bacterias, no era suficiente para diferenciar cepas de *Pseudomonas*.

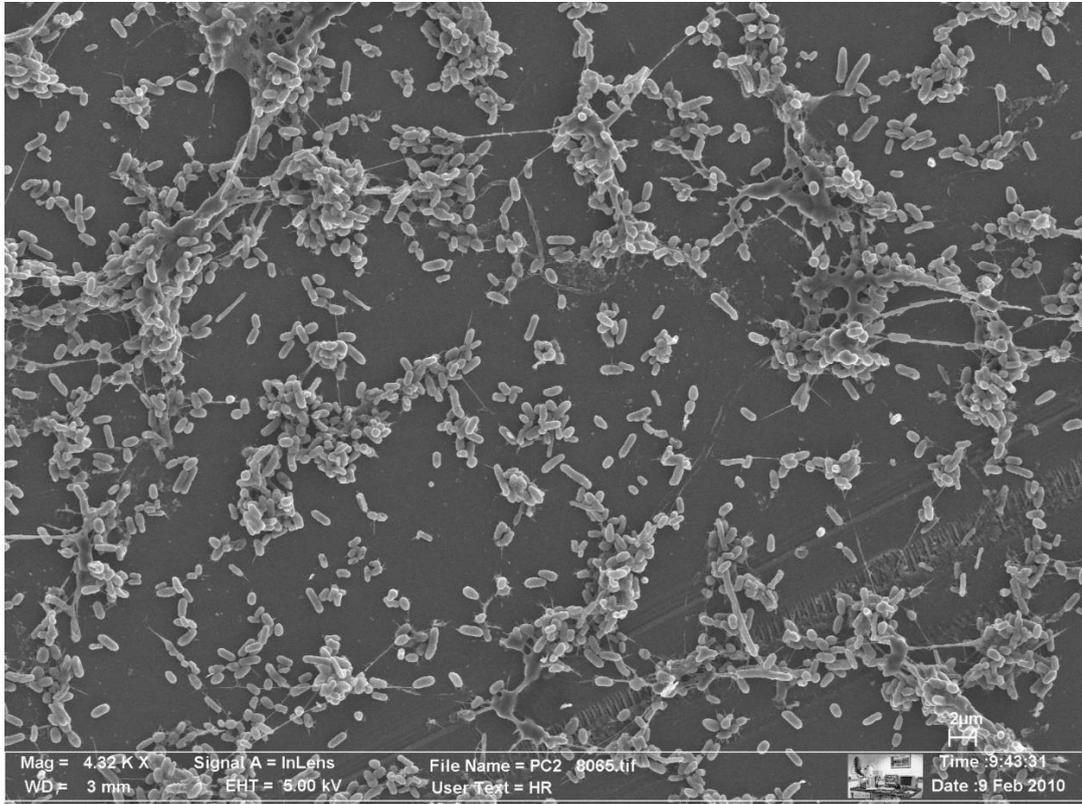


Figura 1. Fotografía al microscopio electrónico de barrido de un cultivo de *Pseudomonas putida* sobre una placa de agar en medio mínimo

Una observación que desde el primer día había puesto sobre la mesa Norberto, al que en más de una ocasión le escuché decir que un gen no podía definir una especie y ni mucho menos un género microbiano. En nuestro laboratorio se han aislado numerosas cepas del género *Pseudomonas* y para discernir entre ellas decidimos secuenciar varios genes, con potencial para actuar como cronómetros evolutivos, y usarlos para la construcción de árboles filogenéticos concatenados. Para este trabajo pusimos en práctica la técnica del *multilocus sequencing type*, que permite distinguir cepas en base al uso de cronómetros moleculares basados en genes que codifican funciones esenciales para la célula (102, 121). En estos estudios

incorporamos los genes *gyrB* y *rpoD*, que codifican una de las subunidades de la ADN girasa o topoisomerasa, y el factor sigma 70 de la RNA polimerasa, respectivamente, porque los estudios de Yamamoto y Harayama (126) indicaban que la variabilidad interna entre genes de *gyrB* y *rpoD* de cepas de una especie era más alta que la del 16S. Los otros dos genes, que elegimos como cronómetros taxonómicos, fueron el gen *citA* que codifica la citrato sintasa, una enzima esencial para la operación del ciclo de Krebs y, por tanto, elemento indispensable en cepas con metabolismo aerobio como *Pseudomonas* y el gen *trpB*, de la ruta de síntesis de triptófano. Es curioso y quizás, pasa desapercibido, pero la ruta de síntesis de este aminoácido aromático ha aparecido sólo una vez en el mundo procariota y, sus genes son, por tanto, excelentes cronómetros moleculares.

Karen Nelson (78) en el año 2002 encabezó un consorcio de grupos, fundamentalmente de USA y Alemania, que secuenciaron el genoma de la cepa *P. putida* KT2440. Una vez se dispuso de la secuencia Maximino Manzanera encontró, en nuestro laboratorio, que tras el gen *rpoH* se localizaba una secuencia de unos 30 pares de bases que era un palíndromo imperfecto (41) y que estaba repetido cerca de 800 veces en el genoma de KT2440. La misma secuencia aparecía repetida en el genoma de otras cepas de esta especie, que habíamos secuenciado y ensamblado en el grupo, aunque el número de este palíndromo imperfecto variaba entre unas 200 copias y las 800 de KT2440 (5, 57); así mismo, la localización de esta secuencia era relativamente aleatoria en los genomas, pero casi siempre se localizaba fuera de la región de transcripción de los genes por lo que se denominaron REP, del inglés *Repetitive Extragenic Palindromic Sequences*. Maximino Manzanera, María Isabel Aranda-Olmedo y Raquel Tobes pusieron de manifiesto que la distinción de cepas de *P. putida* se puede realizar utilizando como cebador la secuencia REP y la reacción en cadena de la ADN polimerasa ya que distintas cepas dan lugar a distintos perfiles de amplificación y permiten, de una manera inequívoca, diferenciar cepas (5, 102). El papel de las REPs sigue siendo

un misterio, pero fue motivo de especulación y discusión en el grupo. Se ha sugerido que podrían servir como punto de anclaje de las ADN girasas para relajar regiones que se encuentren súper enrolladas y así jugar un papel importante en la transcripción de genes; otro posible papel que discutimos fue que la estructura actuase como terminador de la transcripción, aunque la única evidencia de función es que sirve de blanco para el elemento móvil IS*Ppu10* (98), por lo que podría ser importante en la captación de genes por transferencia horizontal. Actualmente su papel es aun desconocido.

Una buena parte de las cepas con las que hemos llevado a cabo nuestros estudios pertenecen a la especie *Pseudomonas putida*, para las que hemos podido definir el pan-genoma que delimita las cepas pertenecientes a esta especie – un trabajo sencillamente elegante que constituyó la Tesis de Zulema Udaondo y que defendió en la Universidad de Granada en 2016. Conviene resaltar que las cepas de la especie *Pseudomonas putida* portan del orden de 6000 genes, de los cuales alrededor del 50% son comunes a todas ellas y definen el metabolismo central de estos microorganismos y sus respuestas básicas al medio ambiente. Este grupo de genes constituye el denominado *core* del pan-genoma de la especie. Cerca de otro 49% de los genes los comparten al menos 2 cepas y éstos se denominan “accesorios”, porque les confieren “ciertas” propiedades metabólicas o capacidades para colonizar distintos nichos. El tercer bloque incluye los denominados genes únicos, muchos de función desconocida, aunque se han identificado profagos y genes que codifican enzimas para el metabolismo de derivados orgánicos del azufre o para el transporte de metabolitos (121). Un conjunto de genes accesorios estuvo en los inicios de nuestro viaje con *Pseudomonas*, estudiando la degradación de tolueno codificada por el plásmido TOL y posteriormente la ruta de la tolueno dioxigenasa, de localización cromosómica, que permite la degradación de tolueno y etilbenceno. Entre este grupo de genes accesorios se encuentran también aquellos que codifican las

bombas de extrusión de tóxicos como TtgDEF y TtgGHI. Señores académicos, el acervo genético de las bacterias del *Pseudomonas* les permite ser ciudadanos del planeta Tierra, su ubicuidad deriva de su alta plasticidad genética y su capacidad para capturar genes y reclutar y expresar rutas de degradación de productos naturales y xenobióticos – compuestos extraños a la naturaleza - un carácter que atrajo a muchos grupos de investigación en los años 90 del pasado siglo. Nosotros hemos trabajado con cepas de la especie *Pseudomonas putida* y hemos contribuido a que se considere esta especie como un organismo modelo para estudiar interacciones plantas-microorganismos (24), formación de biopelículas (26), degradación de compuestos xenobióticos (88, 116), tolerancia a disolventes orgánicos (73, 96, 107) y que se utilice como chasis biotecnológico para producir compuestos de valor añadido (69). Estas y otras propiedades también han sido aliento en el camino a recorrer, descubrirlas, trabajarlas y entenderlas han mantenido vivo mi (nuestro) espíritu científico y mi (nuestra) ilusión.

Algunos aspectos generales sobre la vida de *Pseudomonas*

Uno de los hechos por los que ha sido “fácil” trabajar en el laboratorio con *Pseudomonas* es porque estas bacterias tienen un crecimiento rápido en medios de cultivos definidos, y se hicieron “populares” a partir de los años 50 del siglo pasado porque muchos grupos se sintieron fascinados por estos microorganismos al metabolizar compuestos del tipo de los hidrocarburos aromáticos y lineales que otros microorganismos no pueden mineralizar. De hecho, cuando iniciamos nuestros estudios en Granada el foco general se centraba en la eliminación de contaminantes en los denominados procesos de biorremediación. El primer proyecto que desarrollamos lo hicimos en colaboración con Jorge Lalucat y Elena García-Valdés de la Universidad de las Islas Baleares, que nos introdujeron en la taxonomía de *Pseudomonas*. Otra propiedad relevante de algunas cepas de la especie *P. putida*, y de especies como *P. fluorescens*, es la de estimular el

crecimiento de plantas, tanto de interés agrícola como silvestres, un aspecto en el que comenzamos a trabajar tras varios años de iniciar nuestra estancia en Granada.

Acabo de mencionar que *Pseudomonas* crece bien en medios minerales, el medio que siempre hemos utilizado es una modificación del medio M9, que describieron Marian Abril y Carmina Michán en 1989 en un artículo que publicamos en J. Bacteriol y que ha recibido cerca de 400 citas (1). La bondad de este medio de cultivo está en la solución de micronutrientes y la adición de hierro quelado que optimizan el rendimiento celular. En ausencia de hierro añadido *Pseudomonas* produce sideróforos, que juegan un papel esencial en la captura de hierro – os contaré más adelante que *Pseudomonas* es un verdadero “ladrón de hierro” ya que codifica un buen número de sistemas de captura de hierro quelado por sideróforos producidos por otros microorganismos. Esta es, sin duda, una estrategia de lucha por la supervivencia en la naturaleza que *Pseudomonas* aprovecha para “comer” lo que el vecino ha preparado. La producción de sideróforos se observa de manera clara en el medio de King y en medio CAS, donde se forma un halo incoloro alrededor de las colonias como consecuencia de la quelación del hierro. El principal sideróforo producido por *Pseudomonas putida* es la pioverdina (71).

Nuestros ensayos han demostrado que las *Pseudomonas* son bacterias mesófilas que crecen de manera óptima a 30° C, pero también crecen a temperaturas más bajas y, en más de una ocasión, las incubaciones a temperatura ambiente durante los fines de semana nos ayudaron a terminar los experimentos al evitar que crecieran en exceso a 30° C. El perfil de pH en el que se desarrollan las *Pseudomonas* se encuentra en el intervalo entre 5,5 y 8,5.

El que los hábitats de los que se aíslan las *Pseudomonas* sean tan diversos (suelos, sedimentos, rizosfera, filosfera, lagos, aguas saladas, tejidos de plantas y animales) parece derivar de sus requerimientos nutricionales sencillos, de su capacidad para utilizar un amplio espectro de fuentes de carbono y de nitrógeno tanto inorgánico

–nitrato, amonio – como orgánico incluyendo urea, aminoácidos y algunos xenobióticos como la nitroglicerina y el 2,4,6-trinitrotolueno (10, 21, 28 90, 125). El espectro de nutrientes utilizados por *Pseudomonas* incluye, entre otros, ácidos como cítrico, láctico y fumárico; aminoácidos, ácidos grasos, hidrocarburos lineales y aromáticos y una amplia gama de compuestos resultantes de la despolimerización de lignina; sin embargo, solo utiliza unos pocos monosacáridos –glucosa, fructosa y glucónico (15). En este trabajo tuvimos algunas sorpresas derivadas de que algunos aminoácidos, tanto en su forma *L* como *D*, eran excelentes fuentes de N y C – más adelante relato algunos de los detalles relativos a la prolina y la lisina. Otra característica de las *Pseudomonas* es que son capaces de utilizar un buen número de dipéptidos y peptonas por lo que los medios ricos tipo LB también son buenos para su cultivo, aunque carecen de carácter selectivo (1).

De las cepas que nosotros hemos aislado podemos mencionar T1E, aislada de aguas residuales de la planta de tratamiento de aguas urbanas de Granada, que es la cepa más tolerante a disolventes orgánicos jamás descrita (85, 89); la cepa *Pseudomonas* clon A, que utiliza TNT como fuente de nitrógeno, y que despertó gran curiosidad tanto científica como mediática (21) y la cepa BIRD-1, aislada de la jardinera de mi casa a partir de rizosfera de margaritas y jazmines; esta cepa es una excelente colonizadora de la rizosfera de plantas y es particularmente tolerante a estrés hídrico y ello quizás porque la jardinera está expuesta al sol, con riego ocasional y un suelo pobre en materia orgánica que obligaba a este microorganismo a sobrevivir a expensas de los exudados radiculares en condiciones de estrés (102). El aislamiento recurrente de *Pseudomonas* de distintos nichos se debe considerar una consecuencia de las técnicas de enriquecimiento utilizadas – medios mínimos con nutrientes inorgánicos y requerimiento de altas tasas de crecimiento que favorecerían el aislamiento de este tipo de cepas, no siendo éstas necesariamente las dominantes en esos hábitats. El crecimiento rápido en el laboratorio tampoco es, a

priori, una ventaja para predecir la colonización de suelos o aguas; sin embargo, la cepa BIRD-1 se seleccionó tras una amplia gama de ensayos de competencia con otras bacterias en cuanto a utilización de fuentes de C presentes en exudados radiculares, capacidad de crecer en la rizosfera y de formar biopelículas sobre la raíz (25, 26). Una buena parte del trabajo con BIRD-1 se recogió en la Tesis Doctoral de Paloma Pizarro-Tobías. Los mecanismos de supervivencia de las *Pseudomonas* en suelos no se han estudiado en profundidad; no obstante tenemos datos que indican que el factor más crítico es la humedad, y que, independientemente del contenido en materia orgánica del suelo o la temperatura ambiente, la desecación conduce a la muerte irreversible de *Pseudomonas* en el suelo (67, 87, 115), aunque ni los mecanismos de la muerte celular en este ambiente ni los efectos celulares del estrés hídrico se conocen en detalle.

Las bacterias del género *Pseudomonas* carecen del enzima 6-fosfofructoquinasa y utilizan la ruta de Entner-Doudoroff para asimilar glucosa. El metabolismo inicial de este monosacárido se describe más adelante y es un complejo de rutas convergentes de gran valor en metabolómica y en biología de sistemas. La glucosa en *Pseudomonas* se metaboliza vía 6-fosfogluconato hasta gliceraldehído-3-fosfato (11, 12). De los compuestos aromáticos prácticamente todas las cepas de *P. putida* utilizan benzoato, a través de una ruta orto, así como 4-hidroxibenzoato. Las tasas de crecimiento con estas fuentes de C en medio mínimo son altas y las bacterias se duplican en unos 60 min, lo cual explica por qué en los enriquecimientos en medio mínimo superan en número a otros muchos microorganismos presentes inicialmente en la muestra. *Pseudomonas putida* utiliza aromáticos metoxilados derivados de la lignina. Durante el metabolismo de estos compuestos se genera formaldehído y la cepa KT2440 exhibe dos formaldehído deshidrogenasas y dos complejos del tipo formato deshidrogenasa que rinden de manera estequiométrica CO₂ (103). Para defenderse del formaldehído, altamente tóxico, *Pseudomonas putida* induce hasta 52 genes, un trabajo que formó parte de la Tesis de Amalia

Roca. Los genes que se inducen para responder a formaldehído son los de respuestas para reparar ADN dañado (genes *recA* y *uvrB*), sistemas de eliminación de radicales libres de oxígeno, sistemas de extrusión de tóxicos y los enzimas que destoxifican el aldehído hasta CO₂. Las células también extruyen al medio el subproducto tóxico para lo cual utilizan una bomba de extrusión denominada MexEF/OprN. Los mutantes en esta bomba de extrusión son al menos 4 veces más sensibles al formaldehído que la cepa silvestre.

Muchas *Pseudomonas* utilizan una amplia gama de hidrocarburos aromáticos, que suelen ser tóxicos para la mayoría de los microorganismos. La cepa KT2440 con el plásmido TOL degrada tolueno oxidando el grupo metilo hasta benzoato, y además, degrada *m*-xileno y *p*-xileno, que son oxidados hasta 3- y 4-metilbenzoato respectivamente, y asimilados por una ruta *meta* (91).

La asociación de *Pseudomonas putida* con la raíz de las plantas.

Un actor importante en la historia de este discurso es *Pseudomonas putida* KT2440, una cepa derivada de la llamada mt-2 y que fue aislada originalmente en Japón. Teruko Nakazawa (77) describió el viaje de mt-2 por el mundo. De Japón viajó a Bangor en el País de Gales (UK) donde Peter Williams trabajó en el plásmido TOL, y cuando su estudiante Chris Franklin viajó a Berlín a trabajar en el Instituto Max Planck con Ken Timmis, el grupo receptor construyó KT2440, una cepa que es fácil de manipular genéticamente. De Berlín a Ginebra, y de allí, a bastantes laboratorios de España, conmigo a Granada y a Madrid con Víctor de Lorenzo, Fernando Rojo y Eduardo Díaz. También ha viajado a USA, Italia, Austria, Cánada, Alemania, Gran Bretaña, China, Australia y otros países.

La descripción original de la cepa *P. putida* mt-2 que se aisló de suelo de un campo de cultivo ha pasado muy desapercibida, quizás ensombrecida por la capacidad

metabólica de la cepa para degradar tolueno y *m*- y *p*-xileno. Como he dicho antes en mis primeros años en Granada, José Miguel Barea me estimuló a trabajar con *Pseudomonas* en el suelo y a buscar nuevos aspectos del metabolismo general de las bacterias de este género. Este trabajo se encuadraba bien en las líneas directrices del centro enfocadas en los estudios de micorrizas, que José Miguel Barea tan bien describió en su discurso de incorporación como Académico de Número a esta insigne Academia, y bacterias del género *Rhizobium*, un área en la que José Olivares ha sido uno de los grandes impulsores de la investigación de bacterias simbióticas con leguminosas en España y en Europa. A nosotros nos interesaron, por un lado, el establecimiento de las bacterias en la rizosfera y las bases moleculares de esta colonización y, por otro lado, el metabolismo de *Pseudomonas* a expensas de los exudados radiculares. Además, queríamos iniciar aproximaciones de rizoremediación para eliminar contaminantes del suelo, una línea en la que hemos trabajado en la eliminación de TNT (123) e hidrocarburos derivados de los incendios en bosques naturales (119). Hoy esta línea se mantiene con vigor en la EEZ bajo la dirección de Ana Segura, aunque con una perspectiva más amplia que las *Pseudomonas*.

El suelo es una matriz compleja con múltiples “micro” nichos que permiten a los microorganismos formar agregados sobre su superficie, ocupar los poros, migrar y ubicarse en función de la concentración de nutrientes y la tensión de oxígeno. Esto sin considerar su grado de humedad, determinado por la capa freática y las precipitaciones. Los primeros estudios de supervivencia de *Pseudomonas* en suelos de la provincia de Granada los realizaron Estrella Duque, María Isabel Ramos-González y Asunción Delgado, que estudiaron el comportamiento de KT2440 en distintos tipos de suelos, a los cuales se añadían contaminantes para estudiar cómo se comportaban de cara a diseñar procesos de biorremediación. En general, las *Pseudomonas* colonizan muchos tipos de suelos pero en los desnudos se establecían a baja densidad celular, mientras que *Pseudomonas* proliferaba a alta

densidad asociada a la raíz de plantas donde alcanzaba hasta 10^7 CFU/g de suelo rizosférico (23, 26, 67, 110), esto es la fracción de suelo en contacto más íntimo con la raíz. La rizosfera es una zona rica en nutrientes ya que la planta secreta más del 20% del CO_2 que fija como azúcares, aminoácidos, precursores de la lignina y otros compuestos. En la rizosfera proliferan un gran número de microorganismos, pero las *Pseudomonas* se encuentran entre los más competentes en colonización; lo que se debe en parte a que las *Pseudomonas* son atraídas por los exudados radiculares (quimiotaxis) (50), se multiplican a su expensas, se adhieren a la raíz y colonizan este nicho, explicando por qué la densidad celular por g de suelo en la rizosfera puede ser de tres a cuatro órdenes de magnitud superior a la que prolifera en el suelo desnudo (23, 26 45, 67, 110). Además de las respuestas quimiotácticas a los exudados y la capacidad de utilizar exudados radiculares, otros factores que influyen en la colonización de la raíz de las plantas son la producción de antibióticos, que elimina competidores, y el ser tolerante a las condiciones de estrés oxidativo que impera en la rizoplana de las plantas (63, 97).

En la respuesta quimiotáctica, un tema que ahora desarrolla Tino Krell, juega un papel importante la presencia de flagelos y una amplia gama de quimiorreceptores de membrana que le permiten a *Pseudomonas* detectar compuestos en los exudados radiculares, de manera que se acercan a aquellos que son apetecibles y “nadan” alejándose de los que les resultan tóxicos. En la quimiotaxis los flagelos son esenciales y José-Juan Rodríguez-Herva puso de manifiesto que en la transcripción de los genes de los flagelos juega un papel esencial el factor sigma alternativo *fliA*. Los mutantes *fliA* de *P. putida* son inmóviles y no responden quimiotácticamente a moléculas atrayentes (18). Un video que recogió Manuel Espinosa-Urgel utilizando una cámara acoplada a un microscopio permitió observar como las *Pseudomonas* detectan la presencia de semillas de maíz y tienden a rodearlas y formar biopelículas (104, 113) . Como mas vale una buena imagen que cien palabras les invito a visitar estos videos que se pueden descargar

de <https://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-148-2-341#tab5>. Estas observaciones fueron la base de la línea de biofilms e interacciones *Pseudomonas*/plantas que hoy dirigen Manuel Espinosa-Urgel y Maria Isabel Ramos- González.

La formación de biopelículas sobre la raíz requiere de un buen número de funciones como las que ejercen las fimbrias, pili y un conjunto de proteínas de superficie celular que ayudan a la adhesión. Para la adhesión a raíz *Pseudomonas* se vale fundamentalmente de un conjunto de proteínas llamadas LAP (*large adhesion protein*). La proteína LapA permite a *Pseudomonas* interactuar con la superficie. La proteína LapA consta de 8682 aminoácidos y por tanto se requieren más de 25-kilobases para su codificación (25, 43). Una vez fijada una célula a la superficie la proteína LapF favorece las interacciones entre células para formar biopelículas, aunque una biopelícula es una estructura más compleja ya que en ellas participan exopolisacáridos, proteínas y ADN extracelular que forman una amalgama que mantiene a las células unidas a la raíz y que, por su naturaleza contribuyen, a formar un gel que retiene agua.

A medida que avanzábamos en el viaje con *Pseudomonas* nos sentíamos mas fascinados por su vida en la rizosfera y Manuel Espinosa-Urgel inició una serie de ensayos que nos permitiesen entender mejor las relaciones entre la planta y la bacteria. Se puso en marcha un programa genético para entender, a nivel celular, las respuestas de *Pseudomonas* a las plantas. Las *Pseudomonas* son bacterias “oscuras” ya que no emiten luz, pero Manolo explotó la emisión de LUZ por *Pseudomonas* cuando portan los genes *lux* (25). Para ello utilizó un mini-transposón, que se insertaba al azar en el genoma de *Pseudomonas* y que portaba el operón *lux*, que se expresaba si encontraba en 5’ un promotor en el sitio de inserción. Tras la mutagénesis al azar Manolo buscó clones que emitiesen luz en respuesta a exudados radiculares y encontró un buen número de ellos, que

denominó *rei*. Entre los mutantes uno de los que presentó mayor expresión fue el que implicaba la fusión de los genes '*lux* al promotor del gen *davT*, un gen de la ruta de utilización de la lisina (25, 100). Ello nos llevó primero a entender que las raíces son ricas en lisina y que *Pseudomonas* responde a este aminoácido. Esto abrió el campo para que Olga Revelles estudiase, en su Tesis Doctoral, el metabolismo de la lisina. Olga puso de manifiesto que *Pseudomonas putida* utiliza como fuente de C y N tanto el isómero *L*- como el isómero *D*- de la lisina (100, 101). Mediante aislamiento de mutantes deficientes en el uso de uno o ambos isómeros desciframos los pasos iniciales de la degradación de estos aminoácidos y llegamos a la conclusión, sorprendente, de que el catabolismo de la *L*-lisina requiere del catabolismo de la *D*-lisina. Olga y Manolo demostraron que la vía principal de degradación de este aminoácido tiene lugar tras la oxidación y descarboxilación del aminoácido para producir 5-aminovaleramida, la cual por hidrólisis libera amonio y da lugar a gamma aminovalérico, que se metaboliza hasta acetil-CoA entrando en el ciclo de Krebs. Olga, de manera elegante, desentrañó la estructura del operón de los genes del catabolismo de la lisina, su organización génica y su regulación. Su trabajo es uno de los ejemplos más brillantes de integración de fisiología, bioquímica y genética molecular en los que hemos participado como grupo.

En la ruta de la *D*-lisina uno de los descubrimientos esenciales fue la identificación de DkpA, la proteína que media en la conversión de *L*-pipecolato a amino adipato (101). Mutantes en la ruta de la *D*-lisina no solo no metabolizaban este isómero, sino que también son deficientes en el de la *L*-lisina como fuente de carbono, pero no como fuente de N. Estrella Duque identificó una amino ácido racemasa que convertía *L*- en *D*-lisina y que es necesaria para metabolizar *L*-lisina como fuente de C y N. Con Uwe Sauer en el ETH en Zúrich Olga Revelles comprobó la bondad de los resultados genéticos mediante estudios de metabolómica. En estos estudios Olga utilizó *L*-lisina marcada uniformemente con ^{13}C y ^{15}N y determinó la

distribución de ^{15}N y ^{13}C en tres aminoácidos valina, glutamato y alanina. Los resultados confirmaron todos los pasos metabólicos propuestos en base a mutantes y que los ensayos bioquímicos que se habían realizado eran correctos.

Por otro lado, Cayo Ramos y Lázaro Molina abordaron la aproximación de determinar los aminoácidos exudados por semillas, y no sólo confirmaron que la lisina era uno de los más abundantes sino que otros aminoácidos como prolina, fenilalanina y glutamato se encontraban a alta concentración en los exudados. Estos resultados apoyaban los descritos previamente y dieron lugar al estudio del catabolismo de prolina y fenilalanina en las Tesis de Susana Vilchéz y M. Carmen Herrera, respectivamente. Susana Vilchéz encontró que la prolina es utilizada por *Pseudomonas* como fuente de carbono y nitrógeno y que su metabolismo requiere del producto del gen *putP*, que codifica un transportador y de la proteína PutA que en dos reacciones consecutivas convierte la prolina en glutamato, que entra en el metabolismo central (124). De lo más intrigante en aquellos momentos fue descubrir que la proteína PutA no sólo era un enzima sino que, además, actuaba como un regulador transcripcional modulando la expresión de los genes *putP* y *putA* al reprimir su expresión en ausencia del aminoácido. En contraste, la fenilalanina es utilizada por *Pseudomonas* como fuente de nitrógeno pero no de carbono. Mari Carmen Herrera estableció el papel de los genes *pphAB* en la conversión de fenilalanina en tirosina y su regulación por PhhR, una proteína de la familia de reguladores que funcionan con sigma-54, que se activa por este aminoácido aromático (42).

El crecimiento de *Pseudomonas* en medios mínimos y en la rizosfera requiere la síntesis de aminoácidos. Se analizaron los genes para la biosíntesis de los 20 aminoácidos proteinogénicos y se identificaron, en el genoma, todas las rutas de biosíntesis, un trabajo que realizaron en gran parte M^a Antonia (Nené) Molina-Henares y Miguel Alaminos. Nené estableció que la biosíntesis de fenilalanina y

tirosina están muy conservadas en las cepas de la especie *Pseudomonas putida* y que incluyen enzimas como la 2,4-diamino-6-hidroxipirimidina sintasa, pterinato deshidrogenasa, arogenato deshidrogenasa y aerogenato deshidratasa (70). Miguel Alaminos puso de manifiesto que la ruta de la biosíntesis de metionina se inicia a partir de homoserina en una reacción catalizada por la serina-*O*-acetiltransferasa. También *P. putida* sintetiza metionina a partir de homocisteína mediante transulfurilación y conversión de homocisteína en metionina, una reacción en la que participan 2 metioninas sintasas, una de ellas dependiente de vitamina B12 (3). El metabolismo de la metionina es esencial en el ambiente de estrés oxidativo de la raíz y en el establecimiento de relaciones planta-microorganismo.

Las interacciones de *Pseudomonas* con las plantas y el diálogo entre organismos de distintos Reinos resultaban cada día más interesantes y coincidió en el tiempo con un buen número de avances en biología molecular de estos microorganismos, que incorporamos a nuestras aproximaciones experimentales. María Isabel Ramos-González adoptó la estrategia denominada IVET de *in vivo gene expresión technology*, una aproximación experimental encaminada a detectar la supervivencia de células individuales (97). Desde el punto de vista molecular la estrategia se basa en dos elementos: una cepa con una mutación en el gen ‘*asd*’ que hace que las células no sean viables en la rizosfera ya que se requieren 3 aminoácidos y es incapaz de sintetizar ácido diaminopimélico, un interconector de las cadenas de peptidoglicanos en la célula, lo que conduce a debilidad de pared y muerte celular; y un plásmido suicida en *Pseudomonas putida* con un gen ‘*asd*’ sin promotor que en 5’ presenta sitios BglII que permiten clonar fragmentos al azar. Cuando el fragmento clonado porta un promotor tiene lugar la expresión de ‘*asd*’, bien de manera inducida o constitutiva. En el sitio BglII se clonaron al azar fragmentos de menos de 1kb del ADN de *Pseudomonas* y los plásmidos recombinantes se transfirieron a la cepa *asd* y se seleccionaron clones resistentes a kanamicina (el marcador del plásmido). Estos clones resultaban de la

recombinación del fragmento clonado en el sitio homólogo del cromosoma. Los clones resistentes a kanamicina se cultivaron e introdujeron en la rizosfera de plantas de maíz. Todos aquellos que crecieron en la rizosfera expresaban el gen *asd*, y se utilizó la expresión de *lacZ* en el plásmido tras *asd* para distinguir los constitutivos de los inducibles. Tras rescatar las regiones promotoras de los clones inducibles se identificaron unos 25 promotores inducidos por compuestos presentes en los exudados radiculares, algunos de funciones ya conocidas (mus-5 de adhesión a semillas, transportadores de glucosa y aminoácidos) que confirmaban la bondad de la aproximación y, otros nuevos de interés como el de la síntesis de alginato, metabolismo del acetato para respirar, metabolismo del piruvato, detoxificación de compuestos tóxicos, utilización de prolina y un buen número de promotores que expresaban genes de función desconocida (63, 97). Estos resultados se confirmaron mediante análisis transcriptómicos de *Pseudomonas* en la rizosfera, un trabajo excepcionalmente difícil y ejecutado con gran maestría por Maribel Ramos-González y Miguel Matilla (63).

Genómica de *Pseudomonas*

Análisis del genoma de la cepa Pseudomonas putida KT2440

En Junio de 2004 se disponía de la secuencia de 4 genomas de 4 especies distintas de *Pseudomonas*; 15 años después se dispone de 335 genomas completos y unos 4500 en ejecución (ver www.pseudomonas.com). Nuestro grupo ha analizado el genoma de KT2440, la cepa con la que iniciamos nuestros estudios, que fue el primer genoma de cepas de la especie *P. putida* disponible. Además, su estudio era fundamental para entender el comportamiento de estos microorganismos en el medio ambiente y en el laboratorio. El tamaño del genoma de la cepa KT2440 es del orden de 6,2-Mb y presenta cerca de 900 familias de genes parálogos, superior a las 800 familias de parálogos de la especie *P. aeruginosa* (78). Cerca del 50% de estos parálogos se comparten con otras bacterias, que presentan genomas de

tamaño mayor a 5-Mb, lo que indica la versatilidad metabólica de *Pseudomonas* compartida, en parte, con otros microorganismos tanto del suelo como de ambientes acuáticos. También parece indicar que el genoma se ha ido dotando de funciones que confiere flexibilidad a la bacteria para adaptarse a distintos nichos.

El genoma de *Pseudomonas* codifica diversas enzimas como oxigenasas, hidrolasas, sintetasas, transferasas y otras que juegan papeles esenciales en los procesos metabólicos generales y periféricos. Zulema Udaondo, en un artículo publicado en *Microbial Biotechnology*, clasificó las enzimas y sus funciones en base tanto al conocimiento experimental de ensayos bioquímicos como de aproximaciones bioinformáticas que permitieron identificar motivos catalíticos y estructurales. La versatilidad de familias y funciones metabólicas habla de la plasticidad de estos microorganismos y, de nuevo, de su capacidad para adaptarse a distintos nichos.

El genoma de *Pseudomonas* codifica 350 transportadores de membrana lo que requiere de casi un 5 % de los genes del genoma. De éstos unos 90 están relacionados con el transporte de aminoácidos descritos en otros microorganismos, lo cual es consistente con la capacidad de *P. putida* para establecerse en la rizosfera de plantas en la que se ha detectado la presencia de la mayoría de los aminoácidos proteinogénicos. También presenta transportadores de opinas sintetizadas por plantas sugiriendo la capacidad de utilizar compuestos específicos producidos por éstas. Además de los transportadores *P. putida* presenta una serie compleja de quimiorreceptores que detectan y responden a señales del medioambiente.

La cepa KT2440 presenta al menos 2 sistemas de transporte de sideróforos así como 18 receptores de membrana externa, relacionados con la captura de hierro quelado por sideróforos foráneos que no producen las bacterias de la especie *P. putida*. Estos sistemas de captura de hierro las convierten en auténticos “ladrones” de hierro y son responsables de su capacidad para inhibir el crecimiento de ciertos

fitopatógenos en el suelo, una propiedad que hace que tanto KT2440 como BIRD-1 en ensayos de campo actúen como agentes indirectos de biocontrol. La captura de sideróforos es un proceso que requiere energía y que está mediado por proteínas de la familia de TonB, identificadas tanto por métodos bioinformáticos como experimentales (35, 55). En su Tesis Doctoral Nené Molina-Henares demostró la importancia de la captura de hierro para la colonización de raíces y semillas por la cepa KT2440. Se han descrito al menos 3 transportadores de fosfato y 2 de sulfonatos, así como transportadores de sulfato, nitrato, oligoelementos y metales. La presencia de múltiples transportadores de fosfato y de hierro está relacionada con el hecho de que en los suelos estos nutrientes suelen estar en formas poco solubles en agua y, por tanto, se requieren sistemas de alta afinidad para su transporte al citoplasma. *Pseudomonas putida* también presenta un buen número de porinas, que en algunos casos están acopladas a sistemas de transporte ligados a la membrana citoplasmática, una combinación típica de bacterias que habitan en ambientes acuáticos, a pesar de que se aíslan frecuentemente de suelos.

La cepa KT2440 está dotada también de un buen número de genes de respuesta a estrés oxidativo incluyendo superóxido dismutasas, catalasas, betaina (aldehído) deshidrogenasa y otras enzimas, que juegan un papel en la detoxificación de radicales libres abundantes en el ambiente rizosférico y en condiciones de alto suministro de oxígeno, lo que beneficia la supervivencia de la bacteria en la rizosfera y sus altas tasas de crecimiento en ambientes aerobios (78, 121, 122). Aunque *P. putida* no crece ni desnitrifica en condiciones anaeróbicas, presenta una serie de enzimas que favorecen su proliferación en ambientes de baja tensión de oxígeno, por ejemplo, codifica dos coproporfirinógeno III oxidasas, varias nitrito reductasas y genes para el metabolismo del *D*-lactato y detoxificación de formaldehído vía formato (103).

Factores de transcripción de Pseudomonas

Como he mencionado previamente, nuestros estudios iniciales en Granada se dirigieron a desentrañar los mecanismos de regulación de las rutas de degradación de tolueno. Al profundizar en este aspecto nos hicimos conscientes de que en la regulación participan proteínas específicas y una serie de proteínas accesorias, que permiten la modulación fina de la ruta. Esto nos llevó a tratar de entender no sólo las proteínas específicas, sino el funcionamiento genético de *Pseudomonas*. Las bacterias de este género presentan una gran capacidad de adaptación al medio ambiente lo que deriva de su acervo genético, que no solo le permite utilizar una gran gama de nutrientes sino también responder a estreses ambientales gracias a una amplia serie de sistemas de regulación. Para detectar los nutrientes y responder a factores físico-químicos *Pseudomonas* utiliza algo más del 10% de sus genes. Hemos puesto de manifiesto la existencia de dos grandes grupos de reguladores transcripcionales en *Pseudomonas*; a saber, los que se unen a un efector y activan o reprimen la transcripción y un buen número de sistemas de dos componentes, formados normalmente por una sensor histidina-quinasa y un regulador transcripcional, el último se fosforila por la sensor quinasa en respuesta a una señal y, normalmente, funciona como un activador transcripcional.

Pseudomonas como otros microorganismos presenta reguladores que se pueden clasificar en familias, en base a la conservación de dominios funcionales o estructurales. Caracterizar estos reguladores nos ha ayudado a entender la biología, bioquímica y genética de *Pseudomonas*. La familia de genes más numerosa en KT2440 es la de LysR, un grupo de reguladores transcripcionales con unos 110 miembros. También son muy abundantes (94 miembros) los reguladores de dos componentes y los reguladores transcripcionales, que pertenecen a las familias de AraC/XylS, TetR, IclR, MarR, y reguladores dependientes de sigma-54 y otros. Nuestras aportaciones al estudio de las familias de reguladores transcripcionales

van más allá del género *Pseudomonas*, ya que hemos contribuido a entender los mecanismos de actuación de las proteínas de las familias de TetR, AraC/XylS e IclR. La relevancia de los artículos derivados de las Tesis de Manuel Martínez-Bueno, M. Trinidad Gallegos y Antonio Jesús Molina-Henares sobre estos reguladores se refleja en que han recibido entre 400 y 900 citas – diríamos que se han convertido en unos clásicos en el área (34, 88, 92). A este impropio trabajo también contribuyeron Tino Krell y Raquel Tobes. Por mencionar algo que nos ha faltado hacer, por falta de tiempo y porque es un trabajo que me supera hoy día, es el de recopilar las funciones de los reguladores de la familia de LysR en *Pseudomonas*. De los sistemas de dos componentes los que mejor hemos caracterizado son TodS/TodT, que regulan la ruta de la tolueno dioxigenasa (8, 9, 53, 54), y el sistema GrtS/GltR implicado en el metabolismo de la glucosa (14, 122). Hemos trabajado con reguladores de un solo componente a nivel molecular como XylS y XylR – dos reguladores de la ruta de degradación de tolueno, codificada por el plásmido TOL, y TtgR y TtgV, implicados en el control de la expresión de las bombas de extrusión de tóxicos orgánicos. En general, hemos caracterizado en detalle todos los aspectos referentes a las interacciones de estos reguladores con sus efectores (1, 2, 16, 39, 40, 64, 65, 105, 117, 118). También hemos estudiado en a nivel molecular HexR y GntR en cuanto al metabolismo de azúcares (11, 122).

Uno de los estudios más relevantes que llevamos a cabo a principios de este siglo fue elucidar los factores sigmas que median distintas respuestas en diversos procesos en *Pseudomonas*. El factor sigma-70 reconoce los promotores del conjunto de genes de los llamados *house keeping* y fueron Patricia Domínguez-Cuevas y Silvia Marqués las que para el volumen 2 de la serie de *Pseudomonas*, del que fui editor, reunieron las secuencias de unos 150 promotores de cepas de este género y encontraron que las zonas promotoras contienen un 50% de A+T frente al resto de los genes que tienen alrededor del 35% de A+T. El promotor tipo

de *Pseudomonas* se parece al de *Escherichia coli* y otras bacterias, con una secuencia 5'-TATAcT-3' en la zona de -10 y una secuencia muy conservada en -35 cuyo consenso es 5'-TTGACC-3'. El espaciador es de 17 pares de bases con una desviación de una base (19).

Manuel Martínez-Bueno realizó un excelente trabajo bioinformático y describió e identificó todos los factores sigma codificados en el genoma de la cepa KT2440 (44). El factor sigma-S, que en muchos organismos solo es activo en fase estacionaria, en el caso de *Pseudomonas* activa genes también en fase exponencial (18, 58, 60). Nuestros estudios sugirieron que el factor sigma-H no sólo estaba implicado en respuesta a choque térmico sino también a estrés, causado por la presencia de compuestos aromáticos (57). FliA o sigma-28 media la expresión de los genes de síntesis del flagelo y el homólogo de RpoE, AlgU, es un factor de respuesta a estrés. El factor sigma PvdS está implicado en el control de la expresión de los genes de biosíntesis de pioverdina, el sideróforo por excelencia de *P. putida*. Además, *Pseudomonas putida* sintetiza alginato cuya síntesis se regula por el factor sigma alternativo, sigma-22, y el regulador específico AlgM (121).

Todas las cepas de *Pseudomonas putida* poseen un gen *rpoN* también conocido como sigma-54. La primera secuencia la obtuvimos en Ginebra hace más de 30 años y encontramos que este factor juega un papel esencial en el control de la ruta del xileno (ver más adelante). El factor RpoN de *Pseudomonas* como el de otros microorganismos, es un clásico en reconocer un motivo 5'-TTGC-3' en la región de -12 y el par GG en la región de -24 (44, 91). Las secuencias reconocidas por los reguladores transcripcionales de los promotores dependientes de sigma 54 se localizan a “larga” distancia, hasta 300 pares de base aguas arriba del sitio de unión de la ARN-polimerasa; estas secuencias se denominan UAS del inglés *upstream activator sequences* (1, 2, 82). Para que el regulador y la ARN-polimerasa se pongan en contacto se requiere la formación de lazos de ADN que acerquen al

regulador, unido a las UAS, al complejo ARN polimerasa/RpoN, en la región de -12/-24, y ello requiere de la acción de proteínas accesorias IHF o HU y de la introducción de un doblez en el ADN. Uno de los trabajos más elegantes al respecto lo llevaron a cabo José Pérez- Martín y Víctor de Lorenzo en Madrid estudiando la activación del promotor Pu del plásmido TOL en un artículo publicado en la revista Cell (82).

Al estudiar el metabolismo del carbono también nos hemos encontrado con el conocido fenómeno de represión catabólica. Los primeros pasos los dio Silvia Marqués con Wouter Duetz, que realizó una corta estancia en nuestro laboratorio y nos introdujo en el mundo del cultivo continuo. Estos estudios demostraron desde el principio que el operón *upper* del plásmido TOL está sometido a control catabólico (16). Silvia Marqués e Isabel Aranda-Olmedo continuaron en este tema y demostraron que la expresión del promotor Pu de la ruta *upper* de TOL no tiene lugar en presencia de fuentes ricas de carbono sino que es un fenómeno en el que parecían implicadas las proteínas Crp y PtsN (5).

Metabolismo central: Utilización de glucosa por Pseudomonas putida

Los azúcares se encuentran entre los compuestos más abundantes en los exudados radiculares y ello atrajo nuestra atención hacia el metabolismo de la glucosa. Las bacterias del género *Pseudomonas* se caracterizan por presentar una ruta glicolítica incompleta puesto que carecen del enzima 6-fosfofructoquinasa y utilizan la ruta alternativa de Entner-Doudoroff. La organización de los genes de estas rutas en todas las *Pseudomonas* es un puzle y el control de su expresión requiere de un intrincado sistema de reguladores transcripcionales. En *Pseudomonas putida* estudiamos como se organizan y como se regulan estos genes y como la expresión coordinada de todas las actividades enzimáticas permite un flujo adecuado de carbono. El metabolismo de la glucosa en *Pseudomonas* es uno de los ejemplos

más claros de integración del metabolismo celular, lo que hoy en día constituye uno de los ejemplos de la denominada biología de sistemas (9, 12).

Los estudios de Teresa (Tesi) del Castillo pusieron de manifiesto que la glucosa se metaboliza en *Pseudomonas putida* a través de 3 rutas que operan simultáneamente y convergen a nivel del 6-fosfogluconato, el cual es posteriormente metabolizado por los enzimas EDD y EDA que forman parte de la ruta de Entner/Doudoroff dando lugar a metabolitos que se dirigen al ciclo de Krebs. La glucosa entra en la célula a través de una porina específica denominada OprB y puede o bien ser transportada al citoplasma o ser oxidada a gluconato en el periplasma antes de entrar como tal en el citoplasma. Cuando la glucosa se transporta al citoplasma el proceso es mediado por un sistema del tipo ABC, codificado por tres genes que en todas las *Pseudomonas* forman un operón. Por la acción de la glucoquinasa la glucosa se transforma en glucosa-6-fosfato que a su vez, por la acción de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, da lugar a 6-fosfogluconato.

Cuando la glucosa se oxida en el periplasma hasta gluconato, éste o bien se transporta al citoplasma y se fosforila a 6-fosfogluconato ó se oxida a 2-cetogluconato en el periplasma y es transportado al interior celular donde subsecuentemente se fosforila y reduce hasta 6-fosfogluconato. Así pues se observa que un microorganismo como *Pseudomonas*, que asimila muy pocos azúcares, presenta un metabolismo inicial de la glucosa muy sofisticado.

El metabolismo del 6-fosfogluconato implica la conversión de éste en 2-ceto-3-deoxi-6-fosfogluconato por acción del enzima EDD y, la hidrólisis de este último por EDA en pirúvico y gliceraldehido-3-fosfato. Con el grupo de Uwe Sauer en el ETH en Zürich (Suiza) exploramos los flujos metabólicos utilizando glucosa marcada homogéneamente con carbono-13. Estos estudios revelaron que el oxalacetato se producía a través del circuito de corte del pirúvico más que por

oxidación de malato, a diferencia de lo que ocurre en otras bacterias aerobias, pero en consonancia con el paso catalizado por EDA (12).

Para el análisis genético de la ruta analizamos la colección de mutantes de mini-Tn5, que había construido Estrella Duque. En ella localizamos mutantes incapaces de crecer con glucosa, que estaban mutados en los genes *edd/eda*. Como habíamos secuenciado cerca de 2000 mutantes generados al azar teníamos localizados por ejemplo mutantes en el gen *glk*, que codifica la glucosa quinasa, pero que crecía en glucosa aunque a menor ritmo que la cepa silvestre. Por esa razón Tesi del Castillo emprendió la tarea de construir mutantes individuales en cada una de las rutas y mutantes dobles y triples para bloquear dos o las tres rutas conjuntamente. De nuevo se llevaron a cabo estudios de flujo de C, que revelaron que las tres rutas funcionan simultáneamente, pero que la ruta de la glucoquinasa y el lazo de 2 cetogluconato a 6-fosfogluconato eran cuantitativamente las más importantes.

Tesi del Castillo analizó la información genética de las rutas y encontró un verdadero puzle en el que genes que codifican porinas, transportadores y enzimas forman operones, pero a diferencia de otros sistemas metabólicos en los que los genes de una ruta forman un operón, en este caso hay un verdadero barajado de genes y no sólo entre las tres rutas convergentes sino también con los genes de Entner/Doudoroff; así por ejemplo el gen que codifica la porina *oprB* forma un operón con los transportadores; el gen de la glucoquinasa se transcribe con el gen *edd* y el gen de la glucosa deshidrogenasa se transcribe con el gen *eda*. Esto nos llevó a concluir que la ruta de la glucoquinasa ha co-evolucionado con la de Entner/Doudoroff en *Pseudomonas* y forman un ente inseparable (11, 12). De hecho, esta ruta es la que opera en todas las especies del género, siendo un marcador metabólico del género.

Reguladores transcripcionales de las rutas catabólicas de glucosa en Pseudomonas putida.

La regulación del metabolismo de la glucosa no se hace en respuesta al azúcar, sino a un conjunto de intermediarios metabólicos como son el 2-cetogluconato y el 6-fosfogluconato. Estos efectores interaccionan hasta con 5 reguladores transcripcionales que regulan los puzles de genes del catabolismo de la glucosa, que obliga a una fina coordinación de la activación/represión de los genes para el metabolismo de la glucosa. Describo en esta sección brevemente los reguladores, sus efectores y las secuencias reconocidas por los mismos en sus regiones promotoras, un trabajo que recientemente ha revisado Zulema Udaondo *et al.* en *Microbial Biotechnology* (122). El gen *hexR* codifica un regulador de la familia RpiR implicado en el control de rutas de utilización de azúcares. El gen *hexR* se transcribe de manera divergente con respecto al operón *zwf/pgl/eda* y controla la expresión tanto de este operón como el operón *edd,glk, gltR-2* y al gen *gap-1*. HexR es un represor que se une a los promotores de estas unidades transcripcionales y previene su expresión. La secuencia consenso reconocida por HexR es 5'-TTGTN_{7/8}-ACAA-3'. En presencia de glucosa se producen cantidades basales del primer substrato de la ruta de Entner/Doudoroff, el 2-ceto-3-deoxi-6-fosfogluconato que actúa como efector de HexR y su unión al represor da lugar a la liberación de éste de los promotores y faculta la transcripción de los genes y la activación del bloque central del catabolismo de azúcares (11).

El gen *ptxS* codifica un represor que pertenece a la familia de LacI (13). Este gen regulador se localiza adyacente al operón *kguEKTD*, que codifica las enzimas del metabolismo del gluconato. La proteína PtxS reconoce la secuencia 5'-TGAACCGTTTCA-3' en la región de -10 del operón *kgu* y en frente del gen *gad*. PtxR pertenece a la familia de LysR y también regula la expresión desde P_{kgu} y P_{gad} reconociendo otra secuencia distinta a la que reconoce PtxS y que se corresponde con 5'-GGCN₄₋₆GCC-3' (13). Los operadores de estos dos reguladores están

separados por 50 pares de bases y la represión implica no solo unión al ADN de cada represor sino también interacción entre los reguladores, que da lugar a la formación de un lazo de inhibición en el promotor, un fenómeno bien descrito por Ali Daddaoua (13). El efector de PtxS es el 2-cetogluconato y la unión de éste a PtxS es suficiente para que el complejo nucleoproteico se rompa y permita la entrada de la ARN polimerasa para transcribir el operón *kgu* y el gen *gad*.

El regulador GntR se transcribe divergentemente con respecto a *gnuK* (gluconoquinasa) y se localiza próximo a los genes *gntP* (transportador de gluconato) y *gapN*, que codifica la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. Por tanto, GntR controla el metabolismo del gluconato y su canalización al metabolismo central. GntR es un parálogo de PtxS y podría haber evolucionado a partir de un ancestro común, según ha propuesto Ali Daddaoua (13, 122). GltR/GtrS es un sistema de dos componentes que regula el transporte de glucosa. GtrS es una proteína de la familia de los sensores quinasa, que en respuesta a 2-cetogluconato o 6-fosfogluconato, se autofosforila y, a continuación, transfosforila a la proteína GltR que estimula la transcripción desde el promotor del operón *oprB, glk, edd* y del gen *gap-1* (14, 122).

El juego de este conjunto de reguladores permite la expresión coordinada de los genes necesarios para canalizar el flujo de C desde glucosa via 6-fosfogluconato hasta intermediarios del ciclo de Krebs, donde se generará el NADH necesario para canalizar electrones a las cadenas respiratorias.

El plásmido TOL: Metabolismo periférico y su control transcripcional

Desde el punto de vista histórico, en los años 80 los plásmidos constituyeron el foco de la biología y genética molecular; por un lado, porque se demostró su papel en la transferencia horizontal de genes de resistencia a antibióticos y por otro lado, por su utilidad en el desarrollo de vectores de clonación y expresión de genes. El

plásmido TOL se describió a principios de los 80 como un nuevo tipo de plásmido que portaba genes para la eliminación de contaminantes; además, era un plásmido relativamente grande comparado con los de resistencia a antibióticos. Mi encuentro con TOL está vinculado al trabajo que se desarrollaba en el laboratorio de Kenneth Timmis en Ginebra y los avances que habíamos hecho en la elucidación de la estructura de los genes y su regulación, lo que garantizaba muchos años de trabajo. De acuerdo con Ken diseñamos un plan de trabajo para entender las rutas de TOL al incorporarme a Granada, colaborando estrechamente con mis compañeros de Ginebra primero, y luego con los de Braunschweig, cuando Ken asumió la dirección de la división de biotecnología en el GBF en Alemania. Así es como el plásmido TOL ha estado vinculado al inicio de nuestro trabajo en Granada y a las Tesis doctorales de Carmen Michán y Marian Abril, las cuales, como ya he mencionado, iniciaron nuestro ciclo de trabajo en Granada (1, 2, 64, 65). El plásmido TOL es auto transmisible y su tamaño es de 117 kb portando dos transposones que se denominan Tn4651 y Tn4653, que a su vez contienen un conjunto de genes que codifican la ruta de degradación de tolueno/*m* y *p*-xileno vía benzoato y 3- y 4-metilbenzoato. Antes de entrar en detalles bioquímicos me gustaría destacar que el plásmido TOL se transfiere con frecuencias tan altas como 10^{-1} a 10^{-3} /receptor en el laboratorio entre cepas de las distintas especies de *Pseudomonas* y, con frecuencias del orden de 10^{-7} por receptor a enterobacterias. Un hecho interesante que desvelaron María Isabel Ramos-González y María Ángeles Ramos-Díaz fue el de la retrotransferencia, que consiste en que el plásmido TOL viaja de la célula donadora a una receptora, allí se integra en el cromosoma y regresa al donador original portando genes del cromosoma del receptor (99). Este fenómeno se conoce como retrotransferencia y es una vía de captación horizontal de genes. La frecuencia de captación de genes se encuentra entre 10^{-6} y 10^{-8} por retrotransconjugante dependiendo de la localización cromosómica del marcador (95, 99).

Las reacciones básicas de oxidación de tolueno, codificadas por TOL, se recogen en la Figura 2 que muestra que el grupo metilo en el carbono 1 del tolueno (*m*-, *p*-xileno) se oxida progresivamente a alcohol bencílico, benzaldehído y benzoato. Este conjunto de reacciones se denomina ruta *upper*.

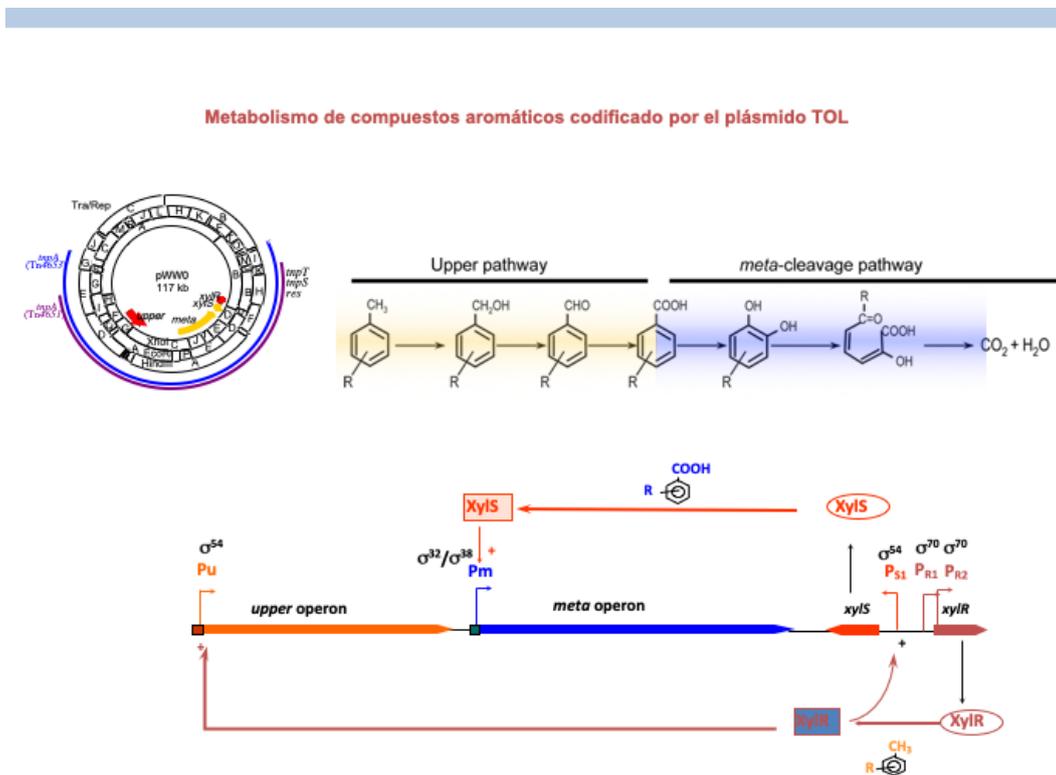


Figura 2. En la parte superior se presenta el plásmido TOL y el conjunto de reacciones que conducen a la oxidación del tolueno (xilenos) hasta catecol (metilcatecoles). La parte inferior presenta un esquema de la regulación de las rutas catabólicas de TOL. XylR es el regulador maestro que en respuesta a tolueno o xilenos activa la transcripción del operón *upper* y del gen *xylS*. El regulador XylS activa la transcripción del operón *meta*, bien en respuesta a benzoato (alquilbenzoatos) o bien por superproducción mediada por la inducción por XylR.

El benzoato (metilbenzoato) es posteriormente oxidado y descarboxilado para producir catecol (3- ó 4-metilcatecol), que mediante una fisión de tipo *meta* dan lugar al correspondiente semialdehído del ácido hidroximucónico ó sus correspondientes derivados alquílicos. El semialdehído producido a partir de 3-metilcatecol se hidroliza directamente a 2-hidroxi-6-oxohepta-2,4-dienoato

mientras que los derivados de catecol o 4-metilcatecol lo hacen a través de la rama del oxocrotonato, aunque todos convergen a nivel del 2-oxo-4-hidroxi-pentanoato, que finalmente da lugar a intermediarios del ciclo de Krebs.

La información genética que codifica la ruta *upper* está formada por un operón, que incluye los genes *xylUWCMABN*, y que fue descrita por Peter Williams en Bangor y Shige Harayama en el lab de Timmis en Ginebra. Un misterio de este operón es que la función de las proteínas que codifican los genes *xylU*, *xylW* y *xylN* es desconocida, mientras que *xylMA*, *xylB* y *xylC* codifican respectivamente la tolueno monooxigenasa, la alcohol deshidrogenasa y la aldehído deshidrogenasa. Los genes de la ruta *meta* también forman un operón denominado *xyWXYZLTEGFJQKIH* cuya organización descifró Shige Harayama (41). Silvia Marqués, en nuestro laboratorio de Granada, demostró que estos genes formaban uno de los operones más largos jamás descritos en procariotas, con unas 11 kb (61). Además de estos genes hay otros dos reguladores localizados en 3' con respecto al operón *meta* denominados *xylS* y *xylR*, éstos se transcriben de manera divergente entre sí. Nuestro grupo ha contribuido, en gran manera, a descifrar las bases moleculares de la expresión de estos genes y operones y sus correspondientes promotores se denominan Pu, Pm, Ps y Pr. La Figura 3 es una versión actualizada del modelo de regulación que propusimos en 1997, en una revisión de un trabajo publicado en la revista *Annual Review of Microbiology* (91). El modelo de regulación, la definición de los lazos transcripcionales y la participación de varias proteínas accesorias se han confirmado en distintos laboratorios del mundo (Teruko Nakazawa en Japón, Peter Williams en Bangor, Ken Timmis en Braunschweig, Víctor de Lorenzo en Madrid, Kaldalu en Estonia).

En este caso, la organización genética refleja la secuencia de las reacciones bioquímicas. Hay dos lazos de regulación, uno que opera cuando las células se cultivan en 3-metilbenzoato (el lazo *meta*), y otro que opera cuando las células se

cultivan en tolueno/*m*-xileno, que garantizan la expresión de los operones *upper* y *meta*. El esquema en la Figura 3 resume bien el conocimiento actual de la regulación específica y su integración en el metabolismo central y todo el conjunto de factores accesorios.

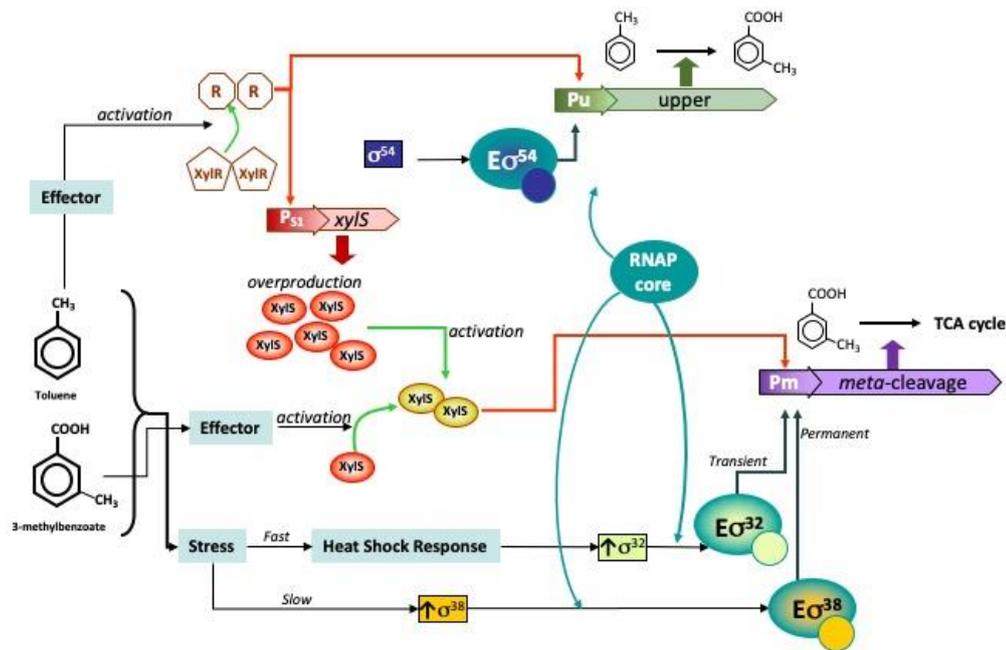


Figura 3. Expresión de los genes de las rutas catabólicas del plásmido TOL y su integración con factores de codificación cromosómica y señales ambientales.

El lazo *meta* funciona de la siguiente manera: en células de *Pseudomonas* cultivadas en medio mínimo con glucosa la expresión del gen *xylS* es baja y tiene lugar desde un promotor que depende de sigma-70, que garantiza una baja expresión del regulador. En estas condiciones los genes de la ruta *meta* no se expresan o se expresan a muy bajo nivel debido a que XylS se encuentra en una forma transcripcionalmente inactiva. Cuando se añade 3-metilbenzoato, XylS reconoce al efector y pasa a una forma activa, XylSa, que estimula fuertemente la

transcripción desde el promotor Pm, dando lugar a altos niveles de expresión de todos los enzimas de la ruta. La expresión de Pm es alta tanto en la fase exponencial como en la estacionaria y ello es debido a que Pm se transcribe con la ARN polimerasa cargada tanto con el factor sigma-70 como con los factores sigma-S o sigma-H, un trabajo que desarrollaron muy elegantemente, M^a Trinidad Gallegos, M^a del Mar González-Pérez y Patricia Domínguez-Cuevas con Silvia Marqués.

El lazo de la cascada fue un trabajo importante en el grupo con varias Tesis, la de Marian Abril, Asunción Delgado, Maxi Manzanera y el trabajo de una serie de post-doctorales como Silvia Marqués y Rafa Salto. La cascada funciona así:

1. El regulador clave es la proteína XylR, y este gen se expresa desde dos promotores en tándem dependientes de sigma-70 que, además, están regulados por el propio XylR (16, 58).
2. La forma inactiva de XylR, XylR_i, se activa al unirse a tolueno o a *m*-xileno pasando a la forma XylR_a y ésta, junto con la ARN polimerasa con sigma-54 en un proceso que además requiere de la proteína IHF, activa la expresión del operon *upper* (1, 16, 112).
3. La proteína XylR_a también estimula la transcripción de *xyI*S induciendo la expresión desde un segundo promotor denominado Ps1, que al igual que Pu es un promotor de los del tipo sigma-54; aquí no participa IHF pero si otra proteína que se une y dobla ADN como es la proteína HU (1, 37, 44, 58).
4. Como resultado de la alta expresión de *xyI*S desde Ps2 y Ps1, la proteína XylS se sobreproduce e incluso en ausencia de benzoatos y como consecuencia de un equilibrio entre XylS_i y XylS_a, una fracción adquiere la forma activa XylS_a, que garantiza la expresión del operon *meta*, la cual se sostiene posteriormente por la activación del propio XylS_i por el benzoato

derivado del tolueno o los alquilbenzoatos, que derivan del metabolismo de los xilenos (59, 88).

Paso a analizar los dos lazos por separado para que el lector aprecie algunos detalles moleculares.

El lazo meta.

El regulador del lazo *meta* es la proteína XylS. El gen *xylS* se expresa constitutivamente a bajo nivel a partir de un promotor sigma 70 y a alto nivel desde el promotor Ps1 en respuesta a tolueno. Dado que en células que expresan XylS a alto nivel no se requiere un efector para estimular la transcripción, se propuso que XylS existe en dos estados en equilibrio, uno activo y otro inactivo; el paso de inactivo a activo se estimula en presencia del efector, pero en ausencia de efectores y altas concentraciones de la proteína existe una fracción activa, que es suficiente para mediar la transcripción. XylS es una proteína de 321 aminoácidos que pertenece a la familia AraC/XylS, donde AraC es el regulador del metabolismo de arabinosa en *E. coli* y uno de los reguladores transcripcionales de procariontes mejor estudiados (34). Nosotros describimos la familia de AraC/XylS y encontramos que el alineamiento de la secuencia de proteína de los miembros de la familia revelaba dos dominios; uno conservado y formado por unos 100 aminoácidos, que es el dominio de unión a ADN, e interacción con la ARN polimerasa como puso de manifiesto Raquel Ruíz en su Tesis doctoral y, otro dominio para la unión a efectores (34, 111). En esta región de 100 aminoácidos hay 17 aminoácidos muy conservados y responden a la secuencia A-----S---L---F----G-----R---A---L-----I/V—I/V---G/F/Y----F---F/R/K---G-P, donde – es cualquier aminoácido. Como no se disponía, ni se dispone de la estructura 3D de miembros de la familia de AraC se realizaron análisis de estructura secundaria, que definieron 2 motivos hélice-giro-hélice de los típicos de unión a ADN en este dominio C-terminal (34). En XylS el primer motivo corresponde a las secuencias entre los residuos 228 y 251,

mientras que el segundo se extiende del residuo 281 al 306. Este dominio en las proteínas más cortas de la familia como SoxS, YetD, MarA consta sólo de 106 a 150 aminoácidos y parece que es suficiente para unirse a ADN, pero no contiene elementos de respuestas a moléculas efectoras, una función que se localiza en el dominio N-terminal de los miembros de esta familia de proteínas. Tanto en XylS como en AraC y MelR se han descrito una serie de mutantes en el dominio C-terminal que pierden la capacidad de unirse a ADN, confirmando el papel en la unión al operador.

El reconocimiento de efectores por XylS se demostró utilizando técnicas clásicas de mutagénesis y aislamiento de mutantes, que llevó a cabo Carmen Michán en su Tesis Doctoral (64, 65). En este caso el promotor Pm se fusionaba al gen '*lacZ*. Las colonias de *E. coli* que portaba la fusión Pm:'*lacZ* eran blancas cuando se cultivaban en medios sólidos suplementados con 5-bromo-4-cloro-3-indolil-D-galactopiranosido (X-gal). No obstante, cuando las células portaban *xylS*, las colonias, en ausencia de efector, eran blancas y tornaban a azules en presencia de benzoato. Aprovechando la amplia gama de benzoatos sustituidos por grupos Cl, Br, I, F, metilo, etilo, metoxi y otros llevamos a cabo un análisis de interacciones efector/regulador y, dado que los sustratos además no se metabolizaban y que la entrada del benzoato se consideraba que era por difusión en *E. coli*, establecimos la constante de afinidad aparente de XylS por los distintos efectores. Carmen Michán aisló mutantes puntuales de XylS que reconocían sustratos no reconocidos por la proteína silvestre y encontró mutaciones en la región 37 a 45, 88-92, 151-155 y en el dominio C-terminal de la proteína (38, 64, 65). El trabajo de Carmen Michán puso de manifiesto que cuando la Arg41 se sustituía por Leu el mutante no respondía a benzoato. También encontró mutantes como XylSSer229Ile o XylSAsp274Val, que inducían Pm en ausencia de efector, indicando que la forma mutante mimetizaba la forma XylSa (64, 65). Estos son solo algunos de los mutantes que nos ayudaron a definir dominios funcionales; sin embargo, la

limitación en la cristalización de la proteína nos hizo abandonar los estudios con esta proteína puesto que no podíamos obtener evidencias directas de las interacciones, aunque los datos apoyaban que el “sitio activo” de XylS no era un conjunto continuo de residuos en la proteína sino un conjunto de regiones implicadas en unir y transmitir señal.

El promotor Pm

La transcripción de Pm se ha estudiado en detalle en nuestro grupo, habiendo contribuido a ello las Tesis de M. Trinidad Gallegos, M. Mar González-Pérez y Patricia Domínguez-Cuevas. El promotor presenta dos dominios, la región de -10 a -35 donde se une la ARN polimerasa con distintos factores sigma, y la región de -40 a -80 que contiene los sitios de unión del regulador XylS que es una secuencia repetida en tándem 5'-TGCAApuAApupyGGNTA-3', que están separadas por 6 pares de bases, y que XylS reconocía como motivos repetidos imperfectos (32, 33, 36, 38). Delecciones situadas por encima de -60 eran activables por las formas constitutivas de XylS, pero no por el tipo silvestre activado con efector. M. Trinidad Gallegos propuso que la secuencia mínima de activación era la región comprendida entre -46 y -57, que constituye el sitio proximal y la secuencia mínima para reconocimiento por XylS del promotor Pm. Mutaciones puntuales demostraron que el dominio TGCA es crítico para la interacción de XylS con Pm y los ensayos de improntas *in vitro* indicaron que la región que protegía Pm se extendía desde -28 a -72 sugiriendo solapamiento con el sitio de unión de la ARN polimerasa. El hecho de que los sitios de unión de la ARN polimerasa y XylS solapen o fuesen al menos adyacentes sugería una estrecha interacción entre XylS y la polimerasa, hecho confirmado por Raquel Ruiz durante su estancia corta en Kansas en el laboratorio de Susan Egan, que demostró que XylS interacciona con la subunidad alfa de la ARN polimerasa.

Análisis de la cascada de TOL

El lazo de la cascada organiza la expresión de los dos operones catabólicos de manera que se establece un balance en la asimilación de una fuente de carbono (33, 44, 58). El gen *xylR* se expresa desde dos promotores divergentes con respecto a *xylS* y las secuencias UAS del promotor Ps1 solapan con los promotores de *xylR*. XylR por la disposición de la secuencia de Ps1 actúa como represor de su propia síntesis. Las secuencias invertidas de *xylSPs1* se localizaban entre -139 y -154 y otra repetición entre -169 y -184, esta disposición da lugar a un solapamiento en Pr1 de +5 a +20 y entre -24 y -19 en Pr2, de manera que explica la autorregulación de XylR. Para no entrar en más detalles indicar que la disposición de secuencias entre dos promotores divergentes permite controlar la expresión del gen maestro de la regulación del lazo de la cascada de TOL (1, 2).

La proteína XylR tiene 566 amino ácidos y pertenece a la familia de reguladores de NtrC. Estas proteínas constan de 4 dominios funcionales. La región carboxi-terminal D, que presenta un motivo alfa hélice-giro-alfa hélice, típica de proteínas que se unen a ADN. El dominio C central para la unión e hidrólisis de ATP – un trabajo elegante de Víctor de Lorenzo y José Perez-Martín, que resolvió temas no sólo de XylR sino también de esta familia de reguladores, probablemente sirva de unión a sigma 54. El dominio B se denomina dominio Q o *Q-linker* y sirve en realidad de nexo entre los dominios C y A de reconocimiento del efector.

En la familia de NtrC el efector o efectores para la mayoría de los reguladores no se conoce, pero XylR reconoce un buen número de compuestos aromáticos como tolueno, *m*-xileno, clorotoluenos, alcohol bencílico *o*- y *p*-nitrotolueno y *m*-aminotolueno pero no reconoce *m*-nitrotolueno ó *o*- y *p*-aminotolueno (16). Este trabajo se realizó en la Tesis de Marian Abril, habiendo contribuido a este trabajo

Asun Delgado y Rafa Salto (1, 16, 112). Los tres trabajaron en los detalles de las interacciones de los efectores y el regulador y las respuestas cinéticas. Asunción Delgado aisló un mutante en el que el Glu 172 se sustituyó por una lisina y ello condujo a que el mutante reconociese *m*-nitrotolueno pero dejase de reconocer *m*-aminotolueno, indicando un punto de contacto entre el efector y un residuo de XylR. El cambio a serina en esta posición dió lugar a un mutante parcialmente constitutivo de XylR, indicando que el residuo juega un doble papel como punto de interacción y de transmisión de señal.

El grupo de Víctor de Lorenzo demostró que se podía eliminar el dominio A y que este mutante no se activaba por efectores, pero aun reprimía la expresión de Pr, indicando que una proteína que contiene los dominios C y D se une al ADN en su sitio de reconocimiento. El dominio *Q-linker*, en general, es flexible ya que permite mantener la función de la proteína, aunque también algunos mutantes que aislamos en esta región dieron lugar a reguladores que mediaban la transcripción de manera constitutiva, demostrando así su papel como elemento de transmisión de señal (82).

El dominio C contiene un dominio de unión de ATP y tiene actividad ATPasa, la cual aumentaba unas 10 veces cuando los ensayos se hacían en presencia de ADN que contiene las secuencias UAS. Distintas evidencias sugieren que XylR se encuentra siempre unido a sus secuencias UAS y, que en presencia de efector, el dominio A altera su estructura, se produce una transmisión de señal que permite la entrada y la hidrólisis de ATP y ello da lugar a una multimerización de XylR, siendo ésta la forma que originalmente llamamos XylRa. Además, la forma XylRa genera modificaciones del complejo nucleoprotéico y junto con IHF permite el contacto de XylRa con ARN-polimerasa/ sigma 54 y se inicia el ciclo de transcripción (2). El sistema se integra en el metabolismo central mediante regulación global y represión catabólica (20).

La arquitectura de los promotores Pu y Ps1

Los promotores Pu y Ps1 pertenecen a la familia de promotores reconocidos y transcritos por la ARN polimerasa con el factor sigma alternativo RpoN, de manera que presentan regiones -12/-24 conservadas y unas secuencias de activación a distancia (UAS), que se localizan entre -120 y -190. Además, presentan una región rica en A and T entre -40 y -80 que le confiere flexibilidad al ADN y que es esencial para permitir la formación de la madeja nucleoprotéica, que acerca el regulador localizado a larga distancia a la ARN polimerasa/RpoN localizada en -12/-24. El motivo -12/-24 contiene la secuencia consenso 5'- TGGCN₇TTGCTA-3', que se describió por primera vez cuando yo estaba en la Unidad de Fijación de Nitrógeno en Brighton, por el grupo de Frank Canon (7), que observó que RpoN (entonces NtrA) reconocía los promotores *nif* que codifican la nitrogenasa. De hecho, el papel de sigma-54 es tan crítico en la inducción de las rutas de TOL que un mutante en este factor sigma no crece en tolueno, aunque si puede crecer en 3-metilbenzoato.

En la región entre -55 y -67 de Pu aparece un motivo de unión de la proteína IHF, una especie de histona procariota, que se une a sitios específicos del ADN y fuerza un doblado (2, 44). En ausencia de IHF la expresión de Pu se reduce a alrededor del 25%, indicando que otras proteínas como HU pueden sustituir a IHF o que el ADN por su propia flexibilidad conferida por la secuencia ricas en A+T se encuentra intrínsecamente doblado, y que el papel de IHF es consolidar el ángulo de torsión para acercar el regulador XylR localizado en las UAS a la ARN-polimerasa. Para IHF se han descrito dos sitios de unión en Ps1; uno, en -8 a -27 y otro previo a las UAS entre -137 y -165, pero el papel de IHF *in vivo* en la expresión de Ps1 no parece relevante puesto que en un fondo IHF de *Pseudomonas* este promotor se activaba *in vivo* a máximo nivel (2).

La identificación de la región de -120 a -190 como crítica para la activación de estos promotores por XylR se realizó mediante una serie de análisis de deleciones seriadas. La secuencia repetida 5'-TTGATCAAATC-3' aparece dos veces alrededor de -160 y de -130 en Pu. Marian Abril en el laboratorio de Martin Buck, en el Imperial College en Londres, realizó análisis de improntas *in vivo* que confirmaron que estas secuencias eran el sitio de unión de XylR. Con la proteína sin el dominio A y mediante ensayos de improntas con radical hidroxilo también se definió que las UAS se localizaban entre -135 y -190 en Ps1. El alineamiento de ambas regiones definió una secuencia consenso para XylR que es 5'-TTGATCAATTGATCAA-3', con el motivo TTGATCAA repetido en tándem lo que da lugar a una secuencia invertida. Los ensayos de improntas *in vivo* de Marian Abril también pusieron de manifiesto que el patrón de metilación del ADN *in vivo* era distinto en la región entre -24 y -130 en respuesta a efectores, por ejemplo se protegían las G -92, -70 y -54 y se producía una exposición a la metilación de la T -45, indicando una fuerte distorsión de la región entre el sitio de unión de la ARN polimerasa y el de unión de XylR. Además, las proyecciones de ADN reflejaron que la ARN polimerasa y XylR se unían en la misma cara del ADN mientras que el sitio IHF caía en la cara opuesta, de manera que existe un estero posicionamiento de los elementos y cuando esta geometría definida se alteraba, se perdía o disminuía significativamente la activación de Pu. Asunción Delgado demostró que solo con la UAS cercana a -12/-24 era suficiente para que el mutante constitutivo XylRAsp135Asn activase Pu, indicando que el sitio proximal de las UAS es crítico para la formación del complejo nucleoproteico (2, 112).

En resumen, la respuesta a tolueno se entiende bastante bien a nivel molecular. La unión de un efector a XylR favorece la entrada e hidrólisis de ATP y da lugar a la multimerización del regulador, siendo esta la forma activa de XylR llamada XylRa. XylRa contacta con la ARN polimerasa gracias a la multimerización y el acentuamiento de un doblez en el ADN por IHF, que pone en contacto a XylRa

con la ARN-polimerasa y permite la transcripción tanto desde Pu como de Ps1. La activación de Pu permite la síntesis de los enzimas del operón *upper* y la de Ps1 da lugar a una hiper producción de XylS que dispara la ruta *meta*, de manera que hay una sincronización plena de ambas rutas catabólicas, aunque el mantenimiento de la activación de la ruta *meta* se basa en la adquisición de una conformación estable XylSa con benzoato en el caso del tolueno o 3-metilbenzoato en el caso del *m*-xileno.

La tolerancia a disolventes: un camino lleno de sorpresas

Nuestros estudios sobre la tolerancia a disolventes orgánicos se han realizado fundamentalmente utilizando la cepa *Pseudomonas putida* DOT-T1E; el nombre DOT proviene de la denominación original de nuestro grupo en el PAIDI de la Junta de Andalucía, *Degradation of Organic Toxic Compounds*, la T viene de tolueno – porque esta bacteria se aisló en un enriquecimiento de microorganismos que utilizaban TNT como fuente de N y tolueno como fuente de carbono y la E es de Estrella Duque, que la aisló de manera serindipítica (86). Nosotros habíamos aislado previamente una cepa de *Pseudomonas* sp. denominada clon A, que utilizaba TNT como fuente de nitrógeno, y una de las hipótesis es que si se eliminasen todos los grupos nitro se podría generar tolueno, por lo que buscábamos cepas que crecieran con TNT como fuente de N y que este crecimiento se facilitase si la cepa metabolizaba tolueno como fuente de C. Como siempre el tolueno se había colocado en una varilla en U y depositado ésta en el centro de un matraz en el que el medio contenía TNT como fuente de N; se habían iniciado unos 50 enriquecimientos distintos con aguas y suelos de distinta procedencia, todos ellos en una de las bandejas del incubador que se agitaba lentamente. Una mañana Estrella se alteró porque alguien había incrementado la velocidad de agitación de la bandeja y había caído medio de cultivo dentro de las varillas y en uno de los cultivos aparecía algo que había crecido dentro de la varilla y había estropeado el

ensayo. Nuestra intención más inmediata fue sustituir la varilla “sucias” por una limpia con tolueno; y así lo hubiésemos hecho si no hubiese sido porque le comenté a Estrella que hacía unos meses había leído un artículo en Nature que se titulaba “A *Pseudomonas* thrives in high concentrations of toluene” escrito por Inoue y Horikoshi (46), y que yo había encontrado como “poco” creíble, porque era de todos bien sabido que los disolventes orgánicos son tóxicos para la mayoría de los microorganismos, y nuestra experiencia avalaba que una gota de tolueno en el medio de cultivo mataba a *Pseudomonas*. Vimos rápidamente que la bacteria que teníamos en la varilla en U crecía en tolueno al 1% (v/v) y, más aún, que era un cultivo puro cuando se sembraba en placas. Además, era gram-negativa, casualmente era una ¡*Pseudomonas*!

La toxicidad de los disolventes orgánicos depende de las propiedades físico-químicas del disolvente y la resistencia intrínseca del microorganismo. En general, la toxicidad de los disolventes orgánicos se correlaciona con el coeficiente de partición del compuesto en una mezcla de octanol/agua, cuyo valor viene definido por el LogP_{ow} (48, 88). Los disolventes orgánicos con valores de logP_{ow} entre 1,5 y 4 son extremadamente tóxicos para los microorganismos y la mayoría de los seres vivos, debido a que se reparten preferentemente en la membrana citoplasmática, desorganizan la estructura de la misma e impiden funciones vitales para los microorganismos. Varios mecanismos conducen a la resistencia a disolventes orgánicos en bacterias gram-negativas, a saber, a) modificaciones adaptativas de las membranas mediante modificación de la composición de lípidos y de los grupos de cabeza de los fosfolípidos, b) formación de vesículas cargadas de compuestos tóxicos y, c) la participación de bombas de extrusión, que utilizan energía para expulsar estos compuestos. Los cambios en el perfil de fosfolípidos son la isomerización *cis/trans* de los lípidos insaturados de la membrana de *Pseudomonas* y la disminución de fosfatidiletanolamina como grupo de cabeza a favor de la cardiolipina (6, 76, 84, 114, 116). Este área de trabajo se desarrolló gracias a las

Tesis de Patricia Bernal, María José Huertas, Antonia Rojas, Vanina García, Cecilia Pini y Patricia Godoy y siempre contó con la colaboración de Frank Junker, José-Juan Rodríguez-Herva, Lázaro Molina y Estrella Duque y la supervisión por Ana Segura. En nuestros estudios y, en el caso particular de *Pseudomonas*, en el proceso participan bombas tripartitas de la familia RND (del inglés *Root-Nodulation-cell Divison*) que exportan los disolventes desde las membranas, el periplasma o el citoplasma al medio externo – en un mecanismo que se discutirá mas adelante (88).

Alteraciones de la composición de fosfolípidos en respuesta a disolventes orgánicos

Las bacterias se encuentran rodeadas por un conjunto de membranas, que en el caso de las gram negativas, es una bicapa que forma la membrana interna y una membrana externa asimétrica con fosfolípidos y LPS, conociéndose como periplasma el espacio que existe entre ambas membranas. Los disolventes orgánicos tienden a repartirse en la bicapa lipídica y, como consecuencia, se altera su fluidez y la bacteria inicia un programa de defensa que tiende a disminuir los efectos disruptivos de los disolventes. La fluidez de la membrana se reajusta mediante compensaciones de la capa lipídica y posterior puesta en marcha de un conjunto de mecanismos de defensa que son un intricado complejo de respuestas encaminadas a mantener fuera de la célula al disolvente orgánico.

La composición típica de la membrana celular es 80% de fosfatidiletanolamina, 15 % de fosfatidilglicerol y 5% de cardiolipina. Sobre estos grupos se colocan los lípidos, dominados en *Pseudomonas* por los C18:0, C16:0, C18:1.11 *cis* y C16:1:9 *cis*. La primera respuesta a disolventes orgánicos es la isomerización *cis* a *trans* de los lípidos insaturados, una respuesta inmediata, que lleva tan poco tiempo como el que se requiere para recoger las células tras exponerlas a una concentración subletal de tolueno. El cambio de *cis* a *trans* le confiere rigidez a la cadena y, por

tanto, contrarresta el efecto fluidificante de los disolventes (33, 35, 59). El enzima que lleva a cabo la isomerización es una *cis/trans* isomerasa codificada por el gen *cti*, el cual se expresa de manera constitutiva. El enzima se localiza en el espacio periplásmico y desde allí accede al doble enlace para catalizar la isomerización tras la alteración estructural de la membrana. El grupo de Bernard Witholt demostró que esta enzima llevaba a cabo la reacción de isomerización con fosfolípidos *in vitro* (81) y Frank Junker, en nuestro laboratorio, generó un mutante nulo carente de Cti, que era incapaz de isomerizar los ácidos grasos insaturados (49). La caracterización de dicho mutante reveló una fase de latencia más larga que la de la cepa silvestre cuando las células se exponían a tolueno y también reveló que la supervivencia era menor en respuesta a un choque de tolueno a altas temperaturas. Estos resultados indicaban que la isomerización *cis/trans* participa en la respuesta a agentes estresantes que alteran la capa de fosfolípidos de la membrana, y se considera una respuesta a corto plazo.

Algunos microorganismos responden a disolventes alterando la relación entre ácidos grasos saturados a insaturados o incrementado el tamaño de la cadena de los ácidos grasos, por ej. incrementado la cantidad de ácidos grasos C20:0; ninguno de estos cambios tiene lugar en *Pseudomonas*. Sin embargo, una respuesta a medio plazo es el cambio de la proporción de los grupos de cabeza; así el grupo de Jan de Bont y el nuestro establecieron que la cantidad de fosfatidiletanolamina disminuía en células expuestas a tolueno, mientras que la cantidad de cardiolipina incrementaba. De hecho, en ensayos con ^{32}P encontramos que cerca del 90% del P que se incorporaba en fosfolípidos tras la exposición a tolueno se dirigía a la síntesis de cardiolipina, que puede aumentar hasta llegar a representar el 10% del total de los fosfolípidos frente a un 5%, que es la proporción normalmente encontrada en las células (89). Se había especulado que los lipopolisacáridos de la membrana externa también podrían jugar un papel en la resistencia a disolventes orgánicos porque cationes divalentes, que acomplejan los LPS, como Mg^{2+} y Ca^{2+} ,

incrementaban la resistencia a disolventes orgánicos, pero un mutante que carece del antígeno O de los LPS era tan resistente a disolventes como la cepa parental (49).

Bombas de eflujo y resistencia a disolventes orgánicos

En el curso de la evolución las bacterias se han visto expuestas a una gran cantidad de compuestos orgánicos como toxinas naturales, productos metabólicos y antibióticos entre otros. Para protegerse de estos compuestos los microorganismos han desarrollado una serie de mecanismos de defensa, entre los cuales destacan las bombas de extrusión de tóxicos que utilizan energía para expulsar éstos al exterior de la célula. Existen distintos grupos funcionales de bombas de eflujo como la superfamilia *major facilitator family* (MSF), las bombas “pequeñas” de extrusión de drogas, sistemas tipo ABC dependientes de ATP y las denominadas bombas de eflujo de la familia RND, que acoplan su funcionamiento al potencial de membrana. La mayoría de las bombas de extrusión de disolventes, identificadas en bacterias Gram-negativas, pertenecen a la familia RND (79, 88). Un hecho destacable es que las bombas RND extruyen compuestos tóxicos desde el citoplasma o el periplasma al exterior celular. La bomba verdadera o elemento clave de la extrusión, es la proteína de membrana interna, que se acopla a una proteína de fusión de membrana, que genera una especie de canal que atraviesa el periplasma y conecta con la proteína de la membrana externa, que actúa como puerta de salida. El grupo de Hiroshi Nikaido demostró que la proteína de membrana interna presenta una serie de vestíbulos de entrada de sustratos de manera que la bomba puede cargar los compuestos a extruir desde el citoplasma, la propia membrana interna o el periplasma (61). Las bombas Ttg cargan distintos compuestos aromáticos y no aromáticos como demostró Antonia Rojas en su Tesis Doctoral, entre ellos tolueno, octanol, estireno y otros (89, 108). Isken y De Bont (47) y nosotros observamos que la cantidad de compuestos aromáticos marcados

con ^{14}C incrementaba en la membrana si las células se trataban con el agente desacoplante CCCP, certificando que la operación de las bombas está acoplada a los sistemas de generación de energía (35).

El papel de las bombas se ha estudiado mediante el aislamiento de mutantes sensibles a tolueno. El primero en describir la implicación de estas bombas en la extrusión de compuestos aromáticos fue el grupo de Jan de Bont, que identificó las bombas SrpABC en la cepa S12. En este tema Estrella Duque y Ana Segura junto con Gilberto Mosqueda (qepd) y Antonia Rojas identificaron tres bombas de actuación sinérgica en resistencia a tolueno, que denominamos TtgABC, TtgDEF y TtgGHI (22, 74, 106, 106). Para entender cómo llegamos a esta conclusión es importante analizar los ensayos realizados. Primero el grupo estableció que la tolerancia a tolueno tenía dos componentes: uno, innato y otro inducible; así la adición de 0,3% (v/v) de tolueno a un cultivo de *Pseudomonas* DOT-T1E resultó en la supervivencia de solo 1 de cada 10.000 células del cultivo, mientras que si las células se habían pre-expuesto a tolueno en fase gaseosa (baja concentración de tolueno), la adición de 0,3% (v/v) del compuesto aromático no provocó la pérdida de viabilidad celular. Habíamos aislado un mutante en el gen *ttgB* (22), que era más sensible a tolueno que la cepa silvestre, y solo sobrevivía 1 de cada 100.000 células de ese mutante pre-expuestas a baja concentración de tolueno tras un choque al disolvente. Esto nos condujo a proponer que la bomba TtgABC estaba implicada fundamentalmente en la resistencia innata a disolventes. Patricia Godoy y Carlos Molina-Santiago pusieron de manifiesto que la bomba TtgABC no sólo está implicada en la extrusión de hidrocarburos sino también en la extrusión de antibióticos ya que mutantes en esta bomba eran hipersensibles a cloramfenicol y beta lactámicos, un trabajo posteriormente corroborado por Carlos Molina-Santiago a nivel de biología celular (29, 72).

Gilberto Mosqueda estaba caracterizando el metabolismo del tolueno en la cepa DOT-T1E, el cual tiene lugar a través de la ruta de la tolueno dioxigenasa (codificada por los genes *tod*), y encontró que los genes *tod* se situaban en una isla génica de unas 100 kb (74). El análisis de las secuencias de ADN permitió a Gilberto identificar que ligado a los genes *tod* aparecía un conjunto de genes con alta homología con *ttgABC* y, además, observó que este ligamiento génico también tenía lugar en todas las cepas que se habían secuenciado con genes *tod*. La hipótesis fue que los genes *ttgDEF* jugaban un papel en la tolerancia de la bacteria a tolueno. Gilberto generó, mediante mutagénesis dirigida, mutantes en *ttgE* y un doble mutante *ttgABC/ttgDEF*. El doble mutante no sobrevivía a la adición de 0,3 % (v/v) de tolueno si las células no se habían pre-expuesto al disolvente y sólo 1 de 100.000 de las células sobrevivía si se habían pre-cultivado en tolueno, suministrado en fase gaseosa. Esto indicaba que TtgDEF jugaba un papel en la tolerancia inducida, pero que debía existir otra bomba que permitiese la supervivencia de una fracción de las células del cultivo. Antonia Rojas identificó la tercera bomba y demostró que un triple mutante no sobrevive a la adición de 0,3% (v/v) de tolueno independientemente de que pueda crecer con tolueno suministrado en fase gaseosa (106). Mientras que las bombas TtgABC y TtgDEF son de codificación cromosómica, la bomba TtgGHI es de codificación plasmídica (66). Antonia Rojas generó una batería de mutantes sencillos, dobles y triples de las bombas y estudió el papel de éstas en la extrusión no solo de tolueno sino también de estireno, xilenos, etilbenceno, propilbenceno y otros compuestos (106). Sus estudios pusieron de manifiesto que la bomba TtgDEF solo está implicada en la extrusión de tolueno y estireno y que el papel sinérgico era obvio cuando los ensayos se realizaron con un doble mutante *ttgABC/ttgDEF*, el cual tiene comprometida su supervivencia frente a estos disolventes.

En nuestra colección de mutantes sensibles a tolueno no sólo aparecieron mutantes en las bombas de extrusión de disolventes, sino que aparecieron otros mutantes

cuyo papel no ha sido del todo desentrañado y que, en algunos casos, han aportado evidencias indirectas sobre el funcionamiento de las bombas de extrusión. Ana Segura aisló un conjunto de mutantes en diversos genes del sistema flagelar (mutantes en FliP, FlhB y FlgK), que eran sensibles a tolueno y que como era de esperar no eran motiles (113). Se han identificado mutantes similares en la cepa S12, indicando un cierto papel de los genes de síntesis del flagelo en la tolerancia de *Pseudomonas* a disolventes. Se ha postulado que el sistema de las bombas podría parasitar al sistema del flagelo para exportar las proteínas periplásmicas o las de membrana externa, pero no se han obtenido evidencias funcionales al respecto.

Patricia Godoy encontró que mutantes en el sistema *exbBDtonB* eran sensibles tanto a disolventes orgánicos como a antibióticos y estos resultados se han tomado como parte de la evidencia de que el funcionamiento de las bombas de extrusión está ligado a este sistema de transducción de energía (35). En otras cepas de *Pseudomonas*, *Escherichia coli* y otras bacterias cuya resistencia antibióticos está mediada por bombas de extrusión del tipo RND se han obtenido resultados similares, y aunque la hipótesis más plausible es que TonB activa de alguna manera a la bomba de la membrana interna, el mecanismo íntimo por el que se transfiere la energía no se conoce aún.

Chaperonas implicadas en la respuesta a tolueno.

El trabajo de Antonia Rojas y Ana Segura llevó a analizar la respuesta proteómica de *P. putida* DOT-T1E a tolueno y se observó que un conjunto de proteínas implicadas en la respuesta general a estrés como son GroES, GroL, GrpE y DnaK se sobrepresaban en respuesta a disolventes como tolueno (115). Esta respuesta ya se había observado en *E. coli*, en respuesta a etanol e isobutanol, e implicaba a un conjunto de genes que se expresan o pertenecen al regulón de RpoH. La presencia de disolventes altera las membranas celulares y la interacción con

proteínas del citoplasma da lugar a su desnaturalización siendo, por tanto, esencial que distintas chaperonas mantengan las proteínas correctamente plegadas o que aquellas que se sintetizan en respuesta al disolvente se plieguen correctamente. También se ha observado la inducción de proteínas relacionadas con estrés oxidativo, lo que parece responder a la alteración de las cadenas respiratorias y producción de radicales libres de oxígeno en presencia del disolvente; los radicales libres han de ser retirados por superóxido dismutasas y peroxidasas.

Regulación de la expresión de las bombas de eflujo de tolueno

En primer lugar, cabe señalar que los genes *ttgABC*, *ttgDEF* y *ttgGHI* forman operones que se transcriben desde el extremo 5' a partir de uno o más promotores localizados aguas arriba del primer gen del operón. Esto se demostró mediante ensayos de PCR con transcriptasa reversa y utilizando cebadores que se anillaban con el ARNm aguas arriba y aguas abajo de cada par de genes del operón. Los ensayos que realizó Estrella Duque demostraron que *ttgABC* se transcribía de manera constitutiva y que su nivel de expresión no se alteraba en respuesta a tolueno, mientras que *ttgDEF* solo se expresaba en respuesta a tolueno y *ttgGHI* se expresaba poco en ausencia de tolueno y que la expresión aumentaba en presencia de tolueno, para lo cual como posteriormente descubrimos se utilizan dos promotores solapados (30, 31). Los análisis de la región génica revelaron que en 3', con respecto a los operones, aparecía un conjunto de genes con homologías a reguladores transcripcionales. Así aguas abajo de *ttgC* aparecía *ttgR*, aguas abajo de *ttgF* aparecía *ttgT* y aguas abajo de *ttgI* aparecían dos genes *ttgV* y *ttgW* (105). El gen *ttgW* presentaba un codón de parada temprano y no codificaba un péptido funcional. Se generaron mutantes en todos y cada uno de esos genes y se analizó la expresión de los operones. Un mutante *ttgR* presentaba incrementada la expresión de *ttgA* (unas 20 veces) indicando que TtgR es un represor transcripcional; además, la propia expresión de *ttgR* aparecía incrementada en el

fondo sin la proteína sugiriendo autorregulación (22). El mutante *ttgR* era hiper resistente a varios antibióticos como cloramfenicol, tetraciclina, carbenicilina y ácido nalidíxico, mientras que el mutante *ttgB* era hipersensible a estos antibióticos confirmando también el papel de *ttgABC* como bomba de extrusión de antibióticos. El nivel basal de la bomba *ttgABC* no incrementó en respuesta a disolventes pero si en respuesta a antibióticos, flavonoides y alcoholes de cadena media – indicando un papel general de la bomba en la extrusión de compuestos potencialmente tóxicos. En este fondo *ttgR* el perfil de expresión de los operones *ttgDEF* y *ttgGHI* era el de la cepa silvestre, indicando que no había regulación cruzada (revisado en 88).

El operador de TtgR es una secuencia de 36 pares de bases en la región intergénica entre *ttgR* y *ttgA*, que solapa la región -10/-35 de *ttgA* y la -10 de *ttgR*. (4, 52). En ausencia de efectores TtgR se une al operador como un dímero y reprime su expresión. La relativa baja afinidad de TtgR por su operador (del orden de 10^{-7} M) permite un cierto nivel de expresión basal, que es esencial para la respuesta intrínseca de *P. putida* a tolueno. TtgR, en respuesta a efectores, se libera de su operador y permite una alta expresión de la bomba, que conduce a una mayor resistencia a antibióticos y, concomitantemente, a tolueno (52, 119). Estos análisis con antibióticos formaron parte de las Tesis Doctorales de Wilson Terán y M. Eugenia Guazzaroni con la posterior colaboración de Ana María Fernández-Escamilla. TtgR se ha cristalizado en su forma libre y unido al efector (Figura 4) y es un dímero que presenta la estructura típica de los miembros de la familia de TetR. Su centro activo es una amplia cavidad hidrofóbica, lo que explica que distintos efectores interaccionen con distintos residuos en dicha cavidad, y que una vez que se establecen los contactos oportunos se transmita la señal de activación, que conduce a una ligera alteración de la estructura 3D promoviendo la liberación del represor de su operador.

En un mutante *ttgT* el perfil de expresión de todas las bombas fue el mismo que en la cepa silvestre indicando que TtgT no es el principal regulador de la bomba TtgDEF. En cambio, un mutante en *ttgV* daba lugar a la hiper expresión tanto de *ttgDEF* como de *ttgGHI* indicando que ese mutante jugaba un papel esencial en la expresión de estos operones, y que su papel era el de represor transcripcional. TtgV pertenece a la familia de IclR (revisado por Antonio Jesús Molina-Henares) (69) y regula tanto a la bomba *ttgGHI* como a la *ttgDEF*. La expresión de *ttgDEF* está silenciada en ausencia de efectores, mientras que *ttgG* se expresa poco. Cuando se añade tolueno, éste interacciona con TtgV y se libera de los correspondientes operadores permitiendo la expresión inducida en respuesta al hidrocarburo aromático. TtgV es un tetrámero en solución que reconoce un operador de 42 pares de bases en sus correspondientes promotores. El operador abarca la región -10 de cada promotor, explicando la inhibición de la transcripción por exclusión de la ARN polimerasa.

Sandy Fillet participó activamente en la caracterización de TtgV y en los estudios iniciales de cristalización de este regulador en el laboratorio de Xiadong Zhang en el Imperial College de Londres (31, 56). La co-cristalización del ADN con el operador permitió definir un pseudo palíndromo como el blanco de TtgV, con reconocimiento del surco mayor del ADN, y centrados entre -24 y -14 y -4 a +7, respectivamente, en la secuencia del operador de *ttgGHI*. De hecho, este solapamiento ya fue definido por los ensayos de protección contra metilación de ADN que había llevado a cabo en su Tesis Doctoral M. Eugenia Guazzaroni que había definido que las posiciones -27, -15 y +6 en la cadena superior y las -23, -11, -4, -3 y +10 en la complementaria estaban protegidas *in vitro*. El co-cristal permitió definir que los residuos R47, T49 y R52 de TtgV contactaban directamente con las bases nucleotídicas del ADN (56).

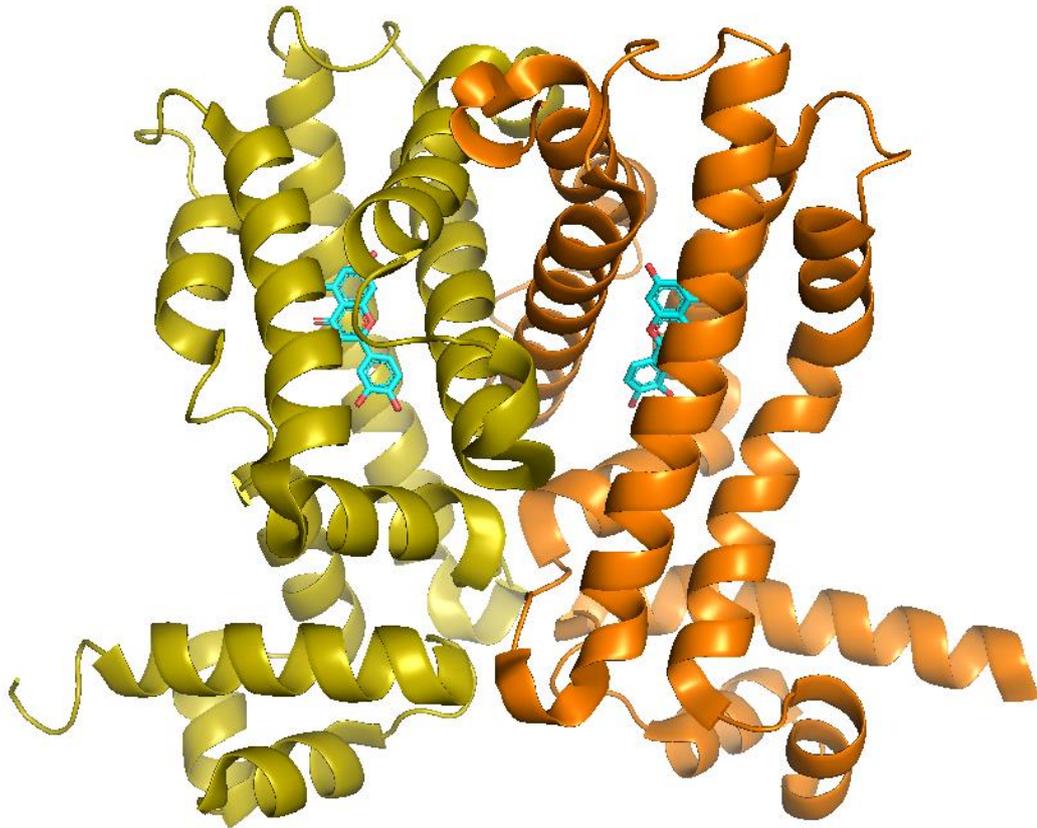


Figura 4. Estructura tridimensional de TtgR representada en forma de cintas (verde y naranja) cada uno de los monómeros y unida a quercitina, un efector de este regulador.

Cada monómero de TtgV tiene dos dominios, uno en el extremo C-terminal, que corresponde al de unión a ADN formado por un motivo HTH y, otro en la región N-terminal que porta el sitio de unión a efectores. Ambos dominios están unidos por una región puente alargada, que forma parte del eje de transmisión de señal. Así, ambos dominios se pueden desconectar mediante mutaciones, por ej. los cambios R98A y D102A, un trabajo excelente de Sandy Fillet que se publicó en la revista PNAS. La unión del efector hace que se deshaga la madeja transcripcional de represión y, tanto la proteína como el ADN se distorsionan en un proceso complejo que hemos analizado mediante cristalografía y métodos físico-químicos como la microcalorimetría. No se han obtenidos cristales de TtgV con sus

efectores, pero si del regulador en solución y unido al ADN, lo que ha permitido deducir como funciona (30, 31, 117).

La estructura 3D de TtgV y el complejo TtgV:operador se resolvieron a 2,9 Å y 3,4 Å, respectivamente, y representaron el primer caso de resolución de una proteína tetramérica formando un complejo con su operador completo (Figura 5). TtgV se une al operador como un tetrámero complejo, formado por un par de dímeros (40). La estructura ha permitido deducir un modelo general de cooperación en la unión de represores a sus secuencias blanco, un trabajo que publicamos los dos grupos en *Genes & Development* (56). El tetrámero tiene doble simetría y es compacto. El dominio de unión al ADN es de los denominados *Winged Helix* (WH) y forma parte del dominio general de interacción con ADN. El dominio WH contiene 3 α hélices a las que siguen dos hojas plegadas en β . El puente, que es la α hélice 4, es un segmento continuo que conecta con la región efectora, que contiene 6 hojas plegadas en β , que a su vez están rodeadas, como si fuese un bocadillo, por dos α hélices por uno de los lados y tres α hélices en el otro lado (56). Las hojas plegadas en β contienen los residuos que interaccionan con los efectores como demostró M. Eugenia Guazzaroni (40). Los dominios de unión al efector de los distintos monómeros interaccionan entre sí, dando lugar a la estructura con forma de diamante. Existen un buen número de interacciones entre los dímeros de manera que el tetrámero, en su conjunto, es una estructura estable. El tetrámero se une al operador como un dímero de dímeros reconociendo secuencias no solapantes en la misma cara del ADN, dicha unión conduce a una distorsión en el ADN de 60° y las proteínas de cada dímero interaccionan entre ellas a través de la región de unión al efector y hacen que el tetrámero presente ahora una estructura asimétrica más parecida a un trapecio (56).

Cuando se compara la estructura de TtgV como monómero, dímero y tetrámero las regiones de unión al ADN y al efector presentan la misma estructura; sin embargo,

el puente es bastante distinto. Así el puente que une ambos dominios forma una estructura lineal con la α hélice 5 en la estructura libre de TtgV mientras que cuando TtgV está unido a ADN adopta una estructura distinta, con un ángulo marcado por el residuo Q86 y el puente está ligeramente desestructurado entre los residuos L81 y A85 (31). Este cambio da lugar a estructuras drásticamente distintas en cuanto a la orientación de los dominios. En la transición del tetrámero simétrico en solución a la estructura asimétrica unida al ADN se genera una rotación de 60° de los dos dominios de unión del efector (56).

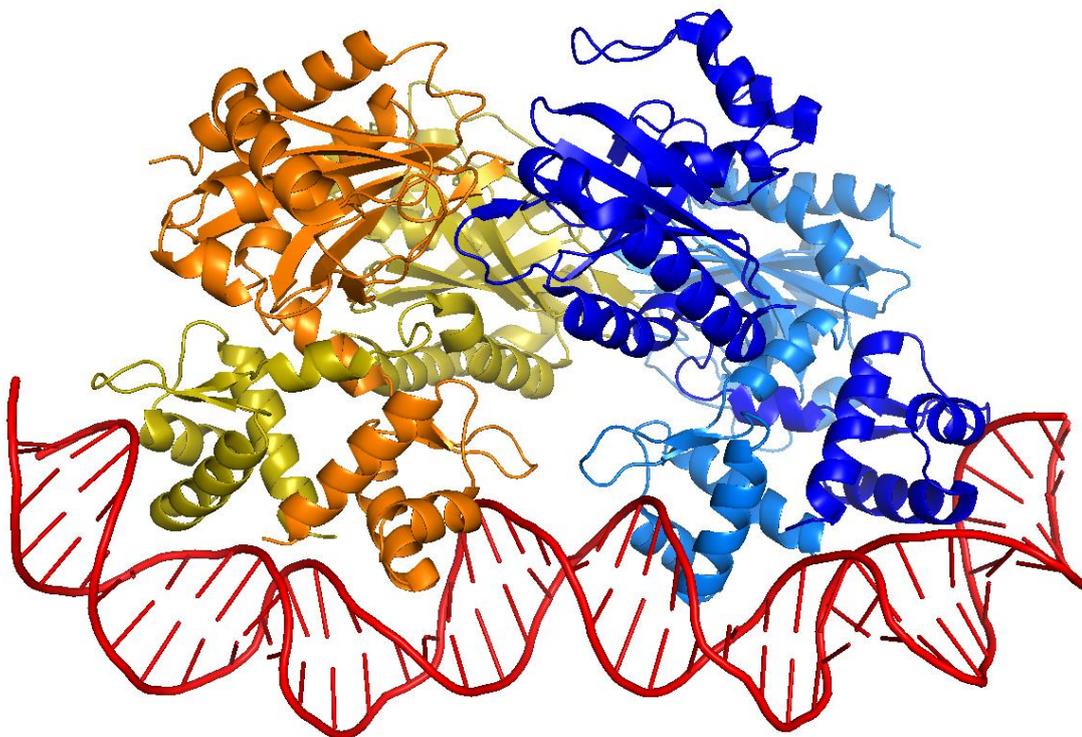


Figura 5. Representación del modelo 3D en forma de cintas del regulador tetramérico TtgV (cada monómero en un color) unido a su secuencia operadora en el ADN (los detalles se discuten en la referencia 56).

Carlos Molina-Santiago demostró que, aunque *Pseudomonas putida* no produce indol, TtgV se activa por el mismo e induce la bomba TtgGHI, que actúa como

expulsora secundaria de antibióticos (72). Esta inducción es parte del programa de defensa ya que en respuesta a indol no sólo se activa la bomba TtgGHI, sino que hay un conjunto de 43 genes que se inducen y 23 que se reprimen. Entre los genes inducidos destacan la activación de proteínas de estrés como DnaK y la alquil hidroxiperoxidasa AhpC, genes de generación de energía para facilitar la expulsión de los compuestos tóxicos y genes relacionados con el metabolismo de amino ácidos, como vía para facilitar la síntesis de las proteínas del programa de defensa.

El papel de las sensores quinasas en la regulación de la ruta TOD de *Pseudomonas*: La ruta de la tolueno dioxigenasa y su control.

El medio ambiente en el que se desarrollan las bacterias es cambiante en cuanto a la tensión de oxígeno, luz, radiación y compuestos que alteran la presión osmótica o los nutrientes disponibles. Para responder a estas señales, a nivel transcripcional, las bacterias emplean frecuentemente los sistemas denominados genéricamente “Sistemas de regulación de dos componentes”. El prototipo consiste en una proteína de membrana, que se denomina sensor quinasa (SK), que actúa como receptor de la señal y un regulador de respuesta que se modifica (frecuentemente mediante fosforilación) y que regula la expresión de los genes que controla (50, 51).

Las SK típicas contienen un dominio sensor periplásmico y un dominio autoquinasa citoplasmático, unidos entre sí a través de un dominio de membrana. Las sensores quinasas más abundantes son aquellas que presentan un dominio PAS de interacción con efectores y una autoquinasa. El dominio PAS reconoce, en algunos casos, moléculas como el citrato, fosfato tolueno como en el caso de TodS. TodS es una SK relativamente compleja puesto que contiene dos dominios PAS y dos dominios auto quinasas interconectados entre sí por un dominio RRR (Figura 6). Normalmente las SK se autofosforilan y luego transfosforilan al regulador que

modula la transcripción. En el caso de TodS se produce una cadena intramolecular de transferencia del grupo fosfato, que se conoce como *phosphorelay*, en la que el grupo fosfato se transfiere internamente hasta alcanzar el dominio de transferencia (conocido como HPT), que finalmente transfosforila al regulador transcripcional (8, 9, 53, 54). En la transferencia interna de P en TodS juegan un papel esencial una serie de residuos de histidina y ácido aspártico.

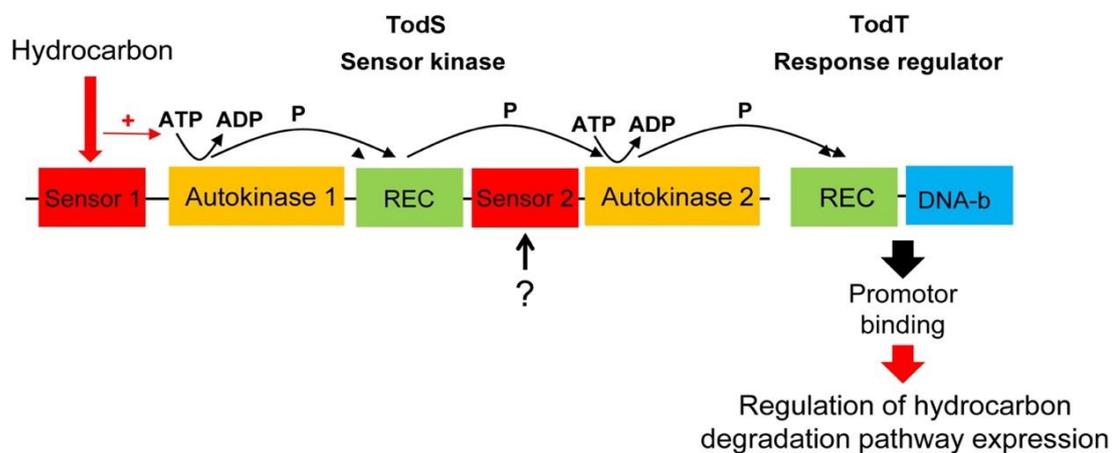


Figura 6. Activación del regulador TodT por transfosforilación por TodS en respuesta a efectores agonistas.

Estudios *in vivo* realizados por Jesús Lacal demostraron que TodS responde a una amplia gama de compuestos aromáticos como tolueno, *m*-xileno, estireno y benceno (53). Los estudios *in vitro* demostraron que TodS interacciona con efectores a través del dominio PAS en la región N-terminal y también mostraron que TodS reconocía algunos compuestos que no eran efectores *in vivo* como el *o*-xileno, llevándonos a proponer que TodS reconoce moléculas agonistas y antagonistas. Los efectores positivos promovían la autofosforilación de TodS mientras que los antagonistas la inhibían.

Aplicaciones biotecnológicas de *Pseudomonas*

Las cepas de *P. putida* tienen un indudable valor como biocatalizadores y agentes promotores del crecimiento de plantas. Por ello, se han utilizado en tratamientos de vertidos de hidrocarburos, eliminación de diversos tóxicos orgánicos – incluidos nitroglicerinas y TNT (21, 28, 83, 90, 123, 125). Las *Pseudomonas* también se han utilizado como biocatalizadores en sistemas de dos fases (107), biosensores (27) y en fitorizoremediación (68, 119, 123). Una de las características más relevantes de algunas cepas de la especie es la resistencia intrínseca a disolventes orgánicos, que suelen ser tóxicos para la mayoría de los organismos vivos, y por esa razón se han considerado como base de chasis para construir, mediante Biología Sintética, biocatalizadores que utilizan sustratos tóxicos o que generan productos que inherentemente son tóxicos. La tolerancia a disolventes orgánicos despertó rápidamente la atención del mundo industrial y la empresa Dupont, por medio de Nick Ornston de la Universidad de Yale, se puso en contacto con nosotros para tratar de utilizar la cepa para la construcción de una bacteria productora de *p*-hidroxibenzoato (96). La idea era aprovechar una corriente de desecho con tolueno para sintetizar el ácido, que a su vez es la base de parabenos y otros compuestos antimicrobianos. El trabajo lo asumió con gran interés, dedicación y perspicacia Maria Isabel Ramos-González y colaboraron Maxi Manzanera, Gilberto Mosqueda (qepd) y Susana Vílchez. La idea básica era introducir los genes de la ruta de la tolueno monooxigenasa en *P. putida* DOT-T1E y sintetizar *p*-hidroxibenzoato. El tema requería de tres actuaciones: transferir los genes *tmo* a DOT-T1E, conseguir la activación de la ruta y bloquear el metabolismo del *p*-hidroxibenzoato. Tras llevar a cabo las tres actuaciones se se construyó una cepa que producía hasta 35 g/L del ácido carboxílico – quizás en aquel momento no lo apreciamos en Granada, pero la cepa entró en el plan de procesos pre-industriales de Dupont – donde no se ensayan más de tres procesos por año.

Como he mencionado previamente las historias se cuentan de una manera que no tiene por que coincidir con el momento en que se realizaron los ensayos. Un ejemplo es el de la cepa T1E que metaboliza tolueno a través de la ruta de la tolueno dioxigenasa, que convierte tolueno en 3-metilcatecol, una reacción indeseada cuando se quiere producir *p*-hidroxibenzoato a partir de tolueno. Nosotros construimos un huésped en el cual los genes *todC1C2*, que codifican las subunidades α y β de la tolueno dioxigenasa se inactivaron y no tenía lugar el catabolismo de tolueno – probablemente una de las construcciones mas complejas que Maribel Ramos-González tuvo que diseñar. En la ruta de la tolueno monooxigenasa el tolueno se oxida a *p*-cresol, en una reacción en la que participa el complejo TmoABCDEF, que está codificado en un operón; a continuación PcuAB (*p*-hidroxibenzaldehído deshidrogenasa) y PcuC (*p*-cresol metilhidrolasa) oxidan el grupo metilo a sus correspondientes alcoholes, aldehído y ácido dando lugar a *p*-hidroxibenzoato y éste a 3,4 dihidroxibenzoato. En *Pseudomonas mendocina* todos estos genes forman un clúster con unas cuatro unidades transcripcionales y en 3' se localizan los genes *tmoST*, que codifican un sistema de dos componentes que activan la expresión de los genes *tmoABCDEF* (96). Una observación de la doctora Ramos-González fue que la secuencia de los genes *todS/T* era muy similar a la de los genes *tmoS/T* y no sólo eso sino que, a nivel de promotor, P_{todX} y P_{tmoX} eran también similares. Por ello planteó un elegante ensayo fusionando P_{tmo} al gen '*lacZ* y transfirió la construcción a un fondo con *TodST* y sin él – pero siempre en ausencia de *tmoST*. Los resultados fueron que *TodST* activaba de manera cruzada la expresión de los genes *tmo*; así, uno de los elementos necesarios para acumular *p*-hidroxibenzoato ya estaba en nuestra cepa. El siguiente paso fue clonar los genes *tmoABCDEF* y *pucXABC* en dos mini-transposones compatibles e insertarlos en una cepa carente de genes *tod*, construyéndose así una cepa que metabolizaba tolueno, pero para sintetizar *p*-hidroxibenzoato hubo que bloquear el metabolismo de éste, para lo cual primero se identificaron dos genes

que codificaban la *p*-hidroxibenzoato dioxigenasa y a continuación se inactivaron. Estas líneas resumen dos años de intenso trabajo de Maribel Ramos-González en colaboración con Dupont. La mejor cepa, denominada DOT-T1-24, se caracterizó y utilizó para optimizar el proceso que llegó a alcanzar en una primera tanda del orden de 12 mM en 30 h. Posteriormente, se realizaron ensayos de mejora de la cepa y se obtuvieron clones que acumularon hasta 35 g/L cuando se ensayaron en los reactores industriales de Dupont.

Pseudomonas putida expresa genes heterólogos y uno de los promotores más potentes es el de plásmido TOL Pm, utilizado con éxito en la construcción de distintos vectores para la expresión de genes foráneos. Estos sistemas se empezaron a emplear en los años 80 en Ginebra y han mejorado y continuado su uso durante más de 30 años. Nosotros hemos utilizado el sistema *xyIS/Pm* para construir y caracterizar bacterias suicidas, una de nuestras contribuciones más relevantes al predecir la supervivencia de los microorganismos en base a sistemas de contención biológica. Este trabajo se inició con una colaboración con Søren Molin en 1990 cuando Asunción Contreras, antes de incorporarse a nuestro grupo, realizó una estancia de tres meses en Dinamarca. Søren había descrito que ciertos genes – denominados *gef*, del inglés *gene expression fatal* – cuando se expresaban causaban muerte celular al generar poros en las membranas; la expresión de estos genes se podía controlar a través de sistemas de regulación transcripcional y modular así su supervivencia (48, 67, 109, 110). M. Carmen Ronchel en su Tesis Doctoral que co-dirigi con Cayo Ramos construyó un sistema de contención biológica para células que degradaban alquilbenzoatos, con objeto de estudiarlas tanto en el laboratorio como en el medio ambiente, un trabajo este último que fue parte de la Tesis Doctoral de Lázaro Molina (67). La idea detrás de estos sistemas de contención era evitar la dispersión en el medioambiente de microorganismos recombinantes en procesos de biorremediación.

La cepa que construimos portaba una fusión del promotor P_{lac} al gen *gef*, que codifica la proteína que induce muerte celular. En este sistema la expresión del promotor P_{lac} está controlada por la proteína LacI y para ello el gen '*lacI*, desprovisto de su promotor, se clonó bajo el control del promotor Pm, cuya expresión, como he descrito antes, es modulada por XylS. El sistema funciona de la siguiente manera: en presencia de un efector de XylS se activa la expresión de *lacI* y el represor LacI evita la expresión de *gef* y las células sobreviven; en ausencia de efector no se produce LacI y, como consecuencia de la expresión de *gef*, las células mueren. Este sistema funciona así tanto en medios de cultivo líquidos como en suelos con y sin alquilbenzoatos y la cepa es genéticamente estable. No obstante, como todo sistema vivo está sujeto a mutaciones, y encontramos que con una frecuencia del orden de 10^{-8} por célula y generación aparecían mutantes resistentes a muerte celular. Para generar cepas mejor controladas M. Carmen Ronchel diseñó un sistema de doble contención. La base del trabajo estaba en las observaciones de María Isabel Ramos-González, que había descrito que un mutante deficiente en el gen *asd* no crecía en la rizosfera debido a que es incapaz de sintetizar treonina, lisina y ácido diaminopimélico. Este mutante recupera su crecimiento si el gen '*asd* se suplementa en *trans*. Lo que hizo M. Carmen fue clonar el gen *asd* bajo el control de Pm e insertarlo en el cromosoma de la cepa en un mini-Tn5; así la cepa sintetiza todos los aminoácidos mencionados en presencia de 3-metilbenzoato pero no en su ausencia. Con esta construcción no se llegaron a aislar mutantes resistentes a muerte celular y constituye el sistema más eficaz de contención biológica descrito hasta la fecha. El sistema de contención dual es un modelo básico de lo que hoy se denomina biología sintética. Las cepas se comportaban en medios líquidos y en suelos conforme a su diseño. Me gustaría destacar que los ensayos de Lázaro Molina, con los permisos pertinentes del Ministerio de Medio Ambiente, con cepas contenidas biológicamente y sus parentales representaron la primera vez que en España se

ensayaron microorganismos recombinantes en el medio ambiente. Lázaro encontró que en un suelo sin alquilbenzoato el número de células viables era inferior a nuestro límite de detección, que se había establecido en 50 células por g de suelo, indicando que el sistema de contención ideado en el laboratorio era efectivo en el medio ambiente.

Cierre

En este discurso he intentado presentar una visión general de las contribuciones hechas por nuestro grupo de la Estación Experimental del Zaidín en Granada a la biología de *Pseudomonas* en general, y las bases que permiten entender los mecanismos de interacción con plantas, la degradación de xenobióticos y los mecanismos de tolerancia a disolventes orgánicos. Por el camino hemos trabajado en aspectos de taxonomía y de metagenómica funcional como vías de entender y complementar las funciones de *Pseudomonas* y convertirlas en biocatalizadores. Este trabajo ha dado lugar a 46 Tesis Doctorales y han trabajado directamente bajo mi supervisión más de 25 investigadores post-doctorales; muchos de ellos hoy distinguidos profesores en Universidades de España, México, Italia, Austria, Dinamarca, Canadá, Holanda, Suiza, Brasil, Argentina y Colombia. Sin ellos, este trabajo no hubiese sido posible como tampoco lo hubiera sido sin Mai Fandila, su memoria enciclopédica y su trabajo constante han sido claves para que nada quedase pendiente ni de hacer ni del azar. Carmen Lorente empezó ayudando con los “journals”, una ayuda inestimable en el manejo de la labor editorial y en el pulido del inglés de muchos artículos, luego se incorporó de pleno y siempre ha estado ahí para ayudar. Ben Pakuts también ha jugado un papel relevante, incluso desde Canadá puliendo el inglés de nuestros manuscritos. No quiero olvidar mis colaboraciones externas, la más exitosa con Xiadong Zhang que nos permitió cristalizar varios reguladores y cumplir uno de mis sueños de estudiante de la

carrera, “ver” la estructura 3D de una proteína, leyendo el viejo “Leningher” me sigue encantando el capítulo de la mioglobina y la hemoglobina. Con Uwe Sauer entender el concepto de la metabolómica utilizando moléculas marcadas con isótopos estables. Con Søren Molin con las bacterias suicidas y la biología de *Pseudomonas* y con Ken Timmis y Victor de Lorenzo en desentrañar la regulación de las rutas del plásmido TOL. En todo este discurso y a lo largo de este maratón siempre han estado presentes mis hijos, Estrella y Juan Luis, que han disfrutado del viaje viajando con nosotros a Alemania, Suiza y Dinamarca; quizás hayan sufrido nuestros desvelos científicos y aunque pensábamos que no hablábamos de ciencia en casa, nos dimos cuenta que *Pseudomonas* era como la hermana pequeña de los dos. Las alegrías de *Pseudomonas* han sido múltiples pero muy pequeñas comparadas con las que nos habéis dado vosotros dos. Este maratón es el de vuestra madre y el mío, vosotros sois parte del mismo, pero hoy vuestro maratón lo tenéis que correr vosotros – ¡ánimo! y como dijo el poeta caminante no hay camino se hace camino al andar.....

REFERENCIAS

1. Abril M.A., Michán C., Timmis K.N., and Ramos J.L. Regulator and enzyme specificities of the TOL plasmid-encoded upper pathway for degradation of aromatic hydrocarbons and expansion of the substrate range of the pathway. *J. Bacteriol.* 171, 6782-6790. 1989.
2. Abril M.A., Buck M., Ramos J.L. Activation of the *Pseudomonas* TOL plasmid upper pathway operon: Identification of binding sites for the XylR positive regulator and IHF protein. *J. Biol. Chem.* 266, 15832-15838. 1991.
3. Alaminos, M., J.L. Ramos. The methionine biosynthetic pathway from homoserine in *Pseudomonas putida* involves the *metW*, *metX*, *metZ*, *metH* and *metE* gene products. *Arch. Microbiol.* 76:151-154. 2001.
4. Alguel, Y., C. Meng, W. Terán, T. Krell, J.L. Ramos, M.T. Gallegos, X. Zhang.

- Crystal structure of multidrug binding protein TtgR in complex with antibiotics and plant antimicrobials. *J. Mol. Biol.* 369:829-840. 2007.
5. Aranda-Olmedo, I., R. Tobes, M. Manzanera, J.L. Ramos, S. Marqués. Species-specific repetitive extragenic palindromic (REP) sequences in *Pseudomonas putida*. *Nucleic Acids Res.* 30:1826-1833. 2002.
 6. Bernal, P., J. Muñoz-Rojas, A. Hurtado, J.L. Ramos, A. Segura. A *Pseudomonas putida* cardiolipin synthesis mutant exhibits increased sensitivity to drugs related to transport functionality. *Environ. Microbiol.* 9:1135-1145. 2007.
 7. Beynon, J., M. Cannon, V. Buchanan-Wollaston, F. Cannon. The *nif* promoters of *Klebsiella pneumoniae* have a characteristic primary structure. *Cell* 34:665-671. 1983.
 8. Busch, A., M.E. Guazzaroni, J. Lacal, J.L. Ramos, T. Krell. The sensor kinase TodS operates by a phosphorelay mechanism involving two autokinase domains. *J. Biol. Chem.* 284:10353-10360. 2009.
 9. Busch, A. Lacal, A. Martos, J.L. Ramos, T. Krell. Bacterial sensor kinase TodS interacts with agonistic and antagonistic signals. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 104:13774-13779. 2007.
 10. Caballero, A., A. Esteve-Núñez, G. Zylstra, J.L. Ramos. Assimilation of nitrogen from nitrite and trinitrotoluene in *Pseudomonas putida* JLR11. *J. Bacteriol.* 187:396-399. 2005.
 11. del Castillo, T., E. Duque, and J.L. Ramos. A set of activators and repressors control peripheral glucose pathways in *Pseudomonas putida* to yield a common central intermediate. *J. Bacteriol.* 190:2331-2339. 2008.
 12. del Castillo, T., J.L. Ramos, J.J. Rodríguez-Herva, T. Führer, U. Sauer, and E. Duque. Convergent peripheral pathways catalyze initial glucose catabolism in *Pseudomonas putida*: Genomic and flux analysis. *J. Bacteriol.* 189:5142-5152. 2007.
 13. Daddaoua, A., T. Krell, and J.L. Ramos. Transcriptional control by two interacting regulatory proteins: identification of the PtxS binding site at PtxR. *Nucl. Acids Res.* 41:10150-10156. 2013.

14. Daddaoua, A., C. Molina-Santiago, J. de la Torre, T. Krell and J.-L. Ramos. GtrS and GltR form a two-component system: the central role of 2-ketogluconate in the expression of exotoxin A and glucose catabolic enzymes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic Acids Research* 42:7654–7665. 2014.
15. Daniels, C., P. Godoy, E. Duque, M.A. Molina-Henares, J. de la Torre, J.M. del Arco, C. Herrera, A. Segura, M.E. Guazzaroni, M. Ferrer, and J.L. Ramos. Global regulation of food supply by *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *J. Bacteriol.* 192:2169-2181. 2010.
16. Delgado A., Ramos J.L. Genetic evidence for activation of XylR, a member of the NtrC family of regulators, by effector binding. *J. Biol. Chem.* 269, 8059-8062. 1994.
17. Domínguez-Cuevas, P., P. Marín, S. Marqués, J.L. Ramos. XylS-Pm Promoter interactions through two helix-turn-helix motifs: Identifying XylS residues important for DNA binding and activation. *J. Mol. Biol.* 375:59-69. 2008.
18. Domínguez-Cuevas, P., P. Marín, J.L. Ramos, S. Marqués. RNA polymerase holoenzymes can share a single transcription start site for the Pm promoter: Critical nucleotides in the 7 to 8 region are needed to select between RNA polymerase with σ^{38} or σ^{32} . *J. Biol. Chem.* 280:41315-41323. 2005.
19. Dominguez-Cuevas, P., S. Marqués. Compiling sigma-70 dependent promoters. En *Pseudomonas* vol 2, pp 319-343. Springer. New York. 2004.
20. Duetz, W.A., Marqués S., de Jong C., Ramos J.L., van Andel J.G. Inducibility of the TOL catabolic pathway in *P. putida* (pWW0) growing on succinate in continuous culture: evidence of carbon catabolite repression control. *J. Bacteriol.* 176, 2354-2361. 1994.
21. Duque E., Haïdour A., Godoy F., Ramos J.L. Construction of a *Pseudomonas* hybrid strain that mineralizes 2,4,6- trinitrotoluene. *J. Bacteriol.* 175, 2278-2283. 1993.
22. Duque, E., A. Segura, G. Mosqueda, J.L. Ramos. Global and cognate regulators control the expression of the organic solvent efflux pumps TtgABC and TtgDEF of *Pseudomonas putida*. *Mol. Microbiol.* 39:1100-1106. 2001.
23. Duque, E., J de la Torre, P. Bernal, M.A. Molina-Henares, M. Alaminos, M.

- Espinosa-Urgel, *et al.* Identification of reciprocal adhesion genes in pathogenic and nonpathogenic *Pseudomonas*. *Environ. Microbiol.* 15:36-48. 2013.
- 24.Espinosa-Urgel, M., R. Kolter., J.L. Ramos. Root colonization by *Pseudomonas putida*; love at first sight. *Microbiology* 148:341-343. 2002.
- 25.Espinosa-Urgel, M., A. Salido, J.L. Ramos. Genetic analysis of functions involved in adhesion of *Pseudomonas putida* to seeds. *J. Bacteriol.* 182, 2363-2369. 2000.
- 26.Espinosa-Urgel, M. and J.L. Ramos. Cell density-dependent gene contributes to efficient seed colonization by *Pseudomonas putida* KT2440. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:5190-5198. 2004.
- 27.Espinosa-Urgel, M., L. Serrano, J.L. Ramos and A.M. Fernández-Escamilla. Engineering biological approaches for detection of toxic compounds: A new microbial biosensor based on the *Pseudomonas putida* TtgR repressor. *Mol Biotechnol.* 57:558-564. 2015.
- 28.Esteve-Núñez, A., A. Caballero., J.L. Ramos. Biological degradation of 2,4,6-trinitrotoluene. *Microb. Mol. Biol. Rev.* 65:335-352. 2001.
- 29.Fernández, M., S. Conde, J. de la Torre, C. Molina-Santiago, J.L. Ramos, and E. Duque. Mechanisms of resistance to chloramphenicol by *Pseudomonas putida* KT2440. *Antimicrob. Agent Chem.* 56:1001-1009. 2012.
- 30.Fillet, S., M. Vélez, D. Lu, X. Zhang, M.T. Gallegos, J.L. Ramos. TtgV Represses two different promoters by recognizing different sequences. *J. Bacteriol.* 191:1901-1909. 2009.
- 31.Fillet, S., T. Krell, B. Morel, D. Lu, X. Zhang, and J.L. Ramos. Intramolecular signal transmission in a tetrameric repressor of the IclR family. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 108:15372-15377. 2011.
- 32.Gallegos, M.T., Marqués, S., Ramos, J.L. Expression of the TOL plasmid *xyIS* gene in *Pseudomonas putida* occurs from a σ^{70} -dependent promoter or from σ^{70} and σ^{54} -dependent tandem promoters according to the (aromatic) compound used for growth. *J. Bacteriol.* 178, 2356-2361. 1996.

33. Gallegos, M.T., Marqués, S., Ramos J.L. The TACAN₄TGCA motif upstream from the -35 region in the σ^{70}/σ^S -dependent Pm promoter of the TOL plasmid is the minimum DNA segment required for transcription stimulation by XylS regulators. *J. Bacteriol.* 178, 6427-6434. 1996.
34. Gallegos, M.T., R. Schleif, A. Bairoch, K. Hofmann, and J.L. Ramos. AraC/XylS of transcriptional regulators. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61:393-410. 1997.
35. Godoy, P., M.I. Ramos-González, J.L. Ramos. *Pseudomonas putida* mutants in the *exbBexbDtonB* gene cluster are hypersensitive to environmental and chemical stressors. *Environ. Microbiol.* 6:605-610. 2004.
36. González-Pérez, M.M., Ramos, J.L., Gallegos, M.T., Marqués, S. Critical nucleotides in the upstream region of the XylS-dependent TOL *meta*-cleavage pathway operon promoter as deduced from analysis of mutants. *J. Biol. Chem.* 274, 2286-2290. 1999.
37. González-Pérez, M.M., J.L. Ramos, S. Marqués. Cellular XylS levels are a function of the transcription of *xylS* from two independent promoters and the differential efficiency of translation of the two mRNAs. *J. Bacteriol.* 186:1898-1901. 2000.
38. González-Pérez, M.M., Ramos, J.L., Gallegos, M.T., Marqués, S. Critical nucleotides in the upstream region of the XylS-dependent TOL *meta*-cleavage pathway operon promoter as deduced from analysis of mutants. *J. Biol. Chem.* 274, 2286-2290. 1999.
39. Guazzaroni, M.E., T. Krell, P. Gutierrez del Arroyo, M. Vélez, M. Jiménez, G. Rivas, J.L. Ramos. The transcriptional repressor TtgV recognizes a complex operator as a tetramer and induces convex DNA bending. *J. Mol. Biol.* 369:927-939. 2007.
40. Guazzaroni, M.E., T. Krell, A. Felipe, R. Ruiz, C. Meng, X. Zhang, M.T. Gallegos, and J.L. Ramos. The multidrug efflux regulator TtgV recognizes a wide range of structurally different effectors in solution and complexed with target DNA: Evidence from isothermal titration calorimetry. *J. Biol. Chem.* 280: 20887-20893. 2005.
41. Harayama, S., P.R. Lehrbach, K. N. Timmis. Transposon mutagenesis analysis

- of meta-cleavage pathway operon of the TOL plasmid of *Pseudomonas putida* mt-2. J. Bacteriol 160:251-255. 1984
- 42.Herrera, M.C., E. Duque, J.J. Rodríguez-Herva, A.M. Fernández-Escamilla, and J.L. Ramos. Identification and characterization of the PhhR regulon in *Pseudomonas putida*. Environ. Microbiol. 12:1427-1438. 2009.
- 43.Hinsa, S.M., M. Espinosa-Urgel, J.L. Ramos, G.A. O'Toole. Transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365 requires an ABC transporter and a large secreted protein. Mol. Microbiol. 49:905-918. 2003.
- 44.Holtel A., Timmis K.N., Ramos J.L. Upstream binding sequences of the XylR activator protein and IHF in the *xylS* gene promoter region of the *Pseudomonas* TOL plasmid. Nucleic Acids Res. 7, 1755-1762. 1992.
- 45.Huertas M.J., Duque E., Molina, L., Roselló-Mora R., Mosqueda G., *et al.* Tolerance to sudden organic solvent shocks by soil bacteria and characterization of *Pseudomonas putida* strains isolated from toluene polluted sites. Env. Sci. Technol. 34, 3395-3400. 2000.
- 46.Inoue, A., K. Horikoshi. A *Pseudomonas* thrives in high concentrations of toluene. Nature 338: 264-266. 1989.
- 47.Isken, S., A. Derks, P. F.G. Wolffs, J. De Bont. Effect of organic solvents on yield on the solvent-tolerant *Pseudomonas* S12. Appl. Environ. Microbiol. 65: 2631-2635. 1999
- 48.Jensen L.B., Ramos J.L., Kaneva Z., Molin S. A substrate-dependent biological containment system for *P. putida* based on the *E. coli* *gef* gene. Appl. Environ. Microbiol. 59, 3713-3717. 1993.
- 49.Junker, F., Ramos, J.L. Involvement of the *cis/trans* isomerase CtiT1 in solvent resistance in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. J. Bacteriol., 181, 5693-5700. 1999.
- 50.Krell, T., A. Busch, J. Lacal, H. Silva-Jiménez, J.-L. Ramos. The enigma of cytosolic two-component systems: a hypothesis. Env. Microb. Reports 1:171-176. 2009.
- 51.Krell, T., J. Lacal, A. Busch, H. Silva-Jiménez, M.E. Guazzaroni, and J.L.

- Ramos. Bacterial sensor kinases: Diversity in the recognition of environmental signals. *Ann. Rev. Microb.* 64:539-559. 2010.
52. Krell, T., W. Terán, O. López-Mayorga, G. Rivas, M. Jiménez, C. Daniels, A.J. Molina-Henares, M. Martínez-Bueno, M.T. Gallegos, J.L. Ramos. Optimization of the palindromic order of the TtgR operator enhances binding cooperativity. *J. Mol. Biol.* 369:1188-1199. 2007.
53. Lacal, J., A. Busch, M.E. Guazzaroni, T. Krell, J.L. Ramos. The TodS/TodT two-component regulatory system recognizes a wide range of effectors and works with DNA-bending proteins. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 103:8191-8196. 2006.
54. Lacal, J., M.E. Guazzaroni, A. Busch, T. Krell and J.L. Ramos. Hierarchical binding of the TodT response regulator to its multiple recognition sites at the *tod* pathway operon promoter. *J. Mol. Biol.* 376:325-337. 2008.
55. Llamas, M., Ramos, J.L., Rodríguez-Herva, J.J. Mutations in each of the *tol* genes of *Pseudomonas putida* reveal that they are critical for the maintenance of outer membrane stability. *J. Bacteriol.* 182:4764-4772. 2000.
56. Lu, D., S. Fillet, C. Meng, Y. Alguel, P. Kloppsteck, J. Bergeron, T. Krell, M.T. Gallegos, J.L. Ramos, and X. Zhang. Crystal structure of TtgV in complex with its DNA operator reveals a general model for cooperative DNA binding of tetrameric gene regulators. *Genes & Development* 24:2556-2575. 2010.
57. Manzanera, M., I. Aranda-Olmedo, J.L. Ramos, S. Marqués. Molecular characterisation of of *Pseudomonas putida* KT2440 *rpoH* gene regulation. *Microbiology* 147:1323-1330. 2001.
58. Marqués, S., Gallegos, M.T., Manzanera, M., Holtel, A., Timmis, K.N., Ramos, J.L. Activation and repression of transcription at the double tandem divergent promoters for *xylR* and *xylS* genes of the TOL plasmid of *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 180, 2889-2894. 1998.
59. Marqués S., Holtel A., Timmis K.N., Ramos J.L. Transcriptional induction kinetics from the promoters of the catabolic pathways of TOL plasmid pWW0 of *Pseudomonas putida* for metabolism of aromatics. *J. Bacteriol.* 176, 2517-2524. 1994.

60. Marqués, S., Manzanera, M., González-Pérez, M.M., Gallegos, M.T., Ramos, J.L. The XylS-dependent Pm promoter is transcribed *in vivo* by RNA-polymerase with σ^{32} or σ^{38} depending on the growth phase. *Mol. Microbiol.* 31, 1249-1257. 1999.
61. Marqués S., Ramos J.L., Timmis K.N. Analysis of the mRNA structure of the *Pseudomonas putida* TOL meta-fission pathway operon. *Biochim. Biophys. Acta* 1216: 227-236. 1993.
62. Martínez-Bueno, M., R. Tobes, M. Rey, J.L. Ramos. Detection of multiple extractoplasmatic function (ECF) sigma factors in the genome of *Pseudomonas putida* KT2440 and their counterparts in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Environ. Microbiol.* 4:842-855. 2002.
63. Matilla, M.A., M. Espinosa-Urgel, J.J. Rodríguez-Herva, J.L. Ramos, M.I. Ramos-González. Genomic analysis reveals the major driving forces of bacterial life in the rhizosphere. *Genome Biology* 8: R179-12R179-13. 2007.
64. Michán C., Kessler B., de Lorenzo V., Timmis K.N., Ramos J.L. XylS domain interactions can be deduced from intraallelic dominance in double mutants. *Mol. Gen. Genet.* 235, 406-412. 1992.
65. Michán C., Zhou L., Gallegos M.T., Timmis K.N., Ramos J.L. Identification of critical amino-terminal regions of XylS. *J. Biol. Chem.* 267, 22897-22901. 1992
66. Molina, L., E. Duque, M.J. Gómez, T. Krell, J. Lacal, A. García-Puente, V. García, M.A. Matilla, J.L. Ramos, and A. Segura. The pGRT1 plasmid of *Pseudomonas putida* DOT-T1E encodes functions relevant for survival under harsh conditions in the environment. *Environ. Microbiol.* 13:2315-2327. 2011.
67. Molina L., Ramos C., Duque E., Ronchel M.C, García J.M., Wyke L., Ramos J.L. Survival of *Pseudomonas putida* KT2440 in soil and in the rhizosphere of plants under greenhouse and environmental conditions. *Soil Biol. Biochem.* 32:315-321. 2000.
68. Molina, L., Ramos, C., Ronchel, M.C, Molin, S., Ramos, J.L. Construction of an efficient biologically contained *Pseudomonas putida* strain and its survival in outdoor assays. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2072-2078. 1998.
69. Molina-Henares, A.J., T. Krell, M.E. Guazzaroni, A. Segura, J.L. Ramos. Members of the IclR family of bacterial transcriptional regulators function as

- activators and/or repressors. FEMS Microbiol. Rev. 20:157-186. 2006.
70. Molina-Henares, M.A., A. García-Salamanca, A.J. Molina-Henares, J. de la Torre, M.C. Herrera, J.L. Ramos, E. Duque. Functional analysis of aromatic biosynthetic pathways in *Pseudomonas putida* KT2440. Microbial Biotech. 2:91-100. 2009.
71. Molina-Henares, M.A., P. Godoy, M.I. Ramos-González, N. Muñoz, J.L. Ramos, M. Espinosa-Urgel. Role of iron and the TonB system in colonization of corn seeds and roots by *Pseudomonas putida* KT2440. Environ. Microbiol. 7:443-449. 2005.
72. Molina-Santiago, C., A. Daddaoua, S. Fillet, E. Duque, and J.L. Ramos. Interspecies signalling: *Pseudomonas putida* efflux pump TtgGHI is activated by indole to increase antibiotic resistance. Environ. Microbiol. 16:1267-1281. 2014.
73. Molina-Santiago, C., Cordero, B., Daddaoua, A., Udaondo, Z., Manzano, J. *et al.* *Pseudomonas putida* as a platform for the synthesis of aromatic compounds. Microbiology 162:1535-1545. 2016
74. Mosqueda, G., Ramos, J.L. A set of genes encoding a second toluene efflux system in *Pseudomonas putida* DOT-T1E is linked to the *tod* genes for toluene metabolism. J. Bacteriol. 182: 937-943. 2000.
75. Moore, E. B., Tindall, B.J., Martins dos Santos, V.A., Pieper, D.H., Ramos, J.L. and Palleroni, N. Non-medical: *Pseudomonas*. The Prokaryotes 6:646-703. 2006
76. Muñoz-Rojas, J., P. Bernal, E. Duque, P. Godoy, A. Segura, J.L. Ramos. Involvement of cyclopropane fatty acids in the response of *Pseudomonas putida* KT2440 to freeze-drying. Appl. Environ. Microbiol. 72:472-477. 2006.
77. Nakazawa, T. Travels of *Pseudomonas* from Japan around the world. Env. Microbiol. 4:782-786. 2002
78. Nelson, K.E., , C. Weinel, I. Paulsen, R.J. Dobson, H. Hilbert et al. Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolic versatile *Pseudomonas putida* KT2440. Environ. Microbiol. 4: 799-808. 2004
79. Nikaido, H., Y. Takahashi. Mechanisms of RND multidrug efflux pumps.

- Biochim Biophys Acta – Proteins 1794:769-781. 2009.
80. Palleroni, N.J., N.R. Krieg, J.G. Holt. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The William and Wilkins Co. 1984 .
81. Pedrotta, V., B. Witholt. Isolation and characterization of the *cis-trans* unsaturated fatty acid isomerase of *Pseudomonas oleovorans* GPo12. J. Bacteriol 181: 3256-3261. 1999
82. Pérez-Martin, J., V. de Lorenzo. ATP binding to the sigma-54-dependent XylR triggers a protein multimerization cycle catalysed by UAS DNA. Cell 86:331-339. 1996
83. Piñar, G., Kovárová, K., Egli, T., Ramos, J.L. Influence of carbon source on nitrate removal by nitrate-tolerant *Klebsiella oxytoca* CECT 4460 in batch and chemostat cultures. Appl. Env. Microbiol. 64, 2970-2976. 1998.
84. Pini, C.V., P. Bernal, P. Godoy, J.L. Ramos, A. Segura. Cyclopropane fatty acids are involved in organic solvent tolerance but not in acid stress resistance in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. Microbial Biotechnol. 2:253-261. 2009.
85. Ramos, J.L., Duque, E., Godoy, P., Segura, A. Efflux pumps involved in toluene tolerance in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. J. Bacteriol. 180, 3323-3329. 1998.
86. Ramos J.L., Duque E., Huertas M.-J., Haïdour A. Isolation and expansion of the catabolic potential of a *Pseudomonas putida* strain able to grow in the presence of high concentrations of aromatic hydrocarbons. J. Bacteriol. 177, 3911-3916. 1995.
87. Ramos J.L., Duque E., Ramos-González M.I. Survival in soils of an herbicide-resistant *Pseudomonas putida* bearing a recombinant TOL plasmid. Appl. Environm. Microbiol. 57, 260-266. 1991.
88. Ramos, J.L., E. Duque, M.T. Gallegos, P. Godoy, M.I. Ramos-González, A. Rojas, W. Terán, A. Segura. Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria. Ann. Rev. Microbiol. 56:743-768. 2002.
89. Ramos, J.L., Duque, E., Rodríguez-Herva, J.J., Godoy, P., Haïdour, A., Reyes,

- F., Fernández-Barrero, A. Mechanisms for solvent tolerance in bacteria. *J. Biol. Chem.* 272, 3887-3890. 1997.
- 90.Ramos, J.L., Haïdour, A., Duque, E., Piñar, G., Calvo, V., Oliva, J.M. Metabolism of nitrate esters by a consortium of two bacteria. *Nature Bio/Technology.* 14, 320-322. 1996.
- 91.Ramos, J.L., Marqués, S., Timmis, K.N. Transcriptional control of the *Pseudomonas* TOL plasmid catabolic operons is achieved through an interplay of host factors and plasmid encoded regulators. *Ann. Rev. Microbiol.* 51, 341-373. 1997.
- 92.Ramos, J.L., M. Martínez-Bueno, A.J. Molina-Henares, W. Terán, K. Watanabe, X. Zhang, M.T. Gallegos, R. Brennan, R. Tobes. The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69:326-356. 2005.
- 93.Ramos J.L., Stolz A., Reineke W., Timmis K.N. Altered effector specificities in regulators of gene expression: TOL plasmid *xyIS* mutants and their use to engineer expansion of the range of aromatic degraded by bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 8467-8470. 1986.
- 94.Ramos J.L., Wasserfallen A., Rose K., Timmis K.N. Redesigning metabolic routes: Manipulation of TOL plasmid pathway for catabolism of alkylbenzoates. *Science* 235, 593-596. 1987.
- 95.Ramos-Díaz, M.A., Ramos, J.L. Combined physical and genetic map of the *Pseudomonas putida* KT2440 chromosome. *J. Bacteriol.* 180, 6352-6363. 1998.
- 96.Ramos-González, M.I., A. Ben-Bassat, M.J. Campos, J.L. Ramos. Genetic engineering of a highly solvent-tolerant *Pseudomonas putida* strain for biotransformation of toluene to *p*-hydroxybenzoate. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:5120-5127. 2003.
- 97.Ramos-González, M.I., M.J. Campos, and J.L. Ramos. Analysis of *Pseudomonas putida* KT2440 gene expression in the maize Rhizosphere: *in vivo* expression technology capture and identification of root-activated promoters. *J. Bacteriol.* 187:4033-4041. 2005.

98. Ramos-González, M.I., M.J. Campos, J.L. Ramos, M. Espinosa-Urgel. Characterization of the *Pseudomonas putida* mobile genetic element IS Ppu10 : an occupant of repetitive extragenic palindromic sequences. *J. Bacteriol.* 188:37-44. 2006.
99. Ramos-González M.I., Ramos-Díaz M.A., Ramos J.L. Chromosomal gene capture mediated by the *Pseudomonas putida* TOL catabolic plasmid. *J. Bacteriol.* 176, 4635-4641. 1994.
100. Revelles, O., M. Espinosa-Urgel, S. Molin, J.L. Ramos. The *davDT* operon of *Pseudomonas putida*, involved in lysine metabolism, is induced in response to the pathway intermediate δ -aminovaleric acid. *J. Bacteriol.* 186:3439-3446. 2004.
101. Revelles, O., R.-M. Wittich, and J.L. Ramos. Identification of the initial steps in D-lysine catabolism in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 189:2787-2792. 2007.
102. Roca, A., P. Pizarro-Tobías, Z. Udaondo, M. Fernández, M.A. Matilla, M.A., et al., Analysis of the plant-growth promoting properties encoded by the genome of the rhizobacterium *Pseudomonas putida* BIRD-1. *Environ. Microbiol.* 15:780-794. 2013.
103. Roca, A., J.J. Rodríguez-Herva, J.L. Ramos. Redundancy of enzymes for formaldehyde detoxification in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 191:3367-3374. 2009.
104. Rodríguez-Herva, J.J., E. Duque, M.A. Molina-Henares, G. Navarro-Avilés, P. van Dillewijn, J. de la Torre, A.J. Molina-Henares, A. Sánchez de la Campa, F. Ann Ran, A. Segura, V. Shingler, and J.L. Ramos. Physiological and transcriptomic characterization of a *fliA* mutant of *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol. Repots* 2:373-380. 2010.
105. Rodríguez-Herva, J.J., V. García, A. Hurtado, A. Segura, and J.L. Ramos. The *ttgGHI* solvent efflux pump operon of *Pseudomonas putida* DOT-T1E is located on a large self-transmissible plasmid. *Environ. Microbiol.* 9:1550-1561. 2007.
106. Rojas, A., E. Duque, G. Mosqueda, G. Golden, A. Hurtado, J.L. Ramos, A. Segura. Three efflux pumps are required to provide efficient tolerance to toluene in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *J. Bacteriol.* 183:3967-3973. 2001.

107. Rojas, A., E. Duque, A. Schmid, A. Hurtado, J.L. Ramos, A. Segura. Biotransformation in double-phase systems: physiological responses of *Pseudomonas putida* DOT-T1E to a double phase made of aliphatic alcohols and biosynthesis of substituted catechols. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:3637-3643. 2004.
108. Rojas, A., A. Segura, M.E. Guazzaroni, W. Terán, A. Hurtado, M.T. Gallegos, and J.L. Ramos. *In vivo* and *in vitro* evidence that TtgV is the specific regulator of the TtgGHI multidrug and solvent efflux pump of *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 185:4755-4763. 2003.
109. Ronchel, M.C., Molina, L., Witte, A., Lutbiz, W., Molin, S., Ramos, J.L., Ramos, C. Characterization of cell lysis in *Pseudomonas putida* induced upon expression of heterologous killing genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4904-4911. 1998.
110. Ronchel M.C., Ramos C., Jensen L.B., Molin S., Ramos J.L. Construction and behavior of biologically contained bacteria for environmental applications in bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol* 61, 2990-2994. 1995.
111. Ruíz, R., J.L. Ramos, S. Egan. Interactions of the XylS regulators with the carboxyl-terminal domain of the RNA polymerase α subunit of influence the expression level from the cognate Pm promoter. *FEBS Lett.* 491:207-211. 2001.
112. Salto, R., Delgado, A., Michán, C., Marqués, S., Ramos, J.L. Modulation of the function of the signal receptor domain of XylR, a member of a family of prokaryotic enhancer-like positive regulators. *J. Bacteriol.* 180, 600-604. 1998.
113. Segura, A., Duque, E., Hurtado, A., and Ramos, J.L. Mutations in genes involved in the flagellar export apparatus of the solvent-tolerant *Pseudomonas putida* DOT-T1E strain impair motility and lead to hypersensitivity to toluene shocks. *J. Bacteriol.* 183:4127-4133. 2001.
114. Segura, A., E. Duque, A. Rojas, P. Godoy, A. Delgado, A. Hurtado, J.E. Cronan Jr., J.L. Ramos. Fatty acid biosynthesis is involved in solvent tolerance in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *Environ. Microbiol.* 6:416-423. 2004.
115. Segura, A., P. Godoy, P. van Dillewijn, A. Hurtado, N. Arroyo, S. J.L. Ramos. Proteomic analysis reveals the participation of energy- and stress-related proteins in the response of *Pseudomonas putida* DOT-T1E to toluene. *J. Bacteriol.* 187:5937-5945. 2005.

116. Segura, A., and J.L. Ramos. Plant-bacteria interactions in the removal of pollutants. *Current Opinion Biotechnology* 24:1-7. 2012.
117. Terán, W., A. Felipe, S. Fillet, M.-E. Guazzaroni, T. Krell, R. Ruiz, J.L. Ramos, M.T. Gallegos. Complexity in efflux pump control: cross-regulation by the paralogues TtgV and TtgT. *Mol. Microbiol.* 66:1416-1428. 2007.
118. Terán, W., T. Krell, J.L. Ramos, M.T. Gallegos. Effector-repressor interactions, binding of a single effector molecule to the operator-bound TtgR homodimer mediates derepression. *J. Biol. Chem.* 281:7102-7109. 2006.
119. Tobías-Pizarro, P., Fernández, M., Niqui, J.L., Solano, J., Duque, E., Ramos, J.L., Roca, A. Restoration of a Mediterranean forest after a fire: biomediation and rhizoremediation field-scale trial. *Microb. Biotech.* 8:77-92. 2015.
120. Udaondo, Z., L. Molina, C. Daniels, M.J. Gómez, M.A. Molina-Henares, M.A., *et al.* Metabolic potential of the organic-solvent tolerant *Pseudomonas putida* DOT-T1E deduced from its annotated genome. *Microbial Biotech.* 6:598-611. 2013.
121. Udaondo, Z., Molina, L., Segura, A., Duque, E., Ramos, J.L. Analysis of the core genome and pangenome of *Pseudomonas putida*. *Environ. Microbiol.* 18:3268-3283. 2016.
122. Udaondo, Z., Ramos, J L., Segura, A., Krell, T., Daddaoua, A. Regulation of carbohydrate degradation pathways in *Pseudomonas* involves a set of transcriptional regulators. *Microb. Biotechnol* 11:442-454. 2018.
123. van Dillewijn, A. Caballero, J.A. Paz, M.M. González-Pérez, J.M. Oliva, J.L. Ramos. Bioremediation of 2,4,6-trinitrotoluene under field conditions. *Environ. Sci. Tech.* 41:1378-1383. 2007.
124. Vílchez, S., M. Manzanera, J.L. Ramos. Control of expression of divergent *Pseudomonas putida put* promoters for proline catabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:5221-5225. 2000.
125. Wittich, R.-M., A. Haïdour, P. van Dillewijn, J.L. Ramos. OYE Flavoprotein reductases initiate the condensation of TNT-derived intermediates

to secondary diarylamines and nitrite. *Environ. Sci. Technol.* 42:734-749. 2008.

126. Yamamoto, S., S. Harayama. Phylogenetic relationships of *Pseudomonas putida* strains deduced from nucleotide sequence of *gyrB*, *rpoD* and 16S *rRNA*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 48:813-819. 1998.

PERSONAL DEL GRUPO EN GRANADA

María Angeles	Abril	Marti
Inés	Abril	Marti
Luis Alejandro	Acosta	González
Miguel	Alaminos	Mingorance
Juste	Amaro	Fuertes
María Isabel	Aranda	Olmedo
José María	Arco del	Martin
Laura María	Barrientos	Moreno
Georg Renatus	Basler	
Karlijn	Bastiaansen	
Patricia	Bernal	Guzman
Silvia Marina	Blanco	Moya
Nicole	Bohnenberber	
Dietmar	Böltner	
Ingrid	Brettar	
Uli	Brinkmann	
Pedro Felipe de	Brito	Brandao
Sergey	Bursakov	
Andreas	Busch	
Antonio	Caballero	Reyes
Jesús	Campos	García
María Jesús	Campos	Rarmos
Gladys Inés	Cardona	Venegas
Carlos	Caselles	Hernando
M. Teresa del	Castillo	Santaella
María Cristina	Civantos	Jimenez
Asunción	Contreras	Vera
José Antonio	Contreras	
Andres	Corral	Lugo
Rene	Cuellar	Rodríguez
M. Sol	Cuenca	Martín
Abdelali	Daddaoua	
Craig	Daniels	
Cristina	Dávila	
Asunción	Delgado	Delgado
Patricia	Domínguez	Cuevas
Wouter	Duetz	
M. Estrella	Duque	Martín de Oliva
Manuel	Espinosa	Urgel
Abraham	Esteve	Núñez
M. Dolores	Fandila	Enrique
M. Mar	Fandila	Enrique
Antonia	Felipe	Reyes
Ana María	Fernández	Escamilla
Regina	Fernández	Piñar
Matilde	Fernández	Rodríguez
Sandy C.	Fillet	
M. Carmen	Fornieles	Cáceres

M.Trini	Gallegos	Fernández
Vanina	García	Altamirano
Cristina	García	Fontana
Ana Isabel	García	García
Alicia	García	Puente
Juan M.	García	Ramírez
Adela	García	Salamanca
Victor	García	Tagua
Matilde	Gil	García
Patricia	Godoy	Alba
Francisca	Godoy	Vílchez
Geir	Golden	
M. Mar	González	Pérez
M. Eugenia	Guazzaroni	
M. Angeles	Guerrero	Langa
Karl-Heinz	Engesser	
Ali	Haïdour	
Jutta	Hellstern	
Verónica	Hernández	Sánchez
M. Carmen	Herrera	González-Molina
Bilge	Hilal	Çardirci
Andreas	Holtel	
M. José	Huertas	Romera
Oscar	Huertas	Rosales
Ana	Hurtado	García
Nuria	Husillos	
Aurelia	Ibáñez	
Lars B.	Jensen	
Frank	Junker	
Mohamed	Khaled	Gijón
Thilo	Köhler	
Tino	Krell	
Jesús	Lacal	Romero
M. Jesús	Lami	
M. Antonia	Llamas	Lorente
Diana	López	Farfán
Carmen D.	Lorente	Vázquez
Gloria	Lucchesi	
Maximino E.	Manzanera	Ruíz
Patricia	Marín	Quero
Silvia	Marqués	Martín
Africa	Martín	Istán
David	Martín	Mora
Manuel	Martínez	Bueno
Marta	Martínez-Gil	Vázquez
Sophie M.	Martirani	Von Abercron
Miguel A.	Matilla	Vázquez
Javier	Medina	Bellver
Noel	Mesa	Torres
Carmen M.	Michán	Doña
Sonia M.	Molina	Arias
Lázaro	Molina	Delgado
A. Alberto	Molina	González

M. Antonia	Molina	Henares
A. Jesús	Molina	Henares
Carlos	Molina	Santiago
Bertrand	Morel	
Silvia	Moreno	Morillas
Gilberto	Mosqueda	
Francisco	Muñoz	Martínez
Jesús	Muñoz	Rojas
Gloria	Navarro	Avilés
Joaquín R.	Otero	Asman
George	O'Toole	
Daniel	Pacheco	Sánchez
Benjamin	Pakuts	
José Antonio	Paz	Luis
Cecilia V.	Pini	Gutierrez
Guadalupe	Piñar	Larrubuaia
Paloma	Pizarro	Tobias
José Miguel	Quesada	Pérez
M. Angeles	Ramos	Díaz
M. Isabel	Ramos	González
Juan Luis	Ramos	Martín
Cayo	Ramos	Rodríguez
Daniela	Reniero	
Olga M.	Revelles	López
José Antonio	Reyes	Daríá
Angustias	Reyes	Franco
Miriam	Rico	Jiménez
Amalia de la A.	Roca	Hernández
Sara	Rodríguez	Conde
José Juan	Rodríguez	Hervá
Antonia M.	Rojas	Martínez
M. Carmen	Ronchel	Barreno
Raquel	Ruíz	Arroyo
M. Amparo	Salido	Ruíz
Rafael	Salto	González
Ana	Sánchez de la	
Saray	Campa	Verdona
Ana	Santamaría	Hernando
Hortencia	Segura	Carnicero
Henry	Silva	Jiménez
Gloria	Smienk	
M. Isabel	Soberón	Chavéz
Andreas	Soriano	Botella
Wilson	Stolz	
Raquel	Terán	
Jesús	Tobes	Terán
María L.	Torre de la	Zúñiga
Zulema	Travieso	Huertas
Paola A.	Udaondo	Domínguez
Felix	Vargas	Gallego
M. Francisca	Velando	Soriano
Susana	Villegas	Torres
Miguel	Vílchez	Tornero
	Valdivia	Borrero

Sarah
Line
Line
Regina-Michaela
Fátima
Luming

Wettstadt
Wike
Witte
Wittich
Yousef
Zhou

Coronado

**Contestación al discurso de Ingreso en la Academia de Ciencias
Matemáticas, Físico-Químicas y Naturales de Granada del
Ilmo. Sr. D. Juan Luis Ramos Martín**

Ilmo. Sr D. José Olivares Pascual

**Excmo. Sr. Presidente de la Academia de Matemáticas, Físico-Químicas y
Ciencias Naturales de Granada,
Excelentísimos e Ilustrísimos Sras. y Sres. Académicos,
Señoras y Señores,**

Como decía en mi anterior laudatio en contestación al discurso de entrada de una ilustre académica, me temo que hoy tampoco soy la persona más indicada que ha elegido esta docta corporación para contestar la brillante exposición que acabamos de escuchar al Dr. Juan Luis Ramos Martín. Es una elección que tengo que agradecer por la confianza que se ha puesto en mí, pero tantos años de relación científica han sembrado, germinado y desarrollado unos lazos de amistad, que pueden hacer que mi juicio sobre sus méritos para pasar a formar parte de esta Institución no sea imparcial. Pudiera parecer en algunos aspectos exagerado, pero los que lo conocen, lo que voy a exponer a continuación y la brillante exposición que hemos escuchado, van a confirmar que la propuesta que en su día hizo la Sección de Naturales fue del todo acertada.

Como ya hemos oído, creo que pocas veces ocurre que la persona que hace su entrada en la ciencia con la defensa de su tesis doctoral, que accede a la carrera investigadora y entre a formar parte de la nómina de una corporación como la nuestra, haya sido juzgada, por decirlo llanamente, por la misma persona que esta tarde le ha tocado estar frente al candidato para poner en evidencia sus méritos y el nivel científico y actual de su trayectoria investigadora.

Después de cursar brillantemente los estudios de biología en la Facultad de la Universidad de Sevilla, el recién licenciado, como nos ha narrado sucintamente, entró en 1978 en el Departamento de Bioquímica, que dirigía el Profesor Manuel Losada, eminente especialista en fotosíntesis, para realizar la tesis doctoral relacionada con el metabolismo del nitrógeno utilizando cianobacterias como material de trabajo. Dado que estos microorganismos son fijadores de nitrógeno, esto es, capaces de reducir la forma dimolecular de este elemento a amonio, proceso que se conoce como fijación de nitrógeno, como hacen otras muchas bacterias, su tema entraba en relación con la investigación que por mucho tiempo llevábamos a cabo en nuestro departamento de la Estación Experimental del Zaidín. Aquí se desarrollaban estudios sobre un conjunto de fijadores, que globalmente se conocen con el término castellanizado de rizobios, que son los responsables de que el cultivo de leguminosas no requiera la aplicación de fertilizante nitrogenado, y esta es la razón por la cual fui llamado a formar parte del tribunal que juzgó su tesis en 1978 y que mereció la máxima calificación. El objetivo práctico del trabajo, que tenía por título, ya citado por su autor: “Bioconversión de energía solar en energía química”, dirigido por los profesores Losada y García Guerrero, era la producción de amonio por estas cianobacterias cuando se inhibía la asimilación del nitrógeno reducido por la adición al medio de un análogo competitivo a un compuesto intermedio. Se trataba de la representación a escala laboratorio de un proceso que independientemente de su rentabilidad, era en sí mismo contaminante, agresivo para el medio por la naturaleza del producto

obtenido, amonio, que una vez aplicado al suelo termina en su mayor parte como nitrato, contaminando las aguas, o convertido en óxidos de nitrógeno, que de alto efecto invernadero, son liberados a la atmósfera.

Pero, lo que son las cosas de la vida. Después del escarceo mencionado de un par de años con una beca postdoctoral EMBO, siguiendo con las bacterias fijadoras en el centro de referencia sobre fijación de nitrógeno de Brighton (Reino Unido), por donde habíamos pasado algunos, se cambió de tema y le dio de lado a los estudios relacionados con su tesis pues le pareció que la biorremediación le llenaba más y por aquel entonces, como así ha sido, tenía un gran futuro por delante. Del estudio de un proceso contaminante se pasó a la recuperación y conservación del medioambiente por microorganismos y en esa línea, bajo diferentes facetas ha seguido prácticamente a lo largo de toda su vida científica, como él mismo nos ha expuesto, y prueba de ello ha sido la concesión de dos importantes galardones: El Premio Rey Jaime I de Protección del Medio Ambiente, en 2012, y la medalla André Lwoff, concedida por la Federación de Sociedades Europeas de Microbiología, en 2013.

El Dr. Ramos siempre ha sido todo menos tranquilo. Esto lo pueden confirmar bien los que lo conocen. Se le podría aplicar lo que Dobzhansky, que es bien conocido por su frase: *"Nada tiene sentido en biología si no es a la luz de la evolución"*, y F.J. Ayala, opinaban sobre la actitud del científico, y así lo expusieron en un seminario conjunto celebrado en la Universidad de Columbia. Decían que el espíritu de la ciencia no es un espíritu de paz, como el que proporciona la contemplación de una obra de arte. Es, por el contrario, un estado de búsqueda incesante y esfuerzo sin fin, de crítica escrupulosa. El alma de la ciencia es un alma inquieta, la búsqueda de lo desconocido es su ilimitada tarea.

Y esa búsqueda le llevó a sentir la atracción por la biorremediación y con la idea de ocuparse de ese tema, llega en 1984 a la Universidad de Ginebra con un

contrato para trabajar con el profesor Kenneth Timmis sobre la degradación de hidrocarburos por *Pseudomonas*. Y aquí aparece su bacteria “de cabecera” que no iba a abandonar, y sobre la que ha desarrollado una investigación, amplia, interesante, de alta calidad y nacional e internacionalmente reconocida, como hemos tenido ocasión de constatar a través de su excelente exposición.

En 1987 regresa a España y, concretamente a esta ciudad, donde consigue por oposición ante un tribunal del que formé parte, y esta es la segunda coincidencia mencionada antes, una plaza de investigador en la Estación Experimental del Zaidín para el Departamento de Bioquímica, dirigido entonces por el Dr. López Gorgé. Este grupo de trabajo se ocupaba del estudio de diversos aspectos de la fotosíntesis, pero la biorremediación era su objetivo y su encuadre en dicho departamento fue sólo el paraguas administrativo para cubrir su situación profesional. Aquí inició, o mejor, continuó sus investigaciones con *Pseudomonas* en estrecha relación con el profesor Timmis, quien me comentó cuando coincidimos en un congreso internacional de biotecnología que no había tenido hasta entonces un postdoc tan brillante. Ha sido, si no el primero, uno de los pioneros de estos estudios en España.

En la Estación Experimental del Zaidín ha desarrollado la mayor parte de su carrera científica, con estancias cortas en Alemania (Stuttgart y Braunschweig) y en la Universidad Técnica de Dinamarca en Lyngby para recibir formación adicional en química y en Biología Sintética y Biología de Sistemas, respectivamente.

Humphrey Davy, presidente que fue de la Royal Society allá por los primeros años del siglo XIX, y, que como dato curioso le llamaban el químico-poeta porque en una página de su cuaderno de laboratorio describía el experimento y en otra las emociones que todos sentimos en su desarrollo, sostenía la idea de que para tener una mente filosófica perfecta eran necesarias la imaginación y la

razón. Estas eran las fuerzas creativas de los descubrimientos. Como he dicho en otras ocasiones, yo he creído siempre que para ser un buen científico se requieren tres cualidades: inteligencia e imaginación, en lo que coincido con Davy, y algo muy importante para mí como es el afán de superación, del que el hoy propuesto académico no anda falto, como bien pronto lo demostró en sus años jóvenes al llevarse un coche en el concurso 1, 2, 3. Y esa cualidad es buena, porque aparte de la curiosidad inherente al científico, está el prurito de ser el primero en conseguir o llegar a una aportación básica o aplicada. En investigación, a diferencia del atletismo, sólo hay medalla de oro para el ganador, pues la plata y el bronce no existen. Creo que nuestro candidato cumple con estas tres exigencias, como se puede deducir de la lectura de su denso y amplio curriculum como científico y como gestor. En relación con estas cualidades, Alexander von Humboldt, del que precisamente celebramos ahora el 250 aniversario de su nacimiento, reconocía que el conocimiento nunca podrá matar la fuerza creativa de la imaginación, por lo que daba un importante peso en ciencia a esta cualidad personal, que el Dr. Ramos puso en juego abriendo su campo de estudio a áreas y temas no suficientemente frecuentadas en su día para sacarle el mayor jugo posible al conocimiento. En su dedicación por la biorremediación, primero, y en la recuperación o conservación del medio, en general, intenta cumplir con la petición que ya en 1864 hacía George Perkins Marsh, en su libro “Man and Nature” para que se actuara sobre el planeta que estaba en peligro por culpa de la mano del hombre. Así escribía: *“La Tierra está convirtiéndose a toda velocidad en un lugar inhabitable para su habitante más noble”*, y más recientemente, el Nobel Manfred Eigen, fallecido hace unos meses, dijo: *“No nos queda mucho tiempo para probar que no somos el producto de una mutación letal”*.

Sin necesidad de informes de expertos de paneles sobre el cambio climático, estas citas muestran el alto interés del tema de trabajo que la perspicacia del candidato le llevó a tomar en su día, y cuyo desarrollo a lo largo de los años es

difícil exponer aquí por razones de tiempo y espacio. No obstante, voy a intentar para el conocimiento de esta audiencia esbozar ligeramente su historial, aunque sólo sea de pasada para completar y luego comentar lo que hoy nos ha expuesto aquí.

La investigación del Dr. Ramos contempla principalmente la fisiología, genética y ecología molecular de los microorganismos con el objetivo primordial de entender y explotar sus propiedades en la biodegradación y eliminación de contaminantes presentes en la biosfera, su utilización en la nutrición y defensa de las plantas y más recientemente, en su aprovechamiento para la obtención de productos industriales limpios y sostenibles como alternativa a los combustibles fósiles. Su línea de investigación principal se ha centrado de forma importante, en la biología de bacterias del género *Pseudomonas*, con aproximaciones recientes a la genómica y pan-genómica de estos microorganismos, de lo que nos ha hablado in extenso, y el aprovechamiento de sus particulares habilidades en diferentes campos de la ciencia. En este sentido creó el grupo de Degradación de Tóxicos Orgánicos en la EEZ-CSIC, que actualmente está constituido por 15 investigadores con plaza fija (científicos y técnicos) y una veintena de estudiantes de masters, tesis y posdoctorales de diferente origen. Desde que el Dr. Ramos se incorporó al CSIC, ha dirigido una cincuenta de tesis doctorales.

Toda su investigación ha sido realizada con el soporte económico y personal proporcionado por diferentes entidades públicas y privadas que en los últimos 10 años, y valga como ejemplo, han supuesto unos fondos de 10 millones de Euros. De alguno de las decenas de proyectos concedidos fue coordinador de más de 70 investigadores como el denominado “Metagenoma de la Península Ibérica” del Programa Consolider Ingenio, y otros de ámbito más reducido, como los dirigidos al estudio de la contaminación de zonas industriales como la Ría de Huelva, por lo que recibió en 2004 el Premio de Medio Ambiente de esta Provincia, o del Campo

de Gibraltar. Su labor científica se ha difundido en más de 250 artículos en revistas de alto índice de impacto, que han sido citados más de 20.000 veces, por encima de 75 capítulos de libros y un alto número de conferencias en distintos foros, ponencias y comunicaciones a congresos. Sus estudios también han dado lugar a 18 patentes licenciadas a empresas tan importantes como Dupont, Unión Española de Explosivos o Abengoa, empresa a la que estuvo incorporado con excedencia especial del CSIC de 2013 a 2017, año en que se reincorporó de nuevo a su Centro de origen. Ha sido el editor y co-editor de 7 volúmenes sobre el género *Pseudomonas*, una serie de libros de gran aceptación a nivel mundial, que recogen el saber contemporáneo de este grupo de microorganismos, relevantes desde el punto de vista ambiental, como hemos tenido ocasión de escuchar, y editor o del cuerpo editorial de varias revistas científicas de prestigio en el área de microbiología, ecología microbiana y biotecnología.

Desde el punto de vista de la gestión, cabe destacar algunos de los hitos más relevantes: así, desde 1990 a 1995 fue jefe del Departamento de Bioquímica Vegetal de la Estación Experimental del Zaidín y desde 1997 a 2008, director del Centro. La dedicación y visión del Prof. Ramos hizo que la Estación experimentase su mayor expansión en infraestructuras y personal en sus más de 50 años de historia. Durante su excedencia en Abengoa dirigió en Sevilla el Departamento de Biotecnología de Abengoa Research, estando a su cargo un equipo de 120 personas entre ingenieros, químicos, biólogos y técnicos, trabajando en el desarrollo de la conversión de residuos agrícolas y urbanos en biocombustibles y productos de alto valor añadido. Fuera del Centro pero dentro del CSIC, fue Coordinador de la Comisión de Área de Ciencias Agrarias del CSIC, un órgano consultivo del Presidente de la Institución que asesora sobre la implementación de políticas científicas y estrategias de investigación dentro del área, que engloba a todos los institutos del Organismo relacionados con temas de agricultura.

Mención aparte merece también su labor como asesor o su participación en numerosas comisiones de asesoramiento en asuntos relacionados con el medio ambiente a diversos organismos o colectivos, tanto nacionales como extranjeros, tales como, el Parlamento Español y la Consejería de Medioambiente de la Junta de Andalucía, y el año pasado se incorporó al grupo Asesor de la Unión Europea para el VII Programa marco en el área de Agricultura, Alimentos, Pesca y Biotecnología. Ha sido evaluador externo de muchos programas y universidades a nivel global y miembro de varios comités científicos de distintos centros de investigación. Desde mayo de 2018, el Dr. Ramos es Presidente del Área de Agricultura, Forestal, Ganadería, Acuicultura y Alimentos de la Agencia Estatal de Investigación. Profesor y organizador de cursos en numerosas universidades españolas y extranjeras y, sólo como ejemplo, dentro de su labor docente, cabe destacar que impartió clases sobre temas relacionados con microbiología medioambiental al Príncipe Felipe, entonces heredero de la Corona de España,

En el discurso que hemos escuchado al Dr. Ramos encontramos dos orígenes de su viaje por las Pseudomonas y dos caminos. Uno de los orígenes comienza en Ginebra, con los Alpes al fondo, con la utilización de estas bacterias en biorremediación, y el otro en Granada, con la Sierra Nevada de telón, donde aborda el segundo camino con el estudio del papel de Pseudomonas en la nutrición y defensa de las plantas. Ambos han buscado desvelar los mecanismos por los que unos microorganismos comensales colaboran en el mantenimiento de los ciclos biogénicos y con ello a la conservación y buen funcionamiento de los ciclos de la vida.

Contaminantes de origen antropogénico, exudados radicales o estreses físicos y biológicos implican a moléculas orgánicas y/o inorgánicas que inducen una serie de respuestas reflejo de la diversidad genética de Pseudomonas y su versatilidad.

Los avances en los años 80 en biología molecular permitieron la aplicación a los microorganismos de multitud de herramientas que posibilitaban clonar genes, conocer su regulación e incluso su manipulación sin mucha dificultad en las direcciones deseadas. Esta tecnología ha permitido la exploración en profundidad del mundo de las *Pseudomonas*. Los primeros genes y procesos a los que el grupo de Granada se encaró fueron los implicados en la ruta de degradación del tolueno y que estaban ligados a la presencia del plásmido TOL en estas bacterias. Lo relevante de los descubrimientos fue definir la perfecta estructura, organización y regulación de los genes implicados en la ruta bioquímica, así como llegar a conocer que las vías catabólicas no son entes aislados, codificados por los genes presentes en un plásmido, sino que se integran en el metabolismo central. En este contexto el grupo pudo describir el fenómeno de la represión catabólica mediada por nuevas proteínas de control global, y poner de manifiesto que los contaminantes, antes que alimento, son señales de alarma y que disparan mecanismos de defensa que indican que lo prioritario es resistir en la batalla ante el enemigo. Una vez el contaminante está dominado se ponen en marcha los mecanismos para desintegrarlo y llevarlo a anhídrido carbónico y agua.

El Dr. Ramos nos ha hablado de un hecho serendípico cuando Estrella Duque se encontró con bacterias que crecían en tolueno casi puro que llevó desde el aislamiento de una bacteria hiperresistente a disolventes hasta el conocimiento de la estructura tridimensional de los reguladores clave en el proceso. El grupo de trabajo puso de manifiesto que la primera defensa reside en las membranas que cambian la configuración de sus ácidos grasos para poner después en marcha sistemas elementales que permitan sobrevivir a la bacteria. Los microorganismos que soportan ambientes hostiles necesitan regular muy finamente su metabolismo para evitar el gasto de energía que supondría tener siempre en activo procesos sólo necesarios en determinadas condiciones ambientales. La respuesta a la presencia de disolventes se realiza vía represión, que ha sido bien caracterizada con la

colaboración puntual del Imperial College. La degradación de tolueno por *Pseudomonas* requiere de la participación de un gran número de moléculas y de una amplia gama de mecanismos moleculares de activación con una fina regulación de la expresión de los genes implicados.

El otro camino que relata Dr. Ramos en su discurso es el relacionado con la nutrición y defensa de las plantas. Su origen está en Granada y más concretamente en la Estación Experimental del Zaidin, donde el Ilustre miembro que fue de esta Academia, José Miguel Barea, que había iniciado los estudios de solubilización de fosfatos en el suelo por rizobacterias, empuja a nuestro hoy propuesto académico a integrarse de pleno en una actividad propia de un Centro de Ciencias Agrarias y le anima a estudiar cómo *Pseudomonas* se relaciona con las plantas, se establece en la raíz y metaboliza los exudados radicales. A cambio de este alimento y soporte, esta bacteria, que es una de las presentes en la rizosfera, proporciona a la planta fósforo y hierro y la protege de fitopatógenos. El diálogo químico entre los dos miembros del conjunto comienza cuando *Pseudomonas* percibe las señales de la planta en forma de aminoácidos, opinas y azúcares que atraen a las bacterias a su raíz. Allí se fija, utilizando una proteína gigante de acertado nombre LapA -lapA- de cerca de 8.500 aminoácidos, codificada por alrededor de 25 kb de ADN, y que sirve de fijación a la raíz, y otra proteína relacionada, llamada LapF, que ayuda a unir a las células y formar una película sobre la raíz, que solubiliza nutrientes y crea una barrera contra patógenos. Revelar estas respuestas quimiotácticas, la adhesión a superficies y el metabolismo de exudados ha requerido de un arduo trabajo con aproximaciones multidisciplinarias y moleculares elegantes, que van desde la utilización de microscopía confocal, metabolómica funcional y una amplia gama de mutantes generados con transposones con genes lux, que iluminaban a los mutantes que respondían a exudados, o la potente técnica IVET, que permite detectar funciones de un microorganismo a nivel de célula sencilla. Entre todas las respuestas analizadas cabe destacar el descubrimiento de las bases del

comportamiento de *Pseudomonas* al ambiente oxidante de la raíz, la puesta en marcha de rutas del metabolismo de la glucosa y aminoácidos como la lisina, prolina y fenilalanina. Los avances en esta línea se hacen de nuevo a base de diseccionar cada reacción de la ruta, cada gen en el cromosoma, cada regulador específico y global. La vida de *Pseudomonas* en la raíz es un viaje en sí al metabolismo celular.

En el mundo microbiano la definición de las especies es mucho más compleja que en el mundo de los eucariotas o de los vertebrados. Los microorganismos viven intercambiando ADN y definir los límites de un género o una especie no resulta trivial. Relata el Dr. Ramos que el insigne microbiólogo argentino Norberto Palleroni, uno de los padres del uso del gen 16S como cronómetro evolutivo, decía que la secuencia de este gen no era suficiente para definir una especie. El trabajo del grupo aislando múltiples cepas de la especie *Pseudomonas putida* ha llevado a definir el límite de esta especie: aquellas bacterias que comparten lo que se denomina el “*core genome*”, un conjunto de unos 3000 genes que definen el metabolismo y el estilo de vida de *Pseudomonas*. El grupo ha puesto de manifiesto que las bacterias de este género se identifican porque metabolizan glucosa a través de la ruta de Entner-Doudoroff, una vía metabólica mucho más eficiente que la clásica glicolisis. Qué lejos quedan todos estos conocimientos de las dos especies que incluía el género *Pseudomonas*, *P. aeruginosa* y *P. fluorescens*, diferenciadas por la producción de pigmento y unas cuantas pruebas bioquímicas, en la Microbiología que aprendí de mi maestro don Vicente Callao.

Falta todavía mucho camino por recorrer, pero nadie duda de que el grupo liderado por quien hoy tenemos delante descifrá muchas de las incógnitas que siguen estando a la vera de la línea de investigación que ha seguido desde que llegó

a Granada, con el denominador común de Pseudomonas, para aprovechar al máximo la potencialidad de “su bacteria”, como la llamé al comienzo.

Para un científico nato, como el Dr. Ramos, que pensamos ha disfrutado con la investigación tocando la Microbiología, la Bioquímica, la Biología Molecular, la Genética, la Fisiología microbiana y vegetal, etc., podría hacer suya la frase que podemos leer en el libro “Echar raíces” de Simone Weil: *“La verdadera definición de la ciencia es el estudio de la belleza del mundo”*

No quiero terminar sin decir que nuestro candidato es miembro electo de las Academias Americana y Europea de Microbiología, y sin unirme al agradecimiento que él ha mostrado a todas las personas con las que ha colaborado a lo largo de su singladura científica hasta llegar al puerto que hoy nos reúne aquí, y especialmente quiero citar a Estrella, su colega y esposa o esposa y colega, por el continuo apoyo recibido.

Creo que una vez conocida la trayectoria científica y las cualidades personales del que hoy se presenta aquí, la decisión que en su día tomó la Sección de Naturales para cubrir una vacante a numerario de esta Institución, como dije al principio, fue totalmente acertada. Le hacen digno de ocupar ese puesto que sin duda enriquecerá a la propia Academia. Esperamos que nuestro elegido, como buen académico, se ocupe de cumplir con nuestro primer objetivo fundacional: El cultivo, fomento y difusión de la Ciencia y sus aplicaciones, algo que no es nuevo para él. Y como decía nuestro Presidente en el acto de apertura de curso: *“el académico, por tanto el nuevo, tiene la obligación de dar testimonio continuo de lo que es y de lo que significa serlo”* y así esperamos todos que no quedaremos defraudados.

Muchas gracias