UNIVERSIDAD DE LEÓN FACULTAD DE VETERINARIA DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR ÁREA DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



"Caracterización genética y bioquímica del catabolismo bacteriano aeróbico del colesterol y moléculas estructuralmente relacionadas"

Joaquín Rodríguez Fernández.

Tesis Doctoral. León, Junio 2014.



INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS

El Dr. D. Jose María Luengo Rodríguez como Director y el Dr. D. Elías Rodríguez Olivera como codirector de la Tesis Doctoral titulada "Caracterización genética y bioquímica del catabolismo bacteriano aeróbico del colesterol y moléculas estructuralmente relacionadas" realizada por D. Joaquín Rodríguez Fernández en el programa de doctorado de Biología Molecular, informan favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, en León a de Junio de 2014.



ADMISIÓN A TRÁMITE DE LA TESIS DOCTORAL

El órgano responsable del programa de doctorado de **Biología Molecular** en su reunión celebrada el día de de ha acordado dar su conformidad a la admisión a trámite de lectura de la Tesis Doctoral titulada **"Caracterización genética y bioquímica del catabolismo bacteriano aeróbico del colesterol y moléculas estructuralmente relacionadas"**, dirigida por el Dr. D. José María Luengo Rodríguez y el Dr. D. Elías Rodríguez Olivera, elaborada por D. Joaquín Rodríguez Fernández y cuyo título en inglés es el siguiente **"Genetic and biochemical characterization of bacterial aerobic catabolism of cholesterol and structurally related molecules ".**

Lo que firmo, en León a

de

de

El Secretario,

Vº Bº

El Director del Departamento/ Presidente de la Comisión Académica,

Fdo.:

A mis padres,

sin palabras...

"La mente que se abre a una nueva idea, jamás volverá a su tamaño original" Albert Einstein (1879-1955).

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quisiera expresar mi más sincero agradecimiento al profesor D. José María Luengo Rodríguez por brindarme la oportunidad de realizar esta Tesis Doctoral bajo su experta dirección científica, lo que me ha permitido no solo crecer a nivel profesional, sino también como persona. Desde estas líneas quiero reconocer su dedicación, profesionalidad, paciencia y aliento para incentivar ese "gusanillo" científico y esa perseverancia que debemos tener todos aquellos que nos dedicamos a esta profesión, que, aunque muchas veces ingrata no deja de ser realmente fascinante. Después de estos años no sólo he ganado un padre científico, sino un inestimable amigo, gracias por todo Chema.

Al profesor D. Elías Rodríguez Olivera, por su dirección, amistad y consejos, tanto científicos como personales. Allá donde vaya echaré de menos esas charlas que en muchas ocasiones sirvieron para que abriera los ojos profesionalmente.

A mi familia, especialmente a mis padres, porque nada de esto hubiera sido posible sin su cariño y apoyo incondicional. Gracias por confiar en mí, muchas veces más que yo mismo, y por estar siempre a mi lado, sobre todo, cuando en ocasiones las fuerzas me flaquearon. Vosotros sois lo mejor de mí. Quisiera acodarme con especial cariño de mi primo Manuel, al que la vida, injustamente, no ha querido darle las mismas oportunidades que a mí; esta Tesis va por tí.

A Bea, por ser como eres. Sin ti todo sería muchísimo más duro. Gracias por estar siempre ahí, por tu apoyo y comprensión ilimitadas, por tu cariño y confianza, por mantenerme los pies en el suelo y por aguantarme al oírme hablar de "bichos". Tú has hecho este Doctorado conmigo, gracias por todo lo vivido a tu lado y por tantas y tantas cosas que llenarían las páginas de otra Tesis.

A todas las personas que forman parte del Departamento, profesores, técnicos y en especial a mis compañeros, Iñaki, Pepelu, Álvaro, Estefanía, Sergio, Manolo, Esther, y a aquellos que lo fueron y ya no están como Sagrario, Mario, Patricia, Ángel, Elsa, Vanesa, Andrea, Nico y su hermano David, que aunque no compañero, si fue un buen amigo que se fue demasiado pronto. Gracias por los buenos momentos vividos, vosotros habéis hecho que el trabajo fuese mucho más agradable y llevadero. Sé que al irme dejo compañeros, pero me llevo amigos.

A profesores y compañeros de otros departamentos como el profesor D. Germán Naharro Carrasco, por su amistad, gracia, consejos y esas largas charlas, y Sheila, porque no hace falta ser amigos de toda la vida para que uno se dé cuenta de la gente que merece la pena, a las personas se las conoce en las ocasiones y tú das la talla con creces. Al grupo de investigación de los doctores Kenneth Timmis y Gabriela Molinari, por acogerme como uno más durante mi estancia en el «Helmholtz Centre for Infection Research» (Braunschweig -Alemania-) y permitirme vivir una experiencia única y enriquecedora.

A Dani, por tu aprecio sincero, tus consejos desinteresados, las largas conversaciones mantenidas y por estar siempre dispuesto a escucharme. Eres el hermano mayor que nunca tuve.

A Jose, "el profesional", el "Messi" de la hostelería, por recibirme siempre con alegría y, aunque él no lo sepa, animarme más de una vez.

A Alex, "el cuñao", porque si te das cuenta hemos vivido bajo el mismo techo unos cuantos años y es muy importante tener en casa a alguien a quien aprecies con quien jugar una partida y desconectar. Al fin y al cabo no sólo nos une tu hermana, también la Play!!!

A mis amigos, a los de aquí (ellos saben quiénes son) y a los de allí, Pedro, Raquel, Fran, Susana, Oliver, Miriam, Dani, Judit, César, Bello, Zulaica, Diego, Inés e Iriana, precisamente por eso, por ser mis amigos y demostrarlo una y otra vez, por vuestra lealtad y afecto, y por estar a mi lado en los buenos y malos momentos, sois increíbles. A Chus, porque los amigos de verdad no hace falta que estén en continuo contacto para que uno sepa que puede contar con ellos para lo que haga falta, y por supuesto tú eres de esos. Y, en especial a mis "hermanos" Carlos y Diego, todo lo que diga sobra, porque hace unos veintitantos años que no sois mis amigos, sois más que eso, siempre ha sido así y siempre lo será. A todos vosotros os corresponde un pedazo de esta Tesis.

Finalmente, quiero dar las gracias al Ministerio de Educación y Ciencia por concederme una beca que me ha permitido llevar a cabo esta Tesis Doctoral, así como al Ministerio de Ciencia y Educación y a la Junta de Castilla y León (Conserjería de Educación) la concesión de los proyectos de investigación BFU2009-11545-CO3-01 y LE246A11-2 respectivamente, que han sido fundamentales para la realización de este trabajo.

Muchas gracias a todos.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	Pág. 1
1. Esteroides y esteroles	Pág. 3
1.1. Definición y estructura básica	Pág. 3
1.2. Funciones generales	Pág. 4
1.3. Clasificación y tipos de esteroides	Pág. 6
1.3.1. Esteroles	Pág. 6
1.3.1.1. Fitosteroles	<u>Pág</u> . 7
1.3.1.2. Ergosterol	<u>Pág.</u> 10
1.3.1.3. Colesterol	<u>Pág</u> . 12
1.3.1.3.1. Biosíntesis de colesterol	Pág. 13
1.3.1.3.2. Degradación de colesterol	Pág. 15
1.3.2. Compuestos esteroideos derivados del colesterol	Pág. 16
1.3.2.1. Hormonas esteroideas	Pág. 16
1.3.2.1.1. Glándulas o cápsulas suprarrenales	Pág. 16
1.3.2.1.2. Gónadas	Pág. 20
1.3.2.2. Vitamina D	Pág. 22
1.3.2.3. Ácidos biliares	Pág. 24
1.3.2.3.1. Estructura, función y tipos	Pág. 24
1.3.2.3.2. Biosíntesis y regulación	Pág. 26
1.3.2.3.3. Actuación y transporte	Pág. 29
1.3.2.4. Esteroides sintéticos	Pág. 32

2. Catabolismo esteroideo en microorganismos	Pág. 35
2.1. Metabolismo aeróbico de esteroides	Pág. 39
2.2. Metabolismo anaeróbico de esteroides	Pág. 46
2.3. Regulación de las rutas responsables de la asimilación de	
compuestos esteroideos	Pág. 50
3. Impacto ambiental de los esteroides	Pág. 52
OBJETIVOS	_Pág. 55
MATERIALES Y MÉTODOS	Pág. 59
1. Microorganismos utilizados	Pág. 61
2. Vectores	Pág. 68
3. Reactivos químicos y bioquímicos	Pág. 71
4. Medios de cultivo	Pág. 73
5. Aditivos suplementados a los medios de cultivo	Pág. 78
6. Aislamiento de bacterias con capacidad de degradar compuestos esteroideos	Pág. 79
7. Mantenimiento y crecimiento de los microorganismos	Pág. 79
8. Caracterización morfológica, fisiológica y bioquímica de las diferentes cepas en estudio	_Pág. 81
8.1. Tinción de Gram	Pág. 81
8.2. Análisis morfológico	Pág. 81
8.2.1. Análisis ultraestructural mediante microscopía electrónica	Pág. 82
8.2.1.1. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	Pág. 82
8.2.1.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	Pág. 83
8.3. Análisis fisiológico y bioquímico	Pág. 83
9. Métodos de análisis y/o tratamiento de las muestras de DNA	Pág. 84

9.1. Digestión y modificación del DNA	Pág. 84
9.1.1. Protocolo general para la digestión del DNA con enzimas	
de restricción	Pág. 84
9.1.2. Reacciones de las enzimas de modificación del DNA utiliz	zadas
con más frecuencia	Pág. 85
9.1.2.1. Desfosforilación de DNA	Pág. 85
9.1.2.2. Ligación de fragmentos de DNA	Pág. 85
9.2. Determinación de la concentración y pureza del DNA	Pág. 86
9.3. Análisis de las muestras de DNA mediante electroforesis en	
geles de agarosa	Pág. 86
9.3.1. Preparación de las muestras	Pág. 86
9.3.2. Preparación de los geles	Pág. 87
9.3.3. Desarrollo de la electroforesis	Pág. 87
9.4. Aislamiento de DNA genómico de las cepas objeto de estudio:	
DOC y COL	Pág. 88
9.5. Aislamiento de DNA plasmídico de <i>E. coli</i>	Pág. 90
9.5.1. Método de la lisis alcalina	Pág. 90
9.5.2. Minipreparaciones	Pág. 91
9.6. Recuperación del DNA desde los geles de agarosa	Pág. 92
9.7. Transformación de <i>E. coli</i>	Pág. 93
9.7.1. Obtención de células competentes de <i>E. coli</i>	Pág. 93
9.7.1.1. Método del cloruro de rubidio	Pág. 93
9.7.1.2. Obtención de células electrocompetentes de	
E. coli	Pág. 94
9.7.2. Procedimientos de transformación	Pág. 95

9.7.2.1. Transformación por choque térmico	Pág. 95
9.7.2.2. Transformación por electroporación	Pág. 96
10. Técnica de amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa	Pág. 97
11. Análisis de las secuencias de DNA	Pág. 99
12. Obtención de cepas mutantes de <i>P. putida</i> DOC21	Pág. 100
12.1. Mutagénesis con el transposón Tn5	Pág. 100
12.1.1. Identificación del punto de inserción del transposón Tn5 en	
el DNA genómico	Pág. 103
12.1.2. Identificación del punto de inserción del transposón Tn5 en	
el DNA genómico mediante la estrategia de recombinación con el	
brazo del transposón Tn5	Pág. 105
12.1.3. Secuenciación de las zonas adyacentes a un fragmento de	
secuencia conocida	Pág. 108

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	[]	Pág. 1	.11
------------------------	----	--------	-----

1. Aislamiento de cepas con capacidad de degradar colesterol	
o ácido desoxicólico	Pág. 113
2. Caracterización de las cepas aisladas	Pág. 115
2.1. Cepas Gram-positivas degradadoras de colesterol (cepas COL)	Pág. 115
2.1.1. Estudios filogenéticos y caracterización de las cepas COL	
mediante el análisis del rDNA 16S	Pág. 115
2.1.1. Caracterización morfológica y fisiológica de las cepas	
degradadoras de colesterol	Pág. 120
2.1.2.1. Cepa COL11	Pág. 120
2.1.2.2. Cepa COL14	Pág. 123

Índice

2.1.2.3. Cepa COL16	Pág. 126
2.1.2.4. Cepa COL17	Pág. 129
2.1.2.5. Cepa COL18	Pág. 132
2.1.2.6. Cepa COL19	Pág. 135
2.1.2.7. Cepa COL20	Pág. 138
2.1.2.8. Cepa COL21	Pág. 141
2.1.2.9. Cepa COL22	Pág. 144
2.1.2.10. Cepa COL23	Pág. 147
2.1.2.11. Cepa COL25	Pág. 150
2.1.2.12. Cepa COL26	Pág. 153
2.1.2.13. Cepa COL27	Pág. 156
2.1.2.14. Cepa COL28	Pág. 159
2.1.2.15. Cepa COL29	Pág. 162
2.1.2.16. Cepa COL30	Pág. 165
2.1.2.17. Cepa COL33	Pág. 168
2.1.3. Resumen de las características catabólicas de las diferentes	
cepas COL	Pág. 171
2.2. Estudio y caracterización de los aislados bacterianos Gram-negativos	5
con capacidad de degradar ácido desoxicólico (cepas DOC21 y DOC19).	Pág. 173
2.2.1. Caracterización y estudios filogenéticos de las cepas DOC.	Pág. 173
2.2.1.1. Análisis del rDNA 16S	Pág. 173
2.2.1.2. Análisis del gen rpoB	Pág. 174
2.2.2. Caracterización morfológica y fisiológica de los	
aislados degradadores de ácido desoxicólico	Pág. 176
2.2.2.1. Estudios morfológicos	Pág. 176

2.2.2.2. Estudios fisiológicos	_Pág. 177
2.2.4. Uso de diferentes fuentes de carbono por las cepas DOC	Pág. 184
2.2.5. Estudio del catabolismo de compuestos esteroideos por	
las cepas DOC	Pág. 187
3. Análisis de la ruta catabólica responsable de la asimilación de esteroides en	
la cepa DOC21	Pág. 190
3.1. Caracterización genética de esta ruta	Pág. 190
3.2. Identificación de las proteínas codificadas por los genes	
implicados en la degradación de compuestos esteroideos	Pág. 195
4. Estudio bioquímico, genético y metabólico del mutante 1 (DOC21Mut1)	Pág. 217
4.1. Expresión en trans del gen que codifica la dioxigenasa en el	
mutante 1 (DOC21Mut1)	Pág. 219
4.2. Análisis del gen que codifica la dioxigenasa de apertura en meta	
de las cepas DOC21 y DOC19	Pág. 222
CONCLUSIONES	Pág. 229
BIBLIOGRAFÍA	Pág. 233
APÉNDICE I	Pág. 263
APÉNDICE II	Pág. 279
APÉNDICE III	Pág. 287

INTRODUCCIÓN

"Muchos creen que el talento es cuestión de suerte, pero pocos saben que la suerte es cuestión de talento"

Jacinto Benavente (1866-1954).

1. Esteroides y esteroles.

1.1. Definición y estructura básica.

Los esteroides constituyen una familia de compuestos químicos orgánicos, ampliamente distribuidos en la naturaleza, que poseen una gran importancia desde un punto de vista biológico, farmacológico, medicinal y químico. El término «esteroide», del griego stereo(s) -στερεος- (sólido) y eid(és) -ειδ-ής/-ές- (que tiene aspecto de), fue adoptado por primera vez en 1963, para hacer referencia a este tipo de compuestos, por los bioquímicos ingleses Robert Kenneth Callow y Frank George Young. Estructuralmente están constituidos por un esqueleto o núcleo de ciclopentanoperhidrofenantreno (también denominado esterano o gonano), el cual es prácticamente plano y bastante rígido debido a que los anillos fusionados no permiten la libre rotación de los enlaces carbono-carbono (Djerassi, 1960; Eliel, 1962). Este núcleo se halla compuesto por 17 átomos de carbono y 28 hidrógenos, formando 4 anillos (3 hexanos y 1 pentano), indicados en la figura 1 con las letras A, B, C y D. Dicha estructura puede verse modificada por la presencia de diferentes grupos hidroxilos, carbonilos o grupos metilo en diferentes posiciones (estos últimos usualmente en C₁₀ y C₁₃) y por la existencia de una cadena lateral hidrocarbonada unida al carbono 17, en la que, además, pueden existir dobles enlaces y/o diferentes grupos funcionales (IUPAC, 1969; IUPAC, 1989; Kime, 1995). Como consecuencia de ello, se generan diferentes compuestos entre los que se incluyen el colesterol, las hormonas esteroideas, la vitamina D, las sales biliares, los fitosteroles y el ergosterol (Fig. 2).



A)

Figura 1. Estructuras químicas del ciclopentanoperhidrofenantreno. (A) plana y (B) tridimensional.

1.2. Funciones generales.

En mamíferos, y por lo tanto en el ser humano, los esteroides cumplen diferentes e importantes funciones (Bloch, 1965; Bloch, 1979; Sapolsky *et al.*, 2000; Ridlon *et al.*, 2006; Chiang, 2009; Greenlee *et al.*, 2011; Taves *et al.*, 2011; Traish *et al.*, 2011b; Yoshida & Stern, 2012). Entre ellas caben citarse:

- **Funciones reguladoras.** Controlan la concentración de sal y la secreción de bilis. Las ejercen los glucocorticoides y los mineralocorticoides.
- **Funciones estructurales.** Ciertos esteroides, tales como el colesterol en animales, los fitosteroles en vegetales y el ergosterol en hongos filamentosos y levaduras, forman parte de la estructura de las membranas biológicas.
- Funciones hormonales. Muchos esteroides actúan como mensajeros químicos. Las principales hormonas esteroideas son:

a) Corticoides. Dentro de ellos se distinguen dos grupos: glucocorticoides y mineralocorticoides. Los primeros son necesarios para que el organismo soporte y responda ante situaciones de estrés como ayuno, hipoglucemia, lesiones físicas, ansiedad y miedo. Los mineralocorticoides actúan principalmente sobre el control de los electrolitos presentes en los líquidos extracelulares y, particularmente, sobre el sodio, potasio y los cloruros.

b) Hormonas sexuales masculinas. En este grupo se incluyen los andrógenos (testosterona y sus derivados) y los anabolizantes androgénicos esteroideos (AAE). Estos últimos se suelen denominar genéricamente esteroides.

c) Hormonas sexuales femeninas. Son los estrógenos. Estos compuestos derivan de los andrógenos. Dentro de este grupo se incluyen la estrona, el estradiol y el estriol.

d) Vitamina D y derivados (colecalciferol -vitamina D_2 - y ergocalciferol - vitamina D_3 -). Como principal función, esta vitamina es la encargada de la absorción y del transporte de Ca²⁺ hasta los huesos, por lo que resulta esencial para la correcta formación y mineralización ósea. No obstante, estudios recientes han permitido atribuir a la vitamina D otras múltiples funciones (Vitamina D -Apdo 2.2.-).

• **Funciones metabólicas.** Los ácidos biliares (ácido cólico, ácido quenodesoxicólico, ácido desoxicólico, ácido litocólico, etc.) y sus sales, participan en la emulsión y absorción de los lípidos ingeridos en la dieta.



Figura 2. Estructura química de los principales esteroles.

1.3. Clasificación y tipos de esteroides.

1.3.1. Esteroles.

Los esteroles conforman un grupo especialmente importante dentro de los esteroides. Estos compuestos poseen un grupo hidroxilo con configuración β en posición C₃, además de una cadena lateral de al menos 8 átomos de carbono unida al carbono C₁₇ (R en la Fig. 3). En este grupo se incluyen el colesterol, que es el esterol más abundante en animales; el fitosterol, mayoritario en plantas superiores; y el ergosterol, presente en hongos filamentosos y en levaduras. Todos ellos son solubles en disolventes orgánicos y poseen un elevado punto de fusión.



Figura 3. Estructura química del esterol tipo y de sus derivados más importantes (fitosterol, colesterol y ergosterol).

A continuación, se procederá a describir los esteroles más importantes, así como sus funciones.

1.3.1.1. Fitosteroles.

Son esteroles naturales de origen vegetal muy similares al colesterol animal y al ergosterol de hongos y levaduras (ya que su origen es común) (Fig. 2). Son insolubles en agua y solubles en disolventes orgánicos, pudiendo encontrarse bien en forma libre, o bien, esterificados con otros compuestos, tales como los ácidos grasos. Las plantas contienen varios fitosteroles (β -sitosterol, campesterol, estigmasterol y brasicasterol) (Fig. 4), que actúan, al igual que el colesterol lo hace en los mamíferos, como componente estructural de las membranas celulares (Gül & Amar, 2006).

Su análisis estructural pone de manifiesto que todos ellos son prácticamente idénticos; diferenciándose exclusivamente en la cadena lateral unida al carbono C_{17} .



Figura 4. Estructura química de los diferentes tipos de fitosteroles.

Los fitosteroles se encuentran de manera natural en pequeñas cantidades en aceites vegetales (Fig. 5), especialmente en:

-Aceite de espino cerval de mar (Hippophae rhamnoides). (a)

-Aceite de maíz (Zea mays). (b)

-Aceite de soja (*Glycine max*). (c)



a)



b)



c)

Figura 5. Especies vegetales que contienen una mayor cantidad de fitosteroles en sus respectivos aceites: (a) Espino cerval de mar; (b) maíz y (c) soja.

El β-sitosterol está ampliamente distribuido en el reino vegetal, donde se encuentra en *Nigella sativa* (abésoda o ajenuz), *Carya illinoinensis* (pacano), *Serenoa repens* (palmito salvaje), *Cucurbita pepo* (pepita de calabaza), *Pygeum africanum (Prunus africana), Anacardium occidentale* (anacardo), salvados, germen de cereal, soja, *Hippophae rhamnoides* (espino cerval de mar), *Lycium barbarum* (cambrón), y en *Wrightia tinctoria* (Xie *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2001; Yang & Kallio, 2001; Kallio *et al.*, 2002; Ryan *et al.*, 2006; Chang & So, 2008; Sajfrtová *et al.*, 2010; M Hassanein *et al.*, 2011; Srivastava, 2014)

El campesterol se encuentra en bajas concentraciones en muchos vegetales (pepino, cebolla, patata, hierba limón -citronella-), frutos (banana, granada, pomelo) y semillas (café, pimienta negra). Sin embargo, aparece en una mayor concentración en los aceites de maíz y colza (*Brassica napus*), de hecho debe su nombre a que fue aislado por primera vez de la *Brassica campestris* (Fernholz & MacPhillamy, 1941).

Por su parte, el brasicasterol es sintetizado como su propio nombre indica, por la planta *Brassica napus* (canola o colza) y por algunas algas unicelulares que forman parte del fitoplacton (Phleger *et al.*, 2001; Phleger *et al.*, 2002; Murphy *et al.*, 2003).

Todos ellos tienen aplicaciones como aditivos alimentarios. De hecho, algunos productos como margarinas, mantequillas y yogures son suplementados con fitosteroles debido a su capacidad para reducir la cantidad de colesterol en sangre (Gupta *et al.*, 2011). Se ha comprobado que los fitosteroles provocan el bloqueo de la absorción de colesterol a nivel intestinal, compitiendo con éste por unirse a las micelas del tracto gastrointestinal, y, por lo tanto, disminuyen la cantidad general de colesterol absorbido, facilitando así su eliminación. Por esta razón, estos esteroles suelen utilizarse para controlar la concentración de colesterol, modificando las cantidades de HDL, de LDL y de triglicéridos en sangre (Jones *et al.*, 1997; Choudhary & Tran, 2011) y para disminuir el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares (Marangoni & Poli, 2010; Rocha *et al.*, 2011).

También se ha comprobado que el β -sitosterol puede ser utilizado como paliativo de los síntomas causados por la hiperplasia benigna de próstata (Plosker & Brogden, 1996; Wilt *et al.*, 2000a; Wilt *et al.*, 2000b; Levin & Das, 2000; Buck, 2004; Dedhia & McVary, 2008; Tacklind *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2012). Investigaciones recientes, han puesto de manifiesto que estos fitosteroles pueden actuar inhibiendo la multiplicación de células cancerosas y la aparición de metástasis en determinados tipos de cánceres (pulmón, mama, próstata y ovarios) (Woyengo, 2009). Sin embargo, un exceso en el organismo (>5% del esterol total) puede ser perjudicial, originando la enfermedad conocida como sitosterolemia o β -sitosterolemia. Esta patología, de origen genético y transmitida de padres a hijos según un patrón autosómico recesivo, provoca la acumulación de grasa cerca de los tendones (xantomatosis tendinosa) y en los párpados (xantelasma), un aumento de la cantidad de colesterol en sangre y la aparición de la denominada "enfermedad cardiovascular prematura" (Marangoni & Poli, 2010). Además de lo anteriormente expuesto, los fitosteroles también poseen aplicaciones cosméticas, por lo que son empleados en la confección de cremas y de barras de labios (Fernandes & Cabral, 2007).

1.3.1.2. Ergosterol.

El ergosterol es un esterol natural de origen fúngico que cumple la misma función estructural que el colesterol en animales y el fitosterol en vegetales. Forma parte de las membranas celulares de hongos, levaduras y de algunos protistas como los tripanosomas (Roberts *et al.*, 2003; Veen *et al.*, 2003). Su estructura química se indica en la Fig. 6.



Figura 6. Estructura química del ergosterol.

Además de la función estructural, el ergosterol es un precursor biológico de la vitamina D, ya que la radiación ultravioleta lo convierte en ergocalciferol o vitamina D₂ (Fig. 7) (Stamp, 1973; Rajakumar *et al.*, 2007).



Figura 7. Estructura química del ergosterol y del ergocalciferol (Vit D₂).

El ergosterol, además, es una molécula que actúa muy eficazmente como protector frente al estrés oxidativo generado como consecuencia de los ciclos de humedad/sequedad que habitualmente tienen lugar en los hábitats fúngicos (Dupont *et al.*, 2012).

Debido a que las membranas de los hongos, a diferencia de las de los vertebrados, poseen ergosterol, ésta molécula ha sido utilizada como diana terapéutica. De hecho, algunos compuestos, como es el caso de la anfotericina B, se utilizan como antifúngicos, ya que este antibiótico se acompleja con el ergosterol de las membranas celulares fúngicas, capturándolo, y por lo tanto, originando un poro por el cual penetran al interior celular iones (Na⁺, K⁺, etc.) y otras moléculas, provocando la muerte del hongo (Ellis, 2002). Asimismo, existen otros compuestos utilizados para tratar las infecciones fúngicas, como el miconazol, el itraconazol y el clotrimazol, que inhiben algunas de las etapas enzimáticas implicadas en la síntesis del ergosterol (Kathivaran *et al.*, 2012).

1.3.1.3. Colesterol.

Dentro del conjunto de los esteroles y de otros compuestos relacionados, el colesterol destaca por su importante papel fisiológico. El colesterol (3-hidroxi-5,6-colesteno), del griego *kole* -χολή- (bilis) y *stereo(s)* -στερεος- (sólido), fue identificado por primera vez en cálculos de la vesícula biliar por Michel Eugène Chevreul, químico francés, quien en un principio le dio el nombre de "colesterina" en 1816. Finalmente, en 1894 se le dio el nombre de colesterol al tratarse de un alcohol. Es un esterol de 27 átomos de carbono, que posee un grupo hidroxilo en configuración β y una cadena lateral de 8 átomos de carbono en posición C₁₇ (Fig. 8).



Figura 8. Estructura química del colesterol.

Este alcohol policíclico, derivado del escualeno, ha sido una de las moléculas biológicas más estudiadas, ya que es un componente esencial de todos los tejidos, formando parte de las membranas celulares de todos los organismos eucariotas y también en algunos organismos procariotas, tales como las cepas *Mycoplasma capricolum*, que requiere esteroles como factor esencial de crecimiento (Odriozola *et al.*, 1978; Bloch, 1979; Dahl *et al.*, 1981; Dahl *et al.*, 1982), y *Methylococcus capsulatus* (Bouvier *et al.*, 1976; Bloch, 1979). El colesterol es especialmente abundante en el tejido nervioso y en el plasma, donde se encuentra formando parte de las lipoproteínas (Bloch, 1965; Tabas, 2002a y b; Björkhem & Meaney, 2004).

De hecho, un funcionamiento cerebral normal, requiere el mantenimiento de unos niveles constantes de colesterol y la necesidad de esta constancia parece ser más importante en el cerebro que en cualquier otro órgano. Tanto es así, que en el cerebro se encuentra aproximadamente el 20% del colesterol total del organismo, la mayoría del cual se halla en la mielina (Jeitner *et al.*, 2011). Este colesterol atraviesa la barrera hematoencefálica mediante una hidroxilación en posición C_{24} , originando el 24-hidroxicolesterol o "cerebrosterol" (Björkhem, 2007), lo que requiere una recuperación de los niveles de colesterol en el cerebro, gracias a un transporte en sentido contrario de 27-hidroxicolesterol (Björkhem, 2006). Ambos compuestos se denominan genéricamente "oxiesteroles" (Björkhem, 2013). Debido a esta importancia en cuanto a la homeostasis cerebral del colesterol, se ha relacionado el desequilibrio cerebral de los niveles de este compuesto, con la aparición de enfermedades neurodegenarativas como el alzheimer (Björkhem *et al.*, 2006; Björkhem *et al.*, 2009; Jeitner *et al.*, 2011).

En el organismo, el colesterol tiene dos posibles orígenes:

- 1) El que se ingiere con los alimentos en la dieta.
- El obtenido gracias a la biosíntesis realizada por todos los tejidos del cuerpo a partir de precursores (Fig. 9). Esta síntesis es particularmente activa en el hígado, corteza renal, intestino, piel y en la pared de la aorta (Bloch, 1965).

1.3.1.3.1. Biosíntesis del colesterol.

La biosíntesis del colesterol, tiene lugar en el retículo endoplasmático liso de prácticamente todas las células en vertebrados. Este es un proceso complejo que incluye diferentes etapas:

A) Síntesis de mevalonato a partir de unidades de acetil-CoA.

B) Conversión de mevalonato en unidades de isopreno activo.

C) Formación de escualeno por condensación de unidades de isopreno.

D) Ciclación del escualeno dando en primer lugar a la formación de lanosterol y posteriormente de colesterol.

Un esquema de esta ruta biosintética, se expone en la figura 9.



Figura 9. Esquema simplificado de la biosíntesis de colesterol en eucariotas. A) En primer lugar, dos moléculas de acetil-CoA reaccionan para formar acetoacetil-CoA, mediante una reacción catalizada por la acetoacetil-CoA tiolasa. Además, una tercera molécula de acetil-CoA se une al acetoacetil-CoA para dar lugar al intermediario 3-hidroxi-3β-metilglutaril-CoA (HMG-CoA), en una reacción catalizada por la HMG-CoA sintasa. Esta enzima tiene dos isoformas, la citosólica que participa en la síntesis de colesterol y la mitocondrial que participa en la formación de cuerpos cetónicos (cetogénesis). En la cetogénesis el HMG-CoA se escinde, sin embargo, en la síntesis de colesterol, es reducido por la HMG-CoA reductasa, localizada en el retículo endoplasmático liso pero con el sitio activo orientado hacia el citosol, dando lugar al ácido mevalónico (mevalonato a pH fisiológico). Esta enzima utiliza NADPH+H⁺ como agente reductor y es la enzima clave en el control de la síntesis de colesterol. B) Conversión del mevalonato en unidades de isopreno activo. C) Estas unidades son polimerizadas mediante diferentes reacciones enzimáticas. Dos moléculas de isopreno activo dan lugar al geranil pirofosfato (10 átomos de carbono), a éste se le une otra molécula de isopreno activo originando el farnesil pirofosfato (15 átomos de carbono). Posteriormente, dos moléculas de farnesil pirofosfato conforman el escualeno (30 átomos de carbono). La escualeno sintasa utiliza NADPH+H⁺ como cofactor. D) A partir del escualeno tienen lugar diferentes reacciones (oxidaciones, reducciones, movimiento de grupos metilo) que intervienen en la ciclación del mismo y que permiten conformar la estructura de anillos común a todos los compuestos esteroideos (núcleo de ciclopentanoperhidrofenantreno). En primer lugar se obtiene el lanosterol y después de la eliminación de 3 grupos metilo, del desplazamiento de un doble enlace y de la reducción del doble enlace de la cadena lateral, se sintetiza el colesterol (Nelson & Cox, 2004). En total transcurren 54 reacciones desde la condensación inicial de 2 moléculas de acetil-CoA hasta la formación final de la molécula de colesterol.
A pesar de que estas cuatro son las etapas más significativas de la biosíntesis de colesterol (A, B, C y D), su génesis requiere otros pasos enzimáticos, algunos de los cuales todavía no han sido aclarados.

En cuanto a la biosíntesis de esteroles en microorganismos, además de lo mencionado anteriormente en las cepas bacterianas *Mycoplasma capricolum* y *Methylococcus capsulatus*, hace bastante tiempo que se han llevado a cabo estudios acerca de la biosíntesis bacteriana del colesterol (Weeks & Francesconi, 1978; Hayami *et al.*, 1979); así, por ejemplo, se ha descrito que *M. smegmatis* es capaz de sintetizar "*de novo*" este compuesto, y *M. tuberculosis* y *M. leprae* poseen genes homólogos a los genes responsables de la biosíntesis del colesterol en levaduras (Lamb *et al.*, 1998).

La importancia metabólica del colesterol es enorme, ya que como hemos indicado con anterioridad, es el precursor de un gran número de compuestos (Fig. 2). A través de diferentes modificaciones estructurales catalizadas por diferentes enzimas, se originan muchos otros compuestos, con importantes funciones e interesantes aplicaciones clínicas y farmacológicas.

1.3.1.3.2. Degradación de colesterol.

El ser humano no es capaz de catabolizar completamente el colesterol hasta CO₂ y H_2O , por lo que la única manera de eliminarlo es como precursor de otras moléculas (Fig. 2). El núcleo central es eliminado del organismo convirtiéndose en ácidos y sales biliares (Àcidos biliares -Apdo 1.3.2.3.2-), las cuales son secretadas en la bilis hacia el intestino para desecharse mediante las heces fecales. Además, parte del colesterol intacto es secretado en la bilis hacia el intestino, el cual es convertido por las bacterias de la flora intestinal en esteroides neutros como coprostanol y colestanol (Norlin *et al.*, 2003).

En ciertas bacterias sí se produce la mineralización total del colesterol y sus derivados, sin embargo, la ruta catabólica responsable dicha degradación todavía se encuentra en proceso de estudio, puesto que, aunque ya se conocen algunos de los pasos y reacciones enzimáticas que tienen lugar para la eliminación del colesterol, aún no se ha esclarecido por completo dicho proceso.

1.3.2. Compuestos esteroideos derivados del colesterol.

1.3.2.1. Hormonas esteroideas.

Como su propio nombre indica, son compuestos esteroideos que desempeñan funciones hormonales. En el ser humano, las hormonas esteroideas son sintetizadas, a partir del colesterol, en las glándulas adrenales o suprarrenales y en las gónadas. No obstante, estudios recientes han evidenciado que esta síntesis también puede ocurrir en otros tejidos, tales como órganos linfoides primarios (médula ósea y timo), intestino, piel, cerebro y posiblemente también en el corazón (Slight *et al.*, 1999; Davies & McKenzie, 2003; Taves *et al.*, 2011). Para su síntesis, es necesaria la eliminación parcial o total de la cadena alifática situada en el C₁₇ del colesterol. Dicha eliminación tiene lugar en las mitocondrias de las células productoras de esteroides, donde también se producen las hidroxilaciones y oxigenaciones requeridas. Estas reacciones están catalizadas por oxidasas que utilizan NADPH+H⁺, O₂ y por los citocromos P-450 mitocondriales (Miller, 1988).

1.3.2.1.1. Glándulas o cápsulas suprarrenales.

Son dos pequeños órganos piramidales situados cada uno de ellos sobre la parte superior de los riñones. Cada glándula está formada por dos partes, corteza y médula suprarrenal. Ambas difieren en cuanto a origen embrionario, organización histológica y funciones, por lo que desarrollan una actividad endocrina completamente independiente, produciendo diferentes tipos de hormonas, tanto de naturaleza esteroidea como no esteroidea.

Las hormonas esteroideas sintetizadas en las células de la corteza (también llamadas células corticales) se denominan **corticosteroides**. En las mitocondrias de las células corticales, el colesterol es transformado en pregnenolona, precursor del resto de hormonas corticales (Baker, 2002) (Fig. 2). Ésta se convierte en el retículo endoplasmático en progesterona, la cual es modificada posteriormente, y de manera diferente, en las mitocondrias de los diversos tipos de células que conforman las distintas zonas o capas que constituyen la corteza suprarrenal.

- Médula suprarrenal.

En la médula suprarrenal se producen **catecolaminas** (adrenalina o epinefrina, noradrenalina o norepinefrina y dopamina). Sin embargo, éstas no son hormonas de naturaleza esteroidea, ya que todas ellas derivan del aminoácido tirosina, y más concretamente de la dopamina. A partir de ésta, se sintetiza la noradrenalina, que finalmente se transforma en adrenalina. Por todo ello, su descripción y el análisis de sus funciones no serán abordadas en esta Tesis Doctoral.

- Corteza suprarrenal.

Deriva del mesodermo y se divide en tres zonas o capas concéntricas diferentes tanto en su aspecto macroscópico como en su organización celular: la zona glomerular, la fasciculada y la reticular. En las mitocondrias de las células glomerulares, la progesterona se convierte en un mineralcorticoide; en las de la zona fasciculada, en un glucocorticoide y en las de la zona reticulada, en un andrógeno.

En la *zona glomerular* (capa más externa de la corteza suprarrenal), las células segregan mineralcorticoides: aldosterona, desoxicortisona y desoxicorticosterona (Fig. 10). El más potente y abundante es la aldosterona (Connell & Davies, 2005). Esta hormona está implicada en el metabolismo del sodio y del potasio, estimula la reabsorción de Na⁺ en los epitelios y, en particular, en la porción distal del túbulo renal, donde además, incrementa la excreción de K⁺. La secreción de esta hormona está regulada sobre todo, por la concentración sanguínea de K⁺ y por el sistema renina-angiotensina (RAS) (Gumz *et al.*, 2010; Greenlee *et al.*, 2011), el cual ayuda a regular a largo plazo la tensión sanguínea y el volumen extracelular corporal.



Figura 10. Estructura química de la aldosterona, desoxicortisona y desoxicorticosterona.

La zona fasciculada está formada por células dispuestas formando anchos cordones orientados radialmente. Aquí se producen los glucocorticoides, cortisol, cortisona y corticosterona (Fig. 11). Entre todos ellos, el más importante es el cortisol. Estos compuestos, inducen la producción de numerosas enzimas y sistemas transportadores celulares, actuando principalmente sobre el metabolismo de glúcidos, lípidos y proteínas. Tanto el cortisol como la cortisona actúan sobre el metabolismo de los carbohidratos acelerando a nivel hepático la síntesis de glucosa y estimulando el catabolismo de proteínas y lípidos (triglicéridos). Son, por lo tanto, hormonas con una actividad "contra-insulínica". Además, inhiben las respuestas inflamatorias e inmunitarias del organismo (propiedad altamente utilizada en terapia), potenciando enormemente la acción de las catecolaminas en la producción de calor y en la acción a nivel cardiovascular e incrementando los efectos metabólicos del glucagón, de las hormonas tiroideas y de la somatotropina hipofisaria (Sapolsky *et al.*, 2000; De Bosscher & Haegeman, 2009; Flammer & Rogatsky, 2011).

La producción de estas hormonas está regulada por la ACTH hipofisaria según un proceso de retroinhibición que implica al hipotálamo. Una disminución en la concentración sanguínea de estas hormonas provoca en el hipotálamo la liberación de mayores cantidades de factores liberadores que estimulan la actividad adenohipofisaria.



Figura 11. Estructura química de los glucocorticoides.

La *zona reticular* está constituida por células que forman un sistema de trabéculas que producen andrógenos, es decir, hormonas sexuales con una actividad principalmente masculinizante (deshidroepiandrosterona -DHEA- y androstendiona) (Traish *et al.*, 2011b). La DHEA es transformada posteriormente en testosterona (Kelly & Jones, 2013; Kang, 2013) (Fig. 12). Las cantidades producidas son muy bajas, por lo que no tiene efectos en el hombre, pero en la mujer pueden contribuir a la aparición de algunos caracteres secundarios masculinos tales como el desarrollo pilífero en el pubis o en las axilas.



Figura 12. Estructura química de los andrógenos.

En resumen, las glándulas suprarrenales producen numerosas sustancias de naturaleza esteroidea, las cuales, según su actividad fisiológica, se clasifican en:

- **Glucocorticoides.** Este grupo incluye compuestos que como el cortisol, la cortisona y la corticosterona, son activos específicamente sobre el metabolismo de glúcidos (Fig. 11).
- **Mineralcorticoides.** Aldosterona, desoxicorticosterona y desoxicortisona. Estas moléculas controlan el equilibrio hidrosalino (Fig. 10).
- Andrógenos. En este grupo se incluyen la testosterona, la deshidroepiandrosterona (DHEA) y la androstendiona, responsables de los caracteres y funciones sexuales (Fig. 12).

1.3.2.1.2. Gónadas.

Son los órganos destinados a la reproducción sexual. En su interior, además de gametos y otras células necesarias para desarrollar la función reproductora, hay células especializadas en la producción de hormonas sexuales (algunas de naturaleza esteroidea) que ejercen una acción específica sobre los órganos implicados en el desarrollo y funcionalidad del aparato reproductor, en la reproducción y en la determinación de los caracteres sexuales secundarios.

La actividad de las gónadas está controlada por la adenohipófisis a través de la hormona folículoestimulante (FSH) y de la hormona luteinizante (LH), producidas en el hipotálamo al ser estimulado por parte de factores liberadores específicos. Esta conexión con el hipotálamo hace que variaciones ambientales puedan influir en el ciclo reproductor.

En el hombre poseen actividad endocrina las células intersticiales del testículo o células de Leydig y las células de Sertoli. Las primeras segregan andrógenos entre los que se incluyen la testosterona y la androstendiona (Fig. 12). Una pequeña parte de estos andrógenos es transformada por las células de Sertoli en estrógenos (Fig. 13), fundamentales por su función trófica, así como su participación en procesos relacionados con la maduración de los espermatozoides.

Por otra parte, se ha relacionado recientemente la deficiencia de testosterona en hombres de una edad comprendida entre 40 y 79 años, con la aparición de determinadas dolencias y/o enfermedades, tales como la obesidad, la diabetes y la hipertensión (Traish & Kypreos, 2011; Traish *et al.*, 2011a).

Introducción

En la mujer, las células de la teca interna producen pequeñas cantidades de andrógenos (testosterona y androstendiona), los cuales son transformados por las células de la granulosa de los folículos ováricos en crecimiento en los estrógenos estradiol, estrona y estriol (Clegg, 2012) (Fig. 13). Estos compuestos estimulan las células del útero y de la vagina, y son responsables de las transformaciones sexuales secundarias, aumentan la retención hídrica, reducen la formación de vello e influyen en la distribución de las grasas y en el desarrollo de los huesos, en particular el de la pelvis. Además, tienen función anabolizante a nivel tisular, estimulando la síntesis de proteínas.



Figura 13. Estructura química de los estrógenos.

Todas las hormonas adrenales de naturaleza esteroidea se sintetizan a partir de la progesterona.

1.3.2.2. Vitamina D.

También llamada calciferol o vitamina antirraquítica (ya que su déficit provoca raquitismo) es un heterolípido insaponificable de naturaleza esteroidea. Esta vitamina, tiene un papel esencial en la homeostasis del calcio y en el metabolismo óseo ya que es la encargada del transporte de Ca²⁺ hasta los huesos. Así pues, es esencial para la correcta formación y mineralización ósea (Dusso *et al.*, 2005; Yoshida & Stern, 2012).

La vitamina D o calciferol es realmente inactiva y necesita convertirse en su forma activa o calcitriol. Para ello, a partir del colesterol sintetizado en el hígado y tras varias transformaciones, se sintetiza el intermediario 7-deshidrocolesterol y éste se modifica en la piel gracias a la radiación UV de la luz solar, dando lugar a la vitamina D₃. Posteriormente, esta vitamina D₃ sufre una doble hidroxilación. La primera de ellas origina el 25hidroxicolecalciferol (calcidiol) mediante una reacción catalizada por una colecalciferol-25hidroxilasa hepática. La segunda tiene lugar en el riñón y da como resultado el 1,25dihidroxicolecalciferol (calcitriol), que es la forma activa (DeLuca, 1977). Por otro lado la vitamina D₂ deriva del ergosterol de la dieta y sigue un proceso de síntesis similar hasta llegar a 1,25-dihidroxicolecalciferol (Stamp, 1973; Rajakumar *et al*, 2007) (Fig. 14). La formación de calcitriol está estimulada por una hormona secretada por la glándula paratiroidea, la parathormona, e inhibida por elevados niveles de calcio en sangre (Lips, 2006).

Si existe una deficiencia de vitamina D no hay un aporte suficiente de Ca^{2+} a los huesos y estos empiezan a debilitarse y curvarse, produciéndose las malformaciones conocidas como raquitismo (niños), osteomalacia y osteoporosis (adultos) (Morris *et al*, 2010; Lips & van Schoor, 2011; Yoshida & Stern, 2012). Asimismo, la vitamina D regula los niveles de calcio y fósforo en la sangre (ambos vitales en el crecimiento y desarrollo de los huesos y dientes), la absorción a nivel intestinal de estos elementos a partir de la dieta ingerida y participa en la reabsorción renal del Ca^{2+} .



Figura 14. Ruta bioquímica propuesta para explicar la síntesis y activación de la vitamina D, a partir tanto del colesterol como del ergosterol proveniente de la dieta.

En cuanto al rol desempeñado en músculo, recientemente se ha relacionado a la deficiencia de vitamina D con la aparición de una funcionalidad muscular alterada. No es raro que diagnósticos errados de fibromialgia se deban a una deficiencia de esta vitamina (Badsha *et al.*, 2009; Ahmed *et al.*, 2009).

Por otra parte, aunque la vitamina D está implicada principalmente en el metabolismo del calcio, estudios recientes han indicado que puede tener otras numerosas funciones fisiológicas tales como la inhibición de la proliferación de células cancerosas, incluyendo el cáncer de mama, de próstata y el melanoma (Osborne & Hutchinson, 2002; Krishnan et al., 2003; Holick, 2006; Ali, 2007; Grant & Boucher, 2009; Reichrath, 2009; Wacker & Holick, Schwartz, 2013). Además, se le atribuyen efectos inmunomoduladores, 2013: antiinflamatorios y neuroprotectores (Dörr et al., 2013), ya que la forma activa de la vitamina D (cacitriol) se une al receptor nuclear de vitamina D (VDR) (Haussler et al., 1997) presente en la mayoría de las células, incluyendo las células inmunitarias (linfocitos B y T, células dendríticas y macrófagos) (Maruotti & Cantatore, 2010). También se ha relacionado la deficiencia de vitamina D con el incremento del riesgo de padecer diversos tipos de enfermedades crónicas, tales como enfermedades autoinmunes (como la enfermedad de Crohn, el asma, la diabetes mellitus tipo I o el lupus eritematoso sistémico), infecciosas, cardiovasculares, síndrome metabólico y diabetes de tipo II (Holick, 2004; Cutolo & Otsa, 2008; Kamen & Aranow, 2008; Szodoray et al., 2008; Bikle, 2011; Holick, 2011; Paul et al., 2012; Pfeffer & Hawrylowicz, 2012; Mok, 2013; Huang et al., 2013; Schneider et al., 2014; González-Parra & Egido, 2014).

De igual forma, podría estar implicada en el riesgo a padecer esclerosis múltiple. Se ha observado que la incidencia de esta enfermedad tiene una correlación geográfica, es decir, se observa un incremento de los casos de dicha enfermedad en zonas con poca exposición a la luz solar. Así pues, dado que la vitamina D se activa en la piel gracias a la radiación UV del sol, los habitantes de áreas geográficas con una abundante radiación solar, tendrán una mayor concentración de 25-hidroxicolecalciferol (calcidiol) en sangre, lo cual se ha relacionado con una redución en el riesgo de padecer dicha enfermedad (Hayes *et al.*, 1997; Hayes, 2000, Raghuwanshi *et al.*, 2008; Kampman & Steffensen, 2010; Döring *et al.*, 2013).

1.3.2.3. Ácidos biliares.

1.3.2.3.1. Estructura, función y tipos.

Son compuestos constituidos por 24 átomos de carbono, di- o trihidroxilados, derivados del colesterol y por lo tanto de naturaleza esteroidea (Fig. 15). Todos ellos poseen, unida al ciclopentanoperhidrofenantreno, una cadena de 5 carbonos con un grupo carboxilo terminal. La principal diferencia entre estos ácidos radica en la incorporación de 1, 2 o 3 grupos hidroxilo a la estructura esteroidea. Componen la bilis, formando sales que actúan como detergentes en el intestino delgado, cumpliendo un papel muy importante en la digestión de los lípidos ya que, al ser apolares, necesitan estar en forma de sales para facilitar su emulsión, degradación por la acción de las lipasas y posterior absorción por la pared intestinal. Adicionalmente, contribuyen a la absorción intestinal de las vitaminas liposolubles. La síntesis y subsiguiente excreción de los ácidos biliares en las heces representan el único mecanismo significativo para la eliminación del exceso de colesterol, ya que los ácidos biliares y los fosfolípidos solubilizan el colesterol en la bilis, previniendo así su precipitación en la vesícula biliar.

Además de su función detergente, los ácidos biliares también actúan señalizando moléculas (como el FXR -ver regulación de ácidos biliares-) y como agentes inflamatorios, activando rutas y receptores nucleares celulares que regulan tanto el metabolismo lipídico, como el glucídico y el energético (Chiang, 2009).



Figura 15. Estructura química de los ácidos cólico y quenodesoxicólico

Los ácidos biliares más importantes y más abundantes en la bilis humana son el ácido cólico y el ácido quenodesoxicólico (Fig. 15), denominados, por lo tanto, ácidos biliares primarios. Estos son secretados por el hígado a través de los conductos biliares hasta la vesícula biliar, donde son almacenados para su uso. Antes de ser utilizados, son conjugados en el hepatocito, mediante la formación de un enlace amida, que se establece entre el grupo carboxilo terminal del ácido biliar, y el grupo amino de la glicocola y/o de la taurina, dando lugar a los ácidos glicocólico y taurocólico, respectivamente (Fig. 16). Estos compuestos son mucho más solubles que aquellos de los que derivan. Posteriormente, a partir de estos se originan los ácidos biliares secundarios, los ácidos desoxicólico, litocólico, ursodesoxicólico, etc (Bortolini *et al.*, 1997) (Fig. 2).



Figura 16. Estructura química de los ácidos glicocólico y taurocólico.

1.3.2.3.2. Biosíntesis y regulación.

Como ya se ha indicado, la síntesis de ácidos biliares es la principal vía de eliminación del colesterol en mamíferos y aunque varias de las enzimas implicadas en este proceso se pueden activar en muchos tipos de células, es en el hígado, en el único órgano donde se produce la síntesis, metabolismo, conjugación, y excreción de los ácidos biliares. Mayoritariamente, dicha síntesis se inicia mediante la hidroxilación en posición C7 del colesterol, dando lugar al 7-hidroxicolesterol. Esta reacción la cataliza la enzima colesterol 7 α -hidroxilasa, miembro de la familia del CYP7A1 y perteneciente a la superfamilia de hemoproteínas denominadas en su conjunto citocromo P450. Esta etapa, es el paso limitante en la síntesis de ácidos biliares (Pandak *et al.*, 1990; Lorbek *et al.*, 2012)

Durante la síntesis de ácidos biliares, el grupo hidroxilo en configuración β situado en posición C3, debe ser epimerizado a configuración α . Esta reacción tiene lugar mediante la conversión de dicho grupo hidroxilo en un grupo ceto, etapa que es catalizada por una 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/isomerasa. Finalmente, tras una serie de pasos entre los que cabe destacar una nueva conversión de dicho grupo ceto a grupo hidroxilo y la reducción de la cadena lateral del colesterol, se originan los ácidos biliares primarios (ácido cólico y ácido quenodesoxicólico). La síntesis de uno u otro ácido biliar está regulada mediante la actividad de una 12 α -hidroxilasa (CYP8B1). Así, si el intermediario 7 α -hidroxicolest-4-en-3-ona es sustrato de esta actividad enzimática, dará lugar al ácido cólico (trihidroxilado), y si escapa a ella generará ácido quenodesoxicólico (dihidroxilado) (Pandak *et al.*, 1990; Lorbek *et al.*, 2012) (Fig. 17).

Por otra parte, existe una vía alternativa, que conlleva la hidroxilación de colesterol en posición C27 mediada por la enzima mitocondrial esterol 27-hidroxilasa (CYP27A1). Posteriormente, los intermediarios, generados a través de la acción de CYP27A1, son hidroxilados en la posición C7 por la oxiesterol 7 α -hidroxilasa (CYP7B1). Esta ruta, en humanos, es la principal vía de síntesis del ácido quenodesoxicólico (Monte *et al.*, 2009). En condiciones normales esta vía alternativa de síntesis recupera aproximadamente el 10% de los ácidos biliares perdidos diariamente (Duane & Javitt, 1999), aunque puede llegar ser la ruta principal de síntesis cuando la actividad del CYP7A1 es deficiente (Axelson & Sjövall, 1990; Beigneux *et al.*, 2002).

La tercera posibilidad para la biosíntesis de ácidos biliares tiene lugar mediante la oxidación del colesterol a 24-hidroxicolesterol. La actividad colesterol 24-hidroxilasa (CYP46A1) tiene lugar principalmente en el cerebro (Lund *et al.*, 1999). Una vez que el 24-hidroxicolesterol atraviesa la barrera hematoencefálica es hidroxilado en posición 7 mediante una oxiesterol 7 α -hidroxilasa II (CYP39A1); esta hidroxilación tiene lugar en el hígado.

Introducción



Figura 17. Esquema de la síntesis de ácidos biliares primarios a partir del colesterol. Se indican las enzimas implicadas en el proceso biosintético. Como se puede observar, es la actividad del CYP8B1, que hidroxila en posición 12, la que difiere en la producción de un ácido biliar u otro.

En cuanto a su regulación, los ácidos biliares y en particular los primarios, pueden ejercer una retroinhibición sobre la expresión de los genes implicados en su síntesis. Así, en el hígado, los ácidos biliares activan un receptor nuclear, denominado receptor X farnesoide (*farnesoid X receptor* -FXR-), también denominado NR1H4 (*nuclear receptor subfamily* 1, *group* H, *member* 4) y codificado por el gen *nr1H4*. Este FXR, al ser activado se transloca al interior celular e induce un pequeño receptor nuclear heterodímero o *small heterodimer partner* (SHP), lo cual provoca la subsecuente inhibición de los receptores nucleares homólogos del hígado y del factor hepático nuclear 4α (HNF4α, del inglés *hepatocyte nuclear factor 4α*). Como resultado de ello se produce la inhibición de la transcripción del gen que codifica la colesterol 7α-hidroxilasa (CYP7A1), y ya que esta enzima es fundamental en la síntesis de ácidos biliares, dicho proceso cesa en su actividad (Chiang, 2009, Li & Chiang, 2013).

Estudios realizados en ratones, han demostrado que este HNF4 α desempeña un papel crucial en la homeostasis de los ácidos biliares, mediante la regulación de ciertos genes que codifican enzimas involucradas en la hidroxilación y β -oxidación de la cadena lateral del colesterol *in vivo* (Inoue *et al.*, 2006; Chiang, 2009; Yin, 2011). Además, también regula la expresión de los genes *cyp7a1* y *cyp8b1*, que codifican la colesterol 7 α -hidroxilasa (CYP7A1) y la esterol 12 α -hidroxilasa (CYP8B1) respectivamente, ya que la inhibición del HNF4 α provoca que la expresión de estos genes se reduzca considerablemente. Como consecuencia de ello disminuye la capacidad de transformación del colesterol en ácidos biliares (Chen *et al.*, 2001; Inoue *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2007; Kir *et al.*, 2012).

Por otra parte, el FXR induce en el intestino de ratones una hormona llamada factor 15 de crecimiento fibroblástico (FGF15), ortóloga del factor 19 de crecimiento fibroblástico (FGF19) en intestino de humanos (*fibroblast growth factor*), que activa el receptor hepático FGFR4 (*fibroblast growth factor receptor 4*). Esta activación es una señal de inhibición de la síntesis de ácidos biliares ya que se inhibe la CYP7A1 (Chiang, 2009; Song *et al.*, 2009). Sin embargo, los mecanismos mediante los cuales el FXR, FGF19 y FGFR4 inhiben la expresión del gen *cyp7a1*, y por lo tanto su transcripción y traducción, no han sido todavía aclarados.

Así pues, todos estos receptores nucleares tienen una importancia capital en el metabolismo de los ácidos biliares, la secreción biliar, la homeostasis del colesterol y, por lo tanto, en los transtornos que tengan que ver con la presencia de cálculos biliares (Claudel *et al.*, 2013).

Por todo lo expuesto, parece cada vez más evidente que los ácidos biliares no solamente desempeñan su función a nivel intestinal emulsionando lípidos, sino que también participan en importantes y complejos procesos fisiológicos y bioquímicos. Como consecuencia de ello, tanto los ácidos biliares como sus receptores son objeto de numerosos estudios, y suelen ser utilizados como dianas terapéuticas. Con ello, se pretende desarrollar

fármacos que puedan ser utilizados en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el depósito y/o metabolismo del colesterol y de los ácidos grasos, tales como el hígado graso, la diabetes, la obesidad, el síndrome metabólico y algunas otras (Li & Chiang, 2013).

1.3.2.3.3. Actuación y transporte.

En el hígado tiene lugar la biosíntesis de ácidos biliares a partir de colesterol (Fig. 17). Estos ácidos biliares forman parte de la bilis (junto con el colesterol, proteínas, hormonas y agua), igualmente producida en el hígado, que tras la ingesta de alimentos, se libera desde la vesícula biliar al duodeno para emulsionar las grasas, facilitando así su proceso digestivo. Este proceso está controlado por la hormona intestinal colecistoquinina. Una vez en el intestino delgado (yeyuno y duodeno), los ácidos biliares ayudan a emulsionar los lípidos de la dieta y posteriormente, son modificados por las bacterias anaerobias intestinales (Bortolini *et al.*, 1997; Ridlon *et al.*, 2006). En primer lugar, se liberan de la taurina y de la glicocola, convirtiéndose así en ácidos biliares secundarios, tales como el ácido desoxicólico, el ácido litocólico, el ácido ursodesoxicólico, etc (Fig. 2). Posteriormente, éstos se reabsorben por el intestino y son devueltos al hígado a través de la circulación portal. Dicha absorción comienza en el fleon y se extiende hasta la parte proximal del colon. La ruta seguida por los ácidos biliares, desde su síntesis hasta su retorno al hígado, es conocida como circulación enterohepática.

No obstante, la absorción de los ácidos biliares en el intestino es incompleta. Así, una cantidad importante de éstos se pierde y es secretada en las heces. Por ello, no es de extrañar que entre los más de 400 tipos distintos de bacterias que viven en el intestino, de las cuales el 99% son anaerobias estrictas, haya algunas capaces de degradar o de modificar parcialmente dichos ácidos biliares. Así pues, dependiendo de su localización en el intestino, encontramos diferentes géneros bacterianos, capaces de transformar estos compuestos:

Intestino delgado

-Duodeno: Lactobacillus y Streptococcus

-Yeyuno: Lactobacillus, Streptococcus, Staphylococcus, Veillonella.

-Ileon: Enterobacteria, Enterococcus, Bacteriodes, Clostridium, Lactobacillus, Veillonella.

• Intestino grueso

-Ciego y colon: Bacteroides, Eubacterium, Bifidobacterium, Ruminococcus, Peptostreptococcus, Propionibacterium, Clostridium, Lactobacillus, Escherichia, Streptococcus, Methanobrevibacter.

La hidrólisis de los ácidos biliares y la oxidación de sus grupos hidroxilo, tienen lugar mediante una serie de reacciones llevadas a cabo por la mayoría de las bacterias anaeróbicas intestinales arriba mencionadas. Sin embargo, la pérdida del hidroxilo en posición 7, se halla restringida a unas pocas bacterias dentro de las que integran la flora intestinal presente en el colon. Además, se ha descrito que, en la bacteria *Clostridium scindens* VPI 12708, los ácidos biliares inducen varios genes conocidos como genes *bai* (*bile acid-inducible*), que codifican enzimas implicadas en las diferentes modificaciones que sufren estos compuestos (Ridlon *et al*, 2006), y que facilitan bien su reabsorción (circulación enterohepática), o bien su excreción (Fig. 18). Anteriormente, esta cepa se había identificado como *Eubacteria sp.* VPI 12708 (Gopal-Srivastava *et al.*, 1990; Mallonee *et al.*, 1990).

Los genes *bai* codifican proteínas que desempeñan las siguientes funciones (citadas en orden de actuación):

- baiG: pertenece a un conjunto de genes que codifican una superfamilia de proteínas transportadoras (Mallonee & Hylemon, 1996). Facilita el transporte de los ácidos biliares primarios (ácidos cólico y quenodesoxicólico) pero no el de los ácidos biliares secundarios (ácidos desoxicólico y litocólico).
- *bai*B: codifica una ácido biliar-CoA ligasa que, como su propio indica, activa el ácido biliar a su tioéster de CoA.
- baiA: baiA1, baiA2 y baiA3. Parece ser que codifican unas 3α-hidroxiesteroide deshidrogenasas, sin embargo, su importancia fisiológica no está del todo clara. (Gopal-Srivastava *et al.*, 1990). Estas enzimas sólo reconocerían los ácidos biliares conjugados y podrían utilizar NAD⁺ y NADP⁺ como aceptores finales de electrones.
- baiCD: codifica una esteroide oxidorreductasa, específica de tioésteres del ácido 3deshidro-4-colenoico y del ácido 3-deshidro-4-quenodesoxicolenoico.

- baiH: codifica una esteroide oxidorreductasa específica para los tioésteres del ácido 3-deshidro-4-ursodesoxicolenoico y del ácido 3-deshidro-4-epicolenoico (Franklund *et al.*, 1993).
- *bai*F: codifica una ácido biliar-CoA hidratasa, pero existe una hipótesis que propone que dada su alta homología con la familia de las CoA transferasas tipo III, podría codificar para una CoA transferasa. Además, para llevar a cabo la 7α -deshidroxilación, podría ser necesaria la hidrólisis de ATP. Mediante una tranferasa podría tener lugar la transferencia de CoA desde los ácidos biliares activados hasta los nuevos ácidos biliares, y así, reiniciar el ciclo de activación sin el consiguiente gasto de ATP. No obstante, está hipótesis todavía no ha sido corroborada experimentalmente.
- *bai*E: codifica una 7α-deshidratasa que actúa sobre el ácido 3-deshidro-4quenodesoxicolenoico.
- *bai*I: codifica una 7β-deshidratasa que utiliza como sustrato el ácido 3-deshidro-4ursodesoxicolenoico.

Las posibles transformaciones de los ácidos biliares, llevadas a cabo por las enzimas codificadas por estos genes *bai*, y que, a su vez, están involucradas en la ruta de la $7\alpha/\beta$ -deshidroxilación de éstos, son el objetivo de estudios encaminados al esclarecimiento de los diferentes mecanismos empleados por las bacterias probióticas de la flora intestinal para la captación de los ácidos biliares, los cuales podrían resultar muy útiles para conseguir una efectiva eliminación de los mismos tras su excreción.



Figura 18. Procesos realizados por las proteínas codificadas por los genes *bai* (bile acid-inducible) en *Clostridium scindens* VPI 12708, con respecto a los ácidos biliares.

1.3.2.4. Esteroides sintéticos.

Son esteroides análogos a los naturales que han sido diseñados para interactuar con los receptores de éstos debido a su similitud estructural (Fig. 23). Estos compuestos, pueden desempeñar eficazmente muchas de las funciones que realizan los esteroides naturales. Algunos compuestos son utilizados en tratamientos médicos, como antiinflamatorios y también en el tratamiento de enfermedades autoinmunes (artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, asma, alergias, psoriasis, enfermedad de Crohn, etc). Dentro de este grupo se incluyen glucocorticoides sintéticos (Barnetson & White, 1992; van de Kerkhof *et al.*, 1994; Jeal & Faulds, 1997; Qureshi, *et al.*, 2001; Hardy *et al.*, 2001a y b; Mercadante *et al.*, 2001; Shih & Jackson, 2007). Algunos de ellos se utilizan para generar un aumento de masa muscular, para incrementar la producción de glóbulos rojos y la densidad ósea, siendo considerados sustancias dopantes en el deporte profesional (nandrolona, dexometasona, etc.)

Introducción

(Quan *et al.*, 2011). Este tipo de esteroides sintéticos también se utilizan para provocar un aumento de peso en el ganado vacuno. Todos estos tratamientos están terminantemente prohibidos por las autoridades sanitarias competentes, siendo considerada su aplicación un grave delito contra la salud pública (Dervilly-Pinel *et al.*, 2011).

Por otra parte, ciertos esteroides sintéticos tales como el 17 β -etinilestradiol (Carlström *et al.*, 1978; Abrams *et al.*, 2001; Creasy *et al.*, 2001; Goa *et al.*, 2003), la noretindrona (Hall & Trussell, 2012; Weisberg, 2012) y el acetato de medroxiprogesterona (Kaunitz, 1994; Kaunitz, 1998; Roy, 2010) son utilizados como anticonceptivos. Este último también es empleado en terapias de sustitución hormonal (paliativos de los trastornos de la menopausia, cambio de sexo, etc...). La actividad biológica de estos esteroides depende del tipo de compuesto, siendo, unas veces más potente y otras menos, que el esteroide natural al que sustituyen.

Ejemplos de hormonas sintéticas son:

- Glucocorticoides: prednisona, dexametasona y triamcinolona.
- Mineralcorticoides: fludrocortisona.
- Andrógenos: oxandrolona y nandrolona.
- Estrógenos: dietilestibestrol y 17β-etinilestradiol.
- Vitamina D: dihidrotaquisterol.
- Progestinas: noretindrona y acetato de medroxiprogesterona.



Figura 23. Estructura química de algunos de los esteroides sintéticos más importantes.

2. Catabolismo esteroideo en microorganismos.

La búsqueda de microorganismos capaces de metabolizar el colesterol, sus análogos y/o sus derivados, comenzó a principio del siglo XX, cuando se observó que ciertas especies bacterianas pertenecientes al género *Mycobacterium* eran capaces de utilizar colesterol como única fuente de carbono y de energía (Söhngen, 1913). También se comprobó que otros microorganismos incluidos en el género *Proactinomyces* eran capaces de degradar parcialmente colesterol y algunos, como *P. erythropolis*, incluso acumulaban compuestos estructuralmente relacionados (Turfitt, 1944a; Turfitt, 1946). Este hecho indicaba, no solo que esas bacterias eran capaces de procesar el colesterol, sino que ponían de manifiesto la posibilidad de obtener nuevos compuestos con estructura esteroídica (Turfitt, 1943; Turfitt, 1944b; Turfitt, 1947; Turfitt, 1948). Asimismo, ciertas especies de *Azotobacter* podían transformar el colesterol en 4-colesten-3-ona, hidrolizando muchas de ellas la cadena lateral y produciendo así metilheptanona, que se acumulaba en el medio de cultivo (Horvath & Kramli, 1947).

Por otra parte, a mediados de siglo se comprobó que ciertas especies de *Nocardia* aisladas del suelo eran capaces de hidrolizar la cadena lateral de colesterol, transformándolo en diferentes derivados esteroideos, algunos de los cuales presentaban características similares a las de algunas hormonas sexuales (Whitmarsh, 1964). Además, diversos autores corroboraron que diferentes especies de los géneros *Nocardia, Arthrobacter, Bacillus, Brevibacterium, Corynebacterium, Streptomyces, Microbacterium, Serratia, Achromobacter, Pseudomonas* o *Protaminobacter* eran capaces de degradar compuestos de naturaleza esteroidea (Tak, 1942; Brown & Bernstein, 1966; Arima *et al.*, 1969; Nagasawa *et al.*, 1969; Chipley *et al.*, 1975; Martin, 1977; Ferreira & Tracey, 1984; Philipp *et al.*, 2006).

Las investigaciones más recientes sobre el metabolismo aeróbico del colesterol se han llevado a cabo en cepas de los géneros de microorganismos Gram-positivos, *Mycobacterium* y *Gordonia*. En cuanto al primero de ellos, curiosamente, aquellas especies de crecimiento lento, por lo general no patógenas, como *M. smegmatis*, eran capaces de metabolizar el colesterol cuando éste se usaba como única fuente de energía. Sin embargo, aquellas especies de crecimiento rápido, patógenas como *M. tuberculosis*, eran capaces de acumularlo y de modificarlo, pero no de utilizarlo como única fuente de energía (Av-Gay & Sobouti, 2000). En *M. smegmatis* se han descrito los genes *ksd*D1 y *ksd*D2, los cuales codifican dos posibles 3-cetoesteroide- Δ^1 -deshidrogenasas que podrían estar implicadas en la degradación de colesterol (Brzosteck *et al.*, 2005). Con respecto al género *Gordonia*, ya se había estudiado la capacidad para degradar colesterol de diversas especies, pero una de ellas, concretamente *Gordonia cholesterolivorans*, presenta un sorprendente comportamiento con respecto a otras especies pertenecientes a este género en cuanto a la degradación de compuestos de naturaleza esteroidea, ya que degrada aquellos que poseen una cadena alifática lateral de un elevado número de carbonos, como el colesterol (C_{27}), la colestenona (C_{27}), el ergosterol (C_{28}) y el estigmasterol (C_{29}). Sin embargo, no catabolizaba aquellos cuya cadena alifática era más corta, tal es el caso del ácido cólico (C_{24}) y la progesterona (C_{21}), ni tampoco aquellos que no la poseían, como la testosterona, la androsterona y la 4-androsten-3,17-diona (4-AD) (todos ellos C_{19}), entre otros (Drzyzga *et al.*, 2009; Drzyzga *et al.*, 2011).

Otras bacterias Gram-positivas, como las pertenecientes al género *Rhodococcus*, son capaces de degradar colesterol y otros compuestos esteroideos (Larkin *et al.*, 2005). En esas especies, se han estudiado diferentes enzimas tales como la colesterol oxidasa, la 3-cetoesteroide- Δ^1 -deshidrogenasa, la cual también ha sido identificada en géneros bacterianos como *Arthrobacter* (Molnár *et al.*, 1995; Choi *et al.*, 1995a y b) y *Nocardia* (Drobnic *et al.*, 1993), y la 3-cetoesteroide-9 α -hidroxilasa (Morii *et al.*, 1998; Navas *et al.*, 2001; Ivshina *et al.*, 2005; van der Geize *et al.*, 2000; van der Geize *et al.*, 2002b; van der Geize *et al.*, 2008; Knol *et al.*, 2008). Además, el análisis completo del genoma de la cepa *Rhodococcus jostii* RHA1 (McLeod *et al.*, 2006) ha permitido descubrir un conjunto de genes (algunos definidos funcionalmente) que podrían estar involucrados en el catabolismo del colesterol (van der Geize *et al.*, 2007).

En 1983 se describió una cepa de Pseudomonas que tenía capacidad para metabolizar el colesterol, Pseudomonas sp. NCIB 10590, la única bacteria Gram-negativa con capacidad para metabolizar esteroles (colesterol y β -sitosterol) (Owen *et al.*, 1983b; Owen *et al.*, 1985) y ácidos biliares (cólico, quenosesoxicólico, litocólico y ursodesoxicólico) como única fuente de carbono y energía (Owen et al., 1983a; Owen & Bilton, 1983; Owen & Bilton, 1984; Owen et al., 1988). Curiosamente degradaba el colesterol y el β-sitosterol en condiciones aeróbicas, y los ácidos biliares en condiciones anaeróbicas. Sin embargo, estos resultados no han podido ser refrendados ya que se ha comprobado que la cepa que se conserva en la colección NCBI no es capaz de crecer en estas fuentes de carbono. Por otra parte, estudios recientes (aparte de los realizados durante esta Tesis Doctoral) han puesto de manifiesto la existencia de una cepa perteneciente al género Pseudomonas capaz de degradar el ácido cólico entre otros ácidos biliares, dicha cepa es la Pseudomonas sp. Chol1 (Holert et al., 2013a). Esta bacteria, anaerobia facultativa, es capaz de metabolizar el ácido cólico tanto en condiciones aerobias como anaerobias, originando en el primero de los casos 7α , 12α dihidroxi-1,4-androstadien-3,17-diona (DHADD) y en el segundo 3a,7a,12a-trihidroxi-9,10seco-1,3,5(10)-androstatrien-9,17-diona (THSATD) (Philipp et al., 2006). Ambos compuestos, análogos al 1,4-androstadien-3,17-diona (ADD) y 3-hidroxi-9,10-seco-1,3,5(10)androstatrien-9,17-diona (HSATD) pertenecientes a la ruta central de degradación de compuestos esteroideos, seguirían la ruta principal de degradación hasta CO₂ (Fig. 19).

Además, se ha descrito en esta cepa una ruta de degradación de la cadena lateral en C_{17} , similar a una β -oxidación (Birkenmaier *et al.*, 2007), que cursa con la formación de un intermediario aldehídico (Holert *et al.*, 2013b). En dicha ruta, se ha caracterizado un gen denominado *skt* que codifica una aldolasa, previamente denominada como una β -cetotiolasa (Birkenmaier *et al.*, 2011), la cual desempeñaría un papel fundamental en dicho proceso, ya que provocaría la ruptura aldolítica necesaria para la desacetilación de la cadena lateral (Holert *et al.*, 2013c). Tanto la oxidación del anillo A de la estructura esteroidea como la degradación de la cadena alifática lateral, se llevarían a cabo mediante procesos semejantes a los indicados en la figura 19.

No obstante, el microorganismo Gram-negativo más estudiado actualmente en el metabolismo aeróbico de esteroides es la especie bacteriana Commamonas testosteroni (anteriormente conocida como Pseudomonas testosteroni), y sobre todo las cepas TA441 y ATCC 11996. Ambas una cepas, no degradan colesterol, pero si pueden utilizar como única fuente de carbono testosterona y ácidos biliares. Muchas de las etapas de la degradación de testosterona en esta bacteria han sido caracterizadas tanto a nivel genético como bioquímico (Horinouchi et al., 2001; Horinouchi et al., 2003a; Horinouchi et al., 2003b; Horinouchi et al., 2004a; Horinouchi et al., 2004b; Horinouchi et al., 2005). Una gran parte de los genes involucrados en la degradación de testosterona en este microrganismo, denominados genes tes, han sido caracterizados, si bien aún no ha sido aclarado completamente la función de cada uno de ellos (Horinouchi et al., 2010; Horinouchi et al., 2012; Gong et al., 2012). Así pues, la testosterona regula la expresión de estos genes involucrados en el catabolismo de compuestos esteroideos en C. testosteroni (Möbus et al., 1997). En este microorganismo se han caracterizado la 3a-hidroxiesteroide deshidrogenasa/carbonil reductasa (3a-HSD/CR codificada por el gen hsdA) que cataliza la oxidoreducción en posición 3 de una gran variedad de esteroides C₁₉₋₂₇ (Oppermann & Maser, 1996; Möbus & Maser, 1998; Möbus & Maser, 1999; Maser et al., 2000; Maser et al., 2001; Hwang et al., 2005; Horinouchi et al., 2010); la 3-cetoesteroide- Δ^5 -isomerasa (ksi) que transforma la 5-androsten-3,17-diona (5-AD) en 4androsten-3,17-diona (4-AD) (Kuliopulos et al., 1987; Choi & Benisek, 1988; Plesiat et al., Δ^4 -deshidrogenasas (3-cetoesteroide- $\Delta^4(5\alpha)$, 1991); 3-cetoesteroide- $\Delta^4(5\beta)$ -V las deshidrogenasas, TesI) que catalizan la conversión del 1-androsten-3,17-diona (1-AD) (anillos A:B trans o cis, respectivamente) en ADD (Florin et al., 1996; Horinouchi et al., 2003b). Dichas enzimas, junto a las denominadas Δ^1 -deshidrogenasas (KsdD, KstD, TesH, todas ellas 3-cetoesteroide- Δ^1 -deshidrogenasas), que transforma el 4-AD en 1,4-androstadien-3,17-diona (ADD), pertenecen a la superfamilia de deshidrogenasas/reductasas de cadena corta (SDRs short-chain dehydrogenases/reductases-) (Kisiela et al., 2012), y catalizan reacciones pertenecientes a las denominadas rutas periféricas que conducen a la formación del compuesto central (ADD).

Sin embargo, a pesar de que se han realizado múltiples trabajos acerca de la degradación del colesterol y derivados por especies microbianas, aún no se ha descrito ninguna ruta bioquímica que permita metabolizar completamente esta molécula. La mayoría de los estudios que se han realizado acerca del metabolismo bacteriano del colesterol, de los ácidos biliares, y de distintos esteroles, se han orientado no tanto a su caracterización bioquímica, sino, fundamentalmente, hacia el desarrollo de procesos de biotransformación para la obtención, de forma más o menos empírica, de productos intermediarios útiles para la semisíntesis de esteroides de interés farmacéutico. Los procedimientos de bioconversión en la síntesis química de esteroides han sido utilizados por la industria químico-farmacéutica desde hace mucho tiempo (Sedlaczek, 1988; Demain, 1992).

En el campo de la medicina, los conocimientos acerca del catabolismo del colesterol han sido utilizados como base para el diseño de moléculas que actúan sobre él (dianas terapéuticas), con el fin de combatir las infecciones causadas por *Mycobacterium tuberculosis* (Ouellet *et al.*, 2011), ya que el colesterol juega un papel crucial en cuanto a la persistencia de dicha infección en el organismo hospedador (Pandey & Sassetti, 2008; Miner *et al.*, 2009). Así, gracias a la caracterización de las denominadas *mammalian cell entry* (*mce*), una familia de proteínas con una importancia capital en la virulencia de *Mycobacterium tuberculosis* (Haile *et al.*, 2002; Saini *et al.*, 2008; Zhang & Xie, 2011; Rathor *et al.*, 2013), se han podido diseñar nuevas estrategias, para el tratamiento de esta infección bacteriana (Gioffré *et al.*, 2005). Estudios recientes han demostrado que el operón *mce4* en *M. tuberculosis* y *M. smegmatis* es requerido para que dicha bacteria metabolice el colesterol (Pandey & Sassetti, 2008). Con respecto a estos genes *mce* en *Mycobacterium smegmatis* (a pesar de que no han sido establecidas aún con exactitud sus funciones), se ha comprobado que están implicados en el mantenimiento de ciertas características celulares, tales como la morfología de la colonia o la capacidad para formar biofilms (Klepp *et al.*, 2012).

A pesar de todo lo expuesto, aún existe bastante desconocimiento acerca de los genes y enzimas que participan en las rutas catabólicas implicadas en la degradación de estos compuestos. Evidentemente, un conocimiento detallado de las mismas permitiría un uso mucho más eficaz de estos procesos, aportando a la industria farmacéutica nuevas estrategias para obtener, tanto, enzimas modificadas mediante técnicas de ingeniería de proteínas, como nuevas moléculas con estructura esteroidea. Además, ante la importancia que han adquirido las dietas bajas en colesterol debido a su repercusión en ciertas patologías cardiovasculares, se antoja imprescindible avanzar en el conocimiento de estas rutas de degradación. De esta forma se pretende llegar a comprender de una manera más completa el metabolismo de estos compuestos esteroideos, con el fin de poder diseñar cepas recombinantes que expresen dichas rutas eficazmente en microorganismos probióticos, de modo que podamos controlar a voluntad tanto la cantidad de colesterol presente en alguno de los alimentos ingeridos, fundamentalmente en aquellos que se obtienen mediante fermentación, como la asimilación de dicho colesterol por parte de nuestro organismo.

2.1. Metabolismo aeróbico de esteroides.

El colesterol y sus derivados son moléculas ampliamente distribuidas en la naturaleza, relativamente resistentes a la degradación. El hecho de que el colesterol sea una molécula recalcitrante, es debido a su complejidad estructural, al bajo número de grupos funcionales existentes en su molécula (un único doble enlace C-C y un sólo grupo hidroxilo), y a su baja solubilidad en agua (3×10^{-8} M).

La ruta metabólica responsable de la asimilación del colesterol no ha sido establecida completamente aún en ninguna bacteria capaz de metabolizarlo, por lo que se desconoce su ruta de degradación completa. A partir de los resultados obtenidos en diferentes estudios bioquímicos realizados con cepas pertenecientes a los géneros *Mycobacterium, Rhodococcus, Gordonia y Comamonas*, se ha postulado una posible ruta para la degradación aeróbica del colesterol y de compuestos análogos (Marsheck *et al.*, 1972; Martin, 1977; Kieslich, 1985; Sedlaczek, 1988; Mahato & Garai, 1997; Donova, 2007; Donova & Egorova, 2012) (Fig. 19). En esta ruta común se pueden establecer dos partes claramente diferenciadas:

a) <u>Ruta alta de degradación: oxidación e isomerización del colesterol y</u> <u>degradación de la cadena lateral.</u>

Etapa I:

La enzima colesterol oxidasa (FAD-dependiente, colesterol oxidasa tipo I) en unos microrganismos, o 3- β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/isomerasa (NAD(P)-dependiente, (colesterol oxidasa tipo II) en otros (Vrielink & Ghisla, 2009), es probablemente la primera actividad de este sistema degradativo que cataliza la oxidación de colesterol a 4-colesten-3ona mediante dos reacciones consecutivas. En primer lugar se produce la oxidación del colesterol a 5-colesten-3-ona (actividad 3- β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/isomerasa), y, posteriormente tiene lugar una isomerización originando el 4-colesten-3-ona (actividad Δ^5 cetoesteroide isomerasa) (Fig. 19-I). Esta colesterol oxidasa requiere oxígeno molecular como aceptor final de electrones. Las colesterol oxidasas mejor caracterizadas (todas ellas de tipo I), son la ChoA y la ChoM de *Streptomyces sp.* SA-COO, ChoB de *Bacillus sterolicum* y ChoE de *Rhodococcus equi*. Son enzimas extracelulares y más bien parecen actuar como factor de virulencia que formando parte de un sistema catabólico (Navas *et al.*, 2001). Mediante la comparación de sus secuencias, se han encontrado homologías con dichas colesterol oxidasas en *Streptomyces coelicolor* y en varias cepas del género *Mycobacterium* en las que se han secuenciado sus genomas (*M. tuberculosis, M. leprae* y *M. bovis*). Todas ellas ha sido denominadas genéricamente ChoD y, a diferencia de las anteriores, carecen de péptido señal, pudiendo ser por lo tanto intracelulares. No obstante, también se ha evidenciado su importancia en la patogénesis de *M. tuberculosis* (Brzostek *et al.*, 2007; Klink *et al.*, 2013). En esta cepa se ha descrito una 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa codificada por el gen *rv*1106*v* que podría ser la enzima fundamentalmente implicada en la oxidación inicial del colesterol en esta bacteria, ya que al disrumpir dicho gen se produce una reducción en la actividad oxidante de unas 90 veces (Yang *et al.*, 2007).

En *Mycobacterium smegmatis* $mc^{2}155$ se han identificado varios genes que podrían codificar enzimas con actividad colesterol oxidasa. Uno de ellos, el MSMEG_1604, codifica una proteína similar a una colesterol oxidasa ChoD de *M. tuberculosis* H37Rv codificada por el gen rv3409c. Sin embargo, en M. smegmatis esta enzima no parecía jugar un papel relevante en la mineralización del colesterol ya que los mutantes afectados en este gen no tenían afectada la producción de colest-4-en-3-ona (colestenona) (Fig. 19-I). Adicionalmente, se han identificado otros 2 genes, el MSMEG_5228 y el MSMEG_5233, que codifican 2 posibles 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasas. La primera de ellas es muy similar a las colesterol oxidasas de Nocardia sp. y M. tuberculosis (Rv1106c) (Horinouchi et al., 1991; Yang et al., 2007), mientras que la segunda es similar a la deshidrogenasa AcmA de Sterolibacterium denitrificans (Apdo 3.2.). Un mutante en el primero de los genes mencionados mostró una disminución radical en la síntesis de colestenona, aunque la capacidad de crecer en colesterol no se veía significativamente afectada. Esto se interpretó como que otras deshidrogenasas como la MSMEG_5233 podrían llevar a cabo este proceso. El estudio de un doble mutante afectado en ambos genes indicó la más que probable existencia de otras deshidrogenasas/isomerasas capaces de catalizar esta primera reacción implicada en la degradación de colesterol en M. smegmatis mc²155 (Uhía et al., 2011).

Por todo lo expuesto, las diferentes colesterol oxidasas presentes en distintos microorganismos cumplen varias funciones biológicas: i) están directamente implicadas en el metabolismo del colesterol y de otros compuestos esteroideos estructuralmente relacionados; ii) son responsables de la patogenicidad bacteriana.

Además, las colesterol oxidasas podrían ser utilizadas como dianas terapéuticas encaminadas a la producción de un amplio espectro de antibióticos antifúngicos (Doukyu, 2009).

Etapa II:

Tras la modificación introducida por la colesterol oxidasa, se produce la eliminación de la cadena alifática del colesterol (Fig. 19-II) mediante una serie de procesos similares a una β -oxidación, que todavía no han sido esclarecidos (van der Geize *et al.*, 2007). Esta etapa ha sido estudiada en algunas especies pertenecientes al género *Nocardia* y en las cepas NRRL B-3683 y NRRL B-3805 de *Mycobacterium sp.* (Sih *et al.*, 1968a, b y c; Marsheck *et al.*, 1972). Se ha identificado la proteína codificada por el gen *ro04679* de *Rhodococcus jostii* RHA1 (Rosłoniec *et al.*, 2009) (citocromo P450 125, CYP 125) que es la enzima responsable de la hidroxilación en C₂₆ de la cadena lateral. Asimismo, se ha descrito una proteína homóloga en *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv que está codificada en el gen *rv3545c* (Capyk *et al.*, 2009b), así como una CYP125A1, una C₂₇ esteroide monooxigenasa que transforma el colesterol en 4-colesten-3-ona (Ouellet *et al.*, 2010).

Esta degradación de la cadena lateral, al parecer, comporta sucesivas hidroxilaciones y posteriores activaciones con coenzima A (CoASH), originando acil-CoA derivados, lo que provoca el sucesivo acortamiento de dicha cadena. Así, recientes estudios han caracterizado 4 acil-CoA ligasas/sintetasas que participarían en estos procesos. Dos de ellas, denominadas FadD19 y FadD17, pertenecientes a la ruta catabólica del colesterol en *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, y las otras dos, llamadas CasG y CasI que formarían parte de la ruta de degradación del ácido cólico en *Rhodococcus jostii* RHA1 (Casabon *et al.*, 2014). Asimismo, se ha comprobado la existencia de acil-CoA ligasas en *Rhodococcus rhodochrous* DSM43269, de hecho, existe una gran similitud entre la FadD19 de esta bacteria y la FadD19 de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (Wilbrink *et al.*, 2011).

A nivel de esta etapa tendría lugar la degradación de la cadena lateral en el proceso catabólico de ácidos biliares (Birkenmaier *et al.*, 2007; Birkenmaier *et al.*, 2011; Holert *et al.*, 2013b y c), así como la modificación del grupo hidroxilo en C_{17} de la testosterona, para la incorporación de estos compuestos (ác. biliares y testosterona) como 4-AD y ADD a la ruta central de degradación (Fig. 19).

b) Rutas central y baja de degradación.

Etapa III:

Inmediatamente después, o quizá al mismo tiempo que la cadena alifática es eliminada, tiene lugar el proceso oxidativo del núcleo de ciclopentanoperhidrofenantreno (Figura 19-III). Puede ser que alguna de las deshidrogenasas de baja especificidad denominadas genéricamente 3-cetoesteroide- Δ^1 -deshidrogenasas (KsdD1 y KsdD2 en *M. smegmatis*, TesH, TesI y Ksi en *Comamonas testosteroni* TA441, y KstD1, KstD2, KstD3 y

KstD4 en *Rhodoccoccus erythropolis* SQ1 y *Rhodococcus jostii* RHA1) (van der Geize *et al.*, 2000; van der Geize *et al.*, 2002b; van der Geize *et al.*, 2007; Brzostek *et al.*, 2005; Knol *et al.*, 2008; Horinouchi *et al.*, 2010), sean capaces de actuar tanto sobre los compuestos que han perdido la cadena lateral 4-androsten-3,17-diona (AD), como sobre los que están en proceso de eliminarla, y así conducir a la formación del compuesto 1,4-androstadien-3,17-diona (ADD), que podría considerarse, en cierta forma, como el metabolito central de estas primeras etapas degradativas. Bajo este supuesto, estos procesos catabólicos que conducen al ADD se encuadrarían dentro de la denominación de *rutas periféricas*, entre las que se incluirían todas las rutas que desde distintos puntos de partida, bien sea desde los ácidos biliares o desde distintos esteroles y esteroides, condujesen al ADD o a los posibles derivados hidroxilados o metilados del ADD.

A continuación tiene lugar una hidroxilación en C9, originando el 9α-hidroxi-1,4androstadien-3,17-diona (9-OH-ADD), y la ruptura del enlace entre los carbonos C_9 y C_{10} catalizada por la enzima KstH en Mycobacterium smegmatis mc²155 y KshAB en Rhodococcus erythropolis SQ1, Rhodococcus jostii RHA1 y Mycobacterium tuberculosis H37Rv, originando el 3-hidroxi-9,10-secoandrosta-1,3,5,(10)-trien-9,17-diona (3-HSATD) (Brzostek et al., 2005; van der Geize et al., 2002b; van der Geize et al., 2007; van der Geize et al., 2008; Capyk et al., 2009a; Capyk et al., 2011). Acto seguido tiene lugar una hidroxilación en C4, llevada a cabo por la enzima TesA1A2 (oxigenasa de 2 componentes) en C. testosteroni (Horinouchi et al., 2004a) y HsaAB en Mycobacterium tuberculosis H37Rv y Rhodococcus jostii RHA1 (Dresen et al., 2010), transformándose así en un derivado aromático de tipo catecólico, el 3,4-dihidroxi-9,10-secoandrosta-1,3,5,(10)-trien-9,17-diona (3-DHSATD). Posteriormente el anillo A de este compuesto se abre por la acción de una extradiol dioxigenasa de tipo meta, denominada TesB en C. testosteroni TA441 (Horinouchi et al., 2001) y HsaC en M. tuberculosis H37Rv y R. jostii RHA1 (van der Geize et al., 2007). Dicha apertura da lugar al ácido 4,5,9,10-diseco-3-hidroxi-5,9,17-trioxoandrosta-1(10),2dien-4-oico (4,9-DSHTAD). A continuación, una hidrolasa denominada TesD en C. testosteroni TA441 (Horinouchi et al., 2003a) y HsaD en M. tuberculosis H37Rv (Lack et al., 2008; Lack et al., 2010) y en R. jostii RHA1 (van der Geize et al., 2007), escinde el 4,9ácidos 2-hidroxihexa-2,4-dienoico y 3aα-H-4α-propanoato-7aβ-DSHTAD en los metilhexahidro-1,5-indanodiona (HIP), completando así lo que se propone como ruta central de la degradación de colesterol.



Figura 19. Ruta propuesta para la degradación del colesterol y de otros compuestos de naturaleza esteroidea. Se encuentran representadas las diferentes etapas en las que se incorporan los distintos compuestos esteroideos.

Etapa IV:

El ácido 2-hidroxihexa-2,4-dienoico daría lugar al ácido 4-hidroxihexa-2-oico gracias a la acción de la enzima TesE, y posteriormente, se escindiría en ácido pirúvico y propionilaldehído mediante la participación de la enzima TesG (Hayashi et al., 2005) (Fig. 19-IV). Finalmente, el propionilaldehído se transformaría en propionil-CoA, mediante una serie de reacciones en las que estaría implicada la enzima TesF. Por otra parte, la 3aa-H-4apropanoato-7aβ-metilhexahidro-1,5-indanodiona (HIP), podría metabolizarse hasta ácido succínico, gracias a la participación entre otros, del gen fadD3, el cual codificaría una enzima acil-CoA ligasa, que activando la HIP a HIP-CoA, iniciaría la degradación de los anillos C v D del núcleo esteroideo (Casabon et al., 2013a). La incursión de estos metabolitos en rutas generales de degradación llevaría a la formación de anhídrido carbónico y agua. Estos genes tes, descritos para Comamonas testosteroni TA441 (Horinouchi et al., 2003b; Horinouchi et al., 2004a; Horinouchi et al., 2004b; Horinouchi et al., 2005) y que tienen sus homólogos en los genes hsaE, hsaF y hsaG, descritos tanto para Mycobacterium tuberculosis H37Rv como para Rhodococcus jostii RHA1 (van der Geize et al., 2007; Dresen et al., 2010), codificarían enzimas que podrían participar en los pasos finales, conformando lo que se denominaría ruta baja de degradación de compuestos esteroideos.

2.2. Metabolismo anaeróbico de esteroides.

La degradación del colesterol y de otros compuestos esteroideos en anaerobiosis, ha sido muy poco estudiada en comparación con su metabolismo en presencia de oxígeno. Hasta hace relativamente poco, los trabajos más significativos en este campo, consistían en el estudio de las biotransformaciones de monoterpenos, ácidos biliares y otros isoprenoides (incluido el colesterol) en ecosistemas anóxicos (Zheng *et al.*, 2012).

Los principales microorganismos en los que se ha realizado este tipo de estudios son las bacterias intestinales de mamíferos *Bacteriodes sp.* D8, cuyo hábitat es el cólon humano, capaz de convertir colesterol, 4-colesten-3-ona y coprostanona en coprostanol (Gerard *et al.*, 2007), y *Eubacterium coprostanoligenes*, capaz de transformar colesterol en coprostanol (Freier *et al.*, 1994). Estas bacterias no son capaces de degradar totalmente estos compuestos ya que catabolizan exclusivamente la cadena lateral pero no el núcleo del ciclopentanoperhidrofenantreno (Groh *et al.*, 1993). Sin embargo, ciertas bacterias desnitrificantes son capaces de metabolizar colesterol y otros compuestos esteroideos completamente. Tal es el caso de *Denitratisoma oestradiolicum*, que degrada 17β-estradiol (Fahrbach *et al.*, 2006); *Steroidobacter denitrificans*, degradadora de estradiol, estrona, testosterona y AD (Fahrbach *et al.*, 2008; Fahrbach *et al.*, 2010) y las cepas 72ChoI (proteobacteria) (Harder & Probian, 1997) y *Sterolibacterium denitrificans* (Tarlera & Denner, 2003), muy próximas filogenéticamente a los géneros *Thauera* y *Azoarcus* (Chiang *et al.*, 2008b). Además, es interesante señalar que *Sterolibacterium denitrificans*, que es anaerobia facultativa, es capaz de degradar completamente el colesterol tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas, lo que supone un claro ejemplo de flexibilidad metabólica (Chiang *et al.*, 2008b).

Los estudios más exhaustivos acerca de la mineralización del colesterol y de compuestos esteroideos en condiciones anaeróbicas han sido realizados en *Sterolibacterium denitrificans*. En esta especie, se han descrito las etapas iniciales de la ruta degradativa de dichos compuestos en condiciones anóxicas. Así, se han caracterizado dos genes (ambos se encuentran en una zona de DNA cromosómico de 43 kb), el *acm*A (*anoxic colesterol metabolism*) que codifica la primera enzima de la ruta degradativa, una colesterol deshidrogenasa/isomerasa que oxida el colesterol a colest-5-en-3-ona, y que posteriormente lo isomeriza a colest-4-en-3-ona; y el *acm*B que codifica una colest-4-en-3-ona Δ^1 - deshidrogenasa (de similar secuencia a la 3-cetoesteroide- Δ^1 -deshidrogenasa presente en algunas bacterias aeróbicas), la cual cataliza la oxidación del colest-4-en-3-ona hasta 25-hidroxicolest-1,4-dien-3-ona, en otros.

Alternativamente, se produce la hidroxilación de la cadena lateral en posición C_{25} , mediante un proceso que implica la participación de agua como donador de oxígeno. Esta etapa constituye una diferencia con respecto a lo descrito en aerobiosis, en cuyo caso, la hidroxilación del carbono C_{26} de la cadena lateral, se debe a la actuación del citocromo P450 125 -CYP 125- tanto en *Rhodococcus jostii* RHA1 como en *Mycobacterium tuberculosis*) (Chiang *et al.*, 2008a y b) (Fig. 20).



Figura 20. Etapas iniciales propuestas explicar para la ruta metabólica responsable de la degradación anaeróbica de colesterol en *Sterolibacterium denitrificans*.

La enzima 4-colesten-3-ona- Δ^1 -deshidrogenasa no solo oxida 4-colesten-3-ona y 5colesten-3-ona, sino que también tiene una alta eficiencia catalítica sobre progesterona, 4androsten-3,17-diona, testosterona y 9-nortestosterona, siendo sus inhibidores competitivos la corticosterona y la estrona. Así, en cuanto a la degradación de testosterona en condiciones anaeróbicas en *Steroidobacter denitrificans*, se ha comprobado que esta enzima podría ser la que cataliza la conversión de testosterona en 1-deshidrotestosterona (DT) aunque también puede ser que la testosterona se transforme en 4-androsten-3,17-diona (AD). A través de análisis *in vivo* realizados mediante HPLC, se comprobó que el compuesto mayoritario originado a partir de testosterona era la 1-deshidrotestosterona. Ambos compuestos dan lugar a 1,4-androstadien-3,17-diona (ADD) que continuaría la ruta catabólica hasta CO₂ (Chiang *et al.*, 2010) (Fig. 21).

Introducción



Figura 21. Representación esquemática de las diferentes etapas iniciales de la degradación de testosterona en condiciones anaeróbicas en la bacteria *Steroidobacter denitrificans*. La 4-colesten-3-ona- Δ^1 -deshidrogenasa, provoca la segunda desaturación en posición C₁. Esta reacción es similar al proceso que tiene lugar en las etapas iniciales de la degradación de colesterol en *Sterolibacterium denitrificans*.

Se ha comprobado que bacterias como *Steroidobacter denitrificans*, que son capaces de crecer en medios que contienen testosterona como única fuente de carbono en condiciones anaeróbicas, originan productos intermediarios similares a aquellas que se desarrollan bajo condiciones aeróbicas (tanto en lo referente a la eliminación de la cadena lateral, como en la degradación del núcleo de ciclopentanoperhidrofenantreno) (Leu *et al.*, 2011). No obstante, estudios recientes han puesto de manifiesto ciertas diferencias en la degradación del núcleo esteroideo en esta bacteria, dependiendo de las condiciones de oxigenación durante su

crecimiento. De esta manera, cuando crece en condiciones anaerobias, el catabolismo del núcleo esteroideo comienza por una escisión en el anillo A (Wang *et al.*, 2013). Por otra parte, bajo condiciones aeróbicas, en estas bacterias anaeróbias facultativas aparece el uso de la ruta anaerobia cuando les falta alguna de las reacciones dependientes de oxígeno (Chiang *et al.*, 2008b; Chiang *et al.*, 2010).

2.3. Regulación de las rutas responsables de la asimilación compuestos esteroideos.

Los trabajos más completos realizados sobre la regulación genética de las rutas metabólicas que tienen lugar en la degradación de compuestos de naturaleza esteroidea en microorganismos se han llevado a cabo en la bacteria C. testosteroni, utilizando testosterona como fuente de carbono, ya que es en este microorganismo donde se posee un mayor conocimiento acerca de los genes que las codifican. Así, en C. testosteroni ATCC 11996 se ha identificado un gen que codifica una proteína reguladora de tipo LuxR, denominada teiR (testosterone inducible regulator), requerida para la degradación de testosterona. Este gen es necesario para la expresión de un gen sip48-β-HSD (proteína de 48 kDa inducible en presencia de esteroides), además de otros genes implicados en la degradación de esteroides. Incluidos dentro de estos últimos, se hallan aquellos que codifican las enzimas 3β-17βhidroxiesteroide deshidrogenasa, 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa (α -HSD), Δ^{5-3} cetoesteroide isomerasa, 3-oxoesteroide Δ^1 -deshidrogenasa y 3-oxoesteroide $\Delta^4(5\alpha)$ deshidrogenasa (Pruneda-Paz et al., 2004; Linares et al., 2008). Además, se ha comprobado que los mutantes obtenidos mediante disrupción del gen teiR en C. testosteroni eran incapaces de inducir la expresión de dichos genes; sin embargo, si se expresaba el gen intacto en trans, el nivel de transcripción de los mismos se restauraba.

Esta proteína teiR, responde a varios esteroides tales como la testosterona y derivados. Se encuentra anclada a la membrana celular y pertenece a la familia de las quinasas. Asimismo, se ha postulado la participación de esta proteína en procesos de quimiotaxis (Göhler *et al.*, 2008). Posteriormente, se identificó en *C. testosteroni* TA441 un gen homólogo al *tei*R, denominado *tes*R, el cual regula la expresión de tres *clusters* de genes que participan en la degradación de esteroides (Horinouchi *et al.*, 2004, Horinouchi *et al.*, 2010) (Fig. 22).



Figura 22. Organización de los tres *clusters* de genes involucrados en la degradación de compuestos esteroideos en *Comamonas testosteroni*. Todos ellos se hallan bajo el control del gen regulador *tes*R en la cepa TA441 (resaltado en rojo), denominado *tei*R en la cepa ATCC 11996 (Horinouchi *et al.*, 2010).

El *cluster* 1 contiene el gen *tes*B, que codifica la dioxigenasa que cataliza la apertura del anillo B, y los genes ORF1, ORF2 y ORF3, todos ellos necesarios para la degradación de compuestos esteroideos. Esta dioxigenasa es inducida por un intermediario de la ruta de degradación de testosterona en *C. testosteroni* TA441 (Horinouchi *et al.*, 2001).

El *cluster* 2 estaría conformado por genes que en su mayoría participarían en la aromatización, apertura y degradación del anillo A.

El *cluster* 3 consta de dos grupos de genes situados en direcciones opuestas y que en su mayoría tomarían parte en la degradación de los anillos B, C y D, incluyendo los genes *tes*A1A2 que codifica una dioxigenasa de 2 componentes que hidroxila en posición C₄ el 3,4-DHSATD.

Así mismo, en *C. testosteroni* la expresión del gen hsdA, que codifica una 3α hidroxiesteroide deshidrogenasa/carbonil reductasa, se encuentra regulada por los genes rep1y rep2, los cuales forman parte de un mecanismo de represión en el que la testosterona actúa como desrepresor, evitando la unión de estos al promotor del gen hsdA (represión transcripcional) y al RNA mensajero (represión traduccional), respectivamente (Xiong & Maser, 2001; Xiong *et al.*, 2003). Estudios recientes en *C. testosteroni* ATCC 11996 han demostrado la existencia de un regulador transcripcional tipo LysR, denominado HsdR, el cual activa la expresión del gen hsdA. Curiosamente, la actividad del HsdR depende de la disminución de la represión ejercida por RepA, ya que estudios *in vitro* han demostrado que el HsdR podría estar en contacto con la RNA polimerasa (Gong *et al.*, 2012a).

En cuanto a la regulación en el género *Mycobacterium*, el avance más importante ha sido el descubrimiento del regulador transcripcional KstR, cuya desrepresión podría tener lugar gracias a la unión del colesterol al KstR. Anteriormente, se había constatado que en *M. tuberculosis* se inducía un gen que codificaba un regulador represor tipo TetR (Kendall *et al.*,
2007). La utilización del colesterol en *Mycobacterium* está regulada por 2 represores transcripcionales de este tipo, el *kst*R (también llamado *kst*R1) y el *kst*R2, los cuales regulan la expresión de 83 (*M. smegmatis*) y 74 genes (*M. tuberculosis*), en el caso del *kst*R1, y 15 genes, en el caso del *kst*R2 (géneros *Mycobacterium* y *Rhodococcus*) (Kendall *et al.*, 2007; Kendall *et al.*, 2010; Casabon *et al.*, 2013b).

En esta especie bacteriana se han descrito recientemente dos genes, el $MSMEG_1604$, que codifica una proteína similar a la colesterol oxidasa ChoD de M. tuberculosis H37Rv y el $MSMEG_5228$, que codifica una proteína semejante a una 3- β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/isomerasa dependiente de NAD(P) en *Nocardia* sp. y en M. tuberculosis (Rv1106c) (Horinouchi *et al.*, 1991; Yang *et al.*, 2007). La expresión de este último se inducía en presencia de colesterol, mientras que la expresión del anterior era constitutiva. Además de estos dos genes, se caracterizó el $MSMEG_5233$, que codificaba para otra 3- β -hidroxiesteroide deshidrogenasa similar a la codificada por el *acm*A de *Sterolibacterium denitrificans* cuando se la cultivaba en condiciones anaeróbicas (Chiang *et al.*, 2008a y b), y que es igualmente inducido por colesterol (Uhía *et al.*, 2011).

3. Impacto ambiental de los esteroides.

Debido a la creciente e incontrolada actividad humana, es cada vez más frecuente observar la presencia de compuestos contaminantes de diferente naturaleza en el medio ambiente. Algunos de estos contaminantes poseen estructura esteroídica y otros son derivados de moléculas que poseen dicha estructura. En cualquier caso son compuestos muy estables, ya que su conformación estructural les confiere dicha característica, siendo por lo tanto difíciles de eliminar. Entre ellos, suelen encontrarse subproductos industriales (derivados del lavado y tratamiento de la lana); residuos generados por las industrias químicas dedicadas a la síntesis y/o transformación de fármacos (especialmente en cuanto a la producción de vitaminas y hormonas de naturaleza esteroidea); y otros compuestos hallados en las aguas residuales municipales, provenientes de centros en los que se aplican tratamientos farmacológicos. Gran parte de estos compuestos son, o pueden llegar a ser, potencialmente perjudiciales, pudiendo intervenir, por ejemplo, en diversos procesos biológicos importantes, tales como la proliferación celular, el control del ciclo celular y en diversos mecanismos de reconocimiento intercelular. Por lo tanto, su presencia y/o acumulación puede causar efectos perjudiciales, pudiendo alterar su sistema endocrino, afectando a los ciclos biológicos y al comportamiento sexual (Teles et al., 2004).

Introducción

De entre todos los compuestos de naturaleza esteroidea (tanto naturales como artificiales) vertidos al medioambiente, los que han suscitado un mayor interés científico son los estrógenos, estrona, 17 β -estradiol y el anticonceptivo sintético oral, 17 α -etinilestradiol (Dytczak *et al.*, 2008; Shi *et al.*, 2010). Este último, está considerado como uno de los responsables de la feminización de los peces ya que estos sufrían diversas alteraciones (disminución en la formación de espermatozoides y la producción de una proteína involucrada en la formación de huevas). Además, el número total de individuos de sexo masculino se redujo significativamente y se incrementó el número de hembras con ovarios deformes, a causa de un cambio de sexo de macho a hembra en alguna etapa de la maduración sexual de dichos peces (Daughton & Ternes, 1999). Por otra parte, también se ha observado, que algunas hormonas sexuales de naturaleza esteroidea tales como la testosterona, el estradiol y la progesterona, pueden afectar a la reproducción de ciertos moluscos. Éstos, aunque no poseen las enzimas necesarias para sintetizarlos, sí pueden captar dichas hormonas si se encuentran presentes en las aguas que constituyen su hábitat (Scott, 2013).

En cuanto al reino vegetal, se ha comprobado que ciertas hormonas sexuales de naturaleza esteroidea (17 β -estradiol, androsterona, testosterona y progesterona), tienen efecto e influencia sobre el crecimiento celular y radicular, sobre el desarrollo del brote y sobre el desarrollo embrionario (Janeczko & Skoczowski, 2005; Janeczcko, 2012).

Estos compuestos esteroideos son utilizados como biomarcadores de referencia en algunos análisis de contaminación debido a su alto índice de persistencia en el medioambiente. Tal es el caso del colesterol (principal componente de la lanolina) y de otros esteroles como el coprostanol (derivado del colesterol). Ambos son bastante resistentes a los tratamientos anaeróbicos realizados sobre los efluentes procedentes del lavado industrial de la lana (Poole & Cord-Ruwisch, 2004; Veiga *et al.*, 2005). Por otra parte, residuos procedentes de fuentes animales tales como el estiércol, también contribuyen de una manera importante a la entrada de estrógenos en el medio ambiente (Hanselman *et al.*, 2003; Raman *et al.*, 2004).

Por todo ello, debido al impacto negativo en el medio que poseen las hormonas esteroideas, la eliminación de las mismas del agua y de los sedimentos durante los tratamientos de depuración ha despertado un gran interés tanto a nivel científico como industrial (Anderson & Iyaduri, 2003). La biorremediación de compuestos esteroideos, requiere un amplio conocimiento de su metabolismo, tanto a nivel genético como bioquímico. Al conseguirlo, se podrán potenciar las capacidades degradativas de los diferentes microorganismos, los cuales podrían ser utilizados como agentes biológicos descontaminantes. Así pues, el conocimiento preciso de las rutas catabólicas (enzimas, intermediarios, mecanismos de regulación, etc.) se antoja de gran interés biológico, ya que ello permitiría diseñar nuevas estrategias que contribuyan a reducir el impacto de los esteroides en el medioambiente (Koh et al., 2008; Shi et al., 2010; Marfil-Vega et al., 2010; Marfil-Vega et al., 2012).

OBJETIVOS

"Daría todo lo que sé, por la mitad de lo que ignoro."

René Descartes (1596-1650).

Objetivos.

Durante la realización de esta Tesis Doctoral se pretende caracterizar bioquímica y genéticamente la ruta o rutas catabólicas responsables de la degradación bacteriana aeróbica de compuestos de naturaleza esteroidea. Para ello, los objetivos propuestos son los siguientes:

- Aislamiento y caracterización de cepas capaces de degradar diferentes compuestos esteroideos tales como el colesterol, los ácidos biliares y la testosterona entre otros.
- Selección de una de ellas como modelo experimental para la realización de todos los estudios catabólicos.
- 3) Aislamiento de mutantes incapaces de degradar alguno de estos compuestos esteroideos, y por lo tanto afectados específicamente en genes que codifican enzimas pertenecientes a la ruta o rutas catabólicas requeridas para su asimilación. Se utilizará como procedimiento básico la mutagénesis con el transposón Tn5.
- 4) Identificación de los puntos de inserción del transposón y secuenciación posterior de las zonas adyacentes. Con ello se pretende establecer la secuencia de cada uno de los genes afectados.
- 5) Identificación y análisis de los distintos marcos abiertos de lectura (ORFs) afectados en cada mutante, así como de aquellos otros localizados en sus inmediaciones. Se trata de conocer las secuencias de las proteínas codificadas por estos genes y las funciones desempeñadas por ellas mediante análisis comparativos con aquellas con las que presenten homología, ya existentes en las bases de datos, y pertenecientes a otros microorganismos.
- 6) Diseño de un boceto representativo de la ruta o rutas metabólicas que conducen a la degradación de los diferentes compuestos esteroideos.

MATERIALES Y MÉTODOS

"Para saber algo, no basta con haberlo aprendido."

Séneca (2 a.C.-65 d.C.).

1. Microorganismos utilizados.

1.1. Género Pseudomonas.

Las bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* (Holt *et al.*, 1994) son bacterias Gram-negativas y se encuentran dentro del grupo de las γ -proteobacterias, las cuales, en función de los estudios de hibridación de rRNA/DNA, se distribuyen en cinco grupos (Palleroni *et al.*, 1973; Palleroni, 1993; Palleroni, 2010). Siguiendo esta clasificación, *Pseudomonas putida* U está incluída en el grupo I de rRNA. El contenido en G+C del cromosoma de esta bacteria es del 60-62%.

Muchos pseudomonádidos son organismos saprófitos y se caracterizan por poseer una gran versatilidad metabólica y fisiológica. Están, además, presentes en numerosos ambientes, como el suelo y los medios acuáticos o se encuentran asociados a organismos hospedadores tales como plantas o animales. Suelen desempeñar un papel muy importante en biodegradación, descomposición, y en los ciclos del carbono y del nitrógeno (Palleroni *et al.*, 1993).

- Pseudomonas putida U.

La cepa de *Pseudomonas putida* U utilizada en el trabajo experimental pertenece a nuestra colección y está depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (C.E.C.T. 4848). Esta bacteria fue originalmente aislada por el profesor R.A. Cooper (*Department of Biochemistry, University of Leicester, Leicester, U. K.*) a partir de aguas residuales urbanas de la ciudad de Urbana, Illinois (Estados Unidos) (Dagley & Gibson, 1964; Dagley & Gibson, 1965).

Características morfológicas.

- Bacilos rectos Gram-negativos con un tamaño que oscila entre 0,5-1,0 x 1,5-5,0 μ m.

- No producen prostecas y no se rodean por vainas.

- Poseen varios flagelos polares.

Características bioquímicas.

- Son quimioorganotróficos. No crecen autotróficamente con hidrógeno.

- No son desnitrificantes.

-Dan reacción de la oxidasa positiva.

-Poseen actividad lipásica. Hidrolizan el Tween 80 y tienen actividad arginina hidrolasa.

-No tienen funcional el ciclo de las pentosas fosfato.

-No forman levanos a partir de sacarosa.

-No acumulan como material de reserva poli- β -hidroxibutirato, pero sí poli-3-hidroxialcanoatos (Kessler & Palleroni, 2000; Ashby *et al.*, 2002).

-No hidrolizan extracelularmente poli- β -hidroxibutirato.

-No hidrolizan la gelatina ni el almidón.

-No hidrolizan la lecitina. Dan reacción de la yema de huevo negativa.

-Degradan el catecol y el ácido protocatéquico, mediante reacciones de apertura en *orto*.

-Utilizan glucosa oxidativamente (Schleissner et al., 1997).

-Utilizan D-fructosa, glucosa, manitol y los ácidos glucónico, sacárico, acético, propiónico, butírico, pentanoico, isopentanoico, hexanoico, heptanoico, octanoico, nonanoico, decanoico, β -hidroxibutírico, succínico, fumárico, cítrico,

α-cetoglutárico, hidroximetilglutárico, L-málico, masónico, láctico, pirúvico, γaminobutírico, δ-aminovalérico, benzoico, *p*-hidroxibenzoico, fenilacético (PhAc), 3-hidroxifenilacético (3-OH-PhAc), 4-hidroxifenilacético (4-OH-PhAc) y ácido quínico. Asimila bien el glicerol y el *n*-butanol, algunas bases tales como sarcosina, putrescina, espermicina y betaína, y los aminoácidos L-alanina, βalanina, L-aspártico, L-glutámico, L-arginina, L-prolina, L-tirosina, D-alanina, L-leucina, L-isoleucina, L-valina, L-histidina, L-fenilalanina y la L-ornitina.

-Utilizan algunas amidas primarias tales como 2-feniletilamina (PhEtNH₂), tiramina, histamina, bencilamina, propilamina, butilamina, pentilamina o hexilamina, y algunos alcoholes primarios como por ejemplo, 2-feniletanol (PhEtOH), alcohol bencílico, etanol, propanol, butanol, pentanol, hexanol, heptanol, octanol, nonanol y decanol.

-No utilizan D-manosa, D-galactosa, D-pseudoheptulosa, D-lactosa, D-maltosa, D-sacarosa, L- y D-arabinosa, D-xilosa, D-ribosa, D-arabinosa, D-fucosa, maltosa, celobiosa, lactosa, trehalosa, sacarosa, galactosa, D- y L-ramnosa, ni el almidón. Tampoco degrada los ácidos adípico, sebácico, pimélico, subérico, citracónico, oxálico, málico, dodecanoico, hexadecanoico, ni pantoténico. No asimila la inulina, el levulinato, los poli- β -hidroxibutiratos, la L-treonina o la L-norleucina, ni otros compuestos tales como el ácido azelaico, el adonitol, sorbitol, eritriol, *meso*-inositol, etilénglicol, isopropanol, ftalato y geraniol.

-Producen pigmentos fluorescentes.

-No producen piocianina, carotenoides ni xantomonadina, pero sí producen pioverdina. No sintetizan clororafina ni monocarboxilato de fenacina.

Condiciones de crecimiento.

- Es un microorganismo que utiliza el O₂ como aceptor final de electrones.

- Su temperatura óptima de crecimiento es 30° C, aunque las bacterias pertenecientes a este género son capaces de crecer en un rango de temperaturas situado entre 4° C y 40° C.

- Es incapaz de crecer en condiciones de acidez (pH 4,5).

- No requiere factores orgánicos de crecimiento.

- Pseudomonas putida KT2440.

Cepa derivada espontáneamente de *Pseudomonas putida* mt-2 (cepa de *P. putida* aislada del suelo por su capacidad de utilizar *m*-tolueno como única fuente de carbono, debido a la presencia del plásmido TOL). El contenido de G+C en el cromosoma de esta bacteria es del 61,6%, valor similar al estimado para otras especies pertenecientes a este mismo género (Bayley *et al.*, 1977).

Es una cepa biológicamente segura, con una gran aplicación en biotransformación, biorremediación y agricultura. Su genoma ha sido secuenciado completamente por "The Institute for Genomic Research" (TIGR) en colaboración con un consorcio alemán (Nelson *et al.*, 2002; Weinel *et al.*, 2002).

P. putida KT2440 posee una elevada homología con *P. putida* U, así como una alta similitud metabólica. Es incapaz de degradar esteroides y no crece en medio mínimo suplementado con ácido 4-OH-PhAc.

- Pseudomonas putida F1.

Cepa aislada de un arroyo contaminado en Urbana, Illinois, y caracterizada por ser capaz de crecer en presencia de hidrocarburos aromáticos tales como benceno, tolueno y etilbenceno como únicas fuentes de carbono. El contenido de G+C en el cromosoma de esta bacteria es de 61,9%, valor similar al estimado para otras especies dentro de este mismo género (Wackett & Gibson, 1988).

Presenta una alta utilidad en el campo de la biorremediación. Posee una elevada homología en su secuencia genómica con *Pseudomonas putida* KT2440, aunque esta cepa no tiene la capacidad de crecer en medios de composición definida cuya única fuente de carbono sea el PhAc o algún derivado hidroxilado del mismo.

Por su incapacidad para utilizar compuestos esteroídicos como fuente de carbono, se la ha utilizado en este trabajo para comparar su perfil metabólico con el de cepas Gram-negativas que si presentan una alta capacidad para utilizar dichos compuestos como fuente de energía.

- Pseudomonas putida DOC21.

Cepa bacteriana aislada y caracterizada en esta Tesis Doctoral. Sus características se reseñan en el apartado de Resultados.

- Pseudomonas putida DOC19.

Cepa bacteriana aislada y caracterizada en esta Tesis Doctoral. Sus características y exigencias metabólicas, al igual que en el caso anterior, se reseñan en el apartado de Resultados.

1.2. Cepas COL.

Cepas pertenecientes a diferentes géneros bacterianos que han sido aisladas y caracterizadas en la presente Tesis Doctoral (ver resultados).

1.3. Cepas de *Escherichia coli* utilizadas en esta Tesis Doctoral.

- Escherichia coli HB101.

Genotipo: F⁻, *thi-1*, *hsd*S20, *rec*A13, *ara-14*, *leu*B6, *pro*A2, *lac*Y1, *gal*K2, *rps*L20, *sup*E44, *xyl-5*, *mtl-1* (Boyer & Roulland-Dussoix, 1969).

Esta cepa posee un vector suicida, pGS9 que incluye al transposón Tn5. Por lo tanto, se utilizó como cepa donadora en los experimentos de mutagénesis realizados con

este transposón. Dichos experimentos consistían en una conjugación biparental entre esta cepa y la cepa de *Pseudomonas putida* DOC21.

- Escherichia coli DH5a' y Escherichia coli DH10B.

Genotipo de *E.coli* DH5 α [']: F['], *end*A1, *hsd*R17 (rk, m-k), *sup*E44, *thi*-1, λ -, *rec*A1, *gyr*A96, *rel*A1, φ 80*dlac*ZIM15, Δ (*lac*ZYA-*arg*F), *deo*R (Hanahan, 1983).

Genotipo de *E.coli* DH10B: F['], *ara*D139, Δ (*ara, leu*) 7697, Δ *lac*X74, *gal*U, *gal*K, *rps*L, *deo*R, Φ 80d*lac*ZIM15, *end*A1, *nup*G, *rec*A1, *mcr*A, Δ (*mrr hsd*RMS *mcr*BC) (Invitrogen, Carlsbad, CA) (Grant *et al.*, 1990).

Estas cepas se utilizaron para los experimentos rutinarios de transformación y amplificación de DNA plasmídico. Permiten la obtención de células competentes con alta eficiencia de transformación (hasta 1×10^8 transformantes/µg de DNA). Además, poseen una deleción en el gen *lacZ*, lo que hace que sea candidatos idóneos para seleccionar plásmidos capaces de originar α-complementación (por ejemplo, los de la serie pUC). Ambas cepas se mantenían en medio LB sólido a 37 °C.

- Escherichia coli HB101 pRK600 (Helper).

Genotipo: F⁻, *thi-1*, *hsd*S20, *rec*A13, *ara-14*, *leu*B6, *pro*A2, *lac*Y1, *gal*K2, *rps*L20, *sup*E44, *xyl-5*, *mtl-1* (Boyer & Roulland-Dussoix, 1969).

Esta cepa, de aquí en adelante nombrada como cepa Helper, tiene en su interior el plásmido prK600 y por ello se utilizó para llevar a cabo eventos de conjugación entre cepas poseedoras de plásmidos deficientes en la función *tra*. De esta manera se consiguió movilizar dichos plásmidos desde la cepa donadora hasta la cepa aceptora.

- Escherichia coli CC118 λpir.

Genotipo: F⁻ Δ (*ara-leu*), *ara*D, Δ *lac*X74, *gal*E, *gal*K, *pho*A20, *thi*-I, *rps*-1, *rpo*B, *arg*E(Amp), *rec*A1, *thi pro hsd*RM⁺, RP4-2-Tc.

Esta cepa es $\Delta lacZ$, es decir, no sólo le falta el péptido α de la β -galactosidasa, sino que presenta una deleción en todo el gen *lacZ*, por lo que permite la selección blanco/azul al clonar un promotor en fase con el gen *lacZ* presente en un plásmido utilizado para identificar promotores. Presenta como marcador de selección un gen de resistencia a rifampicina y tiene, además, varias auxotrofías (leucina, arginina y tiamina), por lo que es necesario añadir aminoácidos cuando se cultiva en medios químicamente definidos.

Esta cepa de *E. coli* presenta el gen *pir* en un episoma. Este gen, codifica la proteína π , lo que permite que los plásmidos con origen de replicación *ori*R6K, o sus derivados, puedan replicarse (Herrero *et al.*, 1990).

- Escherichia coli S17-1 λpir.

Genotipo: F⁻ TpR SmR, *rec*A1, *thi pro hsd*RM⁺, RP4-2-Tc.

Esta cepa, expresa el gen *pir* a partir de una copia lisógena del fago λpir , y está diseñada para la propagación de plásmidos con el origen de replicación R6K, como los vectores pUTmini-Tn5. Además, tiene integradas en el cromosoma funciones RP4 de transferencia por conjugación, lo que permite la transferencia directa de los plásmidos a la cepa receptora sin necesidad de llevar a cabo un acoplamiento triparental mediado por el plásmido pRK600 introducido en una *E. coli* (Marsch-Moreno *et al.*, 1998).

- Escherichia coli DH10B Tn5 Km 12.

Cepa de *E. coli* DH10B a la que se le ha introducido mediante tansformación el plásmido pSG9 (portador del transposón Tn5 y que previamente ha sido extraído de *E. coli* HB101). Esta construcción se realizó para optimizar el proceso de conjugación con la cepa *P. putida* DOC21 con el fin de obtener mutantes incapaces de metabolizar el

ácido desoxicólico, ya que intentos previos entre las cepas DOC21 y *E. coli* HB101 (conjugación biparental) no dieron el rendimiento deseado (poca o ninguna obtención de colonias transconjugantes). De esta manera se realiza una conjugación triparental en la que, además de ambas cepas, participa como cepa intermediaria una cepa de *E. coli* que contiene el plásmido auxiliar pRK600. Esta cepa facilita la transición del pSG9 desde la donadora a la aceptora (DOC21).

2. Vectores.

- pGS9.

Plásmido suicida en *Pseudomonas* que actúa como donador del transposón Tn5. Este plásmido tiene un tamaño de 30,2 kb y posee el replicón p15A y el sistema de conjugación bacteriana N-*tra*. Posee como marcadores genéticos un gen de resistencia a cloranfenicol y otro de resistencia a kanamicina codificados en el genoma correspondiente al transposón Tn5, lo que le permite la rápida selección de las cepas que han incorporado dicho transposón (Selvaraj & Iyer, 1983).

- pUC18 y pUC19.

Son vectores plasmídicos de clonación que se mantienen en el hospedador en un elevado número de copias. Su tamaño es de 2,8 kb. Los plásmidos de esta serie contienen el replicón pMB1 y el origen de replicación ColEI de pBR322 para *E. coli*. Como marcadores genéticos de selección poseen un gen de resistencia a ampicilina y el péptido α de la proteína LacZ. Los números 18 y 19 hacen referencia a la orientación del *polylinker*, o el sitio múltiple de clonación, con respecto al extremo 5' del gen *lacZ*. La clonación de cualquier fragmento de DNA en este plásmido hará que el gen de la β -galactosidasa no se exprese, lo que permite una fácil y rápida identificación de aquellas colonias que posean el vector con el inserto mediante selección blanco/azul al ser cultivadas en medios a los que previamente se ha suplementado X-gal (Norrander *et al.*, 1983; Yanisch-Perron *et al.*, 1985).

- pGEM[®]-T Easy.

Plásmido comercial distribuido por Promega Co. (U.S.A.) que se mantiene en el hospedador en número elevado de copias. Su tamaño es de 3 kb y se utiliza rutinariamente para la clonación directa de los productos obtenidos mediante amplificación, por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando Taq polimerasa como DNA polimerasa termoestable. Los productos obtenidos por PCR con dicha polimerasa, poseen en sus extremos restos de adenina, mientras que el pGEM[®]-T Easy es un plámido abierto que presenta restos de timina en sus extremos 3'. Este plásmido presenta el origen de replicación ColE1 de pBR322 para *E. coli* y posee los promotores T7 y SP6 de la RNA polimerasa flanqueando el *polylinker*, que se encuentra situado dentro de la región que codifica el péptido α de la β -galactosidasa. La clonación de cualquier fragmento de DNA (obtenido por PCR) en este plásmido, hará que el gen de la β -galactosidasa no se exprese, y por lo tanto, será posible la identificación de las colonias que posean el vector con el inserto mediante simple selección blanco/azul tal y como ha sido indicado en el caso anterior.

- pTZ57R/T.

Plásmido comercial distribuido por Fermentas (Canadá), que se mantiene en el hospedador en alto número de copias. Su tamaño es de 2.886 pb y es, básicamente, igual que el pGEM[®]-T Easy. Al igual que este posee el promotor T7 y también permite la selección blanco/azul de las colonias poseedoras del vector con el inserto clonado.

- pRK600.

Plásmido auxiliar utilizado en algunos sistemas de conjugación para movilizar plásmidos mob^+ defectivos en la función *tra* (por ejemplo, el plásmido pK18::*mob* o pJQ200KS). Presenta, además, el origen de replicación ColE1 de pBR322 para *E. coli* (Herrero *et al.*, 1990).

- pJQ200 (KS/SK).

Plásmido de alto número de copias, con un tamaño de 5,4 kb, que posee el origen de replicación P15A, el cual no es reconocido por gran parte de las bacterias Gram-negativas entre las que se incluyen, las bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas*. Presenta como marcadores de selección un gen de resistencia a gentamicina, y el sistema lacZα que permite la selección blanco/azul. Además, este plásmido es movilizable e incorpora el gen *sacB* de *Bacillus subtilis*, que es inducible por sacarosa y cuya expresión resulta letal en bacterias Gram-negativas. La nomenclatura KS/SK indica la orientación del sitio *polylinker*, orientado 5'-*ApaI...SstXI* -3' con respecto al extremo 5' del gen *lacZ*, y 5'- *SstXI...ApaI* -3', respectivamente. Este plásmido se utiliza para obtener mutantes de *Pseudomonas* mediante deleción específica de un gen o un grupo de genes (Quandt & Hynes, 1993).

- pBBR1MCS-3.

Plásmido de bajo número de copias que posee un tamaño de 5,2 kb y un amplio rango de hospedador. Presenta el origen de replicación *ori*BBrI que le confiere capacidad de replicarse autónomamente en multitud de cepas bacterianas (*E. coli, P. fluorescens* y *P. putida*, entre otras). Este plásmido es movilizable y compatible con los plámidos IncP, IncQ e IncW, así como con los orígenes de replicación ColE1 y P15A. Presenta como marcador genético un gen de resistencia a tetraciclina y permite la selección directa de los recombinantes en *E. coli* mediante interrupción del péptido LacZ α .

El plásmido pBBR1MCS-3 deriva del plásmido pBBR1MCS, el cual se obtuvo por modificación del plámido pBBR1 al que se incorporó un fragmento del plámido pBluescript[®] II KS conteniendo el *polylinker* del mismo. De este modo, la nueva construcción contenía un *polylinker* con 16 sitios únicos de restricción y el gen *lac*Za interrumpido. Debido a que el marcador de selección de cloranfenicol (presente en pBBR1MCS) limitaba su uso en muchos microrganismos Gram-negativos, se generaron cuatro plásmidos derivados del pBBR1MCS con resistencia a cuatro antibióticos diferentes (tetraciclina, gentamicina, ampicilina y kanamicina) (Kovach *et al.*, 1995).

El pBBR1MCS-3, indicado de aquí en adelante como pMC, se utiliza habitualmente para la expresión heteróloga de genes en *trans* en *P. putida* DOC21.

3. Reactivos químicos y bioquímicos.

Todos los productos químicos utilizados han sido adquiridos a alguna de las siguientes casas comerciales: Merck (Alemania); Sigma-Aldrich Co. (U.S.A.); Roche (Alemania); Bethesda Research Laboratories (U.S.A.); Bio-Rad (U.S.A.); Promega Co. (U.S.A.); Difco (U.S.A.); Carlo Erba (Italia); Pharmacia (Suecia); Probus (España); Lancaster (Francia); Panreac (España) y Pronadisa (España).

Para los diferentes experimentos se utilizaron los siguientes compuestos esteroideos: colesterol, ácido desoxicólico, β-sitosterol, estigmasterol, ergosterol, ácido cólico, ácido quenodesoxicólico, ácido litocólico, ácido ursodesoxicólico, ácido deshidrocolánico, ácido 5β-colánico, progesterona, prednisona, 5-pregnen-3β-ol-20-ona, testosterona, 17α -metiltestosterona, β -estradiol, *trans*-deshidroandrosterona, estrona, androstanolona, *trans*-androsterona, 17β-hidroximetil-1,4-androstadien-3-ona y 4androsten-3,17-diona. Todos ellos fueron suministrados por la casa comercial Sigma-Aldrich (U.S.A.-Alemania). También se utilizaron los siguientes compuestos: ácido acético, ácido propiónico, ácido octanoico, ácido nonanoico, ácido decanoico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido málico, ácido cítrico, ácido glucónico, ácido fenilacético, ácido 3-OH-fenilacético, ácido 4-OH-fenilacético, ácido benzoico, ácido 2-OH-benzoico, ácido 3-OH-benzoico, ácido 4-OH-benzoico, ácido 3-fenilpropiónico, ácido 3-OH-fenilpropiónico, ácido 4-OH-fenilpropiónico, ácido 3-OH-cinámico, ácido 4-OH-cinámico, ácido fenoxiacético, ácido ciclohexilacético, ácido adípico, ácido pimélico, ácido subérico, lactosa, sacarosa, maltosa, D-glucosa, D-fructosa, D-sorbitol, D-xilosa, D-glucurónico, D-sorbosa, D-manitol, L-arabinosa, L-fucosa, glicerol, feniletilamina, tiramina, histamina, L-isoleucina, L-fenilalanina, L-tirosina, L-valina, Lmetionina, L-histidina. Todos ellos han sido suministrados por las casas comerciales Sigma-Aldrich (U.S.A./Alemania) y Panreac (España).

Además, para conseguir la completa disolución del colesterol y poder añadirlo al medio de cultivo, se utilizaron ciclodextrinas de la casa comercial Cyclodextrin Technologies Development Inc. (Medios de cultivo -Apdo. 4.11-).

Los reactivos utilizados en los experimentos de Biología Molecular procedían de diferentes casas comerciales. Entre ellas caben citarse: Roche (Alemania), Agilent Technologies (U.S.A.), GE Healthcare (Gran Bretaña) y Takara (Japón). También se emplearon: DNA polimerasa termoestable de *Thermus thermophilus* de Biotools (España), *Pfu* DNA polimerasa de *Pyrococcus furiosus* de Promega (U.S.A.), FideliTaqTM DNA polimerasa de GE Healthcare (Gran Bretaña), DNA ligasa del fago T4 y fosfatasa alcalina de gamba de GE Healthcare (Gran Bretaña), así como las enzimas

de restricción empleadas en los diferentes experimentos (Takara). Los marcadores de peso molecular, *1kb DNA ladder plus*[®], fueron suministrados por la casa comercial Gibco Invitrogen Corporation (Gran Bretaña).

Los oligonucleótidos empleados para la amplificación y secuenciación de los genes objeto de estudio fueron sintetizados por las casas comerciales Biomers (Alemania) y Roche (Alemania).

Los diferentes *kits* comerciales utilizados para la extracción de DNA plasmídico y cromosómico, para la limpieza de las reacciones enzimáticas o productos de PCR, así como los empleados para la recuperación de DNA de geles de agarosa, fueron adquiridos en las casas comerciales GE Healthcare (Gran Bretaña), Qiagen (Alemania) y Promega (U.S.A.).

La manipulación del DNA fue realizada de acuerdo a procedimientos estandarizados (Sambrook *et al.*, 1989) o bien siguiendo las indicaciones proporcionadas por las casas comerciales.

Las tiras de API 20NE empleadas para la determinación de algunas de las características fenotípicas de las cepas aisladas se adquirieron en la casa comercial BioMerieux Vitek (Francia).

4. Medios de cultivo.

4.1. Medio Luria Bertani (LB).

Medio Luria Bertani (LB)	
Bacto-triptona	10 g/L
Extracto de levadura	5 g/L
NaCl	10 g/L

Añadir agua destilada hasta 1L y, posteriormente, ajustar el pH a 7 con KOH. Para preparar medio sólido LB se añadió agar al 2% (p/v) (Miller, 1972).

4.2. Medio TSB (Trypticase Soy Broth).

Medio TSB	
Digerido pancreático de caseína	17 g/L
Digerido papaínico de soja	3 g/L
NaCl	5 g/L
Fosfato dipotásico	2,5 g/L
Glucosa monohidrato	2,5 g/L

Disolver 30 g en 1L de agua destilada y, posteriormente, ajustar el pH a 7 con KOH (Sambrook *et al.*, 1989).

4.3. Medio TSA (Trypticase Soy Agar).

Medio TSA	
Digerido pancreático de caseína	15 g/L
Digerido papaínico de soja	5 g/L
NaCl	5 g/L
Agar bacteriológico	15 g/L

Disolver 40 g en 1L de agua destilada y, posteriormente, ajustar el pH a 7 con KOH (Sambrook *et al.*, 1989).

4.4. Medio Φ.

Utilizado como medio de cultivo para la *E. coli* DH10B durante el proceso de obtención de células competentes.

Medio Φ	
Bacto-triptona	20 g/L
Extracto de levadura	5 g/L
KC1	7,5 g/L
MgSO ₄	4 g/L

Añadir agua destilada hasta 1L y, posteriormente, ajustar el pH a 7 con KOH.

4.6. Medio SOC.

El medio SOC se prepara añadiendo glucosa 20 mM al medio SOB, previamente preparado y esterilizado, antes de utilizar (Hanahan, 1983).

Medio SOB	
Bacto-triptona	20 g/L
Extracto de levadura	5 g/L
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgSO ₄	10 mM
MgCl ₂	10 mM

Añadir agua destilada hasta 1L y, posteriormente, ajustar el pH a 7 con KOH.

4.7. Medio Nutrient Broth (NB).

Medio NB		
Polipeptona	5 g/l	
Extracto de levadura	2 g/l	
NaCl	2 g/l	
Extracto de carne	3 g/l	

Añadir agua destilada hasta 1L y, posteriormente, ajustar el pH a 7 con KOH.

4.8. Medio mínimo (MM) de Pseudomonas.

Medio mínimo (MM) de Pseudomonas	
KH_2PO_4	13,6 g/L
$(NH_4)_2SO_4$	2,0 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,25 g/L
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 mg/L

Añadir agua destilada hasta 1L y, posteriormente, ajustar el pH a 7 con KOH. Para la preparación de medio sólido se añadió agar noble al 2% (p/v) (Martínez-Blanco *et al.*, 1990).

4.9. Medio mínimo M9.

Medio mínimo M9	
NaH ₂ PO ₄	60 g/L
K ₂ HPO ₄	30 g/L
NH ₄ Cl	10 g/L
NaCl	5 mg/L
MgSO ₄	0,52 g/L
Solución A9 modificada	2,5 mL

Solución A9 modificada	
HBO ₃	300 mg/L
$ZnCl_2$	50 mg/L
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	30 mg/L
$CoCl_2$	200 mg/L
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	10 mg/L
NiCl ₂ ·6H ₂ O	20 mg/L
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	30 mg/L

Las cantidades indicadas para la solución A9 modificada son requeridas para un volumen final de 1L. El pH de las distintas soluciones utilizadas para preparar el medio mínimo M9 se ajustó a 7 con KOH. Para la preparación de medio sólido se añadió agar noble a una concentración final de 2,25% (p/v) (Sambrook *et al.*, 1989). En función del experimento realizado, se añadieron al medio las fuentes de carbono requeridas.

4.10. Medios King A y King B para *Pseudomonas*.

Medios de cultivo diseñados para diferenciar cepas pertenecientes al género *Pseudomonas*, en función de su capacidad para producir diferentes pigmentos. El medio King A estimula la producción de piocianina y piorrubina, y el medio King B estimula la producción de fluoresceína. Estos medios King A y King B, también se denominan *Pseudomonas* agar P y *Pseudomonas* agar F respectivamente (King *et al.*, 1954).

King A	
Peptona de gelatin	20 g/L
Sulfato de potasio	10 g/L
Cloruro de magnesio	1,4 g/L
Agar	13,6 g/L

King B	
Peptona de carne	20 g/L
Sulfato de magnesio	1,5 g/L
Fosfato de dipotasio	1,5 g/L
Agar	14 g/L

Dichas cantidades son las necesarias para preparar un litro de medio. En ambos casos se resuspenden las cantidades indicadas en 990 mL de agua destilada. Se añaden 10 mL de glicerol absoluto y se calienta el medio agitándolo con frecuencia hasta llegar a ebullición durante 1 minuto. Se ajusta el medio a pH 7 y se esteriliza a 121 °C durante 15 minutos.

4.11. Procedimiento para hacer placas de colesterol.

Para hacer placas medio mínimo suplementado con colesterol como única fuente de carbono, se diseñó un procedimiento diferente al seguido para hacer placas con otras fuentes de carbono, ya que el colesterol es muy hidrofóbico y no se disolvía en agua mediante agitación. Este procedimiento consistía en emplear ciclodextrinas (oligosacáridos cíclicos que se forman en algunos procesos de degradación del almidón), que aumentan la solubilidad del colesterol en agua ya que presentan un exterior hidrofílico y una cavidad interior hidrofóbica donde pueden acoger moléculas orgánicas no polares. El proceso llevado a cabo fue el siguiente:

- Se pesó en una balanza de precisión 1 g de ciclodextrinas y se introdujeron en un tubo estéril de propileno tipo Falcon. A continuación se añadieron a dicho tubo 11 mL de buffer fosfato pH 7 y se mezcló bien en el vórtex.

- Se pesaron 100 mg de colesterol y se añadieron a otro tubo Falcon que contenía previamente una solución isopropanol/cloroformo (2:1 v/v). Esta mezcla se agitó en el vórtex hasta su completa disolución.

- A continuación, se calentó el tubo con la disolución de ciclodextrinas en buffer fosfato y se añadió poco a poco (unos 150 μ L cada vez) la disolución de colesterol en isopropanol/cloroformo, agitando continuamente y alternando calentamiento en el microondas con ruptura de las estructuras escamosas originadas, mediante pulsos sónicos en el sonicador. Antes de añadir más disolución de colesterol se esperó a que se disolviera la mezcla anterior, ya que a medida que se añadía más colesterol la mezcla se enturbiaba más.

- Una vez que ambas disoluciones están mezcladas y dicha mezcla más o menos disuelta se esteriliza en el autoclave. Después del proceso de esterilización el aspecto del colesterol en solución es escamoso y en grumos; no obstante esto se solucionó calentando la solución en el microondas hasta que comenzó a hervir y posteriormente se sonicó hasta obtener una suspensión homogénea.

$$M = \frac{0.1g/386.66_{g/mol}}{0,0005 L} = 0.5157$$

$$C_{i} \cdot V_{i} = C_{f} \cdot V_{f}$$

$$0.5172 \text{ M} \cdot 0.5 \text{ mL} = C_{f} \cdot 11.5 \text{ mL}$$

$$C_{f} = 0.02248 \text{ M} \longrightarrow 22.48 \text{ mM}$$

$$22.48 \text{ mM} \cdot V_{i} = 2 \text{ mM} \cdot 200 \text{ mL}$$

$$V_{i} = 17.79 \text{ mL} \sim 17.8 \text{ mL} \text{ (en 200 mL de medio)}$$

5. Aditivos suplementados a los medios de cultivo.

Para la realización de ciertos experimentos, fue preciso añadir determinados antibióticos, aminoácidos y vitaminas a los medios de cultivo. En esos casos, se siguieron normalmente las recomendaciones de Sambrook *et al.* (Sambrook *et al.*, 1989).

Los antibióticos utilizados fueron: ampicilina (Amp, 100 μ g/mL); kanamicina (Km, 25 μ g/mL en medio sólido y 12,5 μ g/mL en medio líquido); rifampicina (Rf, 20 μ g/mL en medio sólido y 5 μ g/mL en medio líquido); cloranfenicol (Cm, 30 μ g/mL), tetraciclina (Tc, 37,5 μ g/mL) y/o gentamicina (Gtm, 30 μ g/mL).

Para la inducción de los sistemas basados en promotores del tipo *lac*I que reconocen la lactosa como inductor, se utilizó un análogo no metabolizable del inductor natural, el isopropil- β -D-tiogalactopiranósido (IPTG). Por cada mL de medio se añadieron 0,7 µL de una solución 100 mM. La concentración final de IPTG en el medio de cultivo fue de 70 µM.

Cuando se utilizaron vectores en los que la presencia del péptido α de la proteína LacZ permitía una selección blanco/azul, se añadió a los medios de cultivo 5-bromo-4cloro-3-indolil- β -D-galactopiranósido (X-Gal) a razón de 1,7 μ L por mL de medio, empleando para ello una disolución de 20 mg de X-Gal/mL disuelto en dimetilformamida. La concentración final en el medio de cultivo fue de 34 µg/mL.

6. Aislamiento de bacterias con capacidad de degradar compuestos esteroideos.

Se recogieron diferentes muestras de tierra provenientes de distintos lugares de la provincia de León (España). Con ellas se prepararon suspensiones que contenían 1 gramo de la muestra de tierra en 1 litro de agua estéril. Posteriormente, se tomaron 2 mL de cada suspensión y se inocularon matraces de 500 mL de capacidad que contenían 100 mL de medio mínimo (MM) suplementados con colesterol (concentración final de 2 mM), o bien con ácido desoxicólico (concentración final de 4 mM), como únicas fuentes de carbono. Los matraces se incubaron a 30 °C durante diferentes tiempos (entre uno y varios días) para comprobar si existían diferencias de crecimiento según el tipo de microorganismo en desarrollo. Posteriormente, se tomaron alícuotas, se diluyeron, y se sembraron en placas de Petri con MM suplementado bien con colesterol 2 mM o bien con ácido desoxicólico 5 mM y agar (2,5% p/v). Las placas se incubaron a 30 °C durante 72 h, después de lo cual, se podían observar diferentes colonias aisladas. Dichas colonias se sembraron de nuevo en otras placas de Petri con idéntico medio. Este proceso, fue repetido tres veces, con el objetivo d de asegurar la homogeneidad y pureza de las cepas aisladas (Resultados y Discusión, Fig. 29).

7. Mantenimiento y crecimiento de los microorganismos.

Las cepas bacterianas se conservaron en placas de Petri selladas con Parafilm^{III} a 4 °C durante un mes como máximo, o bien en viales con glicerol al 50% (p/v) almacenados a -80 °C, una vez las bacterias aisladas habían sido resuspendidas en 2 mL de LB estéril. Estos cultivos *stock* contienen glicerol, con el fin de proteger la membrana celular bacteriana de los cristales originados durante la congelación.

Todos los aislados bacterianos fueron conservados según su requerimiento específico. De esta forma, las cepas COL fueron conservadas en medio mínimo sólido suplementado con colesterol 2 mM y las cepas DOC21 y DOC19 con ácido desoxicólico 5 mM como única fuente de carbono. Por otra parte, las cepas de *E. coli* se mantuvieron en placas con medio LB (Sambrook *et al.*, 1989).

Para la realización de los cultivos en medio líquido y la elaboración de curvas de crecimiento, se partió de placas de medio sólido sembradas e incubadas en las condiciones anteriormente descritas, a partir de los cuales se procedió a inocular las diferentes cepas a estudiar, en los diferentes medios líquidos. Las células que habían crecido durante 8 horas a 30 °C en medio sólido, se resuspendieron en agua destilada estéril, ajustando la absorbancia a un valor absoluto de 1 (0,1 en una dilución 1/10), medido en un espectrofotómetro Beckman DU 640, a una longitud de onda de 540 nm. A cada matraz que contenía el medio deseado (1/5 del volumen del matraz) se le añadió el volumen necesario de esta suspensión bacteriana para que la densidad óptica a 540 nm inicial del cultivo fuera 0,05. Los matraces se incubaron en un incubador orbital (250 rpm) a 30 °C durante el tiempo requerido para cada experimento. La determinación de la cinética del crecimiento bacteriano se llevó a cabo midiendo periódicamente la absorbancia de la suspensión celular a 540 nm (Abs_{540nm}).

Las fuentes de carbono utilizadas en los diferentes experimentos con cada una de las cepas bacterianas aislada mediante el protocolo anteriormente descrito, así como su concentración fueron:

- Una concentración de 15 mM cuando la fuente de carbono era ácido acético.
- Una concentración de 10 mM cuando se utilizaron los siguientes ácidos • orgánicos: ácido propiónico, ácido octanoico, ácido nonanoico, ácido decanoico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido málico, ácido cítrico, ácido glucónico, ácido fenilacético, ácido 3-OH-PhAc, ácido 4-OH-PhAc, ácido benzoico, ácido 2-OH benzoico, ácido 3-OH benzoico, ácido 4-OH benzoico, ácido 3fenilpropiónico, ácido 3-OH fenilpropiónico, ácido 4-OH fenilpropiónico, ácido cinámico, ácido 4-OH cinámico, ácido fenoxiacético, 3-OH ácido ciclohexilacético, ácido adípico, ácido pimélico, ácido subérico. Asimismo se empleó la misma concentración cuando se utilizaron los siguientes azúcares: lactosa, sacarosa, maltosa, D-glucosa, D-fructosa, D-sorbitol, D-xilosa, Dglucuránico, D-sorbosa, D-manitol, L-arabinosa y L-fucosa. Idénticas concentraciones fueron utilizadas con el glicerol, la feniletilamina, la tiramina, la histamina y los siguientes aminoácidos: L-isoleucina, L-fenilalanina, Ltirosina, L-valina, L-metionina, L-histidina.

• La concentración empleada para los compuestos esteroideos: ácido desoxicólico, β -sitosterol, stigmasterol, ergosterol, ácido cólico, ácido quenodesoxicólico, ácido litocólico, ácido ursodesoxicólico, ácido deshidrocolánico, ácido 5 β colánico, progesterona, prednisona, 5-pregnen-3 β -ol-20-ona, testosterona, 17 α metiltestosterona, β -estradiol, *trans*-deshidroandrosterona, estrona, androstanolona, *trans*-androsterona, 17 β -hidroximetil-1,4-androstadien-3-ona y 4-androsten-3,17-diona, fue de 5 mM, excepto en el caso del colesterol, en cuyo caso la concentración final fue de 2 mM.

8. Caracterización morfológica, fisiológica y bioquímica de las diferentes cepas en estudio.

8.1. Tinción de Gram.

La primera aproximación para la clasificación taxonómica de las diferentes cepas aisladas, consistió en realizar una tinción de Gram a todas ellas. Con esto se pudo clasificar a las cepas bacterianas como Gram-positivas o Gram-negativas.

8.2. Análisis morfológico.

La morfología de las colonias crecidas en medio TSB durante 48 h a 30 °C, fue estudiada mediante la observación de dichas colonias en una lupa estereoscópica.

La morfología celular se observó mediante microscopía electrónica. Estos estudios fueron realizados con bacterias crecidas en medio TSB, a pH 7,2 recolectados antes de comenzar la fase estacionaria de crecimiento.

8.2.1. Análisis ultraestructural mediante microscopía electrónica.

8.2.1.1. Microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Una vez recogidas las células del cultivo mediante centrifugación a 7.000 rpm durante 7 minutos, se eliminó el sobrenadante y se fijaron las muestras en una solución de glutaraldehído al 2% en tampón PBS 0,1 M durante 2 horas a 4 °C. Después, se lavaron las muestras tres veces consecutivas en PBS 0,1 M, recogiendo las células tras cada etapa por centrifugación a 4.000 rpm durante 10 minutos. Posteriormente, se aplicó una postfijación con tetraóxido de osmio (OsO₄) 1% en PBS (proporción 1:1) durante 2 horas en oscuridad y a temperatura ambiente. A continuación, se repitieron tres nuevos lavados con tampón PBS 0,1M.

El precipitado de esta última centrifugación se embebió con agar al 2% en PBS, con el fin de poder continuar con el procesamiento de las muestras sin recurrir a centrifugaciones adicionales. Una vez solidificado el agar, las muestras se cortaron en cubos de 2 mm y se sometieron a deshidratación siguiendo una serie secuencial creciente de soluciones de etanol (desde 30% hasta 100%). A continuación, se realizaron tres lavados de las muestras, en óxido de propileno (una hora cada uno).

El proceso de inclusión se llevó a cabo con una resina tipo epoxi (EPON 812), con la que se obtuvieron una colección de bloques para cada muestra. La elección de esta resina se debe a la uniformidad de su polimerización y a las escasas variaciones de volumen que presenta durante su procesado, lo que le confiere a la muestra una alta estabilidad frente al haz de electrones. Para ello, primero se realizó una infiltración de óxido de propileno-resina, en una proporción 1:1, durante 12-24 horas a temperatura ambiente. Pasado el tiempo, se llevó a cabo otra infiltración, esta vez en resina pura 12-24 horas. Por último, se encapsuló en resina pura y se polimerizó a 60 °C durante 24 horas.

Mediante un ultramicrotomo LKB V se obtuvieron cortes semifinos de 1 μ m, que se tiñeron sobre un portaobjetos con una solución de azul de toluidina al 1% y cortes ultrafinos de 80-100 nm de grosor. Estos cortes se recogieron sobre rejillas de cobre de 75 mallas y 3 mm de diámetro y se contrastaron siguiendo el método de la doble tinción con acetato de uranilo al 2% (20 minutos) y citrato de plomo (3 minutos). Las rejillas se examinaron en un microscopio electrónico de transmisión JEOL 1010.

8.2.1.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM).

La fijación y posteriores lavados se llevaron a cabo de idéntica forma al descrito en el anterior apartado para la TEM. Posteriormente, se adhirieron las células sobre la superficie de filtro "Millipore" de 0,22 nm de diámetro de poro. Este proceso se realizó filtrando la suspensión bacteriana con ayuda de una jeringa de modo que las bacterias quedasen adheridas al filtro. Una vez completado el proceso de filtrado, el filtro se retiró inmediatamente para evitar su desecación y se colocó en una placa Petri con tampón PBS 0,1M.

A continuación, se deshidrató la extensión bacteriana en un gradiente creciente de etanol (30-100%), se realizaron tres pasos en isoamilacetato y se procesó la muestra en un desecador de punto crítico Blazers CPD10.

Una vez desecada la extensión bacteriana, se troceó el filtro y las fracciones resultantes se colocaron sobre los portamuestras metálicos del microscopio electrónico de barrido empleando una cinta de carbono conductora. Sobre este sistema se realizó el recubrimiento metálico o *"sputtering"* de las muestras mediante un *"sputter coater"* Blazers SCD 004 y se observaron en un microscopio electrónico de barrido JEOL SSM-6100.

8.3. Análisis fisiológico y bioquímico.

Algunas de las características bioquímicas de las diferentes cepas bacterianas aisladas se determinaron utilizando las tiras API 20NE siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

Los ensayos bioquímicos y fisiológicos requeridos para la identificación bacteriana se llevaron a cabo según los procedimientos descritos en el *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt *et al.*, 1994). La tolerancia a la temperatura (4 °C, 10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 37 °C, 41 °C y 45 °C) fue determinada midiendo el incremento de la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm de los cultivos crecidos en medio TSB durante al menos 7 días. El rango de valores de pH soportados por las distintas cepas se determinó en medio TSB, variando el rango de pH de dicho medio (valores comprendidos entre 4 y 11). La tolerancia a la salinidad se comprobó en medio NB suplementado con diferentes concentraciones de NaCl (0, 2, 4, 6, 8 y 10% p/v).

Los estudios metabólicos se complementaron mediante el cultivo de las diferentes cepas en medio mínimo suplementado con diferentes fuentes de carbono. Se utilizaron las concentraciones indicadas anteriormente.

Además, se utilizaron los medios King A y King B para determinar la producción de piocianina, pioverdina y/o fluoresceína en las cepas de *Pseudomonas* (King *et al.*, 1954).

9. Métodos generales para el análisis y/o tratamiento de las muestras de DNA.

Todas las etapas del procesamiento de muestras que contenían DNA se llevaron a cabo utilizando materiales y reactivos estériles, evitándose así la degradación y/o contaminación de las muestras.

9.1. Digestión y modificación del DNA.

9.1.1. Protocolo general para la digestión del DNA con enzimas de restricción.

Las digestiones de fragmentos de DNA con endonucleasas se llevaron a cabo utilizando las soluciones amortiguadoras y las condiciones recomendadas por las diferentes casas comerciales para cada enzima en particular.

Mezcla de reacción:

- 1/10 del volumen total de digestión de tampón de digestión (10x).
- X µg de DNA en H₂O MilliQ o en tampón TE.
- 1-3 unidades de la endonucleasa de restricción/µg de DNA.
- H₂O MilliQ estéril hasta completar el volumen de digestión.

- La mezcla de reacción se incubó a la temperatura adecuada durante 1-2 horas.

9.1.2. Reacciones de las enzimas de modificación del DNA usadas con más frecuencia.

9.1.2.1. Desfosforilación del DNA.

- El DNA (0,5 μ g) se disolvió en 45 μ L del tampón de fosfatasa (1x), se calentó a 65 °C durante 10 minutos para asegurar la completa disolución y la relajación del DNA y se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 3 minutos.

 Se añadieron 5 unidades de fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIAP) o de fosfatasa alcalina de gamba (SAP) y la mezcla de reacción se incubó durante 30-60 minutos a 37 °C.

- En el caso de utilizar SAP, la enzima se inactivó a 65 °C durante 15 minutos; sin embargo, con la CIAP, esta inactivación no tiene efecto. En ambos casos se eliminó la fracción proteica del DNA mediante fenolización, se precipitó a -20 °C con 1/10 de volumen de acetato sódico 3 M, pH 6,5 y con 2,5 volúmenes de etanol frío.

9.1.2.2. Ligación de fragmentos de DNA.

- Se mezclaron cantidades equivalentes a 2 ó 3 veces más del DNA utilizado como inserto que del DNA vector (10-40 ng).

- Se añadió el H₂O MilliQ necesaria para obtener un volumen final de reacción de 10 μ L y la mezcla se calentó a 65 °C durante 15 segundos con el fin de relajar todos los fragmentos de DNA.

- Se añadió 1 μ L de tampón de ligación (10x) y 1 unidad de DNA ligasa del fago T4.

- La mezcla de reacción se incubó a 16 °C durante 12 horas (en los casos en los que se requería, la incubación se llevó a cabo a 4 °C durante 12 horas). La reacción de ligación se transfirió a la cepa de *E. coli* adecuada mediante transformación.

9.2. Determinación de la concentración y pureza del DNA.

Para llevar a cabo la medida de la concentración y la pureza de las muestras de DNA, éstas se diluyeron en agua estéril o en tampón TE entre 100 y 1.000 veces y se midió la absorbancia a las longitudes de onda de 260 y 280 nm, para lo cual, se utilizó un espectrofotómetro Beckman DU 640, o bien un Nanodrop ND-1000 mediante la medición de 1 μ L de DNA. La concentración de la muestra fue determinada considerando que a una longitud de onda de 260 nm, una unidad de absorbancia corresponde a una concentración de 50 μ g/mL (Davis *et al.*, 1986). Una relación entre los valores de absorbancia medidas a 260 y 280 nm próxima a 2 indica un nivel óptimo de pureza de las muestras (Sambrook *et al.*, 1989).

Tampón TE: Tris-HCl 10 mM pH 8 y EDTA 1 mM.

9.3. Análisis de las muestras de DNA mediante electroforesis en geles de agarosa.

El análisis de las muestras de DNA se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa de baja electroosmolaridad. La concentración del gel se estableció en función del tamaño del fragmento de DNA que se pretendía analizar. Generalmente se utilizaron geles al 0,8% que permitían ver fácilmente fragmentos de entre 600 y 3.000 pb.

9.3.1. Preparación de las muestras.

Las muestras se mezclaron con aproximadamente una quinta parte de volumen de tampón de carga antes de proceder a depositarlo en el gel. Como marcadores de tamaño molecular se utilizó el *l kb DNA ladder plus*[®] (Invitrogen) a razón de unos 0,7 μ g por carril.

Tampón carga: azul de bromofenol al 0,25%, azul de xileno al 0,25% y sacarosa al 40%.

9.3.2. Preparación de los geles.

La preparación de los geles se llevó a cabo, fundiendo la cantidad oportuna de agarosa en una solución amortiguadora llamada TAE, y añadiendo aproximadamente 0,5 μ g/mL de bromuro de etidio para visualizar las bandas de DNA mediante un transiluminador de luz ultravioleta.

TAE 50X: Tris base 242 g, ácido acético glacial 57,1 mL, EDTA 0,5 M pH 8 100mL y agua destilada hasta 1 L.

Bromuro de etidio: solución 10 mg/mL en H_2O MilliQ, se conserva protegido de la luz a 4 °C.

9.3.3. Desarrollo de la electroforesis.

La electroforesis se realizó en la solución amortiguadora TAE, aplicando una diferencia de potencial de 100 V durante el tiempo adecuado para obtener una correcta resolución de las bandas de DNA.
9.4. Aislamiento de DNA genómico de las cepas objeto de estudio: DOC y COL.

El protocolo que se siguió fue el siguiente:

- **1.** Se inocularon 50 mL de medio LB líquido, suplementado con el antibiótico correspondiente en cada caso. Este cultivo se incubó toda la noche a 30 °C.
- 2. Las células se recogieron por centrifugación a 4.000 x g durante 10 minutos a 4 °C y el precipitado celular así obtenido se resuspendió en 20 mL de solución GTE. A continuación se añadieron 20 mg de lisozima y se incubó a 37 °C durante 30 minutos.

Solución GTE: Tris-HCl 25mM pH 8, glucosa 50 mM y EDTA 10 mM pH 8.

- **3.** Se añadieron 2 mL de SDS 10% de modo que la solución final fuera del 1%. Esta mezcla se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- Transcurrido este período de tiempo, se añadieron 300 μL de proteinasa K (10 mg/mL), y la mezcla se incubó al menos 30 minutos a 37°C.
- 5. A continuación, se añadieron 550 μ L de NaCl 4 M de modo que la concentración final fuese 0,1 M.
- **6.** El DNA se extrajo finalmente con un volumen de fenol neutro dos veces. Posteriormente, las muestras se extrajeron con un volumen de fenolcloroformo-alcohol isoamílico, otras dos veces, y por último, con un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico, conservando la fase acuosa en cada paso.

En cada uno de los pasos descritos en este punto, se voltea suavemente el tubo donde se halla el DNA en fase acuosa y el fenol, a fin de que se mezclen bien.

Fenol neutro: antes de utilizar el fenol para extraer las ácidos nucleicos, debe ser equilibrado a pH 7,8, para lo cual, se siguió el siguiente protocolo:

- 1. Fundir el fenol a 68 °C y añadir hidroxiquinoleína a una concentración final de 0,1%.
- 2. Añadir 1 volumen de tampón Tris-HCl 0,5 M pH 8 y mezclar durante 15 minutos. Dejar reposar en un embudo de decantación y cuando las dos fases se hayan separado, eliminar la mayor cantidad posible de tampón.
- 3. Añadir 1 volumen de tampón Tris-HCl 0,1 M pH 8 y proceder como en el paso anterior.
- 4. Añadir 1/10 de volumen de tampón Tris-HCl 0,1 M pH 8 conteniendo 0,2% de β -mercaptoetanol y conservar a 4 °C.

Fenol-cloroformo-alcohol isoamílico: mezcla de fenol (previamente equilibrado con tampón Tris-HCl pH 8) cloroformo y alcohol isoamílico en una proporción de 25:24:1.

Cloroformo-alcohol isoamílico (CIA): mezcla de cloroformo y alcohol isoamílico en una proporción de 24:1.

- 7. Se añadieron lentamente 2,5 volúmenes de etanol frío al 100% (-20 °C) dejándolo resbalar por la pared del tubo. Las dos fases se mezclaron suavemente, hasta que se apreció la aparición de un ovillo de DNA. Este ovillo se recogió con ayuda de una pipeta Pasteur previamente cerrada en su extremo más fino.
- **8.** El DNA se lavó en etanol frío al 70% (-20 °C) para eliminar el exceso de sales y, posteriormente, se dejó secar al aire.
- 9. Una vez seco, el DNA se resuspendió en 5 mL de tampón TE.

TE: Tris-HCl 10 mM pH 8 y EDTA 1 mM.

Para el aislamiento puntual de muestras de DNA, se emplearon *kits* comerciales (GE Healthcare o Quiagen) y se siguieron las instrucciones descritas por el fabricante. La microcentrífuga utilizada para todos los experimentos, era de la casa comercial Eppendorf, modelo 5415D.

9.5. Aislamiento de DNA plasmídico de *E. coli*.

9.5.1. Método de la lisis alcalina.

Este procedimiento se empleó para el aislamiento de plásmidos a gran escala. El método fue esencialmente el descrito por Maniatis (Maniatis *et al.*, 1982):

- **1.** Se inocularon 100 mL de medio LB suplementado con el antibiótico adecuado y se cultivaron la células entre 12 y 15 horas a 37 °C con agitación orbital (250 rpm).
- Las células se recogieron por centrifugación a 5.000 rpm durante 5 minutos y se resuspendieron en 2 mL de GTE. A continuación se añadieron otros 2 mL de GTE con lisozima (10 mg/mL). La mezcla se agitó y se mantuvo a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- **3.** A continuación, se añadieron 8 mL de solución alcalina/SDS recién preparada. Se mezcló agitando suavemente y se mantuvo 10 minutos en hielo.

Disolución alcalina/SDS: NaOH 0,2 N; SDS 1%.

4. Al resultado de la mezcla del paso 3, se le añadieron 6 mL de solución de acetato potásico pH 4,8 previamente enfriada a 4 °C. Se mezclaron vigorosamente y se mantuvieron a 4 °C durante 15 minutos.

Acetato potásico pH 4,8: se mezclan 60 mL de acetato potásico, 11,5 mL de ácido acético glacial y 28,5 mL de agua destilada. La solución resultante es 3 M respecto al potasio, 5 M respecto al acetato y tiene un pH de 4,8.

5. Transcurrido este tiempo, la mezcla se centrifugó durante 10 minutos a 15.000 rpm y 4 °C. El sobrenadante se recuperó y se le añadieron 0,7 volúmenes de isopropanol. La mezcla así obtenida se mantuvo durante 15 minutos a temperatura ambiente.

6. Posteriormente, la mezcla se centrifugó durante 10 minutos a 8.000 rpm a temperatura ambiente. El precipitado resultante se lavó con etanol al 70%, se secó, se resuspendió en 1 mL de buffer TE y se trató con RNAasa (10 μg/mL) a 37 °C durante 1 hora. El DNA se extrajo con fenol neutro, fenol-CIA y CIA y se concentró mediante precipitación con 2,5 volúmenes de etanol.

RNAsa: se disuelve la RNAsa (Sigma Chemical Co. U.S.A.) en tampón Tris-HCl 10 mM pH 7,5 y NaCl 15 mM a 10 mg/mL de concentración. Se calienta a 100 °C durante 15 minutos, se deja enfriar, se reparte en alícuotas y se conserva a -70 °C.

9.5.2. Minipreparaciones (Holmes & Quigley, 1981).

- Se inocularon 10mL de medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente con un palillo estéril con el que se había seleccionado una colonia aislada de la cepa en estudio. Los tubos se incubaron a 37 °C con agitación (250 rpm) durante un mínimo de 8 horas.
- **2.** Las células fueron recogidas por centrifugación a 10.000 rpm durante 2 minutos. El precipitado obtenido se resuspendió en 350 μ L de STET y se añadieron 10 μ L de solución de lisozima (10 mg/mL en agua).

STET: Sacarosa 8%, Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 50 mM y Tritón X-100 0,5%.

- **3.** La mezcla se agitó durante 1 minuto y se hirvió durante 45 segundos. Las proteínas y el DNA cromosómico se precipitaron por centrifugación a 14.000 rpm durante 10 minutos.
- **4.** El precipitado obtenido se eliminó (restos celulares y DNA cromosómico) con un palillo estéril y el resto se precipitó con 1/10 de acetato sódico 3 M pH 5,2 y 1 volumen de isopropanol. Se mezcló y se mantuvo a temperatura ambiente durante 10 minutos.

5. La mezcla anterior se centrifugó a 14.000 rpm durante 5 minutos y el precipitado resultante se lavó con etanol al 70%. El precipitado se secó y se resuspendió en 50 μL de TE. Finalmente, 2μL del DNA plasmídico total obtenido fueron empleados para su análisis por digestión con endonucleasas de restricción.

En muchas ocasiones se utilizaron *kits* comerciales (GE Healthcare o Quiagen) que permiten la purificación de DNA plasmídico de forma sencilla y rápida, tanto a pequeña como a gran escala. En todos esos casos se siguieron las instrucciones descritas por el fabricante.

9.6. Recuperación del DNA desde los geles de agarosa.

El método utilizado fue la extracción mediante congelación y centrifugación a través de lana de vidrio, que es un método muy rápido, sencillo y que proporciona mejores resultados que los sistemas comerciales cuando se manejan fragmentos de DNA de gran tamaño (10-20 kb), aunque el porcentaje de recuperación no supera el 70%. Este método posee como ventaja adicional el hecho de que no es necesario el uso de agarosa de bajo punto de fusión. El protocolo que se siguió fue el siguiente:

- 1. Una vez realizada la electroforesis, se tiñó el gel por el procedimiento habitual, se cortó la banda de interés y se introdujo en un tubo Eppendorf en el que previamente habíamos practicando un orificio en el fondo y taponado con lana de vidrio.
- 2. Se congeló la banda a 14.000 x g durante 10 minutos colocando debajo del tubo Eppendorf perforado, otro normal, de manera que el tampón (con el DNA disuelto) que atravesase la lana de vidrio fuese recogido en este segundo tubo, quedando la agarosa retenida en la lana de vidrio.

 La solución obtenida se limpió con fenol-CIA y CIA y se precipitó el DNA a -20 °C con 1/10 de volumen de acetato sódico 3 M pH 5,2 y 2,5 volúmenes de etanol frío.

Generalmente, se utilizaron *kits* comerciales (GE Healthcare o Quiagen) de extracción de DNA a partir de geles de agarosa. La mayoría de ellos están basados en la purificación del DNA por interacción hidrofóbica con una resina específica que se suministra bien en suspensión o bien empaquetada en minicolumnas. En un paso previo a la purificación, la agarosa que contenía el DNA se disolvía por calentamiento moderado (50-65 °C) en presencia de una solución salina concentrada (p.e. KI 6 M). Estos métodos son más rápidos que la extracción por congelación y proporcionan mayor rendimiento. Sin embargo, cuando se trataba de fragmentos de DNA grandes (10-20 kb) se producía una mayor fragmentación.

9.7. Transformación de E. coli.

Para que las bacterias admitan DNA exógeno mediante el proceso de transformación, han de estar en un estado de receptividad denominado competencia. Se han descrito varios métodos para la obtención de células competentes, alguno de los cuales se detalla a continuación.

9.7.1. Obtención de células competentes de E. coli.

9.7.1.1. Método del cloruro de rubidio.

Este método es el descrito por Hanahan para obtener células competentes de la cepa *E. coli* DH5 α ' y de *E. coli* DH10B. Siguiendo este protocolo se consigue una elevada eficiencia de transformación (hasta 10⁸ transformantes por µg de DNA) (Hanahan, 1983; Hanahan, 1985). El procedimiento utilizado es:

- La cepa de E. coli deseada se cultiva en medio LB sólido durante 12-14 horas.

- Se prepara un preinóculo de la cepa de *E. coli* deseada, sembrando 100 mL de medio Φ líquido con una colonia aislada. El cultivo se incuba a 37 °C en agitación (250

rpm) hasta que alcanza un crecimiento adecuado para proceder al inóculo de dos matraces de 2,5 litros con 500 mL de Φ cada uno. Estos matraces se incuban a 37 °C hasta que el cultivo alcanza una D.O._{600 nm} de 0,4-0,5 medida en un espectrofotómetro Beckman, modelo DU620. Una vez alcanzada esa densidad óptica, el cultivo se enfrió durante 30 minutos en hielo.

- Las células se recogieron sometiéndolas a centrifugación durante 5 minutos a 5.000 x g y 4 °C.

- El sedimento de células resultante se resuspendió en solución TfB1 (1/3 del volumen inicial) y se mantuvieron durante 30 minutos en hielo.

Solución TfB1: RbCl 100 mM, $MnCl_2$ 50 mM, acetato potásico 30 mM, $CaCl_2$ 10 mM y glicerol al 15% (v/v). Ajustar el pH a 5,8 con ácido acético 0,2 M. Esterilizar por filtración.

- La suspensión anterior en TfB1 se centrifugó 5 minutos a 5.000 x g y 4 °C. El sedimento celular se resuspendió en solución TfB2 (1/12,5 del volumen inicial) y se mantuvo en hielo durante 15 minutos.

Solución TfB2: MOPS 10 mM pH 7, RbCl 10 mM, CaCl₂ 75 mM y glicerol al 15% (v/v). Ajustar el pH a 6,8 con NaOH. Esterilizar por filtración.

- Las células competentes resultantes podían ser utilizadas inmediatamente o bien conservarse (convenientemente repartidas en alícuotas de 200 μ L, listas para su uso en el protocolo de transformación por choque térmico) a -80 °C, previa congelación en nitrógeno líquido o en un baño de hielo seco/etanol.

9.7.1.2. Obtención de células electrocompetentes de *E. coli.*

El procedimiento seguido fue el siguiente:

- Se inocularon 100 mL de medio LB con una colonia de *E. coli* y se incubaron a 37 °C en agitación (250 rpm) hasta que el cultivo alcanza un crecimiento adecuado para

proceder al inocular cinco matraces de 500 mL con 100 mL de LB cada uno. Estos matraces se incubaron a 37 °C hasta que el cultivo alcanza una D.O._{600 nm} de 0,6-0,8. Una vez alcanzada esa densidad óptica, el cultivo se enfrió 30 minutos en hielo.

- Las células se recogieron por centrifugación durante 5 minutos a 5.000 x g a 4 °C.

- El sedimento de células resultante se resuspendió en 200 mL de glicerol al 10% (p/v).

- Se centrifugó como en pasos anteriores, y el sedimento de células se resuspendió en 100 mL de glicerol al 10% (p/v). Este paso se repitió otra vez.

- Se centrifugó en idénticas condiciones que las previamente descritas, y el sedimento de células se resuspendió en 2 mL de glicerol al 10% (p/v) y se repartieron en alícuotas de 40 μ L. Las células competentes pueden ser empleadas inmediatamente, o conservarse a -80 °C, previa congelación en nitrógeno líquido o en un baño hielo seco/etanol.

9.7.2. Procedimientos de transformación.

9.7.2.1. Transformación por choque térmico.

Para la transformación de las células competentes de *E. coli* se ha seguido el método descrito por Hanahan (Hanahan, 1983):

- El DNA (en un volumen no superior a 10 μ L) se añadió a 200 μ L de células competentes y se dejó la mezcla en hielo durante 30 minutos.

- A continuación, las células se sometieron a un choque térmico por inmersión en un baño de agua a una temperatura de 37 °C durante 2 minutos. Se enfriaron en hielo 2 minutos y, posteriormente, se añadieron 800 μ L de medio LB fresco.

- Las células se incubaron durante 1 hora con agitación a 37 °C, con el fin de restituir las membranas.

- Por último, se sembraron alícuotas de 200-250 μ L en placas de LB-agar que contenían el antibiótico usado para la selección. Las placas se mantuvieron a 37 °C durante 12 horas o durante el tiempo necesario para observar la aparición de colonias, las cuales, bajo la presión selectiva del correspondiente antibiótico, expresan el

marcador de selección existente en el plásmido que han incorporado. La eficacia de transformación obtenida por este método, fue del orden de 10^6 transformantes/µg de DNA plasmídico.

9.7.2.2. Transformación por electroporación.

Para la electroporación de células competentes de *E. coli*, se siguió el siguiente protocolo:

- El DNA (en un volumen no superior a 2 μ L) se añadió a 40 μ L de células electrocompetentes y la mezcla se puso en una cubeta de electroporación (1 mm, 90 μ L) (Bix Harvard Apparatus N° de modelo 610).

- A continuación, la cubeta con la mezcla de electroporación se introdujo en el electroporador (Bio-Rad. Modelo Gen Pulser) y se aplicaron unas condiciones de un potencial de 18 kV/cm, una capacitancia de 25 μ F y una resistencia de 200 Ω . La mezcla se enfrió en hielo y se añadió 1 mL de medio SOC fresco.

- Las células se incubaron durante 1 hora con agitación a 37 °C con el fin de restituir las membranas.

- Por último, se sembraron alícuotas de 200-250 μ L en placas de LB-agar que contenían el antibiótico utilizado para la selección. Las placas se mantuvieron a 37 °C durante 12 horas o durante el tiempo necesario para observar la aparición de colonias.

10. Técnica de amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa.

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) descrita por K. Mullis y colaboradores (Mullis *et al.*, 1992) permite amplificar un fragmento de DNA a partir de dos oligonucleótidos (3' y 5') que hibridan en los extremos del fragmento a amplificar, y que actúan como cebadores durante una reacción catalizada por una DNA polimerasa termoestable.

Para la reacción de PCR se utilizaron tres DNA polimerasas termoestables:

- *Taq* polimerasa obtenida de *Thermus aquaticus*. Es una polimerasa termoestable, altamente procesativa, pero que carece de actividad correctora de copia. Los productos de PCR generados al amplificar utilizando esta enzima, pueden ser directamente clonados en los plásmidos comerciales pGEM[®]T-easy y pTZ57R/T.
- *Pfu* polimerasa obtenida de *Pyrococcus furiosus*. Esta enzima posee actividad correctora de copia (*proof-reading*), pero no deja restos de adenina en los fragmentos amplificados, lo que hace imposible la clonación de éstos en los plásmidos anteriormente mencionados. Además, es menos procesativa que la *Taq* polimerasa.
- FideliTaq[™]polimerasa: mezcla de polimerasas, la cual contiene una *Taq* polimerasa recombinante de alta fidelidad y termoestable, y una polimerasa con capacidad correctora de copia. Los productos amplificados con estas enzimas, sí pueden clonarse directamente en los vectores pGEM[®]-T-easy y pTZ57R/T.

A continuación se indica la mezcla de la reacción de PCR empleada, para un volumen final de 50 μ L. En algunas ocasiones fue necesario modificar las condiciones de PCR.

Mezcla de reacción:	Concentración final
5 µL tampón (10x) de la polimerasa	1 x
$2 \ \mu L \ de \ Cl_2 Mg \ (50 \ mM)$	2 mM
2 µL de nucleótidos (dNTPs) (2,5 mM)	0,1 mM
10 μL del oligonucleótido "A" (2 μM)	0,4 µM
10 μL del oligonucleótido "B" (2 μM)	0,4 µM
5 μL DNA (25 ng/ μL)	2,5 ng/ µL

1 unidad de DNA polimerasa

Se añade H_2O destilada estéril hasta un volumen final de 50 μ L.

Rutinariamente, la PCR se realizaba durante 35 ciclos en los que la temperatura de desnaturalización del DNA (95 °C) se mantenía durante 30 segundos. El anillamiento de los oligonucleótidos se realizó a una temperatura que dependía de la naturaleza de los propios cebadores, es decir, la Tm específica (utilizando siempre la menor Tm de los pares de oligonucleótidos), aunque generalmente se realizó a 60 °C, temperatura óptima de la polimerasa (a 68 °C en el caso de la *Pfu* y la FideliTaq), y la extensión a 72 °C. El tiempo de extensión se determinaba en cada caso, considerando que la *Taq* polimerasa sintetizaba una molécula de 1 kb de longitud en un minuto y la *Pfu* polimerasa sintetizaba una molécula de 0,5 kb en un minuto. Asimismo, se agregó una etapa inicial de desnaturalización a 95 °C y una etapa final de extensión a 72 °C (Fig. 23). El termociclador utilizado fue suministrado por la casa comercial Perkin Elmer (U.S.A.). Modelo Gene Amp PCR Sistema 2400.



Figura 23. Esquema de las condiciones estándar utilizadas para la realización de una PCR. Las temperaturas y tiempos, pueden variar según el tamaño del fragmento a amplificar y en función los requerimientos del experimento.

11. Análisis de las secuencias de DNA.

La secuenciación de DNA fue llevada a cabo por la empresa Secugen, S.L. (*Sequencing and Molecular Diagnostic*). Las secuencias obtenidas experimentalmente fueron comparadas frente a las secuencias depositadas en las bases de datos de secuencias genéticas públicas GenBank (*National Center for Biotechnology Information*) (Benson *et al.*, 2000), utilizando los programas BLASTP, BLASTN, BLASTX, TBLASTN (Altschul *et al.*, 1990, Altschul *et al.*, 1997). Para el cálculo de la masa molecular de las distintas proteínas a partir de la secuencia de aminoácidos se utilizó el servidor SMS (*Sequence Manipulation Suite*) (Stothard, 2000). Los alineamientos múltiples, tanto de nucleótidos como de aminoácidos, se realizaron con el programa ClustalW (Larkin *et al.*, 2007).

Las secuencias de aminoácidos fueron analizadas empleando las herramientas disponibles en el servidor de Biología Molecular del Swiss Institute of Bioinformatics (ExPASy) (Hochstrasser *et al.*, 1995). Para la realización de los esquemas comparativos de los diferentes *clusters* analizados en diferentes microrganismos, se utilizó el programa informático *Redasoft Visual Cloning*.

Para la secuenciación de las amplificaciones del rDNA 16S (aprox. 1,4 kb) se utilizaron los *primers* universales 6F y 1510R (van der Meer *et al.*, 1992) (Apéndice III -Tabla 39-) con un ABI PRISM[™] Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) y leídos con un Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer.

Las secuencias parciales del gen *rpo*B se determinaron a partir de productos de PCR obtenidos por amplificación de la región comprendida entre los oligonucleótidos LAPS5 y LAPS27 (Ait Tayeb *et al.*, 2005) (Apéndice III -Tabla 39-).

Todas las secuencias obtenidas en esta Tesis Doctoral se han depositado en la base de datos GenBank del NCBI con los códigos de acceso siguientes: JN695023, JN695024, JN695025, JN695026, JN695027, JN695028, JN695029, JN695030, JN695031, JN695032, JN695033, JN695034, JN695035, JN695036, JN695036, JN695037, JN695038 y JN695039, correspondiente a los rDNA 16S de las cepas Gram positivas, JN695040, JN695041 y JN695042, de los rDNA 16S de las cepas de *Pseudomonas*, JN695043 y JN695044, pertenecientes al gen que codifica para la dioxigenasa de apertura en *meta*, y por último JN695045, JN695046 y JN695047, correspondientes a las secuencias parciales del gen *rpo*B de las cepas de *Pseudomonas*.

En cuanto a los análisis filogenéticos, las secuencias de DNA de los diferentes aislados bacterianos fueron pertinentemente obtenidas y comparadas para ver su homología con las cepas de referencia que se encuentran en la base de datos del GenBank mediante el programa BLAST y, posteriormente, alineadas nucleótido a nucleótido con el ClustalW (ambos anteriormente mencionados). Los árboles filogenéticos se generaron por un método eficiente de categorización o *clustering* ("*Neighbor-Joining* method") y el modelo biparamétrico de Kimura (Kimura, 1980) dentro del programa MEGA 4.1 (Tamura *et al.*, 2007). Este modelo biparamétrico es una extensión del modelo básico diseñado por Jukes y Cantor en 1969, y discierne dos tipos de sustituciones en la secuencia de DNA, las transiciones, cuando una purina es sustituida por otra purina, o una pirimidina es sustituida por otra pirimidina; y las transversiones, cuando una purina es sustituida por otra purina, o una pirimidina por una pirimidina y viceversa. Además, este modelo asume que la frecuencia con la que suceden las transiciones no es la misma que con la que suceden las transversiones. Las topologías y distancias dentro de dichos árboles fueron validadas mediante un análisis basado en 1.000 muestreos.

12. Obtención de cepas mutantes de *P*. *putida* DOC21.

12.1. Mutagénesis con el transposón Tn5.

El procedimiento empleado para obtener los diferentes mutantes fue el propuesto por Selvaraj e Iyer (Selvaraj & Iyer, 1983). Las cepas bacterianas utilizadas en este proceso fueron *E. coli* DH10B Tn5 Km 12 (portadora del plásmido pGS9) como cepa donadora del transposón Tn5 (Cm^R, Km^R), *E. coli* HB101 (portadora del plásmido pRK600) como cepa intemediaria en el intercambio genético (a partir de ahora denominada como *helper*) y *P. putida* DOC21 como cepa receptora (Amp^R) (Fig. 24).

Materiales y Métodos



Figura 24. Mapa genético del transposón Tn5, en el cual también aparecen las zonas "diana" para algunas enzimas de restricción (de Lorenzo *et al.*, 1990; Herrero *et al.*, 1990). Se observan las secuencias de inserción IS50L e IS50R flanqueando la zona central, en la que se encuentran los marcadores genéticos de este transposón, un gen de resistencia a kanamicina, un gen de resistencia a bleomicina y un gen de resistencia a estreptomicina. También se pueden observar los genes presentes en las secuencias IS50: una transposasa (*tnp*), un inhibidor de la transposasa (*inh*), p_3 y p_4 .

Este método ofrece ventajas tales como:

- 1) El Tn5 se integra una única vez y al azar en el genoma de la bacteria receptora.
- 2) Causa una mutación estable.
- 3) El punto de inserción puede ser mapeado fácilmente.

El procedimiento, denominado conjugación triparental es el que se indica a continuación:

- Se inocularon las tres cepas bacterianas en tres tubos estériles de propileno, de 50 mL, tipo Falcon. Uno de ellos, conteniendo 10 mL de medio LB líquido suplementado con Km y Cm, se sembró con *E. coli* DH10B Tn5 Km 12 (pGS9), incubándose a 37 °C durante 8 horas. Otro de los tubos contenía 10 mL de medio LB líquido suplementado con Cm y fue inoculado con la cepa *Helper*, incubándose durante 8 horas a 37 °C; y un último tubo con 10 mL de medio LB líquido suplementado con Ap, se utilizó para cultivar *P. putida* DOC21, incubándose durante 8 horas a 30 °C.

- Del cultivo de *P. putida* DOC21 se tomaron 10 veces más células que de los cultivos de la cepa *Helper* y de *E. coli* DH10B (pGS9). Se midieron las Abs_{540nm} en el espectrofotómetro y los valores de crecimiento de ambas *E. coli* duplicaban el valor de la *P. putida* DOC21, por lo que para sembrar 10 veces más células de ésta, se tuvo que añadir 20 volúmenes de la DOC21 por cada volúmen de las *E. coli*. Dichas cantidades se mezclaron en un tubo Eppendorf estéril, centrifugándose (6.000 rpm durante 1

minuto) y, posteriormente, se desechó el sobrenadante. Las células precipitadas se resuspendieron en 1 mL de medio LB estéril, y se volvieron a centrifugar (6.000 rpm durante 1 minuto), desechándose de nuevo el sobrenadante. El precipitado celular se resuspendió de nuevo en 200 μ L de medio LB estéril y se centrifugó de nuevo (6.000 rpm durante 1 minuto), eliminándose una vez más el sobrenadante. Por último, se repitió el proceso de lavado del precipitado celular y las bacterias se resuspendieron en 50 μ L de medio LB estéril.

- En una placa de medio LB sólido se dispuso un filtro bacteriológico (Millipore o similar) estéril, con un poro de 0,45 μm, sobre el que se depositó la mezcla de bacterias resuspendida (*E. coli* DH10B Tn5 Km 12-*Helper-P. putida* DOC21). La placa se incubó durante 12 horas a 30 °C, ya que esta es la temperatura óptima de crecimiento de la cepa receptora.

- Una vez que las células habían crecido sobre el filtro, éste se retiró de la placa y se introdujo en un tubo de ensayo que contenía 2 mL de H_2O MilliQ estéril, sin antibióticos, y se resuspendieron las bacterias mediante agitación en un vórtex.

- A partir de esta suspensión bacteriana se inocularon placas de medio mínimo (MM) suplementadas con ácido 4-OH-fenilacético 5 mM como única fuente de carbono (ya que la cepa *P. putida* DOC21 crece perfectamente con esta fuente de carbono) y Amp y Km como antibióticos (a las concentraciones anteriormente indicadas), a razón de 200 μL por placa. En estas placas los cepas parentales no pueden crecer, ya que no tenían resistencia a alguno de los dos antibióticos (además de ser auxótrofas, por lo que no pueden crecer en medio mínimo); sin embargo, si crecerían los transconjugantes de *P. putida* DOC21, ya que además de la resistencia a ampicilina que poseen *per se*, también presentaban resistencia a kanamicina adquirida mediante la inserción del transposón Tn5.

- Los transconjugantes que aparecieron en estas placas tras 48 horas de incubación a 30 °C, se seleccionaron por crecimiento en medio mínimo con la fuente de carbono requerida para el experimento: placas de MM ácido 4-OH-fenilacético 5 mM, MM ácido desoxicólico 5 mM y LB, suplementadas con los antibióticos Amp y Km excepto las que contenían ácido desoxicólico. Estas últimas, se suplementaron solamente con Km ya se comprobó que aunque la cepa *P. putida* DOC21 mostraba una elevada resistencia a Amp cuando era cultivada en medio LB y en MM que contenía otras fuentes de carbono, cuando se añadía ampicilina en presencia de ácido desoxicólico, la cepa no crecía (Fig. 25).



Figura 25. Esquema del proceso requerido para obtener mutantes mediante conjugación e inserción del transposón Tn5 en *P. putida* DOC21. Como se indica en el ejemplo, se seleccionan aquellos mutantes en los que el Tn5 se ha insertado en un gen que codifica alguna de las proteínas responsables de la degradación del ácido desoxicólico.

12.1.1. Identificación del punto de inserción del transposón Tn5 en el DNA genómico.

Una vez obtenidos los diferentes mutantes por inserción del transposón Tn5, era necesario conocer que gen había sido interrumpido. El procedimiento seguido con los diferentes mutantes fue el siguiente:

1. Se obtuvo DNA genómico del mutante objeto de estudio.

2. Este DNA se digirió con una endonucleasa de que tuviera una frecuencia de corte no muy elevada en el genoma de *P. putida* DOC21 y que no cortara dentro de la resistencia a Km en el transposón, ya que esta resistencia era utilizada como marcador de selección. Algunas de las enzimas que cumplían ambos requisitos eran *Bam*HI y *Sal*I, aunque también se hicieron combinaciones utilizando una de estas enzimas junto con *Eco*RI, *Sac*I o *Xba*I.

3. Una vez digerido el DNA, se procedió a limpiar la digestión y posteriormente ligar el DNA resultante en el plásmido pUC18 previamente digerido con las enzimas seleccionadas y, en caso de que la digestión se realizara con solo una de esas enzimas, desfosforilado, evitando así la religación de dicho vector de clonación.

4. La reacción de ligación se incubó a 16 °C durante 12 horas y, posteriormente, se utilizó para transformar la cepa *E. coli* DH10B.

5. La selección de los transformantes se llevó a cabo en medio LB suplementado con los antibióticos Amp y Km. De este modo, sólo serían capaces de crecer aquellas cepas que hubieran incorporado el plásmido pUC18, con resistencia a Amp, que llevase el fragmento de DNA directamente unido al transposón, pues serían los únicos que poseerían la resistencia a Km (Tn5).

6. Una vez seleccionados estos transformantes, se obtuvo el DNA plasmídico y se secuenció el inserto que había sido clonado en el *polylinker* del vector pUC18. Para esta secuenciación se utilizaron los oligonucleótidos universales del plásmido, el F24 y el R24, y un oligonucleótido específico del brazo del transposón, denominado Tn5-2 (Apéndice III -Tabla 43-) (Fig. 26).





12.1.2. Identificación del punto de inserción del transposón Tn5 en el DNA genómico mediante la estrategia de recombinación con el brazo del Tn5.

Mediante esta estrategia, diseñada por nuestro grupo de investigación (Arcos et al., 2010), se identificó el punto de inserción del transposón Tn5 de la mayoría de los mutantes obtenidos en esta Tesis Doctoral. Dicha estrategia, se basa en la recombinación homóloga de un vector de clonación suicida en la cepa mutada sobre una de las secuencias repetidas invertidas (secuencias IS50), presentes en ambos extremos del Tn5 (Fig. 24) (Reznikoff, 1993). Teniendo en cuenta que ambas secuencias son idénticas, salvo en un nucleótido, un plásmido suicida que contenga una secuencia homóloga a la de estas secuencias, tendría las mismas posibilidades de insertarse, mediante un fenómeno de recombinación homóloga, sobre cualquiera de los dos extremos del transposón. Esto implicaría que, estadísticamente, la mitad de las colonias obtenidas, habrían recombinado sobre la secuencia IS50R y la otra mitad de las colonias lo habrían hecho sobre la secuencia IS50L. Sirviéndonos de un proceso de restricción con endonucleasas específicas se pueden obtener, a partir del cromosoma de cada uno de los posibles mutantes, las secuencias adyacentes al punto de inserción del transposón Tn5, tanto las que se encuentran "corriente arriba", como aquellas que se encuentren "corriente abajo" con respecto a dicho punto de inserción.

Esta técnica, requiere el uso de un plásmido específicamente diseñado para ello. En primer lugar, se empleó el esqueleto del vector pJQ200SK (portador de un gen de resistencia a gentamicina), para clonar un fragmento de 1113 pb, correspondiente a un trozo de una de las secuencias de inserción del transposón Tn5. En este proceso se utilizaron las dianas de restricción *ApaI/Sal*I. Este plásmido, denominado pJQ-Tn5, poseía, flanqueando a la secuencia repetida del Tn5, las siguientes dianas de restricción (no presentes en el interior del brazo, sino en el *polylinker* del plásmido): *Bam*HI, *Xba*I, *Sma*I y *Sal*I. Posteriormente se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

- La construcción que contenía el brazo del transposón, se transfirió por conjugación triparental (Herrero *et al.*, 1990) a los diferentes mutantes de la cepa *P. putida* DOC21. Para ello, se utilizaron dos cepas de *E. coli*, una como donadora, *E. coli* DH10B, previamente transformada con la construcción pJQ-Tn5; y una cepa de *E. coli* HB101, que actuaba como cepa auxiliar al contener el plásmido pRK600 (cepa Helper), que facilita la movilización de aquellos plásmidos que contengan los genes *mob*. Para llevar a cabo esta conjugación triparental se mezclaron distintas cantidades de cada una

de estas tres cepas (receptora, auxiliar y donadora en proporción 1:1:1), en un tubo Eppendorf estéril. Se centrifugó la mezcla de bacterias (6.000 rpm durante 1 minuto) y se desechó el sobrenadante. Las células precipitadas que conformaban el *pellet* en el fondo del Eppendorf, se resuspendieron en 1 mL de medio LB estéril y se volvieron a precipitar mediante otro ciclo de centrifugación a 6.000 rpm durante un minuto, lavando esta vez el precipitado celular en 200 μ L de medio LB estéril. Este proceso se repitió de nuevo y las células se resuspendieron finalmente en 30-50 μ L de medio LB.

En una placa de medio LB se puso un filtro bacteriológico (Millipore o similar)
estéril sobre el que se depositó la mezcla bacteriana. Dicha placa fue incubada durante
12 h a 30 °C.

- Tras la incubación, se procedió a la selección utilizando los marcadores de resistencia a antibióticos presentes en el plásmido, de aquellos transconjugantes de *P. putida* DOC21 que hubieran integrado en el cromosoma la construcción pJQ-Tn5 (ya que este plásmido no posee origen de replicación autónomo en *Pseudomonas*). Para ello se resuspendió el filtro bacteriológico en 2 mL de PBS y se inocularon placas de LB suplementadas con los antibióticos Gtm y Km.

- En esta conjugación triparental, se pueden producir dos fenómenos de recombinación diferentes debido a que los brazos del Tn5 son secuencias repetidas e invertidas. Así, la construcción del pJQ-Tn5 podrá recombinar en cualquiera de los dos "brazos" del transposón, siendo este el hecho que nos permita conocer las secuencias genéticas adyacentes al punto de inserción del Tn5 (Fig. 27).

- Una vez obtenidos los transconjugantes de *P. putida* DOC21, se extrajo DNA genómico de varios de ellos, teniendo en cuenta que estamos trabajando con dos poblaciones distintas de dichos transconjugantes. Posteriormente, el DNA extraído fue digerido a totalidad con endonucleasas de restricción del *polylinker* del plásmido, que no cortaran en el interior la secuencia repetida, siendo este el caso de *Bam*HI, *Xba*I, *Sal*I y *Sma*I.

- Después de esto, se limpió la reacción de restricción y se realizó la religación del DNA obtenido. Esta reacción de ligación se incubó a 16 °C durante 12 h y posteriormente se empleó para transformar *E. coli* DH10B. La selección de los transformantes obtenidos, se realizó en medio LB suplementado con Gtm, impidiendo así que crecieran otras colonias que no fueran aquellas que habían incorporado el pJQ200SK con el inserto (secuencia *IS* del Tn5 y DNA genómico).

- Finalmente, se obtuvo DNA plasmídico de las dos poblaciones de transformantes y se secuenció el inserto de dichas construcciones, utilizando para ello los oligonucleótidos universales del plásmido pJQ200SK: F24 y R24, y el oligonucleótido Tn5-2 (mencionados anteriormente), que anillan en el extremo del transposón Tn5. El inserto resultante consta de la secuencia del Tn5 más una secuencia de un tamaño variable correspondiente al DNA genómico de *P. putida* DOC21. Esta nueva secuencia corresponde al lado izquierdo o derecho del punto de inserción del transposón Tn5, según en el que se hubiera dado la recombinación.



Figura 27. Representación esquemática del proceso de aislamiento y secuenciación de la zona adyacente al punto de inserción del transposón Tn5 mediante la estrategia de "recombinación del brazo del Tn5". Aparecen reflejadas las dos posibilidades de recombinación de la construcción pJQ-Tn5 en los brazos del transposón Tn5, el cual se ha insertado previamente en el genoma de la *P. putida* DOC21. En esta representación se ha puesto de ejemplo todo el proceso utilizando como corte de restricción *Bam*HI.

12.1.3. Secuenciación de las zonas adyacentes a un fragmento de secuencia conocida.

Una vez que se identificó el punto de inserción del Tn5 y se obtuvo información sobre la secuencia del fragmento próximo al transposón (del gen que estaba interrumpido), se pueden conocer las secuencias adyacentes a dicho fragmento. De forma rutinaria se siguieron dos procedimientos:

1. Se amplificó mediante PCR el fragmento conocido del gen y posteriormente, el producto de amplificación se clonó directamente en el pGEM[®]-T Easy. Mediante la digestión de esta construcción con las endonucleasas adecuadas, el fragmento se clonó en el plásmido pJQ200SK (plásmido movilizable mediante conjugación, que es replicativos en las cepas de *E. coli* pero no en *Pseudomonas putida*). Con esta construcción se transformó la cepa *E. coli* DH10B.

2. La construcción obtenida se transfirió por conjugación triparental, de tal forma que el plásmido se insertaba en el genoma mediante recombinación homóloga a través del inserto clonado. Esto permitió la obtención de transconjugantes en los que, adyacentes a una zona conocida de secuencia, se localizan cortes de restricción conocidos y un marcador genético (el gen de resistencia al antibiótico) que dependerá del plásmido elegido.

3. Se extrajo DNA genómico de alguno de los transconjugantes. Dicho DNA se digirió a totalidad con enzimas de restricción del *polylinker* del plásmido, teniendo en cuenta que cortaran en el interior de la secuencia conocida.

4. Posteriormente, se limpió la digestión y se realizó la religación de los fragmentos que contenían el plásmido

5. La ligación se incubó a 16 °C durante 12 horas y posteriormente se empleó para transformar la cepa *E. coli* DH10B.

6. La selección de los transformantes se realizó en medio LB suplementado con Gtm (pJQ200SK), de tal forma que sólo crecían aquellas colonias que hubieran incorporado el plásmido con el inserto.

7. Se obtuvo DNA plasmídico de los transformantes y se secuenció el inserto de dichas construcciones, tal y como se ha indicado anteriormente (con los oligonucleótidos universales del plásmido). El inserto resultante constaría de la secuencia y de una secuencia desconocida. La nueva secuencia

correspondería a la que está unida (bien al lado izquierdo o derecho) de la secuencia previamente identificada (Fig. 28).

Este protocolo se siguió rutinariamente para secuenciar la zona adyacente a un fragmento conocido de secuencia. Pero en otras ocasiones, se diseñaron oligonucleótidos específicos sobre el fragmento de DNA de secuencia conocida, y se utilizaron para hacer amplificaciones mediante PCR, frente a un oligonucleótido específico del brazo del Tn5. Estas reacciones de PCR se purificaron, siguiendo los protocolos anteriormente descritos o utilizando *kits* comerciales específicos para ello, y se secuenciaron. En ocasiones, si el experimento lo requería, se ligaron en el pGEM[®]-T Easy y, posteriormente, se clonaron en otro plásmido.



Figura 28. Representación esquemática del proceso de secuenciación de la zona adyacente a un fragmento conocido de secuencia. En amarillo aparece el fragmento conocido, y en verde la zona adyacente desconocida. **d**, representa el sitio del oligonucleótido universal F24 y **r**, el sitio del oligonucleótido universal R24. Mediante las indicaciones 5' y 3', se señala la orientación del fragmento conocido. De esta manera, se podrá llegar a conocer la secuencia adyacente, tanto a la derecha como a la izquierda, según fuese la orientación inicial del fragmento clonado en el plásmido.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

"Son vanas y están plagadas de errores las ciencias que no han nacido del experimento, madre de toda certidumbre"

Leonardo da Vinci (1452-1519).

1. Aislamiento de cepas con capacidad de degradar colesterol o ácido desoxicólico.

Con objeto de aislar bacterias que pudieran asimilar compuestos esteroideos, se diseñó un protocolo para la recolección y selección de las mismas. Para ello, se recogieron diferentes muestras de tierra provenientes de distintos lugares de la provincia de León (España). Con ellas, se prepararon suspensiones que contenían 1 gramo de la muestra de tierra en 500 mL de agua MilliQ. Posteriormente, se cogieron 1-2 mL de cada suspensión y se inocularon matraces de 500 mL de capacidad, que contenían 100 mL de medio mínimo (MM) suplementados con colesterol con una concentración final de 2 mM, o bien con ácido desoxicólico con una concentración final de 30 °C durante diferentes tiempos (entre uno y varios días de incubación). Posteriormente, se tomaron alícuotas y se realizaron resiembras seriadas (diluciones en serie) en placas de Petri con MM suplementado, bien con colesterol (2 mM), o bien con ácido desoxicólico (5 mM).

Estas placas se incubaron a 30°C durante aproximadamente 72 h. Las colonias aisladas obtenidas se resembraron en otras placas de Petri con idéntico medio, consiguiendo cultivos puros. Este proceso, fue repetido tres veces, con el objetivo de asegurar la homogeneidad y pureza de las cepas aisladas (Fig. 29).

Siguiendo este protocolo, a partir de placas con MM colesterol 2 mM, se obtuvieron 17 cepas bacterianas diferentes, denominadas: COL11, COL14, COL16, COL17, COL18, COL19, COL20, COL21, COL22, COL23, COL25, COL26, COL27, COL28, COL29, COL30 y COL33. Sin embargo, a partir de las placas con MM ácido desoxicólico 5mM, sólo se obtuvieron 2 cepas bacterianas: DOC19 y DOC21 (Apéndice III -Tabla 36-).

Curiosamente, las cepas DOC capaces de degradar ácido desoxicólico, no eran capaces de utilizar colesterol como única fuente de carbono, mientras que las cepas COL capaces de degradar colesterol como única fuente de carbono, eran incapaces de utilizar ácido desoxicólico. Sin embargo, ambos tipos de cepas bacterianas eran capaces de metabolizar otros esteroides, y, además los diferentes aislados ambientales diferían entre ellos en cuanto a sus perfiles catabólicos respecto a estos compuestos.



Figura 29. Representación esquemática del proceso seguido para la búsqueda y correcto aislamiento de las diferentes cepas bacterianas con capacidad para degradar colesterol.

2. Caracterización de las cepas aisladas.

Para su clasificación taxonómica, los diferentes aislados fueron sometidos a una tinción de Gram (Gerhardt *et al.*, 1994). Se comprobó que todas las cepas bacterianas capaces de crecer en colesterol como única fuente de carbono eran microorganismos Gram-positivos, mientras que aquellas otras capaces de crecer en ácido desoxicólico como única fuente de carbono eran Gram-negativos.

2.1. Cepas Gram-positivas degradadoras de colesterol (cepas COL).

2.1.1. Estudios filogenéticos y caracterización de las cepas COL mediante análisis del rDNA 16S.

Las secuencias del rDNA 16S (Apéndice I -Apdo 1.1-) se obtuvieron mediante PCR utilizando los oligonucleótidos (*primers*) universales 6F y 1510R (Apéndice III -Tabla 39-), a partir de las diferentes cepas COL. La identificación de las distintas secuencias homólogas se realizaron comparándolas con las depositadas en las bases de datos del GenBank. Como resultado de ello, se observó que las 17 cepas, estaban relacionadas con bacterias pertenecientes al orden *Actinomycetales*, suborden *Corynebacterineae*. Las cepas COL11, COL17, COL19, COL20, COL21, COL23, COL26 y COL33 presentaban la máxima identidad con cepas del género *Gordonia*; las cepas COL14, COL16 y COL18 parecían estar relacionadas con cepas del género *Tsukamurella*, y las cepas COL22, COL25, COL27 COL28 COL29 y COL30 presentaban la máxima similitud con cepas del género *Rhodococcus* (Tabla 1).

Tabla 1. Porcentajes de similitud obtenidos al comparar los rDNA 16S de las cepas COL con las depositadas en base de datos del GenBank.

Сера	Secuencias con mayor homología en el GenBank
COL11	Gordonia malaquae cepa IMMIB WWCC-22 (100%)
	Gordonia australis cepa A554 (99,3%)
	Gordonia spumae cepa T4 (99,2%)
COI 14	Tsukamurella tyrosinosolvens cepa IFM 10622 (100%)
COLIT	Tsukamurella pulmonis cepa IFM 0888 (99,9%)
	Tsukamurella pulmonis cepa IFM 0888 (99,7%)
COL16	Tsukamurella tyrosinosolvens cepa IFM 10622 (99,7%)
	Tsukamurella inchonensis cepa ATCC25938 (99,6%)
COL17	Gordonia australis cepa A554 (100%)
	Gordonia spumae cepa T4 (99,9%)
	Gordonia malaquae cepa IMMIB WWCC-22 (99,3%)
COL18	Tsukamurella tyrosinosolvens cepa IFM 10215 (100%)
	Tsukamurella pulmonis cepa IFM 0888 (99,7%)
	Tsukamurella strandjordae cepa ATCCBAA-173 (99,7%)
COL19	Gordonia hydrophobica cepa DSM 44015 (99%)
	Gordonia sihwaniensis cepa DSM 44576 (98,4%)
	Gordonia rubripertincta cepa DSM 43248 (98,2%)
COL20	Gordonia australis cepa A554 (100%)
	Gordonia spumae cepa T4 (99,9%)
	Gordonia malaquae cepa IMMIB WWCC-22 (99,3%)
	Gordonia australis cepa A554 (99,6%)
COL21	Gordonia spumae cepa T4 (99,5%)
	Gordonia malaquae cepa IMMIB WWCC-22 (98,9%)
COL22	Rhodococcus erythropolis cepa EK5 (100%)
	Rhodococcus qingshengii cepa ZJB-09153 (100%)
	Rhodococcus boritolerans cepa BIM-1c (100%)
CO1 02	Gordonia spumae cepa 14 (99,6%)
COL23	Gordonia australis cepa A554 (99,6%)
	Gordonia malaquae cepa IMMIB WWCC-22 (99%)
COL25	Rhodococcus erythropolis cepa DCL14 (100%)
	<i>Knoaococcus erythropous</i> cepa HS19 (99,1%)
COL26	Gordonia wesijalica cepa K01/K02 (99,7%)
	Cordonia namibiansis cono NAM PN062P (00%)
	Phodococcus equi cons DSM20207T (00.0%)
COL27	Rhodococcus onacus cona DNP14 5 (99.7%)
	Rhodococcus opacus cepa $CB241(081\%)$
COL 28	Rhodococcus wratislaviansis cepa CCM/030 (08 1%)
COL28	Rhodococcus anii cena ATCC33703 (97.9%)
	Rhodococcus equi cena DSM20307T (100%)
COL29	Rhodococcus oracus cepa DNP14-5 (97.8%)
	Rhodococcus equi cena DSM20307T (100%)
COL30	Rhodococcus opacus cena DNP14-5 (97.8%)
	Gordonia soli cepa CC-AB07 (98.1%)
COL33	Gordonia sihwaniensis cepa DSM44576 (97 5%)
	Gordonia defluvii cena J5 (97.5%)

Para confirmar las relaciones de las cepas COL con dichos géneros, se realizaron diferentes estudios filogéneticos basados en la comparación de las secuencias rDNA 16S de las cepas aisladas COL con las secuencias de las cepas tipo que representan todos los géneros comprendidos en el suborden *Corynebacterineae (Tsukamurella, Gordonia, Rhodococcus, Segniliparus, Skermania, Millisia, Corynebacterium, Nocardia, Dietzia, Williamsia y Mycobacterium)* (Zhi *et al.*, 2009). Estos resultados permitieron concluir que COL17 y COL20 estaban estrechamente relacionados con *Gordonia spumae* y *G. australis*, y que COL21, junto con COL23, constituían un grupo cercano a éste (*G. spumae-G. australis*). Estos grupos también están relacionados con la rama formada por COL11, cuya secuencia está muy relacionada con *G. malaquae*. La cepa COL19 está muy relacionada con *G. hydrophobica*, y la COL33 ocupa una posición filogenéticamente intermedia entre los dos grupos anteriormente mencionados. Finalmente, COL26 mostró una gran homología con *G. westfalica* (Fig. 30).

Por otra parte, se comprobó que las cepas COL14, COL16 y COL18, estaban estrechamente relacionadas con especies del género *Tsukamurella*, concretamente COL14 y COL18 con *T. carboxydivorans* y *T. tyrosinosolvens* respectivamente, mientras que la cepa COL16 poseía una elevada similitud con *T. spumae* (Fig. 30).

Por último, COL22, COL25, COL27, COL28, COL29 y COL30 mostraron una alta homología en sus secuencias rDNA 16S con especies del género *Rhodococcus*; más concretamente la COL27, COL29 y COL30 con *R. equii*; COL28 con *R. triatomae* y tanto COL22 como COL25, con *R. erythropolis*. (Fig. 30).



Figura 30. Árbol filogenético basado en las secuencias del rDNA 16S. En él se muestran las relaciones filogenéticas existentes entre las diferentes cepas COL, pertenecientes todas ellas al suborden *Corynebacterineae*.

El árbol filogenético fue construido mediante el "*Neighbor-Joining* method" (Saitou & Nei, 1987), en base a la comparación de 1200 nucleótidos y utilizando la cepa *Streptomyces griseus* ISP5236^T como microorganismo ancestral común.

Este método, se propuso para construir árboles filogéneticos, a partir de las distancias evolutivas de las cepas, y consiste en determinar, según su homología, pares de unidades taxonómicas operacionales. Éstas, también conocidas como OTU's, debido a sus siglas en inglés, permiten minimizar la longitud total de las ramas del árbol en cada etapa de categorización o agrupamiento de los OTU's, empezando por la formación de un árbol filogenético en forma de estrella y, posteriormente, ir agrupando OTU's para generar un árbol que muestre emparejadas las unidades con un ancestro común. Este método permite una mayor corrección en el "enraizamiento" (búsqueda del antecesor común a todos los individuos) del árbol filogenético.

2.1.2. Caracterización morfológica y fisiológica de las cepas degradadoras de colesterol.

2.1.2.1. Cepa COL11.

Como se ha detallado en el apartado anterior, este aislado ambiental podría ser adscrito al género *Gordonia* en base al análisis del rDNA 16S (Fig. 30). La observación de las colonias en la lupa estereoscópica, reveló que éstas tenían una morfología irregular, umbiliforme, de aspecto rugoso y color blanquecino-pardo, al ser cultivadas en medio TSA. Mediante microscopía electrónica de barrido se determinó que esta cepa poseía una morfología celular bacilar (Fig. 31).



Figura 31. Fotografías de las colonias bajo la lupa estereoscópica (a) y de microscopía electrónica de barrido de las bacterias (b), correspondientes a la cepa COL11. La barra de escala corresponde a 1mm en la primera fotografía y a 1 μ m en la segunda.

Desde un punto de vista fisiológico se constató que tanto esta cepa como el resto de las cepas COL no formaban esporas, no presentaban actividad catalásica y no poseían actividad oxidasa. No producía arginina dihidrolasa y tampoco β -galactosidasa. Además, no hidrolizaba la gelatina pero si la esculina, producía ureasa y era incapaz de producir indol a partir de triptófano (Apéndice II -Tabla 33-).

En cuanto a los parámetros físicos del cultivo, la temperatura más baja a la que era capaz de crecer es 10 °C y la más alta 30 °C, al ser cultivada en matraces con 100 mL de medio TSB y con una D.O. (densidad óptica) inicial de 0,05. La temperatura óptima de crecimiento era de 15 °C, alcanzando en estas condiciones los mayores valores de

absorbancia. También presentaba un buen crecimiento cuando se cultivaba a 10 y 30 °C, mientras que dicho crecimiento era escaso a 5 °C y prácticamente nulo a 37 y 45 °C. En general, se puede decir que esta bacteria mostraba un mayor crecimiento a temperaturas bajas, sin embargo, le costaba más tiempo alcanzar los valores máximos de absorbancia (Fig. 32). Estos valores correspondientes al comportamiento de la cepa bacteriana al ser cultivada a diferentes temperaturas, fueron obtenidos mediante al menos tres determinaciones distintas. Este tipo de experimento se realizó también para caracterizar el resto de las cepas COL y DOC.



COL11

Figura 32. Comportamiento de la cepa COL11 al ser cultivada en medio TSB a distintas temperaturas. Las temperaturas comprobadas fueron 5 °C (\bullet), 10 °C (\bullet), 15 °C (\checkmark), 20 °C (\bullet), 30 °C (\bullet), 37 °C (\checkmark) y 45 °C (\checkmark).

En cuanto al rango de pH entre el cual era capaz de crecer, se comprobó que soportaba variaciones del mismo, que oscilaban entre 5 y 11, al ser cultivada en medio NB (Materiales y Métodos -Apdo 4.7-). Adicionalmente, se comprobó que cuando se cultivaba en medio TSB (Materiales y Métodos -Apdo 4.2-) con una concentración salina elevada (6% p/v de NaCl o más), no se apreciaba crecimiento (Apéndice II -Tablas 34 y 35-). Experimentos similares se realizaron para todas las cepas COL y DOC.

En referencia a su capacidad para metabolizar compuestos de naturaleza esteroidea, se pudo observar que esta cepa era capaz de utilizar en mayor o menor medida todos aquellos esteroides empleados, salvo el ácido desoxicólico (Tabla 2), revelándose, junto a la COL18, como una de las cepas con mayor capacidad para catabolizar compuestos esteroideos (Apéndice II -Tabla 30-).

Finalmente, se comprobó su capacidad para metabolizar otras fuentes de carbono, tales como ácidos grasos, aminoácidos, azúcares, e intermediarios metabólicos (Tabla 2).

Tabla 2. Diferentes compuestos comprobados con el fin de estudiar la capacidad metabólica de la cepa COL11. En la tabla se establece el tipo de crecimiento de la cepa con respecto al compuesto que degrada para crecer, así +++ hacen referencia a un crecimiento óptimo, ++ significan un crecimiento moderado, + quiere decir que el crecimiento es escaso y – que el crecimiento es nulo.

Comp. esteroideos		Ác. grasos e interm. metabólicos		Azúcares	
Colesterol	++	Ác. acético	+++	D-Glucosa	+++
β-Sitosterol	++	Ác. propiónico	+++	Sacarosa	+++
Estigmasterol	+	Ác. octanoico	-	Maltosa	+
Ergosterol	++	Ác. nonanoico	-	Lactosa	+
Ác. desoxicólico	-	Ác. decanoico	-	D-Fructosa	+++
Ác. cólico	+	Ác. succínico	++	D-Sorbitol	-
Ác. quenodesoxicólico	+++	Ác. fumárico	+	D-Xilosa	+
Ác. litocólico	+++	Ác. málico	+	D-Sorbosa	+
Ác. ursodesoxicólico	+	Ác. cítrico	+++	D-Manitol	+
Ác. deshidrocólico	++	Ác. glucónico	+	L-Arabinosa	+
Ác. 5β-colánico	+			L-Fucosa	+
Progesterona	+++			Ác. D-	+
Prednisona	++			glucurónico	
5-Pregnen-3β-ol-20-ona	+++				
Testosterona	+++				
17α-Metiltestosterona	+				
β-Estradiol	+				
trans-deshidroandrosterona	+++				
Estrona	+				
Androstanolona	++				
trans-androsterona	++				
1-Deshidro-17α-metiltestosterona	+++				
4-Androsten-3,17-diona	+++				

Aminoácidos		Comp. aromáticos		Otros compuestos	
L-Isoleucina	+	Ác. 3-OH-fenilacético	-	Ác. ciclohexilacético	+
L-Fenilalanina	+	Ác. 4-OH-fenilacético	-	Ác. adípico	++
L-Tirosina	+	Ác. 2-OH-benzoico	-	Ác. pimélico	++
L-Valina	+++	Ác. 3-OH-benzoico	-	Ác. subérico	+++
L-Metionina	+	Ác. 4-OH-benzoico	-	Glicerol	+
L-Histidina	+	Ác. 3-OH-fenilpropiónico	+	Histamina	+
		Ác. 4-OH-fenilpropiónico	+		
		Ác. 3-OH-cinámico	+		
		Ác. 4-OH-cinámico	+		
		Ác. fenilacético	-		
		Ác. benzoico	-		
		Ác. 3-fenilpropiónico	-		
		Ác. fenoxiacético	+		
		Feniletilamina	-		
		Tiramina	-		

2.1.2.2. Cepa COL14.

Este aislado ambiental bacteriano pertenece al género *Tsukamurella*, según el análisis del rDNA 16S (Fig. 30). Sus colonias, observadas a la lupa estereoscópica, mostraban un aspecto oleaginoso y cremoso, así como una coloración parda-marronuzca al ser cultivadas en medio TSA. Mediante microscopía electrónica de barrido se determinó que esta cepa poseía una morfología celular bacilar (Fig. 33).



Figura 33. Fotografías de las colonias observadas con lupa (a) y de microscopía electrónica de barrido de las bacterias (b), correspondientes a la cepa COL14. La barra de escala corresponde a 1mm en la fotografía de la lupa (a) y a 1 μ m en la fotografía de microscopía electrónica (b).

Era incapaz de producir arginina dihidrolasa pero si β -galactosidasa. Era incapaz de hidrolizar la gelatina pero si la esculina, no producía ureasa y tampoco era capaz de generar indol a partir de triptófano (Apéndice II -Tabla 33-).

En cuanto a su capacidad de crecimiento con respecto a la temperatura, mostraba crecimiento en un rango de entre 10 °C y 37 °C. Al igual que en la cepa anterior la temperatura óptima de crecimiento seguía siendo 15 °C, pero esta vez el crecimiento a 10 °C era muy pobre y casi inexistente a 5 °C. A temperaturas más elevadas dicho crecimiento tenía lugar más rápido, como era el caso a 30, 20 y 37 °C, si bien no alcanzaba cotas tan altas, siendo en estas dos últimas, muy similar en cuanto a su valor máximo, pero poseían una gran diferencia de tiempo a la hora de alcanzarlo. Finalmente, a 45 °C el crecimiento era nulo (Fig. 34).




Figura 34. Comportamiento de la cepa COL14 frente a diferentes condiciones de temperatura al ser cultivada en medio TSB. Las temperaturas comprobadas fueron 5 °C (•), 10 °C (•), 15 °C (\checkmark), 20 °C (•), 30 °C (•), 37 °C (\checkmark) y 45 °C (\checkmark).

Por otra parte los valores de pH entre los cuales era capaz de crecer estaban comprendidos entre 5 y 11 y toleraba bien la alta salinidad (hasta el 10% p/v de NaCl) (Apéndice II -Tablas 34 y 35-).

Con respecto a la capacidad de utilizar diferentes esteroides como fuente de carbono y energía, se comprobó que solo era capaz de metabolizar el colesterol, el β -sitosterol, el estigmasterol, el ergosterol y el ácido deshidrocólico (Tabla 3).

Además, esta cepa era una de las que poseía menor capacidad metabólica, no solo por su escasa degradación de compuestos esteroideos, sino porque cuando se comprobó su capacidad para utilizar otras fuentes de carbono, como ácidos grasos, aminoácidos, azúcares e intermediarios metabólicos, se observó que no crecía en presencia de compuestos aromáticos (hidroxilados y no hidroxilados) y de entre los ácidos dicarboxílicos, sólo crecía escasamente en ácido adípico. Curiosamente, su crecimiento era muy bueno en la mayoría de los azúcares comprobados y, en cuanto a los aminoácidos, solamente era capaz de metabolizar la valina (Tabla 3). Tabla 3. Diferentes compuestos comprobados con el fin de estudiar la capacidad metabólica de la cepa COL14.

Comp. esteroideos		Ác. grasos e interm. metabólicos		Azúcares	
Colesterol	+++	Ác. acético	+++	D-Glucosa	+++
β-Sitosterol	+++	Ác. propiónico	+++	Sacarosa	+++
Estigmasterol	+	Ác. octanoico	-	Maltosa	+++
Ergosterol	+++	Ác. nonanoico	-	Lactosa	-
Ác. desoxicólico	-	Ác. decanoico	-	D-Fructosa	+++
Ác. cólico	-	Ác. succínico	+++	D-Sorbitol	+++
Ác. quenodesoxicólico	-	Ác. fumárico	+	D-Xilosa	-
Ác. litocólico	-	Ác. málico	++	D-Sorbosa	+++
Ác. ursodesoxicólico	-	Ác. cítrico	-	D-Manitol	+++
Ác. deshidrocólico	+	Ác. glucónico	+++	L-Arabinosa	-
Ác. 5β-colánico	-			L-Fucosa	-
Progesterona	-			Ác. D-glucurónico	-
Prednisona	-				
5-Pregnen-3β-ol-20-ona	-				
Testosterona	-				
17α-Metiltestosterona	-				
β-Estradiol	-				
trans-deshidroandrosterona	-				
Estrona	-				
Androstanolona	-				
trans-androsterona	-				
1-Deshidro-17α-metiltestosterona	-				
4-Androsten-3,17-diona	-				

Aminoácidos		Comp. aromáticos		Otros compuestos	
L-Isoleucina	-	Ác. 3-OH-fenilacético	-	Ác. ciclohexilacético	-
L-Fenilalanina	-	Ác. 4-OH-fenilacético	-	Ác. adípico	-
L-Tirosina	-	Ác. 2-OH-benzoico	-	Ác. pimélico	-
L-Valina	+++	Ác. 3-OH-benzoico	-	Ác. subérico	+
L-Metionina	-	Ác. 4-OH-benzoico	-	Glicerol	-
L-Histidina	-	Ác. 3-OH-fenilpropiónico	-	Histamina	-
		Ác. 4-OH-fenilpropiónico	-		
		Ác. 3-OH-cinámico	-		
		Ác. 4-OH-cinámico	-		
		Ác. fenilacético	-		
		Ác. benzoico	-		
		Ác. 3-fenilpropiónico	-		
		Ác. fenoxiacético	-		
		Ác. fenoxiacético	-		
		Feniletilamina	-		
		Tiramina	-		

2.1.2.3. Cepa COL16.

En función de la clasificación filogenética realizada utilizando la secuencia de su rDNA 16S, este aislado ambiental bacteriano se hallaría incluido en el género *Tsukamurella* (Fig. 30). Morfológicamente, sus colonias tenían una apariencia agrietada y seca y una coloración blanquecina-mate una vez que habían sido cultivadas en medio TSA. Mediante microscopía electrónica de barrido se determinó una morfología bacilar para esta cepa (Fig. 35).



Figura 35. Fotografías de las colonias bajo la lupa estereoscópica (a) y de microscopía electrónica de las bacterias (b), correspondientes a la cepa COL16. La barra de escala corresponde a 1mm en la fotografía de la lupa y a 1 μ m en la fotografía de microscopía electrónica.

Esta cepa era incapaz de producir arginina dihidrolasa pero si β -galactosidasa. Asimismo, no hidrolizaba la gelatina, pero sí la esculina, no producía ureasa y tampoco era capaz de generar indol a partir de triptófano (Apéndice II -Tabla 33-).

Con respecto a su crecimiento, la temperatura más baja en la que tenía capacidad de crecimiento era 10 °C y la más alta 37 °C. No obstante, dicho crecimiento era muy escaso a cualquier temperatura, por lo que las evidentes diferencias encontradas en ambas cepas anteriores entre temperaturas altas y bajas se veían drásticamente reducidas en esta cepa. Así pues, presentaba valores de absorbancia muy parecidos entre las temperaturas de 10, 15 y 30 °C por un lado y entre 5 y 37 °C por otro. Por otra parte, a 20 °C dicho crecimiento era muy pobre, y nulo a 45 °C, no obstante, éste seguía siendo más rápido a temperaturas más elevadas (Fig. 36).





Figura 36. Comportamiento de la cepa COL16 frente a diferentes condiciones de temperatura al ser cultivada en medio TSB. Las temperaturas comprobadas fueron 5 °C (•), 10 °C (•), 15 °C (\checkmark), 20 °C (•), 30 °C (•), 37 °C (\checkmark) y 45 °C (\checkmark).

Esta cepa era capaz de crecer entre valores de pH comprendidos entre 6 y 11. Por otra parte, solo era capaz de crecer en medios con una concentración de NaCl inferior al 2% p/v (Apéndice II -Tablas 34 y 35-).

Cuando se analizó su capacidad para utilizar diferentes compuestos esteroideos como fuente de carbono y energía, se constató que solamente era capaz de metabolizar el colesterol, el β -sitosterol, el estigmasterol, el ergosterol, el ácido deshidrocólico y la 1-deshidro-17 α -metiltestosterona (Tabla 4).

Al comprobarse su capacidad para metabolizar otras fuentes de carbono, como ácidos grasos, aminoácidos, azúcares, compuestos aromáticos e intermediarios metabólicos, se pudo constatar que al igual que la cepa COL14 (también perteneciente al género *Tsukamurella*), de entre todos los aminoácidos, sólo era capaz de degradar el aminoácido valina y al igual que ella no catabolizaba compuestos aromáticos (Apéndice II -Tablas 31 y 32-). Sin embargo, presentaba diferencias con la cepa anteriormente mencionada en cuanto al crecimiento en azúcares, ya que era capaz de utilizar lactosa, arabinosa y fucosa como fuente de carbono, sin embargo no degradaba sorbosa ni manitol (Tabla 4).

Tabla 4. Diferentes compuestos comprobados con el fin de estudiar la capacidad metabólica de la cepa COL16.

Comp. esteroideos		Ác. grasos e interm. met	Azúcares		
Colesterol	+++	Ác. acético	+++	D-Glucosa	+++
β-Sitosterol	+++	Ác. propiónico	+++	Sacarosa	+++
Estigmasterol	+	Ác. octanoico	+++	Maltosa	+
Ergosterol	+++	Ác. nonanoico	-	Lactosa	+
Ác. desoxicólico	-	Ác. decanoico	-	D-Fructosa	+++
Ác. cólico	-	Ác. succínico	+++	D-Sorbitol	-
Ác. quenodesoxicólico	-	Ác. fumárico	+++	D-Xilosa	-
Ác. litocólico	-	Ác. málico	+++	D-Sorbosa	-
Ác. ursodesoxicólico	-	Ác. cítrico	+++	D-Manitol	-
Ác. deshidrocólico	+	Ác. glucónico	+	L-Arabinosa	+
Ác. 5β-colánico	-			L-Fucosa	+++
Progesterona	-			Ác. D-glucurónico	-
Prednisona	-				
5-Pregnen-3β-ol-20-ona	-				
Testosterona	-				
17α-Metiltestosterona	-				
β-Estradiol	-				
trans-deshidroandrosterona	-				
Estrona	-				
Androstanolona	-				
trans-androsterona	-				
1-Deshidro-17α-metiltestosterona	+				
4-Androsten-3,17-diona	-				

Aminoácidos		Comp. aromáticos		Otros compuestos	
L-Isoleucina	-	Ác. 3-OH-fenilacético	-	Ác. ciclohexilacético	-
L-Fenilalanina	-	Ác. 4-OH-fenilacético	-	Ác. adípico	+
L-Tirosina	-	Ác. 2-OH-benzoico	-	Ác. pimélico	-
L-Valina	++	Ác. 3-OH-benzoico	-	Ác. subérico	++
L-Metionina	-	Ác. 4-OH-benzoico	-	Glicerol	++
L-Histidina	-	Ác. 3-OH-fenilpropiónico	-	Histamina	-
		Ác. 4-OH-fenilpropiónico	-		
		Ác. 3-OH-cinámico	-		
		Ác. 4-OH-cinámico	-		
		Ác. fenilacético	-		
		Ác. benzoico	-		
		Ác. 3-fenilpropiónico	-		
		Ác. fenoxiacético	-		
		Feniletilamina	-		
		Tiramina	-		

2.1.2.4. Cepa COL17.

Cepa bacteriana incluída en el género *Gordonia*, según el análisis de su rDNA 16S (Fig. 30). Morfológicamente, sus colonias eran irregulares, de aspecto rugoso y coloración blanquecina al ser cultivadas en medio TSA. Mediante microscopía electrónica se determinó que esta cepa poseía una morfología celular bacilar (Fig. 37).



Figura 37. Fotografías realizadas a las colonias con una lupa estereoscópica (a) y con un microscopio electrónico de barrido de las bacterias (b) de la cepa COL17. La barra de escala corresponde a 1mm en la fotografía de microscopía óptica y a 1 μ m en la fotografía de microscopía electrónica.

Al igual que las cepas anteriores no producía arginina dihidrolasa. Tampoco β galactosidasa. Era incapaz de hidrolizar la gelatina, pero si la esculina. Producía ureasa y no producía indol a partir de triptófano (Apéndice II -Tabla 33-).

Con respecto a la temperatura, era capaz de crecer entre 10 °C y 30 °C, siendo incapaz de hacerlo por encima de ésta. Esto era una diferencia con la mayoría de las cepas analizadas, las cuales eran capaces de crecer a una temperatura de hasta 37 °C. La diferencia en cuanto a la rapidez del crecimiento entre altas y bajas temperaturas vuelve a ser patente. De nuevo la T^a óptima de crecimiento eran 15 °C, en lo que a valores de absorbancia se refiere, aunque también crecía bien a 10 °C. Dicho crecimiento a 20 y 30 °C también era aceptable, mientras que a 5, 37 y 45 °C (sobre todo estas dos últimas) era prácticamente nulo (Fig. 38).





Figura 38. Comportamiento de la cepa COL17 frente a diferentes condiciones de temperatura al ser cultivada en medio TSB. Las temperaturas comprobadas fueron 5 °C (\bullet), 10 °C (\bullet), 15 °C ($\mathbf{\nabla}$), 20 °C (\bullet), 30 °C ($\mathbf{\bullet}$), 37 °C ($\mathbf{\nabla}$) y 45 °C ($\mathbf{\nabla}$).

Con respecto al efecto que la variación del pH en el medio de cultivo tenía sobre el crecimiento de esta cepa, se comprobó que era capaz de crecer en unos valores de pH que oscilaban entre 5 y 11. Asimismo, no crecía en medios con valores superiores a un 4% p/v de NaCl (Apéndice II -Tablas 34 y 35-).

En cuanto a los compuestos esteroideos que era capaz de utilizar como fuente de carbono y energía, se observó que esta cepa metabolizaba con mayor o menor éxito ciertos esteroides, mientras que no utilizaba el ácido desoxicólico, el ácido cólico, el ácido 5 β -colánico, el β -estradiol, la estrona y la *trans*-androsterona (Tabla 5). Además, se puso de manifiesto su capacidad para metabolizar otras fuentes de carbono, tales como ácidos grasos, aminoácidos, azúcares, compuestos del metabolismo central y compuestos aromáticos. Era capaz de metabolizar la mayor parte de los azúcares y compuestos aromáticos, salvo el sorbitol y la feniletilamina (Tabla 5). Metabólicamente esta cepa es muy parecida a la COL11, ambas pertenecientes al género *Gordonia* (Apéndice II -Tablas 30, 31 y 32-).

Tabla 5. Diferentes compuestos comprobados con el fin de estudiar la capacidad metabólica de la cepa COL17.

Comp. esteroideos		Ác. grasos e interm. meta	Azúcares		
Colesterol	++	Ác. acético	+++	D-Glucosa	++
β-Sitosterol	++	Ác. propiónico	+++	Sacarosa	+++
Estigmasterol	+	Ác. octanoico	-	Maltosa	+
Ergosterol	+	Ác. nonanoico	-	Lactosa	+
Ác. desoxicólico	-	Ác. decanoico	-	D-Fructosa	+++
Ác. cólico	-	Ác. succínico	+	D-Sorbitol	-
Ác. quenodesoxicólico	+++	Ác. fumárico	+	D-Xilosa	+
Ác. litocólico	+++	Ác. málico	+	D-Sorbosa	+
Ác. ursodesoxicólico	+	Ác. cítrico	+++	D-Manitol	+
Ác. deshidrocólico	+	Ác. glucónico	+	L-Arabinosa	+
Ác. 5β-colánico	-			L-Fucosa	+
Progesterona	++			Ác. D-glucurónico	+
Prednisona	+				
5-Pregnen-3β-ol-20-ona	+++				
Testosterona	+++				
17α-Metiltestosterona	++				
β-Estradiol	-				
trans-deshidroandrosterona	++				
Estrona	-				
Androstanolona	+				
trans-androsterona	-				
1-Deshidro-17α-metiltestosterona	++				
4-Androsten-3,17-diona	+++				

Aminoácidos		Comp. aromáticos		Otros compuestos	
L-Isoleucina	+	Ác. 3-OH-fenilacético	-	Ác. ciclohexilacético	-
L-Fenilalanina	+	Ác. 4-OH-fenilacético	-	Ác. adípico	++
L-Tirosina	+	Ác. 2-OH-benzoico	-	Ác. pimélico	++
L-Valina	+++	Ác. 3-OH-benzoico	-	Ác. subérico	++
L-Metionina	+	Ác. 4-OH-benzoico	-	Glicerol	+
L-Histidina	+	Ác. 3-OH-fenilpropiónico	+	Histamina	+
		Ác. 4-OH-fenilpropiónico	+		
		Ác. 3-OH-cinámico	+		
		Ác. 4-OH-cinámico	+		
		Ác. fenilacético	-		
		Ác. benzoico	-		
		Ác. 3-fenilpropiónico	-		
		Ác. fenoxiacético	+		
		Feniletilamina	-		
		Tiramina	+		

2.1.2.5. Cepa COL18.

El análisis de su rDNA 16S (Fig. 30) confirmó que esta cepa pertenecía al género *Tsukamurella*. Morfológicamente, sus colonias presentaban una coloración blanquecina-mate, además de poseer una estructura superficial irregular. Mediante microscopía electrónica, se confirmó su morfología bacilar (Fig. 39).



Figura 39. Fotografía una de las colonias de la cepa COL18 realizada bajo la lupa de microscopía óptica de las colonias (a) y fotografía de microscopía electrónica de barrido las bacterias (b). La barra de escala corresponde a 1mm en el primer caso y a 1µm en el segundo.

La COL18 no producía arginina dihidrolasa pero si producía β -galactosidasa. Era incapaz de hidrolizar gelatina y no producía ureasa ni indol a partir de triptófano (Apéndice II -Tabla 33-).

En cuanto a su capacidad de crecimiento, con respecto a la temperatura, era capaz de crecer entre 10 °C y 37 °C. En esta ocasión se pudo observar que la T^a a la que alcanza mayores valores de absorbancia son 30 °C e inmediatamente después 10 °C. Los valores para 5, 10 y 37 °C son muy similares, si bien entre los dos primeros hay una gran diferencia horaria en cuanto a alcanzar dichos valores se refiere. El crecimiento a 20 °C era muy pobre y finalmente a 45 °C era nulo (Fig. 40).





Figura 40. Comportamiento de la cepa COL18 frente a diferentes condiciones de temperatura al ser cultivada en medio TSB. Las temperaturas comprobadas fueron 5 °C (•), 10 °C (•), 15 °C (\checkmark), 20 °C (•), 30 °C (•), 37 °C (\checkmark) y 45 °C (\checkmark).

Esta cepa podía crecer en medios cuyos valores de pH oscilaban entre 5 y 11, sin embargo no era capaz de crecer en medios que contenían más de un 4% p/v de NaCl (Apéndice II -Tablas 34 y 35-).

Esta cepa, crecía con todos los esteroides utilizados como fuente de carbono y energía, salvo con el ácido desoxicólico. Además, cuando se analizó su capacidad para metabolizar otras fuentes de carbono, tales como ácidos grasos, aminoácidos, azúcares, compuestos del metabolismo central y compuestos hidroxilados, se vio que ésta era la cepa con mayor poder catabólico, ya que podía utilizar prácticamente todos los compuestos comprobados, salvo los ácidos grasos de cadena media (octanoico, nonanoico y decanoico), el ác. glucónico, y los compuestos aromáticos hidroxilados, ácido 4-OH-fenilacético y ácido 2-OH-benzoico. Esta era la primera cepa (no la única), en la que se podía observar un curioso comportamiento metabólico, ya que como se ha comentado, no era capaz de catabolizar el ácido fenilacético cuando éste se hallaba hidroxilado en C₄, sin embargo, sí lo degradaba cuando el hidroxilo se encontraba en C₃, diferenciando así entre isómeros del mismo compuesto. De igual manera, metabolizaba los ácidos 3 y 4-OH-benzoico y no el 2-OH-benzoico (Tabla 6). No obstante, es importante señalar que ésta es la cepa con mayor capacidad metabólica de todas las estudiadas (Apéndice II -Tablas 30, 31 y 32-).

Tabla 6. Diferentes compuestos comprobados con el fin de estudiar la capacidad metabólica de la cepa COL18.

Comp. esteroideos		Ác. grasos e interm. meta	Azúcares		
Colesterol	+++	Ác. acético	+++	D-Glucosa	+++
β-Sitosterol	+++	Ác. propiónico	+++	Sacarosa	+++
Estigmasterol	++	Ác. octanoico	-	Maltosa	+++
Ergosterol	+++	Ác. nonanoico	-	Lactosa	+
Ác. desoxicólico	-	Ác. decanoico	-	D-Fructosa	+++
Ác. cólico	+	Ác. succínico	+++	D-Sorbitol	+++
Ác. quenodesoxicólico	+	Ác. fumárico	+++	D-Xilosa	+
Ác. litocólico	+	Ác. málico	+++	D-Sorbosa	+++
Ác. ursodesoxicólico	+	Ác. cítrico	+++	D-Manitol	+++
Ác. deshidrocólico	+	Ác. glucónico	-	L-Arabinosa	+
Ác. 5β-colánico	+			L-Fucosa	+++
Progesterona	+			Ác. D-glucurónico	+
Prednisona	++				
5-Pregnen-3β-ol-20-ona	+				
Testosterona	+				
17α-Metiltestosterona	+				
β-Estradiol	+				
trans-deshidroandrosterona	+				
Estrona	+				
Androstanolona	+				
trans-androsterona	+				
1-Deshidro-17α-metiltestosterona	+				
4-Androsten-3,17-diona	+				

Aminoácidos		Comp. aromáticos		Otros compuestos	
L-Isoleucina	+	Ác. 3-OH-fenilacético	+	Ác. ciclohexilacético	+
L-Fenilalanina	++	Ác. 4-OH-fenilacético	-	Ác. adípico	++
L-Tirosina	+++	Ác. 2-OH-benzoico	-	Ác. pimélico	++
L-Valina	+++	Ác. 3-OH-benzoico	+	Ác. subérico	+++
L-Metionina	+	Ác. 4-OH-benzoico	+	Glicerol	++
L-Histidina	+++	Ác. 3-OH-fenilpropiónico	+	Histamina	+
		Ác. 4-OH-fenilpropiónico	+		
		Ác. 3-OH-cinámico	++		
		Ác. 4-OH-cinámico	+		
		Ác. fenilacético	+++		
		Ác. benzoico	+++		
		Ác. 3-fenilpropiónico	+		
		Ác. fenoxiacético	+		
		Feniletilamina	+++		
		Tiramina	+		

2.1.2.6. Cepa COL19.

Aislado ambiental bacteriano perteneciente al género *Gordonia* y estrechamente relacionada con *G. hydrophobica* (Fig. 30). Morfológicamente sus colonias son irregulares, de aspecto rugoso, con una coloración blanquecina al ser cultivadas en medio TSA. Mediante microscopía electrónica se observó que esta cepa poseía una morfología celular bacilar (Fig. 41).



Figura 41. Fotografías de una colonia observaba con la lupa (a) y de microscopía electrónica de barrido de las bacterias (b) de la cepa COL19. La barra de escala corresponde a 1mm en la fotografía "a" y a 1μ m en la fotografía "b".

No producía arginina dihidrolasa ni β -galactosidasa. Además, era incapaz de hidrolizar tanto gelatina como esculina. No producía ureasa y no formaba indol a partir de triptófano (Apéndice II -Tabla 33-).

Con respecto a su crecimiento, éste se producía a temperaturas entre 10 °C y 37 °C. A 5 °C presentaba cierto crecimiento después de un largo periodo de tiempo de incubación. Al igual que sucedía con las cepas anteriores, la diferencia horaria en el crecimiento a bajas temperaturas, era muy significativa, ya que los máximos valores de absorbancia a 5, 10 y 15 °C, los alcanzaba con una diferencia de 100-150 horas (Fig. 42).





Figura 42. Comportamiento de la cepa COL19 frente a diferentes condiciones de temperatura al ser cultivada en medio TSB. Las temperaturas comprobadas fueron 5 °C (•), 10 °C (•), 15 °C (\checkmark), 20 °C (•), 30 °C (•), 37 °C (\checkmark) y 45 °C (\checkmark).

Los valores de pH entre los que era capaz de crecer, se hallaban comprendidos entre 5 y 11. Además, soportaba altas concentraciones de NaCl (por encima del 10%) (Apéndice II - Tablas 34 y 35-).

En cuanto al análisis de su capacidad metabólica, se comprobó que era una cepa que presentaba una gran dificultad para degradar la mayoría de los compuestos probados. Así, de entre los compuestos de naturaleza esteroidea, sólo era capaz de utilizar el colesterol, el estigmasterol, el ergosterol y el β -sitosterol; entre los azúcares, solamente metabolizaba la sacarosa, la glucosa y la fructosa. Presentaba una marcada incapacidad para degradar compuestos aromáticos, lo que suponía una similitud metabólica con otras dos cepas, la COL14 y la COL16, a pesar de que éstas pertenecían a otro género bacteriano distinto (Apéndice II -Tabla 31-). Finalmente, de entre el resto de componentes probados sólo catabolizaba los ácidos acético, propiónico y glucónico (Tabla 7).

Tabla 7. Diferentes compuestos comprobados con el fin de estudiar la capacidad metabólica de la cepa COL19.

Comp. esteroideos		Ác. grasos e interm. meta	Azúcares		
Colesterol	++	Ác. acético	+++	D-Glucosa	+
β-Sitosterol	++	Ác. propiónico	+++	Sacarosa	++
Estigmasterol	+	Ác. octanoico	-	Maltosa	-
Ergosterol	+	Ác. nonanoico	-	Lactosa	-
Ác. desoxicólico	-	Ác. decanoico	-	D-Fructosa	+++
Ác. cólico	-	Ác. succínico	-	D-Sorbitol	-
Ác. quenodesoxicólico	-	Ác. fumárico	-	D-Xilosa	-
Ác. litocólico	-	Ác. málico	-	D-Sorbosa	-
Ác. ursodesoxicólico	-	Ác. cítrico	-	D-Manitol	-
Ác. deshidrocólico	-	Ác. glucónico	+++	L-Arabinosa	-
Ác. 5β-colánico	-			L-Fucosa	-
Progesterona	-			Ác. D-glucurónico	-
Prednisona	-				
5-Pregnen-3β-ol-20-ona	-				
Testosterona	-				
17α-Metiltestosterona	-				
β-Estradiol	-				
trans-deshidroandrosterona	-				
Estrona	-				
Androstanolona	-				
trans-androsterona	-				
1-Deshidro-17α-metiltestosterona	-				
4-Androsten-3,17-diona	-				

Aminoácidos		Comp. aromáticos		Otros compuestos	
L-Isoleucina	-	Ác. 3-OH-fenilacético	-	Ác. ciclohexilacético	-
L-Fenilalanina	-	Ác. 4-OH-fenilacético	-	Ác. adípico	-
L-Tirosina	-	Ác. 2-OH-benzoico	-	Ác. pimélico	-
L-Valina	-	Ác. 3-OH-benzoico	-	Ác. subérico	-
L-Metionina	-	Ác. 4-OH-benzoico	-	Glicerol	-
L-Histidina	-	Ác. 3-OH-fenilpropiónico	-	Histamina	-
		Ác. 4-OH-fenilpropiónico	-		
		Ác. 3-OH-cinámico	-		
		Ác. 4-OH-cinámico	-		
		Ác. fenilacético	-		
		Ác. benzoico	-		
		Ác. 3-fenilpropiónico	-		
		Ác. fenoxiacético	-		
		Feniletilamina	-		
		Tiramina	-		

2.1.2.7. Cepa COL20.

El análisis de su rDNA 16S, permitió adscribir este aislado medioambiental al género *Gordonia*, estando estrechamente relacionado con *G. australis* (Fig. 30). Sus colonias presentaban una superficie irregular, con aspecto rugoso y color blanquecino cuando era cultivada en medio TSA. Mediante microscopía electrónica se observó que esta cepa poseía una morfología celular bacilar (Fig. 43).



Figura 43. Fotografías a la lupa de las colonias (a) y de microscopía electrónica de las bacterias (b) de la cepa COL20. La barra de escala corresponde a 1mm en la primera fotografía y a 1μ m en la segunda.

No producía arginina dihidrolasa ni β -galactosidasa. Aunque era capaz de hidrolizar esculina, no era capaz de hidrolizar la gelatina. Producía ureasa y no formaba indol a partir de triptófano (Apéndice II -Tabla 33-).

Su crecimiento tenía lugar a temperaturas comprendidas entre los 10 °C y los 37 °C, alcanzando los mayores valores de absorbancia a los 10 y 15 °C, aunque con una evidente diferencia horaria entre ellas. Asimismo, también crecía bien a 30 y 37°C, mostraba un pobre crecimiento a 20 °C, muy escaso a 5 °C y nulo a 45 °C (Fig. 44).





Figura 44. Comportamiento de la cepa COL20 frente a diferentes condiciones de temperatura al ser cultivada en medio TSB. Las temperaturas comprobadas fueron 5 °C (\bullet), 10 °C (\bullet), 15 °C ($\mathbf{\nabla}$), 20 °C (\bullet), 30 °C ($\mathbf{\bullet}$), 37 °C ($\mathbf{\nabla}$) y 45 °C ($\mathbf{\nabla}$).

El rango de pH en el cual era capaz de crecer, se hallaba comprendido entre 5 y 11 y toleraba un alto valor de salinidad en el medio (por encima del 10% de NaCl) (Apéndice II - Tablas 34 y 35-).

En cuanto a su capacidad degradativa, era capaz de metabolizar muchos de los esteroides probados, sin embargo no mineralizaba el ácido desoxicólico, el ácido cólico, el ácido ursodesoxicólico, el ácido deshidrocólico, el ácido 5 β -colánico, el estradiol y la estrona (Tabla 8). Por otra parte, era incapaz de catabolizar los ácidos grasos de cadena media (octanoico, nonanoico y decanoico), degradaba bien compuestos intermediarios del Ciclo de Krebs (ácidos succínico, málico, fumárico), metabolizaba algunos compuestos aromáticos (ácidos 3 y 4-OH-fenilpropiónico y la feniletilamina), y de entre los azúcares era capaz de utilizarlos todos salvo el sorbitol (Tabla 8).

Tabla 8. Diferentes compuestos comprobados con el fin de estudiar la capacidad metabólica de la cepa COL20.

Comp. esteroideos		Ác. grasos e interm. meta	Azúcares		
Colesterol	++	Ác. acético	+++	D-Glucosa	++
β-Sitosterol	++	Ác. propiónico	+++	Sacarosa	+++
Estigmasterol	+	Ác. octanoico	-	Maltosa	+
Ergosterol	+	Ác. nonanoico	-	Lactosa	+
Ác. desoxicólico	-	Ác. decanoico	-	D-Fructosa	+++
Ác. cólico	-	Ác. succínico	++	D-Sorbitol	-
Ác. quenodesoxicólico	+++	Ác. fumárico	+	D-Xilosa	+
Ác. litocólico	+++	Ác. málico	+	D-Sorbosa	+
Ác. ursodesoxicólico	-	Ác. cítrico	+++	D-Manitol	+
Ác. deshidrocólico	-	Ác. glucónico	-	L-Arabinosa	+
Ác. 5β-colánico	-			L-Fucosa	+
Progesterona	+++			Ác. D-glucurónico	+
Prednisona	+				
5-Pregnen-3β-ol-20-ona	+++				
Testosterona	+++				
17α-Metiltestosterona	+				
β-Estradiol	-				
trans-deshidroandrosterona	+++				
Estrona	-				
Androstanolona	+				
trans-androsterona	+				
1-Deshidro-17α-metiltestosterona	+				
4-Androsten-3,17-diona	+++				

Aminoácidos		Comp. aromáticos		Otros compuestos	
L-Isoleucina	+	Ác. 3-OH-fenilacético	-	Ác. ciclohexilacético	+
L-Fenilalanina	+	Ác. 4-OH-fenilacético	-	Ác. adípico	+
L-Tirosina	+	Ác. 2-OH-benzoico	-	Ác. pimélico	++
L-Valina	+++	Ác. 3-OH-benzoico	-	Ác. subérico	++
L-Metionina	+	Ác. 4-OH-benzoico	-	Glicerol	+
L-Histidina	+	Ác. 3-OH-fenilpropiónico	+	Histamina	+
		Ác. 4-OH-fenilpropiónico	+		
		Ác. 3-OH-cinámico	+		
		Ác. 4-OH-cinámico	+		
		Ác. fenilacético	-		
		Ác. benzoico	-		
		Ác. 3-fenilpropiónico	-		
		Ác. fenoxiacético	+		
		Feniletilamina	-		
		Tiramina	+		

2.1.2.8. Cepa COL21.

La cepa COL21 pertenece también al género *Gordonia* (Fig. 30). Morfológicamente, sus colonias presentan una superficie irregular, tienen aspecto rugoso y color blanquecino al ser cultivadas en medio TSA. Mediante microscopía electrónica se confirmó que esta cepa poseía una morfología celular bacilar (Fig. 45).



Figura 45. Fotografía colonias observadas con la lupa (a) y de microscopía electrónica de las bacterias (b) de la cepa COL21. La barra de escala corresponde a 1mm en la primera fotografía y 1µm en la segunda fotografía.

Este aislado no producía arginina dihidrolasa y tampoco β -galactosidasa. Además, era incapaz de hidrolizar la gelatina pero si la esculina. Producía ureasa y no generaba indol a partir de triptófano (Apéndice II -Tabla 33-).

Esta bacteria podía crecer a temperaturas comprendidas entre 10 °C y 37 °C, alcanzando los máximos valores de absorbancia a 10 y 15° C. Sin embargo, también presentaba un buen crecimiento a 20, 30 y 37 °C, mientras que éste era pobre a 5 °C y nulo a 45 °C (Fig. 46).





Figura 46. Comportamiento de la cepa COL21 frente a diferentes condiciones de temperatura al ser cultivada en medio TSB. Las temperaturas comprobadas fueron 5 °C (\bullet), 10 °C (\bullet), 15 °C (\bigtriangledown), 20 °C (\bullet), 30 °C (\bullet), 37 °C (\checkmark) y 45 °C (\checkmark).

Asimismo, era capaz de crecer en un rango de pH comprendido entre los valores 5 y 11, además de soportar altos niveles de NaCl (Apéndice II -Tablas 34 y 35-).

En cuanto a su capacidad de degradar compuestos esteroideos, era exactamente la misma que la de la cepa anterior COL20, aunque se podía observar una menor capacidad para catabolizar los ácidos quenodesoxicólico y litocólico (Tabla 9). Cuando se comprobó su capacidad para metabolizar otras fuentes de carbono, se observó que seguía teniendo una alta similitud con la cepa COL20, pero se diferenciaba de ésta en algunos compuestos que no era capaz de metabolizar (fenilalanina y metionina). Cabe destacar que, al igual que la COL18, su capacidad degradativa discernía entre dos isómeros de una molécula, ya que era capaz de crecer en medios que contenían como fuentes de carbono los ácidos 3-OH-cinámico y 4-OH-fenilpropiónico, y no en aquellos suplementados con el ácido 4-OH-cinámico o el ácido 3-OH-fenilpropiónico (Tabla 9).

Tabla 9. Diferentes compuestos comprobados con el fin de estudiar la capacidad metabólica de la cepa COL21.

Comp. esteroideos		Ác. grasos e interm. metabólicos		Azúcares	
Colesterol	++	Ác. acético	+++	D-Glucosa	++
β-Sitosterol	++	Ác. propiónico	+++	Sacarosa	+++
Estigmasterol	+	Ác. octanoico	-	Maltosa	+
Ergosterol	+	Ác. nonanoico	-	Lactosa	+
Ác. desoxicólico	-	Ác. decanoico	-	D-Fructosa	+++
Ác. cólico	-	Ác. succínico	+	D-Sorbitol	-
Ác. quenodesoxicólico	+	Ác. fumárico	+	D-Xilosa	+
Ác. litocólico	+	Ác. málico	+	D-Sorbosa	-
Ác. ursodesoxicólico	-	Ác. cítrico	++	D-Manitol	+
Ác. deshidrocólico	-	Ác. glucónico	+	L-Arabinosa	+
Ác. 5β-colánico	-			L-Fucosa	+
Progesterona	+++			Ác. D-glucurónico	+
Prednisona	+				
5-Pregnen-3β-ol-20-ona	+++				
Testosterona	+++				
17α-Metiltestosterona	+				
β-Estradiol	-				
trans-deshidroandrosterona	+++				
Estrona	-				
Androstanolona	+				
trans-androsterona	+				
1-Deshidro-17α-metiltestosterona	+				
4-Androsten-3,17-diona	++				

Aminoácidos		Comp. aromáticos		Otros compuestos	
L-Isoleucina	+	Ác. 3-OH-fenilacético	-	Ác. ciclohexilacético	+
L-Fenilalanina	-	Ác. 4-OH-fenilacético	-	Ác. adípico	+
L-Tirosina	+	Ác. 2-OH-benzoico	-	Ác. pimélico	++
L-Valina	+++	Ác. 3-OH-benzoico	-	Ác. subérico	+++
L-Metionina	-	Ác. 4-OH-benzoico	-	Glicerol	-
L-Histidina	+	Ác. 3-OH-fenilpropiónico	-	Histamina	+
		Ác. 4-OH-fenilpropiónico	+		
		Ác. 3-OH-cinámico	+		
		Ác. 4-OH-cinámico	-		
		Ác. fenilacético	-		
		Ác. benzoico	-		
		Ác. 3-fenilpropiónico	-		
		Ác. fenoxiacético	-		
		Feniletilamina	-		
		Tiramina	+		

2.1.2.9. Cepa COL22.

Esta bacteria pertenece al género *Rhodococcus*, según el análisis de su rDNA 16S (Fig. 30). Morfológicamente, las colonias son de forma regular, circular, convexa y translúcidas, además de poseer un aspecto suave-cremoso y una pigmentación *beige* al ser cultivadas en medio TSA. Mediante microscopía electrónica se confirmó una morfología celular cocoidebacilar (Fig. 47).



Figura 47. Fotografía realizada con lupa estereoscópica de las colonias (a) y microscopía electrónica de las bacterias (b) de la cepa COL22. La barra de escala corresponde a 1mm en la primera y a 1μ m en la segunda.

Atendiendo a los resultados obtenidos en los estudios fisiológicos realizados con esta cepa, se pudo observar que no formaba esporas, poseía actividad catalásica y era oxidasa negativa. No producía arginina dihidrolasa pero si β -galactosidasa. Era incapaz de hidrolizar la gelatina pero si la esculina. Producía ureasa y no formaba indol a partir de triptófano (Apéndice II -Tabla 33-).

Su crecimiento tenía lugar entre 5 °C y 37 °C, siendo 10 °C la temperatura a la cual alcanza los mayores valores de absorbancia. La novedad en esta cepa, es que inmediatamente después de los 10 °C, la temperatura a la que mejor crecimiento se observa es 5 °C. También crecía muy bien a 15 °C y bastante bien a 20, 30 y 37 °C, mientras que al igual que en las demás cepas el crecimiento era nulo a 45 °C. En lo que al tiempo de crecimiento se refiere, a temperaturas más bajas, tardaba más en crecer y a medida que aumenta dicha temperatura, la velocidad de crecimiento se incrementaba (Fig. 48).





Figura 48. Comportamiento de la cepa COL22 frente a diferentes condiciones de temperatura al ser cultivada en medio TSB. Las temperaturas comprobadas fueron 5 °C (•), 10 °C (•), 15 °C (\checkmark), 20 °C (•), 30 °C (•), 37 °C (\checkmark) y 45 °C (\checkmark).

Además, el rango de pH en el cual era capaz de crecer estaba comprendido entre los valores 5 y 11. En cuanto a su resistencia a la presencia de sal, se comprobó que esta cepa era capaz de soportar altos niveles de salinidad (por encima del 10% de NaCl) (Apéndice II - Tablas 34 y 35-).

Al analizar su capacidad degradativa, se comprobó que metabolizaba ciertos esteroides pero no todos, siendo incapaz de metabolizar el β -sitosterol, el estigmasterol, el ergosterol, el ácido desoxicólico, el ácido 5 β -colánico, el β -estradiol y la estrona (Tabla 10). No catabolizaba ácidos grasos de cadena media y tampoco algunos de los aminoácidos probados, como la tirosina y la metionina. Además, tampoco degradaba aminas, tales como la feniletilamina, la tiramina y la histamina. Esta cepa también presentaba una diferencia en su comportamiento catabólico, con respecto a los compuestos aromáticos, ya que era capaz de degradar los ácidos fenilacético y 3-OH-fenilacético, pero no el 4-OH-fenilacético, degradaba el ácido 4-OH-benzoico, pero no otros compuestos relacionados con éste y era incapaz de degradar ácidos aromáticos con una cadena lateral de 3 carbonos (Tabla 10).

Tabla 10. Diferentes compuestos comprobados con el fin de estudiar la capacidad metabólica de la cepa COL22.

Comp. esteroideos		Ác. grasos e interm. meta	bólicos	Azúcares	
Colesterol	++	Ác. acético	+	D-Glucosa	+
β-Sitosterol	-	Ác. propiónico	+	Sacarosa	+
Estigmasterol	-	Ác. octanoico	-	Maltosa	+
Ergosterol	-	Ác. nonanoico	-	Lactosa	-
Ác. desoxicólico	-	Ác. decanoico	-	D-Fructosa	+++
Ác. cólico	+++	Ác. succínico	++	D-Sorbitol	++
Ác. quenodesoxicólico	+++	Ác. fumárico	++	D-Xilosa	-
Ác. litocólico	+++	Ác. málico	+	D-Sorbosa	++
Ác. ursodesoxicólico	+++	Ác. cítrico	+	D-Manitol	+
Ác. deshidrocólico	+++	Ác. glucónico	-	L-Arabinosa	+
Ác. 5β-colánico	-			L-Fucosa	+
Progesterona	+++			Ác. D-glucurónico	-
Prednisona	+				
5-Pregnen-3β-ol-20-ona	+++				
Testosterona	+++				
17α-Metiltestosterona	+				
β-Estradiol	-				
trans-deshidroandrosterona	+++				
Estrona	-				
Androstanolona	+++				
trans-androsterona	+++				
1-Deshidro-17α-metiltestosterona	++				
4-Androsten-3,17-diona	+++				

Aminoácidos		Comp. aromáticos		Otros compuestos	
L-Isoleucina	+	Ác. 3-OH-fenilacético	+++	Ác. ciclohexilacético	-
L-Fenilalanina	+++	Ác. 4-OH-fenilacético	-	Ác. adípico	+++
L-Tirosina	-	Ác. 2-OH-benzoico	-	Ác. pimélico	++
L-Valina	++	Ác. 3-OH-benzoico	-	Ác. subérico	+++
L-Metionina	-	Ác. 4-OH-benzoico	+	Glicerol	+++
L-Histidina	+	Ác. 3-OH-fenilpropiónico	-	Histamina	-
		Ác. 4-OH-fenilpropiónico	-		
		Ác. 3-OH-cinámico	-		
		Ác. 4-OH-cinámico	-		
		Ác. fenilacético	+++		
		Ác. benzoico	-		
		Ác. 3-fenilpropiónico	-		
		Ác. fenoxiacético	-		
		Feniletilamina	-		
		Tiramina	-		

2.1.2.10. Cepa COL23.

Este aislado ambiental bacteriano fue incluído dentro del género *Gordonia*, en base al análisis de su rDNA 16S (Fig. 30). Morfológicamente, las colonias son irregulares, de aspecto rugoso y con una coloración blanquecina-*beige* al ser cultivadas en medio TSA. Mediante microscopía electrónica de barrido se pudo observar una morfología bacilar para esta cepa (Fig. 49).



Figura 49. Fotografía de las colonias visualizadas con una lupa estereoscópica (a) y microscopía electrónica de las bacterias (b) de la cepa COL23. La barra de escala corresponde a 1mm en la fotografía de las colonias y a 1µm en la fotografía de las bacterias.

La cepa COL23, no producía arginina dihidrolasa ni β -galactosidasa. Tampoco era capaz de hidrolizar la gelatina ni la esculina. No producía ureasa y no generaba indol a partir de triptófano (Apéndice II -Tabla 33-).

Desde un punto de vista físicoquímico, crecía en una horquilla de temperaturas de entre 10 °C y 37 °C, siendo este crecimiento muy bueno a 10, 15 y 30 °C. Además, a dichas temperaturas, este crecimiento era inversamente proporcional al tiempo que tardaba en alcanzarlo. Por otra parte, el crecimiento fue bueno a 20 y 37 °C, muy escaso a 5 °C e inexistente a 45 °C (Fig. 50).





Figura 50. Comportamiento de la cepa COL23 frente a diferentes condiciones de temperatura al ser cultivada en medio TSB. Las temperaturas comprobadas fueron 5 °C (\bullet), 10 °C (\bullet), 15 °C (\bigtriangledown), 20 °C (\bullet), 30 °C (\bullet), 37 °C (\checkmark) y 45 °C (\checkmark).

En cuanto al pH, presentaba crecimiento en un rango de valores de entre 5 y 11, y toleraba altas concentraciones de NaCl (iguales o mayores 10% p/v) (Apéndice II -Tablas 34 y 35-).

En lo que a su capacidad metabólica se refiere, no degradaba algunos de los compuestos esteroideos probados tales como el estigmasterol, el ergosterol, el ácido desoxicólico, el ácido cólico, el ácido ursodesoxicólico, el ácido deshidrocólico, el ácido 5β-colánico y la estrona (Tabla 11). Cuando, al igual que en las anteriores cepas, se comprobó su capacidad para metabolizar otras fuentes de carbono, se pudo ver que catabolizaba los ácidos grasos de cadena corta, acético y propiónico, los ácidos dicarboxílicos adípico, pimélico y subérico, los aminoácidos isoleucina, fenilalanina, tirosina y valina y los azúcares sacarosa, maltosa, glucosa y fructosa (Tabla 11). En esta cepa llama mucho la atención la incapacidad para metabolizar compuestos aromáticos hidroxilados, al igual que ocurría en las cepas COL14, COL16 y COL19 (Apéndice II -Tabla 31-).

Tabla 11. Diferentes compuestos comprobados con el fin de estudiar la capacidad metabólica de la cepa COL23.

Comp. esteroideos		Ác. grasos e interm. metabólicos		Azúcares	
Colesterol	++	Ác. acético	+	D-Glucosa	++
β-Sitosterol	+++	Ác. propiónico	+	Sacarosa	+
Estigmasterol	-	Ác. octanoico	-	Maltosa	+
Ergosterol	-	Ác. nonanoico	-	Lactosa	-
Ác. desoxicólico	-	Ác. decanoico	-	D-Fructosa	+++
Ác. cólico	-	Ác. succínico	-	D-Sorbitol	-
Ác. quenodesoxicólico	+++	Ác. fumárico	-	D-Xilosa	-
Ác. litocólico	+++	Ác. málico	-	D-Sorbosa	-
Ác. ursodesoxicólico	-	Ác. cítrico	-	D-Manitol	-
Ác. deshidrocólico	-	Ác. glucónico	+	L-Arabinosa	-
Ác. 5β-colánico	-			L-Fucosa	+
Progesterona	+++			Ác. D-glucurónico	-
Prednisona	+				
5-Pregnen-3β-ol-20-ona	+++				
Testosterona	+++				
17α-Metiltestosterona	+				
β-Estradiol	+				
trans-deshidroandrosterona	+++				
Estrona	-				
Androstanolona	+				
trans-androsterona	+				
1-Deshidro-17α-metiltestosterona	+				
4-Androsten-3,17-diona	++				

Aminoácidos		Comp. aromáticos		Otros compuestos	
L-Isoleucina	++	Ác. 3-OH-fenilacético	-	Ác. ciclohexilacético	+
L-Fenilalanina	+	Ác. 4-OH-fenilacético	-	Ác. adípico	+
L-Tirosina	+	Ác. 2-OH-benzoico	-	Ác. pimélico	+
L-Valina	++	Ác. 3-OH-benzoico	-	Ác. subérico	++
L-Metionina	-	Ác. 4-OH-benzoico	-	Glicerol	+
L-Histidina	-	Ác. 3-OH-fenilpropiónico	-	Histamina	-
		Ác. 4-OH-fenilpropiónico	-		
		Ác. 3-OH-cinámico	-		
		Ác. 4-OH-cinámico	-		
		Ác. fenilacético	+		
		Ác. benzoico	-		
		Ác. 3-fenilpropiónico	+		
		Ác. fenoxiacético	+		
		Feniletilamina	-		
		Tiramina	-		

2.1.2.11. Cepa COL25.

Esta cepa bacteriana pertenecería al género *Rhodococcus* (Fig. 30). Morfológicamente, sus colonias son regulares, circulares, convexas y translúcidas, además de poseer un aspecto suave y una coloración grisácea al cultivarla en medio TSA. Mediante microscopía electrónica de barrido se determinó que tenían una forma celular cocoide (Fig. 51).



Figura 51. Fotografía resultante de la observación a la lupa de las colonias (a) y de microscopía electrónica de las bacterias (b) de la cepa COL25. La barra de escala corresponde a 1mm en la primera de ellas y a 1μ m en la segunda.

Los estudios estructurales y fisiológicos a los que fue sometida pusieron de manifiesto que esta cepa no formaba esporas, presentaba actividad catalásica y era oxidasa negativa. No producía arginina dihidrolasa pero si β -galactosidasa. Además, aunque era incapaz de hidrolizar la gelatina, sí hidrolizaba la esculina y producía ureasa, sin embargo no formaba indol a partir de triptófano (Apéndice II -Tabla 33-).

La cepa COL25, presentaba crecimiento en un rango de temperaturas que iba desde los 5 °C hasta los 30 °C. La absorbancia alcanzada a bajas temperaturas (5 °C y 10 °C) era elevada, aunque a 5 °C sufría un considerable retraso. A 20 °C el crecimiento observado era moderado, siendo nulo a 37 y 45 °C. Se pueden observar unos valores de crecimiento muy parecidos con respecto a las temperaturas de 15 y 30 °C (Fig. 52).





Figura 52. Comportamiento de la cepa COL25 frente a diferentes condiciones de temperatura al ser cultivada en medio TSB. Las temperaturas comprobadas fueron 5 °C (\bullet), 10 °C (\bullet), 15 °C ($\mathbf{\nabla}$), 20 °C (\bullet), 30 °C ($\mathbf{\bullet}$), 37 °C ($\mathbf{\nabla}$) y 45 °C ($\mathbf{\nabla}$).

Asimismo, el rango de pH en el que era capaz de crecer, estaba comprendido entre valores de 5 y de 11, y soportaba altas concentraciones de NaCl (por encima del 10%) (Apéndice II -Tablas 34 y 35-).

En cuanto a la capacidad de degradar esteroides, se comprobó que era incapaz de metabolizar el β-sitosterol, el estigmasterol, el ergosterol, el ácido desoxicólico, el ácido 5β-colánico, el β-estradiol y la estrona (Tabla 12). También se comprobó su capacidad para metabolizar otras fuentes de carbono y se constató, que al igual que el resto de cepas, no degradaba ácidos grasos de cadena media. Sin embargo, catabolizaba ácidos dicarboxílicos y la mayoría de los azúcares probados (Tabla 12). De entre los aminoácidos, los únicos que no utilizaba como fuente de carbono y energía, eran la tirosina y la metionina. Además de todo esto, también se podía apreciar una notable incapacidad para degradar compuestos aromáticos hidroxilados, salvo el ácido 3-OH-fenilacético y el ácido 4-OH-benzoico. Con respecto a esto último, hay que reseñar la capacidad catabólica de esta cepa para discernir entre dos isómeros moleculares, ya que, si bien crece en presencia de ambos ácidos hidroxilados, no lo hace con el ácido 4-OH-fenilacético, ni con el ácido 2-OH-benzoico, ni con el ácido 3-OH-benzoico (Tabla 12). Este discernimiento entre isómeros de un mismo compuesto, ya se había observado en las cepas COL18, COL21 y COL22 (Apéndice II -Tabla 31-).

Tabla 12. Diferentes compuestos comprobados con el fin de estudiar la capacidad metabólica de la cepa COL25.

Comp. Esteroideos		Ác. grasos e interm. metabólicos		Azúcares	
Colesterol	++	Ác. acético	+	D-Glucosa	+
β-Sitosterol	-	Ác. propiónico	+	Sacarosa	+
Estigmasterol	-	Ác. octanoico	-	Maltosa	+
Ergosterol	-	Ác. nonanoico	-	Lactosa	-
Ác. desoxicólico	-	Ác. decanoico	-	D-Fructosa	+++
Ác. cólico	+++	Ác. succínico	++	D-Sorbitol	+++
Ác. quenodesoxicólico	+++	Ác. fumárico	++	D-Xilosa	-
Ác. litocólico	+++	Ác. málico	+	D-Sorbosa	++
Ác. ursodesoxicólico	+++	Ác. cítrico	++	D-Manitol	+++
Ác. deshidrocólico	++	Ác. glucónico	+	L-Arabinosa	+
Ác. 5β-colánico	-			L-Fucosa	+
Progesterona	+++			Ác. D-glucurónico	-
Prednisona	+				
5-Pregnen-3β-ol-20-ona	+++				
Testosterona	+++				
17α-Metiltestosterona	++				
β-Estradiol	-				
trans-deshidroandrosterona	+++				
Estrona	-				
Androstanolona	+++				
trans-androsterona	+++				
1-Deshidro-17α-metiltestosterona	++				
4-Androsten-3,17-diona	++				

Aminoácidos		Comp. aromáticos		Otros compuestos	
L-Isoleucina	++	Ác. 3-OH-fenilacético	+++	Ác. ciclohexilacético	-
L-Fenilalanina	+++	Ác. 4-OH-fenilacético	-	Ác. adípico	+++
L-Tirosina	-	Ác. 2-OH-benzoico	-	Ác. pimélico	++
L-Valina	++	Ác. 3-OH-benzoico	-	Ác. subérico	+++
L-Metionina	-	Ác. 4-OH-benzoico	+++	Glicerol	+++
L-Histidina	+	Ác. 3-OH-fenilpropiónico	-	Histamina	-
		Ác. 4-OH-fenilpropiónico	-		
		Ác. 3-OH-cinámico	-		
		Ác. 4-OH-cinámico	-		
		Ác. fenilacético	+++		
		Ác. benzoico	+++		
		Ác. 3-fenilpropiónico	-		
		Ác. fenoxiacético	-		
		Feniletilamina	-		
		Tiramina	-		

2.1.2.12. Cepa COL26.

Esta cepa también pertenecería al género *Gordonia* (Fig. 30). Morfológicamente sus colonias son, a diferencia de las demás cepas de este género, circulares, convexas, de aspecto cremoso y color anaranjado-rojizo al sembrarla en medio TSA. Mediante microscopía electrónica se determinó para esta cepa una morfología celular cocoidal (Fig. 53).



Figura 53. Fotografía tomada durante la observación de las colonias mediante la lupa estereoscópica (a) y fotografía de microscopía electrónica de las bacterias (b) de la cepa COL26. La barra de escala corresponde a 1mm de la izquierda, y a 1 μ m en la fotografía de la derecha.

La cepa COL26 no producía arginina dihidrolasa y tampoco β -galactosidasa. Era incapaz de hidrolizar tanto la gelatina como la esculina. No producía ni ureasa, ni indol a partir de triptófano (Apéndice II -Tabla 33-).

En cuanto a los parámetros fisicoquímicos de crecimiento, se pudo observar que dicho crecimiento, tenía lugar en una horquilla de temperaturas entre 10 °C y 37 °C. Las temperaturas a las que se alcanzan mayores valores de absorbancia son 10 y 15 °C, mientras que a 30 °C también presenta muy buen crecimiento, bastante bueno a 20 °C y 37 °C, pobre a 5 °C e inexistente a 45 °C (Fig. 54).





Figura 54. Comportamiento de la cepa COL26 frente a diferentes condiciones de temperatura al ser cultivada en medio TSB. Las temperaturas comprobadas fueron 5 °C (•), 10 °C (•), 15 °C (\checkmark), 20 °C (•), 30 °C (•), 37 °C (\checkmark) y 45 °C (\checkmark).

Por otra parte, el crecimiento de esta cepa tenía lugar en un rango de valores de pH comprendidos entre 5 y 11. Además, era capaz de tolerar la alta salinidad, es decir, altas concentraciones de NaCl (hasta el 10% p/v) (Apéndice II -Tablas 34 y 35-).

En cuanto a su habilidad para degradar esteroides, se constató que solamente era capaz de metabolizar el colesterol, el β -sitosterol, el ergosterol, la testosterona y la 4-androsten-3,17-diona, mostrando por lo tanto una escasa capacidad catabólica para asimilar este tipo de compuestos (Tabla 13). Cuando se comprobó su capacidad para metabolizar otras fuentes de carbono, se vió que, al igual que las demás cepas, no degradaba ácidos grasos de cadena larga, pero sí intermediarios metabólicos del Ciclo de Krebs (Tabla 13). Además, al igual que se ha descrito en otras cepas, discriminaba entre distintos isómeros de determinados compuestos aromáticos hidroxilados (Apéndice II -Tabla 31-).

Tabla 13. Diferentes compuestos comprobados con el fin de estudiar la capacidad metabólica de la cepa COL26.

Comp. esteroideos		Ác. grasos e interm. metabólicos		Azúcares	
Colesterol	++	Ác. acético	+	D-Glucosa	++
β-Sitosterol	+++	Ác. propiónico	+	Sacarosa	+
Estigmasterol	-	Ác. octanoico	-	Maltosa	++
Ergosterol	+	Ác. nonanoico	-	Lactosa	+
Ác. desoxicólico	-	Ác. decanoico	-	D-Fructosa	+++
Ác. cólico	-	Ác. succínico	+	D-Sorbitol	+++
Ác. quenodesoxicólico	-	Ác. fumárico	++	D-Xilosa	-
Ác. litocólico	-	Ác. málico	+	D-Sorbosa	+++
Ác. ursodesoxicólico	-	Ác. cítrico	++	D-Manitol	+++
Ác. deshidrocólico	-	Ác. glucónico	+	L-Arabinosa	+
Ác. 5β-colánico	-			L-Fucosa	++
Progesterona	-			Ác. D-glucurónico	+
Prednisona	-				
5-Pregnen-3β-ol-20-ona	-				
Testosterona	++				
17α-Metiltestosterona	-				
β-Estradiol	-				
trans-deshidroandrosterona	-				
Estrona	-				
Androstanolona	-				
trans-androsterona	-				
1-Deshidro-17α-metiltestosterona	-				
4-Androsten-3,17-diona	+				

Aminoácidos		Comp. aromáticos		Otros compuestos	
L-Isoleucina	+	Ác. 3-OH-fenilacético	+	Ác. ciclohexilacético	+
L-Fenilalanina	+	Ác. 4-OH-fenilacético	-	Ác. adípico	+++
L-Tirosina	+	Ác. 2-OH-benzoico	-	Ác. pimélico	+
L-Valina	-	Ác. 3-OH-benzoico	-	Ác. subérico	+++
L-Metionina	-	Ác. 4-OH-benzoico	+++	Glicerol	+
L-Histidina	-	Ác. 3-OH-fenilpropiónico	-	Feniletilamina	-
		Ác. 4-OH-fenilpropiónico	-	Tiramina	-
		Ác. 3-OH-cinámico	-	Histamina	-
		Ác. 4-OH-cinámico	-		
		Ác. fenilacético	+++		
		Ác. benzoico	+++		
		Ác. 3-fenilpropiónico	+		
		Ác. fenoxiacético	-		
		Feniletilamina	-		
		Tiramina	-		

2.1.2.13. Cepa COL27.

Este aislado ambiental bacteriano se incluyó dentro de las especies pertenecientes al género *Rhodococcus*, según el análisis de su rDNA 16S (Fig. 30). Morfológicamente, sus colonias son circulares, convexas, de contorno regular, translúcidas, de aspecto suave y coloración anaranjada al sembrarla en medio TSA. Mediante microscopía electrónica se constató que poseía una morfología celular cocoidal (Fig. 55).



Figura 55. Fotografía de la observación con microscopía óptica de las colonias (a) y electrónica de las bacterias (b) de la cepa COL27. La barra de escala corresponde a 1mm en la fotografía de microscopía óptica y a 1µm en la fotografía de microscopía electrónica.

Otro tipo de estudios permitió concluir que la cepa COL27 no producía arginina dihidrolasa ni β -galactosidasa. Era incapaz de hidrolizar tanto gelatina como esculina. Asimismo, tampoco producía ureasa, ni indol a partir de triptófano (Apéndice II -Tabla 33-).

Esta cepa era capaz de crecer a una temperatura entre 10 °C y 37 °C, alcanzando esta vez los valores más altos de absorbancia a 20 °C, mientras que a 45 °C, el crecimiento era nulo (Fig. 56).





Figura 56. Comportamiento de la cepa COL27 frente a diferentes condiciones de temperatura al ser cultivada en medio TSB. Las temperaturas comprobadas fueron 5 °C (\bullet), 10 °C (\bullet), 15 °C (\bigtriangledown), 20 °C (\bullet), 30 °C (\bullet), 37 °C (\checkmark) y 45 °C (\checkmark).

En referencia al pH, la cepa crecía en medios en los que los valores de pH oscilaban entre 5 y 11. Además, soportaba concentraciones de NaCl de hasta el 10% p/v (Apéndice III - Tablas 34 y 35-).

Al comprobar su habilidad para degradar compuestos de naturaleza esteroidea, se vio que era incapaz de degradar el estigmasterol, el ergosterol, el ácido desoxicólico, el ácido 5 β -colánico, la prednisona, la 17 α -metiltestosterona, el β -estradiol y la estrona (Tabla 14).

Finalmente, se pudo constatar su crecimiento en otras fuentes de carbono y, como particularidad, cabe destacar que era una de las pocas cepas que no era capaz de degradar los ácidos adípico, pimélico y subérico (Tabla 14). Además, era una de las cepas, junto con la COL30, que mejor crecía en aquellos compuestos aromáticos hidroxilados susceptibles de ser degradados, siendo también de discriminar entre diferentes isómeros hidroxilados de dichos compuestos (Apéndice II -Tabla 31-).

Tabla 14. Diferentes compuestos comprobados con el fin de estudiar la capacidad metabólica de la cepa COL27.

Comp. esteroideos		Ác. grasos e interm. metabólicos		Azúcares	
Colesterol	++	Ác. acético	+	D-Glucosa	-
β-Sitosterol	+	Ác. propiónico	+	Sacarosa	-
Estigmasterol	-	Ác. octanoico	-	Maltosa	-
Ergosterol	-	Ác. nonanoico	-	Lactosa	-
Ác. desoxicólico	-	Ác. decanoico	-	D-Fructosa	-
Ác. cólico	+++	Ác. succínico	+	D-Sorbitol	-
Ác. quenodesoxicólico	+++	Ác. fumárico	++	D-Xilosa	-
Ác. litocólico	+++	Ác. málico	+	D-Sorbosa	-
Ác. ursodesoxicólico	+++	Ác. cítrico	-	D-Manitol	-
Ác. deshidrocólico	++	Ác. glucónico	-	L-Arabinosa	-
Ác. 5β-colánico	-			L-Fucosa	-
Progesterona	+++			Ác. D-glucurónico	-
Prednisona	-				
5-Pregnen-3β-ol-20-ona	+++				
Testosterona	+++				
17α-Metiltestosterona	-				
β-Estradiol	-				
trans-deshidroandrosterona	+++				
Estrona	-				
Androstanolona	+++				
trans-androsterona	+++				
1-Deshidro-17α-metiltestosterona	+				
4-Androsten-3,17-diona	++				

Aminoácidos		Comp. aromáticos		Otros compuestos	
L-Isoleucina	-	Ác. 3-OH-fenilacético	+++	Ác. ciclohexilacético	-
L-Fenilalanina	-	Ác. 4-OH-fenilacético	-	Ác. adípico	-
L-Tirosina	-	Ác. 2-OH-benzoico	-	Ác. pimélico	-
L-Valina	-	Ác. 3-OH-benzoico	-	Ác. subérico	-
L-Metionina	-	Ác. 4-OH-benzoico	+++	Glicerol	-
L-Histidina	-	Ác. 3-OH-fenilpropiónico	+++	Histamina	-
		Ác. 4-OH-fenilpropiónico	-		
		Ác. 3-OH-cinámico	+++		
		Ác. 4-OH-cinámico	+++		
		Ác. fenilacético	-		
		Ác. benzoico	-		
		Ác. 3-fenilpropiónico	+++		
		Ác. fenoxiacético	-		
		Feniletilamina	-		
		Tiramina	-		

2.1.2.14. Cepa COL28.

Aislado ambiental bacteriano perteneciente al género *Rhodococcus*, según el análisis de su rDNA 16S (Fig. 30). Morfológicamente esta cepa presentaba unas colonias regulares, circulares, convexas, traslúcidas, de aspecto suave y color pardo-blanquecino, al sembrarla en medio TSA. Mediante microscopía electrónica se constató que poseía una morfología celular cocoidal (Fig. 57).



Figura 57. Fotografía de las colonias observadas con una lupa estereoscópica (a) y de microscopía electrónica de las bacterias (b) de la cepa COL28. La barra de escala corresponde a 1mm en la primera fotografía y a 1μ m en la segunda.

Esta cepa no producía arginina dihidrolasa ni β -galactosidasa, era incapaz de hidrolizar la gelatina y la esculina, no producía ureasa ni tampoco indol a partir de triptófano (Apéndice II -Tabla 33-).

En cuanto a su crecimiento con respecto a la temperatura de incubación, era capaz de crecer en un rango de temperaturas comprendidas entre 10 °C hasta 37 °C. Dicho crecimiento era óptimo a 15 °C, bastante bueno a 10 °C y bueno, pero en menor medida, a 20, 30 y 37 °C. A 5 °C es casi inexistente y, como en las cepas anteriores, nulo a 45 °C (Fig. 58).




Figura 58. Comportamiento de la cepa COL28 frente a diferentes condiciones de temperatura al ser cultivada en medio TSB. Las temperaturas comprobadas fueron 5 °C (•), 10 °C (•), 15 °C (\checkmark), 20 °C (•), 30 °C (•), 37 °C (\checkmark) y 45 °C (\checkmark).

Con respecto al pH, COL28 era capaz de crecer en un rango de valores comprendidos entre 5 y 11. Esta cepa presentaba una alta tolerancia a la salinidad, ya que soportaba altas concentraciones de NaCl (Apéndice II -Tablas 34 y 35-).

En referencia a su capacidad para degradar esteroides, no era capaz de metabolizar el estigmasterol, el ácido desoxicólico, el ácido 5 β -colánico, la prednisona, el β -estradiol y la estrona (Tabla 15). Cuando se comprobó su capacidad para metabolizar otras fuentes de carbono, se pudo observar que poseía una capacidad catabólica similar a la cepa COL25, salvo que no utilizaba los ácidos glucónico y benzoico, el sorbitol y el glicerol. Sin embargo, sí degradaba los ácidos ciclohexilacético y glucuránico, y el aminoácido tirosina (Tabla 15). Asimismo, y como ya se ha visto hasta ahora en muchas cepas, discriminaba entre algunos isómeros de determinados compuestos aromáticos hidroxilados (Apéndice II -Tabla 31-).

 Tabla 15. Diferentes compuestos comprobados con el fin de estudiar la capacidad metabólica de la cepa COL28.

Comp. esteroideos		Ác. grasos e interm. meta	Azúcares		
Colesterol	++	Ác. acético	+	D-Glucosa	+
β-Sitosterol	+	Ác. propiónico	+	Sacarosa	+
Estigmasterol	-	Ác. octanoico	-	Maltosa	+
Ergosterol	+	Ác. nonanoico	-	Lactosa	-
Ác. desoxicólico	-	Ác. decanoico	-	D-Fructosa	+
Ác. cólico	+++	Ác. succínico	++	D-Sorbitol	-
Ác. quenodesoxicólico	+++	Ác. fumárico	++	D-Xilosa	-
Ác. litocólico	+++	Ác. málico	+	D-Sorbosa	+
Ác. ursodesoxicólico	+++	Ác. cítrico	++	D-Manitol	+
Ác. deshidrocólico	++	Ác. glucónico	-	L-Arabinosa	+
Ác. 5β-colánico	-			L-Fucosa	+
Progesterona	+++			Ác. D-glucurónico	+
Prednisona	-				
5-Pregnen-3β-ol-20-ona	+++				
Testosterona	+++				
17α-Metiltestosterona	++				
β-Estradiol	-				
trans-deshidroandrosterona	+++				
Estrona	-				
Androstanolona	+++				
trans-androsterona	+++				
1-Deshidro-17α-metiltestosterona	++				
4-Androsten-3,17-diona	++				

Aminoácidos		Comp. aromáticos		Otros compuest	tos
L-Isoleucina	+	Ác. 3-OH-fenilacético	+++	Ác. ciclohexilacético	+
L-Fenilalanina	+	Ác. 4-OH-fenilacético	-	Ác. adípico	+
L-Tirosina	+	Ác. 2-OH-benzoico	-	Ác. pimélico	+
L-Valina	++	Ác. 3-OH-benzoico	-	Ác. subérico	+++
L-Metionina	-	Ác. 4-OH-benzoico	+	Glicerol	-
L-Histidina	+++	Ác. 3-OH-fenilpropiónico	-	Histamina	-
		Ác. 4-OH-fenilpropiónico	-		
		Ác. 3-OH-cinámico	-		
		Ác. 4-OH-cinámico	-		
		Ác. fenilacético	+++		
		Ác. benzoico	-		
		Ác. 3-fenilpropiónico	-		
		Ác. fenoxiacético	-		
		Feniletilamina	-		
		Tiramina	-		

2.1.2.15. Cepa COL29.

COL 29 también pertenece al género *Rhodococcus* (Fig. 30). Morfológicamente, sus colonias eran regulares, circulares, convexas, traslúcidas, de aspecto cremoso y color amarillento al sembrarla en medio TSA. Mediante microscopía electrónica se constató que poseía una morfología celular cocoidal (Fig. 59).



Figura 59. Fotografía de las colonias observadas con una lupa estereoscópica (a) y de microscopía electrónica de las bacterias (b) de la cepa COL29. La barra de escala corresponde a 1mm en la primera fotografía y a 1μ m en la segunda.

Esta bacteria era incapaz de hidrolizar la gelatina y tampoco la esculina. No producía ureasa, ni indol a partir de triptófano (Apéndice II -Tabla 33-).

En cuanto al estudio de su crecimiento a diferentes temperaturas, se comprobó que era capaz de crecer en una horquilla de temperaturas desde 10 °C hasta 37 °C. Presenta un crecimiento muy similar a la cepa anterior, con la diferencia de que la temperatura óptima es de 10 °C (Fig. 60).





Figura 60. Comportamiento de la cepa COL29 frente a diferentes condiciones de temperatura al ser cultivada en medio TSB. Las temperaturas comprobadas fueron 5 °C (\bullet), 10 °C (\bullet), 15 °C (\bigtriangledown), 20 °C (\bullet), 30 °C (\bullet), 37 °C (\checkmark) y 45 °C (\checkmark).

Soportaba altas concentraciones de NaCl y era capaz de crecer en un rango de valores de pH entre 5 y 11 (Apéndice II -Tablas 34 y 35-).

Desde un punto de vista metabólico, esta bacteria se reveló como la cepa con menor capacidad degradativa de entre todas las estudiadas en esta Tesis Doctoral (Apéndice II – Tablas 30, 31 y 32). Así pues, en referencia a los compuestos de naturaleza esteroidea que era capaz de catabolizar, solamente utilizaba el colesterol, el ácido quenodesoxicólico y la 1- deshidro-17 α -metiltestosterona como fuentes de carbono y energía (Tabla 16). Asimismo, se comprobó que sólo degradaba los ácidos succínico, fumárico, 3-OH-fenilacético (no así el 4-OH-fenilacético) y 4-OH-benzoico (pero no el 2 y 3-OH-benzoico). Por otra parte, no era capaz de metabolizar ninguno de los azúcares ni de los aminoácidos probados (Tabla 16). Es pues, la cepa con menos potencial catabólico de todas las estudiadas.

Tabla 16. Diferentes compuestos comprobados con el fin de estudiar la capacidad metabólica de la cepa COL29.

Comp. esteroideos		Ác. grasos e interm. meta	Azúcares		
Colesterol	+	Ác. acético	-	D-Glucosa	-
β-Sitosterol	-	Ác. propiónico	-	Sacarosa	-
Estigmasterol	-	Ác. octanoico	-	Maltosa	-
Ergosterol	-	Ác. nonanoico	-	Lactosa	-
Ác. desoxicólico	-	Ác. decanoico	-	D-Fructosa	-
Ác. cólico	-	Ác. succínico	+	D-Sorbitol	-
Ác. quenodesoxicólico	+++	Ác. fumárico	+	D-Xilosa	-
Ác. litocólico	-	Ác. málico	-	D-Sorbosa	-
Ác. ursodesoxicólico	-	Ác. cítrico	-	D-Manitol	-
Ác. deshidrocólico	-	Ác. glucónico	-	L-Arabinosa	-
Ác. 5β-colánico	-			L-Fucosa	-
Progesterona	-			Ác. D-glucurónico	-
Prednisona	-				
5-Pregnen-3β-ol-20-ona	-				
Testosterona	-				
17α-Metiltestosterona	-				
β-Estradiol	-				
trans-deshidroandrosterona	-				
Estrona	-				
Androstanolona	-				
trans-androsterona	-				
1-Deshidro-17α-metiltestosterona	+				
4-Androsten-3,17-diona	-				

Aminoácidos		Comp. aromáticos		Otros compuest	tos
L-Isoleucina	-	Ác. 3-OH-fenilacético	+	Ác. ciclohexilacético	-
L-Fenilalanina	-	Ác. 4-OH-fenilacético	-	Ác. adípico	-
L-Tirosina	-	Ác. 2-OH-benzoico	-	Ác. pimélico	-
L-Valina	-	Ác. 3-OH-benzoico	-	Ác. subérico	-
L-Metionina	-	Ác. 4-OH-benzoico	+	Glicerol	-
L-Histidina	-	Ác. 3-OH-fenilpropiónico	-	Histamina	-
		Ác. 4-OH-fenilpropiónico	-		
		Ác. 3-OH-cinámico	-		
		Ác. 4-OH-cinámico	-		
		Ác. fenilacético	-		
		Ác. benzoico	-		
		Ác. 3-fenilpropiónico	-		
		Ác. fenoxiacético	-		
		Feniletilamina	-		
		Tiramina	-		

2.1.2.16. Cepa COL30.

El análisis del rDNA 16S, permitió concluir que la cepa COL30 pertenecía al género *Rhodococcus* (Fig. 30). Morfológicamente sus colonias eran regulares, circulares, convexas, traslúcidas, de aspecto cremoso y color amarillo intenso al sembrar esta cepa en medio TSA. Mediante microscopía electrónica se constató que poseía una morfología celular cocoidal (Fig. 61).



Figura 61. Fotografía de las colonias observadas con una lupa estereoscópica (a) y de microscopía electrónica de las bacterias (b) de la cepa COL30. La barra de escala corresponde a 1mm en la primera fotografía y a 1μ m en la segunda.

La COL 30 no producía arginina dihidrolasa ni β -galactosidasa. No era capaz de hidrolizar ni la gelatina, ni la esculina. No producía ureasa y tampoco indol a partir de triptófano (Apéndice II -Tabla 33-).

Esta cepa era capaz de crecer en un rango de temperaturas entre 10 °C y 37 °C. Es evidente que la temperatura óptima era 15 °C, muy por encima del crecimiento observado con 10, 20, 30 y 37 °C. Finalmente, a 5 y 45 °C, dicho crecimiento era muy pobre (Fig. 62).





Figura 62. Comportamiento de la cepa COL30 frente a diferentes condiciones de temperatura al ser cultivada en medio TSB. Las temperaturas comprobadas fueron 5°C (\bullet), 10°C (\bullet), 15°C (\bigtriangledown), 20°C (\bullet), 30°C (\bullet), 37°C (\bigtriangledown) y 45°C (\bigtriangledown).

Con respecto al pH se podía observar crecimiento en un rango de valores entre 5 y 11, y su resistencia al NaCl era elevada, ya que soportaba concentraciones de hasta un 10% p/v (Apéndice II -Tablas 34 y 35-).

Esta cepa era una de las que poseía una mayor capacidad para degradar compuestos esteroideos, ya que solamente era incapaz de metabolizar el ácido desoxicólico, el ácido 5 β -colánico, la prednisona, el β -estradiol y la estrona (Tabla 17). Sin embargo, en cuanto al resto de compuestos comprobados, ácidos grasos, compuestos intermediarios del Ciclo de Krebs, compuestos aromáticos, ácidos dicarboxílicos, azúcares y aminoácidos, cabe destacar que catabolizaba con eficacia algunos de los compuestos aromáticos hidroxilados mencionados (Tabla 17).

 Tabla 17. Diferentes compuestos comprobados con el fin de estudiar la capacidad metabólica de la cepa COL30.

Comp. esteroideos		Ác. grasos e interm. meta	Azúcares		
Colesterol	++	Ác. acético	+	D-Glucosa	-
β-Sitosterol	+++	Ác. propiónico	+	Sacarosa	-
Estigmasterol	+	Ác. octanoico	-	Maltosa	-
Ergosterol	++	Ác. nonanoico	-	Lactosa	-
Ác. desoxicólico	-	Ác. decanoico	-	D-Fructosa	-
Ác. cólico	++	Ác. succínico	-	D-Sorbitol	-
Ác. quenodesoxicólico	+++	Ác. fumárico	-	D-Xilosa	-
Ác. litocólico	+++	Ác. málico	-	D-Sorbosa	-
Ác. ursodesoxicólico	+++	Ác. cítrico	-	D-Manitol	-
Ác. deshidrocólico	++	Ác. glucónico	-	L-Arabinosa	-
Ác. 5β-colánico	-			L-Fucosa	-
Progesterona	+++			Ác. D-glucurónico	-
Prednisona	-				
5-Pregnen-3β-ol-20-ona	+++				
Testosterona	+++				
17α-Metiltestosterona	++				
β-Estradiol	-				
trans-deshidroandrosterona	++				
Estrona	-				
Androstanolona	+++				
trans-androsterona	+++				
1-Deshidro-17α-metiltestosterona	++				
4-Androsten-3,17-diona	++				

Aminoácidos		Comp. aromáticos		Otros compuest	ros compuestos	
L-Isoleucina	-	Ác. 3-OH-fenilacético	+++	Ác. ciclohexilacético	-	
L-Fenilalanina	-	Ác. 4-OH-fenilacético	-	Ác. adípico	-	
L-Tirosina	-	Ác. 2-OH-benzoico	-	Ác. pimélico	-	
L-Valina	-	Ác. 3-OH-benzoico	+	Ác. subérico	-	
L-Metionina	-	Ác. 4-OH-benzoico	+++	Glicerol	-	
L-Histidina	-	Ác. 3-OH-fenilpropiónico	+++	Histamina	-	
		Ác. 4-OH-fenilpropiónico	-			
		Ác. 3-OH-cinámico	+++			
		Ác. 4-OH-cinámico	+++			
		Ác. fenilacético	-			
		Ác. benzoico	-			
		Ác. 3-fenilpropiónico	+++			
		Ác. fenoxiacético	-			
		Feniletilamina	-			
		Tiramina	-			

2.1.2.17. Cepa COL33.

Esta cepa correspondía a una especie perteneciente al género *Gordonia* (Fig. 30). Morfológicamente sus colonias tienen una apariencia irregular y rugosa, y poseen un color blanquecino al cultivarlas en medio TSA. Mediante microscopía electrónica se comprobó que poseía una morfología coco-bacilar (Fig. 63).



Figura 63. Fotografía de las colonias observadas con una lupa estereoscópica (a) y de microscopía electrónica de las bacterias (b) de la cepa COL33. La barra de escala corresponde a 1mm en la primera fotografía y a 1μ m en la segunda.

Esta cepa bacteriana no producía arginina dihidrolasa ni β -galactosidasa. Era incapaz de hidrolizar la gelatina y la esculina. No producía ureasa y tampoco indol a partir de triptófano (Apéndice II -Tabla 33-).

En cuanto a la valoración de su crecimiento a diferentes temperaturas, se comprobó que era capaz de crecer en una horquilla de temperaturas entre 10 °C y 37 °C. A 15 °C se observa un crecimiento muy bueno en referencia a los valores de absorbancia obtenidos, seguido a mucha distancia de los proporcionados a 10 °C y más aún de aquellos conseguidos a 20, 30 y 37 °C. Finalmente, el crecimiento a 5 y 45 °C era muy pobre y/o casi inexistente (Fig. 64).





Figura 64. Comportamiento de la cepa COL33 frente a diferentes condiciones de temperatura al ser cultivada en medio TSB. Las temperaturas comprobadas fueron 5 °C (•), 10 °C (•), 15 °C (\checkmark), 20 °C (•), 30 °C (•), 37 °C (\checkmark) y 45 °C (\checkmark).

Con respecto al pH, se podía observar crecimiento en un rango de valores entre 5 y 11. Además toleraba concentraciones de hasta 10% p/v de NaCl (Apéndice II -Tablas 34 y 35-).

En cuanto a su capacidad para utilizar diferentes esteroides, se observó que degradaba el colesterol, el β -sitosterol, el estigmasterol, el ergosterol, el ácido quenodesoxicólico, el ácido litocólico, el ácido ursodesoxicólico, el ácido deshidrocólico, la prednisona y la 17 α -metiltestosterona, no así el resto (Tabla 18). Además, de entre todos los compuestos aromáticos, sólo utilizaba el ácido 4-OH-benzoico. Cabe destacar su escasa capacidad para catabolizar los azúcares probados y su incompetencia para metabolizar diferentes aminoácidos (Tabla 18).

Tabla 18. Diferentes compuestos comprobados con el fin de estudiar la capacidad metabólica de la cepa COL33.

Comp. esteroideos		Ác. grasos e interm. meta	Azúcares		
Colesterol	++	Ác. acético	++	D-Glucosa	++
β-Sitosterol	+++	Ác. propiónico	++	Sacarosa	+
Estigmasterol	+	Ác. octanoico	-	Maltosa	-
Ergosterol	++	Ác. nonanoico	-	Lactosa	-
Ác. desoxicólico	-	Ác. decanoico	-	D-Fructosa	+
Ác. cólico	-	Ác. succínico	-	D-Sorbitol	-
Ác. quenodesoxicólico	+++	Ác. fumárico	-	D-Xilosa	-
Ác. litocólico	+++	Ác. málico	-	D-Sorbosa	-
Ác. ursodesoxicólico	+	Ác. cítrico	+	D-Manitol	-
Ác. deshidrocólico	+	Ác. glucónico	+	L-Arabinosa	-
Ác. 5β-colánico	-			L-Fucosa	-
Progesterona	-			Ác. D-glucurónico	+
Prednisona	+				
5-Pregnen-3β-ol-20-ona	-				
Testosterona	-				
17α-Metiltestosterona	+				
β-Estradiol	-				
trans-deshidroandrosterona	-				
Estrona	-				
Androstanolona	-				
trans-androsterona	-				
1-Deshidro-17α-metiltestosterona	-				
4-Androsten-3,17-diona	-				

Aminoácidos		Comp. aromáticos		Otros compuest	tos
L-Isoleucina	-	Ác. 3-OH-fenilacético	-	Ác. ciclohexilacético	-
L-Fenilalanina	-	Ác. 4-OH-fenilacético	-	Ác. adípico	-
L-Tirosina	-	Ác. 2-OH-benzoico	-	Ác. pimélico	-
L-Valina	-	Ác. 3-OH-benzoico	-	Ác. subérico	-
L-Metionina	-	Ác. 4-OH-benzoico	++	Glicerol	-
L-Histidina	-	Ác. 3-OH-fenilpropiónico	-	Histamina	-
		Ác. 4-OH-fenilpropiónico	-		
		Ác. 3-OH-cinámico	-		
		Ác. 4-OH-cinámico	-		
		Ác. fenilacético	-		
		Ác. benzoico	-		
		Ác. 3-fenilpropiónico	-		
		Ác. fenoxiacético	-		
		Feniletilamina	-		
		Tiramina	-		

2.1.3. Resumen de las características catabólicas de las diferentes cepas COL.

La capacidad de las cepas COL para utilizar esteroides y otros compuestos como fuente de carbono (Apéndice II -Tablas 30, 31 y 32-) se estudió cultivando estas cepas en medio mínimo suplementado con dichos esteroides. Una característica común a todas ellas es que eran capaces de utilizar ácidos grasos de cadena corta (acético, propiónico) pero no ácidos grasos de cadena media (octanoico, nonanoico y decanoico) (Apéndice II -Tabla 31-).

Las especies pertenecientes al género *Tsukamurella* (COL14, COL16 y COL18), eran capaces de metabolizar el colesterol, el β -sitosterol, el estigmasterol y el ergosterol. Las cepas COL14 y COL16 no degradaban otros esteroides, salvo la 1-deshidro-17 α -metiltestosterona, la cual era escasamente degradada por la cepa COL16, y el ácido deshidrocólico, que era ligeramente metabolizado por ambas cepas, mientras que la cepa COL18 era capaz de utilizar todos estos compuestos (Apéndice II -Tabla 30-). Curiosamente, esta cepa era capaz de degradar, aunque muy pobremente, compuestos esteroideos no metabolizados por otras cepas COL (salvo la cepa COL11), como por ejemplo el ácido 5 β -colánico, el β -estradiol y la estrona.

Estas tres cepas, COL 14, 16 y 18, además, eran capaces de utilizar una larga lista de azúcares, así como intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos o ciclo de Krebs. Sin embargo, la capacidad para utilizar aminoácidos y compuestos aromáticos hidroxilados, solamente la mostraba la cepa COL18 (Apéndice II -Tablas 31 y 32-).

Las cepas pertenecientes al género *Gordonia* (COL11, COL17, COL19, COL20, COL21, COL23, COL26 y COL33), en su mayoría, eran capaces de utilizar como única fuente de carbono todos los esteroides probados. Aunque el estigmasterol y el ergosterol no eran tan eficientemente metabolizados como el colesterol y el β -sitosterol. No obstante, la cepa COL23 era incapaz de metabolizar los dos primeros y la COL26 era incapaz de utilizar el estigmasterol, pero si el ergosterol, el colesterol y el β -sitosterol, además de la testosterona y la 4-androsten-3,17-diona. Curiosamente, la cepa COL19 catabolizaba esteroles pero no otros esteroides (Apéndice II -Tabla 30-).

Por otra parte, mientras la cepa COL19 utilizaba solo un grupo limitado de fuentes de carbono (sacarosa, fructosa, glucosa, ácido acético o ácido propiónico), la cepa COL26 era capaz de asimilar diferentes azúcares, ácidos dicarboxílicos y metabolitos centrales, como el ácido fumárico y el ácido cítrico (Apéndice II -Tablas 31 y 32-).

Otras cepas de *Gordonia* como la COL20, COL21 y COL23, eran capaces de degradar el ácido quenodesoxicólico y el ácido litocólico, pero no otros ácidos biliares como el ácido

desoxicólico o el ácido ursodesoxicólico (Apéndice II -Tabla 30-). Sin embargo, las fuentes de carbono utilizadas por la COL11, COL17 y COL33, incluían los ácidos quenodesoxicólico, litocólico, desoxicólico y ursodesoxicólico. El metabolismo de la cepa COL33 estaba casi completamente restringido para la utilización de esteroles, los ácidos biliares anteriormente mencionados, la prednisona y la 17 α -metiltestosterona (Apéndice II -Tabla 30-). Otras cepas COL, como la COL11, COL17, COL20, COL21 y COL23, eran capaces de degradar la progesterona, la prednisona, la 5-pregnen-3 β -ol-20-ona, la 17 α -metiltestosterona, la 1-deshidro-17 α -metiltestosterona, la testosterona, la *trans*-deshidroandrosterona, la androstanolona y la 4-androsten-3,17-diona (Apéndice II -Tabla 30-).

Tanto la cepa COL11, perteneciente al género *Gordonia*, como la COL18 del género *Tsukamurella*, presentaban como curiosidad la capacidad para metabolizar ciertos compuestos esteroideos, como el ácido 5 β -colánico, el β -estradiol (también degradado por la cepa COL23) y la estrona (Apéndice II -Tabla 30-), ya que estos tres compuestos no eran degradados por el resto de cepas analizadas.

En cuanto a las cepas pertenecientes al género *Rhodococcus*, la mayoría de ellas solo metabolizaban colesterol de entre todos los esteroles testados, sin embargo, la cepa COL30 era capaz de degradar todos ellos. Por el contrario, la cepa COL29 poseía un metabolismo esteroideo muy pobre, ya que solamente era capaz de utilizar el colesterol, el ácido quenodesoxicólico y la 1-deshidro-17α-metiltestosterona como únicas fuentes de carbono (Apéndice II -Tabla 30-). Por otra parte, esta cepa mostraba un escaso potencial catabólico ya que solo crecía en medios que contenían ácido succínico, ácido fumárico, ácido 3-OH-benzoico o ácido 4-OH-fenilacético como únicas fuentes de carbono. No crecía en ninguno de los azúcares ni aminoácidos probados (Apéndice II -Tablas 31 y 32-).

Por el contrario, las cepas COL22, COL25, COL27, COL28 y COL30 presentaban una gran eficiencia en cuanto al uso de ácidos biliares como fuente de carbono, con las únicas excepciones del ácido desoxicólico y el ácido 5β-colánico. Además, la mayoría de estas cepas metabolizaban fácilmente hormonas sexuales con estructura esteroidea así como análogos estructurales de estos compuestos. Sin embargo, ninguno de ellos degradaba el β-estradiol o la estrona (Apéndice II -Tabla 30-). Curiosamente, al analizar el crecimiento en fuentes de carbono no esteroide, se determinó que COL27 y COL30 eran incapaces de metabolizar azúcares, aminoácidos, ácidos dicarboxílicos, etc., aunque ambas cepas crecían bien en medio de composición química definida (medio mínimo -MM-), que contenía compuestos aromáticos como única fuente de carbono. Por el contrario las cepas COL22, COL25 y COL28, degradaban solo algunos de estos compuestos (Apéndice II -Tablas 31 y 32-).

2.2. Estudio y caracterización de los aislados bacterianos Gram-negativos con capacidad de degradar ácido desoxicólico (cepas DOC21 y DOC19).

Se aislaron más de 40 colonias con capacidad de crecer en medio mínimo con ácido desoxicólico como única fuente de carbono. Sin embargo, después de llevar a cabo su caracterización, se pudo concluir que todas ellas pertenecían únicamente a dos cepas Gramnegativas diferentes, a las que denominamos DOC19 y DOC21.

2.2.1. Caracterización y estudios filogenéticos de las cepas DOC.

2.2.1.1. Análisis del rDNA 16S.

Con el objetivo de situar taxonómicamente ambas cepas, se realizaron estudios basados en el análisis de su rDNA 16S. El análisis de la secuencia del rDNA 16S (Apéndice I -Apdo 1.2.-) obtenida mediante amplificación por PCR con los oligonucleótidos universales 6F y 1510R (Apéndice III -Tabla 39-), mostraba altos porcentajes de similitud entre la cepa DOC19 y dos cepas pertenecientes al género *Pseudomonas: Pseudomonas putida* cepa KF715, implicada en la degradación de compuestos bifenilos y bifenilos policlorados (Hayase *et al.*, 1990; Nishi *et al.*, 2000) y *Pseudomonas monteilli* SB 3067 (98,6 y 98,5% de identidad respectivamente). Sin embargo, la cepa DOC21 se encontraba muy relacionada con las cepas *Pseudomonas putida* KF715, *Pseudomonas asplenii* ATCC 23835^T y *Pseudomonas fuscovaginae* MAFF 301177^T (99,3, 99,0 y 99,0% de identidad respectivamente), en concreto con la rama formada por estas dos especies evolutivamente ligadas a *P. putida*. El porcentaje de identidad basado en la comparación de secuencias con los dos aislados fue del 98,4%. El estudio comparativo de las secuencias del rDNA 16S, sugería la inclusión de ambas cepas dentro del grupo de *Pseudomonas putida* (Anzai *et al.*, 2000).

Por otra parte, la cepa *P. putida* DOC21 se encontraba muy relacionada filogenéticamente con *P. fuscovaginae* y *P. asplenii*, en concreto con la rama formada por estas dos especies filogenéticamente ligadas a *P. putida*. Para la cepa DOC19, se determinó,

una cercana relación con *P. filiscindens*, formando una rama filogenética conjunta con *P. putida* DOC21, *P. fuscovaginae* y *P. asplenii*. De esta manera, los cambios en el rDNA 16S, desde un punto de vista evolutivo, evidencian la fuerte relación entre estas dos cepas con el grupo de las *P. putida* (Fig. 65-A).

2.2.1.2. Análisis del gen rpoB.

Con el fin de obtener una mayor precisión en la catalogación filogenética de estas cepas, se llevó a cabo la determinación de la secuencia parcial de gen rpoB (codifica la subunidad β de la RNA polimerasa) de *P. putida* DOC21 y DOC19, así como de *P. putida* U, cepa perteneciente a nuestra colección (Martínez-Blanco et al., 1990) y utilizada en esta Tesis Doctoral como cepa de referencia para comparar crecimiento, capacidad metabólica, etc. (Apéndice I -Apdo 2-). Este gen, que proporciona una alternativa fiable para la adscripción filogenética de pseudomonádidos (Adékambi et al., 2009), ha sido utilizado exitosamente para analizar las relaciones filogenéticas entre especies pertenecientes al género Pseudomonas (Ait Tayeb et al., 2005). Sorprendentemente, el análisis filogenético basado en el gen rpoB y realizado mediante su amplificación parcial, con los oligonucleótidos específicos, LAPS5 y LAPS27 (Apéndice III - Tabla 39-), mostraba que ambas cepas estaban agrupadas juntas y además pertenecían a la rama común, en el árbol filogenético, en la que se encontraban las cepas correspondientes al mencionado "grupo P. putida" (Fig. 65-B). Además, se llevó a cabo la comparación de las secuencias parciales del gen rpoB de estas cepas, con la secuencia completa de dicho gen, de la cepa Pseudomonas putida KT2440, obtenida del proyecto genoma depositado en la base de datos del NCBI. Esta puesta en común, reveló que estas secuencias eran prácticamente idénticas, lo cual corroboraba la gran proximidad entre las cepas y confirmaba la pertenencia de éstas al género Pseudomonas.

En resumen, se puede aseverar a tenor de los estudios evolutivos basados en el análisis y comparación de los genes del rDNA 16S y del *rpo*B, la vinculación tanto de la DOC21 como de la DOC19 con el "grupo *P. putida*".



Figura 65. Relaciones filogenéticas de las cepas *Pseudomonas putida* DOC21 y DOC19 con otras cepas pertenecientes al género *Pseudomonas*. Dicho historial evolutivo se obtuvo mediante el análisis del rDNA 16S (A) y el gen *rpoB* (B), utilizándose para la comparación de secuencias el método eficiente de categorización o *clustering* denominado "*Neighbor-Joining method*" (Saitou & Nei, 1987), e incluyéndose las secuencias de *P. putida* U, *P. putida* KT2440 y *P. putida* F1. Ambos árboles se diseñaron tomando las secuencias de la cepa *Salmonella enterica* LT2^T para dotarlos de una raíz ancestral.

2.2.2. Caracterización morfológica y fisiológica de los aislados degradadores de ácido desoxicólico.

2.2.2.1. Estudios morfológicos.

El exámen macroscópico de las colonias formadas por las cepas DOC21 y DOC19, cuando eran cultivadas en medio TSA y/o LB sólido a 30 °C durante 24h, mostraron que poseían una morfología circular y convexa, y que tenían un aspecto cremoso y translúcido. Además, eran de forma circular y convexa y de aspecto cremoso y translúcido. Sin embargo, las colonias de la cepa DOC19 tenían una pigmentación amarillenta (Fig. 66-A), mientras que las colonias de la cepa DOC21 eran blanquecinas (Fig. 66-C). La observación de las cepas en el microscopio electrónico de barrido reveló una morfología bacilar para ambas cepas, aunque la DOC19 (1,3-2,2 μ m de largo x 0,6-0,7 μ m de diámetro) tenía una superficie de aspecto suave y regular (Fig. 66-B). Por el contrario, la cepa DOC21 (1,6-2,4 μ m de largo x 0,4-0,7 μ m de diámetro) presentaba una morfología más irregular, con una superficie rugosa, recubierta por una especie de grietas o ranuras (Fig. 66-D). Ambas cepas eran móviles ya que una tinción negativa mostraba la posesión de flagelos polares.



Figura 66. Diferentes fotografías de las cepas DOC21 (C, D) y DOC19 (A, B). En ellas se aprecian perfectamente las diferencias entre ambos microorganismos, tanto a nivel macroscópico (fotografías A y C, efectuadas al observar a las colonias con una lupa estereoscópica) como microscópico (fotografías B y D de microscopía electrónica de barrido). La barra de escala corresponde a 1mm en las fotos de microscopía óptica, y a 1µm en microscopía electrónica.

2.2.2.1. Estudios fisiológicos.

Tanto la cepa DOC19 como la cepa DOC21 son microorganismos aerobios estrictos, que poseen un metabolismo oxidativo no fermentativo y ninguna de las dos forman esporas.

Ambas cepas, así como las cepas control utilizadas por su proximidad filogenética, *Pseudomonas putida* KT2440, F1 y U, producían catalasa y oxidasa. En ensayos realizados con las tiras reactivas API NE, se demostró que, mientras que las cepas *P. putida* U y KT2440 presentaban actividad arginina dihidrolásica, las cepas F1, DOC19 y DOC21 no poseían esta actividad. Por otra parte, estas cinco cepas de *Pseudomonas* no producían indol a partir de triptófano, ni tampoco ureasa ni β -galactosidasa. Asimismo, tanto la cepa DOC21 como la cepa DOC19, al igual que las cepas control, no reducían nitratos a nitritos, es decir, no eran capaces de realizar procesos de desnitrificación. Ninguna de las cinco cepas era capaz de hidrolizar la gelatina. Además, las cepas *P. putida* DOC19, F1 y U, podían hidrolizar la esculina, mientras que las cepas *P. putida* KT2440 y DOC21 no podían hacerlo (Tabla 19). Por otra parte, se pudo comprobar que ambos aislados, DOC21 y DOC19, eran resistentes al antibiótico ampicilina, tolerando concentraciones comprendidas entre 100 y 200 µg/ml⁻¹.

Cuando se analizó la tolerancia de las dos cepas a diferentes valores de pH, concentración salina y temperatura, se comprobó que la cepa DOC19 y la cepa DOC21 tenían un comportamiento muy parecido al que presentaban las cepas control. Así, todas las cepas mostraban una temperatura óptima de crecimiento de 30 °C. También eran capaces de crecer a 4 °C, alcanzando, en algunos casos, valores de absorbancia superiores a los obtenidos a 30 °C, pero requerían para ello más tiempo. Finalmente, ninguna de las cepas crecía a 41 °C, salvo la F1, ya que además de crecer, lo hacía muy eficazmente, alcanzando valores de absorbancia muy elevados (Fig. 67).

Todas las cepas, las *P. putida* DOC21, DOC19, U, KT2440 y F1 eran capaces de crecer en un rango de valor de pH que variaba entre 5 y 11, mientras que ninguna de ellas crecía a pH 4 (Fig. 69). Todas las cepas toleraban valores de NaCl cercanos al 6% (p/v). Sin embargo, si esta concentración se elevaba por encima del 8%, su crecimiento se veía afectado drásticamente (Fig. 70).

Tabla 19. Resultados de la prueba API para microorganismos, obtenidos al realizar dicha prueba sobre las diferentes cepas de Pseudomonas putida.

	Cepas		Cepas control		
Sistema API	P. putida DOC19	P. putida DOC21	P. putida F1	P. putida U	P. putida KT2440
Reducción de nitratos en nitritos	-	-			
Reducción de nitratos en nitrógeno	-	-		-	
Formación de Indol (Triptófano)	-	-			
Fermentación (Glucosa)	-	-		-	
Arginina dihidrolasa	-	-		+	+
Ureasa	-	-			
Hidrólisis (β-glucosidasa) (Esculina)	+	-	+	+	¥
Hidrólisis (Proteasa) (Gelatina)	-	-		-	
β-galactosidasa (p-Nitrofenil-βD- Galactopiranosidasa)	-	-			
Asimilación (Glucosa)	+	-	+	+	+
Asimilación (Arabinosa)	-	-	¥	¥	¥
Asimilación (Manosa)	-	-	+	-	+
Asimilación (Manitol)	-	-		-	
Asimilación (N-acetilglucosamina)	-	-	¥	¥	¥
Asimilación (Maltosa)	-	-		-	
Asimilación (Gluconato potásico)	+	-	+	+	+
Asimilación (Ácido cáprico)	+	+	+	+	+
Asimilación (Ácido adípico)	-	-		-	-
Asimilación (Malato)	+	+	+	+	+
Asimilación (Citrato trisódico)	+	+	+	+	+
Asimilación (Ácido fenilacético)	-	+	+	+	+
Citocromo oxidasa		+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+

Reacción positiva: +; reacción negativa: -



Figura 67. Efecto de las diferentes temperaturas sobre el crecimiento de las distintas cepas de *Pseudomonas putida* sometidas a estudio durante esta Tesis Doctoral. Las temperaturas probadas fueron 4 °C (•), 30 °C (•) y 41 °C (\checkmark).

En el caso de la cepa *P. putida* DOC21, se estudió el efecto a valores intermedios de temperatura, utilizando siempre como control la cepa *P. putida* U. El resultado de dicho experimento reveló que ambas cepas crecían a 10 y 20 °C, si bien la *P. putida* U alcanzaba valores de absorbancia muy superiores a los mostrados por la *P. putida* DOC21. Ambas cepas no presentaban crecimiento alguno ni a 37 °C ni a 45°C (Fig. 68).



Figura 68. Efecto provocado por la temperatura, sobre el crecimiento de las cepas *Pseudomonas putida* DOC21 y *Pseudomonas* putida U (control), al ser expuestas a otras temperaturas diferentes a las anteriores. Las temperaturas probadas fueron 10 °C (\bullet), 20 °C (\bullet), 37 °C (\checkmark), y 45 °C (\checkmark).



Figura 69. Efecto del pH sobre el crecimiento de las diferentes cepas de *Pseudomonas putida* sometidas a estudio. Los valores de pH probados fueron, pH 4 (\bullet), pH 5 (\blacksquare), pH 6 (\bigtriangledown), pH 7 (\bullet), pH 8 (\blacksquare) y pH 9 (\land).



Figura 70. Efecto de la salinidad sobre el crecimiento de las distintas cepas de *Pseudomonas putida* sometidas a estudio. Los porcentajes de NaCl probados fueron, 0% (●), 2% (■), 4% (▼), 6% (●), 8% (■) y 10% (▲) p/v respectivamente.

Adicionalmente, se analizó la producción de los pigmentos piocianina y fluoresceína, tanto en la cepa DOC21 como en la cepa DOC19. Para ello se cultivaron ambas en los medios King A y B (King *et al.*, 1954), comparándose los resultados con los obtendos con las cepas control *P. putida* F1, *P. putida* KT2440 y *P. putida* U. Se pudo comprobar, que ninguna de estas cepas producían piocianina, ni fluoresceína al ser cultivadas durante una semana en los medios indicados. Como curiosidad, cabe destacar que las cepas *P. putida* KT2440 y F1 mostraban una fuerte fluorescencia ante la luz ultravioleta cuando crecían en placas con medio King B durante 24 h, mientras que el resto de cepas DOC21, DOC19 y U, solamente mostraban trazas de fluorescencia después de 100 h de incubación en dicho medio. A la vista de estos resultados, se puede sugerir que tanto en las cepas DOC como en la cepa U, la captura el Fe (III) del medio es llevada a cabo por mecanismos diferentes a los involucrados en la producción de fluoresceína.

2.2.4. Uso de diferentes fuentes de carbono por las cepas DOC.

Las cepas *P. putida* DOC21 y DOC19, así como las cepas control *P. putida* KT2440, F1 y U, no eran capaces de asimilar como fuentes de carbono los ácidos dicarboxílicos: adípico, pimélico y subérico, como única fuente de carbono (Tabla 20). Ninguna de estas cepas era capaz, tampoco, de utilizar azúcares como sacarosa, lactosa, maltosa, D-sorbosa, Larabinosa, L-fucosa, D-sorbitol, D-manitol ni metabolizar N-acetil-D-glucosamina. Curiosamente, el uso de glucosa como única fuente de carbono por parte de la cepa DOC21 era muy ineficiente, contrastando con las otras cepas empleadas y siendo su crecimiento en medio con ácido glucónico como única fuente de carbono, prácticamente despreciable (Tablas 20 y 21).

Sin embargo, todas estas cepas, eran capaces de metabolizar eficientemente intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, así como ácidos grasos con una longitud en su cadena hidrocarbonada de entre 2 y 10 átomos de carbono (Tabla 20). Además, estas cepas acumulaban polihidroxialcanoatos intracelularmente cuando se cultivaban en medio mínimo con ácidos grasos de seis (ácido hexanoico) o más átomos de carbono.

Cuando en los medios mínimos de composición químicamente definida en los que se cultivaron estas cepas se utilizaban distintos aminoácidos como fuente de carbono, éstos servían como sustrato para el crecimiento de todas las cepas, salvo la L-metionina, que no era utilizado por ninguna de las cinco cepas, y la L-fenilalanina, la cual no era utilizada por la cepa DOC19 (Tabla 21).

Asimismo, se observó el potencial de estas cepas como degradadoras de compuestos aromáticos al cultivarlas en medio mínimo con benzoato, fenilacetato, fenilpropionato o diferentes compuestos estrechamente relacionados como única fuente de carbono. La cepa DOC21 asimilaba más eficazmente que la DOC19 los diferentes compuestos aromáticos testados. Sin embargo, el espectro de estos compuestos aromáticos degradados y su asimilación difería entre las diferentes cepas (Tabla 20).

Tabla 20. Crecimiento de las distintas cepas de *Pseudomonas putida* en medio mínimo suplementado con diferentes ácidos grasos (acetato, propionato, etc), intermediarios del metabolismo central (malato, citrato, glicerol), compuestos aromáticos (fenilacetato, benzoato, 3-OH-fenilacetato, 4-OH cinamato, 2-OH-benzoato, etc), como única fuente de carbono, con una concentración final de 5mM.

	Ce	pas			
Fuente de carbono	P. putida DOC19	P. putida DOC21	P. putida F1	P. putida U	P. putida KT2440
Acetato	++	++	++	++	++
Propionato	++	++	++	++	++
Octanoato	+++	+++	+++	+++	+++
Nonanoato	+++	+++	+++	+++	+++
Decanoato	+	+++	+++	+++	+++
Succinato	++	++	++	++	++
Fumarato	++	++	++	++	++
Malato	+++	+++	+++	+++	+++
Citrato	+++	+++	+++	+++	+++
Glicerol	+++	+++	+++	+++	+++
Fenilacetato	-	+++	+++	+++	+++
3-OH-fenilacetato	-	-	-	+++	-
4-OH-fenilacetato		+++		+++	-
Benzoato	+++	-	+++	+++	+++
2-OH-benzoato	-	-	-	+++	-
3-OH-benzoato					-
4-OH-benzoato	+++	+++	+++	+++	+++
3-fenilpropionato	-	+++	•	-	-
3-OH-fenilpropionato		+++			-
4-OH-fenilpropionato	-	-	+++	-	+++
3-OH-cinamato	-	+			-
4-OH-cinamato	-	+	-	-	-
Fenoxiacetato	-	-		-	-
Ciclohexilacetato					-
Adipato	•		•		•
Pimelato	•				
Suberato					al .

Crecimiento óptimo: +++; crecimiento moderado: ++; crecimiento escaso: +; crecimiento nulo: -

NOTA: Todos los compuestos reseñados en la tabla como sales, en un principio eran ácidos: ácido acético, ácido propiónico, ácido octanoico, etc..., pero al preparar las soluciones "stock", se ajustaron dichas soluciones a pH 7-8 con KOH. Así, todos ellos se convirtieron en sales y se añadieron como tal al medio en el que servirían como fuente de carbono para las cepas de *Pseudomonas putida*.

Tabla 21. Crecimiento de las distintas cepas de *Pseudomonas putida* en medio mínimo suplementado con diferentes azúcares, aminoácidos y aminas biogénicas como única fuente de carbono, con una concentración final de 5mM.

	Ce	pas	Cepas control			
Fuente de carbono	P. putida DOC19	P. putida DOC21	P. putida F1	P. putida U	P. putida KT2440	
Lactosa	-	-	-	-	-	
Sacarosa	-	-	-		-	
Maltosa				-	-	
D-Glucosa	+++	+	+++	+++	+++	
D-Fructosa	+++	+	+++	+++	+++	
D-Sorbitol	-	-	-	-	-	
D-Xilosa	-	+	+	+	+	
D -Glucuronato	++	+	++	++	++	
Gluconato	+++	-	+++	+++	+++	
D-Sorbosa	-	-	-	-	-	
D-Manitol	-	-	-	-	-	
L-Arabinosa	-	-	-	-	-	
L-Fucosa	-	-	-	-	-	
L-Isoleucina	++	++	++	++	++	
L-Fenilalanina	-	+	++	++	++	
L-Tirosina	+++	+++	+++	+++	+++	
L-Valina	++	+	++	++	++	
L-Metionina	-	-	-	-	-	
L-Histidina	-	++	++	++	++	
Feniletilamina	-	-	+++	+++	+++	
Tiramina		+++	-	+++	-	
Histamina	-	-	+++	+++	+++	

Crecimiento óptimo: +++; crecimiento moderado: ++; crecimiento escaso: +; crecimiento nulo: -

2.2.5. Estudio del catabolismo de compuestos esteroideos en las cepas DOC.

Ambas cepas, tanto DOC19 como DOC21, eran capaces de crecer en medios que contenían el ácido desoxicólico como única fuente de carbono. Sin embargo, la cepa DOC21 lo hacía más eficientemente (Fig. 71).



Figura 71. Crecimiento de las cepas *P. putida* DOC21 (•) y DOC19 (•) al ser cultivadas en medio mínimo suplementado con ácido desoxicólico a una concentración de 5mM. Sembradas a una D.O. inicial de 0,05.

Con el objetivo de analizar el perfil de compuestos esteroideos que estas cepas eran capaces de utilizar, se las cultivó en medios mínimos suplementados con las moléculas indicadas en la tabla 22. Como puede observarse, ambas cepas eran capaces de metabolizar diferentes ácidos biliares tales como los ácidos cólico, desoxicólico, quenodesoxicólico y deshidrocólico, y además la cepa DOC21, no así la cepa DOC19, también era capaz de degradar el ácido litocólico y el ácido ursodesoxicólico. Sin embargo, las dos cepas utilizaban la testosterona y la 4-androsten-3,17-diona como única fuente de carbono, pero solamente la DOC21 era capaz de metabolizar la androstanolona (Tabla 22).

Tabla 22. Crecimiento de las cepas *Pseudomonas putida* DOC19 y *Pseudomonas putida* DOC21 en medio mínimo sólido suplementado con diferentes compuestos esteroideos como única fuente de carbono con una concentración final de 5mM.

	Cepas			
Fuente de carbono	P. putida DOC19	P. putida DOC21		
Colesterol				
B-Sitosterol				
Estigmasterol				
Ergosterol	-	-		
Ácido desoxicólico	+++	+++		
Ácido cólico	+++	++		
Ácido quenodesoxicólico	+++	+++		
Ácido litocólico		+++		
Ácido ursodesoxicólico		+++		
Ácido deshidrocólico	+++	+		
Ácido 5β-Colánico				
Progesterona		-		
Prednisona		-		
5-Pregnen-3β-ol-20-ona		-		
Testosterona	++	+++		
17α-Metiltestosterona				
β-Estradiol	-	-		
trans-deshidroandrosterona				
Estrona				
Androstanolona		+++		
trans-androsterona		-		
1-Deshidro-17α-Metiltestosterona		-		
4-Androsten-3,17-diona	++	+++		

Crecimiento óptimo: +++; crecimiento moderado: ++; crecimiento escaso: +; crecimiento nulo: -

A partir de estos resultados se puede concluir que:

-La presencia de un grupo hidroxilo con una configuración α o un grupo ceto en posición 3, parece jugar un papel muy importante en el catabolismo de compuestos esteroideos en ambas cepas, ya que todos los esteroides que son capaces de utilizar para crecer, tienen al menos uno de estos dos grupos funcionales en las posiciones mencionadas (Fig. 72), mientras que todos los que presentan un grupo hidroxilo con configuración β en esa posición no son metabolizados.



Figura 72. Configuración α del grupo hidroxilo (A) y ubicación del grupo ceto, ambos en C₃ (indicado en rojo), en la estructura esteroidea.

-Además, el hecho de que ninguna de las cepas fuese capaz de degradar compuestos esteroideos en los cuales el carbono terminal de la cadena lateral, unida al C_{17} no hubiera sido oxidado, sugiere que la presencia de grupos carboxilos en la cadena lateral, es requerida para que ésta pueda comenzar a ser degradada.

Estas hipótesis están apoyadas por las siguientes observaciones:

(i) La cepa DOC21 era capaz de degradar el ácido litocólico, pero no el ácido 5β -colánico; por otra parte, la *trans*-androsterona, que posee un grupo hidroxilo en configuración β , no era catabolizada, en contraste con otros compuestos relativamente homólogos como la testosterona, androstanolona y 4-androsten-3,17-diona. Esta observación afianza la primera de las hipótesis.

(ii) Ni el colesterol, ni otros compuestos análogos estructuralmente, generados por el acortamiento de su cadena alifática (como la 4-pregnen-3β-ol-20-ona), eran degradados por la cepa DOC21, lo cual está en concordancia con la segunda hipótesis. Además, tanto la cepa DOC21 como la cepa DOC19, podían utilizar testosterona como única fuente de carbono, mientras que la progesterona, que es un compuesto análogo desde un punto de vista estructural, no era utilizada.

Teniendo en consideración que *P. putida* DOC21 metabolizaba un mayor número de compuestos esteroideos (Tabla 22) y era capaz de degradar el ácido desoxicólico más eficazmente que *P. putida* DOC19, se tomó a la cepa DOC21 como modelo microbiano Gram negativo para estudiar las rutas catabólicas involucradas en la asimilación y degradación de las sales biliares y de otros esteroides.

3. Análisis de la ruta catabólica responsable de la asimilación de esteroides en la cepa DOC21.

3.1. Caracterización genética de esta ruta.

Con objeto de caracterizar la ruta o rutas metabólicas mediante las cuales la cepa *P. putida* DOC21 era capaz de asimilar determinados compuestos esteroideos, se obtuvieron 53 mutantes de la cepa *P. putida* DOC21 deficientes en el catabolismo de los mismos (Apéndice III -Tabla 37-). Para ello, se utilizó una estrategia mutacional consistente en la inserción aleatoria del transposón Tn5 (Materiales y Métodos -Apdo 12-) (Selvaraj and Lyer, 1983; Herrero *et al.*, 1990). En base a las diferencias en cuanto a su capacidad de metabolizar compuestos esteroideos, se han podido definir, dos grupos de mutantes. El primero está constituido por aquellos mutantes incapaces de crecer en medios mínimos que contenían como única fuente de carbono los ácidos desoxicólico y cólico y la 4-androsten-3,17-diona (4-AD) o la testosterona (24 mutantes). El segundo estaría formado por aquellos mutantes que, mientras que eran incapaces de metabolizar ácidos biliares, sí catabolizaban 4-androsten-3,17-diona o testosterona de igual manera que la cepa original (26 mutantes) (Tabla 23).

Tabla 23. Relación de los diferentes mutantes obtenidos y el punto de inserción del transposón Tn5 en el genoma de P. *putida* DOC21, con la consiguiente interrupción del gen mencionado.

Fenotipo	Mutantes	Proteína codificada por el gen interrumpido
Crecen en testosterona y 4- androsten-3,17-diona, pero no en desoxicolato como únicas fuentes de carbono (5mM)	$\begin{array}{c} 8\\ 9\\ 12\\ 14, 15, 17,\\ 20, 24 26\\ 27\\ 30, 31, 36,\\ 37, 38, 39,\\ 40, 41\\ 43\\ 45, 46, 47,\\ 48, 49, 52,\\ 53\\ \end{array}$	Proteína de la superfamilia de las metalo-β-lactamasas Malato: quinona oxidorreductasa Acil-CoA deshidrogenasa Deshidrogenasa Proteína hipotética semejante a DUF1302 NADH:flavina oxidorreductasa Acil-CoA deshidrogenasa Acil-CoA ligasa
Incapaces de crecer en medios mínimos en los que la fuente de carbono sea desoxicolato, testosterona o 4- androsten-3,17-diona (5mM)	$ \begin{array}{c} 1\\ 3\\ 4,50\\ 5\\ 6,13,16,\\ 18,19,22,\\ 23,25,51\\ 7\\ 11\\ 28,42\\ 29\\ 32\\ 33,34\\ 35\\ 44\\ \end{array} $	 Dioxigenasa de apertura en <i>meta</i> Proteína semejante a tRNA pseudouridina sintetasa B Acetil-CoA acetiltransferasa Proteína reguladora de un sistema de señalización de dos componentes. Enoil-CoA hidratasa/isomerasa Aconitasa del ciclo del metilcitrato Enoil-ACP reductasa Malato sintasa Metilentetrahidrofolato reductasa Acetil-CoA acetiltransferasa Isocitrato liasa Subunidad β de una CoA transferasa de dos componentes

Las características del primer grupo sugieren la existencia de una ruta catabólica común involucrada en la degradación de sales biliares, testosterona y 4-androsten-3,17-diona, y que los genes interrumpidos por el Tn5 impedían el uso de estos compuestos por los respectivos mutantes. Sin embargo, respecto a los mutantes pertenecientes al segundo grupo, en los cuales el metabolismo de testosterona y/o 4-androsten-3,17-diona no estaba afectado, se podía sugerir que los genes interrumpidos por el transposón, probablemente codifiquen enzimas participantes en los pasos iniciales de la degradación de los ácidos biliares. Así, podríamos asumir que la cepa DOC21 y probablemente otras bacterias capaces de degradar esteroides, poseen diferentes rutas periféricas responsables de la asimilación de ácido desoxicólico, testosterona, 4-androsten-3,17-diona y otros esteroides relacionados, y que estas rutas específicas convergen en una ruta degradativa principal o central que transforma los productos finales de cada ruta periférica en metabolitos generales. De esta forma, la

incapacidad de la cepa DOC21 para degradar colesterol y otros compuestos estructuralmente relacionados, podría ser explicada asumiendo que esta cepa bacteriana no posee la ruta periférica específica, o las enzimas requeridas para la oxidación de la cadena alifática lateral. Como contrapartida, cabe destacar que, recientemente, en *Rhodococcus*, se han descrito dos grupos de genes que codifican el catabolismo de colesterol y de ácidos biliares independientemente (Mohn *et al.*, 2012).

Esta organización, es decir, una ruta principal y otras periféricas que convergen en ella, sería similar a la presente en otras unidades catabólicas complejas (catabolones), requeridas para la asimilación de los ácidos fenilacético, 4-hidroxifenilacético y algunos de sus derivados (Olivera *et al.*, 1998; Arcos *et al.*, 2010).

Todos los mutantes obtenidos se analizaron genéticamente, determinándose el punto de inserción del transposón en el cromosoma de cada mutante (Tabla 23). La identificación de la secuencia de DNA adyacente al punto de inserción del transposón se realizó mediante el empleo de una estrategia diseñada en nuestro laboratorio que implica la recombinación de un plásmido suicida sobre el genoma de los mutantes a través de un fragmento homólogo al mismo, concretamente, un fragmento de una de las secuencias *IS*50 de inserción del transposón (Arcos *et al.*, 2010). Sorprendentemente, el análisis de los puntos de inserción del transposón, ya que se identificó el mismo punto exacto de mutación en múltiples mutantes, aislados en diferentes momentos (Fig. 73).

Además, mediante el diseño de oligonucleótidos (Apéndice III -Tablas 41 y 42-) sobre secuencia conocida y la ejecución de múltiples PCRs, se obtuvo la secuencia de DNA genómico adyacente a los genes mutados por la inserción del Tn5, configurándose de esta manera el boceto de la organización genética, que conforma la ruta o rutas degradativas de compuestos esteroideos (Fig. 73).

Teniendo en cuenta el gen interrumpido a causa de la inserción del transposón Tn5 en los distintos mutantes obtenidos, además de su correspondiente efecto fenotípico en cuanto a la capacidad de utilización de diferentes compuestos esteroideos, ya que se observa perfectamente la existencia o no de crecimiento, se puede reclasificar a los mutantes en tres grupos diferentes:

I) Mutantes afectados en genes que codifican funciones necesarias para llevar a cabo la transformación del ácido desoxicólico en intermediarios metabólicos comunes del catabolismo de compuestos esteroideos. Estos mutantes estarán representados por aquellos mutantes incapaces de crecer en ácido desoxicólico, pero que sí son capaces de degradar eficientemente testosterona y 4-androsten-3,17-diona (mutantes 8, 9, 12, 14, 15, 17, 20, 24, 26, 27, 30, 31, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 43, 45, 46, 47, 48, 49, 52 y 53).

II) Mutantes en los que la inserción del Tn5, ha tenido lugar en genes con funciones comunes para la utilización de ácido desoxicólico, testosterona y 4-androsten-3,17-diona y, por lo tanto, afectados en algunos de los procesos de una ruta central de degradación en la que convergen metabolitos comunes en la degradación de compuestos esteroideos (mutantes 1, 3, 4, 5, 6, 11, 13, 16, 18, 19, 22, 23, 25, 29, 32, 35, 44, 50, 51).

III) Mutantes afectados en procesos del metabolismo general de la bacteria (ciclo del glioxilato, ciclo del metilcitrato), que van a ser utilizados para el catabolismo, tanto de sales biliares y testosterona, como de 4-AD. Dado que estos mutantes muestran un crecimiento deficiente o no crecen cuando las fuentes de carbono utilizadas son el ácido desoxicólico, la testosterona o la 4-androsten-3,17-diona, esto implica que estos compuestos esteroideos son catabolizados generando como productos finales acetil-CoA y/o propionil-CoA o algún derivado de éste. Así, tenemos mutantes afectados en el ciclo del glioxilato (mutantes 28, 33, 34 y 42), y mutantes afectados en el ciclo del metilcitrato (mutante 7). Los mutantes afectados en el ciclo del glioxilato son, además, incapaces de crecer en medios mínimos en los que la fuente de carbono sea exclusivamente cetogénica (acetato, octanoato o cualquier ácido graso con un número par de átomos de carbono). Por su parte, el mutante afectado en la aconitasa perteneciente al ciclo del metilcitrato es incapaz de crecer en medio mínimo conteniendo propionato como única fuente de carbono, y presenta un crecimiento deficiente cuando las fuentes de carbono utilizadas son otros ácidos grasos con un número impar de átomos de carbono, nonanoato).

La identificación del punto de inserción del transposón Tn5, ha permitido caracterizar los genes anteriormente citados y su posible función correspondiente, por homología mediante el programa BLAST, con genes ya estudiados y caracterizados en otros microorganismos de los que se conoce su actividad, por ejemplo genes de *Comamonas testosteroni* implicados en la degradación de testosterona y genes de *Mycobacterium* y *Rhodococcus* para la degradación de colesterol.

Gracias a estos resultados, se han podido identificar hasta el momento 5 grupos de genes principales, unos codificantes para funciones enzimáticas (*scaffolds* DC0010, DC0011, DC0012, DC0013 y DC0014) y otros para funciones reguladoras (genes *tes*R en el *scaffold* DC0013 y *tes*R2 en el *scaffold* DC0010), análogos al *tes*R de *Comamonas testosteroni* TA441 (Horinouchi *et al.*, 2004b; Horinouchi *et al.*, 2012), *tei*R (testosterone-inducible regulator) de *Comamonas testosteroni* ATCC 11996 (Horinouchi *et al.*, 2004b; Linares *et al.*, 2008; Horinouchi *et al.*, 2012) y *kst*R y *kst*R2 de *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium smegmatis* (Kendall *et al.*, 2007; Kendall *et al.*, 2010; Casabon *et al.*, 2013b), imprescindibles en el proceso catabólico de testosterona en el caso del *tes*R y *tei*R, y del colesterol en cuanto al *kst*R y *kst*R2, en dichos microorganismos (Figura 73).

Pseudomonas putida DOC21



Figura 73. Representación esquemática de los genes implicados en la degradación de compuestos esteroideos en *P. putida* DOC21 e identificación de aquellos en los que se había insertado el transposón Tn5, originando los diferentes mutantes incapaces de crecer con ácido desoxicólico como única fuente de energía, e integrados en los *scaffolds* ensamblados en la secuenciación del genoma de la cepa DOC21. En rojo, posibles genes de la ruta periférica para la degradación de ácido desoxicólico hasta intermediarios generales de la ruta catabólica de esteroides. En verde, genes identificados como codificantes de enzimas que desempeñan funciones específicas de la ruta catabólica central para el catabolismo de compuestos esteroideos.

En azul, aquellos genes que aún no se ha identificado en cuál de los dos procesos participan. En gris, genes que se supone no codifican funciones para la degradación de compuestos esteroideos.

3.2. Identificación de las proteínas codificadas por los genes implicados en la degradación de compuestos esteroideos.

Con el objetivo de identificar la función de cada proteína codificada por los genes implicados en la degradación de compuestos de naturaleza esteroidea (Fig. 73), se obtuvo la secuencia de aminoácidos a partir de la secuencia de nucleótidos de cada uno de ellos y se introdujo en la base de datos del NCBI. El análisis resultante de estas secuencias se detalla a continuación, y además, se indican los porcentajes de identidad de dichos genes con respecto a genes homólogos pertenecientes a una de las cepas con las que presenta mayor homología (*Pseudomonas* sp. GM84), y también a dos cepas (*Pseudomonas* sp. Chol1 y *Comamonas testosteroni* ATCC 11996) degradadoras de estos compuestos y muy próximas filogenéticamente a la *Pseudomonas putida* DOC21 (Tablas 24, 25, 26, 27 y 28).
Tabla 24. Genes implicados en el metabolismo de compuestos esteroideos y organizados en el scaffold DC0010.

Scaffold DC0010			
Gen	Secuencia de aminoácidos	% identidad-% homología	ID secuencia
	MTKLAEISIDNAQRTHRYARGWHCLGAVEEYRDGKLHTLNIFGTRLVAF ATSEGMISVLDAYCPHMGADLSQGTIENDRVVCPFHHWQYDKAGKCVEI	<i>Pseudomonas</i> sp. GM84 = 305/346 (88%)- 326/346 (94%)	WP_008094744.1
3-cetoesteroide-9 α - hidroxilasa sub. α	PYCKRIPPKAKTRAWLTCEENNLLFIWNNPEGQPPREGVVIPHLEAMDS AEWIHDWNIDTMLIETNPRELVDNLVDAQHFGPVHGTPTKYFSNIFEGH IGHQIFHGDSERLGGDLIAESAYFGPATHFTHLSSMFGEVRIHAILLNS	<i>Pseudomonas</i> sp. Chol1 = 251/346 (73%)-288/346 (83%)	WP_008568691.1
(KSIIA)	HVPVGPNSFELRFGCMVQRVPGWSEEQNREVAKAYVMGNRESFYQDVDI WKHKIRIDNPVLAESDGPVYQLREWYQQFFTDEDQVPASMAVRREIVTV DER	<i>C. testosteroni</i> ATCC 11996 = 98/334 (29%)- 149/334 (44%)	EHN64465.1
	MTGSNLAPRGLASWTFAAVLGCTSIAPASAAPEDVSRLGSELTCLGADK SGNADGSIPAWSGKWLGVPPQVDFKGTGNHPIDPYPEEKPLFVITAANL GQYAEQLSDGQKALFKLYPATFKMPIYPSHRDFRPSDTVCQATKENAAI	<i>Pseudomonas</i> sp. GM84 = 395/440 (90%)- 415/440 (94%)	WP_008094742.1
Proteína de función desconocida (DUF1329)	AKLVDDGEGVVGKTGGTPFPVPRSGLELLKNASTFTLRAWTEEYVSDNA YVLKDGNINWGRVHSRNLAPALEPGRIGDTTGNSSFYLNETLLPQRDKG EINTGTEFWNDKTEPRQAWRYDPGTRRVRQSPGYGFDMSFPGSGGSITV DEVRLENGSGORYDWKIVGKREMYIPYNAYRLHSPOLKYADLLTPGHIN	<i>Pseudomonas</i> sp. Chol1 = 234/447 (52%)- 304/447 (68%)	WP_008568658.1
	PDAMRYERHRVWELEGTLKPGYRHLYGKRKLYIDEDTWFPMLADNYDNR GELWRTSMVNYFYAYESQNQQAGVGLYHDLNAGSYLAFNLINEQRNGYQ LNKPGFSPKDFGPEAARRFGQ	<i>C. testosteroni</i> ATCC 11996 = 211/436 (48%) 285/436 (65%)	WP_003078265.1

Regulador transcripcional perteneciente a la familia LuxR (<i>Tes</i> R2)	MHTMMSNTQVLEALGLELAEYERLIGNMYDAAMDTRCMTESLQQVRAVF QANFVTLILRVVDEPFLSPMMVAGDIELGEGGVNHYAYYAKSTLFDKLP TDRVFTIDDLTSEAEWLNSSFYLLYCEPYGCHQMLGVDIAMPDGGVLRF RINRTRDQPRFGDAERAMCAMLVPHLRRALHMHSLLDRSESLGSLYCQT ISRLAVATIVLDESGSVLQLNPVAREILDSNDGLKLVGGRLEATYPSDN RELSRLVRNAFTRARQGEGGGQGAEAMSVSRPSGQVNLGVVVELIPTQE LLDGKGKPTVMVYVRDAVSKSLVSNVVTSQLYHLTPAETALALELANGL SLEEASEMLNIRRNTARAHLRSIFSKTGVRRQTELVRIMLNSVGRFGSA GHFADAGQRGLKNRRHARRRRGGAVKMR	Pseudomonas sp. GM84 = 318/393 (81%)- 356/393 (90%) Pseudomonas sp. Chol1 = 211/369 (57%)- 274/369 (74%) C. testosteroni ATCC 11996 = 165/374 (44%)-228/374 (60%)	WP_008094739.1 WP_008568690.1 WP_003078370.1
Glicosil hidrolasa	MRHLIGYTMSAIVIAAVALAFSPRQPAPLAATQINADRVQVNALIADGG QLLGVGERGTILVSHDGGASWQTRQVNGGRDATLTAITALANGVLVAVG HDGWILRSTDGGQQWQEMHYDAELGEPLLGVWSADGKHVVAYGSYGKYL ESDDAGQHWAAREMPGEGAHFNGLDGAVDGRQMLVGEQGLVLRSNDGGQ HWQSLTPFYNGSLFGVVRLSAERWLAYGMRGNVFLSSDFGDTWQRVDVG STQPIYGHARLPGNQGLVLVGAGSRLIRLDAEGAVLDSSQRSGLGTLTS ALVLNARHLLVAGERGVYQGSNGDALTASAR	Pseudomonas sp. GM84 = 240/323 (74%)- 266/323 (82%) Pseudomonas sp. Chol1 = 151/311 (49%)- 201/311 (64%) C. testosteroni ATCC 11996 = 109/291 (37%)-159/291 (54%)	WP_008094736.1 WP_008568687.1 WP_003078256.1
Acil-CoA acetiltransferasa	MSLNEVVIVATARTALAKSFRGSFNDTEAPVLGGHVIRAVLQRAGIEAD AVEDVIMGAAVQQGTQAYNIGRLCAYTGGLPDSVPGMALDRMCASGLMS IGVAAKGIMTGEMTVAIGGGVESLSLTQTKHKNTYRAQSTAVLEVMPSA YIPMLETAEIVSRRYGISRAAQDDYSLQSQQRTAAAQRAGVFDEEIVAL EADRLLFDKDGQPAGHERVRVERDECNRPGTRLEDLAALKPVWKDGKWV AQGEFITAGNASQFSDGAAASLLMSRDEARRRGLTPLGIYRGIAVGGCA PEEMGIGPVVAIPKLLKRFGLGVADIGLWEINEAFACQVLHCRDALQIP AERLNVNGGAIAIGHPFGMSGARMVGHALLEGRRRGVRYVVVAMCIGGG MGAAGLFELP	Pseudomonas sp. GM84= 353/401 (88%)- 386/401 (96%) Pseudomonas sp. Chol1 = 319/400 (80%)- 350/400 (87%) C. testosteroni ATCC 11996 = 285/399 (71%)-331/399 (82%)	WP_008094678.1 WP_008568686.1 WP_003078372.1

		<i>Pseudomonas</i> sp. GM84 = 125/154 (81%)- 143/154 (92%)	WP_008094676.1
Acil-deshidratasa	MSHSFNSARSLLDAEGLDLGRTDWLSISQERIDLFAEATGDHQWIHVDP QRAASGPFGVCIAHGYLTQSLANLFMPQLMTLENMAMGVNYGSDRVRFP APVRVGARVRGHGVILRAELLGEAVQVVVRLSVEIEGESRPGCVVDTIS RYTFNPV	<i>Pseudomonas</i> sp. Chol1 = 111/154 (72%)- 121/154 (78%)	WP_008568685.1
		<i>C. testosteroni</i> ATCC 11996 = 85/148 (57%)- 116/148 (78%)	WP_003078374.1
	VKQAPPYVPGHQLLAGKSVLITAAAGAGIGYSAARRSAEEGCRALMISD	<i>Pseudomonas</i> sp. GM84 = 236/261 (90%)- 251/261 (96%)	WP_008094674.1
Alcohol deshidrogenasa de cadena corta	DVLINNAGLGGQKSVVQMSDEEWSRVIDVTLTGTFRMTRAMLPHMQRRG AGAIVNNASVLGWRAQKEQAHYAAAKAGVMALTRCSALEAAEHGVRINA VSPSIALHDFLKKASSEDLLASLAGREAFGRAAEVWEVANVMMFLASDY	<i>Pseudomonas</i> sp. Chol1 = 241/261 (92%)-249/261 (95%)	WP_008568684.1
	ASIMVGEVESVSSQQA	<i>C. testosteroni</i> ATCC 11996 = 155/217 (71%)-186/217 (85%)	WP_003078376.1
	MSNNKPMPVVTEISAPFWEGLKARRLLIQQCNACSHWVFYPRRHCPLCL AHDLSWREVOGOATLYSYTLTRIPTLPDFADEMPOKLAVVELAEGVRIN	<i>Pseudomonas</i> sp. GM84= 251/315 (80%)- 274/315 (86%)	WP_008094065.1
Posible acil-CoA deshidrogenasa	TNLVGLEEGQIQIGMALQPVFAEVDSKGTRLLRFTGLDNDPTAFESLPG LEPEPVPAADTPAPRRIDFNDAAALQALVSDSFSEWSNVIIVDQALIDA FAQLSGDDYWIHTDPERARLQSPFGGTIAHGALVQVLQSRMKLELGFEI	<i>Pseudomonas</i> sp. Chol1 = 208/313 (66%)- 247/313 (78%)	WP_008568674.1
	TGFSTQINYGSDRLRFPAPVPAGARIHARARVKSVELLGRGTQLTLEIN THVLGQERPSVINDLVILYRG	<i>C. testosteroni</i> ATCC 11996 = 171/315 (54%)-226/315 (71%)	WP_003078252.1

Proteína de transferencia lipídica	MGLKGHAAIVGTAQYKPEKYATAPKMFHLEQVADLAARALQDAGLKAED LDGLVINGPHFHETPVFVPAMAAEYLGLRLNFAEVVDLGGCTSVGMVWR AAAAIELGLCQAVLCVLPARMAPFGPDEDPSWMARAMRFGGHSTAYGAP EAEFDLPYGHMGQNTGYAMIAQRYAAQYGYDPVALAKIAVDQRTNALAN PDAMFYGQPLTIEQVLASRMVADPLHVLEIVMPVAGGAAMIVASKEVAA RARKRPAFVTGFGEHLAFKSPSYAADMIHTPIGPASQRAFAMAGLKPTD VDAAQIYDCYTITALLTLEDAGFCGKGEGMAFVREHDLTYRGDFPMNTH GGQLSFGQAGSAGGMSQVIEAVTQIAGSAGERQLKGCDSVYVSGTGGVM SEQGALILQGA	Pseudomonas sp. GM84 = 375/403 (93%)- 388/403 (96%) Pseudomonas sp. Chol1 = 342/403 (85%)- 368/403 (91%) C. testosteroni ATCC 11996 = 283/404 (70%)-330/404 (81%)	WP_008094064.1 WP_008568673.1 WP_003078254.1
Proteína de función desconocida (DUF1302)	VIDNNNKVPGLGSPRFQATSLTVAIALASTPVWAGETIEFDNGATIDW SVTTSYGAGVRLGKQSDRLMGVNADDANRNFDRGSLTTNRIGALGEMIL RKDNYGAVVRASTFYDDVYHKDNDNDSPATVNKRGDNDEFTSDTRYYSG GRTRLLDAYVFGGWRFANDTMLDVKAGRHIESWGESLYYPGVNGVQNPS DAVKAAQPGVEVKEVLLPVGQVSASYRINPQFTLGAYVQYEWKGTELPP VGSYLSSSDVIGPGREFLIMPTGRVDYLGTDKPRDSGQWGVQVRFRPVP AVELALFHVNYHDKNPATALVGYNPLPVGGGQYAFAANGYRVKYFEDIK LTGISATTKLGEVQLGGEWSYRDGAPVMVNTGLGPVPTRGKGQQIQFSA MRVLGDRPWASQTTLTAEVVHVRVDSVDDASAAPNLQGVNLLPSLSGMV GNSDDYTYKTASAWRSRDSSAYTLGTSFSYPGVFQGWDLEVPVRFSNVF SGSTPMSGSISGVQGDRRLSVGTTFKYLGNLEVGLNYTGYLGSADPVKR PFADRDYATFSMKYSF	Pseudomonas sp. GM84 = 468/555 (84%)- 497/555 (89%) Pseudomonas sp. Chol1 = 334/567 (59%)- 407/567 (71%) C. testosteroni ATCC 11996 = 200/547 (37%)-290/547 (53%)	WP_008094061.1 WP_008568671.1 EHN64428.1
Posible β-lactamasa	MTDLDANGHELRDGLRYPWPVAPAPGEVREVADGVFWLRMPLPFRLDHI NLYLLRDGDGWVAVDTGMNTAQTFEVWDQVLGGLCAGQPLHALVCTHFH SDHAGVAGWLSARFRCPVYMTEAEYQSLYVKVPGGDAPGWDFLDYYAKA GFSDEQAGDMYRTIQNGHFRPLHFNSYRRLHDGSRLRIGQRDWRVVVGR GHSPEHACLYAEDDGLLISGDQVLPRITSTVGVHATEPEANPLRQWLAS LAHLRSLPDSVLVLPAHERPFFNLHARLTQLEAHHRAHLALLLATCDEP RSALELMAVLFPKLSGRFDELMALGETLAHANYLMAEGALSREEHCGLY RYRRCPEGTPAVDPLKAF	Pseudomonas sp. GM84 = 268/347 (77%)- 295/347 (85%) Pseudomonas sp. Chol1 = 201/343 (59%)-250/343 (72%) C. testosteroni ATCC 11996 = 158/336 (47%)-205/336 (61%)	WP_008097692.1 WP_008568670.1 WP_003078273.1

Acil-CoA ligasa 2	MNLPSSGLPPSRVVPREQTQAILDRRSAASALIKPSDLYTLADRLEQQA ERFGERPLLIYGEQSLSYAEVDARANQMAHTFYAKGLRAGDVCAMVMEN RPAFFCTWFGLVKLGVVVAFINTQVNGKALLHALQTTAAKALVVGEECL SNVLATEGLPPLSYWLVGDAENPWTADLPGFIDRQFAARLDSAPRTAFP RDIRAGVEAQTPTLLIFTSGTTGLPKAARYSHMRWMSSGDVMEVTLAAT CDDVFYCCLPLYHGAAATSVTSTALRAGASIVVRRFSVSEFWRDVSRH QITVFQYIGEICRYLLNRPVQPGEQAHSLRCMLGAGLTPESWQRWIERF GPIQVFEGWGATEANSALINVDNYPGSCGRVPDWARTNLRLIRFDVEND CHPRDANGFYQECQVGEVGEAMGFIVNHPDIGGGRFEGYTSAEATESKI RRNVLREGDAWWSSGDLLRQDADGYCYFVDRIGDTFRWKSENVSTQEVA DALGDLTGLELINIYGVQVPGHEGRAGMAAVLMQAGQSFDPQALFALAE ARLPRYAAPLFVRVSAAADLTSTFKLRKVDLQRQGYCPQACADPLYIRD EQSSSYQPYSPELLERLELAPFVVASHD	<i>Pseudomonas</i> sp. GM84 = 497/617 (81%)- 539/617 (87%) <i>Pseudomonas</i> sp. Chol1 = 423/604 (70%)- 476/604 (78%) <i>C. testosteroni</i> ATCC 11996 = 332/598 (56%)-405/598 (67%)	WP_008097693.1 WP_008568669.1 WP_003078275.1
NADH flavin oxidoreductasa	MSILFEPLRLGELHLANRIVMAPMTRSRADARALATADMVEYYRQRAGA GLIVAEGTAPSASGLGYCRTPAIYSAEQIDAWRRVTDAVHAEGGRIVLQ LMHVGRAASRHNKPAGAATVAPSAIRANTQVFTDALGMADTEQPDALTL DGIATVIGDYRQAALNAREAGFDGVELHCTSGYLPMQFMASGSNQRDDA YGGSTDKRLRFVTETVEAMASAIGAGRVAVRLCPGNPYNDIHDDDPAAT ASGLCKALAPMALAYLHVMRSPLANLDAFALARAHSEQQLILNDGFDGA SARAALEAGEGAAVSFGRHFVGNPDLVERLRRGQPLAGFDRKTLYTPGP RGYSDYPALRVAAEVAQ	Pseudomonas sp. GM84 = 277/360 (77%)- 306/360 (85%) Pseudomonas sp. Chol1 = 237/351 (68%)- 271/351 (77%) C. testosteroni ATCC 11996 = 196/347 (56%)-245/347 (70%)	WP_008097695.1 WP_008568668.1 WP_003078412.1
Proteína de transporte (MFS)	VTWRTHYALLVLASIYVFNYIDRQLMAILIEPVKLEFGISDTGIGLLS GVTFAVFYTVFGFPLGRLSDRIGRKPVIAFSCMAWSVMTMLCGMAGNFF TLVLARIGVAVGEAGGTAPSVAMVSDLYPANRRSTALSVLMLGSSLGAI VGLGLGGWIAQHHGWRYAFLLIGAPGILLGLILLLTVRSPKPQIAPWEI AAAAQEGWLQTLVELFRMPSFNWLVATGGAAAIAGYAIGTWSPSFLIRS HGLNLQEAGFLVGVVGGTGSTIGTLACGMLTDRLARRDVGWQIGVPLLG TLLSIPFALAYFLWPQGIAFHIGSIPVPQAFLFYSAFGFFGVWWATPCL GAITHLFPATRLAQATAIFVMSMTLLGVGVGPLLIGVLSDAFVGALGGE SLRYALAASVSLLVLAAGFLAMALPRYRRQLQAQADVRVVGSPLAV	Pseudomonas sp. GM84 = 383/427 (90%)- 400/427 (93%) Pseudomonas sp. Chol1 = 264/428 (62%)- 335/428 (78%) C. testosteroni ATCC 11996 = 195/423 (46%)-273/423 (64%)	WP_008097697.1 WP_008568664.1 WP_003078353.1

Tabla 25. Genes implicados en el metabolismo de compuestos esteroideos y organizados en el scaffold DC0011.

Scaffold DC0011			
Gen	Secuencia de aminoácidos	% identidad-% homología	ID secuencia
	MKTTRTGVMLAVALTANCVAIAGACAAVSPEEAARLGKDLTCVGAEKAG NAEGTIPPYTGKYLGEVPGWNHVKFSGDQPVDPYAAEKPIVVITAANMS QYESHLSEGQKALLKKYPTTYKMNIYPGHRDFRYPDYVCKRAMSNALNA KLVNDGLGIEGLGQVPFPIPKNGMEVLWNHQLPARAYTEEKISDLASVL	<i>Pseudomonas</i> sp. GM84 = 406/451 (90%)-437/460 (95%)	WP_008097306.1
Posible proteina reguladora δΕ	PNGSIGWGRAHARNLSQANSPTVEPITDTGIQAMSYNTTLKPARDNGVI SIAHEPYNFVTSSRQAWSYSPSTRRVRQMPGYGYDQPMIGTNGTMTVDE DRLFNGAPERYTWKLLGKREIYVPANAFKPNSADIKYADMLTPNHPNPD FMRYELRRVWVVEADLKEGFRHVYGKRVLFIDEDTWNAVMADNFDARGQ LWKHAMINYYYHPDMSGWQAGSQFFMDLNSGQYTGYGMTNEAKKGPILN EGKYTPDMYTADAARAIGR	Pseudomonas sp. Chol1 = 304/447 (68%)-374/456 (82%) C. testosteroni ATCC 11996 = 252/450 (56%)-315/458 (68%)	WP_008568658.1 WP_003078265.1
Acil-CoA ligasa 1	MSIEQWRSAWTQLIGEGAPFEVITPADGGPRQFRHAPATLQAVIDAGRV HGEREFLVWQDQRLSFAGYFDLVDRLAGQMIARFGLQPGERVAIAMRNQ PAWLIAFAAIQRCGAVCVPLNSWGLRDELLHGLEDSGAGLLLCDEARLN LLRDDLAARQRTTIAVGLGSAVGLPDYCFRYEDLLAAEPLSAPQVQVGR DSPAMILYTSGTTSRAKGVLSSHRAVCQALTALEFQGAFCALSSPQRIG KVIASGFAPTSLMAVPLFHVSGLHAQFLSALRGGRRLVLMYKWDVEQAL DLIRDERCTQFNGAPVMMQQLLASPRFGSADTASLFGLGLGGGGASSAGL LGWMVERKPDVIGGSGYGLTESNGIGAAIGGDPFVHKPASCGWPLPIVD	<i>Pseudomonas</i> sp. GM84 = 417/559 (75%)-470/559 (84%) <i>Pseudomonas</i> sp. Chol1 = 320/559 (57%)-397/559 (71%)	WP_008097308.1 WP_008568657.1
	LRIGDDPRQPVADGDSGLIWLRSPTLMSGYWNQPQASAETLQDGWLNTG DLGYLDDEGFLCINGRVKELINRGGEKISAAEIEACISDMPGVDEAAVF AVPDPLLGEAVALVIQGDQLPTEQAVQVFIAERLAGYKVPAHVYRVSEP LPRNATGKVLKAQLKQRLTL	<i>C. testosteroni</i> ATCC 11996 = 253/559 (45%)-352/559 (62%)	WP_003078267.1

Acil-CoA deshidrogenasa	MNLRYSDEQRLLADSARDFLAACAPVGAQRKLRDQGSVQGFDGQLWQDA VNLGWSAIPFPESLGGLEFGCMGLGPVFEAIGENLSATPLLSSVVLGGS LLHLAGNAGQQQRWLPGLIAGGLRVALAVDERARHNPHSINLTAVADGD GYRLDGDKYWLVDGNGADAFIVAARTSGNATDEQGISLFLLPADTPGLS CTALPLIDSRNSARLQLHQVRVSRDALLGEAGQGRAVLDAVLDRGRACL AAELLGIAEHLFRTTLDYLKTRVQFDTPIGAFQALQHRAAWLHVDLALT RSAVMAALSALDEDSLDAAQRGRLVSLAKWKAGDTAIKVANEAVQMHGG IGVTDELDVGLYLKRVRVAQACLGDRDFHCERYTALDPACA	Pseudomonas sp. GM84 = 298/384 (78%)-333/384 (86%) Pseudomonas sp. Chol1 = 215/376 (57%)-263/376 (69%) C. testosteroni ATCC 11996 = 190/380 (50%)-239/380 (62%)	WP_008097311.1 WP_008568656.1 WP_003078268.1
Acil-CoA deshidrogenasa	MSTIEQFRHDTRAWLEANCPLSMRTPMGEGDVVWGASQPEFPSEDARLW FERMRDKRWFCPEWPEEYGGAGLDAEQVAVLESELRRLKCRPPQINLGI WMLGPVLLAYASEEQKLSLLPPMARGETRWCQGFSEPNAGSDLASLKMA ARDAGDHFVVDGSKIWTSYGDKSDWMYALVRTNTSKPKHEGISLIVLDM RSPGVNPVPIDLISGKSAFCQVFFDAVKVPRSQLIGPLDGGWNLGKYLL QHERKAMSKFGEISLPSHFDLPALVRQYLPQPQGQAELALQARASACAM NEHAYNLTVQRMGELARAGDDVSGLMAIMKLVHTEQERDKFEVLLDILG GRAFGWDSEAFGERELAVTRGWLNSYALTISGGASEVQLNVIAKRVLGL PDAKKGATA	Pseudomonas sp. GM84 = 354/401 (88%)-371/401 (92%) Pseudomonas sp. Chol1 = 282/396 (71%)-332/396 (83%) C. testosteroni ATCC 11996 = 216/399 (54%)-279/399 (69%)	WP_008097313.1 WP_008568655.1 WP_003078270.1
Acil-CoA deshidrogenasa	MFVDLTPEQHALRRKVRDYFQALMTPELREQLRGKEGGELYRQTIRQMG RDGWLAVGWPKAHGGQGYAATEQLIFFEEANIAGAPLPFVTISTVGPAL MEHGSAAQKERFLPGIAAGEIMFAIGYSEPDAGSDLAVLKTSARLQGEH FVVNGNKLWTSGAESADFIWLAARTDPDLARHKGVSILILDTTLPGFSS TVIPTTSNPTAATYYDNVAVPRDMLVGELNGGWKLITAQLNHERLGLGS WSDKVAGLFRRVYLWAKSADEHGRRAMDKAWVRTSLAECYSRLEAMRLI NLRIAANLEHERMDVALSSTTKVYGSESAIEILRRLSAVIGVNGSLRSG SAAAALHGELEYELRASVTVTFGGGTNEIQRELIAQFGLGMPRTQR	Pseudomonas sp. GM84 = 355/389 (91%)-372/389 (95%) Pseudomonas sp. Chol1 = 300/389 (77%)-336/389 (86%) C. testosteroni ATCC 11996 = 281/393 (72%)-329/393 (83%)	WP_008097314.1 WP_008568653.1 WP_003078277.1
Proteína de transferencia lipídica	MTQSSISGRAAIVGLGATEFSKNSGRTELRLAMEATLEALKDAGIDPSE VEGFSSYSVDKVPEYEIARLLGCKDVKFFSQVPHGGGAACAPVLHAAMA VATGVAKVVVVYRAMNERSWYRFGSGSYGFASTPIFENVNYGWYMPHGF HTPAAWVGMFAQRYMHTYGATSEDFGRVAVAVRDFAATNPKAFFHGKPI TLEEHQASRWICEPLHLLDCCQESDGAVAMVITSAERARDLRQKPVTIK AGSQGISSGQQIMTSFYRDDITGLPEMGVVARELYRQSGLGPDAFQTAV IYDHFTPFVLPQLEEFGFVPRGQAKEFIRAGEHARGGKLPINTHGGQLG EAYIHGMNGIAEAVRQVRGTAVNQVADVENVLVTAGTGVPTSGLILGTA	Pseudomonas sp. GM84 = 373/392 (95%)-384/392 (97%) Pseudomonas sp. Chol1 = 337/392 (86%)-370/392 (94%) C. testosteroni ATCC 11996 = 327/386 (85%)-358/386 (92%)	WP_008097316.1 WP_008568651.1 WP_003078279.1

Proteína con un dominio MaoC	MTLKNTKRFDDVRPGELLPELAVPITVALIAGGAIATRDYFPGHHDLEA ARELGSPHVFMNILTTNGLVQRFVEAWAGPLARLQSLKIKLGAPNYPGD SMTFSGSVTRLDPETRTVEVTLGGKNSMGNHVTGTVALVLP	Pseudomonas sp. GM84 = 125/139 (90%)-127/139 (91%) Pseudomonas sp. Chol1 = 94/139 (68%)-108/139 (77%) C. testosteroni ATCC 11996 = 92/131(70%) -109/131 (83%)	WP_008097317.1 WP_008568650.1 EHN64437.1
Acil-CoA deshidrogenasa	MDFELSEDQRAIEQMADSLFVDYCDDDAMRKWDTSGEPMMAPLWALCRE TGLHALAIAEADGGSGLGMTELMLVLQAQGRGLGQVPLWRHQLAAATLG RFASGEYAAWIEAAASGEALLSLSLDGVNAANGITLHATPNGATWQVDG RVAALPLAVQSGAALVPVLLHGQPRLMLLELQSPCVQFTPAVMTHGEAV ADVQVEGLSVSHLLPVGALDWLEPRAIAAVAALQLGVSEEQIRRTVAYV SERQQFERRIGSFQAVQMSMADARIALEALRSTLWQLCYRLDAGLPAPS EALATAWQACEAGHRIGHVAQHVHGGIGVDLTYPIHRFLYWSRALGLAL GGSAVCLERLGDWLSDNDKLGWKYDLEEHQAL	Pseudomonas sp. GM84 = 291/377 (77%)-320/377 (84%) Pseudomonas sp. Chol1 = 225/377 (60%)-268/377 (71%) C. testosteroni ATCC 11996 = 182/371 (49%)-238/371 (64%)	WP_008097319.1 WP_008568649.1 WP_003078283.1
Proteína de función desconocida (DUF35)	VADPQLLSNVRALVGRQYGRVYAWDDVNAPMIRQWCEIMGVDNPLYTDP AAALQGPHDGIVAPPAMLQVWTMEGLHANNYPPGSTDENPYEVLKLIEE YGYASVVAVNSELTFQRPVYLGERLYYTTRLDAVGDEKTTALGTGFFVT LVMSHFVEKPEGDEPVGELLFRVFKFRPANPQRAATPAATTAAAPAKAK RPLPGMSDDTRFFWEGCAEGKLLIQRCSACATLRHPPAPVCIECHSFDW DTVQASGRGSLYSFVVMHYPEVAPFDHPNPIGLIELEEGVRLIAGLTGV KRDELRIGQRLQVEFQTFDEQQTLPLFRPVAEPE	Pseudomonas sp. GM84 = 282/326 (87%)-303/326 (92%) Pseudomonas sp. Chol1 = 221/326 (68%)-263/326 (80%) C. testosteroni ATCC 11996 = 215/328 (66%)-251/328 (76%)	WP_008097320.1 WP_008568648.1 WP_003078285.1

Deshidrogenasa/	MARNFGWRLLIMGLMLRYKLDFKWRKKSKYDRRAALGSSLVASLRRSLM DRNVPLWLNTDFRELLMKDGKVAGIVVERDGQEQRIEARHGVIFGSGGF EONOALBEOYLPKPTOMAWSATPPCNNTGTALLAGMKEGATTALMDWAW	<i>Pseudomonas</i> sp. GM84 = 166/200 (83%)-181/200 (90%) <i>Pseudomonas</i> sp. Chol1 = 46/69	WP_008095286.1
reductasa de cadena corta	WAPTIAVPGEDKPRGIFAERAFPGAIVVNSLGRRFVNEAAPYLEFVDAM HRDNTDQAHLHYGSDAGIAAVSAGIPAARMAVAEDINACLYIASPLASY ASGCNLLLHGGGERPAFLGAAQATPT	(67%)-54/69 (78%) <i>C. testosteroni</i> ATCC 11996 = 100/197 (51%)-133/197 (67%)	WP_003078235.1
Enoil-CoA hidratasa	MTDILTREDSGVLIVTFNREAKKNALTVPMYQHLTALLHQAEHDPAIAV VLFHGSEQAFSAGNDLADFISQPPSALDAPVWQFLRAVSSFPKPLVAAV CGVAVGIGSTLLLHCDLVHAGSNARFSLPFVNLGLCPEAGSSLLLPKLF GYORAAFVLLIGEPFDAAAALOAGLINRVLEPAOVFDSALTOARKLACK	Pseudomonas sp. GM84 = 108/236 (46%)-147/236 (62%) Pseudomonas sp. Chol1 = 83/250 (33%) 128/250 (51%)	WP_008093401.1 WP_008568826.1
	PLAALIETKRLLKSADAASLRARIDEEAQVFARMLETDTARQAIASFNS RR	C. testosteroni ATCC 11996 = 146/249 (59%)-181/249 (72%)	EHN63216.1
	MTALNHKAPGRVQDKIALVTGGAKGIGRASARLLAREGATVVIADIDEL AGKALAAELGEPAVFVRHDASSETGWOVLMALIGERFGRLDVLVNNAGI	<i>Pseudomonas</i> sp. GM84 = 195/253 (77%)-219/253 (86%)	WP_008095289.1
β-hidroxiesteroide deshidrogenasa	LIAGTIEETSLDDWHKLMRVNADSVFIGCREAIGLMKVGGGSIINLSSI AALAGRDDYLAYSASKGAVAALTRSVAAFCRRRKYRIRCNSLHPDGVLT DMTSGGFPAGLDPERMTIDSDPMNRMCRPEDVAASVLFLASDESRAVNG	<i>Pseudomonas</i> sp. Chol1 = 157/250 (63%)-199/250 (79%)	WP_008568638.1
	AFTKAD2GÄMAM2T	<i>C. testosteroni</i> ATCC 11996 = 125/252 (50%)-170/252 (67%)	EHN63389.1

3-cetoesteroide-∆4- deshidrogenasa (<i>tes</i> I)	MSRAQDTVTAVLPPLQVEDSQALKWDAQCEVLVLGWGAAGACAALQARA EGADVLVADRFTGGGASAKSGGVVYAGGGTRQQRAAGFSDSPEAMFDYL KHETQGVVSDDTLRRFCNDSVSNLQWLEGHGASYSHEVPPGGKTSYPQD GYFLYYSGNELVPLYGGANPPAPRGHRTVGKGQCGAVLYARLKDACLKA GVRPLLQAAAKRLVVDATGRVIGAEFSRLPPGSQQAELHARLTARAERL QNFAPGYCDSLRQRASQLERDFARPVLVHASKAVILSTGGFIFNRELIG QHAPKFRRNFKVGATGCDGSGLRLGLSVGASSDRLERVSAWRFINPPYS WHKGIVVNSDGRRFCNEEVYGATLGQPLMEEQGGRAWLVLDAPLRKAI SEALFKGYWWFQTVPALALMLLKVRKGKTLDQLAHSTGMDPAVLAESIR ANNAAARGEAGDPFGKSRGGRRALAHGPFYACDISVSNPIFPLGALTLG GLRVDEQSGAVLDVAAQPIAGLYAAGRAAVGIPSHLYISGLSLADCVFS GRRAGKAAARETLNQAQLAAEASS	Pseudomonas sp. GM84 = 417/535 (78%)-460/535 (85%) Pseudomonas sp. Chol1 = 181/537 (34%)-250/537 (46%) C. testosteroni ATCC 11996 = 297/557 (53%)-375/557 (67%)	WP_008095288.1 WP_008568654.1 EHN64412.1
3-cetoesteroide-∆1- deshidrogenasa (<i>tes</i> H)	MESAAGRIRRPFLTSANGITTMTAQVQSQSAYDVIVVGSGAGAMTSAV FLADHGLRVLIVEKSDKYGGTSAISGGGIWIPNNHYFARMGGNDSPELA RRYLQASAGEHVEPARLEAYLANAPKMIEALTRNSRVRYAVAAKYPDYY PHLPGSLAGGRTLDPELFDTSLLGEELNNLRKPSPSTLLMGRIAWIARH AHKAMARNFGWRLLIMGLMLRYKLDFKWRKKSKYDRRAALGSSLVASLR RSLMDRNVPLWLNTDFRELLMKDGKVAGIVVERDGQEQRIEARHGVIFG SGGFEQNQALREQYLPKPTQMAWSATPPGNNTGTALLAGMKEGAATALM DWAWWAPTIAVPGEDKPRGIFAERAFPGAIVVNSLGRRFVNEAAPYLFV DAMHRDNQKTGGCSVPAWVIFDAHFRFHYAMGPLMPAQVMPDSRLRKEW LNTLYWKADTLAGLAAQIGVDADGLENTVVKVNDYARSGVDPDFGRGGN VFDRYYGDCNIKPNPCLAPLRKGPFYAMRLDAGDIGTKGGLLTNEHAQV VRDGTPIAGLYAIGNCSASVMGTSYPGAGGTLGPAMTFGYVAANHLARE AS	Pseudomonas sp. GM84 = 475/568 (84%)-515/568 (90%) Pseudomonas sp. Chol1 = 143/555 (26%)-209/555 (37%) C. testosteroni ATCC 11996 = 286/561 (51%)-369/561 (65%)	WP_008095286.1 WP_008568654.1 WP_003078235.1

Transportador de membrana (<i>twin-</i> arginine translocation pathway signal)	MTTDYPRRTVLKATAVVAGASLLGRFASVQAGELSASDYQSLDAWAMAE AVRKGELTPETLLAAALARNALVGPKVKAVNMLHEDYARNLLAQRRAAG QSASGALAGVPLLLKDLNTYLQGTSTSNGSRLFKDAPPAAHTSTLIARY ERAGAVPFGKTTCPEFGLTTTTESLAWGQTRNPWNLGHSAGGSSGGAAS AVAAGIVPVAHATDGGGSIRIPASYCGLVGLKPSRYRTPSGPAHFEGWF GASVGNVVSRSVRDTALFLDAGHGHEAGSSYWAAPVERPYSEELQRDPG KLRIAVVRQSLTGAPLDPAIATTLDLTIKRLLGLGHEVEELSLGVDPRQ LFGAHGSVIGTALLNLVHEREQALGRAATAQDLEQITQVVLQRAQGTTG EALYRARHSFEDIGAAMEKHFERFDLILSPVTANLTPELGLLSLDQGWD SYAHHAMGSAGFTVLANVSGQPAISLPLGMSDSGLPVGMMFTARLGGED GLLRIASQLEQDQPWIGRRAVV	Pseudomonas sp. GM84 = 419/508 (82%)-459/508 (90%) Pseudomonas sp. Chol1 = 359/511 (70%)-409/511(80%) C. testosteroni ATCC 11996 = 223/476 (47%)-303/476 (63%)	WP_008095284.1 WP_008568636.1 WP_003078385.1
Aldehído deshidrogenasa	MNSAASSVQTLSGLLARQKSAFNAAGAVDAAARRQRIQRVIELLVNHHQ ALTDAIDADFGGRPAGFSLMNDVLGALASLKYARQYLEHWMQDEPRAPF PPYDQLGAEAWIMYQPKGSVGIIGTWNAPLFTLFSPLASALAAGNRAIL KPSEVVPRTAELLARLCAEHLDPLDVAVVNGDAALAEAFTAQPFDHLVF TGSTAVGRSVMRNAAQNLVPVTLELGGKSPVIISASADLAQAAFSIAAA KACNGGQICINPDLVYVPQARREAFITALREAYASLHPRIAGNPDVVAV VNQRHLQRVEGYIEDARALGARVLSLPEELPSDAQDRRPLRLVIDPPP HSQIMNEEIFGPALVLLSYDSLDQVIDAINARPRPLALYYFGQDADEQR RVLEHTLSGGVTLNDVMMHAAMHDAPFGGVGASGMGHYHGREGFLEFSH MRTVFKAPAHDPRREWGLLPPYGDHYLAAMTAMVTSD	Pseudomonas sp. GM84 = 364/478 (76%)-419/478 (87%) Pseudomonas sp. Chol1 = 306/478 (64%)-367/478 (76%) C. testosteroni ATCC 11996 = 267/476 (56%)-341/476 (71%)	WP_008095283.1 WP_008568634.1 EHN64462.1
3-HSA-4-hidroxilasa (tesA)	MATQNISFDPQAFRAALGTFTTGVTIITTQSEDGSPVGITANSFNSVSL NPPLVLWSLSKQARSLPVFSTGKHWNVHVLSTEQEKLSGRFATQGENKF AEVELDRGISEAPLLQDCTARFQCRTAFQYEGGDHVIFVGEVLAFDHSD RTPLAFQSGQYALTTRKPRNELRLATTPPPPECSYTEDLLGYLLGRGHY QVLNVLRHLLSNQQLDEQAFFILAVLCIRDNLSLEEINTFVSYTGHEVT LAGMRFLERQQLVAIEGEEGSQRFVLTANGRETSLQQVALAKVVEQELT AKLGIADAQALKVLLKRLIVVSDPGLPDLWAPR	Pseudomonas sp. GM84 = 296/327 (91%)-309/327 (94%) Pseudomonas sp. Chol1 = 231/324 (71%)-267/324 (82%) C. testosteroni ATCC 11996 = 160/328 (49%)-219/328 (66%)	WP_008095281.1 WP_008568633.1 WP_003078237.1

Tabla 26. Genes implicados en el metabolismo de compuestos esteroideos y organizados en el scaffold DC0012.

Scaffold DC0012			
Gen	Secuencia de aminoácidos	% identidad-% homología	ID secuencia
	MSILKRFQLDGSVAIVTGSGRGIGRAIALAYAEAGADVICSARSLAEVE AVAAEVRALGRRALAIACDVNDSEQRQALVRQGVEHMGRITHLVNNAGG	<i>Pseudomonas</i> sp. GM84 = 229/257 (89%)-245/257 (95%)	WP_008094767.1
7α-hidroxiesteroide deshidrogenasa	GGPNDPLKMSPEQFDEILRFNVSSAYAFCQLCVPLMREAGGGNIVNISS VAARYSQRHFSAYGSAKAALSHLTRLLAQDFAPQVRVNAVAPGPTLTDA LAGVMPAAMRQTMENNTPLKCLGTPEDIAAAALYLASPASAWVSGKIID	<i>Pseudomonas</i> sp. Chol1 = 185/257 (72%)-214/257 (83%)	WP_008568632.1
	VDGGADSTVWVG	<i>C. testosteroni</i> ATCC 11996 = 136/251 (54%)-183/251 (72%)	WP_003078336.1
	MDAHLIDALGAELFHALRSRKTLAPLTGRYPEISLDDAYRISLRFLQRR	<i>Pseudomonas</i> sp. GM84 = 229/263 (87%)-243/263 (92%)	WP_008094766.1
2-ceto-4-pentanoato hidratasa (<i>tes</i> E)	EALGERVVGKKIGVTSRAVQEMLDVHQPDFGFLTDAMQVADASDVSLSR YNLIQPRAEGEIAFILGEDLQGPGISAEDVLAASESVMACFEIVDSRID NWQIRIQDTVADNASCGVFALGSQRLDPRTLDLASVQMQLFKNGEPAGS GLGSAVQGHPCAAVAWLANTLGELGIPFRRGEVILSGALAPLVPVVAGD	<i>Pseudomonas</i> sp. Chol1 = 195/264 (74%)-227/264 (85%)	WP_008568631.1
	RISLSMSGLGQSSLRFIP	<i>C. testosteroni</i> ATCC 11996 = 171/260 (66%)-209/260 (80%)	WP_003078242.1
	MSKKIRCALIGPGNIGTDLLYKLKRSEVLEPVWMVGIDATSEGLARARE LGLKTTADGVDGLLPHVLEDRIQIAFDATSAYVHPENSRKLNELGVLMI	<i>Pseudomonas</i> sp. GM84 = 275/307 (90%)-290/307 (94%)	WP_008094765.1
Acetaldehído deshidrogenasa (<i>tes</i> F)	PVDYAEIVATAASKSVGPGTRKNIDEFTRTTSSAIEKVGGAKQGKAIII INPAEPPLIMRDTVHCLTATEPDQDAIRAAIDAMIAQVQRYVPGYKLVN	<i>Pseudomonas</i> sp. Chol1 = 254/294 (86%)-270/294 (91%)	WP_008568630.1
	GALTLRATESAHA	<i>C. testosteroni</i> ATCC 11996 = 235/298 (79%)-261/298 (87%)	EHN64418.1

	MDLRGKQITVHDMCLRDGMHPKRHQISLQQMKDIACGLDAAGIPLIEVT	Pseudomonas sp. $GM84 = 309/339$	WP_008094764.1
	HGDGLGGSSVNYGFPAHSDEQYLSAVIPLMKQAKVSALLLPGIGTVDHL	(91%)-327/339 (96%)	
1 hidrovi 2	QMAHELGVSTIRVATHCTEADVSEQHISHARKLGLDTVGFLMMAHMNSA		
4-Indioxi-2-	QGLATQGKLMESYGANCIYLTDSAGYLLPEDVGARVATLRAALKPETEI	<i>Pseudomonas</i> sp. Chol1 = $306/340$	WP_008568629.1
(<i>tes</i> G)	GFHGHHNLSMGVANSIAAIAAGATRIDAACAGLGAGAGNTPMEVLVAVC	(90%)-328/340 (96%)	
	ERMGIETGVNLFQIQDVAEDLVVPIMDFPIRSDRDALTMGFAGVYGSFL		
	LFAKRAEKKYGVSAREILVEMGRRGMVGGQEDMIEDTAMTLARARKLA	<i>C. testosteroni</i> ATCC 11996 = 280/340	WP 003078246 1
		(82%)-315/340 (92%)	W1_000070210.1

Tabla 27. Genes implicados en el metabolismo de compuestos esteroideos y organizados en el scaffold DC0013.

Scaffold DC0013							
Gen	Secuencia de aminoácidos	% identidad-% homología	ID secuencia				
Regulador	VENPVLTHDGLSTLGLDLVAYDRLVGEVYDGAMDPKLMARALTSFRTLY DANYVTLILRVPDQPDMGVMIIVGDIAGAGEVSYMTYPQTHTPFTNQPL DYVFTVDDVMSSTEWEHCAYFKMFCGPOGVYHVMGADISTPDGGKLRFR	<i>Pseudomonas</i> sp. GM84 = 361/412 (88%)-383/412 (92%)	WP_008094070.1				
transcripcional perteneciente a la	ITRPKQAPAFSRNDRALCAMFLPHLRRALQVHNLLDRSESLSDLYSQAI SRLSVATLVLDESGSVLRVNPVAQDLLAQADGLKLVGGRLEATYPSDNR ELQRLIRAALSPDAPKSADAMSVTRPSGQVNLGLVVEPIPSLDWAEEKG	<i>Pseudomonas</i> sp. Chol1 = 224/384 (58%)-282/384 (73%)	WP_008568690.1				
Tallilla Luxk (lesk)	EELNIRRNTARAHLRSIFSKTGVRRQTELVRILLNSVVALGKPKMPLKT PAKVKVPPPQLAVPVLAQRA	<i>C. testosteroni</i> ATCC 11996 = 172/371 (46%)-238/371 (64%)	WP_003078370.1				
	MNKVAFITGASRGIGRAAALAFAAAGFDIAISARTVDEGEQHPHALRDA	<i>Pseudomonas</i> sp. GM84 = 225/276 (82%)-249/276 (90%)	WP_008094074.1				
3α-hidroxiesteroide deshidrogenasa	SGAPLPGSLNATAEAIRALGRKVLVVPMDLLDSDSALAACTVVLSGFGR IDVLINNAIYQGSDLNAGFMELQPETLERMFKGYILTPFLLTRAVTQVM AEQGGGVVINVTSGAGESDPPVAAGKGGWGYAYGAGKAAVSRLSGVVAV ELGDAGVRAYTVNPGVVTTDALKATIGDKGLIALRAGSAPPEVPAAVML	<i>Pseudomonas</i> sp. Chol1 = 74/229 (32%)-114/229 (49%)	WP_008568632.1				
	WLATHEQAPRHQRRTIAAQPFALEQEIVPDW	<i>C. testosteroni</i> ATCC 11996 = 133/269 (49%)-173/269 (64%)	WP_003078341.1				

Tabla 28. Genes implicados en el metabolismo de compuestos esteroideos y organizados en el scaffold DC0014.

Scaffold DC0014							
Gen	Secuencia de aminoácidos	% identidad-% homología	ID secuencia				
	MHSMRDKSEEEIELIERARRLVPLLKERAAQAERDLRVPDESIIELQAA GLLRALQPRAFGGYEVDPRTFFEIQMILAEGCMSTAWIYGVMGVHPWQL ARYPVEAOREVWASDHGALISSTYMPAAKVTVVEGGYRISGRWGFSSGS	<i>Pseudomonas</i> sp. GM84 = 358/395 (91%)-376/395 (95%)	WP_008094768.1				
Acil-CoA deshidrogenasa	EHCQWVFLGGILPADGDFASEHGTFLLPRQDYLIERNWDVLGLRGTGSH DIVVEDVFVPAHRVQRTNNWRIEATPGRLVNTNPIYAIPFAQVFSRAVS TSAIGALQGAINEFRANAAAHIGKHGARTADDPVAQISVAEAIITVDAL	<i>Pseudomonas</i> sp. Chol1 = 284/396 (72%)-336/396 (84%)	WP_008568637.1				
	SMAASGLYNSNPVARLFRDLHQARGHIANNFMAYGRSFGAVQLGLPNPD PFV	<i>C. testosteroni</i> ATCC 11996 = 215/389 (55%)-280/389 (71%)	WP_003071339.1				
	MNDYLALRVARVIEETVDARSLVFDVPEHLSERFRYQPGQFLTLRVPFE GGWLPRCYSLSSTPLLDEPLRVTVKRVRDGRASNWLCGELOEGOTLDVL	<i>Pseudomonas</i> sp. GM84 = 287/340 (84%)-309/340 (90%)	WP_008094769.1				
3-cetosteroide-9α- hidroxilasa sub. β (kshB)	PPAGVFVPRSLDADLLLFGGGSGVTPVLSILRSALLAGQGRILLIYANR DEQSVIFRDELRFLANAHPQRLQIVHWLDSIQGVPATQQLAELARPFVD AQAFICGPAPFMDASVAALKSLGMPSARVHVERFVSLPGEGEALPQVSS	<i>Pseudomonas</i> sp. Chol1 = 221/340 (65%)-254/340 (74%)	WP_008568639.1				
	EAAVAAQLAVRLDGEDYSLACDSGETVLDAMHRAGLNPPSACRVGGCAS CMCTLESGEVELLHNDALDAGELAEGWILACQAVPTSAQLRIRFPE	<i>C. testosteroni</i> ATCC 11996 = 197/346 (57%)-257/346 (74%)	WP_003078230.1				

Acil-CoA ligasa 3	MMSESMMNPIQNCAAPLPAAPTSIARLLFASAARFAGYTAIEEDGQCLD YADLPEQALTVTRGLMALGIQAGDRVGLWAPNGRQWILAALGIHCAGAV LVPINTRMKGAEAADILARSGCRALFVQRRFLDVDYPALLEPCRPASLE HQIVFDAEQVADARDLGYAQFLTGALTIEKLTAERRALSIGPEAMCDLL FTSGTTGKPKGVMSAHGQNLRAFSEYVRVIGLVPGDRYLIVNPFFHAFG YKAGWLTCLIAGATILPHAVFDADVVFQRIARERISVLFGAPTLYLSLL AHPRLADTDLSSLRIAVTGSASIPPSLIERMRNELGFSVVTTAYGLTEC GGLATLCDPGDSAEVIAGTSGRPLAGTEVSIRDPQNLALAQGETGEICL RGFHVMHGYFENPEATREAIDAEGWLHTGDVGRLDGQGNLVITDRLKDM YIVGGFNCYPAEIEAALIAHPAIAQVAVIGIPDARMGEVGCACVVLREG RQLAEGELIAWSRERMANYKVPRQVRLFPALPLNASSKVAKNELRALVA CD	Pseudomonas sp. GM84 = 441/519 (85%)-475/519 (91%) Pseudomonas sp. Chol1 = 350/517 (68%)-411/517 (79%) C. testosteroni ATCC 11996 = 298/533 (56%)-370/533 (69%)	WP_008094770.1 WP_008568640.1 WP_003078228.1
Posible proteína de función desconocida	MSLHNRIAQPATRDLRRRSLLALIGLASGAATAGPSFELGENTTLDTSL TVNYTASMRTGKPAHEYLNDLNNDDGTRNFKRGALVNNRVSLFGELMLK HDNLGAVLRGSHFYDDVYHRDNDNDSPGTVNKVGRADGFSDDPRRLSGS KARLLDAYVYGNFDVGETQYLSVKAGRHLVAWGESLFWANISQGQAPVD ATKFNVPGTEAKDSYLPVGQVSASWSLNEDLALVGYYQYEWEKTQLNPV GDYFGSDTFGPGAEFFRLAPGVIANLPDKSFTGVNYAGELKPRDSGQWG LGVRYRITENTEIGLFHYRYHERIGSMFFDFSGSTEYSSLRRLARHSGV ESAPAYRLGYFEDVELTGISFSSKIGDSMQYAGDLSYRDGASVYLNNGA PTTGQIWQGNLNASYILGPSFLAQQTTFMGEVVHQRIQGVDKLTVSGGG AGVDGVYDTFESATQTRGSTLLGIGAYMDYPSIANGVDLTTKLVWTQNV DGSAYQGLGRDEKRLTVGGDFKYLGNFQVGLTYVAYLSSPDVAQGRLMA DRDYLSLNAKYTF	<i>Pseudomonas</i> sp. GM84 = 459/553 (83%)-510/553 (92%) <i>Pseudomonas</i> sp. Chol1 = 356/536 (66%)-421/536 (78%) <i>C. testosteroni</i> ATCC 11996 = 180/546 (33%)-284/546 (52%)	WP_008094771.1 WP_008568641.1 WP_003078263.1
NAD oxidasa	MKNTAAASPFSPVTIGPLTLKNRFIKAATNEGMSAGGVPSKQLALLHGN LAGGGVALTTVAYCAVSRDGRTLPNQLILEPASLPHFKALTDAVHARGG LASAQITHGGCFTFIRERSTKRPLSASGGFNKIGMMSGMFLKQAMSESD MQQVVADFAQGARLARDAGFDAVEIHMGHGYLLSQFISPLYNKRRDQYG GSLENRLRFPRRVLRAVLDAVGQELAVICKYSITEGVRAGNSAEDGARI AQMLEAEGAHLLVLSAGMNAESITTMFGSSFPKENRVQQKNPVIALAMA IQRMTDPVVEFRELYLLEHARKVRAAVKMPLAYLGGAQSLNGIEQLMSE GFDLVAMGRALIAEPGYVNKLANGEGRSNLCTACNRCVAMMYTPGGTSC VLGKPGDAALNRVPAAG	Pseudomonas sp. GM84 = 363/409 (89%)-380/409 (92%) Pseudomonas sp. Chol1 = 302/406 (74%)-348/406 (85%) C. testosteroni ATCC 11996 = 108/394 (27%)-186/394 (47%)	WP_008094772.1 WP_008568643.1 EHN64450.1

Proteína de dominio estructural <i>mano</i> -EF	MLMSFWRSLGFRHKSKPQKPSPAPCAPAITPAATAATPPPAPMSIVPPA PLPRPGFAFTLALMKQLFPGVPTQRQGDLQAIADELNAHLDFYKLDTPL RRTHFFAQIRQETGEGLVVEENFIYNAGALTQSFSYFRCHPEKACEHGY QTRAGRLKANGKPMTRSDFEAIANFAYGGRTTLGNGDHASGDGWRFRGR GLKQLTGRYNYSRFQAWHDQHNAQWPQDRPDFLADPDLLLSMKYATRSA VSFWLNNHLYTLADQGSDAQVVNQITAVVNKATASYQQRREHFERFWRL MG	Pseudomonas sp. GM84 = 20/49 (41%)-22/49 (44%) Pseudomonas sp. Chol1 = 135/237 (57%)-172/237 (72%) C. testosteroni ATCC 11996 = 26/85 (31%)-36/85 (42%)	WP_008090614.1 WP_008567540.1 EHN66269.1
3-oxoacil-ACP reductasa (<i>tes</i> D)	MNQPVDLPLPVGHYQTLPNGVRLHYLDQGEGPVVLWLHGSGPGASGYSN FKGNAPEFVAAGYRNILLDLPGFGRSDKPEDVQYNLDFFVDCVGEFLQA IGVTRCTLLGNSLGGAIALGLALRHPQLAEKLILLAPGGVEERETYFQM PGILRMVGLFNAGPIGIEEMRSMMSLQLFDASILPEDLLLERVAVAVLQ PKNLFSTMMVPNMESRLGEITCPILGFWGSNDNFNPVSGAQRIIDGAAK ARFIVLNQCGHWVQVEHRELFNRSCLEFLRLG	Pseudomonas sp. GM84 = 236/277 (85%)-253/277 (91%) Pseudomonas sp. Chol1 = 194/274 (71%)-220/274 (80%) C. testosteroni ATCC 11996 = 134/274 (49%)-189/274 (68%)	WP_008094773.1 WP_008568663.1 WP_003078239.1
3-cetoacil-ACP reductasa	MKLQNKVAFVTGAGQGMGQAIVRRFVAEGAKVVAVDLDRQALANGLADL GDSVLALSCNVADSASVADAMGQVEAHFGGLDIVVNNAGVGALDSFLDT PDESWARVINVNLGGTFLCAREGARLMVKGQRQGTIINLSSTAALTGEG PSHYCASKAAVMGLTRSIARELASHGIRVNTLVPGPTNTPMMAGIPDEH MQALLKNVPLGRMCETDEIARVAVFLASDDASFMTGQNVAVNGGMAFI	Pseudomonas sp. GM84 = 224/244 (92%)-235/244 (96%) Pseudomonas sp. Chol1 = 162/244 (66%)-193/244 (79%) C. testosteroni ATCC 11996 = 146/244 (60%)-182/244 (74%)	WP_008094774.1 WP_008568665.1 WP_003078419.1
20-β-hidroxiesteroide deshidrogenasa	MSKRLQGKIAFVTGAGSGIGEATALRFAEEGAVVVLCGRRPEPLQDVQE RIQALGGEAEIAVADVSDEHAYVAALEATARRHGRLDILVNNAMAYTWG GIDSMSTADWHANFSTTVDGTFWGTRTAMRLMQASGGGAIVNIASICGL FGTAWMAGYSAAKAAVINFSRAAASEGAPHKVRCNVVIPGVVDTPATAG MLGDAKTRANTEKVIPMKRVGLPVELANAILFLASDEASYITGASLSVD GGRSSDLYTVLD	Pseudomonas sp. GM84 = 222/257 (86%)-242/257 (94%) Pseudomonas sp. Chol1 = 194/253 (77%)-220/253 (86%) C. testosteroni ATCC 11996 = 185/256 (72%)-214/256 (83%)	WP_008094775.1 WP_008568666.1 WP_003078416.1

	MAMDDASLLQRIDRLESLDAIRQLAGKYALALDMRDMDAMANCFAADVR	<i>Pseudomonas</i> sp. GM84 = 197/211 (93%)-200/211 (94%)	WP_008094778.1
Posible proteína de función desconocida	VGRDKSGRAHLKAWLDETMRKQFHGTSHHLGQHIIEFSDPDHATGVVYS KNEHETGPEWVIMQMLYWDDYERIDGRWCFRRRLPCYWYATDLNKPPIG GLKMRWPGREPYAGSFHELFPSWDAFWANRPGKDELPQIAEPAPLEGFL	<i>Pseudomonas</i> sp. Chol1 = 154/209 (74%)-179/209 (85%)	WP_008568667.1
	QSMRRGAGDPKIRVR	<i>C. testosteroni</i> ATCC 11996 = 158/205 (77%)-177/205 (86%)	WP_003078414.1
	MKIGFNSADEAFRKEIAGWMAEHLRGEFEPLRFRGGPGDEHSFPEERKA WERELAAGGWTGVGWSQEHGGRGLSISQQVIFHEEYARAGGPGRMGHIG EGLVGPTLATFGNADQKRRLLPGILSGREFWCQGYSEPGAGSDLANVQT	<i>Pseudomonas</i> sp. GM84 = 331/394 (84%)-357/394 (90%)	WP_008090771.1
Acil-CoA deshidrogenasa	RARLDDSGEYWLISGQKVWTSLAHEADWCFVLARTEAGSSGHRGLSFLL VPMHQEQIRVQPIRQLTGTSEFNEVFFDQARTSVANMIGEPGDGWKIAM ALLGFERGVSTLGQQMLFQNELDDVIRIARDNGASRDPLLRQRIARAWA	<i>Pseudomonas</i> sp. Chol1 = 316/394 (80%)-349/394 (88%)	WP_008568644.1
	GLRVLRYNSLRMLSGPQDGSLGREAMIYKLAWSNWHVELGKLAMDVLGP EAEILEGAPYALSRLQSLFLFTRSDTIYGGSNEIQRNVIAERALGMPRE VRR	<i>C. testosteroni</i> ATCC 11996 = 230/396 (58%)-290/396 (73%)	EHN64484.1
	MEFAFTEEQLMIRDSAERFLAQASDSTAVRAAMERPEGYDPALWQQIGQ ELYWPALMVPEQYGGMGLGFVELALLQEQCGRFLLGSPLFATACLATPA	<i>Pseudomonas</i> sp. GM84 = 293/388 (76%)-320/388 (82%)	WP_008090773.1
Acil-CoA deshidrogenasa	LMLADNPPLQDTWLSAIASGQTRATLAWGSAMDADAITVTAGAEGGDYL LDGRFAQVVDGAEADLLIIAARAPGSRGEHGISLFALPSDTPGIQRSAL PTLDQTRRLARIELQGVRLDDSALLCAAGEGWPLLRDVLSIAAIALAAE OTGGAOOVLDLTLAYIGEBKOFNBAIASFOAIKHBCADLMLOVECABSA	<i>Pseudomonas</i> sp. Chol1 = 241/387 (62%)-282/387 (72%)	WP_008568645.1
	FWYAACVAGERLAADGEPTVAAQLSAAAATAKLHASEAFFHCAAESIQL HGGVGFTWEYDPHLYFKRARAGEQLLGTPSWHSEHLALQLLGEPA	<i>C. testosteroni</i> ATCC 11996 = 146/377 (39%)-204/377(54%)	EHN64485.1
	MVASTVFLSNFDLGAFCGGLIDAAVGGGGLVQVPALLHALPQYSLATVF	<i>Pseudomonas</i> sp. GM84 = 123/242 (51%)-167/242 (69%)	WP_008089404.1
Posible proteína de función desconocida	GTNKLAVLAGNLASIFSYAKRVSIVWWLMIPTMVSAFAGSFLGAFSVSL IPREVMEYAVFIVLVVMAVYTFAKKDLGRTHAQVRRSTRAVAWGVFLGA LIGFYDGVFGPGSGSLLLFAFVKVFGFDFLNASASAKLVNLATFCAALL FFIPSGHVLWAIGGLVCLSNMTGAFVGTFLALRYGSGFIRVFFLILLVF	<i>Pseudomonas</i> sp. Chol1 = 77/238 (32%)-121/238 (50%)	WP_008567871.1
	LIGRMGLSIFA	<i>C. testosteroni</i> ATCC 11996 = 107/244 (44%)-155/244 (63%)	EHN66424.1

Dioxigenasa de apertura en <i>meta</i> (<i>tes</i> B)	MIEIRGLSYFVAQVENLSHWQRYAEDVLGMQVRPAPAGGLYVKMDERPF RMLIVEGSEARYVASGWELASEQAFTAALAHLDGQGVEWQAGSAEDIDQ RGVQALVVVRDPSGNRHELSWGHRSDCLPFVSPQGVPRFVTGDMGLGHT VLPAPDFDATLAFAKDVLGFSLSDIFNFRPDPSAPPIRIHFLHCGNARH HSLALAEYPVPSGCVHVMVEVDSMTEVGRAHDRHQAQGVQLSATLGQHL NDRMTSFYMKTPSGFDLEYGFGGLQVDWAEHSAFEFTRVSIWGHDFSVG 0002	Pseudomonas sp. GM84 = 262/296 (89%)-277/296 (93%) Pseudomonas sp. Chol1 = 226/298 (76%)-250/298 (83%) C. testosteroni ATCC 11996 = 174/280	WP_008090776.1 WP_008568675.1		
	Y Y Y Y	(62%)-203/280 (72%)	WP_003078410.1		
3-cetoacil-CoA transferasa sub. α	MNKQLTAADAVGQLRDGMTIGFGGWGPRRKPMAIVREILRSPVKDLTVV AYGGPEVGMLCAAGKVRKLVFGFATLDAIPLEPYYRKAREAGELELMEL DEGMFQWGLRAAGMRLPFLPTRCGLATDVARLNPEIKEIRSPYADGEVL LAMPALNLDVAFVHVNVADRLGNCLVTGPDPYFDHLFARAAQQCFVSCE	Pseudomonas sp. GM84 = 236/261 (90%)-245/261 (93%) Pseudomonas sp. Chol1 = 226/291 (78%)-251/291 (86%)	WP_008094659.1 WP_008568676.1		
	QLQDRLELTAESARFNTFERYLVTGVVHAPLGAHPTSCPSDYGWDMQHL KRYVASASEENGWQQYVQTYVAGGEQAYQAQNGGAERMGALPLAVF	<i>C. testosteroni</i> ATCC 11996 = 174/291 (60%)-214/291 (73%)	WP_003078407.1		
	MSATCDFTLAELLIVAASEAWRGNGELIASGLGVIPRLGASLAKLSHSP	<i>Pseudomonas</i> sp. GM84 = 234/265 (88%)-251/265 (94%)	WP_008094660.1		
3-cetoacil-CoA transferasa sub. β	ELLMTDSEAFLVEEPIPLGDRGDYQFRISGYLSFERVFECVWGGRRHAM IGPTQIDRWGQTNLSCVGDYHKPKTAILGVRGLPGNSINHLNSFFVPSH NTRVFVGGEVDMVSGVGFKAERWPQGARRDLMDIRLVVSDLCVLDFDGP ERAVQVRSLHPGVSFEQVQDNTGFPLLKSPHLRETDHPTPEQLALIRRL	<i>Pseudomonas</i> sp. Chol1 = 195/259 (75%)-226/259 (87%)	WP_008568677.1		
	DPHDLRASALKGNPPGIKIA	<i>C. testosteroni</i> ATCC 11996 = 134/252 (53%)-190/252 (75%)	WP_003078404.1		
	MHSSDSEFVVREDHSAYETDEPVLYGVAGGIATVTLNRPNFNNAQNSQM TYALDAALROAVDDDAVKVIILRGAGRHFSAGHDIGTPGRDIDKPFERA	<i>Pseudomonas</i> sp. GM84 = 276/302 (91%)-288/302 (95%)	WP_008094661.1		
Enoil-CoA hidratasa	HLWWDHTNKPGGEQLYAREQEVYLGMCRRWRELPKPTIAMVHGACVAGG LMLAWVCDLIVASDDAFFQDPVVRMGIPGVEYFAHPYELNPRIAKEFLF CGERMSAERAWQMGMVNRMVPRAELEAATYALAAGIARQPRMGLALTKQ AINHVEDLOGKBAAMDAAEAWHHEAHAHNFILSGDKLCCFDAKCMVOAN	<i>Pseudomonas</i> sp. Chol1 = 225/293 (77%)-250/293 (85%)	WP_008568678.1		
	KQALGAQGKGA	<i>C. testosteroni</i> ATCC 11996 = 225/296 (76%)-256/296 (86%)	WP_003078402.1		

Enoil-ACP reductasa	MSGWLNTPLTAALGCRYPIVQTAMGWVADANLVIATTRAGGFGFLAGAT IAASELEGEIRKVIDATGGSNFGLNFHMFQDNAAQCVDLAIAYRLRAVS YGRGPDKQTIARFKAANVLCIPTVGALKHALKAVQLGADLITIQGGEGG GHTGGVPSSILLPQVLDGVSVPVIAAGGFATGRGLASALAAGASGIAMG TRFLMTRESPTPAATLERYLKVNDPQQVRVTLAVDGMRHRMIENRFINH LEQAGPFGRLRIALGSAWQWKQHTGMSLGHMAGVFFRALREDPAALSQV	Pseudomonas sp. GM84 = 311/357 (87%)-322/357 (90%) Pseudomonas sp. Chol1 = 285/350 (81%)-307/350 (87%)	WP_008094662.1 WP_008568679.1		
	VMAANQPVLLQRSMVDGQPDDGILPSGQVAAAIGELLSCQEVIESIARE AEQCLDALLARRHEARPAVPCPPIGEPL	<i>C. testosteroni</i> ATCC 11996 = 215/349 (62%)-269/349 (77%)	WP_003078400.1		
	VNTAFSTQLNQGIAELVIAKPPVNALDSQEWNALAREIDSLGANPEVRV	<i>Pseudomonas</i> sp. GM84 = 218/250 (87%)-234/250 (93%)	WP_008094663.1		
Enoil-CoA hidratasa	VVIRAEGRGFCAGVDIKELDAHPERIVEVNAGNYATFKAVHRCPVPVIV AVHGFVLGGGIGITGAADIVVAAECATFALPEVDRGAMGGGAHLQRLFP LQKVRYLFFTGDRIGAPEAMQYGFIERLVNKEQLRETALEIAARIAAKS PGMIRIAKEALNGIEDGNLEDKYRWEQGFTLQAYTSPDSAETRRAFVEK	<i>Pseudomonas</i> sp. Chol1 = 83/253 (33%)-114/253 (45%)	WP_008568646.1		
	REARF	<i>C. testosteroni</i> ATCC 11996 = 179/241 (74%)-207/241 (85%)	WP_003078394.1		
	MELTYTPKQNAFRAEVRAWLADHVPREPLASYDTREGFEQHRAWEAKLF DSRWSMVMWPAELGGRGCDLIEWLIFEEEYYGAGAPMRVNQNGQLLLGP	<i>Pseudomonas</i> sp. GM84 = 352/387 (91%)-366/387 (94%)	WP_008094666.1		
Acil-CoA deshidrogenasa	TLMEFGTEAQKKHFLPRMAASVDMWAQGWSEPNAGSDMAAITSKAVRDG DHYVLNGQKTWSTRATFADWLFGLFRSEPGSTRHHGLSFLMVPLDAPGV SIRPIKALNGKDAFAEVFFDDVRVPVGNLIGAEGQGWHVAMATAGFERG LLLRSPARFQYTARRLVELFKAEPAAAERDPGLRDAVLDCWMGAEAYAL	<i>Pseudomonas</i> sp. Chol1 = 318/387 (82%)-349/387 (90%)	WP_008568680.1		
	SAYHTVGRLGRGEQIGAESSINKIIWSELDLKMHETAMRLLGARGELLA GAPLAGDAAQWLEGFLFAQAGPIYAGTNEIQRNIIAERMLGLPK	<i>C. testosteroni</i> ATCC 11996 = 274/387 (71%)-325/387 (83%)	WP_003078392.1		
	MDFTFTDDQLAFREAISRFLMTEAAPEMLREIWETDAGRSPDLRNKIAA QGLTALSIPEDDGGLGMDDVAWALMTQELGYYAIPDSLADTAYVAVGLL	<i>Pseudomonas</i> sp. GM84 = 318/352 (90%)-332/352 (94%)	WP_008094668.1		
Acil-CoA deshidrogenasa	AALAADHPARSSLLPRIAEGSLRLAIGHPLNPLVSDAQLAEVLILPHGD EVHLLPRAAVDVEANPSIDASRRLGRVTWNPTPATLLVGGAQGRAVQAQ LLDRGALSVAGQLLGLAQRMLDLSVDYVAQRKQFGKAIGSFQAVKHHLA DVARQIEQAKPVLYRAAHGLARGDASASLWVSQARLACCEASWLAARKG	<i>Pseudomonas</i> sp. Chol1 = 256/352 (73%)-294/352 (83%)	WP_008568681.1		
	IQVHGAMGYTWEVDLQMFMKRAWALDASWGDRGFHKSRVGAYLFADTAR LGPGHTFED	<i>C. testosteroni</i> ATCC 11996 = 222/356 (62%)-273/356 (76%)	WP_003078391.1		

	MPEAYIVDALRSPTGKRKGALAEVHAIDLGAQVLKALVQRNAIPAEDYD DVIFGCVDTIGSQAGDIARTSWLAAGLPLNVPGTTVDRQCGSSQQALHF AAQAVMSGTQDVVAVGGVQTMTRIPISSAMLAGQPLGFSDPFSGSKGWQ	<i>Pseudomonas</i> sp. GM84 = 352/383 (92%)-371/383 (96%)	WP_008094670.1		
β-cetoadipoil-CoA tiolasa	QRFGSQPVDQFYAAQRIADHWHISREQMEAFALHSHQRALAARDNGRFA REIIAVEGLSVDETPRQTSLAKMAELQPVDPRFPSITAAVSSQTCDASA ALLVVSEAALKRYDLTPRARIHHLTVLGDDPIWHLTAPIAATRRALEKT	<i>Pseudomonas</i> sp. Chol1 = 324/383 (85%)-349/383 (91%)	WP_008568682.1		
	GLRMSDIDCVEINEAFASVVMAWAKELDIDPARTNVNGGAIALGHPLGA TGARLMTTLLNELECSGGRYGLQTMCEGGGQANVTIIERL	<i>C. testosteroni</i> ATCC 11996 = 297/381 (78%)-327/381 (85%)	WP_003078389.1		
	MAICNGRTVIITGAGGGLGRAYALAFAAEGANVVINDIRADAAQDVAGE	<i>Pseudomonas</i> sp. GM84 = 255/292 (87%)-271/292 (92%)	WP_008094672.1		
3-oxoacil-ACP reductasa	IRANGGQAIANSDDISTLDSAQRIVDAALAAFGEVHVLVNNAGVLRDRM FISLGEDDWDLVMRVHLKGHYCLANILGRRWRDQAKAGTPVAGRIINTS SGAGLQGSIGQSNYSAAKGGIAALTLVQAAELARYGITANALAPAARTA MTESAMPDVVKRPEDGSFDAWAPENVAPLVVWLGSEQSAHVSGQVFESQ	<i>Pseudomonas</i> sp. Chol1 = 184/294 (63%)-223/294 (75%)	WP_008568683.1		
	GGRISLGDGWRTGVTRDKGALWQVEEIGEAVAAILAEAPKAQRVWGS	<i>C. testosteroni</i> ATCC 11996 = 202/292 (69%)-237/292 (81%)	WP_003078383.1		
	MQDLELTEEQIMIRDMARDFARGEIAPHAQAWEKAAWIDDAVVAKMGEL GLLGMVVNEQWGGSYTDYVAYALAVEEIAAGDGATGALMSIHNSVGCGP	<i>Pseudomonas</i> sp. GM84 = 352/383 (92%)-366/383 (95%)	WP_008097430.1		
Acil-CoA deshidrogenasa	LLAYGSEQQQQDWLPRLATGEVIGCFCLTEPQAGSEAHNLRTRAELKDG EWVINGAKQFVSNARRAGLAIVFAVTDPDAGKKGISAFLVPTANEGFVV DRSEHKMGIRASDTCAVTLNNCRIPEANLLGERGKGLAIALSNLEGGRI GIAAQALGIARAAFEAALVYSRERIQFGKPINEHQSIANLLADMQVQIN	<i>Pseudomonas</i> sp. Chol1 = 324/383 (85%)-352/383 (91%)	WP_008568828.1		
	ATRLLILHAARLRSAGKPCLSEASQAKLFASEMAERVCSMAIQVHGGYG YLEDYPVERYYRDARITQIYEGSSEIQRMLIARELKHYPL	<i>C. testosteroni</i> ATCC 11996 = 208/374 (56%)-262/374 (70%)	EHN67232.1		
Enoil-CoA hidratasa	MTAHAQPPATSDAQSAQVLSDVRNHIGHLTLNRPAGLNALTLQMVRELR LHLEAWAVDPQIHAVVLRGEGPKGFCAGGDIRSLYDSYKSGATLHRDFF	<i>Pseudomonas</i> sp. GM84 = 135/340 (40%)-174/340 (51%)	WP_008095013.1		
	IEEYDLDLFIHHYRKPIVALMDGFTLGGGMGLAQGAELRVVTERSRLAM PEVGIGYFPDVGGSYFLSRIPGELGTYLGVTGVQIQAADALYCGLADWY LESAQLAVLDQRLDHLSWGEYPLKDLQGALARLGTQTLHNPPLAELRPA IDHFFALPDIPALLEQLRSVTVANSREWALKTADLLETRSPLAMAVTLE	<i>Pseudomonas</i> sp. Chol1 = 214/344 (62%)-259/344 (75%)	WP_008568827.1		
	LLRRGRHLSLEDCFRMELHLDQQWFDRGDLIEGVRALLIDKDKQPRWNP ASVFELDHQRVDQFFEGL	<i>C. testosteroni</i> ATCC 11996 = 51/152 (34%)-77/152 (50%)	EHN67426.1		

Aquellos genes que, además del nombre de la proteína que codifican, también están nombrados como *tes*, es debido a que ya estaban previamente caracterizados en *Comamonas testosteroni*. Por otra parte, aquellos genes que codifican para enzimas con denominación MaoC hacen referencia a proteínas que poseen un dominio estructural enoil-CoA hidratasa y relacionadas con las monoaminooxidasas implicadas en la degradación de aminas biogénicas (Sugino *et al.*, 1992), los que tienen la extensión DUF hacen referencia a una dominio proteico de función desconocida, el que se denomina como EF es un dominio estructural de proteínas de tipo hélice-bucle-hélice que se encuentra en una gran familia de proteínas de unión a calcio y aquellas con las siglas ACP son proteínas de unión a grupos acilo.

4. Estudio bioquímico, genético y metabólico del mutante 1 (DOC21Mut1).

El primer mutante obtenido utilizando la estrategia mutacional con el transposón Tn5 y denominado DOC21Mut1, no era capaz de crecer en medio mínimo suplementado con ácidos desoxicólico, cólico, testosterona o 4-androsten-3,17-diona como únicas fuentes de carbono, con una concentración de 5 mM en todos los casos. De acuerdo con el modelo propuesto (Fig. 19), el gen afectado en este mutante, codifica una enzima que cataliza etapas pertenecientes a la ruta central de degradación de compuestos esteroideos.

Utilizando una estrategia de recombinación homóloga mencionada anteriormente (Arcos *et al.*, 2010), se pudo identificar el punto de inserción exacto del transposón Tn5, así como el DNA adyacente en el mutante 1. Esta secuencia se verificó por PCR, utilizando DNA de la cepa silvestre (DOC21) como diana y los oligonucleótidos DES6 y DCB5*Xho*I (Apéndice III -Tabla 40-). Adicionalmente, estos cebadores fueron utilizados en PCRs en las cuales el DNA diana correspondía a los diferentes mutantes del Tn5 y ninguno de ellos estaba afectado en el mismo gen que el mutante 1.

La inserción del mencionado transposón en DOC21Mut1, interrumpía un gen con una alta similitud con un gen que codifica una dioxigenasa, responsable de la apertura en *meta* de anillos aromáticos. Esta enzima, desempeña un papel fundamental en la degradación de testosterona, [este gen se denomina tesB en Comamonas testosteroni TA441 (Horinouchi et al., 2001; Horinouchi et al., 2003a) y en Comamonas testosteroni ATCC 11996 (Horinouchi et al., 2004b; Horinouchi et al., 2012)] y colesterol [denominado hsaC en Mycobacterium tuberculosis H37Rv (Yam et al., 2009) y en Rhodococcus jostii RHA1 (van Der Geize et al., la apertura en anillo 2007)]. al provocar meta del А del núcleo de ciclopentanoperhidrofenantreno (Fig. 19).

Todas las dioxigenasas, catalizan la incorporación de 2 átomos de oxígeno al sustrato orgánico y se hallan implicadas tanto en procesos de biosíntesis como de degradación (Nozaki, 1979). Una de sus funciones más importantes es la ruptura de anillos aromáticos, de hecho, la primera dioxigenasa que se caracterizó, fue una catecol-1,2-dioxigenasa, que escindía el anillo aromático del catecol (Hayaishi, 1962). Pueden ser intradiólicas (escinden el anillo aromático entre carbonos hidroxilados adyacentes) y extradiólicas (rompen el anillo aromático entre un carbono hidroxilado y su carbono adyacente no hidroxilado) (Nozaki, 1979) (Fig. 74).



Figura 74. Ruptura del anillo aromático por parte de una dioxigenasa, ya sea con una actividad intradiólica (se representa en color rojo los oxígenos aportados al sustrato), o bien con una actividad extradiólica (los oxígenos aportados al sustrato se indican en azul).

Las extradiol dioxigenasas, realizan funciones de ruptura en *meta* de compuestos aromáticos dihidroxilados, intermediarios de rutas catabólicas de compuestos monocíclicos y policíclicos (Harayama *et al.*, 1992; Vaillancourt *et al.*, 2006; Fetzner, 2012). Las extradiol dioxigenasas mejor conocidas son, la catecol-2,3-dioxigenasa (XylE, NahH), la 2,3-dihidroxibifenil-1,2-dioxigenasa (BphC) y la 1,2-dihidroxinaftaleno dioxigenasa (NahC) (Yen & Gunsalus, 1982; Broderick, 1999; Khan *et al.*, 1996). Las dos últimas, catalizan la reacción de escisión del anillo A del bifenilo y del naftaleno respectivamente, y la primera de ellas cataliza la ruptura del anillo aromático del catecol, formado durante el metabolismo de compuestos monocíclicos y policíclicos, incluidos el naftaleno y el bifenilo (Yen & Gunsalus, 1982; Harayama & Rekik, 1989; Chaudhry & Chapalamadugu, 1991).

4.1. Expresión en *trans* del gen que codifica la dioxigenasa en el mutante 1 (DOC21Mut1).

Con el objetivo de comprobar la importancia de este gen para la degradación del ácido desoxicólico y otros compuestos esteroideos, se diseñaron y utilizaron los oligonucleótidos específicos DCB 3XbaI y DCB 5XhoI (Apéndice III - Tabla 40-), sobre el DNA genómico de la cepa DOC21, para amplificar mediante PCR el gen codificante para la dioxigenasa de apertura en meta del anillo A. El producto de amplificación se clonó en el plásmido pBBR1MCS-3 [replicativo en Pseudomonas (Kovach et al., 1995)], utilizando los cortes de restricción presentes en los primers flanqueantes al gen (XbaI y XhoI respectivamente), resultando la construcción pMCOx (expresándose así el gen bajo el control del promotor lac). Posteriormente, el pMCOx fue transferido al mutante DOC21Mut1 mediante un mating triparental (Materiales y Métodos - Apdo 12-), con el objetivo de comprobar si se producía una reversión de función en el mutante DOC21Mut1, recuperando la capacidad de degradar el ácido desoxicólico. Sin embargo, a pesar de que el gen clonado se expresaba en *trans*, la cepa recombinante DOC21Mut1 pMCOx, era incapaz de crecer en medio mínimo suplementado con los ácidos cólico y desoxicólico como única fuente de carbono. Además, cuando dicha cepa recombinante que expresa el gen de la dioxigenasa fue cultivada en medio mínimo suplementado con citrato como fuente de crecimiento y los ácidos cólico y desoxicólico como precursores de intermediarios, se observó una tinción rojiza similar a la producida por el DOC21Mut1. Estos resultados sugerían que el gen que codificaba para la dioxigenasa pertenecía a una unidad transcripcional que comprendía diferentes genes "corriente abajo", los cuales no se expresaban debido al efecto polar de la inserción del transposón Tn5.

Si como se espera, el intermediario o intermediarios acumulados son los mismos en el mutante como en la cepa recombinante que está expresando la dioxigenasa, se podría argumentar que algunos de los genes localizados "corriente abajo" respecto a dicho gen, participan en la formación de un intermediario previo a la síntesis del sustrato de la dioxigenasa de apertura en *meta*. Así, si el bloqueo metabólico sucede antes de la síntesis del 3,4-dihidroxi-9,10-secoandrosta-1,3,5(10)-trieno-9,17-diona (DHSATD) (Fig. 19), los intermediarios acumulados (causantes de la tinción rojiza del medio), no podrían ser utilizados como sustrato por la *meta*-dioxigenasa, por lo que la expresión en *trans* de este gen, podría no afectar al comportamiento del mutante.

Cuando el mutante DOC21Mut1 se cultivó en medio mínimo líquido, conteniendo ácido 4-OH-fenilacético o ácido cítrico, a una concentración 5 mM como única fuente de energía y ácido desoxicólico, ácido cólico o testosterona, a una concentración 5 mM como fuente de potenciales intermediarios del metabolismo central, el medio torna gradualmente a

rojo, indicando la acumulación de intermediarios catabólicos. Esto evidencia la existencia de una ruta central resultante de la convergencia de rutas periféricas, involucradas en la degradación de ácido desoxicólico, ácido cólico, testosterona y probablemente muchos otros esteroides.

La identificación de estos intermediarios producidos a partir del ácido desoxicólico, ácido cólico o testosterona, nos permitirá dar respuesta a importantes preguntas. Así, si los intermediarios metabólicos a partir de ácido cólico o ácido desoxicólico conservaban sus hidroxilaciones, esto implica que las posibles enzimas pertenecientes a la ruta general, eran capaces de aceptar diferentes sustratos estructuralmente relacionados. Sin embargo, los intermediarios no hidroxilados, se acumulaban a partir de todos los precursores, lo que indicaba el desconocimiento de las etapas metabólicas requeridas para la eliminación de los grupos hidroxilo y lo que sucedía anteriormente a la convergencia de las rutas periféricas, el metabolismo de los compuestos esteroideos mencionados, ocurre a través de su transformación en 4-androsten-3,17-diona (Fig. 19). La degradación de los 4 anillos de la estructura del ciclopentanoperhidrofenantreno de estos esteroides, implica la apertura del anillo B y la aromatización simultánea del anillo A. El fenolato resultante, es posteriormente hidroxilado, originando el derivado aromático dihidroxilado 3,4-dihidroxi-9,10-secoandrosta-1,3,5(10)-trieno-9,17-diona (DHSATD). Este DHSATD, es sometido a una apertura del anillo gracias a una escisión en *meta* del núcleo aromático dihidroxilado. Dicha acción es catalizada por la dioxigenasa codificada por el gen mutado en el DOC21Mut1. El producto originado por la apertura de los anillos A, B y C, el ácido 4,5-9,10-diseco-3-hidroxi-5,9,17-trioxoandrosta-1(19),2-dieno-4-oico (4,9-DSHTAD), es finalmente convertido en metabolitos centrales, mediante una serie de reacciones no definidas todavía (Fig. 75).



Figura 75. Representación esquemática de la posible ruta de degradación de los compuestos esteroideos. Los estudios realizados durante esta Tesis Doctoral, en consonancia con estudios anteriores realizados sobre otras cepas (Introducción - Apdo 3-), sugieren la confluencia catabólica de los diferentes compuestos esteroideos en un intermediario común a todos ellos, el androsta-4-en-3,17-diona, el cual continuaría el proceso degradativo hasta dar lugar a compuestos intermediarios del metabolismo central.

4.2. Análisis del gen que codifica la dioxigenasa de apertura en *meta* de las cepas DOC21 y DOC19.

Para llevar a cabo el análisis genético del gen que codificaba la dioxigenasa de apertura en *meta*, se realizó una amplificación de dicho gen con los *primers* DES6 y DCB 5*Xho*I (Apéndice III -Tabla 40-), diseñados sobre la secuencia de DNA genómico de la cepa DOC21. La PCR se hizo con el oligo DES6, que se halla en el gen adyacente, con el objetivo de comprobar que los ORFs adyacentes al gen de la dioxigenasa estaban conservados con respecto a otras bacterias degradadoras de compuestos esteroideos, como *Comamonas testosteroni* TA441 (Horinouchi *et al.*, 2001; Horinouchi *et al.*, 2003a), *Comamonas testosteroni* ATCC11996 (Horinouchi *et al.*, 2004b; Horinouchi *et al.*, 2012), *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (Yam *et al.*, 2009) y *Rhodococcus jostii* RHA1 (van Der Geize *et al.*, 2007), además de corroborar así que la región amplificada era la esperada.

Una vez realizada la amplificación en ambas cepas, DOC21 y DOC19. El resultado, como era de esperar, fue la obtención de la secuencia completa de un gen que codificaba una dioxigenasa de apertura en *meta* del anillo A, tanto en la DOC21 (Fig. 76), como en la DOC19 (Fig. 77). Dicha secuencia era prácticamente idéntica en ambas cepas (Fig. 78). La proteína codificada en DOC19 mostraba una homología del 88,5% con la proteína identificada en DOC21 (Tabla 29).

Secuencia del gen que codifica la enzima dioxigenasa que cataliza la apertura en *meta* del anillo A en la cepa *P. putida* DOC21:

+1	М	I	E	I	R	G	L	S	Y	F	v	A	Q	v	E	N	L	S	i I	H	W	Q :	R 3	ζ
1	ATO	GAT	CGA	GAT	TCG	CGG	TTT	GAG	СТА	TTT	CGT	CGC.	ACA	GGT	CGA	AAA	ССТ	CAG	GCCA	ATT	GGC	AGC	GTTA	ACG
	TA	СТА	GCT	СТА	AGC	GCC	AAA	CTC	GAT	AAA	GCA	GCG	TGT	CCA	GCT	TTT	GGA	.GTC	GG	ΓΑΑ	CCG	TCG	CAAI	ſGC
+1	А	Е	D	v	L	G	м	0	v	R	Р	А	Р	А	G	G	L	Y	v	к	м	D	Е	R
71	CCC	GAG	GAT	GTC	стс	GGC	ATG	CAG	GTC	CGG	CCG	GCA	CCG	GCT	GGC	GGG	CTG	TAC	GTO	GAA	GAT	GGA	CGAC	GCG
, -	GG	CTC	СТА	CAG	GAG	CCG	TAC	GTC	CAG	GCC	GGC	CGT	GGC	CGA	CCG	CCC	GAC	ATG	GCA	CTT	СТА	CCT	GCT	CGC
+1	1	P	F	R	м	L.	т	v	E	G	s i	E)	A 1	R ·	y '	v	A	s	G	W	Е	L	А	s
141	GC	CGT	- TTC	GCA	TGC	TGA	– TCG'	TCG	AGG	GCA	GCG	AGG	CGC	GCT	– Atrgi	TCG	ССТ		GC	rgg	GAG	CTG	GCT1	rCG
	CG	GCA.	AAG	CGT	ACG	ACT	AGC	AGC	TCC	CGT	CGC	TCC	GCG	CGA	TAC	AGC	GGA	.GGC	CGI	ACC	CTC	GAC	CGAF	AGC
+1	Е	Q	A	F	т	A	A	L	A	. н	L	D	G	Q	G	v	E	W	ΓÇ	2.	A	G	S J	A
211	GA	GCA	GGC	CTT	CAC	TGC	TGC	GCT	GGC	CCA	TCT	GGA	CGG	GCA	GGG	CGT	GGA	GTG	GCI	AGG	CCG	GCA	GCG	CCG
	CTC	CGT	CCG	GAA	GTG	ACG	ACG	CGA	CCG	GGT	AGA	ССТ	GCC	CGT	CCC	GCA	ССТ	CAC	CG	ГСС	GGC	CGT	CGCC	GGC

+1 E D I D Q R G V Q A L V V V R D P S G N R H E L 281 AGGACATCGACCAGCGCGGCGTGCAAGCGCTGGTGGTGGTGGTCGTGACCCTTCCGGCAACCGCCATGAACT TCCTGTAGCTGGTCGCGCCGCACGTTCGCGACCACCACCAGGCACTGGGAAGGCCGTTGGCGGTACTTGA
+1 S W G H R S D C L P F V S P Q G V P R F V T G 351 GAGCTGGGGCCATCGCTCCGACTGCCTGCCGTTCGTATCGCCGCAGGGCGTGCCGCGTTTCGTCACCGGT CTCGACCCCGGTAGCGAGGCTGACGGACGGCCAAGCATAGCGGCGTCCCGCACGGCGCAAAGCAGTGGCCA
+1 D M G L G H T V L P A P D F D A T L A F A K D 421 GACATGGGCCTGGGCCACACCGTGCTGCCGGCGCCGGACTTCGACGCGACCCTGGCCTTCGCCAAGGACG CTGTACCCGGACCCGGTGTGGCACGACGGCCGCGCGCGCG
+1 V L G F S L S D I F N F R P D P S A P P I R I H 491 TGCTCGGCTTCAGCCTGTCGGACATCTTCAATTTCCGCCCCGATCCGTCGGCGCCGCCGATCCGCATCCA ACGAGCCGAAGTCGGACAGCCTGTAGAAGTTAAAGGCGGGGGCTAGGCAGCCGCGGCGGCGGCGAGGT
+1 F L H C G N A R H H S L A L A E Y P V P S G C 561 CTTCCTGCACTGCGGCAACGCCCGTCACCACAGCCTGGCGCTGGCCGAGTACCCGGTGCCGTCAGGCTGC GAAGGACGTGACGCCGTTGCCGGGCAGTGGTGTCGGACCGCGACCGGCTCATGGGCCACGGCAGTCCGACG
+1 V H V M V E V D S M T E V G R A H D R H Q A Q 631 GTGCATGTGATGGTCGAAGTCGATGCGAAGTCGGACGCGCGCG
+1 G V Q L S A T L G Q H L N D R M T S F Y M K T P 701 GCGTGCAGCTTCGGCCACGCTCGGCCAGCACCTCAATGACCGCATGACCAGCTTCTACATGAAAACCCC CGCACGTCGAAAGCCGGTGCGAGCCGGTCGTGGAGTTACTGGCGTACTGGTCGAAGATGTACTTTTGGGG
+1 S G F D L E Y G F G G L Q V D W A E H S A F E 771 GTCCGGCTTCGACCTGGAGTACGGCTTTGGCGGCCTGCAGGTGGACTGGGCCGAGCACTCGGCATTCGAG CAGGCCGAAGCTGGACCTCATGCCGAAACCGCCGGACGTCCACCTGACCCGGCTCGTGAGCCGTAAGCTC
+1 F T R V S I W G H D F S V G Q Q G A & 841 TTCACCCGCGTGAGCATCTGGGGGCCATGACTTCTCGGTCGG

Figura 76. Secuencias de nucleótidos y aminoácidos del gen completo que codifica la enzima dioxigenasa de apertura en *meta*, perteneciente a la *P. putida* DOC21. Se muestra resaltado en rojo, el marco de lectura abierto correcto de la proteína (ORF).

Secuencia del gen que codifica la enzima dioxigenasa que cataliza la apertura en *meta* del anillo A en la cepa *P. putida* DOC19:

+1 1	M I E I R G L S Y F V A Q C A D L S Q W Q R Y ATGATCGAGATTCGCGGTTTGAGCTACTTCGTCGCCCAGTGCGCAGACCTCAGCCAGTGGCAGCGCTATG TACTAGCTCTAAGCGCCAAACTCGATGAAGCAGCGGGTCACGCGTCTGGAGTCGGTCACCGTCGCGATAC
+1 71	A V D V L G M Q V S P A P A G G L Y V K M D E R CCGTGGATGTGGGCATGCAGGTGAGCCCGGCGCCTGCGGGGCGGGC
+1 141	P F R M L I V E G S E P R Y L A S G W E L A S CCCGTTTCGCATGCTGATCGTCGAAGGCAGCGAGCCGCGTTACCTGGCCTCGGGCAGCGGAACTGGCCTCG GGGCAAAGCGTACGACTAGCAGCTTCCGTCGCTCGGCGCAATGGACCGGAGCCCGACCCTTGACCGGAGC
+1 211	Q A A F E T A L A H L D A C G V E W Q A G S A CAGGCGGCGTTCGAAACGGCCTTGGCGCACCTGGACGCCTGTGGCGTCGAATGGCAAGCGGGCAGCGCTG GTCCGCCGCAAGCTTTGCCGGAACCGCGTGGACCTGCGGACACCGCAGCTTACCGTTCGCCCGTCGCGAC
+1 281	A Q I E Q R G V Q A L V S L T D P S G N R H E L CGCAGATCGAGCAGCGGGGTGTCCAGGCACTGGTCAGCCTGACCGACC
+1 351	S W G H R S D C Q P F T S P Q G V P R F I T G GAGCTGGGGGCCATCGCTCCGACTGCCAGCCCTTTACCTCGCCCCAAGGTGTGCCGCGCGTTCATTACCGGC CTCGACCCCGGTAGCGAGGCTGACGGTCGGGAAATGGAGCGGGGTTCCACACGGCGCGAAGTAATGGCCG
+1 421	D M G L G H T V L P A P Q F D A T L A F A K D GACATGGGCCTGGGGCACACGGTGCTGCCAGCCCCCCAGTTCGACGCCACCCTGGCCTTCGCCAAGGACG CTGTACCCGGACCCCGTGTGCCACGACGGTCGGGGGGGTCAAGCTGCGGTGGGACCGGAAGCGGTTCCTGC
+1 491	V L G F E L S D I F N F R P D P S A A P I R I H TGCTCGGCTTCGAACTCTCGGACATCTTCAACTTCCGCCCCGATCCTTCGGCCGCGCCGATCCGTATCCA ACGAGCCGAAGCTTGAGAGCCTGTAGAAGTTGAAGGCGGGGGCTAGGAAGCCGGCGCGCGC
+1 561	F L H C R N A R H H S L A L A E Y P V P S G C TTTTCTGCATTGCCGCAATGCCCGCCACCACAGTCTGGCACTGGCCGAGTATCCGGTGCCGTCGGGATGC AAAAGACGTAACGGCGTTACGGGCGGTGGTGTCAGACCGTGACCGGCTCATAGGCCACGGCAGCCCTACG
+1 631	V H V M V E V D S M T E V G R A H D R L L A H GTGCACGTGATGGTCGAGGTCGACTCGATGACCGAGGTCGGCCGCGCCCACGACCGCCTGCTGGCCCATG CACGTGCACTACCAGCTCCAGCTGAGCTACTGGCTCCAGCCGGCGGGGGGGG
+1 701	D V R L S A T L G Q H L N D R M T S F Y M K T P ACGTGCGCCTCTCGGCAACCCTGGGCCAGCACCTGAACGACCGCATGACCAGCTTCTACATGAAGACCCC TGCACGCGGAGAGCCGTTGGGACCCGGTCGTGGACTTGCTGGCGTACTGGTCGAAGATGTACTTCTGGGG
+1 771	S A F D L E Y G H G G L Q V D W A E H S A F E GTCGGCGTTCGACCTGGAGTACGGGCATGGCGGCCTGCAAGTCGACTGGGCCGAGCACTCGGCCTTCGAA CAGCCGCAAGCTGGACCTCATGCCCGTACCGCCGGACGTTCAGCTGACCCGGCTCGTGAGCCGGAAGCTT



Figura 77. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos del gen completo que codifica la enzima dioxigenasa de apertura en *meta*, perteneciente a la *P. putida* DOC19. Se muestra resaltado en rojo, el marco de lectura abierto correcto de la proteína (ORF).

Para comprobar el porcentaje de identidad existente entre las secuencias de los genes que codifican las dioxigenasas de las cepas a estudio, y las de otras dioxigenasas presentes en otras cepas bacterianas con capacidad de catabolizar compuestos esteroideos, pertenecientes a diferentes taxones filogenéticos (*Comamonas, Mycobacterium y Rhodococcus*), se obtuvieron del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) las secuencias de aminoácidos de dichos genes y se compararon. Como resultado de este proceso se pudo observar una notable homología entre dichos genes (Fig. 78).

DOC21 DOC19 TA441 H37Rv RHA1	MIEIRGLSYFVAQVENLSHWQRYAEDVLGMQVRP-APAGGLYVKMDERPFRMLIVEGSEA MIEIRGLSYFVAQCADLSQWQRYAVDVLGMQVSP-APAGGLYVKMDERPFRMLIVEGSEP MMEIRGLAYVVAESSDLDRWVSYARDVLGMMPST-TADGDLLIKMDERQFRFQVQPGSND -MSIRSLGYLRIEATDMAAWREYGLKVLGMVEGKGAPEGALYLRMDDFPARLVVVPGEHD -MSIRSLAYMRIEATDMSAWREYGLKVLGMVEGKGSDPDALYLRMDDFPARLVIFPGEHD :.**.*.*. : :: * ***** : . * ::**: *:: *	59 59 59 59 59
DOC21 DOC19 TA441 H37Rv RHA1	RYVASGWELASEQAFTAALAHLDGQGVEWQAGSAEDIDQRGVQALVVVRDPSGNRHELSW RYLASGWELASQAAFETALAHLDACGVEWQAGSAAQIEQRGVQALVSLTDPSGNRHELSW RYSASGWEVANKQAFEQALKVLQAADVHYEMGSSELCAKRHVQELAIVMDPSGNRHEIVW RLLEAGWECANAEGLQEIRNRLDLEGTPYKEATAAELADRRVDEMIRFADPSGNCLEVFH RLSVSGWETANAAELQEVRDNLSAAGVAFKEGTAEQLQDRRVDELITFEDPSGNTLEAFH * :*** *. : *: * *: : . ***** *	119 119 119 119 119 119
DOC21 DOC19 TA441 H37R v RHA1	GHRSDCLPFVSPQGVPRFVTGDMGLGHTVLPAPDFDATLAFAKDVLGFSLSDIFNFRP GHRSDCQPFTSPQGVPRFITGDMGLGHTVLPAPQFDATLAFAKDVLGFELSDIFNFRP GFKSDFSHFASPQGVSRFITGDYGLGHTVLPAPDFDKTVAFVRNVLGFGLSDIYNFKP GTALEHRRVVSPYG-HRFVTGEQGMGHVVLSTRDDAEALHFYRDVLGFRLRDSMRLPPQM GAALEHRRVVSPYG-HKFVTGEQGLGHVVLSTTDDEASLRFYRDVLGFRLRDSMRLPPQL * :** * :*:**: *:**.**: : :: *: *:**** * * .: *	177 177 177 178 178
DOC21 DOC19 TA441 H37Rv RHA1	DPSAPP-IRIHFLHCGNARHHSLALAEYPVPSGCVHVMVEVDSMTEVGRAHDRHQAQG DPSAAP-IRIHFLHCRNARHHSLALAEYPVPSGCVHVMVEVDSMTEVGRAHDRLLAHD AGDAGPTVRIHFFHCANGRHHSLALAEFPSASGCVHVMVEVDNMPEVGRAMDRMQKSQ VGRPADGPPAWLRFFGC-NPRHHSLAFLPMPTSSGIVHLMVEVEQADDVGLCLDRALRRK VGRPADGKPAWLRFFGC-NPRHHSLAFLPMPTPSGIVHLMIEVENSDDVGLCLDRALRKK ::*: * * ******: * .** **:*:*: :**: ***	234 234 235 237 237
DOC21 DOC19 TA441 H37Rv RHA1	VQLSATLGQHLNDRMTSFYMKTPSGFDLEYGFGGLQVDWAEHSAFEFTRVSIWGHDFSVG VRLSATLGQHLNDRMTSFYMKTPSAFDLEYGHGGLQVDWAEHSAFEFTRVSIWGHDFSVG VKLSATLGQHTNDKMISFYMKTPSNFDLEFGYGGAVIDWEHHITHEFTTVSLWGHDFSVG VPMSATLGRHVNDLMLSFYMKTPGGFDIEFGCEGRQVDDRDWIARESTAVSLWGHDFTVG VKMSATLGRHVNDLMLSFYMKTPGGFDIEFGCEGRQVEDESWIARESTAVSLWGHDFSVG * :*****: ** * *******. **:* * :: : * * **:****	294 294 295 297 297
DOC21 DOC19 TA441 H37R v RHA1	QQGA- 298 QQ 296 RPENN 300 ARG 300 MQP-300	

Figura 78. Comparación entre las secuencias de aminoácidos completas de los genes codificantes de dioxigenasas de apertura en *meta*, pertenecientes a diferentes microorganismos con capacidad para catabolizar compuestos esteroideos, *Comamonas testosteroni* TA441, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *Rhodococcus jostii* RHA1 y las cepas a estudio

Pseudomonas putida DOC21 y *Pseudomonas putida* DOC19. Debajo de las secuencias, se hallan diferentes signos de puntuación, los asteriscos indican que en dicha posición los residuos son idénticos, dos rayas indican posiciones en las que se han realizado sustituciones conservativas, que no afectarían al comportamiento de la proteína, una sola raya indica la presencia de sustituciones menos conservativas y un espacio en blanco representa sustituciones nada conservativas que indican un cambio importante en el aminoácido, ya que son muy diferentes entre ellos. Las líneas entre residuos dentro de las secuencias, representan la ausencia de un aminoácido; esto puede ser debido a un proceso de deleción, translocación, etc...

A la vista de los resultados, se puede observar, como era de esperar, que las secuencias de las dioxigenasas poseen un gran porcentaje de identidad entre las cepas de *P. putida* y va decreciendo a medida que las especies bacterianas se alejan en su relación filogenética (Tabla 29).

Tabla 29. Pocentaje de identidad entre los genes codificantes para la dioxigenasa de apertura en *meta* entre diferentes microoganismos como *C. testosteroni* TA441, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *Rhodococcus jostii* RHA1 y las cepas a estudio *P. putida* DOC21 y DOC19.

	C. testosteroni	M. tuberculosis	R. jostii	DOC19	DOC21
C. testosteroni	100				
M. tuberculosis	42	100			
R. jostii	44	81	100		
DOC19	62	41	43	100	
DOC21	61	42	43	89	100

Por otra parte, se pudo comprobar que los ORFs adyacentes estaban conservados en ambas cepas (Fig. 79), mostrando una alta homología con los genes localizados "corriente abajo" del gen *tes*B en *Comamonas testosteroni* (Fig. 80). La conservación de estas funciones entre bacterias pertenecientes a diferentes taxones no relacionados sugería que:

- a) La ruta catabólica central para la degradación de compuestos esteroideos se ha conservado durante la evolución.
- b) Los genes codificados en esta ruta han sido ampliamente distribuidos por transferencia horizontal.

DOC21 DOC19 TA441	-MNKQLTAADAVGQLRDGMTIGFGGWGPRRKPMAIVREILRSPVKDLTVVAYGGPEVGML -MNKQLTAADAVAQLRDGMTIGFGGWGPRRKPMAIVREILRSPLKDLTVVAYGGPEVGML MANKLMTAKDVVASIKDGMTIGIGGWGPRRKPMALVRELLRSPVKDLTVVAYGGADVGML ** :** *.*.::*****:********************	59 59 60
DOC21 DOC19 TA441	CAAGKVRKLVFGFATLDAIPLEPYYRKAREAGELELMELDEGMFQWGLRAAGMRLPFLPT CAAGKVRKLVFGFVTLDAIALEPYFRKAREAGELELLELDEG CAAGKVKKLIFAFVSLDFIPLEPYFRKARQSGEIEVMEIDEGHMVLGLKAAGMRIPYIPT ******:**:*.*	119 101 120
DOC21 DOC19 TA441	RCGLATDVARLNPEIKEIRSPYADGEVLLAMPALNLDVAFVHVNVADRLGNCLVTGPDPY RVGLGTDVLKHNSSIRLIESPY-DGKEWVAMPAINLDVALLHVDRADSRGVCQIAGPDIY	179 179

DOC21 DOC19	FDHLFARAAQQCFVSCEQLQDRLELTAE-SARFNTFERYLVTGVVHAPLGAHPTSCPSDY 238
TA441	MDDLFARAATNTFVSCDELVESSSFESEQAARLVFWERSETTGVVHLPGGAHPSSCAPLY 239
DOC21	GWDMQHLKRYVASASEENGWQQYVQTYVAGGEQAYQAQNGGAERMGALPLAVF 291
DOC19	
TA441	GFDVKHFKEYAASSKEEGGWSSYQQKYVQCTEQEYLEKVGGMEAIKRLPLPVF 292

Figura 79. Comparación de las secuencias del gen que codifica la subunidad α de la 3-cetoesteroide-CoA transferasa, tanto de la *Comomamonas testosteroni* TA441 (cepa control) y la *Pseudomonas putida* DOC21 (ambos genes completos), como de la cepa *Pseudomonas putida* DOC19 (fragmento del gen). Este es el gen adyacente "corriente abajo" del gen de la dioxigenasa. Como se puede observar presentan una alta homología entre las cepas bacterianas.



Figura 80. Cladograma que representa la homología del gen codificante para la dioxigenasa de apertura en *meta*, así como de algunos de los genes adyacentes, en diferentes microorganismos.

En el momento actual se están llevando a cabo en nuestro laboratorio otra serie de estudios encaminados a continuar esclareciendo y caracterizando bioquímica y genéticamente las rutas catabólicas que permiten la degradación de compuestos de naturaleza esteroidea en la cepa *Pseudomonas putida* DOC21. Esta Tesis Doctoral ha permitido el aislamiento y caracterización de diferentes cepas, su análisis genético y la obtención de diferentes mutantes que permitirán, en adelante, estudiar y caracterizar la ruta requerida en *P. putida* DOC21 para la degradación de diferentes compuestos esteroideos.

CONCLUSIONES

"Un científico debe tomarse la libertad de plantear cualquier cuestión, de dudar de cualquier afirmación, de corregir errores"

Robert Oppenheimer (1904-1967).

Conclusiones.

- 1) El estudio de la ruta o rutas metabólicas requeridas para la asimilación bacteriana aeróbica del colesterol y de otros compuestos estructuralmente relacionados, ha conducido al aislamiento de 19 cepas diferentes. Todas ellas eran capaces de utilizar compuestos esteroideos como única fuente de carbono y energía. Diecisiete de los aislados podían asimilar colesterol (cepas COL), mientras que sólo dos degradaban el ácido desoxicólico (cepas DOC). Ninguna de las cepas COL era capaz de degradar el ácido desoxicólico y ninguna de las cepas DOC metabolizaba el colesterol. Todas estas cepas han sido caracterizadas bioquímica y genéticamente.
- 2) Todos las cepas COL eran bacterias Gram-positivas y pertenecían a los géneros Gordonia, Tsukamurella y Rhodococcus. Sin embargo, las dos cepas DOC eran bacterias Gram-negativas pertenecientes al género Pseudomonas (Pseudomonas putida DOC21 y DOC19).
- 3) La cepa *Pseudomonas putida* DOC21 fue seleccionada debido su mejor crecimiento en los medios ensayados, para estudiar la ruta responsable de la asimilación de diferentes ácidos biliares (ácido desoxicólico, ácido cólico, ácido quenodesoxicólico, ácido litocólico y ácido ursodesoxicólico). Mediante mutagénesis con el transposón Tn5, se aislaron 53 mutantes, todos ellos afectados en genes involucrados en la degradación de estos esteroides. El análisis del punto de inserción del transposón, ha permitido conocer la secuencia de dichos genes así como la de las proteínas codificadas por ellos.
- 4) Los resultados expuestos en esta Tesis Doctoral, han permitido diseñar, por primera vez en *Pseudomonas*, el boceto que representa la ruta principal y rutas periféricas que permitiría a la DOC21 llevar a cabo la completa degradación de ácidos biliares y de otros compuestos esteroideos.
BIBLIOGRAFÍA

"El sabio puede cambiar de opinión. El necio, nunca."

Immanuel Kant (1724-1804).

Abrams, L.S., Skee, D.M., Natarajan, J., Wong, F.A., Leese, P.T., Creasy, G.W., Shangold, M.M. (2001). Pharmacokinetics of norelgestromin and ethinyl estradiol delivered by a contraceptive patch (Ortho Evra/Evra) under conditions of heat, humidity, and exercise. *J. Clin. Pharmacol.* **41**, 1301–1309.

Adékambi, T., Drancourt, M., Raoult, D. (2009). The *rpo*B gene as a tool for clinical microbiologists. *Trends Microbiol.* 17, 37–45.

Ahmed, W., Khan, N., Glueck, C.J., Pandey, S., Wang, P., Goldenberg, N., Uppal, M., Khanal, S. (2009). Low serum 25 (OH) vitamin D levels (<32 ng/mL) are associated with reversible myositis-myalgia in statin-treated patients. *Transl. Res. J. Lab. Clin. Med.* **153**, 11–16.

Ali, M.M., Vaidya, V. (2007). Vitamin D and cancer. J. Cancer Res. Ther. 3, 225–230.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389–3402.

Anderson, J., Iyaduri, R. (2003). Integrated urban water planning: big picture planning is good for the wallet and the environment. *Water Sci. Technol.* 47, 19–23.

Anzai, Y., Kim, H., Park, J.Y., Wakabayashi, H., Oyaizu, H. (2000). Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **4**, 1563–1589.

Arcos, M., Olivera, E.R., Arias, S., Naharro, G., Luengo, J.M. (2010). The 3,4dihydroxyphenylacetic acid catabolon, a catabolic unit for degradation of biogenic amines tyramine and dopamine in *Pseudomonas putida* U. *Environ. Microbiol.* **12**, 1684–1704.

Arima, K., Nagasawa, M., Bae, M., Tamura, G. (1969). Microbial transformation of sterols. Part I. Decomposition of cholesterol by microorganisms. *Agric. Biol. Chem.* 33, 1636–1643.

Ashby, R.D., Solaiman, D.K.Y., Foglia, T.A. (2002). The synthesis of short- and medium-chain-length poly(hydroxyalkanoate) mixtures from glucose- or alkanoic acid-grown *Pseudomonas oleovorans. J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 28, 147–153.

Axelson, M., and Sjövall, J. (1990). Potential bile acid precursors in plasma--possible indicators of biosynthetic pathways to cholic and chenodeoxycholic acids in man. *J. Steroid Biochem.* **36**, 631–640.

Badsha, H., Daher, M., Ooi Kong, K. (2009). Myalgias or non-specific muscle pain in Arab or Indo-Pakistani patients may indicate vitamin D deficiency. *Clin. Rheumatol.* **28**, 971–973.

Baker, M.E. (2002). Recent insights into the origins of adrenal and sex steroid receptors. J. Mol. Endocrinol. 28, 149–152.

Barnetson, R.S., White, A.D. (1992). The use of corticosteroids in dermatological practice. *Med. J. Aust.* 156, 428–431.

Bayley, S.A., Duggleby, C.J., Worsey, M.J., Williams, P.A., Hardy, K.G., Broda, P. (1977). Two modes of loss of the Tol function from *Pseudomonas putida* mt-2. *Mol. Gen. Genet.* 154, 203–204.

Beigneux, A., Hofmann, A.F., Young, S.G. (2002). Human CYP7A1 deficiency: progress and enigmas. J. Clin. Invest. 110, 29–31.

Benson, D.A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., Rapp, B.A., Wheeler, D.L. (2000). GenBank. *Nucleic Acids Res.* 28, 15–18.

Bikle, D.D. (2011). Vitamin D regulation of immune function. *Vitam. Horm.* 86, 1–21.

Birkenmaier, A., Holert, J., Erdbrink, H., Moeller, H.M., Friemel, A., Schoenenberger, R., Suter, M.J.-F., Klebensberger, J., Philipp, B. (2007). Biochemical and genetic investigation of initial reactions in aerobic degradation of the bile acid cholate in *Pseudomonas* sp. strain Chol1. *J. Bacteriol.* **189**, 7165–7173.

Birkenmaier, A., Möller, H.M., Philipp, B. (2011). Identification of a thiolase gene essential for β -oxidation of the acyl side chain of the steroid compound cholate in *Pseudomonas* sp. strain Chol1. *FEMS Microbiol. Lett.* **318**, 123–130.

Björkhem, I. (2006). Crossing the barrier: oxysterols as cholesterol transporters and metabolic modulators in the brain. *J. Intern. Med.* **260**, 493–508.

Björkhem, I. (2007). Rediscovery of cerebrosterol. Lipids 42, 5–14.

Björkhem, I. (2013). Five decades with oxysterols. *Biochimie* 95, 448–454.

Björkhem, I., Meaney, S. (2004). Brain cholesterol: long secret life behind a barrier. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 806–815.

Björkhem, I., Heverin, M., Leoni, V., Meaney, S., Diczfalusy, U. (2006). Oxysterols and Alzheimer's disease. *Acta Neurol. Scand. Suppl.* 185, 43–49.

Björkhem, I., Cedazo-Minguez, A., Leoni, V., Meaney, S. (2009). Oxysterols and neurodegenerative diseases. *Mol. Aspects Med.* **30**, 171–179.

Bloch, K. (1965). The biological synthesis of cholesterol. *Science* 150, 19–28.

Bloch, K.E. (1979). Speculations on the evolution of sterol structure and function. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 7, 1–5.

Bortolini, O., Medici, A., Poli, S. (1997). Biotransformations on steroid nucleus of bile acids. *Steroids* 62, 564–577.

De Bosscher, K., Haegeman, G. (2009). Minireview: latest perspectives on antiinflammatory actions of glucocorticoids. *Mol. Endocrinol.* **23**, 281–291.

Bouvier, P., Rohmer, M., Benveniste, P., and Ourisson, G. (1976). $\Delta^{8(14)}$ -steroids in the bacterium *Methylococcus capsulatus. Biochem. J.* **159**, 267–271.

Boyer, H.W., Roulland-Dussoix, D. (1969). A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 41, 459–472.

Broderick, J.B. (1999). Catechol dioxygenases. Essays Biochem. 34, 173–189.

Brown, J.J., Bernstein, S. (1966). The preparation of steroidal $\Delta^{5(10),9(11)}$ -3-ketones. *Steroids* **8**, 87–107.

Brzostek, A., Sliwiński, T., Rumijowska-Galewicz, A., Korycka-Machała, M., Dziadek, J. (2005). Identification and targeted disruption of the gene encoding the main 3-ketosteroid dehydrogenase in *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiol*. **151**, 2393–2402.

Brzostek, A., Dziadek, B., Rumijowska-Galewicz, A., Pawelczyk, J., Dziadek, J. (2007). Cholesterol oxidase is required for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 275, 106–112.

Buck, A.C. (2004). Is there a scientific basis for the therapeutic effects of *Serenoa repens* in benign prostatic hyperplasia? Mechanisms of action. *J. Urol.* **172**, 1792–1799.

Capyk, J.K., D'Angelo, I., Strynadka, N.C., Eltis, L.D. (2009a). Characterization of 3-ketosteroid 9α-hydroxylase, a Rieske oxygenase in the cholesterol degradation pathway of *Mycobacterium tuberculosis. J. Biol. Chem.* **284**, 9937–9946.

Capyk, J.K., Kalscheuer, R., Stewart, G.R., Liu, J., Kwon, H., Zhao, R., Okamoto, S., Jacobs, W.R., Jr, Eltis, L.D., Mohn, W.W. (2009b). Mycobacterial cytochrome p450 125 (Cyp125) catalyzes the terminal hydroxylation of C₂₇ steroids. *J. Biol. Chem.* **284**, 35534–35542.

Capyk, J.K., Casabon, I., Gruninger, R., Strynadka, N.C., Eltis, L.D. (2011). Activity of 3-ketosteroid 9α-hydroxylase (KshAB) indicates cholesterol side chain and ring degradation occur simultaneously in *Mycobacterium tuberculosis. J. Biol. Chem.* **286**, 40717–40724.

Carlström, K., Lunell, N.O., Zador, G. (1978). Serum levels of FSH, LH, estradiol-17 β and progesterone following the administration of a combined oral contraceptive containing 20 micrograms ethinylestradiol. *Gynecol. Obstet. Invest.* **9**, 304–311.

Casabon, I., Crowe, A.M., Liu, J., Eltis, L.D. (2013a). FadD3 is an acyl-CoA synthetase that initiates catabolism of cholesterol rings C and D in actinobacteria. *Mol. Microbiol.* **87**, 269–283.

Casabon, I., Zhu, S.-H., Otani, H., Liu, J., Mohn, W.W., Eltis, L.D. (2013b). Regulation of the KstR2 regulon of *Mycobacterium tuberculosis* by a cholesterol catabolite. *Mol. Microbiol.* **89**, 1201–1212.

Casabon, I., Swain, K., Crowe, A.M., Eltis, L.D., Mohn, W.W. (2014). Actinobacterial acyl coenzyme A synthetases involved in steroid side-chain catabolism. *J. Bacteriol.* **196**, 579–587.

Chang, R.C.-C., So, K.-F. (2008). Use of anti-aging herbal medicine, *Lycium barbarum*, against aging-associated diseases. What do we know so far? *Cell. Mol. Neurobiol.* 28, 643–652.

Chaudhry, G.R., Chapalamadugu, S. (1991). Biodegradation of halogenated organic compounds. *Microbiol. Rev.* 55, 59–79.

Chen, W., Owsley, E., Yang, Y., Stroup, D., Chiang, J.Y. (2001). Nuclear receptormediated repression of human cholesterol 7α -hydroxylase gene transcription by bile acids. *J. Lipid Res.* **42**, 1402–1412.

Chiang, J.Y.L. (2009). Bile acids: regulation of synthesis. J. Lipid Res. 50, 1955–1966.

Chiang, Y.-R., Ismail, W., Gallien, S., Heintz, D., Van Dorsselaer, A., Fuchs, G. (2008a). Cholest-4-en-3-one-delta 1-dehydrogenase, a flavoprotein catalyzing the second step in anoxic cholesterol metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 107–113.

Chiang, Y.-R., Ismail, W., Heintz, D., Schaeffer, C., Van Dorsselaer, A., Fuchs, G. (2008b). Study of anoxic and oxic cholesterol metabolism by *Sterolibacterium denitrificans. J. Bacteriol.* 190, 905–914.

Chiang, Y.-R., Fang, J.-Y., Ismail, W., Wang, P.-H. (2010). Initial steps in anoxic testosterone degradation by *Steroidobacter denitrificans*. *Microbiol*.156, 2253–2259.

Chipley, J.R., Dreyfuss, M.S., Smucker, R.A. (1975). Cholesterol metabolism by *Mycobacterium*. *Microbios*. 12, 199–207.

Choi, K.Y., Benisek, W.F. (1988). Nucleotide sequence of the gene for the Δ^5 -3-ketosteroid isomerase of *Pseudomonas testosteroni. Gene* **69**, 121–129.

Choi, K.P., Molnár, I., Yamashita, M., Murooka, Y. (1995a). Purification and characterization of the 3-ketosteroid- Δ^1 -dehydrogenase of *Arthrobacter simplex* produced in *Streptomyces lividans. J. Biochem.* **117**, 1043–1049.

Choi, K.P., Molnár, I., Murooka, Y. (1995b). Secretory overproduction of Arthrobacter simplex 3-ketosteroid- Δ^1 -dehydrogenase by Streptomyces lividans with a multi-copy shuttle vector. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43, 1044–1049.

Choudhary, S.P., Tran, L.S. (2011). Phytosterols: perspectives in human nutrition and clinical therapy. *Curr. Med. Chem.* 18, 4557–4567.

Clarke, S.C. (2005). Pyrosequencing: nucleotide sequencing technology with bacterial genotyping applications. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 5, 947–953.

Claudel, T., Zollner, G., Wagner, M., Trauner, M. (2011). Role of nuclear receptors for bile acid metabolism, bile secretion, cholestasis, and gallstone disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1812, 867–878.

Clegg, D.J. (2012). Minireview: the year in review of estrogen regulation of metabolism. *Mol. Endocrinol.* 26, 1957–1960.

Connell, J.M.C., Davies, E. (2005). The new biology of aldosterone. J. Endocrinol. 186, 1–20.

Creasy, G.W., Abrams, L.S., Fisher, A.C. (2001). Transdermal contraception. *Semin. Reprod. Med.* **19**, 373–380.

Cutolo, M., Otsa, K. (2008). Review: vitamin D, immunity and lupus. Lupus 17, 6–10.

Dagley, S., Gibson, D.T. (1964). Degradation of catechol by bacterial enzymes. *J. Biol. Chem.* **239**, 1284–1285.

Dagley, S., Gibson, D.T. (1965). The bacterial degradation of catechol. *Biochem. J.* 95, 466–474.

Dahl, J.S., Dahl, C.E., Bloch, K. (1981). Effect of cholesterol on macromolecular synthesis and fatty acid uptake by *Mycoplasma capricolum*. J. Biol. Chem. 256, 87–91.

Dahl, J.S., Dahl, C.E., Bloch, K. (1982). Role of membrane sterols in *Mycoplasma* capricolum. Rev. Infect. Dis. 4 Suppl, S93–96.

Daughton, C.G., Ternes, T.A. (1999). Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environ. Health Perspect.* **107** Suppl 6, 907–938.

Davies, E., MacKenzie, S.M. (2003). Extra-adrenal production of corticosteroids. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **30**, 437–445.

Davis, L. G., Dibner, M. D., Battey, J. F. (ed.) (1986). Basic methods in molecular biology. Elsevier Sci. Publ. Co. New York.

Dedhia, R.C., McVary, K.T. (2008). Phytotherapy for lower urinary tract symptoms secondary to benign prostatic hyperplasia. *J. Urol.* **179**, 2119–2125.

DeLuca, H.F. (1977). Vitamin D as a prohormone. Biochem. Pharmacol. 26, 563–566.

Demain, A.L. (1992). Microbial secondary metabolism: a new theoretical frontier for academia, a new opportunity for industry. *Ciba Found. Symp.* **171**, 3–16.

Van Der Geize, R., Hessels, G.I., van Gerwen, R., Vrijbloed, J.W., van Der Meijden, P., and Dijkhuizen, L. (2000). Targeted disruption of the *kst*D gene encoding a 3-ketosteroid- Δ^1 -dehydrogenase isoenzyme of *Rhodococcus erythropolis* strain SQ1. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 2029–2036.

Dervilly-Pinel, G., Rambaud, L., Sitthisack, P., Monteau, F., Hewitt, S.A., Kennedy, D.G., and Le Bizec, B. (2011). 5α -Estrane- 3β ,17 β -diol and 5β -estrane- 3α ,17 β -diol: definitive screening biomarkers to sign nandrolone abuse in cattle? *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **126**, 65–71.

Djerassi, C. (ed.) (1960). Optical Rotatory Dispersion. McGraw-Hill. New York.

Donova, M.V., Egorova, O.V. (2012). Microbial steroid transformations: current state and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **94**, 1423–1447.

Döring, A., Paul, F., Dörr, J. (2013). [Vitamin D and multiple sclerosis : the role for risk of disease and treatment]. *Nervenarzt* **84**, 173–189.

Dörr, J., Döring, A., Paul, F. (2013). Can we prevent or treat multiple sclerosis by individualised vitamin D supply? *EPMA J.* **4**, 4.

Doukyu, N. (2009). Characteristics and biotechnological applications of microbial cholesterol oxidases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **83**, 825–837.

Dresen, C., Lin, L.Y.-C., D'Angelo, I., Tocheva, E.I., Strynadka, N., Eltis, L.D. (2010). A flavin-dependent monooxygenase from *Mycobacterium tuberculosis* involved in cholesterol catabolism. *J. Biol. Chem.* 285, 22264–22275.

Drobnic, K., Krizaj, I., Gubensek, F., Komel, R. (1993). Improved purification of steroid 1:2-dehydrogenase from *Nocardia opaca* and partial characterization of its cloned gene sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190, 509–515.

Drzyzga, O., Llorens, J.M.N., Fernández de Las Heras, L., García Fernández, E., Perera, J. (2009). *Gordonia cholesterolivorans* sp. nov., a cholesterol-degrading actinomycete isolated from sewage sludge. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**, 1011–1015.

Drzyzga, O., Fernández de las Heras, L., Morales, V., Navarro Llorens, J.M., Perera, J. (2011). Cholesterol degradation by *Gordonia cholesterolivorans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 4802–4810.

Duane, W.C., Javitt, N.B. (1999). 27-hydroxycholesterol: production rates in normal human subjects. *J. Lipid Res.* **40**, 1194–1199.

Dupont, S., Lemetais, G., Ferreira, T., Cayot, P., Gervais, P., Beney, L. (2012). Ergosterol biosynthesis: a fungal pathway for life on land? *Evol. Int. J. Org. Evol.* **66**, 2961–2968.

Dusso, A.S., Brown, A.J., Slatopolsky, E. (2005). Vitamin D. Am. J. Physiol. Renal. physiol. 289, F8-28.

Dytczak, M.A., Londry, K.L., Oleszkiewicz, J.A. (2008). Biotransformation of estrogens in nitrifying activated sludge under aerobic and alternating anoxic/aerobic conditions. *Water Environ. Res. Res. Publ. Water Environ. Fed.* **80**, 47–52.

Eliel, E.L. (1962). Dynamic Stereochemistry I: Conformation and Reactivity. *In Stereochemistry of Carbon Compunds*. Nasipuri, D. (ed.) 398-433. McGraw-Hill. New York.

Ellis, D. (2002). Amphotericin B: spectrum and resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 49 Suppl 1, 7–10.

Fahrbach, M., Kuever, J., Meinke, R., Kämpfer, P., Hollender, J. (2006). *Denitratisoma oestradiolicum* gen. nov., sp. nov., a 17β-oestradiol-degrading, denitrifying betaproteobacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**, 1547–1552. Fahrbach, M., Kuever, J., Remesch, M., Huber, B.E., Kämpfer, P., Dott, W., Hollender, J. (2008). *Steroidobacter denitrificans* gen. nov., sp. nov., a steroidal hormone-degrading gammaproteobacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 2215–2223.

Fahrbach, M., Krauss, M., Preiss, A., Kohler, H.-P.E., Hollender, J. (2010). Anaerobic testosterone degradation in *Steroidobacter denitrificans*--identification of transformation products. *Environ. Pollut.* **158**, 2572–2581.

Fernandes, P., Cabral, J.M.S. (2007). Phytosterols: applications and recovery methods. *Bioresour. Technol.* 98, 2335–2350.

Fernholz, E., MacPhillamy, H.B. (1941). Isolation of a New Phytosterol: Campesterol. *J. Am. Chem. Soc.* 63, 1155–1156.

Ferreira, N.P., Tracey, R.P. (1984). Numerical taxonomy of cholesterol-degrading soil bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 57, 429–446.

Fetzner, S. (2012). Ring-cleaving dioxygenases with a cupin fold. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 2505–2514.

Flammer, J.R., Rogatsky, I. (2011). Minireview: Glucocorticoids in autoimmunity: unexpected targets and mechanisms. *Mol. Endocrinol.* 25, 1075–1086.

Florin, C., Köhler, T., Grandguillot, M., Plesiat, P. (1996). *Comamonas testosteroni* 3-ketosteroid- $\Delta^4(5\alpha)$ -dehydrogenase: gene and protein characterization. *J. Bacteriol.* 178, 3322–3330.

Franklund, C.V., Baron, S.F., Hylemon, P.B. (1993). Characterization of the *bai*H gene encoding a bile acid-inducible NADH:flavin oxidoreductase from *Eubacterium sp.* strain VPI 12708. *J. Bacteriol.* **175**, 3002–3012.

Freier, T.A., Beitz, D.C., Li, L., Hartman, P.A. (1994). Characterization of *Eubacterium coprostanoligenes* sp. nov., a cholesterol-reducing anaerobe. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44, 137–142.

Av-Gay, Y., Sobouti, R. (2000). Cholesterol is accumulated by mycobacteria but its degradation is limited to non-pathogenic fast-growing mycobacteria. *Can. J. Microbiol.* **46**, 826–831.

Van der Geize, R., Hessels, G.I., van Gerwen, R., Vrigbloed, J.W., van der Meijden, P., Dijkhuizen, L. (2000). Targeted disruption of the *kst*D gene encoding a 3-ketosteroid- Δ^1 -dehydrogenase isoenzime of *Rhodococcus erythropolis* strain SQ1. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 2029-2036.

Van der Geize, R., Hessels, G.I., van Gerwen, R., van der Meijden, P., Dijkhuizen, L. (2002a). Molecular and functional characterization of *ksh*A and *ksh*B, encoding two components of 3-ketosteroid 9α -hydroxylase, a class IA monooxygenase, in *Rhodococcus erythropolis* strain SQ1. *Mol. Microbiol.* **45**, 1007–1018.

Van der Geize, R., Hessels, G.I., Dijkhuizen, L. (2002b). Molecular and functional characterization of the *kst*D2 gene of *Rhodococcus erythropolis* SQ1 encoding a second 3-ketosteroid Δ^1 -dehydrogenase isoenzyme. *Microbiol.* 148, 3285–3292.

Van der Geize, R., Hessels, G.I., Nienhuis-Kuiper, M., Dijkhuizen, L. (2008). Characterization of a second *Rhodococcus erythropolis* SQ1 3-ketosteroid 9α -hydroxylase activity comprising a terminal oxygenase homologue, KshA2, active with oxygenase-reductase component KshB. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 7197–7203.

Van der Geize, R., Yam, K., Heuser, T., Wilbrink, M.H., Hara, H., Anderton, M.C., Sim, E., Dijkhuizen, L., Davies, J.E., Mohn, W.W., Eltis, L.D. (2007). A gene cluster encoding cholesterol catabolism in a soil actinomycete provides insight into *Mycobacterium tuberculosis* survival in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 1947–1952.

Gérard, P., Lepercq, P., Leclerc, M., Gavini, F., Raibaud, P., Juste, C. (2007). *Bacteroides sp.* strain D8, the first cholesterol-reducing bacterium isolated from human feces. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 5742–5749.

Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Wood, W.A., Krieg, N.R. (ed.) (1994). *Methods for general and molecular bacteriology*. Am. Soc. Microbiol. Washington, D.C.

Gioffré, A., Infante, E., Aguilar, D., Santangelo, M.D. la P., Klepp, L., Amadio, A., Meikle, V., Etchechoury, I., Romano, M.I., Cataldi, A., Hernández, R., Bigi, F. (2005). Mutation in *mce* operons attenuates *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *Microbes Infect.* 7, 325–334.

Goa, K.L., Warner, G.T., Easthope, S.E. (2003). Transdermal ethinylestradiol/norelgestromin: a review of its use in hormonal contraception. *Treat. Endocrinol.* **2**, 191–206.

Göhler, A., Xiong, G., Paulsen, S., Trentmann, G., Maser, E. (2008). Testosteroneinducible regulator is a kinase that drives steroid sensing and metabolism in *Comamonas testosteroni. J. Biol. Chem.* 283, 17380–17390.

Gong, W., Xiong, G., Maser, E. (2012a). Identification and characterization of the LysR-type transcriptional regulator HsdR for steroid-inducible expression of the 3α -hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase gene in *Comamonas testosteroni*. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 941–950.

Gong, W., Kisiela, M., Schilhabel, M.B., Xiong, G., Maser, E. (2012b). Genome sequence of *Comamonas testosteroni* ATCC 11996, a representative strain involved in steroid degradation. *J. Bacteriol.* **194**, 1633–1634.

González-Parra, E., Egido, J. (2014). Vitamina D, síndrome metabólico y diabetes mellitus. *Med. Clin.* 142, 493-496.

Gopal-Srivastava, R., Mallonee, D.H., White, W.B., Hylemon, P.B. (1990). Multiple copies of a bile acid-inducible gene in *Eubacterium sp.* strain VPI 12708. *J. Bacteriol.* 172, 4420–4426.

Grant, W.B., Boucher, B.J. (2009). Current impediments to acceptance of the ultraviolet-B-vitamin D-cancer hypothesis. *Anticancer Res.* 29, 3597–3604.

Grant, S.G., Jessee, J., Bloom, F.R., Hanahan, D. (1990). Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into Escherichia coli methylation-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 4645–4649.

Greenlee, M.M., Lynch, I.J., Gumz, M.L., Cain, B.D., Wingo, C.S. (2011). Mineralocorticoids stimulate the activity and expression of renal H⁺,K⁺-ATPases. *J. Am. Soc. Nephrol.* **22**, 49–58.

Groh, H., Schade, K., Hörhold-Schubert, C. (1993). Steroid metabolism with intestinal microorganisms. *J. Basic Microbiol.* 33, 59–72.

Gül, M.K., Amar, S. (2006). Sterols and the phytosterol content in oilseed rape (*Brassica napus* L.). J. Cell Mol. Biol. 5, 71–79.

Gumz, M.L., Lynch, I.J., Greenlee, M.M., Cain, B.D., Wingo, C.S. (2010). The renal H⁺-K⁺-ATPases: physiology, regulation, and structure. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **298**, F12–21.

Gupta, A.K., Savopoulos, C.G., Ahuja, J., Hatzitolios, A.I. (2011). Role of phytosterols in lipid-lowering: current perspectives. *QJM*. **104**, 301–308.

Haile, Y., Caugant, D.A., Bjune, G., Wiker, H.G. (2002). *Mycobacterium tuberculosis* mammalian cell entry operon (*mce*) homologs in *Mycobacterium* other than tuberculosis (MOTT). *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 33, 125–132.

Hall, K.S., Trussell, J. (2012). Types of combined oral contraceptives used by US women. *Contraception* 86, 659–665.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166, 557–580.

Hanahan, D (1985). Techniques for transformation of E. coli. *In DNA Cloning: a practical approach*. Glover, D.M. (ed.). 109–135. IRL Press Oxf. Oxford.

Hanselman, T.A., Graetz, D.A., Wilkie, A.C. (2003). Manure-borne estrogens as potential environmental contaminants: a review. *Environ. Sci. Technol.* **37**, 5471–5478.

Harayama, S., Rekik, M. (1989). Bacterial aromatic ring-cleavage enzymes are classified into two different gene families. *J. Biol. Chem.* 264, 15328–15333.

Harayama, S., Rekik, M., Wasserfallen, A., Bairoch, A. (1987). Evolutionary relationships between catabolic pathways for aromatics: conservation of gene order and nucleotide sequences of catechol oxidation genes of pWW0 and NAH7 plasmids. *Mol. Gen. Genet.* **210**, 241–247.

Harayama, S., Kok, M., Neidle, E.L. (1992). Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. *Annu. Rev. Microbiol.* 46, 565–601.

Harder, J., Probian, C. (1997). Anaerobic mineralization of cholesterol by a novel type of denitrifying bacterium. *Arch. Microbiol.* 167, 269–274.

Hardy, J.R., Rees, E., Ling, J., Burman, R., Feuer, D., Broadley, K., Stone, P. (2001a). A prospective survey of the use of dexamethasone on a palliative care unit. *Palliat. Med.* 15, 3–8.

Hardy, K., Herry, I., Attali, V., Cadranel, J., Similowski, T. (2001b). Bilateral phrenic paralysis in a patient with systemic lupus erythematosus. *Chest* **119**, 1274–1277.

Haussler, M.R., Haussler, C.A., Jurutka, P.W., Thompson, P.D., Hsieh, J.C., Remus, L.S., Selznick, S.H., Whitfield, G.K. (1997). The vitamin D hormone and its nuclear receptor: molecular actions and disease states. *J. Endocrinol.* 154 Suppl, S57–73.

Hayaishi, O. (1962). Biological oxidations. Annu. Rev. Biochem. 31, 25-46.

Hayami, M., Okabe, A., Sasai, K., Hayashi, H., Kanemasa, Y. (1979). Presence and synthesis of cholesterol in stable staphylococcal L-forms. *J. Bacteriol.* 140, 859–863.

Hayase, N., Taira, K., and Furukawa, K. (1990). *Pseudomonas putida* KF715 *bph*ABCD operon encoding biphenyl and polychlorinated biphenyl degradation: cloning, analysis, and expression in soil bacteria. *J. Bacteriol.* **172**, 1160–1164.

Hayashi, T., Koshino, H., Kurita, T., Kudo, T. (2005). Identification of 9,17-dioxo-1,2,3,4,10,19-hexanorandrostan-5-oic acid, 4-hydroxy-2-oxohexanoic acid, and 2hydroxyhexa-2,4-dienoic acid and related enzymes involved in testosterone degradation in *Comamonas testosteroni* TA441. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 5275–5281.

Hayes, C.E. (2000). Vitamin D: a natural inhibitor of multiple sclerosis. *Proc. Nutr. Soc.* 59, 531–535.

Hayes, C.E., Cantorna, M.T., DeLuca, H.F. (1997). Vitamin D and multiple sclerosis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 216, 21–27.

Herrero, M., de Lorenzo, V., Timmis, K.N. (1990). Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **172**, 6557–6567.

Hochstrasser, D.F., Appel, R.D., Golaz, O., Pasquali, C., Sanchez, J.C., Bairoch, A. (1995). Sharing of worldwide spread knowledge using hypermedia facilities & fast communication protocols (Mosaic and World Wide Web): the example of ExPASy. *Methods Inf. Med.* 34, 75–78.

Holert, J., Alam, I., Larsen, M., Antunes, A., Bajic, V.B., Stingl, U., Philipp, B. (2013a). Genome Sequence of *Pseudomonas sp.* Strain Chol1, a Model Organism for the Degradation of Bile Salts and Other Steroid Compounds. *Genome Announc.* 1. e00014-12.

Holert, J., Kulić, Ž., Yücel, O., Suvekbala, V., Suter, M.J.-F., Möller, H.M., Philipp, B. (2013b). Degradation of the acyl side chain of the steroid compound cholate

in *Pseudomonas sp.* strain Chol1 proceeds via an aldehyde intermediate. *J. Bacteriol.* **195**, 585–595.

Holert, J., Jagmann, N., Philipp, B. (2013c). The essential function of genes for a hydratase and an aldehyde dehydrogenase for growth of *Pseudomonas sp.* strain Chol1 with the steroid compound cholate indicates an aldolytic reaction step for deacetylation of the side chain. *J. Bacteriol.* **195**, 3371–3380.

Holick, M.F. (2004). Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. *Am. J. Clin. Nutr.* **79**, 362–371.

Holick, M.F. (2006). Vitamin D: its role in cancer prevention and treatment. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 92, 49–59.

Holick, M.F. (2011). Vitamin D: evolutionary, physiological and health perspectives. *Curr. Drug Targets* **12**, 4–18.

Holmes, D.S., Quigley, M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* 114, 193–197.

Holt, J. G., Kieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., Williams, S. T. (ed.) (1994). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams & Wilkins. Baltimore.

Horinouchi, M., Yamamoto, T., Taguchi, K., Arai, H., Kudo, T. (2001). Metacleavage enzyme gene *tes*B is necessary for testosterone degradation in *Comamonas testosteroni* TA441. *Microbiol.* **147**, 3367–3375.

Horinouchi, M., Hayashi, T., Koshino, H., Yamamoto, T., Kudo, T. (2003a). Gene encoding the hydrolase for the product of the meta-cleavage reaction in testosterone degradation by *Comamonas testosteroni*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 2139–2152.

Horinouchi, M., Hayashi, T., Yamamoto, T., Kudo, T. (2003b). A new bacterial steroid degradation gene cluster in *Comamonas testosteroni* TA441 which consists of aromatic-compound degradation genes for seco-steroids and 3-ketosteroid dehydrogenase genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 4421–4430.

Horinouchi, M., Kurita, T., Yamamoto, T., Hatori, E., Hayashi, T., Kudo, T. (2004a). Steroid degradation gene cluster of *Comamonas testosteroni* consisting of 18 putative genes from meta-cleavage enzyme gene *tes*B to regulator gene *tes*R. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324, 597–604.

Horinouchi, M., Hayashi, T., Kudo, T. (2004b). The genes encoding the hydroxylase of 3-hydroxy-9,10-secoandrosta-1,3,5(10)-triene-9,17-dione in steroid degradation in *Comamonas testosteroni* TA441. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **92**, 143–154.

Horinouchi, M., Hayashi, T., Koshino, H., Kurita, T., Kudo, T. (2005). Identification of 9,17-dioxo-1,2,3,4,10,19-hexanorandrostan-5-oic acid, 4-hydroxy-2-oxohexanoic acid, and 2-hydroxyhexa-2,4-dienoic acid and related enzymes involved in testosterone degradation in *Comamonas testosteroni* TA441. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 5275–5281.

Horinouchi, M., Kurita, T., Hayashi, T., Kudo, T. (2010). Steroid degradation genes in *Comamonas testosteroni* TA441: Isolation of genes encoding a $\Delta^{4(5)}$ -isomerase and 3 α - and 3 β -dehydrogenases and evidence for a 100 kb steroid degradation gene hot spot. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **122**, 253–263.

Horinouchi, M., Hayashi, T., Kudo, T. (2012). Steroid degradation in *Comamonas* testosteroni. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 129, 4–14.

Horinouchi, S., Ishizuka, H., Beppu, T. (1991). Cloning, nucleotide sequence, and transcriptional analysis of the NAD(P)-dependent cholesterol dehydrogenase gene from a *Nocardia sp.* and its hyperexpression in *Streptomyces spp. Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 1386–1393.

Horvath, J., Kramli, A. (1947). Microbiological oxidation of cholesterol with *Azotobacter*. *Nature* 160, 639.

Huang, H., Porpodis, K., Zarogoulidis, P., Domvri, K., Giouleka, P., Papaiwannou, A., Primikyri, S., Mylonaki, E., Spyratos, D., Hohenforst-Schmidt, W., Kioumis, I., Zaragouli, K. (2013). Vitamin D in asthma and future perspectives. *Drug Des. Devel. Ther.* **7**, 1003–1013.

Hwang, C.-C., Chang, Y.-H., Hsu, C.-N., Hsu, H.-H., Li, C.-W., Pon, H.-I. (2005). Mechanistic roles of Ser-114, Tyr-155, and Lys-159 in 3α-hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase from *Comamonas testosteroni*. J. Biol. Chem. 280, 3522–3528.

Inoue, Y., Yu, A.-M., Yim, S.H., Ma, X., Krausz, K.W., Inoue, J., Xiang, C.C., Brownstein, M.J., Eggertsen, G., Björkhem, I., González, F.J. (2006). Regulation of bile acid biosynthesis by hepatocyte nuclear factor 4α . *J. Lipid Res.* **47**, 215–227.

IUPAC Commission on the Nomenclature of Organic Chemistry and IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. (1969). Revised tentative rules for nomenclature of steroids. *Biochem. J.* **113**, 5–28.

IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). The nomenclature of steroids. Recommendations 1989. (1989). *Eur. J. Biochem.* **186**, 429–458.

Janeczko, A. (2012). The presence and activity of progesterone in the plant kingdom. *Steroids* **77**, 169–173.

Janeczko, A., Skoczowski, A. (2005). Mammalian sex hormones in plants. *Folia Histochem. Cytobiol.* **43**, 71–79.

Jeal, W., Faulds, D. (1997). Triamcinolone acetonide. A review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in the management of allergic rhinitis. *Drugs* 53, 257–280.

Jeitner, T.M., Voloshyna, I., Reiss, A.B. (2011). Oxysterol derivatives of cholesterol in neurodegenerative disorders. *Curr. Med. Chem.* 18, 1515–1525.

Jones, P.J., MacDougall, D.E., Ntanios, F., Vanstone, C.A. (1997). Dietary phytosterols as cholesterol-lowering agents in humans. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **75**, 217–227.

Kallio, H., Yang, B., Peippo, P., Tahvonen, R., Pan, R. (2002). Triacylglycerols, glycerophospholipids, tocopherols, and tocotrienols in berries and seeds of two subspecies (ssp. *sinensis* and *mongolica*) of Sea Buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*). *J. Agric. Food Chem.* **50**, 3004–3009.

Kamen, D., Aranow, C. (2008). Vitamin D in systemic lupus erythematosus. *Curr. Opin. Rheumatol.* 20, 532–537.

Kampman, M.T., Steffensen, L.H. (2010). The role of vitamin D in multiple sclerosis. *J. Photochem. Photobiol. B* 101, 137–141.

Kang, H.-Y. (2013). Beyond the male sex hormone: deciphering the metabolic and vascular actions of testosterone. *J. Endocrinol.* 217, C1–3.

Kathiravan, M.K., Salake, A.B., Chothe, A.S., Dudhe, P.B., Watode, R.P., Mukta, M.S., and Gadhwe, S. (2012). The biology and chemistry of antifungal agents: a review. *Bioorg. Med. Chem.* 20, 5678–5698.

Kaunitz, A.M. (1994). Long-acting injectable contraception with depot medroxyprogesterone acetate. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 170, 1543–1549.

Kaunitz, A.M. (1998). Injectable depot medroxyprogesterone acetate contraception: an update for U.S. clinicians. *Int. J. Fertil. Womens Med.* **43**, 73–83.

Kelly, D.M., Jones, T.H. (2013). Testosterone: a metabolic hormone in health and disease. *J. Endocrinol.* 217, R25–45.

Kendall, S.L., Withers, M., Soffair, C.N., Moreland, N.J., Gurcha, S., Sidders, B., Frita, R., Ten Bokum, A., Besra, G.S., Lott, J.S., Stoker, N.G. (2007). A highly conserved transcriptional repressor controls a large regulon involved in lipid degradation in *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* **65**, 684–699.

Kendall, S.L., Burgess, P., Balhana, R., Withers, M., Ten Bokum, A., Lott, J.S., Gao, C., Uhia-Castro, I., Stoker, N.G. (2010). Cholesterol utilization in mycobacteria is controlled by two TetR-type transcriptional regulators: KstR and KstR2. *Microbiol.* 156, 1362–1371.

Van de Kerkhof, P.C., Chang, A., van der Walle, H.B., van Vlijmen-Willems, I., Boezeman, J.B., Huigen-Tijdink, R. (1994). Weekly treatment of psoriasis with a hydrocolloid dressing in combination with triamcinolone acetonide. A controlled comparative study. *Acta Derm. Venereol.* **74**, 143–146.

Kessler, B., Palleroni, N.J. (2000). Taxonomic implications of synthesis of poly- β -hydroxybutyrate and other poly- β -hydroxyalkanoates by aerobic pseudomonads. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50** *Pt*, 711–713.

Khan, A.A., Wang, R.F., Nawaz, M.S., Cao, W.W., Cerniglia, C.E. (1996). Purification of 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase from *Pseudomonas putida* OU83 and characterization of the gene (*bph*C). *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 1825– 1830.

Kieslich, K. (1985). Microbial side-chain degradation of sterols. *J. Basic Microbiol.* **25**, 461–474.

Kim, T.-H., Lim, H.-J., Kim, M.-S., Lee, M.S. (2012). Dietary supplements for benign prostatic hyperplasia: an overview of systematic reviews. *Maturitas* **73**, 180–185.

Kime, D.E. (1995). Steroid nomenclature. Gen. Comp. Endocrinol. 98, 119–120.

Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* **16**, 111–120.

King, E.O., Ward, M.K., Raney, D.E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J. Lab. Clin. Med.* 44, 301–307.

Kir, S., Zhang, Y., Gerard, R.D., Kliewer, S.A., Mangelsdorf, D.J. (2012). Nuclear receptors HNF4α and LRH-1 cooperate in regulating *cyp7a1* in vivo. *J. Biol. Chem.* **287**, 41334–41341.

Kisiela, M., Skarka, A., Ebert, B., Maser, E. (2012). Hydroxysteroid dehydrogenases (HSDs) in bacteria: a bioinformatic perspective. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 129, 31–46.

Klepp, L.I., Forrellad, M.A., Osella, A.V., Blanco, F.C., Stella, E.J., Bianco, M.V., Santangelo, M. de la P., Sassetti, C., Jackson, M., Cataldi, A.A., Bigi, F., Morbidoni, H. (2012). Impact of the deletion of the six *mce* operons in *Mycobacterium smegmatis*. *Microbes Infect. Inst. Pasteur* 14, 590–599.

Klink, M., Brzezinska, M., Szulc, I., Brzostek, A., Kielbik, M., Sulowska, Z., Dziadek, J. (2013). Cholesterol oxidase is indispensable in the pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*. *PloS One* **8**, e73333.

Knol, J., Bodewits, K., Hessels, G.I., Dijkhuizen, L., van der Geize, R. (2008). 3-Keto-5 α -steroid Δ^1 -dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis* SQ1 and its orthologue in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv are highly specific enzymes that function in cholesterol catabolism. *Biochem. J.* **410**, 339–346.

Koh, Y.K.K., Chiu, T.Y., Boobis, A., Cartmell, E., Scrimshaw, M.D., Lester, J.N. (2008). Treatment and removal strategies for estrogens from wastewater. *Environ. Technol.* 29, 245–267.

Kovach, M.E., Elzer, P.H., Hill, D.S., Robertson, G.T., Farris, M.A., Roop, R.M., 2nd, Peterson, K.M. (1995). Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 166, 175–176.

Krishnan, A.V., Peehl, D.M., Feldman, D. (2003). The role of vitamin D in prostate cancer. *Recent Results Cancer Res.* 164, 205–221.

Kuliopulos, A., Shortle, D., Talalay, P. (1987). Isolation and sequencing of the gene encoding Δ^5 -3-ketosteroid isomerase of *Pseudomonas testosteroni*: overexpression of the protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 8893–8897.

Lack, N., Lowe, E.D., Liu, J., Eltis, L.D., Noble, M.E.M., Sim, E., Westwood, I.M. (2008). Structure of HsaD, a steroid-degrading hydrolase, from *Mycobacterium tuberculosis. Acta Crystallograph. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 64, 2–7.

Lack, N.A., Yam, K.C., Lowe, E.D., Horsman, G.P., Owen, R.L., Sim, E., Eltis, L.D. (2010). Characterization of a carbon-carbon hydrolase from *Mycobacterium tuberculosis* involved in cholesterol metabolism. *J. Biol. Chem.* 285, 434–443.

Lamb, D.C., Kelly, D.E., Manning, N.J., Kelly, S.L. (1998). A sterol biosynthetic pathway in *Mycobacterium. FEBS Lett.* **437**, 142–144.

Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinforma*. 23, 2947–2948.

Larkin, M.J., Kulakov, L.A., Allen, C.C.R. (2005). Biodegradation and *Rhodococcus*-masters of catabolic versatility. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16, 282–290.

Leu, Y.-L., Wang, P.-H., Shiao, M.-S., Ismail, W., Chiang, Y.-R. (2011). A novel testosterone catabolic pathway in bacteria. *J. Bacteriol.* **193**, 4447–4455.

Levin, R.M., Das, A.K. (2000). A scientific basis for the therapeutic effects of *Pygeum* africanum and Serenoa repens. Urol. Res. 28, 201–209.

Li, T., Chiang, J.Y.L. (2013). Nuclear receptors in bile acid metabolism. *Drug Metab. Rev.* 45, 145–155.

Linares, M., Pruneda-Paz, J.L., Reyna, L., Genti-Raimondi, S. (2008). Regulation of testosterone degradation in *Comamonas testosteroni*. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 112, 145–150.

Lipman, D.J., Pearson, W.R. (1985). Rapid and sensitive protein similarity searches. *Science* 227, 1435–1441.

Lips, P. (2006). Vitamin D physiology. Prog. Biophys. Mol. Biol. 92, 4-8.

Lips, P., van Schoor, N.M. (2011). The effect of vitamin D on bone and osteoporosis. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 25, 585–591.

Lorbek, G., Lewinska, M., Rozman, D. (2012). Cytochrome P450s in the synthesis of cholesterol and bile acids--from mouse models to human diseases. *FEBS J.* 279, 1516–1533.

De Lorenzo, V., Herrero, M., Jakubzik, U., Timmis, K.N. (1990). Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J. Bacteriol.* **172**, 6568–6572.

Lund, E.G., Guileyardo, J.M., Russell, D.W. (1999). cDNA cloning of cholesterol 24hydroxylase, a mediator of cholesterol homeostasis in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 7238–7243.

M Hassanein, M.M., El-Shami, S.M., El-Mallah, M.H. (2011). Investigation of lipids profiles of *Nigella*, lupin and artichoke seed oils to be used as healthy oils. *J. Oleo Sci.* **60**, 99–107.

Mahato, S.B., Garai, S. (1997). Advances in microbial steroid biotransformation. *Steroids* 62, 332–345.

Mallonee, D.H., Hylemon, P.B. (1996). Sequencing and expression of a gene encoding a bile acid transporter from *Eubacterium* sp. strain VPI 12708. *J. Bacteriol.* 178, 7053–7058.

Mallonee, D.H., White, W.B., Hylemon, P.B. (1990). Cloning and sequencing of a bile acid-inducible operon from *Eubacterium* sp. strain VPI 12708. *J. Bacteriol.* 172, 7011–7019.

Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. (ed.) (1982). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harb. Lab. Press. Cold Spring Harb., NY.

Marangoni, F., Poli, A. (2010). Phytosterols and cardiovascular health. *Pharmacol. Res.* **61**, 193–199.

Marfil-Vega, R., Suidan, M.T., Mills, M.A. (2010). Abiotic transformation of estrogens in synthetic municipal wastewater: an alternative for treatment? *Environ. Pollut.* **158**, 3372–3377.

Marfil-Vega, R., Suidan, M.T., Mills, M.A. (2012). Assessment of the abiotic transformation of 17β -estradiol in the presence of vegetable matter--II: the role of molecular oxygen. *Chemosphere* 87, 521–526.

Marsch-Moreno, R., Hernández-Guzmán, G., Alvarez-Morales, A. (1998). pTn5cat: a Tn5-derived genetic element to facilitate insertion mutagenesis, promoter probing, physical mapping, cloning, and marker exchange in phytopathogenic and other gramnegative bacteria. *Plasmid* **39**, 205–214.

Marsheck, W.J., Kraychy, S., Muir, R.D. (1972). Microbial degradation of sterols. *Appl. Microbiol.* 23, 72–77.

Martin, C.K. (1977). Microbial cleavage of sterol side chains. *Adv. Appl. Microbiol.* 22, 29–58.

Martínez-Blanco, H., Reglero, A., Rodriguez-Aparicio, L.B., Luengo, J.M. (1990). Purification and biochemical characterization of phenylacetyl-CoA ligase from *Pseudomonas putida*. A specific enzyme for the catabolism of phenylacetic acid. *J. Biol. Chem.* 265, 7084–7090. Maruotti, N., Cantatore, F.P. (2010). Vitamin D and the immune system. J. Rheumatol. 37, 491–495.

Maser, E., Möbus, E., Xiong, G. (2000). Functional expression, purification, and characterization of 3α-hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase from *Comamonas testosteroni. Biochem. Biophys. Res. Commun.* **272**, 622–628.

Maser, E., Xiong, G., Grimm, C., Ficner, R., Reuter, K. (2001). 3α-Hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase from *Comamonas testosteroni*: biological significance, three-dimensional structure and gene regulation. *Chem. Biol. Interact.* **130**-**132**, 707–722.

McLeod, M.P., Warren, R.L., Hsiao, W.W.L., Araki, N., Myhre, M., Fernandes, C., Miyazawa, D., Wong, W., Lillquist, A.L., Wang, D., *et al.* (2006). The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 15582–15587.

Van der Meer, J.R., de Vos, W.M., Harayama, S., Zehnder, A.J. (1992). Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiol. Rev.* 56, 677–694.

Mercadante, S., Fulfaro, F., Casuccio, A. (2001). The use of corticosteroids in home palliative care. *Support. Care Cancer* 9, 386–389.

Miller, W.L. (1988). Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocr. Rev.* 9, 295–318.

Miller, J.H. (ed.) (1972). *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harb. Lab. Press. Cold Spring Harb., NY.

Miner, M.D., Chang, J.C., Pandey, A.K., Sassetti, C.M., Sherman, D.R. (2009). Role of cholesterol in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Indian J. Exp. Biol.* 47, 407–411.

Möbus, E., Maser, E. (1998). Molecular cloning, overexpression, and characterization of steroid-inducible 3α-hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase from *Comamonas testosteroni*. A novel member of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily. *J. Biol. Chem.* **273**, 30888–30896.

Möbus, E., Maser, E. (1999). Cloning and sequencing of a new *Comamonas* testosteroni gene encoding 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase. *Adv. Exp. Med. Biol.* 463, 395–402.

Möbus, E., Jahn, M., Schmid, R., Jahn, D., Maser, E. (1997). Testosterone-regulated expression of enzymes involved in steroid and aromatic hydrocarbon catabolism in *Comamonas testosteroni. J. Bacteriol.* **179**, 5951–5955.

Mohn, W.W., Wilbrink, M.H., Casabon, I., Stewart, G.R., Liu, J., van der Geize, R., Eltis, L.D. (2012). Gene cluster encoding cholate catabolism in *Rhodococcus* spp. *J. Bacteriol.* **194**, 6712–6719.

Mok, C.C. (2013). Vitamin D and systemic lupus erythematosus: an update. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 9, 453–463.

Molnár, I., Choi, K.P., Yamashita, M., Murooka, Y. (1995). Molecular cloning, expression in *Streptomyces lividans*, and analysis of a gene cluster from *Arthrobacter simplex* encoding 3-ketosteroid- Δ^1 -dehydrogenase, 3-ketosteroid- Δ^5 -isomerase and a hypothetical regulatory protein. *Mol. Microbiol.* **15**, 895–905.

Monte, M.J., Marin, J.J.G., Antelo, A., Vazquez-Tato, J. (2009). Bile acids: chemistry, physiology, and pathophysiology. *World J. Gastroenterol.* **15**, 804–816.

Morii, S., Fujii, C., Miyoshi, T., Iwami, M., Itagaki, E. (1998). 3-Ketosteroid- Δ^1 -dehydrogenase of *Rhodococcus rhodochrous*: sequencing of the genomic DNA and hyperexpression, purification, and characterization of the recombinant enzyme. *J. Biochem.* **124**, 1026–1032.

Morris, H.A., O'Loughlin, P.D., Anderson, P.H. (2010). Experimental evidence for the effects of calcium and vitamin D on bone: a review. *Nutrients* 2, 1026–1035.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1992). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnol.* 24, 17–27.

Murphy, K.J., Mann, N.J., Sinclair, A.J. (2003). Fatty acid and sterol composition of frozen and freeze-dried New Zealand Green Lipped Mussel (*Perna canaliculus*) from three sites in New Zealand. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* **12**, 50–60.

Nagasawa, H., Chen, C.L., Meites, J. (1969). Effects of estrogen implant in median eminence on serum and pituitary prolactin levels in the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 132, 859–861.

Navas, J., González-Zorn, B., Ladrón, N., Garrido, P., Vázquez-Boland, J.A. (2001). Identification and mutagenesis by allelic exchange of *choE*, encoding a cholesterol oxidase from the intracellular pathogen *Rhodococcus equi. J. Bacteriol.* 183, 4796–4805.

Nelson, K.E., Weinel, C., Paulsen, I.T., Dodson, R.J., Hilbert, H., Martins dos Santos, V.A.P., Fouts, D.E., Gill, S.R., Pop, M., Holmes, M., *et al.* (2002). Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* **4**, 799–808.

Nelson, D.L., Cox, M.M. (ed.) (2004). *Lehninger Principles of Biochemistry, 4^a edn.* Omega. Madison, Wisconsin.

Nishi, A., Tominaga, K., Furukawa, K. (2000). A 90-kilobase conjugative chromosomal element coding for biphenyl and salicylate catabolism in *Pseudomonas putida* KF715. *J. Bacteriol.* **182**, 1949–1955.

Norlin, M., von Bahr, S., Bjorkhem, I., Wikvall, K. (2003). On the substrate specificity of human CYP27A1: implications for bile acid and cholestanol formation. *J. Lipid Res.* 44, 1515–1522.

Norrander, J., Kempe, T., Messing, J. (1983). Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. *Gene* 26, 101–106.

Nozaki, M. (1979). Oxygenases and dioxygenases. Top. Curr. Chem. 78, 145–186.

Odriozola, J.M., Waitzkin, E., Smith, T.L., Bloch, K. (1978). Sterol requirement of *Mycoplasma capricolum. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75, 4107–4109.

Olivera, E.R., Miñambres, B., García, B., Muñiz, C., Moreno, M.A., Ferrández, A., Díaz, E., García, J.L., Luengo, J.M. (1998). Molecular characterization of the phenylacetic acid catabolic pathway in *Pseudomonas putida* U: the phenylacetyl-CoA catabolon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 6419–6424.

Oppermann, U.C., Maser, E. (1996). Characterization of a 3 α-hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase from the gram-negative bacterium *Comamonas testosteroni. Eur. J. Biochem. FEBS* **241**, 744–749.

Osborne, J.E., Hutchinson, P.E. (2002). Vitamin D and systemic cancer: is this relevant to malignant melanoma? *Br. J. Dermatol.* **147**, 197–213.

Ouellet, H., Guan, S., Johnston, J.B., Chow, E.D., Kells, P.M., Burlingame, A.L., Cox, J.S., Podust, L.M., de Montellano, P.R.O. (2010). *Mycobacterium tuberculosis* CYP125A1, a steroid C27 monooxygenase that detoxifies intracellularly generated cholest-4-en-3-one. *Mol. Microbiol.* **77**, 730–742.

Ouellet, H., Johnston, J.B., de Montellano, P.R.O. (2011). Cholesterol catabolism as a therapeutic target in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol*. **19**, 530–539.

Owen, R.W., Bilton, R.F. (1983). The degradation of cholic acid by *Pseudomonas* sp. N.C.I.B. 10590 under anaerobic conditions. *Biochem. J.* **216**, 641–654.

Owen, R.W., Bilton, R.F. (1984). Bioconversion of Lithocholic Acid Under Anaerobic Conditions by *Pseudomonas* sp. Strain NCIB 10590. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 606–609.

Owen, R.W., Hill, M.J., Bilton, R.F. (1983a). Biotransformation of chenodeoxycholic acid by *Pseudomonas* species NCIB 10590 under anaerobic conditions. *J. Lipid Res.* **24**, 1109–1118.

Owen, R.W., Mason, A.N., Bilton, R.F. (1983b). The degradation of cholesterol by *Pseudomonas* sp. NCIB 10590 under aerobic conditions. *J. Lipid Res.* **24**, 1500–1511.

Owen, R.W., Mason, A.N., Bilton, R.F. (1985). The degradation of β -sitosterol by *Pseudomonas* sp. NCIB 10590 under aerobic conditions. *J. Steroid Biochem.* 23, 327–332.

Owen, R.W., Wait, R., Bilton, R.F. (1988). Biotransformation of ursodeoxycholic acid by *Pseudomonas* sp NCIB 10590. *J. Lipid Res.* 29, 459–468.

Palleroni, N.J. (1993). *Pseudomonas* classification. A new case history in the taxonomy of gram-negative bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **64**, 231–251.

Palleroni, N.J. (2010). The Pseudomonas story. Environ. Microbiol. 12, 1377–1383.

Palleroni, N. J., Kunisawa, R., Contopoulon, R., Doudoroff, M. (1973). Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas. Int. J. Syst. Bacteriol.* 23, 333–339.

Pandak, W.M., Vlahcevic, Z.R., Heuman, D.M., Hylemon, P.B. (1990). Regulation of bile acid synthesis. V. Inhibition of conversion of 7-dehydrocholesterol to cholesterol is associated with down-regulation of cholesterol 7α -hydroxylase activity and inhibition of bile acid synthesis. *J. Lipid Res.* **31**, 2149–2158.

Pandey, A.K., Sassetti, C.M. (2008). Mycobacterial persistence requires the utilization of host cholesterol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 4376–4380.

Paul, G., Brehm, J.M., Alcorn, J.F., Holguín, F., Aujla, S.J., Celedón, J.C. (2012). Vitamin D and asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **185**, 124–132.

Pfeffer, P.E., Hawrylowicz, C.M. (2012). Vitamin D and lung disease. *Thorax* 67, 1018–1020.

Philipp, B., Erdbrink, H., Suter, M.J.-F., Schink, B. (2006). Degradation of and sensitivity to cholate in *Pseudomonas* sp. strain Chol1. *Arch. Microbiol.* 185, 192–201.

Phleger, C.F., Nelson, M.M., Mooney, B.D., Nichols, P.D. (2001). Interannual variations in the lipids of the Antarctic pteropods *Clione limacina* and *Clio pyramidata*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **128**, 553–564.

Phleger, C.F., Nelson, M.M., Mooney, B.D., Nichols, P.D. (2002). Interannual and between species comparison of the lipids, fatty acids and sterols of Antarctic krill from the US AMLR Elephant Island survey area. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 131, 733–747.

Plesiat, P., Grandguillot, M., Harayama, S., Vragar, S., Michel-Briand, Y. (1991). Cloning, sequencing, and expression of the *Pseudomonas testosteroni* gene encoding 3oxosteroid- Δ^1 -dehydrogenase. *J. Bacteriol.* 173, 7219–7227.

Plosker, G.L., Brogden, R.N. (1996). Serenoa repens (Permixon). A review of its pharmacology and therapeutic efficacy in benign prostatic hyperplasia. Drugs Aging **9**, 379–395.

Poole, A.J., Cord-Ruwisch, R. (2004). Treatment of strongflow wool scouring effluent by biological emulsion destabilisation. *Water Res.* **38**, 1419–1426.

Pruneda-Paz, J.L., Linares, M., Cabrera, J.E., Genti-Raimondi, S. (2004). TeiR, a LuxR-type transcription factor required for testosterone degradation in *Comamonas testosteroni. J. Bacteriol.* **186**, 1430–1437.

Quan, C., Su, F., Wang, H., Li, H. (2011). Development of anabolic-androgenic steroids purity certified reference materials for anti-doping. *Steroids* **76**, 1527–1534.

Quandt, J., Hynes, M.F. (1993). Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria. *Gene* 127, 15–21.

Que, L., Jr (1983). The catechol dioxygenases. Adv. Inorg. Biochem. 5, 167–199.

Qureshi, F., Zaritsky, A., Poirier, M.P. (2001). Comparative efficacy of oral dexamethasone versus oral prednisone in acute pediatric asthma. *J. Pediatr.* 139, 20–26.

Raghuwanshi, A., Joshi, S.S., Christakos, S. (2008). Vitamin D and multiple sclerosis. J. Cell. Biochem. 105, 338–343.

Rajakumar, K., Greenspan, S.L., Thomas, S.B., Holick, M.F. (2007). SOLAR ultraviolet radiation and vitamin D: a historical perspective. *Am. J. Public Health* **97**, 1746–1754.

Raman, D.R., Williams, E.L., Layton, A.C., Burns, R.T., Easter, J.P., Daugherty, A.S., Mullen, M.D., Sayler, G.S. (2004). Estrogen content of dairy and swine wastes. *Environ. Sci. Technol.* **38**, 3567–3573.

Rathor, N., Chandolia, A., Saini, N.K., Sinha, R., Pathak, R., Garima, K., Singh, S., Varma-Basil, M., Bose, M. (2013). An insight into the regulation of *mce4* operon of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberc. Edinb. Scotl.* **93**, 389–397.

Reichrath, J. (2009). Skin cancer prevention and UV-protection: how to avoid vitamin D-deficiency? *Br. J. Dermatol.* **161** Suppl 3, 54–60.

Reznikoff, W.S. (1993). The Tn5 transposon. Annu. Rev. Microbiol. 47, 945–963.

Ridlon, J.M., Kang, D.-J., Hylemon, P.B. (2006). Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J. Lipid Res.* 47, 241–259.

Roberts, C.W., McLeod, R., Rice, D.W., Ginger, M., Chance, M.L., Goad, L.J. (2003). Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa. *Mol. Biochem. Parasitol.* 126, 129–142.

Rocha, M., Banuls, C., Bellod, L., Jover, A., Victor, V.M., Hernandez-Mijares, A. (2011). A review on the role of phytosterols: new insights into cardiovascular risk. *Curr. Pharm. Des.* 17, 4061–4075.

Rosłoniec, K.Z., Wilbrink, M.H., Capyk, J.K., Mohn, W.W., Ostendorf, M., van der Geize, R., Dijkhuizen, L., Eltis, L.D. (2009). Cytochrome P450 125 (CYP125) catalyses C26-hydroxylation to initiate sterol side-chain degradation in *Rhodococcus jostii* RHA1. *Mol. Microbiol.* 74, 1031–1043.

Roy, G. (2010). Injectable contraception. Semin. Reprod. Med. 28, 126–132.

Ryan, E., Galvin, K., O'Connor, T.P., Maguire, A.R., O'Brien, N.M. (2006). Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of brazil, pecan, pine, pistachio and cashew nuts. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **57**, 219–228.

Saini, N.K., Sharma, M., Chandolia, A., Pasricha, R., Brahmachari, V., Bose, M. (2008). Characterization of Mce4A protein of *Mycobacterium tuberculosis*: role in invasion and survival. *BMC Microbiol.* **8**, 200.

Saitou, N., Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406–425.

Sajfrtová, M., Licková, I., Wimmerová, M., Sovová, H., and Wimmer, Z. (2010). β -Sitosterol: supercritical carbon dioxide extraction from sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seeds. *Int. J. Mol. Sci.* **11**, 1842–1850.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (ed.) (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harb. Lab. Cold Spring Harb., NY.

Sapolsky, R.M., Romero, L.M., Munck, A.U. (2000). How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr. Rev.* 21, 55–89.

Schleissner, C., Reglero, A., Luengo, J.M. (1997). Catabolism of D-glucose by *Pseudomonas putida* U occurs via extracellular transformation into D-gluconic acid and induction of a specific gluconate transport system. *Microbiol.* 143, 1595–1603.

Schneider, L., Dos Santos, A.S.P., Santos, M., da Silva Chakr, R.M., Monticielo, O.A. (2014). Vitamin D and systemic lupus erythematosus: state of the art. *Clin. Rheumatol.*

Schwartz, G.G. (2013). Vitamin d, sunlight, and the epidemiology of prostate cancer. *Anticancer Agents Med. Chem.* 13, 45–57.

Schweizer, H.P. (1991). *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19. *Gene* 97, 109–121.

Scott, A.P. (2013). Do mollusks use vertebrate sex steroids as reproductive hormones? II. Critical review of the evidence that steroids have biological effects. *Steroids* **78**, 268–281.

Sedlaczek, L. (1988). Biotransformations of steroids. Crit. Rev. Biotechnol. 7, 187–236.

Selvaraj, G., Iyer, V.N. (1983). Suicide plasmid vehicles for insertion mutagenesis in *Rhizobium meliloti* and related bacteria. *J. Bacteriol.* 156, 1292–1300.

Shi, W., Wang, L., Rousseau, D.P.L., Lens, P.N.L. (2010). Removal of estrone, 17α ethinylestradiol, and 17β -estradiol in algae and duckweed-based wastewater treatment systems. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **17**, 824–833.

Shih, A., Jackson, K.C., 2nd (2007). Role of corticosteroids in palliative care. *J. Pain Palliat. Care Pharmacother.* 21, 69–76.

Sih, C.J., Wang, K.C., Tai, H.H. (1968a). Mechanisms of steroid oxidation by microorganisms. 13. C22 acid intermediates in the degradation of the cholesterol side chain. *Biochemistry*. **7**, 796–807.

Sih, C.J., Tai, H.H., Tsong, Y.Y., Lee, S.S., Coombe, R.G. (1968b). Mechanisms of steroid oxidation by microorganisms. XIV. Pathway of cholesterol side-chain degradation. *Biochemistry*. **7**, 808–818.

Sih, C.J., Tsong, Y.Y., Stein, B. (1968c). The roles of reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate in steroid hydroxylation. *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 5300–5302.

Slight, S.H., Joseph, J., Ganjam, V.K., Weber, K.T. (1999). Extra-adrenal mineralocorticoids and cardiovascular tissue. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **31**, 1175–1184.

Söhngen, N.L. (1913). Benzin, Petroleum, Paraffinöl und Paraffin als Kohlenstoff- und Energiequelle für Mikroben. *Zentr. Bacteriol. Parasitenk. Art. II* 37, 595–609.

Song, K.-H., Ellis, E., Strom, S., Chiang, J.Y.L. (2007). Hepatocyte growth factor signaling pathway inhibits cholesterol 7α-hydroxylase and bile acid synthesis in human hepatocytes. *Hepatol.* **46**, 1993–2002.

Song, K.-H., Li, T., Owsley, E., Strom, S., Chiang, J.Y.L. (2009). Bile acids activate fibroblast growth factor 19 signaling in human hepatocytes to inhibit cholesterol 7α -hydroxylase gene expression. *Hepatol.* **49**, 297–305.

Srivastava, R. (2014). A review on phytochemical, pharmacological, and pharmacognostical profile of *Wrightia tinctoria*: Adulterant of kurchi. *Pharmacogn. Rev.* **8**, 36–44.

Stamp, T.C. (1973). Vitamin D metabolism. Recent advances. *Arch. Dis. Child.* 48, 2–7.

Stoesser, G., Baker, W., van den Broek, A., Camon, E., Garcia-Pastor, M., Kanz, C., Kulikova, T., Leinonen, R., Lin, Q., Lombard, V., *et al.* (2002). The EMBL Nucleotide Sequence Database. *Nucleic Acids Res.* 30, 21–26.

Stothard, P. (2000). The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *BioTechniques.* **28**, 1102-1104.

Sugino, H., Sasaki, M., Azakami, H., Yamashita, M., Murooka, Y. (1992). A monoamine-regulated *Klebsiella aerogenes* operon containing the monoamine oxidase structural gene (*maoA*) and the *maoC* gene. *J. Bacteriol.* 174, 2485-92.

Szodoray, P., Nakken, B., Gaal, J., Jonsson, R., Szegedi, A., Zold, E., Szegedi, G., Brun, J.G., Gesztelyi, R., Zeher, M., Bodolay, E. (2008). The complex role of vitamin D in autoimmune diseases. *Scand. J. Immunol.* **68**, 261–269.

Tabas, I. (2002a). Consequences of cellular cholesterol accumulation: basic concepts and physiological implications. *J. Clin. Invest.* **110**, 905–911.

Tabas, I. (2002b). Cholesterol in health and disease. J. Clin. Invest. 110, 583–590.

Tacklind, J., MacDonald, R., Rutks, I., Wilt, T.J. (2009). Serenoa repens for benign prostatic hyperplasia. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD001423.

Tak, J. (1942). On bacteria decomposing cholesterol. *Antonie van Leeuwenhoek* **8**, 32–40.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1596–1599.

Tarlera, S., Denner, E.B.M. (2003). *Sterolibacterium denitrificans* gen. nov., sp. nov., a novel cholesterol-oxidizing, denitrifying member of the β -Proteobacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**, 1085–1091.

Taves, M.D., Gomez-Sanchez, C.E., Soma, K.K. (2011). Extra-adrenal glucocorticoids and mineralocorticoids: evidence for local synthesis, regulation, and function. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **301**, E11–24.

Ait Tayeb, L., Ageron, E., Grimont, F., Grimont, P.A.D. (2005). Molecular phylogeny of the genus *Pseudomonas* based on *rpo*B sequences and application for the identification of isolates. *Res. Microbiol.* **156**, 763–773.

Teles, M., Gravato, C., Pacheco, M., Santos, M.A. (2004). Juvenile sea bass biotransformation, genotoxic and endocrine responses to β -naphthoflavone, 4-nonylphenol and 17 β -estradiol individual and combined exposures. *Chemosphere* 57, 147–158.

Tenneson, M.E., Baty, J.D., Bilton, R.F., Mason, A.N. (1979). The degradation of cholic acid by *Pseudomonas* sp. N.C.I.B. 10590. *Biochem. J.* 184, 613–618.

Traish, A.M., and Kypreos, K.E. (2011). Testosterone and cardiovascular disease: an old idea with modern clinical implications. *Atherosclerosis* 214, 244–248.

Traish, A.M., Kang, H.P., Saad, F., Guay, A.T. (2011b). Dehydroepiandrosterone (DHEA)--a precursor steroid or an active hormone in human physiology. *J. Sex. Med.* 8, 2960–2982.

Traish, A.M., Miner, M.M., Morgentaler, A., Zitzmann, M. (2011a). Testosterone deficiency. *Am. J. Med.* **124**, 578–587.

Turfitt, G.E. (1943). The microbiological degradation of steroids: 1. The sterol content of soils. *Biochem. J.* 37, 115–117.

Turfitt, G.E. (1944a). Microbiological Agencies in the Degradation of Steroids: I. The Cholesterol-Decomposing Organisms of Soils. *J. Bacteriol.* **47**, 487–493.

Turfitt, G.E. (1944b). The microbiological degradation of steroids: 2. Oxidation of cholesterol by *Proactinomyces* spp. *Biochem. J.* **38**, 492–496.

Turfitt, G.E. (1946). The microbiological degradation of steroids: 3. Oxidation of hydroxy-steroids to keto-derivatives by *Proactinomyces* spp. *Biochem. J.* **40**, 79–81.

Turfitt, G.E. (1947). Microbiological Agencies in the Degradation of Steroids: II. Steroid Utilization by the Microflora of Soils. *J. Bacteriol.* **54**, 557–562.

Turfitt, G.E. (1948). The microbiological degradation of steroids: 4. Fission of the steroid molecule. *Biochem. J.* **42**, 376–383.

Turfitt, G.E. (1946). The microbiological degradation of steroids; oxidation of hydroxy-steroids to keto-derivatives by *Proactinomyces* spp. *Biochem. J.* **40**, 79–81.

Turfitt, G.E. (1948). The microbiological degradation of steroids; fission of the steroid molecule. *Biochem. J.* 42, 376–383.

Uhía, I., Galán, B., Medrano, F.J., García, J.L. (2011). Characterization of the KstRdependent promoter of the gene for the first step of the cholesterol degradative pathway in *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiol*. 157, 2670–2680.

Vaillancourt, F.H., Bolin, J.T., Eltis, L.D. (2006). The ins and outs of ring-cleaving dioxygenases. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 41, 241–267.

Veen, M., Stahl, U., Lang, C. (2003). Combined overexpression of genes of the ergosterol biosynthetic pathway leads to accumulation of sterols in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* **4**, 87–95.

Veiga, P., Juste, C., Lepercq, P., Saunier, K., Béguet, F., Gérard, P. (2005). Correlation between faecal microbial community structure and cholesterol-tocoprostanol conversion in the human gut. *FEMS Microbiol. Lett.* **242**, 81–86.

Voskuil, M.I. (2013). *Mycobacterium tuberculosis* cholesterol catabolism requires a new class of acyl coenzyme A dehydrogenase. *J. Bacteriol.* **195**, 4319–4321.

Vrielink, A., Ghisla, S. (2009). Cholesterol oxidase: biochemistry and structural features. *FEBS J.* 276, 6826–6843.

Wacker, M., Holick, M.F. (2013). Sunlight and Vitamin D: A global perspective for health. *Dermatoendocrinol.* 5, 51–108.

Wackett, L.P., Gibson, D.T. (1988). Degradation of trichloroethylene by toluene dioxygenase in whole-cell studies with *Pseudomonas putida* F1. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 1703–1708.

Wang, P.-H., Leu, Y.-L., Ismail, W., Tang, S.-L., Tsai, C.-Y., Chen, H.-J., Kao, A.-T., Chiang, Y.-R. (2013). Anaerobic and aerobic cleavage of the steroid core ring structure by *Steroidobacter denitrificans*. J. Lipid Res. 54, 1493–1504.

Weeks, O.B., Francesconi, M.D. (1978). Occurrence of squalene and sterols in *Cellulomonas dehydrogenans* (Arnaudi 1942) comb. nov. Hester 1971. *J. Bacteriol.* 136, 614–624.

Weinel, C., Nelson, K.E., Tümmler, B. (2002). Global features of the *Pseudomonas putida* KT2440 genome sequence. *Environ. Microbiol.* **4**, 809–818.

Weisberg, E. (2012). A chewable low-dose oral contraceptive: a new birth control option? *Patient Prefer. Adherence* 6, 355–360.

Whitmarsh, J. M. (1964). Intermediates of microbiological metabolism of cholesterol. *Biochem. J.* 90, 23.

Wilbrink, M.H., Petrusma, M., Dijkhuizen, L., van der Geize, R. (2011). FadD19 of *Rhodococcus rhodochrous* DSM43269, a steroid-coenzyme A ligase essential for degradation of C-24 branched sterol side chains. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 4455–4464.

Wilt, T., Ishani, A., MacDonald, R., Stark, G., Mulrow, C., Lau, J. (2000a). β sitosterols for benign prostatic hyperplasia. *Cochrane Database Syst. Rev. Online* CD001043.

Wilt, T.J., Ishani, A., Rutks, I., MacDonald, R. (2000b). Phytotherapy for benign prostatic hyperplasia. *Public Health Nutr.* **3**, 459–472.

Woyengo, T.A., Ramprasath, V.R., Jones, P.J.H. (2009). Anticancer effects of phytosterols. *Eur. J. Clin. Nutr.* 63, 813–820.

Xie, C., Xu, L.Z., Li, X.M., Li, K.M., Zhao, B.H., Yang, S.L. (2001). [Studies on chemical constituents in fruit of *Lycium barbarum* L]. *J. Chin. Mater. Medica* 26, 323–324.

Xiong, G., Maser, E. (2001). Regulation of the steroid-inducible 3α-hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase gene in *Comamonas testosteroni*. J. Biol. Chem. 276, 9961–9970.

Xiong, G., Martin, H., Blum, A., Schäfers, C., Maser, E. (2001). A model on the regulation of 3α -hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase expression in *Comamonas testosteroni. Chem. Biol. Interact.* **130**-132, 723–736.

Xiong, G., Martin, H.-J., Maser, E. (2003). Identification and characterization of a novel translational repressor of the steroid-inducible 3α-hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase gene in *Comamonas testosteroni*. *J. Biol. Chem.* 278, 47400–47407.

Yam, K.C., D'Angelo, I., Kalscheuer, R., Zhu, H., Wang, J.-X., Snieckus, V., Ly, L.H., Converse, P.J., Jacobs, W.R., Jr, Strynadka, N., Eltis, L.D. (2009). Studies of a ring-cleaving dioxygenase illuminate the role of cholesterol metabolism in the pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog*. **5**, e1000344.

Yang, B., Karlsson, R.M., Oksman, P.H., Kallio, H.P. (2001). Phytosterols in sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) berries: identification and effects of different origins and harvesting times. J. Agric. Food Chem. 49, 5620–5629.

Yang, X., Dubnau, E., Smith, I., Sampson, N.S. (2007). Rv1106c from *Mycobacterium tuberculosis* is a 3β -hydroxysteroid dehydrogenase. *Biochemistry* 46, 9058–9067.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J., Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103–119.

Yen, K.M., Gunsalus, I.C. (1982). Plasmid gene organization: naphthalene/salicylate oxidation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 874–878.

Yin, L., Ma, H., Ge, X., Edwards, P.A., Zhang, Y. (2011). Hepatic hepatocyte nuclear factor 4α is essential for maintaining triglyceride and cholesterol homeostasis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 328–336.

Yoshida, T., Stern, P.H. (2012). How vitamin D works on bone. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 41, 557–569.

Zhang, F., Xie, J.-P. (2011). Mammalian cell entry gene family of *Mycobacterium* tuberculosis. Mol. Cell. Biochem. 352, 1–10.

Zheng, W., Li, X., Yates, S.R., Bradford, S.A. (2012). Anaerobic transformation kinetics and mechanism of steroid estrogenic hormones in dairy lagoon water. *Environ. Sci. Technol.* **46**, 5471–5478.

Zhi, X.-Y., Li, W.-J., Stackebrandt, E. (2009). An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class *Actinobacteria*, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**, 589–608.

APÉNDICE I

"Cuando eliminamos lo imposible, lo que queda por improbable que parezca es la verdad."

Sir Arthur Ignatius Conan Doyle (1859-1930) -El Signo de los Cuatro-.

1. Secuencias de nucleótidos de los rDNA 16S de las diferentes cepas COL y DOC.

1.1 Aislados COL.

Secuencia rDNA 16S de COL11:

GACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAAAGGCCCCTTCGGGGGGTACTCGAGTGGCGAACG GGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCCAAACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACTGGATATGACCT TCTGCTTCATGGTGGTTGGTGGAAAGCTTTTGCGGTTTGGGATGGGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTAAT GGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACT CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACG GCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCGGCAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCCAACTA CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTT TGTCGCGTCGTCTGTGAAATTCTGCAACTCAATTGCAGGCGTGCAGGCGATACGGGCAGACTTGAGTACTACAGGGG AGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGG TAGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGG TGGGTACTAGGTGTGGGGGCTCATTTCACGAGTTCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGTACCCCGCCTGGGGAGTACG GCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAAC GTGCATGGCTGTCGTCGTGTCGTGTGGGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCTGTATTGC CAGCACGTAATGGTGGGGACTTGCAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATC ATGCCCCTTATGTCCAGGGCTTCACACATGCTACAATGGCGCGTACAGAGGGCTGCGAGACCGTGAGGTGGAGCGAA TCCCTTAAAGCGCGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGAT CAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCATGAAAGTCGGTAACACCCCGAA GCCGGTGGCCTAACCCCTCGGGGGGGGGGGGGCCGTCGAAGGTGGGATCGGCGATTGGGACGA

Secuencia rDNA 16S de COL14:

GACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGTAAGGCCCCTTCGGGGGGTACACGAGTGGCGAACG GGTGAGTAACACGTGGGTGACCTGCCCTGTACTTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCT TCTCCTGCATGGGGGTTGGTGGAAAGCTTTTGCGGTACAGGATGGGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGGTAAT GGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACT CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACG GCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGTAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTACAGAAGAAGCACCGGCCAACTA CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGATTTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTT TGTCACGTCGTCTGTGAAAAACCCGAGGCTTAACCTCGGGCCTGCAGGCGATACGGGCAGACTTGAGTACTGTAGGGG AGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGG CAGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGG TGGGTACTAGGTGTGGGTTTCCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGTACCCCGCCTGGGGAGTACGG CCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACG CGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATATAGAGGATCGCCGGAGAGATTCGGTTTGCCTTGTGCCTTCTATACAGGTGG TGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTCATGTTGCC AGCACGTAATGGTGGGGGACTCGTGAGAGACTGCCGGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGGATGACGTCAAGTCATCA TGCCCCTTATGTCCAGGGCTTCACACATGCTACAATGGCGCGTACAGAGGGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAAT CCCTTAAAGCGCGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATC AGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCATGAAAGTCGGTAACACCCGAAG CCGGTGGCCTAACCCCTTGTGGGAGGGAGCTGTCGAAGGTGGGATTGGCGATTGGGACGA

Secuencia rDNA 16S de COL16:

GACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGTAAGGCCCCTTCGGGGGTACACGAGTGGCGAACG GGTGAGTAACACGTGGGTGACCTGCCCTGTACTTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCT ${\tt TCCTCTGCATGGGGGTTGGTGGAAAGCTTTTGCGGTACAGGATGGGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGGTAAT}$ GGCCTACCAAGGCGACGACGGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACT CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACG GCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGTAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTACAGAAGAAGCACCGGCCAACTA CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGATTTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTT TGTCACGTCGTCTGTGAAAAACCCGAGGCTTAACCTCGGGCCTGCAGGCGATACGGGCAGACTTGAGTACTGTAGGGG AGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGG CAGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGG TGGGTACTAGGTGTGGGTTTCCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGTACCCCGCCTGGGGAGTACGG CCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACG CGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATATAGAGGATCGCCGCAGAGATGTGGGTTTGCCTTGTGCCTTCTATACAGGTGG TGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGGGGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTCATGTTGCC AGCACGTAATGGTGGGGACTCGTGAGAGACTGCCGGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCA TGCCCCTTATGTCCAGGGCTTCACACATGCTACAATGGCGCGTACAGAGGGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAAT CCCTTAAAGCGCGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATC AGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCATGAAAGTCGGTAACACCCGAAG CCGGTGGCCTAACCCCTTGTGGGAGGGAGCTGTCGAAGGTGGGATTGGCGATTGGGACGA

Secuencia rDNA 16S de COL17:

GACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAAAGGCCCCTTCGGGGGTACTCGAGTGGCGAACG GGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCCAAACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACTGGATATGACCT ${\tt TCTGCTTCATGGTGGTGGTGGAAAGCTTTTGCGGTTTGGGATGGGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGGTAAT}$ GGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACT CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACG GCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCGGCAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCCAACTA CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTT TGTCGCGTCGTCTGTGAAATTCTGCAACTCAATTGCAGGCGTGCAGGCGATACGGGCAGACTTGAGTACTACAGGGG AGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGG TAGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGG TGGGTACTAGGTGTGGGGGCTCATTTCACGAGTTCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGTACCCCGCCTGGGGAGTACG GCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAAC GGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGGGGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCTGTATTG CCAGCACGTAATGGTGGGGGACTTGCAGGAGACTGCCGGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGGATGACGTCAAGTCAT CATGCCCCTTATGTCCAGGGCTTCACACATGCTACAATGGCGCGTACAGAGGGCTGCGAGACCGTGAGGTGGAGCGA ATCCCTTAAAGCGCGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAG ATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCATGAAAGTCGGTAACACCCG AAGCCGGTGGCCTAACCCCTCGGGGAGGGAGCCGTCGAAGGTGGGATCGGCGATTGGGACG

Secuencia del rDNA 16S de COL18:

GACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGTAAGGCCCTTTCGGGGGGTACACGAGTGGCGAACG GGTGAGTAACACGTGGGTGACCTGCCCTGTACTTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCT ${\tt TCTCCTGCATGGGGGTTGGTGGAAAGTTTTTGCGGTACAGGATGGGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTAAT}$ GGCCTACCAAGGCGACGACGGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACT CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACG GCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGTAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTACAGAAGAAGCACCGGCCAACTA CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGATTTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTT TGTCACGTCGTCTGTGAAAAACCCGAGGCTTAACCTCGGGCCTGCAGGCGATACGGGCAGACTTGAGTACTGTAGGGG AGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGG CAGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGG TGGGTACTAGGTGTGGGTTTCCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGTACCCCGCCTGGGGAGTACGG CCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACG CGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATATAGAGGATCGCCGGAGAGATTCGGTTTGCCTTGTGCCTTCTATACAGGTGG TGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTCATGTTGCC AGCACGTAATGGTGGGGACTCGTGAGAGACTGCCGGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCA TGCCCCTTATGTCCAGGGCTTCACACATGCTACAATGGCGCGTACAGAGGGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAAT CCCTTAAAGCGCGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATC AGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCATGAAAGTCGGTAACACCCGAAG CCGGTGGCCTAACCCCTTGTGGGAGGGAGCTGTCGAAGGTGGGATTGGCGATTGGGACGA

Secuencia del rDNA 16S de COL19:

GACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAAAGGCCCCTTCGGGGGGTACTCGAGTGGCGAACG GGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGAACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCA CTGATCGCATGGTTGGTGGTGGAAAGCTTTTGCGGTTTGGGATGGGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACT CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACG GCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCGCCAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGGAGAAGAAGCACCGGCCAACTA CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTT TGTCGCGTCGTCTGTGAAATTCTGCAACTCAATTGCAGGCGTGCAGGCGATACGGGCAGACTTGAGTACTACAGGGG AGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGG TAGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGG TGGGTACTAGGTGTGGGGGCTCATTTCACGAGTTCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGTACCCCGCCTGGGGAGTACG GCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAAC GCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATACACCAGACGTATGTAGAGATACATATTCCCTTGTGGTTGGGTGTACAGGTG GTGCATGGCTGTCGTCGTGTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCTGTATTGC CAGCGGGTTATGCCGGGGACTTGCAGGAGACTGCCGGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATC ATGCCCCTTATGTCCAGGGCTTCACACATGCTACAATGGCGCGTACAGAGGGCTGCGAGACCGTGAGGTGGAGCGAA TCCCTTAAAGCGCGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGAT CAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACGTCATGAAAGTCGGTAACACCCGAA GCCGGTGGCCTAACCCTTGTGGAGGGAGCTGTCGAAGGTGGGATCGGCGATTGGGACGA
Secuencia del rDNA 16S de COL20:

GACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAAAGGCCCCTTCGGGGGTACTCGAGTGGCGAACG GGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCCAAACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACTGGATATGACCT ${\tt TCTGCTTCATGGTGGTGGTGGGAAAGCTTTTGCGGTTTGGGATGGGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGGTAAT}$ GGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACT CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACG GCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCGGCAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCCAACTA CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTT TGTCGCGTCGTCTGTGAAATTCTGCAACTCAATTGCAGGCGTGCAGGCGATACGGGCAGACTTGAGTACTACAGGGG AGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGG TAGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGG TGGGTACTAGGTGTGGGGCTCATTTCACGAGTTCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGTACCCCGCCTGGGGAGTACG GCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAAC GGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGGGGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCTGTATTG ${\tt CCAGCACGTAATGGTGGGGGACTTGCAGGAGACTGCCGGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAT}$ CATGCCCCTTATGTCCAGGGCTTCACACATGCTACAATGGCGCGTACAGAGGGCTGCGAGACCGTGAGGTGGAGCGA ATCCCTTAAAGCGCGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAG ATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCATGAAAGTCGGTAACACCCG AAGCCGGTGGCCTAACCCCTCGGGGAGGGAGCCGTCGAAGGTGGGATCGGCGATTGGGACGA

Secuencia del rDNA 16S de COL21:

GACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAAAGGCCCCTTCGGGGGGTACTCGAGTGGCGAACG GGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCCAAACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACTGGATATGACCT ${\tt TCCGCTTCATGGTGGTGGTGGAAAGCTTTTGCGGTTTGGGATGGGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTAAT}$ GGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACT CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACG GCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCGCTAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTAGAGAAGAAGCACCGGCCAACTA CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTT TGTCGCGTCGTCTGTGAAATTCTGCAACTCAATTGCAGGCGTGCAGGCGATACGGGCAGACTTGAGTACTACAGGGG AGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGG TAGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGG TGGGTACTAGGTGTGGGGGCTCATTTCACGAGTTCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGTACCCCGCCTGGGGAGTACG GCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAAC GGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGGGGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCTGTATTG CCAGCACGTAATGGTGGGGGACTTGCAGGAGACTGCCGGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGGATGACGTCAAGTCAT CATGCCCCTTATGTCCAGGGCTTCACACATGCTACAATGGCGCGTACAGAGGGCTGCGAGACCGTGAGGTGGAGCGA ATCCCTTAAAGCGCGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAG ATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCATGAAAGTCGGTAACACCCG AAGCCGGTGGCCTAACCCCTCGGGGAGGGGGGGCCGTCGAAGGTGGGATCGGCGATTGGGACGA

Secuencia del rDNA 16S de COL22:

GACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAAGGCCTTTCGGGGGTACACGAGCGGCGAACGGG TGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCTCC TATCGCATGGTGGGTGGTGGAAAGATTTATCGGTGCAGGATGGGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTAATG GCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTC CTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGG CCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTAC GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGTTCGTAGGCGGTTT GTCGCGTCGTTTGTGAAAACCAGCAGCTCAACTGCTGGCTTGCAGGCGATACGGGCAGACTTGAGTACTGCAGGGGA GACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGC AGTAACTGACGCTGAGGAACGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGT GGGCGCTAGGTGTGGGTTCCTTCCACGGAATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGC CGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACGC GAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATATACCGGAAAGCTGCAGAGATGTGGCCCCCCTTGTGGTCGGTATACAGGTGG TGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATCTTATGTTGCC AGCACGTTATGGTGGGGACTCGTAAGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCA TGCCCCTTATGTCCAGGGCTTCACACATGCTACAATGGCCAGTACAGAGGGCTGCGAGACCGTGAGGTGGAGCGAAT CCCTTAAAGCTGGTCTCAGTTCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATC AGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCATGAAAGTCGGTAACACCCGAAG CCGGTGGCTTAACCCCTTGTGGGAGGGAGCCGTCGAAGGTGGGATCGGCGATTGGGACGA

Secuencia del rDNA 16S de COL23:

GACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAAAGGCCCCTTCGGGGGGTACTCGAGTGGCGAACG GGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCCAAACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACTGGATATGACCT ${\tt TCCGCTTCATGGTGGTGGTGGAAAGCTTTTGCGGTTTGGGATGGGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTAAT}$ GGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACT CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACG GCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCGCTAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTAGAGAAGAAGCACCGGCCAACTA CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTT TGTCGCGTCGTCTGTGAAATTCTGCAACTCAATTGCAGGCGTGCAGGCGATACGGGCAGACTTGAGTACTACAGGGG AGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGG TAGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGG TGGGTACTAGGTGTGGGGGCTCATTTCACGAGTTCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGTACCCCGCCTGGGGAGTACG GCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAAC GGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGGGGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCTGTATTG CCAGCACGTAATGGTGGGGGACTTGCAGGAGACTGCCGGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGGATGACGTCAAGTCAT CATGCCCCTTATGTCCAGGGCTTCACACATGCTACAATGGCGCGTACAGAGGGCTGCGAGACCGTGAGGTGGAGCGA ATCCCTTAAAGCGCGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAG ATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACCCCCGTCACGTCATGAAAGTCGGTAACACCCG AAGCCGGTGGCCTAACCCCTCGGGGAGGGGGGCCGTCGAAGGTGGGATCGGCGATTGGGACGA

Secuencia del rDNA 16S de COL25:

GACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAAGGCCTTTCGGGGGTACACGAGCGGCGAACGGG TGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCTCA GGTTGCATGACTTGGGGTGGAAAGATTTATCGGTGCAGGATGGGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGGTAATG GCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTC CTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGG CCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTAC GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGTTCGTAGGCGGTTT GTCGCGTCGTTTGTGAAAACCAGCAGCTCAACTGCTGGCTTGCAGGCGATACGGGCAGACTTGAGTACTGCAGGGGA GACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGC AGTAACTGACGCTGAGGAACGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGT GGGCGCTAGGTGTGGGTTCCTTCCACGGAATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGC CGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACGC GAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATATACCGGAAAGCTGCAGAGATGTGGCCCCCCTTGTGGTCGGTATACAGGTGG TGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGGGGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATCTTATGTTGCC AGCACGTTATGGTGGGGACTCGTAAGAGACTGCCGGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCA TGCCCCTTATGTCCAGGGCTTCACACATGCTACAATGGCCAGTACAGAGGGCTGCGAGACCGTGAGGTGGAGCGAAT CCCTTAAAGCTGGTCTCAGTTCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATC AGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCATGAAAGTCGGTAACACCCGAAG CCGGTGGCTTAACCCCTTGTGGGAGGGAGCCGTCGAAGGTGGGATCGGCGATTGGGACGA

Secuencia del rDNA 16S de COL26:

GACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAAGGCCCAGCTTGCTGGGTACTCGAGTGGCGAA CGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGAACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGAC ${\tt CTTGGAGTGCATGCTCTGGGGTGGAAAGCTTTTGCGGTTCAGGATGGGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTA}$ ATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGA CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGA CGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCACCAGGGACGAAGCGCGAGTGACGGTACCTGGAGAAGAAGCACCGGCCAAC TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGG TTTGTCGCGTCGTCTGTGAAATTCTGCAACTCAATTGTAGGCGTGCAGGCGATACGGGCAGACTTGAGTACTACAGGG GAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGG GTAGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACG GTGGGTACTAGGTGTGGGGGCTCATTTCACGAGTTCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGTACCCCGCCTGGGGAGTAC GGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAA GGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGGGGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCGACGAGCGCAACCCTTGTCCTGTATTG CCAGCGGGTTATGCCGGGGACTTGCAGGAGACTGCCGGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAT CATGCCCCTTATGTCCAGGGCTTCACACGTGCTACAATGGCTGGTACAGAGGGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGA ATCCCTTAAAGCCAGCCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAG ATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCATGAAAGTCGGTAACACCCG AAGCCGGTGGCCTAACCCCTTGTGGGAGGGAGCTGTCGAAGGTGGGATCGGCGATTGGGACGA

Secuencia del rDNA 16S de COL27:

GACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGTAAGGCCCCTTCGGGGGTACACGAGTGGCGAACG GGTGAGTAAGACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGAGCT ${\tt CCTGTCGCATGGCGGGGGTTGGAAAGGTTTACTGGTGCAGGATGGGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTAA}$ TGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGAC TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGAC GGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGAGAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCCAACT ACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGT TTGTCGCGTCGTCGTGAAAACTTGGGGCTCAACCCCAAGCTTGCGGGCGATACGGGCAGACTTGAGTACTGCAGGG GAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGG GCAGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACG GTGGGCGCTAGGTGTGGGTTTCCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTAC GGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAA CGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATATACCGGAAAGCCGTAGAGATACGGCCCCCCTTGTGGTCGGTATACAGG TGGTGCATGGCTGTCGTCGTGTGGTGGGGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCTGTGTT GCCAGCGCGTAATGGCGGGGACTCGCAGGAGACTGCCGGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGGACGACGTCAAGTCA TCATGCCCCTTATGTCCAGGGCTTCACACATGCTACAATGGCCGGTACAGAGGGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCG AATCCCTTAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCA GATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCATGAAAGTCGGTAACACCC GAAGCCGGTGGCCTAACCCTTGTGGAGGGGGGCCGTCGAAGGTGGGATCGGCGATTGGGACGA

Secuencia del rDNA 16S de COL28:

GACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAAGGCCCTTTCGGGGGGTACACGAGCGGCGAACG GGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCA GAGGCTGCATGGCTTTTGGTGGAAAGGTTTACTGGTGCAGGATGGGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGGTAA TGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGAC TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGAC GGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCCAACT ACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGT TTGTCGCGTCGTCTGTGAAAAACCAGCAGCTCAACTGCTGGCTTGCAGGCGATACGGGCAGACTTGAGTACTGCAGGG GAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGG GCAGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACG GTGGGCGCTAGGTGTGGGTTTCCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTAC GGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAA CGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATATACCGGAAAGCCGTAGAGATACGGCCCCCCTTGTGGTCGGTATACAGG TGGTGCATGGCTGTCGTCGTGGTGTGGGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCTGTGTT GCCAGCGCGTAATGGCGGGGACTCGCAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCA TCATGCCCCTTATGTCCAGGGCTTCACACATGCTACAATGGCCGGTACAGAGGGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCG AATCCCTTAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCA GATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCATGAAAGTCGGTAACACCC GAAGCCGGTGGCCTAACCCTTGTGGAGGGGGGCCGTCGAAGGTGGGATCGGCGATTGGGACGA

Secuencia del rDNA 16S de COL29:

GACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGTAAGGCCCCTTCGGGGGTACACGAGTGGCGAACG GGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGAGCT ${\tt CCTGTCGCATGGCGGGGGTTGGAAAGGTTTACTGGTGCAGGATGGGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTAA}$ TGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGAC TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGAC GGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGAGAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCCAACT ACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGT TTGTCGCGTCGTCGTGAAAACTTGGGGCTCAACCCCAAGCTTGCGGGCGATACGGGCAGACTTGAGTACTGCAGGG GAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGG GCAGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACG GTGGGCGCTAGGTGTGGGTTTCCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTAC GGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAA CGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATATACCGGAAAGCCGTAGAGATACGGCCCCCCTTGTGGTCGGTATACAGG TGGTGCATGGCTGTCGTCGTGTGTGGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCTGTGTT GCCAGCGCGTAATGGCGGGGACTCGCAGGAGACTGCCGGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGGACGACGTCAAGTCA TCATGCCCCTTATGTCCAGGGCTTCACACATGCTACAATGGCCGGTACAGAGGGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCG AATCCCTTAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCA GATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCATGAAAGTCGGTAACACCC GAAGCCGGTGGCCTAACCCTTGTGGAGGGGGGCCGTCGAAGGTGGGATCGGCGATTGGGACGA

Secuencia del rDNA 16S de COL30:

GACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGTAAGGCCCCTTCGGGGGGTACACGAGTGGCGAACG GGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGAGCT ${\tt CCTGTCGCATGGCGGGGGTTGGAAAGGTTTACTGGTGCAGGATGGGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGGTAA}$ TGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGAC TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGAC GGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGAGAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCCAACT ACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGT TTGTCGCGTCGTCGTCGAAAACTTGGGGCTCAACCCCAAGCTTGCGGGCGATACGGGCAGACTTGAGTACTGCAGGG GAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGG GCAGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACG GTGGGCGCTAGGTGTGGGTTTCCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTAC GGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAA CGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATATACCGGAAAGCCGTAGAGATACGGCCCCCCTTGTGGTCGGTATACAGG TGGTGCATGGCTGTCGTCGTGGTGTGGGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCTGTGTT GCCAGCGCGTAATGGCGGGGACTCGCAGGAGACTGCCGGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGGACGACGTCAAGTCA TCATGCCCCTTATGTCCAGGGCTTCACACATGCTACAATGGCCGGTACAGAGGGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCG AATCCCTTAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCA GATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCATGAAAGTCGGTAACACCC GAAGCCGGTGGCCTAACCCTTGTGGAGGGAGCCGTCGAAGGTGGGATCGGCGATTGGGACGA

Secuencia del rDNA 16S de COL33:

GACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCATGTCGAACGGAAAGGCCCAGCTTGCTGGGTACTCGAGTGGCGAAC GGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGAACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACC ATGCCATGCATGTGGTGGTGGGAAAGCTTTTGCGGTTTGGGATGGGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGGTAA TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGAC GGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCGCCAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGGAGAAGAAGCACCGGCCAACT ACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGT TTGTCGCGTCGTCTGTGAAATTCTGCAGCTTAACTGCAGGCGTGCAGGCGATACGGGCAGACTTGAGTACTACAGGG GAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGCGGCGAAGGCGGGTCTCTGG GTAGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACG GTGGGTACTAGGTGTGGGTTCCATTTCACGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGTACCCCGCCTGGGGAGTAC GGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAA TGGTGCATGGCTGTCGTCGTGTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCTGTATT GCCAGCACGTAATGGTGGGGACTTGCAGGAGACTGCCGGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGGATGACGTCAAGTCA TCATGCCCCTTATGTCCAGGGCTTCACACATGCTACAATGGCGCGCTACAGAGGGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCG AATCCCTTAAAGCGCGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCA GATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCATGAAAGTCGGTAACACCC GAAGCCGGTGGCCTAACCCTTGTGGAGGGAGCTGTCGAAGGTGGGATCGGCGATTGGGACGA

1.2. Aislados DOC.

Secuencia del rDNA 16S de la cepa Pseudomonas putida U:

ATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGATGAGAAGAGCTTGCTCTTCGATTCAGCGGCGGAC GGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACGTCCT ACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAT GGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTC CTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGG TCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCATTAACCTAATACGTTAGTGTTTTGACGTTACCGACAGA ATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTA AAGCGCGCGTAGGTGGTTTGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAACTGGCAA CGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGT AGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGAC TTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATGCAGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCG GGAACTCTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGGGGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGC AACCCTTGTCCTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGG GGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCCAA GCCGCGAGGTGGAGCTAATCTCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGA ATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGG GAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGCTAGTCTAACCTTCGGGAGGACGGTTACCACGGTGTGATTCATGACTGGGGTGA

Secuencia del rDNA 16S de la cepa Pseudomonas putida DOC21:

ATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGATGAGAAGAGCTTGCTCTTCGATTCAGCGGCGGAC GGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACGTCCT ACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAA GGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTC CTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGG TCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCATTAACCTAATACGTTAGTGTTTTGACGTTACCGACAGA ATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTA AAGCGCGCGTAGGTGGTTCGTTAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAACTGGCGA GAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTA GTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGGGTCCTTGAGACTTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACC GCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTT TAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATGCAGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGG GAACTCTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCGTCGTGTCGTGGGTTAGGTCCCGTAACGAGCGCA ACCCTTGTCCTTAGTTACCAGCACGTTATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGG GATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCCAAG CCGCGAGGTGGAGCTAATCTCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAA TCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGG AGTGGGTTGCACCAGAAGTAGCTAGTCTAACCTTCGGGGGGGACGGTTACCACGGTGTGATTCATGACTGGGGTGA

Secuencia del rDNA 16S de la cepa Pseudomonas putida DOC19:

ATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGATGAGAGGAGCTTGCTCCTCGATTCAGCGGCGGAC GGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACGTCCT ACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAA GGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTC CTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGG TCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCCGTTACCTAATACGTGATGGTTTTGACGTTACCGACAGA ATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTA AAGCGCGCGTAGGTGGTTGGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAACTGGCCA CGAAGGCGACCACCTGGGCTCATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGT AGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGAC CGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGT TTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATGCAGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCG GGAACTCTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGC AACCCTTGTCCTTAGTTACCAGCACATCATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGG GGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACGTGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTCGCCAA GCCGCGAGGTGGAGCTAATCTCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGA ATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGG GAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGCTAGTCTAACCCTCGGGAGGACGGTTACCACGGTGTGATTCATGACTGGGGTGA

2. Secuencias de nucleótidos del gen *rpo*B de las diferentes cepas pertenecientes al género *Pseudomonas*.

2.1. Pseudomonas putida U.

TGGCCTGGTGCGTGTAGAGCGCGGCGGTCAAGGAACGTCTGTCGATGGCGGAAAGCGAAGGCTTGATGCCGCAAGAC GAACAACCCGCTCTCCGAGATCACCCACAAGCGCCGCGTCTCTGCACTCGGCCCGGGCGGTCTGACCCGTGAGCGTG CTGGCTTCGAAGTCCGTGACGTACACCCGACCCACTACGGCCGTGTGTGCCCGATCGAGACCCCTGAAGGTCCGAAC AAGGAAGGCGTTGTCAGCGACGACGACATCGTGTCCTGTCGGCAATTGAAGAAGCGGACCACGTCATCGCCCAGGCTTC GGCCGCGATGAACGACAAGAAGCAACTGATCGATGAGCTGGTAGCTGTTCGTCACCTGAACGAATTCACCGTCAAGG CGCCGGAAGACGTCACCCTGATGGACGTTTCGCCGAAGCAGGTTGTTTCTGTTGCTGCGTCGCTGATTCCGTTCCTCG AGCACGACGACGCCAACCGTGCGTTGATGGGTTCGAACATGCAGCGTCAGGCTGTACCGACACTGCGTGCCGACAAG CCGCTGGTAGGTACCGGCATGGAGCGCAACGTTGCCCGTGACTCCGGTGGTCTGCGTGGTTGCTCGCCGTGGTGGCGTG ATCGACTCGGTCGACGCCAGCCGTATCGTTGTTCGCGTTAATGACGACGAAGTGGAAACCGGCGAAGCAGGTGTAGA TATCTACAACCTGACCAAGTACACCCGTTCGAACCAGAACACCTGCATCAACCAGCGTCCGCTGGTGAGCAAGGGTG ACAAGGTTCAGCGTAGCGACATCATGGCCGACGGCCCGTCCACCGACATGGGTGAACTGGCGCTGGGTCAGAACATG CGCTTCACCACCATCCACATTCAGGAACTGACCTGTGTGGCGCGTGACACCAAGCTTGGCCCAGAGGAAATCACTGC GGACATCCCGAACGTGGGTGAAGCTGCA

2.2. Pseudomonas putida DOC21.

TGGCCTGGTGCGTGTTGAGCGTGCGGTCAAAGAGCGTCTGTCGATGGCTGAAAGCGAAGGCCTGATGCCTCAGGACC ACAACCCGCTCTCCGAGATCACCCACAAGCGTCGTGTCTCTGCACTCGGCCCGGGCGGTCTGACCCGTGAGCGCGCA GGCTTCGAAGTCCGTGACGTACACCCGACCCACTATGGTCGCGTCTGCCCGATCGAGACTCCTGAAGGTCCGAACAT AGAGGGTGTGGTTACCGACGACATCGTGTTCCTGTCGGCGATCGAAGAAGCGGATCACGTCATTGCTCAGGCTTCGG CCGCAATGAGCGAGAAGAAGCAACTGATCGACGAACTGGTAGCTGTTCGTCACCTGAACGAATTCACCGTCAAGGCA CCTGAAGATGTGACCCTGATGGACGTTTCGCCGAAGCAGGTAGTTTCGGTCGCTGCGTCGCTGATTCCGTTCCTCGAG CACGACGACGCCAACCGTGCGTTGATGGGTTCGAACATGCAGCGTCAGGCTGTACCGACCCTACGCGCTGACAAGCC GCTGGTAGGTACCGGCATGGAGCGCAACGTTGCCCGTGACTCCGGCGTCTGCGTCGTGGCTCGCCGTGGTGGTGTGA TCGACTCCGTCGATGCCAGCCGTATCGTTGTTCGCGTTGCCGATGACGAAGTTGAGACCGGCGAAGCTGGTGTCGAC ATCTACAACCTGACCAAGTACACCGGCTCGAACCAGAACACCTGCATCAACCAGCGTCCGCTGGTGAGCAAGGGTGA GTATCGCGTTCATGGCGTGGAACGGCTTCAACTTCGAAGACTCCATCTGCCTGTCCGAGCGTGTGGTTCAGGAAGACC GCTTCACCACGATCCACATCCAGGAACTGACCTGTGTGGCTCGTGACACCAAGCTTGGCCCAGAAGAGATCACCGCG GACATCCCGAACGTGGGTGAAGCTGC

2.3. Pseudomonas putida DOC19.

TGGCCTGGTACGCGTCGAGCGTGCGGTCAAGGAACGTCTGTCGATGGCCGAAAGCGAAGGCCTGATGCCGCAGGACC AACAACCCGCTCTCCGAGATCACCCACAAGCGCCGCGTCTCCGCACTCGGCCCTGGCGGTCTGACCCGTGAGCGCGCG CGGCTTCGAAGTCCGTGACGTACACCCGACCCACTACGGTCGCGTGTGCCCGATCGAGACCCCTGAAGGTCCGAACA AAGAGGGCGTGGTCTCCGACGACATCGTGTCCTGTCGGCGATCGAAGAGGCTGATCACGTCATCGCCCAGGCTTCG GCCACGATGAACGAGAACAAGCAGCTGGTCGACGAACTGGTAGCGGTCCGTCACCTGAACGAATTCACCGTCAAGG CGCCCGAAGACGTCACCTTGATGGACGTTTCGCCGAAGCAGGTTGTCTCGGTCGCAGCGTCGCTGATTCCGTTCCTCG AGCACGACGACGCCAACCGAGCGTTGATGGGTTCGAACATGCAGCGTCAGGCAGTACCGACCCTGCGCGCCGACAA GCCGCTGGTAGGTACCGGCATGGAGCGCAACGTCGCCCGTGACTCCGGTGTCTGCGTCGTGGCACGCCGTGGTGGTG TGATCGACTCCGTCGACGCCAGCCGTGTCGTGGTTCGCGTGGCCGACGACGACGACGACGACGACGCGGCGAAGCCGGTGTC GACATCTACAACCTGACCAAGTACACCCGCTCCAACCAGAACACCTGCATCAACCAGCGCCCGCTGGTCAACAAGGG TGCGCATCGCGTTCATGGCATGGAACGGCTTCAACTTCGAAGACTCCATCTGCCTGTCCGAGCGTGTGGTGCAGGAA GACCGCTTCACCACGATCCACGAACTGAACTGACCTGCGTGGCCCGTGACACCAAGCTTGGCCCAGAGGAAATCAC TGCGGACATCCCGAACGTGGGTGAAGCCGCA

APÉNDICE II

"Vivid arduamente, no temáis nada y os sonreirá el triunfo." Sir Winston Leonard Spencer Churchill (1874-1965).

Tabla 30. Crecimiento de las cepas COL en medio mínimo sólido suplementado con diferentes compuestos esteroideos como única fuente de carbono, con una concentración final de 5mM.

								C	EPAS								
Fuente de carbone				Gord	lonia				Tsı	ıkamur	ella	Rhodococcus					
Fuente de carbono	COL11	COL17	COL19	COL20	COL21	COL23	COL26	COL33	COL14	COL16	COL18	COL22	COL25	COL27	COL28	COL29	COL30
Colesterol	++	++	++	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	++	++	++	++	+	++
β-Sitosterol	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	+	+	-	+++
Estigmasterol	+	+	+	+	+		-	+	+	+	++	-	-	-	-	-	+
Ergosterol	++	+	+	+	+		+	++	+++	+++	+++	-	-	-	+	-	++
Ácido desoxicólico	-	-	-	1	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ácido cólico	+	-	-	1	-		-	-	-	-	+	+++	+++	+++	+++	-	++
Ácido quenodesoxicólico	+++	+++	-	+++	+	+++	-	+++	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Ácido litocólico	+++	+++	-	+++	+	+++	-	+++	-	-	+	+++	+++	+++	+++	-	+++
Ácido ursodesoxicólico	+	+	-	1	-	1	-	+	-	-	+	+++	+++	+++	+++	-	+++
Ácido deshidrocólico	++	+	-		-	-	-	+	+	+	+	+++	++	++	++	-	++
Ácido 5β-colánico	+	-	-		-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Progesterona	+++	++	-	+++	+++	+++	-		-	-	+	+++	+++	+++	+++	-	+++
Prednisona	++	+	-	+	+	+	-	+	-	-	++	+	+	-	-	-	-
5-Pregnen-3β-ol-20-ona	+++	+++	-	+++	+++	+++	-	-	-	-	+	+++	+++	+++	+++	-	+++
Testosterona	+++	+++	-	+++	+++	+++	++	-	-	-	+	+++	+++	+++	+++	-	+++
17α-Metiltestosterona	+	++	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	++	-	++	-	++
β-Estradiol	+	-	-		-	+	-		-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>trans-</i> deshidroandosterona	+++	++	-	+++	+++	+++	-	-	-	-	+	+++	+++	+++	+++	-	++
Estrona	+	-	-		-		-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
Androstanolona	++	+	-	+	+	+	-		-	-	+	+++	+++	+++	+++	-	+++
trans-androsterona	++	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+++	+++	+++	+++	-	+++
1-Deshidro-17α- metiltestosterona	+++	++	-	+	+	+	-	-	-	+	+	++	++	+	++	+	++
4-Androsten-3,17-diona	+++	+++	-	+++	++	++	+	-	-	-	+	+++	++	++	++	-	++

Crecimiento óptimo: +++; crecimiento moderado: ++; crecimiento escaso: +; crecimiento nulo: -

Tabla 31. Crecimiento de las cepas COL en medio mínimo suplementado con diferentes ácidos grasos (acético, propiónico, etc.), compuestos del metabolismo central (ácido málico, ácido cítrico, glicerol), compuestos aromáticos hidroxilados (fenilacetato, benzoato, ácidos 3-OH-fenilacético, 4-OH-cinámico, 2-OH-benzoico, etc.), como única fuente de carbono, con una concentración final de 5mM.

									CEPAS								
Fuente de carbono	COL11	COL14	COL16	COL17	COL18	COL19	COL20	COL21	COL22	COL23	COL25	COL26	COL27	COL28	COL29	COL30	COL33
Acetato	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+	+		+	++
Propionato	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+	+	-	+	++
Octanoato	-	-	+++	-	-	-						-	-	-		-	-
Nonanoato	-	-	-	-	-	-						-	-	-		-	
Decanoato	-	-		-	-	-						-	-	-	-	-	-
Succinato	++	+++	+++	+	+++	-	++	+	++	-	++	+	+	++	+	-	-
Fumarato	+	+	+++	+	+++	-	+	+	++		++	++	++	++	+	-	-
Malato	+	++	+++	+	+++	-	+	+	+		+	+	+	+		-	
Citrato	+++	-	+++	+++	+++	-	+++	++	+		++	++	-	++	-	-	+
Glicerol	+	-	++	+	++	-	+		+++	+	+++	+	-	-	-	-	
Fenilacetato	-	-	-	-	+++	-	-	-	+++	+	+++	+++	-	+++	-	-	-
3-OH-fenilacetato	-	-	-	-	+	-	-	-	+++	-	+++	+	+++	+++	+	+++	-
4-OH-fenilacetato	-	-		-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-
Benzoato	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	+++	+++	-	-	-	-	-
2-OH-benzoato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3-OH-benzoato	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
4-OH-benzoato	-	-	-	-	+	-	-		+	-	+++	+	+++	+	+	+++	++
3-fenilpropionato	-	-	-	-	+	-	-		-	+	-	+	+++	-	-	+++	-
3-OH-fenilpropionato	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+++	-	-	+++	-
4-OH-fenilpropionato	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3-OH-cinamato	+	-	-	+	++	-	+	+	-	-	-	-	+++	-	-	+++	-
4-OH-cinamato	+	-	-	+	+	-	+	-		-	-	-	+++	-	-	+++	-
Fenoxiacetato	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Ciclohexilacetato	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-
Adipato	++	•	+	++	++	-	+	+	+++	+	+++	+++	-	+	-	-	-
Pimelato	++	•	-	++	++	-	++	++	++	+	++	+	-	+	-	-	-
Suberato	+++	+	++	++	+++	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++		-	

Crecimiento óptimo: +++; crecimiento moderado: ++; crecimiento escaso: +; crecimiento nulo: •

NOTA: Todos los compuestos reseñados en la tabla como sales, en un principio eran ácidos: ácido acético, ácido propiónico, ácido octanoico, etc..., pero al preparar las soluciones "stock", se ajustaron dichas soluciones a pH 7-8 con KOH. Así, todos ellos se convirtieron en sales y se añadieron como tal al medio en el que servirían como fuente de carbono para las cepas COL.

									CEPAS								
Fuente de carbono	COL11	COL14	COL16	COL17	COL18	COL19	COL20	COL21	COL22	COL23	COL25	COL26	COL27	COL28	COL29	COL30	COL33
Sacarosa	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+	+	+	+	-	+	-	-	+
Maltosa	+	+++	+	+	+++	-	+	+	+	+	+	++	-	+	-	1	-
Lactosa	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
D-Glucosa	+++	+++	+++	++	+++	+	++	++	+	++	+	++	-	+	-		++
D-Fructosa	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	+	-		+
D-Sorbitol	-	+++	1	-	+++	-	-	-	+++	-	+++	+++	-	-	-		-
D-Xilosa	+	-	1	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	1	-
D-Glucuronato	+	-		+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+
Gluconato	+	+++	+	+	-	+++	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+
D-Sorbosa	+	+++	-	+	+++		+	-	++	-	++	+++	-	+	-	-	
D-Manitol	+	+++	-	+	+++	-	+	+	+	-	+++	+++	-	+	-	-	-
L-Arabinosa	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	
L-Fucosa	+	-	+++	+	+++	-	+	+	+	+	+	++	-	+	-	-	-
L-Isoleucina	+	-	-	+	+	-	+	+	+	++	++	+	-	+	-	-	
L-Fenilalanina	+	-		+	++	-	+	-	+++	+	+++	+	-	+	-		
L-Tirosina	+	-	-	+	+++	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-		
L-Valina	+++	+++	++	+++	+++	-	+++	+++	++	++	++	-	-	++	-	1	
L-Metionina	+	-		+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-		-
L-Histidina	+	-	-	+	+++	-	+	+	+	-	+	-	-	+++	-		
Feniletilamina	-	-	1	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-		-		
Tiramina				+	+		+	+									
Histamina	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-		-

Tabla 32. Crecimiento de las cepas COL en medio mínimo suplementado con diferentes azúcares, aminoácidos y aminas biogénicas como única fuente de carbono, con una concentración final de 5mM.

Crecimiento óptimo: +++; crecimiento moderado: ++; crecimiento escaso: +; crecimiento nulo: -

Tabla 33. Resultados de la prueba API para microorganismos obtenidos al realizar dicha prueba sobre las cepas COL.

									CEPAS								
Sistema API	COL11	COL14	COL16	COL17	COL18	COL19	COL20	COL21	COL22	COL23	COL25	COL26	COL27	COL28	COL29	COL30	COL33
Reducción de nitratos en nitritos	+	-	-	+	-	-	+	-			-	+	1	+	-	-	-
Reducción de nitratos en nitrógeno	-	-	-		-	-		-	1	ł	-	-	ł	-		-	
Formación de Indol (Triptófano)	-	-	-	1	-	-	-	-	1	1	-	-	1	-	1	-	1
Fermentación (Glucosa)	-	-	-	-	-	-	-	-		1	-	-	1	-	-	-	-
Arginina dihidrolasa	-	-	-	-	-	-	-	-		1	-	-		-	-	-	-
Ureasa	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	1		-		-
Hidrólisis (β- glucosidasa)(Esculina)	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-		+	-	-	-
Hidrólisis (Proteasa)(Gelatina)	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-		-	-	-	-
β-galactosidasa(p- Nitrofenil-βD- Galactopiranosidasa)	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Asimilación (Glucosa)	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+		+	+	-	+
Asimilación (Arabinosa)	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-		+	+	-	+
Asimilación (Manosa)	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-		+	+	-	+
Asimilación (Manitol)	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
Asimilación (N- acetilglucosamina)	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+		+	+	-	+
Asimilación (Maltosa)	+	+		+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Asimilación (Gluconato potásico)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Asimilación (Ácido cáprico)	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	+	-
Asimilación (Ácido adípico)	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
Asimilación (Malato)	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Asimilación (Citrato trisódico)	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Asimilación (Ácido fenilacético)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-
Citocromo oxidasa	-				-		-	-			-	-		-	-		
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Reacción positiva: +; reacción negativa: -

	COL11	COL14	COL16	COL17	COL18	COL19	COL20	COL21	COL22	COL23	COL25	COL26	COL27	COL28	COL29	COL30	COL33
pH 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
рН 5	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
рН 9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabla 34. Resultados del crecimiento de las diferentes cepas COL cuando son sembradas en medios con diferentes valores de pH.

Crecimiento: +; no crecimiento: -

Tabla 35. Resultados del crecimiento de las distintas cepas COL con respecto a la tolerancia de éstas a diferentes valores de salinidad en el medio.

	COL11	COL14	COL16	COL17	COL18	COL19	COL20	COL21	COL22	COL23	COL25	COL26	COL27	COL28	COL29	COL30	COL33
0% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2% NaCl	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4% NaCl	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6% NaCl	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8% NaCl	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10% NaCl	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Crecimiento: +; no crecimiento: -.

APÉNDICE III

"El día que el hombre se diese cuenta de sus profundas equivocaciones, habría terminado el progreso de la ciencia."

Marie Curie (1867-1934).

1. Tabla con las diferentes cepas utilizadas durante la realización de esta Tesis Doctoral.

Tabla 36. Diferentes cepas utilizadas durante la realización de este estudio.

Cepas	Descripción	Referencia
<i>E. coli</i> DH5α'	F ⁻ , $\Delta lacU169$, $\varphi 80dlacZ1M15$, $hsdR17$, $recA1$, $endA1$, $gyrA96$, $thy-1$, $relA1$, $supE44$, $deoR$.	Hanahan, 1985
E. coli DH10B	F, mcrA, Δ (<i>mrr-hsd</i> RMS- <i>mcr</i> BC), ϕ 80d <i>lac</i> Z1M15, Δ <i>lac</i> X74, <i>deo</i> R, <i>rec</i> A1, <i>end</i> A1, <i>ara</i> D139, Δ (<i>ara</i> , <i>leu</i>)7697, <i>gal</i> U <i>gal</i> K, λ^{-} , <i>rps</i> L, <i>nup</i> G.	Grant <i>et al.</i> , 1990
<i>E. coli</i> HB101	F ⁻ , Δ (<i>gtp-pro</i> A)62, <i>leu</i> B6, <i>sup</i> E44, <i>ara</i> -14, <i>gal</i> K2, <i>lac</i> Y1, Δ (<i>mcr</i> C- <i>mrr</i>), <i>rps</i> L20(Sm ^r), <i>xyl</i> -5 <i>mtl</i> -1, <i>rec</i> A13.	Boyer & Roulland- Dussoix, 1969
<i>E. coli</i> DH10B Tn5-12	Cepa de <i>E. coli</i> DH10B transformada con el plásmido pGS9 (extraído previamente de la HB101), para obtener transconjugantes con la cepa <i>P. putida</i> DOC21, mediante conjugación triparental.	Este estudio
<i>P</i> . putida DOC19	Cepa de <i>P. putida</i> , capaz de crecer en medio mínimo suplementado con ácido desoxicólico como única fuente de carbono, Ap ^r .	Este estudio
P. putida DOC21	Cepa de <i>P. putida</i> aislada e identificada en nuestro laboratorio, capaz de crecer en medio mínimo suplementado con ácido desoxicólico como única fuente de carbono, Ap ^r (al cabo de 24-48 h crecen una colonias en Rf y Cm). Cepa "estrella" de esta Tesis Doctoral.	Este estudio
P. putida KT2440	hsdMR, Ap ^r .	Bayley <i>et al.</i> , 1977
P. putida U	Cepa silvestre, Rf ^r .	Martínez- Blanco <i>et al.</i> , 1990

P. putida F1	Cepa silvestre.	Wackett, LP et al., 1988
COL11	Cepa bacteriana Gram+ perteneciente al género <i>Gordonia</i> , capaz de crecer en medio mínimo suplementado con colesterol 4 mM como única fuente de carbono. Sin resistencias conocidas.	Este estudio
COL14	Cepa bacteriana Gram+, perteneciente al género <i>Tsukamurella</i> , capaz de crecer en medio mínimo suplementado con colesterol 4 mM como única fuente de carbono. Ap ^r , Km ^r , Gtm ^r .	Este estudio
COL16	Cepa bacteriana Gram+ perteneciente al género <i>Tskamurella</i> , capaz de crecer en medio mínimo suplementado con colesterol 4 mM como única fuente de carbono. Ap ^r , Gtm ^r .	Este estudio
COL17	Cepa bacteriana Gram+, perteneciente al género <i>Gordonia</i> , capaz de crecer en medio mínimo suplementado con colesterol 4 mM como única fuente de carbono. Sin resistencias conocidas.	Este estudio
COL18	Cepa bacteriana Gram+ perteneciente al género <i>Tsukamurella</i> , capaz de crecer en medio mínimo suplementado con colesterol 4 mM como única fuente de carbono. Ap ^r , Gtm ^r .	Este estudio
COL19	Cepa bacteriana Gram+ perteneciente al género <i>Gordonia</i> , capaz de crecer en medio mínimo suplementado con colesterol 4 mM como única fuente de carbono. Sin resistencias conocidas.	Este estudio
COL20	Cepa bacteriana Gram+ perteneciente al género <i>Gordonia</i> , capaz de crecer en medio mínimo suplementado con colesterol 4 mM como única fuente de carbono. Sin resistencias conocidas.	Este estudio
COL21	Cepa bacteriana Gram+ perteneciente al género <i>Gordonia</i> , capaz de crecer en medio mínimo suplementado con colesterol 4 mM como única fuente de carbono. Sin resistencias conocidas.	Este estudio

COL22	Cepa bacteriana Gram+ perteneciente al género <i>Rhodococcus</i> , capaz de crecer en medio mínimo suplementado con colesterol 4 mM como única fuente de carbono. Km ^r .	Este estudio
COL23	Cepa bacteriana Gram+ perteneciente al género <i>Gordonia</i> , capaz de crecer en medio mínimo suplementado con colesterol 4 mM como única fuente de carbono. Sin resistencias conocidas.	Este estudio
COL25	Cepa bacteriana Gram+ perteneciente al género <i>Rhodococcus</i> , capaz de crecer en medio mínimo suplementado con colesterol 4 mM como única fuente de carbono. Sin resistencias conocidas (al cabo de unas 48 h aprox. aparecen unas colonias en Km ^r).	Este estudio
COL26	Cepa bacteriana Gram+ perteneciente al género <i>Gordonia</i> , capaz de crecer en medio mínimo suplementado con colesterol 4 mM como única fuente de carbono. Ap ^r .	Este estudio
COL27	Cepa bacteriana Gram+ perteneciente al género <i>Rhodococcus</i> , capaz de crecer en medio mínimo suplementado con colesterol 4 mM como única fuente de carbono. Km ^r .	Este estudio
COL28	Cepa bacteriana Gram+ perteneciente al género <i>Rhodococcus</i> , capaz de crecer en medio mínimo suplementado con colesterol 4 mM como única fuente de carbono. Km ^r .	Este estudio
COL29	Cepa bacteriana Gram+ perteneciente al género <i>Rhodococcus</i> , capaz de crecer en medio mínimo suplementado con colesterol 4 mM como única fuente de carbono. Km ^r .	Este estudio
COL30	Cepa bacteriana Gram+ perteneciente al género <i>Rhococcus</i> , capaz de crecer en medio mínimo suplementado con colesterol 4 mM como única fuente de carbono. Km ^r .	Este estudio
COL33	Cepa bacteriana Gram+ perteneciente al género <i>Gordonia</i> , capaz de crecer en medio mínimo suplementado con colesterol 4 mM como única fuente de carbono. Sin resistencias conocidas.	Este estudio

2. Tabla con los diferentes mutantes obtenidos durante la realización de esta Tesis Doctoral.

 Tabla 37. Mutantes obtenidos como resultado de este estudio.

Mutantes	Descripción	Referencia
DOC21 Mut1	Mutante 1 de la cepa DOC21, obtenido mediante conjugación triparental (como todos los mutantes). Incapaz de metabolizar ácido desoxicólico, testosterona y 4-androsten-3,17- diona (4 mM). Ap ^r , Km ^r .	Este estudio
DOC21 Mut3	Mutante 3. No utiliza ácido desoxicólico, testosterona y 4-androsten-3,17-diona (4 mM). Ap ^r , Km ^r .	Este estudio
DOC21 Mut4	Mutante 4. No crece en ácido desoxicólico, testosterona y 4-androsten-3,17-diona (4 mM). Ap ^r , Km ^r .	Este estudio
DOC21 Mut5	Mutante 5. Incapaz de degradar ácido desoxicólico, testosterona y 4-androsten-3,17- diona (4 mM). Ap ^r , Km ^r .	Este estudio
DOC21 Mut6	Mutante 6. No es capaz de metabolizar ácido desoxicólico, testosterona y 4-androsten-3,17- diona (4 mM). Ap ^r , Km ^r .	Este estudio
DOC21 Mut7	Mutante 7. No presenta capacidad de crecimiento en ácido desóxicólico, testosterona y 4-androsten-3,17-diona (4 mM). Ap ^r , Km ^r .	Este estudio
DOC21 Mut8	Mutante 8. Incapaz de metabolizar ácido desoxicólico, pero crece en testosterona y 4- androsten-3,17-diona (4 mM). Ap ^r , Km ^r .	Este estudio
DOC21 Mut9	Mutante 9. Capaz de crecer en testosterona y 4-androsten-3,17-diona, pero no en ácido desoxicólico (4 mM). Ap ^r , Km ^r .	Este estudio
DOC21 Mut10	Mutante 10. Crece en 4-OH AHA y LB pero no metaboliza el ácido desoxicólico. Ap ^r , Km ^r .	Este estudio
DOC21 Mut11	Mutante 11. No crece en ácido desoxicólico, testosterona y 4-androsten-3,17-diona (4 mM). Ap ^r , Km ^r .	Este estudio

DOC21 Mut12	Mutante 12. Incapaz de degradar ácido desoxicólico, pero sí testosterona y 4-androsten-3,17-diona (4 mM). Ap ^r , Km ^r .	Este estudio
DOC21 Mut13	Mutante 13. No es capaz de metabolizar ácido desoxicólico ni testosterona ni 4-androsten- 3,17-diona (4 mM). Ap ^r , Km ^r .	Este estudio
DOC21 Mut14	Mutante 14. Metaboliza testosterona y 4- androsten-3,17-diona, no así ácido desoxicólico (4 mM). Ap ^r , Km ^r .	Este estudio
DOC21 Mut15	Mutante 15. No degrada ácido desoxicólico, pero si testosterona y 4-androsten-3,17-diona (4 mM). Ap ^r , Km ^r .	Este estudio
DOC21 Mut16	Mutante 16. Incapaz de crecer en ácido desoxicólico, testosterona y 4-androsten-3,17- diona (4 mM). Ap ^r , Km ^r .	Este estudio
DOC21 Mut17	Mutante 17. No metaboliza ácido desoxicólico, pero si testosterona y 4-androsten-3,17-diona (4 mM). Ap ^r , Km ^r .	Este estudio
DOC21 Mut18	Mutante 18. No es capaz de catabolizar ácido desoxicólico, testosterona y 4-androsten-3,17- diona (4 mM). Ap ^r , Km ^r .	Este estudio
DOC21 Mut19	Mutante 19. Incapaz de crecer en ácido desoxicólico, testosterona y 4-androsten-3,17- diona (4 mM). Ap ^r , Km ^r .	Este estudio
DOC21 Mut20	Mutante 20. Degrada testosterona y 4-androsten- 3,17-diona, pero no ácido desoxicólico (4 mM). Ap ^r , Km ^r .	Este estudio
DOC21 Mut22	Mutante 22. No metaboliza ácido desoxicólico ni testosterona ni 4-androsten-3,17-diona. Ap ^r , Km ^r .	Este estudio
DOC21 Mut23	Mutante 23. No es capaz de degradar ácido desoxicólico, testosterona y 4-androsten-3,17- diona (4 mM). Ap ^r , Km ^r .	Este estudio
DOC21 Mut24	Mutante 24. Incapaz de crecer en ácido desoxicólico pero si en testosterona y 4-androsten-3,17-diona (4 mM). Ap ^r , Km ^r .	Este estudio
DOC21 Mut25	Mutante 25. No degrada ácido desoxicólico, testosterona y 4-androsten-3,17-diona (4 mM). Ap ^r , Km ^r .	Este estudio
DOC21 Mut26	Mutante 26. Metaboliza testosterona y 4- androsten-3,17-diona, pero no ácido desoxicólico (4 mM). Ap ^r , Km ^r .	Este estudio
DOC21 Mut27	Mutante 27. Crece en testosterona y 4-androsten- 3,17-diona, no así en ácido desoxicólico (4 mM). Ap ^r , Km ^r .	Este estudio

DOC21 Mut28	Mutante 28. Incapaz de metabolizar ninguno de los tres compuestos mencionados. Ap ^r , Km ^r .	Este estudio
DOC21 Mut29	Mutante 29. Idéntico al anterior. Ap ^r , Km ^r .	Este estudio
DOC21 Mut30	Mutante 30. Crece en testosterona y 4-androsten- 3,17-diona, pero no en ácido desoxicólico (4 mM). Ap ^r , Km ^r .	Este estudio
DOC21 Mut31	Mutante 31. Metaboliza la testosterona y el 4- androsten-3,17-diona, pero no el ácido desoxicólico (4 mM). Ap ^r , Km ^r .	Este estudio
DOC21 Mut32	Mutante 32. Incapaz de metabolizar ácido desoxicólico, testosterona y 4-androsten-3,17- diona (4 mM). Ap ^r , Km ^r .	Este estudio
DOC21 Mut33	Mutante 33. Idéntico al anterior. Ap ^r , Km ^r .	Este estudio
DOC21 Mut34	Mutante 34. Idéntico al anterior. Ap ^r , Km ^r .	Este estudio
DOC21 Mut35	Mutante 35. Idéntico al anterior. Ap ^r , Km ^r .	Este estudio
DOC21 Mut36	Mutante 36. Es capaz de metabolizar la testosterona y el 4-androsten-3,17-diona, pero no el ácido desoxicólico (4 mM). Ap ^r , Km ^r .	Este estudio
DOC21 Mut37	Mutante 37. Idéntico al anterior. Ap ^r , Km ^r .	Este estudio
DOC21 Mut 38	Mutante 38. Idéntico al anterior. Ap ^r , Km ^r .	Este estudio
DOC21 Mut 39	Mutante 39. Idéntico al anterior. Ap ^r , Km ^r .	Este estudio
DOC21 Mut 40	Mutante 40. Idéntico al anterior. Ap ^r , Km ^r .	Este estudio
DOC21 Mut 41	Mutante 41. Idéntico al anterior. Ap ^r , Km ^r .	Este estudio
DOC21 Mut42	Mutante 42. Incapaz de metabolizar ácido desoxicólico, testosterona y 4-androsten-3,17- diona (4 mM). Ap ^r , Km ^r .	Este estudio
DOC21 Mut43	Mutante 43. Metaboliza testosterona y 4- androsten-3,17-diona, pero no ácido desoxicólico (4 mM). Ap ^r , Km ^r .	Este estudio

DOC21 Mut44	Mutante 44. No crece en ácido desoxicólico, testosterona y 4-androsten-3,17-diona (4 mM). Ap ^r , Km ^r .	Este estudio
DOC21 Mut45	Mutante 45. Es capaz de crecer en testosterona y 4-adrosten-3,17-diona, no así en ácido desoxicólico (4 mM). Ap ^r , Km ^r .	Este estudio
DOC21 Mut46	Mutante 46. Idéntico al anterior. Ap ^r , Km ^r .	Este estudio
DOC21 Mut47	Mutante 47. Idéntico al anterior. Ap ^r , Km ^r .	Este estudio
DOC21 Mut48	Mutante 48. Idéntico al anterior. Ap ^r , Km ^r .	Este estudio
DOC21 Mut49	Mutante 49. Idéntico al anterior. Ap ^r , Km ^r .	Este estudio
DOC21 Mut50	Mutante 50. Incapaz de crecer en ácido desoxicólico, testosterona y 4-androsten-3,17- diona (4 mM). Ap ^r , Km ^r .	Este estudio
DOC21 Mut51	Mutante 51. Idéntico al anterior. Ap ^r , Km ^r .	Este estudio
DOC21 Mut52	Mutante 52. No metaboliza ácido desoxicólico, pero si testosterona y 4-androsten-3,17-diona (4 mM). Ap ^r , Km ^r .	Este estudio
DOC21 Mut53	Mutante 53. Idéntico al anterior. Ap ^r , Km ^r .	Este estudio

3. Tabla con los distintos plásmidos y construcciones empleadas y/o diseñadas durante la realización de esta Tesis Doctoral.

Tabla 38. Plásmidos y construcciones obtenidas durante la realización de este estudio.

Plásmidos y construcciones	Descripción	Referencia
pGS9	Plásmido conjugativo que contiene el transposón Tn5. Km ^r , Cm ^r .	Selvaraj & Iyer, 1983
pUC18	Vector de clonación, promotor <i>lac</i> , <i>lac</i> $Z\alpha^+$, <i>ori</i> ColE1. Ap ^r .	Norrander <i>et al.</i> , 1983
pRK600	Plásmido auxiliar utilizado en los experimentos de conjugación, <i>ori</i> ColE1, <i>ori</i> V, Mob ⁺ . Cm ^r .	Herrero <i>et al.</i> , 1990
pGEM [®] -T Easy	Vector utilizado para clonar directamente los productos de PCR, promotor <i>lac</i> , <i>ori</i> ColE1, <i>lac</i> $Z\alpha^+$, SP6 T7. Ap ^r .	PROMEGA
pTZ57R/T	Vector utilizado para clonar directamente los productos de PCR (básicamente igual al anterior), promotor <i>lac</i> , <i>ori</i> ColE1, <i>lacZα</i> ⁺ , SP6 T7. Ap ^r .	Fermentas
pJQ200(KS/SK)	Vector utilizado para generar deleciones mediante eventos de doble recombinación, $ori15A$, Mob ⁺ , $lacZ\alpha^+$, $sacB$. Gtm ^r .	Quandt & Hynes, 1993
pBBR1MCS-3(pMC)	Vector de clonación y expresión de genes de amplio rango de hospedador, promotor <i>lac</i> , <i>lac</i> Zα ⁺ , <i>ori</i> BBr1, Mob ⁺ . Tc ^r .	Kovach <i>et al.</i> , 1995
pJQTn5-Mut1 Dig. SalI Col 2-13	Cepa de <i>E</i> . coli DH10B en cuyo interior se encuentra el plásmido pJQ y clonado en él, un inserto de DNA genómico del Mut1 (en el cual se ha integrado el Tn5), mediante una genoteca realizada por el método del "brazo del Tn5" con el corte enzimático SalI. Colonia 2-13. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5-Mut1 Dig. SalI Col 3-21	Clon del anterior. Colonia 3-21. Gtm ^r .	Este estudio

pJQTn5-Mut1 Dig. BamHI Col 35-1	Esencialmente igual al anterior, salvo por el corte enzimático con el que está realizada la genoteca, aquí es BamHI. Colonia 35-1. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5-Mut1 Dig. BamHI Col 37-3	Clon del anterior. Colonia 37-3. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5-Mut1 Dig. BamHI 40-11	Clon del anterior. Colonia 40-11. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5-Mut4 Dig. BamHI Col 1-2	Cepa de <i>E</i> . coli DH10B en cuyo interior se encuentra el plásmido pJQ y clonado en él, un inserto de DNA genómico del Mut4 (en el cual se ha integrado el Tn5), mediante una genoteca realizada por el método del "brazo del Tn5" con el corte enzimático SalI. Colonia 1-2. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5-Mut4 Dig. BamHI Col 2-2	Clon del anterior. Colonia 2-2. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5-Mut4 Dig. BamHI Col 3-2	Clon del anterior. Colonia 3-2. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5-Mut4 Dig. BamHI Col 4-2	Clon del anterior. Colonia 4-2. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5-Mut4 Dig. SalI Col 1-1	Esencialmente igual al anterior salvo por el corte enzimático con el que está realizada la genoteca, aquí es SalI. Colonia 1-1. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5-Mut4 Dig. SalI Col 2-3	Clon del anterior. Colonia 2-3. Gtm ^r .	Este estudio
DOC21 Mut5 Tn5- 2/21DOC210 pG Col 11	Cepa de <i>E.coli</i> DH10B con el pGEM [®] -T Easy en su interior. Dicho plásmido lleva inserto un producto de PCR amplificado sobre DNA genómico del Mut5 con los <i>primers</i> Tn5-2 y 21DOC210, para la comprobación de la inserción del transposón. Colonia 11. Ap ^r .	Este estudio
DOC21 Mut5 Tn5- 2/21DOC209 pG Col 11	Igual al anterior. La diferencia radica en que la amplificación se ha producido entre los <i>primers</i> Tn5-2 y el 21DOC209. Colonia 11. Ap ^r .	Este estudio

pJQTn5 Mut5 Dig. BamHI Col 4-3	Igual al resto de construcciones para realizar genotecas reseñadas anteriormente, salvo que ésta es con el Mut5. Se ha realizado con el corte enzimático BamHI. Colonia 4-3. Gtm ^r .	Este estudio
DOC21 Mut6 Tn5-2/Des7 pG Banda 10-1	Cepa <i>E. coli</i> DH10B hospedadora de un pGEM [®] -T Easy en cuyo interior se encuentra clonado un fragmento de DNA, amplificado por PCR sobre genómico de Mut6 y entre los oligos Tn5-2 y Des7 para comprobar el punto de inserción del Tn5. Colonia 10-1. Ap ^r .	Este estudio
DOC21 Mut6 Tn5-2/Des7 pG Banda 10-4	Clon del anterior. Colonia 10-4. Ap ^r .	Este estudio
pJQTn5 Mut7 Dig. Sall Col 21-2	Idéntica a las demás construcciones para ejecutar genotecas. En este caso sobre el Mut7. Se ha realizado con el corte enzimático SalI. Colonia 21-2. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5 Mut8 Dig. SalI Col 7-1	Genoteca sobre el Mut8, al igual que las demás con el método del "brazo del Tn5". Realizada con el corte SalI. Colonia 7-1. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5 Mut9 Dig. BamHI Col 5-1	Genoteca sobre el Mut9, al igual que las demás con el método del "brazo del Tn5". Realizada con el corte BamHI. Colonia 5-1. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5 Mut9 Dig. BamHI Col 6-1	Clon del anterior. Colonia 6-1. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5 Mut11 Dig. BamHI Col 2-4	Genoteca realizada sobre el Mut11 mediante el "brazo del Tn5", utilizando el corte BamHI. Colonia 2-4. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5 Mut12 Dig. Sall Col 1-6	Genoteca sobre el Mut12, al igual que las demás con el método del "brazo del Tn5". Realizada con el corte SalI. Colonia 1-6. Gtm ^r	Este estudio
pJQTn5 Mut12 Dig. Sall Col 2-2	Clon del anterior. Colonia 2-2.Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5 Mut13 Dig. BamHI Col 4-1	Genoteca realizada sobre el Mut13 mediante el "brazo del Tn5", utilizando el corte BamHI. Colonia 4-1. Gtm ^r .	Este estudio

pJQTn5 Mut14 Dig. Sall Col 6-2	Construcción en pJQ para realizar una genoteca sobre el Mut14, con igual metodología que las anteriormente mencionadas. Realizada con el corte de restricción SalI. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5 Mut15 Dig. BamHI Col 6-1	Genoteca sobre el Mut15. Idéntica metodología que las anteriores. Corte de restricción BamHI. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5 Mut15 Dig. BamHI Col 6-3	Clon del anterior. Colonia 6-3. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5 Mut16 Dig. Sall Col 2-2	Genoteca realizada sobre el Mut16 mediante el "brazo del Tn5", utilizando el corte SalI. Colonia 2-2. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5 Mut17 Dig. Sall Col 3-1	Idéntica a las demás construcciones para ejecutar genotecas. En este caso sobre el Mut17. Se ha realizado con el corte enzimático SalI. Colonia 3-1. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5 Mut18 Dig. BamHI Col 2-3	Genoteca realizada sobre el Mut18 mediante el "brazo del Tn5", utilizando el corte BamHI. Colonia 2-3. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5 Mut18 Dig. BamHI Col 3-2	Clon del anterior. Colonia 3-2. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5 Mut18 Dig. BamHI Col 4-3	Clon del anterior. Colonia 4-3. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5 Mut19 Dig. SalI Col 42-1	Genoteca realizada sobre el Mut19. Idéntico protocolo que el resto. Colonia 42-1. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5 Mut19 Dig. Sall Col 42-3	Clon del anterior. Colonia 42-3. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5 Mut19 Dig. Sall Col 46-1	Clon del anterior. Colonia 46-1. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5 Mut20 Dig. SalI Col 12-1	Genoteca realizada sobre el Mut20. Idéntico protocolo que el resto. Colonia 12-1. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5 Mut20 Dig. Sall Col 41-2	Clon del anterior. Colonia 41 -2. Gtm ^r .	Este estudio

pJQTn5 Mut22 Dig. BamHI Col 3-3	Genoteca sobre el Mut22. Colonia 3-3. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5 Mut23 Dig. BamHI Col 6-1	Genoteca sobre el Mut23. Idéntico protocolo. Colonia 6-2. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5 Mut24 Dig. BamHI Col 11-5	Genoteca realizada sobre el Mut24. Idéntico protocolo. Colonia 11-5. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5 Mut25 Dig. BamHI Col 8-1	Genoteca llevada a cabo sobre el Mut25. Protocolo habitual. Colonia 8-1. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5 Mut26 Dig. BamHI Col 4-1	Genoteca llevada a cabo sobre el Mut26. Protocolo habitual. Colonia 4-1. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5 Mut26 Dig. BamHI Col 5-1	Clon del anterior. Colonia 5-1. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5 Mut27 Dig. BamHI Col 2-19	Genoteca sobre el Mut27, realizada con el método del "brazo del Tn5". Colonia 2-19. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5 Mut27 Dig. BamHI Col 3-1	Clon del anterior. Colonia 3-1. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5 Mut 29 Dig. BamHI Col 9-1	Genoteca sobre el Mut29. Procedimiento habitual. Colonia 9-1. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5 Mut 30 Dig. BamHI Col 2-1	Genoteca sobre el Mut30. Procedimiento habitual. Colonia 2-1. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5 Mut 31 Dig. BamHI Col 4-2	Genoteca sobre el Mut31. Procedimiento habitual. Colonia 4-2. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5 Mut32 Dig. BamHI Col 5-1	Genoteca sobre el Mut32. Procedimiento habitual. Colonia 5-1. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5 Mut32 Dig. BamHI Col 5-2	Clon del anterior. Colonia 5-2. Gtm ^r .	Este estudio

pJQTn5 Mut33 Dig. BamHI Col 6-1	Genoteca realizada sobre el Mut33. Procedimiento habitual, mediante el "brazo del Tn5". Colonia 6-1. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5 Mut33 Dig. BamHI Col 6-3	Clon del anterior. Colonia 6-3. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5 Mut34 Dig. BamHI Col 2-1	Genoteca sobre el Mut34. Procedimiento habitual. Colonia 2-1. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5 Mut36 Dig. Sall Col 18-2	Genoteca sobre el Mut36. Procedimiento habitual. Colonia 18-2. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5 Mut37 Dig. BamHI Col 1-1	Genoteca sobre el Mut36. Protocolo habitual. Colonia 1-1. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5 Mut37 Dig. BamHI Col 1-2	Clon del anterior. Colonia 1-2. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5 Mut38 Dig. BamHI Col 1-1	Genoteca sobre el Mut38. Protocolo habitual. Colonia 1-1. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5 Mut38 Dig. BamHI Col 1-2	Clon del anterior. Colonia 1-2. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5 Mut39 Dig. XbaI Col 3-1	Genoteca llevada a cabo en el Mut39 mediante el protocolo habitual de para todas ellas: "brazo del Tn5". Colonia 3-1. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5 Mut40 Dig. BamHI Col 1-1	Genoteca realizada sobre el Mut40. Procedimiento habitual, mediante el "brazo del Tn5". Colonia 1-1. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5 Mut41 Dig. BamHI Col 3-1	Genoteca realizada sobre el Mut41. Procedimiento habitual, mediante el "brazo del Tn5". Colonia 3-1. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5 Mut41 Dig. BamHI Col 3-2	Clon del anterior. Colonia 3-2. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5 Mut42 Dig. Sall Col 4-1	Genoteca sobre el Mut42. Protocolo habitual. Colonia 4-1. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5 Mut42 Dig. Sall Col 4-2	Clon del anterior. Colonia 4-2. Gtm ^r .	Este estudio

pJQTn5 Mut42 Dig. SalI Col 5-1	Clon del anterior. Colonia 5-1. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5 Mut43 Dig. BamHI Col 1-1	Genoteca sobre el Mut43. Procedimiento habitual. Colonia 3-1. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5 Mut43 Dig. BamHI Col 3-1	Clon del anterior. Colonia 3-1. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5 Mut44 Dig. BamHI Col 5-2	Genoteca realizada sobre el Mut44. Procedimiento habitual, mediante el "brazo del Tn5". Colonia 5-2. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5 Mut47 Dig. BamHI Col 1-2	Genoteca sobre el Mut47. Procedimiento habitual. Colonia 1-2. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5 Mut47 Dig. BamHI Col 4-1	Clon del anterior. Colonia 4-1. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5 Mut48 Dig. BamHI Col 2-5	Genoteca sobre el Mut48. Procedimiento habitual. Colonia 2-5. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5 Mut49 Dig. BamHI Col 3-1	Genoteca sobre el Mut49. Procedimiento habitual. Colonia 3-1. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5 Mut49 Dig. BamHI Col 3-2	Clon del anterior. Colonia 3-2. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5 Mut49 Dig. BamHI Col 3-3	Clon del anterior. Colonia 3-3. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5 Mut50 Dig. BamHI Col 3-1	Genoteca sobre el Mut50. Protocolo habitual. Colonia 3-1. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5 Mut50 Dig. BamHI Col 3-2	Clon del anterior. Colonia 3-2. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5 Mut51 Dig. BamHI Col 4-1	Genoteca sobre el Mut51. Procedimiento habitual. Colonia 4-1. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5 Mut51 Dig. BamHI Col 4-2	Clon del anterior. Colonia 4-2. Gtm ^r .	Este estudio

pJQTn5 Mut51 Dig. BamHI Col 4-3	Clon del anterior. Colonia 4-3. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5 Mut52 Dig. BamHI Col 2-1	Genoteca sobre el Mut52. Procedimiento habitual. Colonia 2-1. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5 Mut52 Dig. BamHI Col 2-2	Clon del anterior. Colonia 2-2. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5 Mut52 Dig. BamHI Col 2-3	Clon del anterior. Colonia 2-3. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5 Mut52 Dig. BamHI Col 2-4	Clon del anterior. Colonia 2-4. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5 Mut53 Dig. BamHI Col 3-1	Genoteca realizada sobre el Mut53. Procedimiento habitual, mediante el "brazo del Tn5". Colonia 3-1. Gtm ^r .	Este estudio
pJQTn5 Mut53 Dig. BamHI Col 3-2	Clon del anterior. Colonia 3-2. Gtm ^r .	Este estudio
pG Tn5-2/21MS1 Col 3-2	Cepa de <i>E. coli</i> DH10B, hospedadora de un pGEM [®] -T easy en cuyo interior se encuentra clonado el producto de pCR correspondiente a parte del gen interrumpido que codifica para la Malato Sintasa. Dicha PCR se realizó sobre genómico de la DOC21 y con los <i>primers</i> Tn5-2 y 21MS1. Colonia 3-2. Ap ^r .	Este estudio
pG Tn5-2/21MS2 Col 4-2	Igual al anterior, pero es el otro fragmento de la Malato Sintasa. <i>Primers</i> Tn5-2 y 21MS2. Colonia 4-2. Ap ^r .	Este estudio
pG MQO DNA DOC21 Col1	 <i>E. coli</i> DH10B con el plásmido pGEM[®]-T easy y clonado en él, el gen codificante para la Malato Quinona Oxidoreductasa. Amplificado sobre genómico de la DOC21. <i>Primers</i> DOC21 MQOXhoI y DOC21 MQOSacI. Colonia 1. Ap^r. 	Este estudio
pG MQO DNA DOC21 Col10	Clon del anterior. Colonia 10. Ap ^r .	Este estudio
pMC MQO DNA DOC21 Col6	Construcción anterior clonada en el pMC gracias a los cortes enzimáticos de los <i>primers</i> . Colonia 6. Tc ^r .	Este estudio
--	--	--------------
pMC MQO DNA DOC21 Col12	Clon del anterior. Colonia 12. Tc ^r .	Este estudio
pMC DOC21Mut1-Ox ₂ Col1	Mutante 1 al que se le ha introducido en <i>"trans</i> " el gen de dioxigenasa clonado en el pMC (previamente clonado en pG). Colonia 1. Ap Km Tc ^r .	Este estudio
pMC DOC21Mut1-Ox ₂ Col19	Clon del anterior. Colonia 19. Ap Km Tc ^r .	Este estudio
DOC21-Helper-pMC Col 1	Der-pMC Col 1 Cepa de <i>P. putida</i> DOC21 a la que mediante conjugación triparental se la ha introducido el plásmido pMC. Colonia 1. Ap^{r} , Tc ^r .	
DOC21-Helper-pMC Col 2	Clon del anterior. Colonia 2. Ap ^r , Tc ^r .	Este estudio
DOC21Mut9-Helper-pMC Col1	Mutante 9 de la DOC21, al que se le ha introducido mediante conjugación triparental el plásmido pMC. Colonia 1. Ap ^r , Km ^r , Tc ^r .	Este estudio
DOC21Mut9-Helper-pMC Col4	Clon del anterior. Colonia 4. Ap ^r , Km ^r , Tc ^r .	Este estudio
DOC21Mut9-pMC MQO Col8	Mutante 9 de la DOC21, con el pMC en su interior y en éste se encuentra clonado el gen que codifica para la MQO. Colonia 8. Ap ^r , Km ^r , Tc ^r .	Este estudio
DOC21Mut9-pMC MQO Col44	Clon del anterior. Colonia 44. Ap ^r , Km ^r , Tc ^r .	Este estudio
DOC21Mut9-pMC MQO Col5	Clon del anterior, pero es la colonia 6 del pMC con el gen inserto en su interior, y la colonia 5 de la transformación. Ap ^r , Km ^r , Tc ^r .	Este estudio
DOC21Mut9-pMC MQO Col36	Clon del anterior. Colonia 36 de la transformación. Ap ^r , Km ^r , Tc ^r .	Este estudio

pG Ox ₂ Col 1	<i>E. coli</i> DH10B en cuyo interior se halla el pG con el gen de la Dioxigenasa de apertura en <i>meta</i> clonado. Colonia 1. Ap^{r} .	Este estudio
pG Ox ₂ Col 2	Clon del anterior. Colonia 2. Ap ^r .	Este estudio
pG Ox ₃	Igual a los anteriores, pero con la mutación de un nucleótido en la dioxigenasa. Ap ^r .	Este estudio
pG 3-cetoácil-CoA transf. Sub-β Col8	<i>E. coli</i> DH10B en cuyo interior se halla el pG con la subunidad β del gen de la 3-cetoacil-CoA transferasa clonado. Colonia 8. Ap ^r .	Este estudio
pG 3-cetoácil-CoA transf. Sub-β Col9	Clon del anterior. Colonia 9. Ap ^r .	Este estudio
pG 3-cetoácil-CoA transf. Sub-α Col2E. coli DH10B en cuyo interior se halla el pG con la subunidad α del gen de la 3- cetoacil-CoA transferasa clonado. Colonia 2. Ap ^r .		Este estudio
pG 3-cetoacil-CoA transf. Sub-α Col3	Clon del anterior. Colonia 3. Ap ^r .	Este estudio
pMC Ox ₂ Col1	Gen de la dioxigenasa clonado en el plásmido pMC. Previamente clonado en pG. Colonia 1. Tc ^r .	Este estudio
pMC Ox ₂ Col4	Igual al anterior. Colonia 4. Tc ^r .	Este estudio
pMC 3-cetoacil-CoA transf. Sub β Col4	<i>E. coli</i> DH10B en cuyo interior se halla el pMC con la subunidad β del gen de la 3-cetoacil-CoA transferasa clonado. Previamente clonado en pG. Colonia 4. Tc ^r .	Este estudio
pG 3-cetoácido-CoA transf. Subs αβ Col3	<i>E. coli</i> DH10B en cuyo interior se halla el pG con la subunidades α y β del gen de la 3-cetoacil-CoA transferasa clonado. Colonia 3. Ap ^r .	Este estudio
pG 3-cetoácido-CoA transf. Subs αβ Col5	Clon del anterior. Colonia 5. Amp ^r .	Este estudio
pMC 3-cetoácido-CoA transf. Subs αβ Col2	<i>E. coli</i> DH10B en cuyo interior se halla el pMC con la subunidades α y β del gen de la 3-cetoacil-CoA transferasa clonados mediante los cortes XhoI-XbaI. Previamente fue clonado en el plásmido pG. Colonia 2. Tc ^r .	Este estudio

pMC 3-cetoácido-CoA transf. Subs αβ Col6	Clon del anterior. Colonia 6 de la transformación. Tc ^r .	Este estudio
pG Acil-CoA lig 3 DNA DOC21 Col1-1	Cepa de <i>E. coli</i> DH10B, con el gen de la Acil-CoA ligasa 3 en su interior clonado en el pG. Dicho gen fue amplificado con los <i>primers</i> DCD5PstI y DCD3XbaI. Colonia 1-1. Ap ^r .	Este estudio
pG Acil-CoA lig 3 DNA DOC21 Col1-4	Clon del anterior. Colonia 1-4. Ap ^r .	Este estudio
pG Metaloproteasa DNA DOC21 Col7-7	Cepa de <i>E. coli</i> DH10B, con el gen de la Metaloproteasa en su interior clonado en el pG. Dicho gen fue amplificado con los <i>primers</i> DCF5XhoI y DCF3XbaI. Colonia 7-7. Ap ^r .	Este estudio
pG Enoil-CoA hidratasa DNA DOC21 Col8-14 Cepa de <i>E. coli</i> DH10B, con el gen de Enoil-CoA hidratasa su interior clonado el pG. Dicho gen fue amplificado con <i>primers</i> DCA5XhoI y DCA3XbaI. Colo 8-14 Ap ^r .		Este estudio
pMC 3-cetoácido-CoA transf. Sub. α Col1	Cepa de <i>E. coli</i> DH10B, que contiene la subunidad α del gen de la 3-cetoácido-CoA. Se ha introducido en <i>trans</i> clonado en el pMC. Previamente clonado en pG. Colonia 1. Tc ^r .	Este estudio
pMC 3-cetoácido-CoA transf. Sub. α Col2	Clon del anterior. Colonia 2. Tc ^r .	Este estudio
pG pCR 9 (diox. DOC19) Col1	Cepa de <i>E. coli</i> DH10B a la que se le ha introducido el gen de la dioxigenasa en <i>trans</i> , previamente amplificado sobre la DOC19 y clonado en el pG. Colonia 1. Ap ^r .	Este estudio
pG pCR 9 (diox. DOC19) Col2	Clon del anterior. Colonia 2. Ap ^r .	Este estudio
pJQ pCR Acil-CoA ligasa TesHI Col1	Cepa de <i>E.coli</i> , en cuyo interior se encuentra alojado el plásmido pJQ 200SK y en éste se halla clonado el gen de la Acil- CoA ligasa TesHI delecionado. Previamente clonado en pG. La deleción se llevó a cabo con los <i>primers</i> LigTesHI1, LigTesHI2, LigTesHI3 y LigTesHI4. Colonia 1. Gtm ^r .	Este estudio

pJQ pCR Acil-CoA ligasa TesHI Col4	Clon del anterior. Colonia 4. Gtm ^r .	Este estudio
pJQ pCR Acil-CoA ligasa Lig Col2	Cepa de <i>E.coli</i> , en cuyo interior se encuentra alojado el plásmido pJQ 200SK y en éste se halla clonado el gen de la Acil- CoA ligasa Lig delecionado. Previamente clonado en pG. La deleción se llevó a cabo con los <i>primers</i> Lig1, Lig2, Lig3 y Lig4. Colonia 2. Gtm ^r .	Este estudio
pJQ pCR Acil-CoA ligasa Lig Col9	il-CoA ligasa Col9 Clon del anterior. Colonia 9. Gtm ^r .	
pJQ pCR pG Col13 Cepa de <i>E.coli</i> , en cuyo interior se encuentra alojado el plásmido pJQ 200SK y en éste se halla clonado el gen de la Acil- CoA ligasa DCD delecionado. Previamente clonado en pG. La deleción se llevó a cabo con los <i>primers</i> DCD5PstI(2), DCDBHI1, DCD3XbaI(2) y DCDBHI2. Colonia 13. Gtm ^r .		Este estudio

4. Tablas con oligonucleótidos diseñados y utilizados utilizados durante la realización de esta Tesis Doctoral.

Con el objetivo de caracterizar las cepas a estudio, tanto los aislados COL como los DOC, se realizaron análisis del rDNA 16S de todas estas cepas y además se analizó el gen *rpo*B en el caso de las cepas DOC. Para ello se emplearon los oligonucleótidos 6F y 1510R para el rDNA 16S y los oligos LAPS5 y LAPS27 para el gen *rpoB* (Tabla 39).

Tabla 39. Oligonucleótidos empleados en la caracterización genética de las cepas COL y DOC utilizadas en esta Tesis Doctoral. Además de su secuencia, se indican las tamaños de la amplificación en cada caso y el DNA diana.

	Nombre	Secuencia (5'→3')	Tamaño amplicón	DNA diana
	6F	GGAGAGTTAGATCTTGGCTCAG		
s			~ 1450 pb	rDNA 16S
ıəı	1510R	GTGCTGCAGGGTTACCTTGTTACGACT		
rin	LAPS5	TGGCCGAGAACCAGTTCCGCGT		
μ			~ 1240 pb	Gen <i>rpoB</i>
	LAPS27	CGGCTTCGTCCAGCTTGTTCAG	•	-

Para obtener la secuencia completa del gen que codifica para la dioxigenasa de apertura en *meta* se realizó una PCR, utilizando DNA de la cepa silvestre (DOC21) como diana y los oligonucleótidos DES6 y DCB5*Xho*I (Tabla 40).

Tabla 40. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación completa del gen de la dioxigenasa de apertura en *meta* del anillo A del núcleo del ciclopentanoperhidrofenantreno. En azul se encuentran marcados los cortes enzimáticos presentes en ambos oligos.

	Nombre	Secuencia (5'→3')	Tamaño amplicón	DNA diana
	DES6	GGGTCGGCAGGAACGGC		
Oligos	DCB 5XhoI	CGG <mark>CTCGAG</mark> CCATCGAGGAACAGGGGCATGATC	~1280 pb ~950 pb	Gen dioxigenasa
	DCB 3XbaI	CCG <mark>TCTAGA</mark> GTTGTTTGTTCATGTCAGGCTCCTTGC	r Pa	

La secuenciación y caracterización de los genes implicados en la degradación de compuestos de naturaleza esteroidea en la cepa *Pseudomonas putida* DOC21, se llevó cabo mediante el diseño de una serie de oligonucleótidos sobre secuencia ya conocida y obtenida gracias a los mutantes originados mediante el proceso de conjugación triparental (Materiales y Métodos -Apdo 12-). Estos oligos se utilizaron en diferentes construcciones en las que o bien se había clonado en fragmento de DNA a secuenciar, o eran productos de PCR amplificados y secuenciados directamente (Tabla 41).

 Tabla 41. Oligonucleótidos diseñados y construcciones empleadas para secuenciar la ruta catabólica de compuestos esteroideos en la DOC21.

Oligonucleótido (primer)	Secuencia (5'→3')	Construcción en la que se ha utilizado
Cor1	CGTCATCACCGTCGCCTGCTCAAC	pG DNA DOC21 Col 4/Col 16/Col 22/Col 23
Cor2	CATTCCCGGGCTCCTGTGACGTG	pG DNA DOC21 Col 1/Col 3/Col 25
Cor3	GTTGCGCGCGGCTGCGGCAGCAC	pG DNA DOC21 Col 1/Col 3/Col 25
Cor4	GGGTCGGGGGCACTGGGCTTGAGGTTG	pG DNA DOC21 Col 29/Col 31
Cor5	GCCGGCGAGAATCGCCCGTTCG	pG DNA DOC21 Col 29/Col 31
Cor4'	GGGCTTGAGGTTGTGCGGCGGC	pG DNA DOC21 Col 1/Col 4/Col28
Cor5'	CCGGCGTTCACCTGGAAGTAAAACTGTG	pG DNA DOC21 Col 1/Col 4/Col 28
Cor6	CGCGAGCGTTTCGGCATCCAGGACG	Prod. pCR Cor6-Cor7
Cor7	GGGGTATTCGGGCTCGTCGGCGGC	Prod. pCR Cor6-Cor7
Cor35a	CCAGAGCGGCAGCAACAACCAGAGC	pG DNA DOC21 Col 1/Col 20

Cor35b	GACCCAGCCCAGTTCGCCGCAGTTG	pG DNA DOC21 Col 1/Col 20	
Cor46	GTGATCCTTGAGCAGCACGGC	Doc21 Mut38-PJQ Tn5 Col 1-1/ Col1-2 Dig. BamHI	
Cor47	CAATTGGCATGTATGGCGCAG	Doc21 Mut38-PJQ Tn5 Col 1-1/ Col1-2 Dig. BamHI	
Cor48	GGCTCATCTACGGTTTCCTTTTTGTTTTCTTTGGG	Doc21 Mut53-PJQ Tn5 Col 3- 1/Col 3-2 Dig. BamHI	
Cor49	GGCGGATGTGCGGGTGGTGGGTAGTC	Doc21 Mut53-PJQ Tn5 Col 3- 1/Col 3-2 Dig. BamHI	
Quin1	CATCGTGGTCGGGGGGGGTTCC	Doc21 Mut53-PJQ Tn5 Col 3-2 Dig. BamHI	
Quin2	GCAATTGACCGCCCAGCCGTG	Doc21 Mut53-PJQ Tn5 Col 3-2 Dig. BamHI	
Quin3	GACCCGCGCCATCGTCACCCGTTGAG	Doc21 Mut53-PJQ Tn5 Col 3-2 Dig. BamHI	
Quin4	GCGCGCCCTGAAATCCACACTGGCG	Doc21 Mut53-PJQ Tn5 Col 3-2 Dig. BamHI	
Quin5	CGGGCACGGCATTTCCATCAACC	Doc21 Mut53-PJQ Tn5 Col 3-2 Dig. BamHI	
Quin6	GATCGATGCGTCAGCCACCCG	Doc21 Mut53-PJQ Tn5 Col 3-2 Dig. BamHI	
Quin7	GGCGCCGTAGGAGCGGGTTTACC	Doc21 Mut53-PJQ Tn5 Col 3-2 Dig. BamHI	
21DOC987	CCCGTTGCCGAAGACATTCCCGAGG	pCR (2) DNA DOC21 21DOC987-21DOC988	
21DOC988	GGGCTCGGGCAACGGTGTCAGGG	pCR (2) DNA DOC21 21DOC987-21DOC988	
21DOC987	CCCGTTGCCGAAGACATTCCCGAGG	Prod. pCR 21DOC987- 21DOC988 DNA DOC21	
21DOC988	GGGCTCGGGCAACGGTGTCAGGG	Prod. pCR 21DOC987- 21DOC988 DNA DOC21	
21DOC142	GGCCGGGGCTACCGAGGTCAATGC	Prod. pCR 21DOC990- 21DOC142 DNA DOC21	
21DOC990	TCTTCAGGAACAGCGTGCCGGTATGG	Prod. pCR 21DOC990- 21DOC142 DNA DOC21	
21DOC993	CGTAATAGTCACCGTCCGGAGTCTTGGCG	Prod. pCR 21DOC993- 21DOC994 DNA DOC21	
21DOC994	CGCACCTGAATTGGTTTAGCATCACGGC	Prod. pCR 21DOC993- 21DOC994 DNA DOC21	
21DOC129	TGCTGGATGAGTGGATACGGCGAAGG	Prod. pCR 21DOC129- 21DOC132/21DOC133 DNA DOC21	
21DOC132	TCTCAACGAAGGCAAATACACCCCGGAC	Prod. pCR 21DOC132- 21DOC129/21DOC134 DNA DOC21	
21DOC133	GCCGACCTCAATCCCCACCCTC	Prod. pCR 21DOC133- 21DOC129/21DOC134 DNA DOC21	
21DOC134	CTATTTCGGCTTATCTCAGGCTCCCC	Prod. pCR 21DOC134- 21DOC132/21DOC133 DNA DOC21	
21DOC135	CCTGCTCGCCCGTGCCTGGTATC	Prod. pCR 21DOC135- 21DOC136 DNA DOC21	

21DOC136	CACCTGCAGAAAGTAGTCCTCGTTGTCG Prod. pCR 21DOC13 21DOC136 DNA DOC	
21DOC137	CGCAGCCGCCGTCGCCATCAGC	Prod. pCR 21DOC137- 21DOC138 DNA DOC21
21DOC138	GATCGATGAAGGTCGGCAGCAGGTT	Prod. pCR 21DOC137- 21DOC138 DNA DOC21
21DOC141	CGTCCGTGGCTGGCAATCGC	pG DNA DOC21 Col 5/Col 24
21DOC142	GGCCGGGGCTACCGAGGTCAATGC	pG DNA DOC21 Col 5/Col 24
21DOC143	GGGCTCGGGCAACGGTGTCAGGG	pG DNA DOC21 Col 1/Col 3/Col 4
21DOC144	GCTGCTTGCTTCGAATATCCGG	pG DNA DOC21 Col 1/Col 3/Col 4
21DOC145	TTTGGCGAGACCGAAGGCATC	pG DNA DOC21 Col 18/Col 20
21DOC146	GATGATCAGCCCGGTACGTTCG	pG DNA DOC21 Col 18/Col 20
21DOC147	CCCCGCCGCCAACACCAGCAACG	pG DNA DOC21 Col 2/Col 24
21DOC148	CAAGAACCGGAGCAGCCCAGTG	pG DNA DOC21 Col 2/Col 24
21DOC984	CGCCGGCCACCCACTGACCCGCC	pG DNA DOC21 Col 4/Col 16/Col 22/Col 23
21DOC985	GCGCGCACACCAGGTCGAGCACATG	pG DNA DOC21 Col 12/Col 30
21DOC986	CCAATACTTCCTTCCAGCGTGCGCAGTACC	pG DNA DOC21 Col 12/Col 30
21DOC987	CCCGTTGCCGAAGACATTCCCGAGG	pG DNA DOC21 Col 1/Col 33
21DOC988	GGGCTCGGGCAACGGTGTCAGGG	pG DNA DOC21 Col 1/Col 33
21DOC989	GCGGTGCAGGATCAGTTTTATGGCGAC	pG DNA DOC21 Col 22 (1)/Col 22 (2)
21DOC990	TCTTCAGGAACAGCGTGCCGGTATGG	pG DNA DOC21 Col 22 (1)/Col 22 (2)
21DOC991	CACCGTCGTCATGGCTTGCTGCTCG	pG DNA DOC21 Col 2/Col 17
21DOC992	CGGCCACGTACTTGCGGAAGGTGTC	pG DNA DOC21 Col 2/Col 17
0024L	GCTGGAGACCGATGCGCCCGATATG	pCR 0024L-0024R DNA DOC21
0024R	CAGCAGATTGCGGCAGCGGTTGAACA	pCR 0024L-0024R DNA DOC21
0024L	GCTGGAGACCGATGCGCCCGATATG	pG DNA DOC21 Col 2 (1)/Col 2 (2)/Col 6 (1)/Col 6 (2)
0024R	CAGCAGATTGCGGCAGCGGTTGAACA	pG DNA DOC21 Col 2 (1)/Col 2 (2)/Col 6 (1)/Col 6 (2)

Además de estos *primers* y construcciones, se diseñaron entre otros, los siguientes oligonucleótidos para ser utilizados en distintas zonas del genoma de *Pseudomonas putida* DOC21 a fin de resolver otros puntos de indeterminación existentes en el mismo (Tabla 42).

Oligo (primer)	Secuencia (5'→3')	Oligo (primer)	Secuencia (5'→3')
Cor8	GCGCTTCAAGGAACTGACCCTGC	Cor27	CCGGCGCTATGGCAAGGGCACCC
Cor9	CGGGGTCGGTGTTCGGAGAGTCGC	Cor28	GGCCGCCGATGATGCTGCTGCTCC
Cor10	CCTGATCACCGAGTTCAACCGCCTCAG	Cor29	CGAACACCTGCCCGACACCTTGCTGG
Cor11	CCAGGGCTCGGCGGTCACGGCGG	Cor30	CCTGCCCCGGTTTGCTGCCCAG
Cor12	CCGGCCGTGCAAGGCCCGACGC	Cor31	CCCAGTTCATCCAGTCCATCGCCG
Cor13	GTTGCTGGAGGTCTGCTGCGGCGTGTAG	Cor32	GGCCAGCTCCAGCGACGAAGTGC
Cor14	CGGCGGCGAGCATTACACCCAGTC	Cor33	CGGCGATCCTGAAGGCAACCTGC
Cor15	GCAGCGGCCAGCAGGGTTTTCAGCGG	Cor34	GGCCGGCAACTACAACAACGCGACC
Cor16	CGGCCGAGTGCTGGATGCCAGTACCC	Cor35	CGCCTCGATCCAGCAGTTCGGCAGCGGC
Cor17	GGGCCTTGAAGTAGGGCAGCAGGGC	Cor36	CATGCAACGAAGAAGACGGTAGAGGCTG
Cor18	CGCGCCGAAGGCATCCGTCGCC	Cor37	GCGCCGACCGCCATCACCCACGCC
Cor19	CCATGGTCTGCCGGGCTTTGTTCG	Cor38	GCCGGGCAAATCCTCTCCTTCATCACC
Cor20	GGCCACCGCCCGCAAAGCCGAC	Cor39	GCTGAAAGCCCTGCCGCGCCCGCTCTAC
Cor21	CCGGAATCACCCAGGTCCAGCCCGCC	Cor40	CCGCGAGCAAACCGAGGACACCCG
Cor22	GGCCAGCAGCATCCAGGACTTC	Cor41	CCTGATCAACCTCGCCACCCACACCTCC
Cor23	GCCGGCAGGCTGGAGCGGTTCCAG	Cor42	GCGACAACAACAAGTGGTGCTGGTG
Cor24	GGGTTGCGCACAATGGCTGTTCATCAG	Cor43	GCCGGACCCTGTGCGAACTGATGG
Cor25	CGAGGTACCGACCAGCGCCACGTTCGG	Cor44	CATGCCCGATGCTGCCCCTGCG
Cor26	CCGGCAGATTCATCGACTCCAGC	Cor45	GCCTGTGGGAAATCAACGAAGCC

Tabla 42. Oligos diseñados para la corrección de indeterminaciones en la secuencia de DNA genómico de la DOC21.

Se realizaron multitud de PCR's, con el objetivo de descifrar regiones del genoma desconocidas situadas entre los *contigs* obtenidos mediante la secuenciación del mismo. También se amplificaron dentro de dichos *contigs* zonas de indeterminaciones para su resolución.

Todas estas amplificaciones se clonaron en uno de estos dos plásmidos comerciales, el pGEM[®]-T Easy o el pTZ57R/T, ambos prácticamente iguales (Materiales y Métodos) Para leer el inserto clonado, todos los plásmidos poseen oligos universales propios, ubicados por parejas (directo-F- y reverso-R-), con los que se puede identificar el inserto clonado (Tabla 43).

ApéndiceIII

Tabla 43. Oligos universales F17, R19, F24 y R24. Con ellos se leen las secuencias de DNA correspondientes a los insertos clonados en todos los plásmidos utilizados en esta Tesis Doctoral. Todos estos vectores utilizan el F24 y el R24, salvo en el caso del pGEM[®]-T Easy y en el del pTZ57R/T que utilizan el F17 y el R19. Además, en ocasiones se utilizó el Tn5-2 (oligo interno del propio Tn5-2) para leer secuencias de DNA, de insertos clonados en un plásmido a continuación del Tn5.

	Nombre	Secuencia
	F17	GTAAAACGACGGCCAGT
S	F24	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC
Oligo	R19	GGAAACAGCTATGACCATG
	R24	AGCGGATAACAATTTCACACAGGA
	Tn5-2	CCGCCGAAGAGAACAGGC