



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 176 082**

② Número de solicitud: 200001387

⑤ Int. Cl.⁷: C12N 1/21

C07K 14/825

C02F 1/28

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **31.05.2000**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.11.2002**

Fecha de concesión: **01.12.2003**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **01.01.2004**

⑮ Fecha de publicación del folleto de patente:
01.01.2004

⑰ Titular/es:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES
Universidad de Barcelona**

⑱ Inventor/es: **Lorenzo Prieto, Víctor de;
Fernández Herrero, Luis Angel;
Atrian Ventura, Silvia y
Valls Matheu, Marc**

⑳ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Bacterias con la capacidad de unir metales pesados y su empleo en la detoxificación de medios contaminados con metales pesados.**

㉑ Resumen:

Bacterias con la capacidad de unir metales pesados y su empleo en la detoxificación de medios contaminados con metales pesados.

La bacteria con capacidad de unir metales pesados es una bacteria adaptada al suelo y resistente a metales pesados, bien de forma natural o mediante manipulación genética, y ha sido modificada para expresar en su superficie, al menos, una proteína o una secuencia peptídica con la capacidad de unir uno o más metales pesados. En una realización particular, la bacteria adaptada al suelo y resistente, de forma natural, a metales pesados es *Ralstonia eutropha*, y la proteína capaz de unir uno o más metales pesados es una metalotioneína de un medio, sólido o líquido, contaminado con metales pesados.

ES 2 176 082 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCION

Bacterias con la capacidad de unir metales pesados y su empleo en la detoxificación de medios contaminados con metales pesados.

5 Campo de la invención

Esta invención se refiere al desarrollo de bacterias con una elevada capacidad de unir metales pesados en su superficie y a su empleo en la recuperación de suelos y/o medios líquidos contaminados con metales pesados. Las bacterias, adaptadas al suelo y resistentes a metales pesados, bien de forma natural o mediante manipulación genética, han sido modificadas para producir en su superficie una proteína, o una secuencia peptídica, con capacidad de unir metales pesados.

Antecedentes de la invención

15 Bajo la denominación de metales pesados se incluyen una serie de metales y metaloides de la Tabla Periódica de elementos con propiedades metálicas y potencialmente tóxicos. Entre ellos, Ag, As, Bi, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Pd, Pt, Te, Tl, Sb, Se, Sn y Zn son considerados elementos de carácter tóxico.

20 El desarrollo de actividades humanas directas o indirectas está incrementando significativamente los contenidos de metales pesados en los suelos. La contaminación del suelo con metales pesados puede aparecer como resultado de actividades de todo tipo: industriales, agrícolas o de servicios. El vertido incontrolado de residuos, las fugas accidentales de depósitos y tuberías enterradas, la práctica de operaciones industriales sobre suelos mal protegidos, la aplicación de fertilizantes y pesticidas, la incorporación de residuos urbanos e industriales, los riegos con efluentes de bajo nivel de calidad, constituyen el origen de un elevado porcentaje de los suelos contaminados.

25 Diversas vías de migración de los contaminantes presentes en el suelo (infiltración, escorrentía, etc.), pueden provocar la extensión del problema a otros medios, por ejemplo, aguas subterráneas y superficiales, con el consiguiente riesgo para la salud (humana y animal), la producción agrícola y los ecosistemas.

30 El aumento del potencial de acumulación de metales pesados de las bacterias que residen en sitios contaminados o en los residuos, es una estrategia atractiva para contrarrestar el efecto tóxico de los iones presentes en bajas concentraciones y que no se pueden controlar con tratamientos físico-químicos [Gadd et al., (1993)]. Esto es especialmente atractivo para la contaminación residual a largo plazo que permanece después de la limpieza mecánica del suelo afectado por los vertidos de residuos mineros [Grimalt et al., (1999); Summers, A.O., (1992)].

35 Por consiguiente, es necesario, por una parte, prevenir la aparición de nuevos focos de contaminación de aguas y suelos con metales pesados y, por otra parte, recuperar las aguas y suelos ya contaminados. Dentro de esta segunda vertiente de actuación, la recuperación de suelos contaminados utilizando un agente biológico [biorrecuperación] es una de las tecnologías más prometedoras.

Compendio de la invención

45 La invención se enfrenta con el problema de recuperar un medio, sólido o líquido, contaminado con uno o más metales pesados mediante el empleo de agentes biológicos.

50 La solución proporcionada por esta invención se basa en que los inventores han observado que mediante el anclaje de proteínas o secuencias peptídicas con la capacidad de unir metales pesados sobre la superficie de unas bacterias adaptadas al suelo y resistentes a metales pesados se puede recuperar eficientemente un medio contaminado con metales pesados. El Ejemplo 2 ilustra la adsorción de cadmio a partir de un medio líquido por la bacteria *Ralstonia eutropha* MTB proporcionada por esta invención, mientras que el Ejemplo 3 ilustra la capacidad de dicha bacteria para contrarrestar el efecto tóxico del cadmio en suelo.

55 Por tanto, un objeto de esta invención lo constituyen unas bacterias adaptadas al suelo y resistentes a metales pesados que contienen en su superficie una proteína, o una secuencia peptídica, con la capacidad de unir uno o más metales pesados. El empleo de dichas bacterias en la recuperación de un medio, sólido o líquido, contaminado con metales pesados constituye un objeto adicional de esta invención.

60 Otro objeto adicional de esta invención lo constituye un método para recuperar un suelo contaminado por metales pesados que comprende poner en contacto dichas bacterias con el suelo a recuperar.

Otro objeto adicional de esta invención lo constituye un método para tratar un efluente cargado con metales pesados, con el fin de reducir el contenido en metales pesados en dicho efluente, que comprende poner en contacto el efluente a tratar con dichas bacterias o, alternativamente, con biomasa no viable procedente de dichas bacterias, muertas, estando dicha biomasa unida a un soporte sólido.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra la estructura genética de pMT β -1 y la producción de MT β en *E. coli*. La Figura 1A muestra el esquema del plásmido pMT β -1 que contiene la fusión del gen *mtb*. Se indican el gen *lacI* y el promotor *lac* (*plac*). También está esbozada la estructura del dominio y la topología básica de la proteína MT β . Se muestran las localizaciones del péptido señal *pelB* (ss, no presentes en la proteína madura), el dominio MT, el péptido E-tag y el dominio β de la proteasa IgA de *Neisseria gonorrhoeae*. La Figura 1B muestra los resultados de la inmunodetección de proteínas procedentes de las fracciones solubles, de la membrana interna (MI) y membrana externa (ME) de las células de *E. coli* JCB570 (*wt*) y *E. coli* JCB571 (*dsbA*) que llevan el pMT β -1 e inducidas con IPTG. Se usó el anticuerpo monoclonal anti-E-tag para probar la presencia del híbrido MT β -1 (57 kDa) en los extractos de proteínas transferidas tras electroforesis SDS-PAGE. La Figura 1C muestra la presentación de MT β sobre la superficie de *E. coli*. La accesibilidad de la proteína MT β en células intactas (I), sometidas a choque osmótico (S) y lisadas (L) se probó utilizando un anticuerpo monoclonal anti-E-tag en un ELISA [véase el Ejemplo 1.5]. El control negativo incluyó las células isogénicas de *E. coli* desprovistas del plásmido pMT β -1.

La Figura 2 muestra la acumulación de Cd²⁺ por *E. coli* y *R. eutropha*. La cantidad de Cd²⁺ unido por las células bacterianas se determinó por espectroscopía de absorción atómica y está indicada en nmoles de Cd²⁺ por mg de masa celular seca. Los valores mostrados son el promedio de dos experimentos independientes usando muestras duplicadas en cada determinación de Cd. La Figura 2A muestra los resultados de las células de *E. coli* JCB570 (*wt*) y *E. coli* JCB571 (*dsbA*) transformadas con pMT β -1 (+), o no transformadas (-), inducidas con IPTG en medio MJS que contenía CdCl₂ 30 μ M. La Figura 2B recoge los resultados de la acumulación de Cd²⁺ por las cepas de *R. eutropha*. Los cultivos celulares de *R. eutropha* MTB y su cepa parental *R. eutropha* CH34 se indujeron con 3-metilbenzoato (3-MB) en medio MJS que contiene CdCl₂ 30 μ M (izquierda) o 300 μ M (derecha).

La Figura 3 muestra la estructura del transposón TnMT β -1 y la producción de MT β en *R. eutropha*. En la Figura 3A se indican los elementos genéticos dentro del TnMT β -1: el gen *mtb*, el gen de resistencia a kanamicina (Km), el gen *xylS* (que codifica para el activador transcripcional *XylS* del promotor *Pm*), el promotor *Pm* y los extremos I y O del mini-Tn5. La secuencia señal (ss) *pelB* del gen *mtb* también aparece señalada. La Figura 3B muestra los resultados de la inmunotransferencia de los extractos de proteínas de células enteras de *R. eutropha* MTB y su cepa control parental (CH34) ensayadas con el anticuerpo monoclonal anti-E-tag para detectar la presencia de la proteína MT β . El inductor del promotor *Pm*, 3-metil-benzoato (3-MB), se añadió (+) o no (-) al cultivo bacteriano. La Figura 3C muestra los resultados de la inmunodetección de proteínas, tras electroforesis SDS-PAGE y transferir, procedentes de las fracciones solubles, de la membrana interna (MI) y membrana externa (ME) de las células de *R. eutropha* MTB inducidas con 3-MB y ensayadas con el anticuerpo monoclonal anti-E-tag.

La Figura 4 muestra los resultados de la reparación de la toxicidad por Cd²⁺ sobre el crecimiento de las plantas con *R. eutropha* MTB. Se hicieron crecer plantas de semillero de 15 días de *N. bentamiana* durante 40 días en tierra control estéril (1), o en tierra inoculada con 10⁸ células de *R. eutropha* CH34/g (2), o 10⁸ células de *R. eutropha* MTB/g (3), crecidas previamente en medio MS que contenía citrato y 3-MB; la tierra control también se mezcló con el mismo medio [Figura 4A]. Figura 4B: se realizó el mismo procedimiento que el descrito para la Figura 4A pero en tierra que contenía 150 μ moles de Cd²⁺/kg. Se puede observar la toxicidad del Cd (compárense las Figuras 4A y 4B) y el efecto protector de *R. eutropha* MTB sobre el crecimiento de la planta (compárense las macetas 1 a 3).

Descripción detallada de la invención

La invención proporciona una bacteria con capacidad de unir metales pesados, en adelante bacteria de la invención, caracterizada porque es una bacteria adaptada al suelo y resistente a metales pesados y que contiene en su superficie una proteína, o una secuencia peptídica, con la capacidad de unir metales pesados.

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “bacteria adaptada al suelo y resistente a metales pesados” significa que la bacteria puede vivir en el suelo y que su crecimiento no se ve afectado

por la presencia de metales pesados en las concentraciones tóxicas para la mayoría de organismos y otras bacterias, e incluye tanto a bacterias adaptadas al suelo y resistentes, de forma natural, a metales pesados, es decir, cuyo hábitat natural es el suelo, como a bacterias adaptadas al suelo que han adquirido la resistencia a metales pesados por técnicas de ingeniería genética, por ejemplo, mediante transformación de una bacteria que naturalmente no es resistente a metales pesados con un sistema capaz de inducir resistencia a metales pesados. La resistencia a los metales pesados es debida principalmente a la presencia de sistemas de bombeo de metales pesados desde el citoplasma al medio externo. Gracias a estos mecanismos el metal pesado no se acumula en el interior de la bacteria. Entre las bacterias adaptadas al suelo y resistentes, de forma natural, a metales pesados se incluyen bacterias pertenecientes a los géneros de gram negativos *Ralstonia* y *Pseudomonas*, y *Bacillus* en gram positivos. En una realización particular, la bacteria de la invención procede de *Ralstonia eutropha* (anteriormente llamada *Alcaligenes eutrophus*) CH34, una cepa bacteriana que está adaptada para desarrollarse en suelos altamente contaminados con iones metálicos.

El término “metales pesados” tal como se utiliza en esta descripción incluye una serie de metales y metaloides de la Tabla Periódica de elementos con propiedades metálicas y potencialmente tóxicos. Entre los metales pesados de carácter tóxico se encuentran Ag, As, Bi, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Pd, Pt, Te, Tl, Sb, Se, Sn y Zn. En general, los metales pesados más significativos son Cd, Co, Cu, Hg, Ni, Pb y Zn. El término “metal pesado” incluye a cualquier forma química de dicho metal que puede estar presente en un medio sólido o líquido.

La proteína o secuencia peptídica debe unir al menos un metal pesado, incluyendo, pero no limitando, a Ag, As, Bi, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Pd, Pt, Te, Tl, Sb, Se, Sn y Zn, y sus formas químicas correspondientes. Ejemplos ilustrativos de proteínas con capacidad de unir uno o más metales pesados incluyen a las metalotioneínas y a las fitoquelatinas de las plantas. Las metalotioneínas (MT) son un grupo de proteínas de pequeño tamaño (aproximadamente 60 aminoácidos) ricas en cisteína, que están especializadas en la unión de metales pesados, por ejemplo, Zn^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , [Nordberg, M., (1998)]. Pueden encontrarse genes que codifican para MT en diferentes especies animales (por ejemplo, en ratón y en humanos), vegetales, y de hongos.

La secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína o secuencia peptídica con capacidad de unir uno o más metales pesados puede ser obtenida de cualquier fuente disponible, tanto natural como artificial. La secuencia de nucleótidos que codifica para dichas proteínas, o secuencia peptídica, puede ser aislada de su fuente natural mediante el empleo de las enzimas de restricción adecuadas o bien puede ser obtenida por técnicas de ADN recombinante o bien puede ser obtenida por técnicas sintéticas. También puede ser una forma polimérica de una secuencia de ADN que codifique para una proteína o secuencia peptídica con la capacidad de unir uno o más metales pesados, así como una variante en la que se han reemplazado unos codones por otros con el fin de codificar para aminoácidos que aumentan la afinidad de unión de metales pesados y/o para obtener proteínas o secuencias peptídicas que tienen afinidad por otros metales pesados distintos a los metales pesados por los que tiene afinidad la proteína o secuencia peptídica nativa.

Adicionalmente, el término “proteína o secuencia peptídica con capacidad de unir uno o más metales pesados” incluye no solo a las formas nativas y sintéticas sino, además, a derivados de las mismas, por ejemplo, productos de fusión de dichas proteína o secuencia peptídica y otra proteína o péptido que pueden proporcionar distintas funciones, por ejemplo, mejorar la estabilidad y/o actividad del agente bioadsorbente de metales pesados. En la patentes norteamericanas US 5.824.512 y US 5.965.796 se describen unas MT naturales, sintéticas y derivadas de las mismas, así como unas secuencias de unión a metales, respectivamente, que podrían ser utilizadas en la presente invención. otras proteínas y secuencias de unión a metales que pueden ser utilizadas en la presente invención han sido descritas por Klemba et al. (1995), Brown, (1997), y Bae & Mehra, (1997). En una realización particular, la proteína con capacidad para unir uno o más metales pesados presente en la superficie de la bacteria es una MT de ratón, concretamente la MT-I de ratón.

La bacteria adaptada al suelo y resistente a metales pesados que sirve de base para el desarrollo de la bacteria de la invención puede ser Gram positiva o Gram negativa. Cuando es Gram positiva, la proteína o secuencia peptídica con capacidad de unir uno o más metales pesados está unida sobre el peptidoglicano bien directamente o bien mediante elementos acopladores adecuados, tipo dominios de unión a peptidoglicano como los obtenidos de la proteína A de *Staphylococcus aureus* [Ståhl et al., (1997)]. Cuando la bacteria es Gram negativa, el anclaje de dicha proteína o secuencia peptídica con capacidad de unir uno o más metales pesados sobre la membrana externa puede realizarse mediante un sistema autotransportador o mediante cualquier otro sistema de anclaje a membrana externa, como por ejemplo

la maltoporina o el híbrido lpp-ompA [Valls et al., (1998)]. Los sistemas de anclaje deben permitir que la proteína o secuencia peptídica con capacidad de unión de uno o más metales pesados se manifieste sobre la superficie de la bacteria.

5 Los autotransportadores son una familia muy extendida de proteínas secretadas que se encuentran en bacterias Gram negativas y que son capaces de translocarse a través de la membrana externa sin ninguna maquinaria proteica auxiliar [Henderson et al., (1998)]. Su mecanismo de exportación, ejemplificado por primera vez por la proteasa IgA de *Neisseria gonorrhoeae* [Pohlner et al., (1987)], implica la producción de un precursor proteico grande que contiene un péptido señal N-terminal que dirige el transporte a través de la membrana interna (MI) en el periplasma. A esto le sigue la inserción en la membrana externa (ME) del dominio C-terminal de la proteína (el colaborador o dominio β) que, formando un barril β anfipático, permite al dominio N pasajero acompañante cruzar la ME [Klauser et al., (1993); Veiga et al., (1999)]. Mediante el uso de esta estrategia de secreción, y un vector mini-transposón para la integración cromosómica estable del ADN [de Lorenzo et al., (1994)] se ha construido una cepa recombinante de *R. eutropha* dotada de una mayor capacidad de adsorber Cd^{2+} del medio y que produce una reducción de la toxicidad biológica del metal en suelos contaminados.

Las bacterias proporcionadas por esta invención pueden obtenerse mediante el empleo de técnicas convencionales de ADN recombinante. Para ello, la secuencia que codifica para la proteína o secuencia peptídica con capacidad de unir uno o más metales pesados se clona en un vector de expresión tal como un plásmido. En una realización particular, se clona dicha secuencia codificante para la proteína o secuencia peptídica con capacidad de unir uno o más metales pesados en el vector de expresión de manera que se expresen como un producto de fusión con una proteína de la membrana celular o bien con un sistema de anclaje, tal como un autotransportador. El vector de expresión recombinante así obtenido se introduce, mediante métodos convencionales, en una bacteria adaptada al suelo y resistente a metales pesados, cuya resistencia a los metales pesados la ha adquirido bien de forma natural o bien mediante manipulación genética, capaz de expresar el producto de la secuencia de ADN codificante para la proteína o secuencia peptídica con capacidad de unir uno o más metales pesados. En una realización particular, se pueden insertar múltiples copias de distintos vectores de expresión proporcionados por esta invención en una única célula bacteriana. Las bacterias transformadas se someten a un proceso de inducción mediante el empleo de los inductores apropiados de manera que expresen dicha proteína o secuencia peptídica con capacidad para unir uno o más metales pesados en la superficie de la bacteria.

Las bacterias de la invención pueden ser utilizadas en la recuperación de un medio, sólido o líquido, contaminado con metales pesados.

La invención proporciona, por tanto, un método para recuperar un suelo contaminado por metales pesados que comprende poner en contacto una cantidad eficaz para recuperar dicho suelo contaminado de, al menos, un cultivo de bacterias proporcionadas por esta invención con el suelo a recuperar. En una realización particular, se aplican entre 10^5 y 10^{11} bacterias/g de suelo, preferentemente 10^8 bacterias/g suelo. Las bacterias de la invención se aplican sobre el suelo a tratar por cualquier método convencional. Las bacterias pueden ponerse en contacto con el suelo a tratar bien en fase sólida o líquida, por ejemplo, introduciendo o inyectando una suspensión de bacterias de la invención sobre el suelo a tratar, o bien regando el suelo a tratar con una formulación que contiene una suspensión de las bacterias de la invención; alternativamente, el suelo a tratar se puede mezclar físicamente con las bacterias de la invención. Aunque resulta difícil cuantificar lo que debe entenderse por suelo contaminado con un metal pesado, ya que ello dependerá de numerosos factores, entre los que se encuentra el metal pesado y la forma en que se encuentra, el método proporcionado por esta invención resulta adecuado para recuperar suelos contaminados con metales pesados que contienen entre 0,1 μmoles de metal pesado/kg de suelo y 50 100 milimoles de metal pesado/kg de suelo.

La invención también proporciona un método para tratar un efluente cargado con metales pesados, con el fin de reducir el contenido en metales pesados en dicho efluente, que comprende poner en contacto una cantidad efectiva de, al menos, un cultivo de bacterias proporcionadas por esta invención con el efluente a tratar. La reducción del contenido en metales pesados en dicho efluente tiene por finalidad alcanzar un nivel de metales pesados contaminantes en el efluente que no sea tóxico para el medio ambiente, con lo que dicho efluente, descargado sustancialmente de metales pesados contaminantes, puede ser vertido de forma controlada.

Con carácter previo a poner en contacto las bacterias de la invención con el efluente a tratar, se analiza el efluente y se determina el pH y la existencia de los nutrientes adecuados para el crecimiento de las bacterias de la invención, de manera que, en caso de que no tenga el pH no los nutrientes necesarios en

las cantidades adecuadas para garantizar la viabilidad de las bacterias se tomen las medidas oportunas consistentes, por ejemplo, en la corrección del pH y en suplementar el efluente con los nutrientes necesarios.

5 En una realización particular del método para tratar un efluente cargado con metales pesados, para reducir su contenido en metales pesados, proporcionado por esta invención, se contempla la posibilidad de utilizar biomasa no viable procedente de bacterias, muertas, proporcionadas por esta invención, estando dicha biomasa unida a un soporte sólido. En este caso, la retirada de metales pesados del efluente comprende (i) matar, por métodos convencionales, por ejemplo, modificando las condiciones de viabilidad de las bacterias en cuestión, unas bacterias proporcionadas por esta invención, que expresan en su superficie una proteína o secuencia peptídica capaz de unir uno o más metales pesados, para obtener una biomasa no viable capaz de unir uno o más metales pesados, (ii) unir dicha biomasa a la superficie de un soporte sólido, (iii) poner en contacto dicha superficie que tiene unida a la biomasa, con un efluente que contiene al menos un metal pesado de manera que dicho metal pesado se una a dicha proteína o secuencia peptídica capaz de unir a dicho metal pesado, y (iv) retirar de dicho efluente el soporte que contiene unida a dicha biomasa. La biomasa puede estar unida al soporte sólido bien por una unión covalente o no covalente, por ejemplo, por adsorción, etc. La patente norteamericana US 5.824.512 describe un método para retirar metales pesados de un medio acuoso mediante el empleo de biomasa no viable obtenida a partir de bacterias muertas capaces de unir al menos un metal pesado, estando dicha biomasa unida a un soporte sólido. Las enseñanzas de dicha patente norteamericana se incluyen en esta descripción como referencia.

La invención se ilustra más adelante mediante un ejemplo que muestra la expresión de la MT-I de ratón sobre la superficie celular de *R. eutropha* CH34, cepa bacteriana Gram negativa adaptada para desarrollarse en suelos altamente contaminados con iones de metales pesados. Para ello, la secuencia de ADN que codifica para la MT-I de ratón se fusionó al dominio β del autotransportador de la proteasa IgA de *N. gonorrhoeae*, que sitúa la proteína híbrida (Mt β) hacia la membrana bacteriana externa. La translocación, presentación en la superficie bacteriana, y funcionalidad de la proteína quimérica MT β fue inicialmente demostrada en *E. coli* antes de la transferencia de su gen codificante (*mtb*) a *R. eutropha*, observándose que la cepa bacteriana resultante, denominada *R. eutropha* MTB, tenía una mayor capacidad para inmovilizar los iones de cadmio (Cd²⁺) procedentes del medio externo [Ejemplo 2]. Asimismo, la inoculación en suelo contaminado con Cd²⁺ de *R. eutropha* MTB disminuyó significativamente los efectos tóxicos del metal pesado sobre el crecimiento de las plantas de tabaco (*Nicotiana benthamiana*) [Ejemplo 3]. Aunque en el Ejemplo 3 se utiliza un inductor (3-MB) para la expresión de la MT-I de ratón en *R. eutropha* MTB, debido a que el promotor utilizado en la construcción es un promotor inducible, para su empleo en el tratamiento de suelos es más conveniente utilizar una construcción en la que el promotor del gen que codifica para la proteína o secuencia peptídica con capacidad para unir uno o más metales pesados sea un promotor constitutivo de manera que la expresión de dicha proteína o secuencia peptídica se realice de forma continua y no dependa de la disponibilidad de un inductor. Cualquier promotor constitutivo podría ser utilizado en dichas construcciones.

De forma más concreta, en los Ejemplos 1-3 se describen dos sistemas que se han desarrollado independientemente para manejar los metales pesados con el fin de obtener un eficaz bioabsorbente de metales pesados para aplicaciones *in situ*. Se produjo MT de ratón, una proteína quelante de metales, sobre la superficie celular de *R. eutropha* CH34, una cepa Gram negativa que reside en el suelo y que está adaptada a ambientes contaminados con metales pesados [Mergeay, M. (1985); Tibazarwa et al., (2000); Diels et al. (1995)]. Aunque las metalotioneínas (MT) se han expresado de varias formas en *E. coli* [Sousa et al., (1998); Valls et al., (1998); Romeyer et al. (1988); Shi et al. (1992); Jacobs et al., (1989)], los ejemplos previamente descritos constituyen el primer intento exitoso de transferencia de MT de animales en especies bacterianas que residen de forma natural en suelos contaminados con metales pesados, y de validación de su eficacia para disminuir la toxicidad del metal *in situ*.

El despliegue superficial de polipéptidos en bacterias ha suscitado mucho interés en relación con su potencial para el desarrollo de vacunas vivas, biodegradación de compuestos tóxicos o bioadsorción de metales pesados [Stahl et al., (1997); Georgiou et al., (1997); Richins et al., (1997)]. En este contexto, la producción de MT sobre la superficie celular de *R. eutropha*, en vez de intracelularmente, constituye un camino muy eficaz para aumentar la capacidad de unión a metales pesados de esta cepa bacteriana sin inducir alteraciones en su fisiología. El hecho de que los mecanismos de resistencia, conocidos para varios metales en *R. eutropha* CH34, implican el flujo activo de iones de metal pesado, desde el citoplasma hasta el medio extracelular [Tibazarwa et al., (2000); Diels et al. (1995); Nies et al., (1989); Mergeay, M., (1991)], provoca que estas células pueden resultar excelentes agentes detoxificantes cuando están dotadas de propiedades superiores de adsorción de metales pesados sobre la superficie celular.

Se utilizó el sistema autotransportador de la proteasa IgA de *N. gonorrhoeae* para la presentación de MT-I de ratón, ya que éste no requiere una maquinaria especial (distinta de la ruta reguladora *sec*) para la secreción de las fusiones N terminales heterólogas [Klauser et al., (1990)]. El dominio β de la proteasa IgA dirigió muy eficazmente el híbrido MT β a la ME de *E. coli*, independientemente de la presencia de DsbA (Figura 1B). Sin embargo, el nivel del resto MT translocado a la superficie celular se redujo en tres veces en las cepas DsbA⁺ (Figura 1C). Se ha informado que los puentes disulfuro intramoleculares dentro del dominio N-pasajero de los autotransportadores disminuye su translocación a través de la ME [Veiga et al., (1999); Klauser et al., (1992)]. Ya que la MT-I de ratón es una proteína de 61 aminoácidos que contiene 20 residuos de cisteína esparcidos a través de su secuencia [Romero-Isart et al., (1999)], es posible que DsbA catalice fortuitamente la formación de puentes disulfuro intra/intermoleculares durante el paso del módulo MT a través del periplasma, disminuyendo así la eficacia global del proceso de translocación mediado por el autotransportador β .

La evidencia de un resto MT funcional de MT β se obtuvo inicialmente por la unión de metales pesados de las células de *E. coli* que producen MT β sobre su superficie. Estas células unieron una cantidad de iones Cd²⁺ 10 veces mayor que las células control (Figura 2A). Es interesante señalar que las células de *E. coli* (pMT β -1) que tienen una enzima DsbA activa, unieron una cantidad idéntica de iones Cd²⁺, que sus células mutantes isogénicas *dsbA*. Este resultado sugiere que el módulo MT podría unir metales pesados con eficacia similar tanto cuando se localiza en el lado periplasmático de la ME como cuando se transloca a la superficie celular.

El gen *mtb* se insertó posteriormente en el cromosoma de *R. eutropha* CH34 y su expresión se indujo por la adición de 3-MB (Figura 3). De forma similar a *E. coli*, las células de *R. eutropha* MTB inducidas produjeron la proteína MT β y la dirigieron hacia la ME. La producción de la proteína MT β produjo un aumento de 3 veces la capacidad intrínseca de células de *R. eutropha* CH34 para unir metales pesados (Figura 2B). Se determinó una acumulación de 42 nmoles de átomos de Cd/mg de peso seco bacteriano, que corresponde a un total de aproximadamente 13 μ moles de átomos de Cd adsorbidos/litro, en células de *R. eutropha* MTB crecidas en presencia de CdCl₂ 300 μ M. Aunque la bioacumulación en este ensayo *in vitro* es una de las más altas observadas hasta el momento, la cantidad de Cd eliminada representa sólo aproximadamente el 5% del metal total presente en el medio de cultivo. Sin embargo, los experimentos de reparación de la toxicidad debida al Cd (Figura 4), sugieren que la inmovilización de los iones de Cd²⁺ en una forma biológicamente inactiva, podría ser mucho más elevada en el suelo que *in vitro*. Un resultado sorprendente de estos experimentos fue que *R. eutropha* MTB tenía un efecto protector mucho más elevado sobre el crecimiento de *N. bentamiana* que su cepa parental (Figura 4). La presencia de la cepa MTB manipulada en suelos contaminados con Cd aumentó en 4 veces la producción de biomasa y el contenido de clorofila de las plantas de *N. bentamiana* (Tabla 1). La morfología macroscópica y el tamaño de las plantas crecidas en suelos que contienen *R. eutropha* MTB y 150 μ moles de Cd/kg fue comparable a los de las plantas crecidas sin bacterias con 40 μ moles de Cd/kg (no mostrados). Así, estos ensayos *in situ* implican una inmovilización de aproximadamente el 70% del metal accesible a las plantas en el suelo. El mecanismo responsable de la diferencia en los valores de la adsorción de metales *in vitro* y en el suelo todavía no está claro.

Un cálculo del número de proteínas MT β producidas por la célula *R. eutropha* MTB sugirió que la inmovilización de Cd era un fenómeno más complejo que la simple unión del metal a la MT. La comparación de las señales obtenidas en inmunotransferencias con el anticuerpo monoclonal anti-E-tag, utilizando extractos de células enteras de *R. eutropha* MTB y una proteína E marcada de concentración conocida, dio una estimación de un máximo de 15.000 moléculas de MT β /célula (datos no mostrados). Ya que cada módulo MT puede unir 7 iones metálicos divalentes, el número predicho de esferas de coordinación disponibles es de aproximadamente 10⁵/célula. A partir de los valores obtenidos en los experimentos de unión de Cd mostrados en la Figura 2B, se puede inferir que el contenido de cadmio es de aproximadamente 1,5 x 10⁶ átomos de Cd/célula. Por tanto, el número real de iones de Cd²⁺ unidos a la superficie de *R. eutropha* MTB excede en al menos 10 veces las predicciones de un aumento de la acumulación basada sólo en el aumento del número de centros de unión del metal sobre la superficie celular. También se ha informado de conclusiones similares para otros esquemas artificiales de unión a metales [Sousa et al., (1998); Sousa et al., (1996)]. Estos resultados sugieren que los canales de fusión MT β de iones metálicos están dirigidos hacia otras estructuras celulares que no pueden interactuar con los metales en solución. Dicho efecto embudo produce la multiplicación de la capacidad nativa de las bacterias para acumular iones metálicos en vez de la simple adición de esferas de coordinación sobre la superficie celular. Sin embargo, esto todavía parece insuficiente para explicar la gran reducción de la toxicidad metálica en el suelo.

Además de la afinidad intrínseca de la MT por iones divalentes, la reactividad global de la cepa *R. eutropha* CH34 (la cual precipita de forma natural los metales pesados sobre la superficie bacteriana) [Diels et al., (1995); Diels et al., (1999); Van Roy et al., (1997); Gilis et al., (1998)] y el proceso físico-químico que la acompaña, podría contribuir sinérgicamente al resultado final de la inmovilización del metal en el suelo. Por consiguiente, la diferencia observada entre los ensayos *in vitro* e *in situ* podría explicarse si las moléculas MT β presentes sobre la superficie de las bacterias manipuladas no sólo coordinan los iones metálicos, sino que también catalizan un proceso de precipitación abiótica de fosfatos y carbonatos metálicos [Gilis et al., (1998)].

Concluyendo, estos resultados apoyan el potencial biotecnológico de las MT expresadas en *R. eutropha* y, además, proporciona la evidencia directa de que el uso de bacterias resistentes a metales pesados, como hospedadores para el despliegue superficial de proteínas de unión a iones de alta afinidad, es un método prometedor para la generación de correcciones biológicas en los suelos contaminados con esta clase de contaminantes, difíciles de erradicar.

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la invención y no deben ser considerados en sentido limitativo del alcance de la misma.

Ejemplo 1

Producción de MT β en *E. coli* y en *R. eutropha*

I. Protocolo experimental

1.1 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

Las cepas bacterianas utilizadas fueron: *E. coli* JCB570 (MC1000 *phoR zih1::Tn10*) [Bardwell et al., (1991)]; *E. coli* JCB571 (MC1000 *phoR zih12::Tn10 dsbA::kan1*) [Bardwell et al., (1991)]; *E. coli* DH5 α F' (F' Δ (*lacZYA-argF*)U169 *deoR endA1 hsdR17 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1* (Φ 80*dlacZ* Δ M15) [Laboratorios Gibco BRL, Bethesda, USA] *E. coli* CC118 λ pir (Δ *ara leu araD* Δ *lac X74 galE galK phoA20 thi-1 rpsE rpoB argE* (Am) *recA1*) [de Lorenzo et al., (1994)]; y *E. coli* S17-1 λ pir (Tp^r Sm^r *recA thi pro hsdR* M⁺ RP4-2-Tc::Mu:Km Tn7) [de Lorenzo et al., (1994)]. *Ralstonia eutropha* (denominada anteriormente *Alcaligenes eutrophus*) CH34 fue donada por Max Mergeay [Mergeay et al., (1985)].

Salvo que se indique lo contrario, las bacterias se crecieron a 30°C en medio LB [Miller et al., (1992)] líquido o en placas de agar LB 1,5% p/v suplementadas con los antibióticos apropiados [Miller et al., (1992)]. Se incluyó glucosa (2% p/v) en el medio de crecimiento para la represión total del promotor *lac* de pMT β -1 en *E. coli*. La expresión de MT β se indujo en *E. coli* (pMT β -1) por transferencia de células de cultivos en crecimiento exponencial (DO600 nm = 0,5 aproximadamente) a un medio LB fresco sin glucosa y que contenía isopropil-1-tio- β -D-galactósido (IPTG) 0,1 mM, e incubación posterior durante tres horas a 30°C. Se utilizó ampicilina y cloranfenicol en unas concentraciones finales de 100 μ g/ml y 40 μ g/ml respectivamente.

La producción de MT β en *R. eutropha* se indujo en cultivos líquidos LB y MJS mediante la adición de 3-metil-benzoato (3-MB) 3 mM y posterior incubación a 30°C durante 3 horas.

1.2 Construcciones génicas

Las manipulaciones del ADN se realizaron utilizando los métodos estándar [Ausubel et al., (1994)]. El gen MT-I de ratón se amplificó a partir del plásmido pMTP [Valls et al., (1998)] por PCR usando los oligonucleótidos Smt1 (SEC. ID. N°: 1) y Smt2 (SEC. ID. N°: 2).

Smt1: 5'-CGGGCCCAGCCGCGCCATGGCGGACCCCAACTGCTCCTGC-3', y

Smt2: 5'-GCGGCCCCGACGCGCGGCACAGACAGTGCACCTTGTC-3'

El fragmento de ADN amplificado de 200 pb que contenía el gen MT-I franqueado por los sitios *Sfi*I, fue digerido con *Sfi*I y ligado al fragmento de 5,2 kb obtenido con la digestión *Sfi*I de pPvH β [Veiga et al., (1999)]. En el plásmido resultante, pMT β -0, los sitios *Xba*I y *Hind*III que contenía franqueando al gen *mtb* fueron convertidos en sitios *Not*I en pMT β -1 [véase la Figura 1] por ligación de los acopladores *Xba*I-*Not*I y *Hind*III-*Not*I. El acoplador *Xba*I-*Not*I fue construido por hibridación de los oligonucleótidos: 5'-CTAGGCGGCCGC-3' (SEC. ID. N°: 3) y 5'-CTAGGCGGCCGC-3' (SEC. ID. N°:

4). De forma similar, el acoplador *Hind*III-*Not*I fue construido por hibridación de los oligonucleótidos: 5'-AGCTGCGGCCGC-3' (SEC. ID. N°: 5) y 5'-AGCTGCGGCCGC-3' (SEC. ID. N°: 6).

Para la construcción de pTnMT β -1, el fragmento de ADN de 1,7 kb que contenía el gen *mtb* fue aislado por digestión *Not*I de pMT β -1 y se ligó en el único sitio *Not*I de pCNB1 [de Lorenzo et al., (1993)] en la orientación que coloca a *mtb* bajo el control del promotor *Pm* [véase la Figura 3].

1.3 Transferencia de TnMT β -1 a *Ralstonia eutropha* CH34

El elemento mini-Tn5 TnMT β -1 fue transferido al cromosoma de *R. eutropha* CH34 por conjugación con *E. coli* S17-1 λ pir transformado con el plásmido pTnMT β -1 utilizando el protocolo descrito previamente [de Lorenzo et al., (1994)]. La selección de los transconjugantes de *R. eutropha* CH34 se realizó en placas con medio mínimo M9 [Miller et al., (1992)] que contenían citrato 0,2% p/v y suplementadas con kanamicina (1 mg/ml). Se aislaron varios clones y se buscó el fenotipo sensible a piperacilina (100 μ g/ml), que indicaba que se correspondía a acontecimientos auténticos de transposición, más que a la integración del pTnMT β -1 total en el genoma.

1.4 Métodos para determinar las proteínas expresadas

El fraccionamiento de las células de *E. coli* y *R. eutropha* se llevó a cabo utilizando un método basado en la solubilización diferencial de los compartimentos celulares con Triton X-100 1,5%, así como un procedimiento estándar de centrifugación en gradiente de sacarosa [Nikaido, H., (1994)]. La concentración de proteínas en las diferentes fracciones se cuantificó mediante el método de Bradford [Ausubel et al. (1994)]. Se separaron cantidades idénticas de proteína de diferentes muestras mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecilsulfato sódico 10% (SDS-PAGE) y se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF, Millipore). Para la inmunodetección de la proteína MT β , la membrana PVDF se incubó con el anticuerpo monoclonal anti-E-tag (1 μ g/ml; Pharmacia) en tampón B (PBS; leche desnatada 3% p/v) que contenía Tween 20 0,1% v/v. Como anticuerpo secundario se utilizó un conjugado IgG anti ratón-peroxidasa (0,03 U/ml; Boehringer Mannheim). La membrana se reveló mediante una reacción de quimioluminiscencia [Veiga et al., (1999)] y se expuso a una película de rayos X (X-OMAT; Kodak).

1.5 Ensayo de inmunoabsorción unido a enzima (ELISA)

Para determinar el nivel de MT β desplegada sobre la superficie de *E. coli*, las células inducidas se lavaron en PBS y se resuspendieron hasta una DO600 nm = 1,5 en PBS para obtener la muestra de células intactas. Como alternativa, las células lavadas se resuspendieron a la misma densidad en PBS con sacarosa 20% p/v y EDTA 10 mM para obtener una muestra de células sometidas a choque. Para generar una muestra de células lisadas, se resuspendieron las bacterias (DO600 nm = 1,5) en PBS que contenía EDTA 10 mM y se sonicaron utilizando 6 pulsos de 30 segundos en un aparato Labsonic U (B. Branun). Todas las muestras, las células intactas, las células sometidas a choque osmótico o las lisadas (50 μ l) se adsorbieron a las placas ELISA (Maxisorb, Nunc) durante 1 hora a temperatura ambiente, se bloquearon con tampón B (PBS; con leche desnatada 3% p/v) durante 2 horas y se incubaron durante 1 hora en el tampón B con el anticuerpo monoclonal anti-E-tag (1 μ g/ml; Pharmacia). Las placas se lavaron a continuación 3 veces en PBS y como anticuerpo secundario se usó un conjugado IgG anti ratón-peroxidasa (0,3 U/ml; Boehringer Mannheim). Se desarrollaron los ELISA utilizando *o*-fenilendiamina (OPD; Sigma) y se determinaron sus valores de DO492 nm.

II. Resultados

Producción de MT β en *E. coli*

Para explotar el potencial de un dominio autotransportador para situar la MT de ratón sobre la superficie de una bacteria Gram negativa, se ha construido una fusión génica denominada *mtb* y expresada en *E. coli*. Esta fusión codifica para una proteína modular (MT β) constituida por el péptido señal *pelB* ensamblado en fase con la MT de ratón (7 kDa aproximadamente) y el dominio β (50 kDa aproximadamente) de la proteasa IgA de *N. gonorrhoeae*. Adicionalmente, a la proteína MT β se le añadió un epítipo peptídico corto (E-tag) para permitir su inmunodetección mediante el anticuerpo monoclonal anti-E-tag. El plásmido pMT β -1 (Figura 1A) lleva la fusión del gen *mtb* bajo el control del promotor *lac* de *E. coli*.

En primer lugar, se trató la localización subcelular del híbrido MT β . Asimismo, también se investigó la influencia de DsbA, el principal catalizador periplasmático formador de puentes disulfuro [Bardwell, (1994)]. Esto es debido a que en estudios previos, se ha establecido que la oxidación de los residuos de cisteína en el periplasma puede evitar la exposición de las proteínas pasajeras que contienen cisteínas fusionadas al dominio β [Jose et al., (1996)]. Para ello, la cepa mutante *dsbA* de *E. coli* JCB571 [Bardwell et al., (1991)] y su cepa isogénica de tipo silvestre *E. coli* JCB570 se transformaron con el plásmido pMT β -1 y se indujo la expresión de *mtb* por la adición de IPTG. Después de la inducción, se recogieron las células de *E. coli* y las proteínas de las fracciones solubles, MI y ME se analizaron por SDS-PAGE, se transfirieron y se ensayaron con el anticuerpo monoclonal anti-E-tag. Tal como se observa en la Figura 1B, se localizó una proteína principal del tamaño esperado para MT β (57 kDa aproximadamente) en la fracción ME de las células de *E. coli* de tipo silvestre y *dsbA* (pMT β -1). Es interesante señalar que la presencia o ausencia de DsbA no supuso una diferencia significativa en la estabilidad de MT β o en su direccionamiento hacia la ME.

Para valorar si el resto MT del híbrido MT β estaba expuesto al medio externo, se llevó a cabo un ELISA con células de *E. coli* intactas, utilizando el anticuerpo monoclonal anti-E-tag para detectar la presencia del híbrido MT β sobre su superficie. Asimismo, células de *E. coli* sometidas a choque osmótico y lisadas que producen MT β se adsorbieron sobre las placas ELISA como controles positivos para inmunodetección, mientras que las células no transformadas se usaron como controles negativos. Los valores de DO492 nm obtenidos con las células intactas frente a aquellos obtenidos con las células lisadas son una medida de la cantidad del resto MT translocado hacia el lado externo de la ME por el dominio β de la IgA. Utilizando este método, se observó el reconocimiento específico del anticuerpo monoclonal anti-E-tag frente a las células intactas de *E. coli* que producen MT β (Figura 1C), lo que indica que el resto MT estaba expuesto al medio externo. Siguiendo este criterio, las células de *E. coli* de tipo silvestre translocaron en su totalidad aproximadamente el 20% de los restos de MT de las fusiones MT β hacia el medio externo. El nivel del resto de MT desplegado sobre la superficie celular fue 3 veces superior (60 % aproximadamente) en la cepa mutante de *E. coli dsbA* (Figura 1C), una característica que parece estar relacionada con el mecanismo de secreción de los autotransportadores [Veiga et al., (1999)].

Con el fin de determinar si la expresión de MT β aumentaba la capacidad de las células de *E. coli* para adsorber los metales pesados *in vivo*, se hicieron crecer cultivos de *E. coli* JCB750 y *E. coli* JCB571, transformados con pMT β -1, en presencia de CdCl₂ 30 μ M. A continuación, las bacterias se recogieron y se midió el contenido de Cd²⁺ acumulado por la biomasa mediante espectrometría de adsorción atómica. Tal como puede verse en la Figura 2A, la producción de MT β aumentó el contenido de Cd²⁺ de las células de *E. coli* en 10 veces, lo que indica que el resto MT de MT β retuvo su capacidad de unión a los metales. La producción de MT β en un hospedador mutante *E. coli dsbA* (Figura 2A) no aumentó adicionalmente esta acumulación de metales, a pesar del aumento de translocación superficial del dominio MT.

Producción de MT β en *Ralstonia eutropha* CH34

Las limitaciones de *E. coli* para sobrevivir en ambientes contaminados con metales pesados indujo a introducir el gen *mtb* en la cepa *R. eutropha* CH34 tolerante a los metales [Mergeay, M. (1985); Tibazarwa et al., (2000)]. Para ello, el gen *mtb* se colocó en un transposón mini-Tn5 (Km^r) en dirección del promotor *Pm* del plásmido pWVO de *Pseudomonas putida*, junto con el gen que codifica para su activador transcripcional *xylS* [Ramos et al., (1997)]. El plásmido obtenido, pTnMT β -1, posibilita la integración estable del mini-transposón TnMT β -1 en el cromosoma de una amplia variedad de bacterias Gram negativas y permite la inducción de la expresión de *mtb* por adición de 3-metil-benzoato (3-MB) en el medio de crecimiento (Figura 3A).

Se insertó el mini-transposón TnMT β -1 en el cromosoma de *R. eutropha* CH34 y la producción de MT β se ensayó por inmunotransferencia después de la inducción con 3-MB. Tal como se puede observar en la Figura 3B, la producción de MT β era estrictamente dependiente de la presencia de 3-MB en el medio de crecimiento, lo que demuestra el estricto control del promotor *Pm* en *R. eutropha* CH34. La cepa bacteriana de *R. eutropha* CH34 que lleva el mini-transposón TnMT β -1 integrado de manera estable en su cromosoma ha sido denominada *R. eutropha* MTB y ha sido depositada en la CECT con el número de depósito CECT5323. De manera similar al caso de *E. coli*, el híbrido MT β se localizó enteramente en la fracción ME de *R. eutropha* MTB (Figura 3C), lo que demuestra que la proteína híbrida había sido correctamente dirigida a la ME por el dominio autotransportador. Asimismo, la fusión MT β se produjo como una banda de polipéptido individual, sin indicación de inestabilidad o degradación proteolítica.

Ejemplo 2

Adsorción de Cd²⁺ a partir del medio por R. eutropha MTB

5 Para investigar si la expresión de MTβ aumentaba la capacidad de las células de *R. eutropha* para adsorber metales pesados, se hicieron crecer cultivos de *R. eutropha* MTB y su cepa parental control (*R. eutropha* CH34) en presencia de CdCl₂. Para estos ensayos, se utilizaron concentraciones bajas y altas de metal pesado. En primer lugar, se usó CdCl₂ 30 μM para comparar el comportamiento de *R. eutropha* MTB con el de *E. coli* que expresa MTβ. Además, se investigó la adsorción del metal de las células
10 de *R. eutropha* MTB después del crecimiento en presencia de CdCl₂ 300 μM, una concentración que es inhibitoria del crecimiento de muchas otras bacterias tales como *E. coli*.

Para ello, se hicieron crecer las células de *E. coli* y *R. eutropha*, que contienen el gen *mtb* o sus correspondientes controles, en medio LB a 30°C hasta una DO600 nm de 0,3 aproximadamente. A continuación, se recogieron las células y se resuspendieron en medio de fosfato mínimo MJS [HEPES 12,5 mM
15 (pH 7,1), con NaCl 50 mM, NH₄Cl 20 mM, KCl 1 mM, MgCl₂ 1 mM, MnCl₂ 0,05 mM, casaminoácidos 0,8% p/v (Gibco BRL), glicerol 4% v/v y tiamina 0,005% p/v] suplementado con la concentración apropiada de CdCl₂ e inductor (IPTG o 3-MB) y se incubaron adicionalmente hasta una DO600 nm de 1,5 aproximadamente. A continuación, las células se recogieron, se lavaron con NaCl 0,8% en HEPES 5 mM
20 (pH 7,1) y se secaron durante 20 horas a 65°C. El material seco se digirió durante la noche con ácido nítrico 70% y se midieron las concentraciones de Cd²⁺ de la solución resultante con un espectrofotómetro Hitachi Z-2800 [Romeyer et al., (1988)].

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 2B, en donde la medición del contenido de Cd²⁺ reveló que *R. eutropha* MTB aumentaba en 3 veces la ya significativa capacidad natural de adsorción de
25 metales pesados de *R. eutropha* CH34 [Diels et al., (1995); Diels et al. (1999)]. Este aumento relativo de 3 veces en la acumulación de Cd²⁺ de la cepa MTB recombinante, se produjo en presencia tanto de CdCl₂ 30 μM como de 300 μM, aunque los niveles de adsorción absoluta variaban en cada caso proporcionalmente a los niveles basales. El nivel de adsorción medio obtenido por *R. eutropha* MTB fue de 42 nmol de Cd²⁺/mg de células secas (Figura 2B) cuando crecía en presencia de CdCl₂ 300 μM. Este
30 fenómeno se produjo sin ninguna variación significativa en la velocidad de crecimiento de los cultivos de *Ralstonia* (no mostrada) lo que indica que ni la producción de la proteína híbrida MTβ ni el aumento en la adsorción de metales tuvo efectos apreciables sobre la bacteria.

Ejemplo 3

35

Recuperación del suelo de la toxicidad por Cd²⁺

Para determinar la capacidad de *R. eutropha* MTB para contrarrestar el efecto tóxico del Cd²⁺ en el suelo, se estableció un ensayo biológico en el cual la inmovilización de los metales pesados en una forma
40 no bioactiva estaba reflejada por un efecto positivo sobre el crecimiento de la planta.

Para la inoculación del suelo con *R. eutropha*, se hicieron crecer los cultivos bacterianos a 30°C en medio líquido de Murashige y Skoog (MS) (Sigma) que contiene tampón MES 1,25 mM pH 5,8 y citrato 0,1% p/v como fuente de carbono. Los cultivos crecidos durante la noche se diluyeron 1:10 en el mismo
45 medio, suplementado con CdCl₂ 300 μM en caso necesario y se indujeron con 3-MB 100 μM. Los cultivos se hicieron crecer adicionalmente durante 18 horas a 30°C.

Para el crecimiento de las plantas, se usó tierra de turba estándar (Gebr. Brill Substrate GmbH), esterilizada en el autoclave y que contenía 1/3 de vermiculita. La tierra se mezcló 1:1 (v/p) con cultivos
50 inducidos de *R. eutropha* (10⁸ bacterias/g) [*R. eutropha* MTB y *R. eutropha* CH34], o con un medio MS estéril que contenía el inductor, suplementado con CdCl₂ 300 μM, si así se requería. La concentración final del metal en la tierra fue de 150 μmoles de Cd/kg. El suelo tratado se distribuyó en macetas (400 g/maceta) y a continuación se transfirieron a plantas de semillero de 15 días de *Nicotiana bentamiana*. Se hicieron crecer las plantas en un invernadero y se regaron dos veces a la semana con 0,1 x medio MS,
55 MES 0,12 mM pH 5,8, citrato 0,01% (p/v).

La toxicidad del cadmio se ensayó inicialmente en plantas de *N. bentamiana* crecidas en suelos que presentaban un aumento creciente del contenido de CdCl₂ (no mostrado). Estos experimentos revelaron
60 que 150 μmoles de la sal Cd/kg de suelo disminuyeron considerablemente el crecimiento de la planta y provocaban una clorosis severa, dos rasgos típicos de la toxicidad con Cd²⁺, [Ouzounidou et al., (1997)]. Este contenido de metal se usó para otros experimentos ya que todavía permitía un crecimiento lento de la planta.

Para investigar el efecto de las diferentes cepas de *R. eutropha* sobre el crecimiento de la planta, se transfirieron las plantas de semillero de *N. bentamiana* a suelos estériles estándar o contaminados con cadmio, inoculados por separado con 10^8 bacterias/g de *R. eutropha* MTB inducida, la cepa CH34 o una solución salina estéril que contenía el inductor. Después de 40 días de crecimiento en un invernadero, se observó una reducción de los efectos tóxicos del metal pesado en las plantas en presencia de *R. eutropha* MTB en el suelo (Figura 4B). Los experimentos control en suelos a los que no se les había añadido Cd^{2+} indicaron que la presencia de bacterias no alteraba el crecimiento de la planta (Figura 4A). Además, se observó un efecto significativamente protector de la cepa de tipo silvestre *R. eutropha* CH34. Probablemente, esto se debió a la capacidad inherente de acumulación de metales pesados de la cepa CH34 [Diels et al., (1995); Diels et al., (1999); Van Roy et al., (1997)]. Estas observaciones fueron cuantificadas y confirmadas midiendo la biomasa de las plantas y el contenido de clorofila de las hojas, para lo cual se homogeneizaron las hojas en acetona:agua (9:1) y se determinó la DO600 nm. El coeficiente de extinción usado para la clorofila fue 34,5. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1. Tomados en su conjunto, estos datos indican que la producción de MT β sobre la superficie celular de *R. eutropha* MTB aumentó la capacidad ya existente de inmovilización de metales pesados de esta cepa bacteriana, a lo que siguió un mayor efecto protector sobre el crecimiento de *N. bentamiana* en suelos contaminados.

TABLA 1

Efecto del CdCl₂ y de R. eutropha sobre el crecimiento de N. bentamiana

Tratamiento del suelo		Biomasa planta (g)	Clorofila (mg/g)
Bacteria	Cd		
Ninguno	Sí	0,53 \pm 0,36	0,40 \pm 0,25
<i>R. eutropha</i> CH34	Sí	1,29 \pm 0,39	0,81 \pm 0,31
<i>R. eutropha</i> MTB	Sí	2,37 \pm 0,37	1,41 \pm 0,25
Ninguno	No	17,65 \pm 2,05	2,22 \pm 0,10
<i>R. eutropha</i> CH34	No	15,52 \pm 1,69	2,50 \pm 0,08
<i>R. eutropha</i> MTB	No	14,55 \pm 2,37	2,38 \pm 0,05

En la Tabla 1 se recogen los valores medios de 4 experimentos independientes en el día 55 posterior a la germinación de la planta. La biomasa indica el peso húmedo de la parte aérea de la planta, en gramos. El contenido en clorofila se indica como mg de pigmento por g de planta (peso húmedo). En donde se especifica, el suelo fue inoculado con 10^8 bacterias/g y suplementado o no con 150 μ moles de CdCl₂/kg.

Depósito de microorganismos

Un cultivo de la cepa *Ralstonia eutropha* MTB ha sido depositado en la Colección Española de Cultivos Tipos [CECT], con sede en Burjasot (Valencia), el día 23 de Mayo de 2000, correspondiéndole el número de depósito CECT5323.

Bibliografía

- Ausubel et al., (1994). *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, New York).
- Bae, W. & Mehra, R.K. (1997). "Metal-binding characteristics of a phytochelatin analog (Glu-Cys)-2Gly". *Journal of Inorganic Biochemistry* 68, 201-210 (1997).
- Bardwell et al., (1991). "Identification of a protein required for disulfide bond formation *in vivo*". *Cell* 67, 581-589.
- Bardwell, J.C.A. (1994). "Building bridges: disulfide bond formation in the cell". *Mol. Microbiol.* 14, 199-205.
- Brown, S. (1997). "Metal-recognition by repeating polypeptides". *Nat. Biotechnol.* 15, 269-272.

- de Lorenzo et al.**, (1993). "Engineering of alkyl- and haloaromatic-responsive gene expression with minitransposons containing regulated promoters of biodegradative pathways of *Pseudomonas*". *Gene* 130, 41-46.
- 5 **de Lorenzo et al.**, (1994). "Analysis and construction of stable phenotypes in Gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons". *Methods Enzymol.* 235, 386-405.
- Diels et al.**, (1995). "The *czc* operon of *Alcaligenes eutrophus* CH34: from resistance mechanisms to the removal of heavy metals". *Journal of Industrial Microbiology* 14, 142-153.
- 10 **Diels et al.**, (1999). "Heavy metals bioremediation of soil". *Mol. Biotechnol.* 12, 149-158.
- Gadd et al.**, (1993). "Microbial treatment of metal pollution a working biotechnology?". *Trends Biotechnol.* 11, 353-359.
- 15 **Georgiou et al.**, (1997). "Display of heterologous proteins on the surface of microorganisms: From the screening of combinatorial libraries to live recombinant vaccines". *Nature Biotechnology* 15, 29-34.
- Gillis et al.**, (1998). "Effect of the siderophore alcaligin E on the bioavailability of Cd to *Alcaligenes eutrophus* CH34". *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 20, 61-68.
- 20 **Grimalt et al.**, (1999). "The mine tailing accident in Aznalcollar". *The Science of the Total Environment* 242, 3-11.
- Henderson et al.**, (1998). "The great escape: structure and function of the autotransporter proteins". *Trends Microbiol.* 6, 370-378.
- 25 **Jacobs et al.**, (1989). "Human metallothionein-II is synthesized as a stable membrane-localized fusion protein in *Escherichia coli*". *Gene* 83, 95-103.
- 30 **Jose et al.**, (1996). "Absence of periplasmic DsbA oxidoreductase facilitates export of cysteine-containing passenger proteins to the *Escherichia coli* cell surface via the Iga β autotransporter pathway". *Gene* 178, 107-110.
- 35 **Klauser et al.**, (1990). "Extracellular transport of cholera toxin B subunit using *Neisseria* IgA protease β -domain: conformation-dependent outer membrane translocation". *EMBO J.* 9, 1991-1999.
- Klauser et al.**, (1992). "Selective extracellular release of cholera toxin B subunit by *Escherichia coli*: dissection of *Neisseria* Iga β -mediated outer membrane transport". *EMBO J.* 11, 2327-2335.
- 40 **Klauser et al.**, (1993). "The essential unit for outer membrane targeting and extracellular protein secretion". *J. Mol. Biol.* 234, 579-593 (1993).
- Klemba et al.**, (1995). "Novel metal-binding proteins by design". *Nat. Struct. Biol.* 2, 368-373.
- 45 **Mergeay et al.**, (1985). "*Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultativa chemolitotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals". *J. Bacteriol.* 162, 328-334.
- Mergeay, M.** (1991). "Towards an understanding of the genetics of bacterial metal resistance". *Trends Biotechnol.* 9, 17-24.
- 50 **Miller et al.**, (1992). *A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for Escherichia coli and related bacteria* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York).
- 55 **Nies, et al.**, (1989). "Plasmid-determined inducible efflux is responsible for resistance to cadmium, zinc, and cobalt in *Alcaligenes eutrophus*". *J. Bacteriol.* 171, 896-900.
- Nikaido, H.** (1994). "Isolation of outer membranes". *Methods Enzymol.* 235, 225-234.
- 60 **Nordberg, M.** (1998). "Metallothioneins: Historical review and state of knowledge". *Talanta* 46, 243-254.

Ouzounidou et al., (1997). "Physiological and ultrastructural effects of cadmium on Wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves". *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 32, 154-160.

5 **Pohlner** et al., (1987). "Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoea* IgA protease". *Nature* 325, 458-462.

Ramos et al., (1997). "Transcriptional control of the *Pseudomonas* TOL plasmid catabolic operons is achieved through an interplay of host factors and plasmid-encoded regulators". *Ann. Rev. Microbiol.* 10 51, 341-373.

Richins et al., (1997). "Biodegradation of organophosphorus pesticides by surface-expressed organophosphorus hydrolase". *Nature Biotechnology* 15, 984-987.

15 **Romero-Isart** et al., (1999). "Replacement of terminal cysteine with histidine in metallothionein alpha and beta domains maintains its binding capacity". *Eur. J. Biochem.* 259, 519-527.

Romeyer et al., (1988). Bioaccumulation of heavy metals in *Escherichia coli* expressing an inducible synthetic human metallothionein gene". *J. Biotechnol.* 8, 207-220.

20 **Shi** et al., (1992). "Cyanobacterial metallothionein gene expressed in *Escherichia coli*. Metal-binding properties of the expressed protein". *FEBS Lett.* 303, 159-163.

Sousa et al., (1996). "Enhanced metal adsorption of bacterial cells displaying poly-His peptides". 25 *Nature Biotechnology* 14, 1017-1020.

Sousa et al., (1998). "Metal adsorption by *Escherichia coli* cells displaying yeast and mammalian metallothioneins anchored to the outer membrane protein LamB". *J. Bacteriol.* 180, 2280-2284.

30 **Stahl** et al., (1997). "Bacterial surface display: trends and progress". *Trends in Biotechnology* 15, 185-192 (1997).

Summers A.O., (1992). "The hard stuff: metals in bioremediation". *Cur. Opin. Biotechnol.* 3, 271-276.

35 **Tibazarwa** et al., (2000). "Regulation of the *cnr* cobalt and nickel resistance determinant of *Ralstonia eutropha* (*Alcaligenes eutrophus*) CH34". *J. Bacteriol.* 182, 1399-1409.

Valls et al., (1998). "Bioaccumulation of heavy metals with proteins fusions of metallothionein to 40 bacterial OMPs". *Biochemie* 80, 855-861.

Van Roy et al., (1997). "The use of *Alcaligenes eutrophus* biofilm in a membrane bioreactor for heavy metal recovery". *Res. Microbiol.* 148, 526-528.

45 **Veiga** et al., (1999). "Probing secretion and translocation of a beta-autotransporter using a reporter single-chain Fv as a cognate passenger domain". *Mol. Microbiol.* 33, 1232-1243.

50

55

60

REIVINDICACIONES

1. Una bacteria con capacidad de unir metales pesados, **caracterizada** porque es una bacteria adaptada al suelo y resistente a metales pesados que contiene en su superficie, al menos, una proteína o una secuencia peptídica con la capacidad de unir uno o más metales pesados.
2. Bacteria según la reivindicación 1, **caracterizada** porque dicha bacteria adaptada al suelo y resistente a metales pesados es una bacteria adaptada al suelo y resistente, de forma natural, a metales pesados.
3. Bacteria según la reivindicación 1, **caracterizada** porque dicha bacteria adaptada al suelo y resistente a metales pesados es una bacteria adaptada al suelo que ha adquirido la resistencia a metales pesados mediante manipulación genética de una bacteria que no es resistente, de forma natural, a metales pesados, para introducir en ella un sistema capaz de inducir resistencia a metales pesados.
4. Bacteria según la reivindicación 1, **caracterizada** porque dicha bacteria adaptada al suelo y resistente a metales pesados, es una bacteria Gram positiva.
5. Bacteria según la reivindicación 1, **caracterizada** porque dicha bacteria adaptada al suelo y resistente a metales pesados, es una bacteria Gram negativa.
6. Bacteria según la reivindicación 5, **caracterizada** porque dicha bacteria adaptada al suelo y resistente a metales pesados, es una bacteria del género *Ralstonia* o *Pseudomonas*.
7. Bacteria según la reivindicación 6, **caracterizada** porque dicha bacteria adaptada al suelo y resistente a metales pesados es la bacteria *Ralstonia eutropha* CH34.
8. Bacteria según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizada** porque dicho metal pesado se selecciona entre Ag, As, Bi, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Pd, Pt, Te, Tl, Sb, Se, Sn y Zn, sus especies iónicas correspondientes y sus mezclas.
9. Bacteria según la reivindicación 8, **caracterizada** porque dicha proteína con capacidad de unir uno o más metales pesados es una metalotioneína.
10. Bacteria según la reivindicación 9, **caracterizada** porque dicha proteína con capacidad de unir uno o más metales pesados es la metalotioneína I de ratón.
11. Bacteria según la reivindicación 1, **caracterizada** porque la secuencia que codifica para dicha proteína o una secuencia peptídica con capacidad de unir uno o más metales pesados, que se expresa en la superficie de la bacteria, se encuentra bajo el control de un promotor inducible.
12. Bacteria según la reivindicación 1, **caracterizada** porque la secuencia que codifica para dicha proteína o una secuencia peptídica con capacidad de unir uno o más metales pesados, que se expresa en la superficie de la bacteria, se encuentra bajo el control de un promotor constitutivo.
13. Bacteria según la reivindicación 1, **caracterizada** porque el anclaje de dicha proteína o secuencia peptídica con capacidad de unir uno o más metales pesados sobre la membrana externa se realiza mediante un sistema autotransportador.
14. Bacteria según la reivindicación 13, **caracterizada** porque dicho sistema autotransportador es la proteasa IgA de *Neisseria gonorrhoeae*.
15. Bacteria según la reivindicación 1, **caracterizada** porque es *Ralstonia eutropha* MTB, depositada en la CECT con el número de depósito CECT5323.
16. Un método para recuperar un suelo contaminado por metales pesados que comprende poner en contacto una cantidad eficaz para recuperar dicho suelo contaminado de, al menos, un cultivo de bacterias con capacidad de unir uno o más metales pesados, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, con el suelo a recuperar.
17. Un método para tratar un efluente cargado con metales pesados, con el fin de reducir el contenido en metales pesados en dicho efluente, que comprende poner en contacto una cantidad efectiva de, al

menos, un cultivo de bacterias con capacidad de unir uno o más metales pesados, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, con el efluente a tratar.

5 18. Un método para tratar un efluente cargado con metales pesados, con el fin de reducir su contenido en metales pesados, comprende las etapas de:

(i) matar bacterias con capacidad de unir uno o más metales pesados, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, para obtener una biomasa no viable capaz de unir uno o más metales pesados,

10 (ii) unir dicha biomasa a la superficie de un soporte sólido,

(iii) poner en contacto dicha superficie que tiene unida a la biomasa, con un efluente que contiene al menos un metal pesado de manera que dicho metal pesado se una a dicha proteína o secuencia peptídica capaz de unir a dicho metal pesado, y

15 (iv) retirar de dicho efluente el soporte que contiene unida a dicha biomasa.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

FIGURA 1

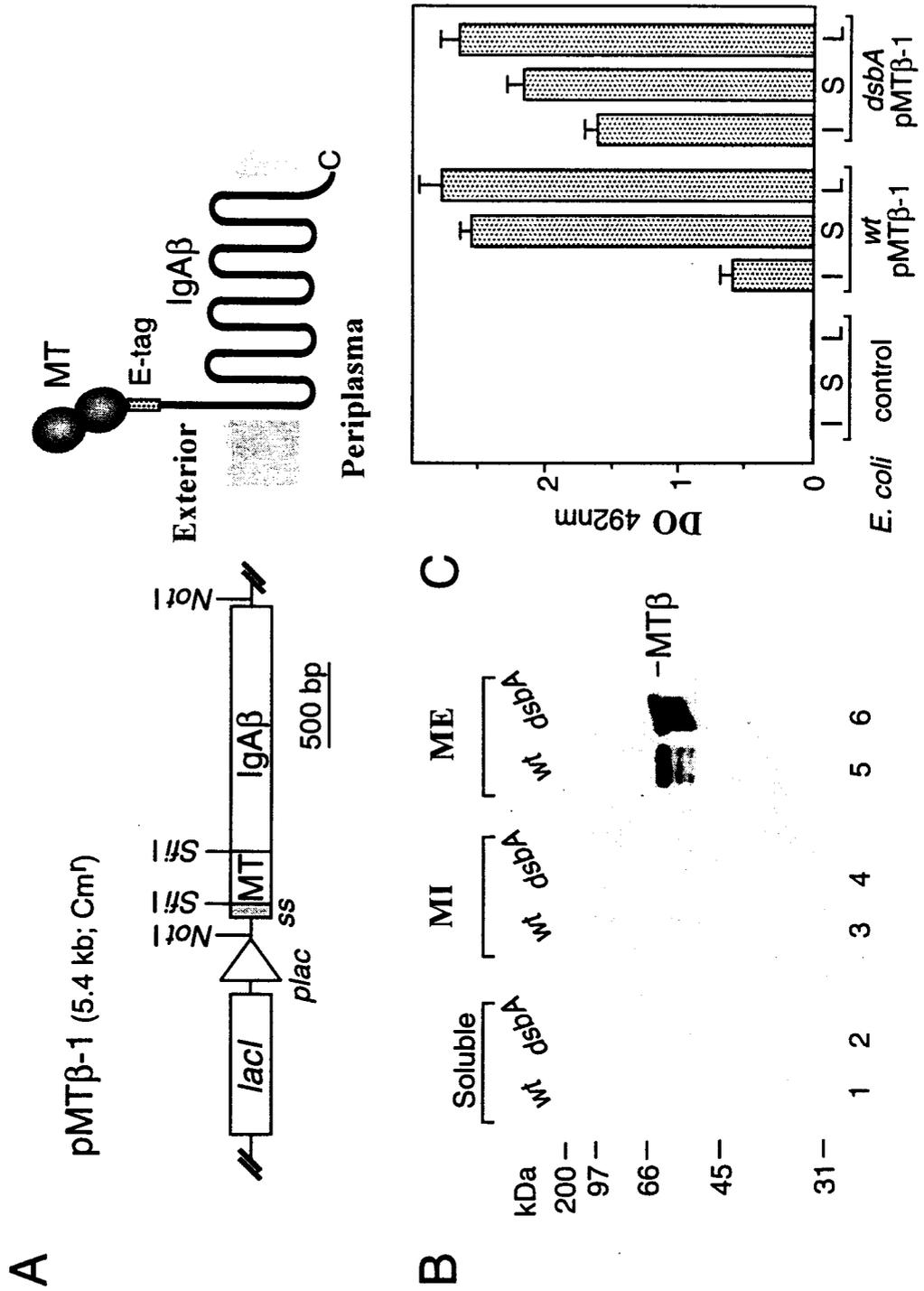


FIGURA 2

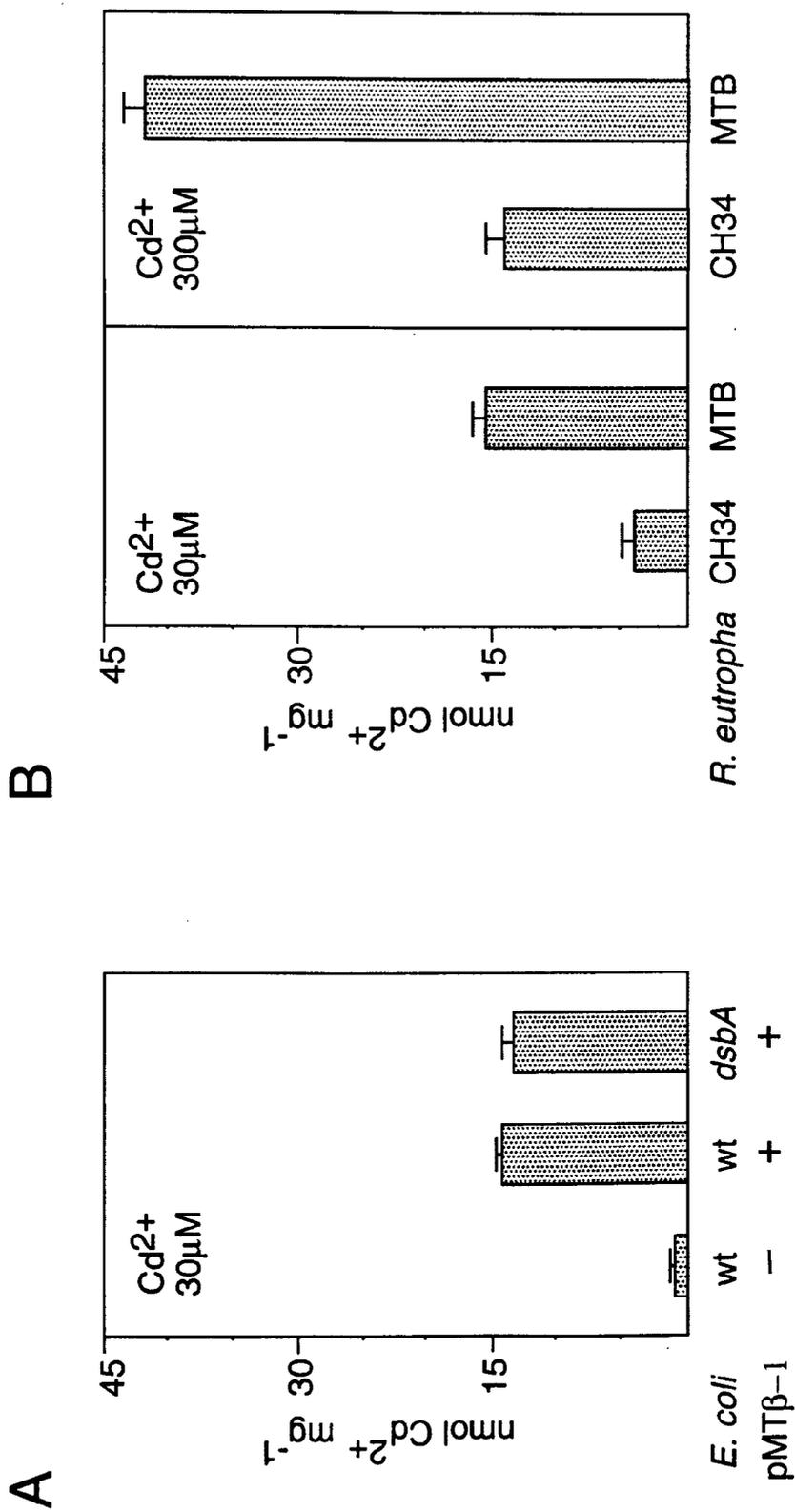
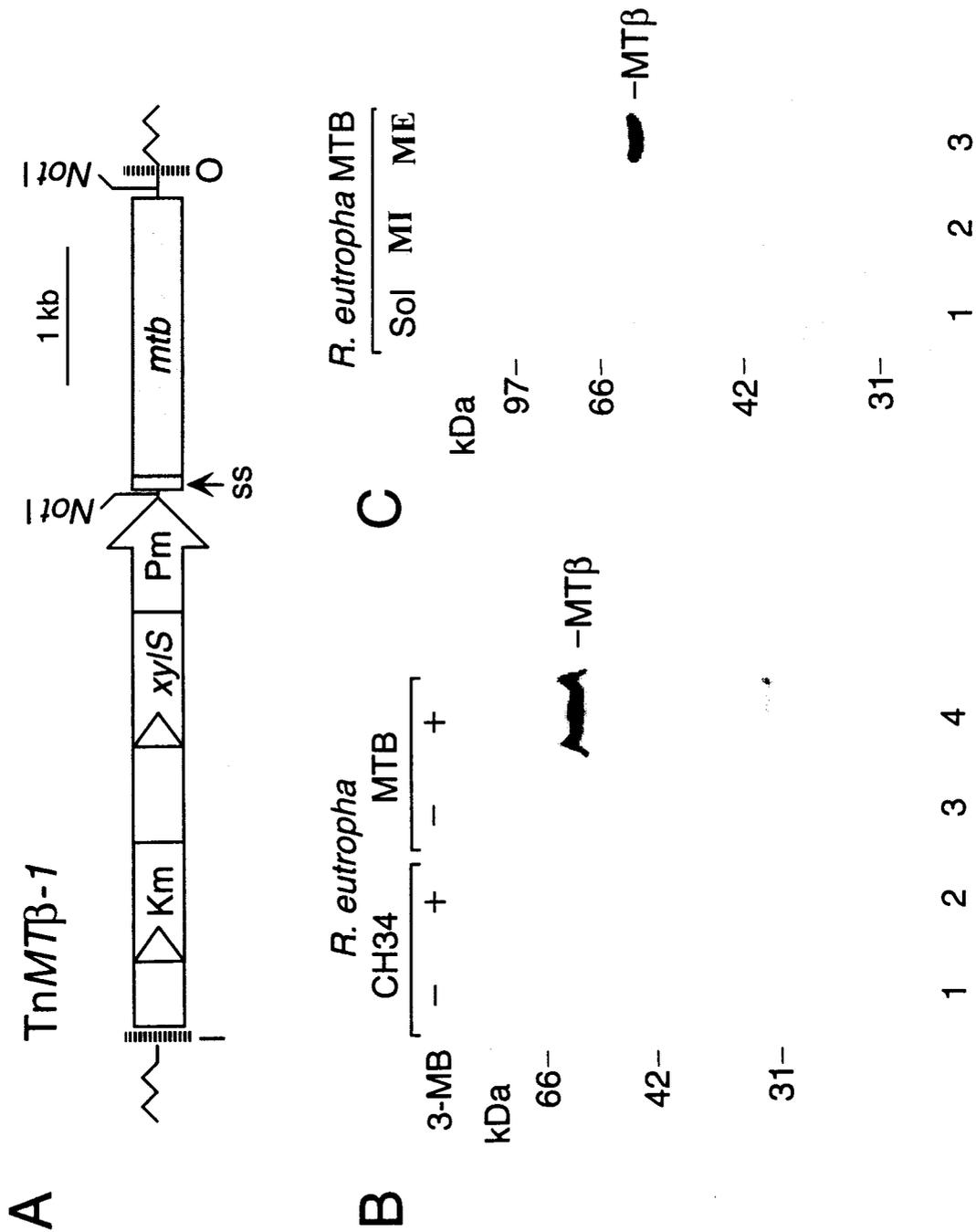


FIGURA 3



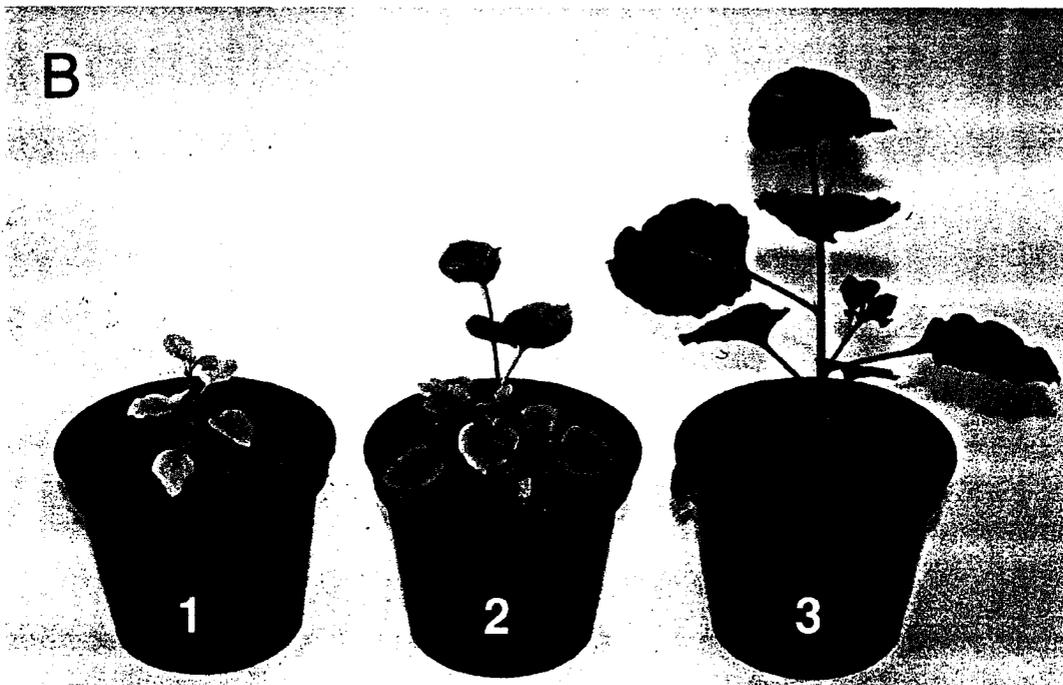


FIGURA 4

LISTAS DE SECUENCIAS

	<110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas	
5	<120> Bacterias con la capacidad de unir metales pesados y su empleo en la detoxificación de medios contaminados con metales pesados	
	<160> 6	
10	<210> 1	
	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<223> Oligonucleótido iniciador Smt1	
	<400> 1	
20	cgggccccagc cggccatggc ggaccccaac tgctcctgc	39
	<210> 2	
	<211> 38	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<223> Oligonucleótido iniciador Smt2	
30	<400> 2	
	gcggccccc acgccgeggc acagacagtg cacttgtc	38
35	<210> 3	
	<211> 12	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<223> Oligonucleótido	
45	<400> 3	
	ctaggcggcc gc	12
50	<210> 4	
	<211> 12	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
55	<223> Oligonucleótido	
	<400> 4	
60	ctaggcggcc gc	12

ES 2 176 082 B1

<210> 5
<211> 12
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
5
<223> Oligonucleótido

<400> 5
10 agctgcggcc gc 12

<210> 6
15 <211> 12
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
20 <223> Oligonucleótido

<400> 6
25 agctgcggcc gc 12

30

35

40

45

50

55

60



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁷: C12N 1/21, C07K 14/825, C02F 1/28

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	VALLS, M. et al. "Engineering outer-membrane proteins in Pseudomonas putida for enhanced heavy-metal bioadsorption", JOURNAL OF INORGANIC BIOCHEMISTRY, 2000, N° 79, páginas 219-223. Todo el documento.	1-17
Y	Todo el documento.	18
X	KOTRBA, P. et al. "Enhanced metallosorption of Escherichia coli cells due to surface display of Beta- and alpha-domains of mammalian metallothionein as a fusion to Lam B protein", J. OF RECEPTOR AND SIGNAL TRANSDUCTION RESEARCH, 1999, Vol. 19, N° 1-4, páginas 703-715. Todo el documento.	1
X	VALLS, M. et al. "Bioaccumulation of heavy metals with protein fusions of metallothionein to bacterial OMPs", BIOCHEMIE, 1998, Vol. 80, páginas 855-861. Todo el documento.	1
X	SOUSA, C. et al. "Metalloadsorption by Escherichia coli cells displaying yeast and mammalian metallothioneins anchored to the outer membrane protein Lam B", JOURNAL OF BACTERIOLOGY, 1998, Vol. 180, N° 9, páginas 2280-2284. Todo el documento.	1
X	JACOBS, F.A. et al. "Human metallothionein II is synthesized as a stable membrane-localized fusion protein in Escherichia coli", GENE, 1989, Vol. 83, páginas 95-103. Todo el documento.	1
Y	US 5824512 A (PAZIRANDEH et al.) 20.10.1998, todo el documento.	18

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n°:

Fecha de realización del informe

09.10.2002

Examinador

J.L. Vizán Arroyo

Página

1/2



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁷: C12N 1/21, C07K 14/825, C02F 1/28

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	REN, L. et al. "Expression of the mouse metallothionein-I gene conferring cadmium resistance in a transgenic cyanobacterium", FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, 1998, Vol. 158, páginas 127-132. Todo el documento.	1-18
A	ERBE, J.L. et al. "Expression of mouse metallothionein in the cyanobacterium Synechococcus PCC7942", JOURNAL OF INDUSTRIAL MICROBIOLOGY, 1996, Vol. 17, páginas 41-46. Todo el documento.	1-18

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe

09.10.2002

Examinador

J.L. Vizán Arroyo

Página

2/2