

UCH-FC
DOC - Microbiología
Ch 512
C-1

Estudio del metabolismo de los polifosfatos en la bacteria que
degrada policlorobifenilos *Pseudomonas sp.* B4: posibles
implicancias en los ajustes fisiológicos de las bacterias ante la
presencia de estos compuestos organoclorados

Tesis

Entregada a la Universidad de Chile

En cumplimiento parcial de los requisitos

Para optar al grado de

Doctor en Ciencias con mención en Microbiología

Facultad de Ciencias

por

Francisco Pablo Chávez Espinosa

Junio de 2006

Director de Tesis: Dr. Carlos A. Jerez



Facultad de Ciencias

Universidad de Chile

INFORME DE APROBACIÓN

TESIS DE DOCTORADO

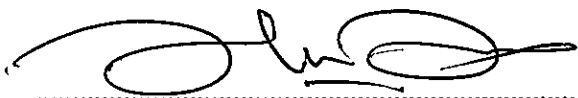
Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

Francisco Pablo Chávez Espinosa

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Microbiología, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 7 de junio de 2006.

Director de tesis:

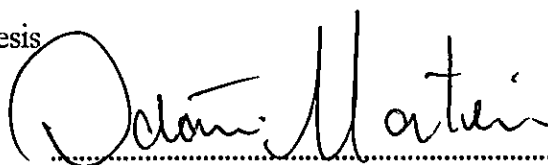
Dr. Carlos A. Jerez



.....

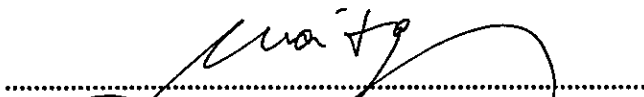
Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Octavio Monasterio
(Presidente)



.....

Dr. Claudio Vásquez



.....

Dr. Héctor Toledo



.....



A mis padres y mi familia

y en especial a Alejandra



AUTOBIOGRAFÍA



Desde mi nacimiento el 18 de febrero de 1972 en la Habana, Cuba, mis padres y familia han sido un apoyo en toda mi formación académica y espiritual. Mis estudios primarios fueron en el Colegio “Roberto Poland” del Cerro y toda mi enseñanza secundaria y preuniversitaria fue en una de las Instituciones cubanas de mayor prestigio mundial, la Escuela Vocacional “Vladimir Ilich Lenin”. Fue durante esta bella etapa (1984-1990) donde reafirmé mi gusto por las ciencias químicas y biológicas y en una decisión salomónica decidí estudiar Bioquímica en la Facultad de Biología de la Universidad de la Habana. Después de 5 maravillosos y difíciles años me gradué con Medalla de Oro. Siendo estudiante de segundo año de la carrera me vinculé en unidades de investigación con el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), uno de los centros latinoamericanos más destacados en ésta área de las ciencias biológicas. Fue así que mi tesis para optar por el título de Licenciado en Bioquímica la realicé en el Departamento de Biotecnología Industrial de este Instituto durante todo el año 1995. Luego de graduado fui contratado como investigador de este departamento, cargo que ocupé por 5 años hasta marzo del año 2000. Mi estancia en el CIGB no solo me permitió formar una base sólida en diferentes temas de biología molecular y biotecnología sino que pude publicar mis primeros artículos científicos en revistas internacionales. También participé en numerosos cursos y congresos internacionales. Con el cambio de milenio vinieron grandes cambios en mi vida y fue así que Chile pasó a ser mi segunda patria. En la Universidad de Chile, y particularmente en el Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología comencé mis estudios doctorales gracias a una beca del DAAD. Durante estos 5 años y gracias a mi trayectoria, la Sociedad Chilena de Bioquímica me eligió en el año 2005 como el mejor estudiante de doctorado del país en las ciencias biológicas, primera ocasión que se le daba esa distinción a un estudiante extranjero. Ahora que hago el recuento no puedo sino agradecer a todas las personas (profesores, familiares y amigos) que han logrado desarrollar en mi las capacidades que me permiten culminar esta Tesis doctoral.

AGRADECIMIENTOS

Mi estancia en esta Universidad ha valido todo el esfuerzo que significó esta tesis doctoral para mí. Por lo tanto quisiera agradecer primeramente a la Universidad de Chile y a todos los profesores del Doctorado, por la formación académica adquirida y por toda la ayuda recibida durante estos años. Particularmente a los miembros de mi Comisión por los cambios e ideas sugeridos que redundaron sin dudas en un mejor manuscrito.

Esta tesis no hubiera sido posible sin el financiamiento otorgado por el Servicio Alemán de Intercambio Académico (DAAD), la Agencia Chilena de Cooperación Internacional (AGCI) y la Iniciativa Científica Milenio (ICM).

Quiero expresar mi agradecimiento especial para al Dr. Carlos Jerez, director de esta tesis, por haberme acogido en su laboratorio cuando mi situación personal era difícil y compleja. También por su ejemplo de pasión por el conocimiento e incansable dedicación para el trabajo científico. Asimismo agradezco al Dr. Nicolás Guiliani, por su rigurosidad científica y sus siempre valiosos comentarios y aportes para este trabajo.

Agradezco a mis compañeros de tesis durante esta travesía y que ahora no están en el laboratorio, Sergio, Pablo y Silvia por haberme hecho más fácil mi adaptación a este maravilloso país gracias al clima de trabajo. A Juan Araos, por su gran corazón e infinita bondad. Y por supuesto a los actuales miembros del laboratorio y en especial a Mario, Panchocu, Felipe y Lissette.

A todos mis hermanos cubanos residentes en Chile y en especial al Cali, que me han permitido, a pesar de los pesares, tener siempre presente nuestra amada isla en el sur del mundo.

Esta tesis está dedicada a mis padres y mi familia en Cuba que aunque no estuvieron físicamente conmigo durante esta tesis doctoral siempre estuvieron en mi corazón y mis pensamientos. Finalmente quisiera agradecer especialmente a mi esposa Alejandra, por su infinito amor, comprensión y financiamiento espiritual.



DEDICATORIA.....	IV
AGRADECIMIENTOS.....	V
LISTA DE FIGURAS.....	VI
LISTA DE TABLAS.....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
RESUMEN.....	XII
ABSTRACT.....	XVI
1. Introducción.....	6
1.1. La contaminación ambiental y la bioremediación de los policlorobifenilos . 6	
1.1.1. Bacterias degradadoras de PCBs.....	7
1.1.2. Adaptaciones fisiológicas de las bacterias degradadoras de PCBs.....	11
1.1.2.1. <i>Movilidad y quimiotaxis</i>	12
1.1.2.2. <i>Biopelículas y comunidades bacterianas</i>	15
1.2. Toxicidad de los PCBs y respuesta al estrés.....	18
1.3. Polifosfatos inorgánicos.....	20
1.3.1. Metabolismo de los poliP en las bacterias.....	23
1.3.2. Los poliP y las condiciones de estrés y carencia.....	25
2. Materiales y Métodos.....	29
2.1. Materiales.....	29
2.1.1. Reactivos.....	29
2.1.2. Cepas bacterianas y medios de cultivo.....	30
2.1.2.1. <i>Cepas degradadoras de PCBs</i>	30
2.1.2.2. <i>Cepas de Escherichia coli</i>	31



2.1.2.3.	<i>Otros microorganismos</i>	32
2.1.2.4.	<i>Medios de cultivo</i>	32
2.1.2.5.	<i>Plasmidios</i>	33
2.2.	<i>Métodos</i>	36
2.2.1.	<i>Métodos de biología molecular</i>	36
2.2.1.1.	<i>Extracción de DNA cromosómico</i>	36
2.2.1.2.	<i>Extracción de DNA plasmidial</i>	36
2.2.1.3.	<i>Electroforesis de DNA en geles de agarosa</i>	36
2.2.1.4.	<i>Purificación de los fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa</i>	37
2.2.1.5.	<i>Cuantificación del DNA</i>	37
2.2.1.6.	<i>Digestiones de DNA con enzimas de restricción</i>	38
2.2.1.7.	<i>Partidores y reacciones de PCR</i>	38
2.2.1.8.	<i>Clonación del gen PPX1r en los vectores pGEM[®]-T Easy y pCR[®]T7/CT-TOPO[®]</i>	40
2.2.1.9.	<i>Clonación del gen PPX1r en los vectores de expresión pMLS7 y pMLBAD</i>	41
2.2.1.10.	<i>Secuenciación del DNA</i>	44
2.2.1.11.	<i>Transformaciones de E. coli</i>	44
2.2.1.12.	<i>Transformaciones de Pseudomonas sp. B4</i>	45
2.2.2.	<i>Métodos de análisis de los poliP</i>	45
2.2.2.1.	<i>Extracción del poliP de las células bacterianas</i>	45
2.2.2.2.	<i>Purificación de la PPK1 recombinante de E. coli</i>	46
2.2.2.3.	<i>Cuantificación de los poliP</i>	47
2.2.2.4.	<i>Análisis de los poliP por electroforesis en geles de poliacrilamida</i>	48



2.2.2.5.	<i>Síntesis y purificación de los poliP in vitro</i>	49
2.2.2.6.	<i>Determinación de la actividad exopolifosfatasa (PPX)</i>	50
2.2.3.	Técnicas de microscopía.....	51
2.2.3.1.	<i>Microscopía electrónica de transmisión (TEM)</i>	51
2.2.3.2.	<i>Análisis dispersivo de rayos-X (EDAX)</i>	52
2.2.3.3.	<i>Espectroscopía de pérdida de energía del electrón (EELS)</i>	52
2.2.4.	Ensayos de movilidad, quimiotaxis y formación de biopelículas.....	52
2.2.4.1.	<i>Swimming (natación)</i>	52
2.2.4.2.	<i>Ensayo modificado de quimiotaxis con capilares</i>	53
2.2.4.3.	<i>Formación de biopelículas</i>	53
2.2.5.	Detección <i>in vivo</i> de las especie reactivas del oxígeno (ROS).....	54
2.2.6.	Métodos de análisis de las proteínas.....	55
2.2.6.1.	<i>Obtención de los extractos crudos de Pseudomonas sp. B4</i>	55
2.2.6.2.	<i>Obtención de los extractos crudos de E. coli</i>	55
2.2.6.3.	<i>Preparación de las muestras para la electroforesis en geles de SDS-PAGE</i>	56
2.2.6.4.	<i>Electroforesis en minigeles de poliacrilamida-SDS</i>	56
2.2.6.5.	<i>Detección inmunológica de las proteínas mediante "Western blot"</i>	57
2.2.6.6.	<i>Determinación cuantitativa de las proteínas</i>	58
2.2.6.7.	<i>Electroforesis bidimensional (2D-PAGE)</i>	58
2.2.6.8.	<i>Selección de proteínas de los geles 2D y secuenciación por espectrometría de masas</i>	59
3.	Resultados	61
3.1.	Los poliP inorgánicos en <i>Pseudomonas sp. B4</i> y su relación con el medio de cultivo y la fase de crecimiento.....	61



3.1.1.	Observación microscópica de los gránulos de poliP	61
3.1.2.	Análisis elemental de los gránulos densos a los electrones.....	63
3.1.3.	Análisis cualitativo y cuantitativo de los poliP de <i>Pseudomonas sp.</i> B4 en diferentes condiciones de crecimiento	68
3.2.	PCBs y estrés en <i>Pseudomonas sp.</i> B4.....	71
3.3.	Obtención de las bacterias incapaces de acumular poliP inorgánicos.....	76
3.3.1.	Diseño y estrategia de los vectores de expresión	76
3.3.1.1.	<i>Subclonación del gen PPX1 de levadura en E. coli</i>	77
3.3.1.2.	<i>Clonación del gen PPX1r en vectores de expresión para Pseudomonas sp. B4</i>	79
3.3.2.	Análisis funcional de la expresión del gen <i>PPX1r</i> en <i>Pseudomonas sp.</i> B4.....	81
3.3.2.1.	<i>Actividad y regulación de la actividad de la exopolifosfatasa exógena de los recombinantes de Pseudomonas sp. B4</i>	84
3.3.2.2.	<i>Contenido de poliP en los recombinantes de Pseudomonas sp. B4</i>	87
3.4.	Caracterización de las bacterias incapaces de acumular poliP inorgánicos .	89
3.4.1.	Movilidad y quimiotaxis en <i>Pseudomonas sp.</i> B4 (poliP-).....	90
3.4.2.	Formación de biopelículas en <i>Pseudomonas sp.</i> B4 (poliP-).....	92
3.4.3.	Crecimiento en bifenilo y morfología de las células de <i>Pseudomonas sp.</i> B4 (poliP-)	95
3.4.4.	Otros fenotipos de las células de <i>Pseudomonas sp.</i> B4 (poliP-).....	99
3.4.5.	Cambios en el proteoma de las células de <i>Pseudomonas sp.</i> B4 (poliP-).....	101
4.	Discusión	106
4.1.	Cambios en los niveles de los poliP en <i>Pseudomonas sp.</i> B4.....	106
4.2.	PCBs, poliP y estrés.....	110



4.3. Obtención y caracterización de las bacterias incapaces de acumular los poliP	113
4.4. Cambios en el proteoma de la <i>Pseudomonas sp.</i> B4 (poliP-)	118
5. Referencias bibliográficas	123
6. Anexos	141



LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vía degradativa de bifenilo y mapa genético del locus <i>bph</i> de <i>B. xenovorans</i> LB400.....	9
Figura 2. Los polifosfatos inorgánicos.....	21
Figura 3. Estrategia de clonación del gen <i>PPX1r</i> de <i>S. cerevisiae</i> en el vector de expresión regulada <i>pMLBAD</i>	42
Figura 4. Estrategia de clonación del gen <i>PPX1r</i> de <i>S. cerevisiae</i> en el vector de expresión constitutiva <i>pMLS7</i>	43
Figura 5. Presencia de gránulos densos a los electrones en las células de <i>Pseudomonas</i> sp. B4 en la fase exponencial del crecimiento.....	62
Figura 6. Presencia de gránulos densos a los electrones en las células de <i>Pseudomonas</i> sp. B4 en la fase estacionaria del crecimiento.....	63
Figura 7. Espectros de análisis de dispersión de energía de rayos-X (EDAX) de las células de <i>Pseudomonas</i> sp. B4.....	64
Figura 8. Espectros EELS de las células de <i>Pseudomonas</i> sp. B4.....	65
Figura 9. Distribución del fosfato en las células de <i>Pseudomonas</i> sp. B4.....	67
Figura 10. Influencia del medio y la fase de crecimiento en la acumulación de poliP en <i>Pseudomonas</i> sp. B4.....	69
Figura 11. Presencia de gránulos de poliP en células de <i>Pseudomonas</i> sp. B4 expuestas a la presencia de clorobifenilos.....	70
Figura 12. Inducción de los niveles de la proteína de estrés GroEL en presencia de bifenilo y clorobifenilos.....	72
Figura 13. Estrés oxidativo en <i>Pseudomonas</i> sp. B4 expuestas a la presencia de bifenilo y clorobifenilos.....	73
Figura 14. Cambios en el tiempo de los poliP, GroEL y ROS en células de <i>Pseudomonas</i> sp. B4.....	75



Figura 15. Subclonación y sobreexpresión del gen PPX1 de <i>S. cerevisiae</i> en <i>E. coli</i>	78
Figura 16. Clonación del gen PPX1r en vectores de expresión para <i>Pseudomonas sp.</i> B4.....	80
Figura 17. Sobreexpresión de la PPX1r en <i>Pseudomonas sp.</i> B4.....	83
Figura 18. Expresión constitutiva y regulada de la PPX1r en <i>Pseudomonas sp.</i> B4	85
Figura 19. Actividad PPX en los extractos crudos de las células recombinantes de <i>Pseudomonas sp.</i> B4.....	86
Figura 20. Contenido de poliP de los recombinantes de <i>Pseudomonas sp.</i> B4.....	88
Figura 21. Movilidad y quimiotaxis en <i>Pseudomonas sp.</i> B4 poliP-.....	91
Figura 22. Formación de biopelículas en <i>Pseudomonas sp.</i> B4 poliP-.....	93
Figura 23. Morfología de las colonias de <i>Pseudomonas sp.</i> B4 poliP-,	93
Figura 24. Crecimiento de las células recombinantes de <i>Pseudomonas sp.</i> B4 en medio M9 con glucosa y bifenilo.....	95
Figura 25. Presencia de gránulos de poliP en las células recombinantes de <i>Pseudomonas sp.</i> B4	97
Figura 26. Presencia de material extracelular en células recombinantes de <i>Pseudomonas sp.</i> B4	99
Figura 27. Efecto de la ausencia de los poliP en la división celular en las células recombinantes de <i>Pseudomonas sp.</i> B4.....	100
Figura 28. Cambios en el proteoma de <i>Pseudomonas sp.</i> B4 recombinante (pS7PPX1).	103
Figura 29. Cambios en el proteoma de <i>Pseudomonas sp.</i> B4 recombinante (pMLS7).	105
Figura 30. Los poliP: una molécula para muchas funciones.....	118



LISTA DE TABLAS

<i>Tabla 1. Cepas degradadoras de PCBs y sus derivadas.....</i>	<i>30</i>
<i>Tabla 2. Cepas de E.coli y sus derivadas.....</i>	<i>31</i>
<i>Tabla 3. Plasmidios empleados en E. coli y Pseudomonas sp. B4.....</i>	<i>33</i>
<i>Tabla 4. Comparación de los niveles de políP encontrados en diferentes microorganismos.....</i>	<i>108</i>



LISTA DE ABREVIATURAS

Amp: Ampicilina

BSA: Seroalbúmina bovina

CAPS: Ácido 3-ciclohexilamino-1-propano

CHAPS: 3-[(3-cholamidopropil)-dimetialmino] propansulfato

DMSO: Dimetil sulfóxido

DO₆₀₀: Densidad óptica a 600 nm

DTT: Ditiotreitól

EDAX: Análisis de Dispersión de Energía de Rayos X

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EELS: Espectro de pérdida de energía del electrón

EFTEM: Microscopía electrónica de barrido acoplada a una espectroscopia de pérdida de energía de los electrones.

EPS: Exopolisacáridos

ESI: Imagen espectroscópica electrónica

ESI-QUAD-TOF: Ionización por electro-spray con analizador de cuádruplo y tiempo de vuelo.

GITC: Isotiocianato de guanidina

HEPES: Ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N²-(etanosulfónico).

IPTG: Isopropil tio-β-D-galactósido

LB: Luria Bertani

MS: Espectrometría de masas

NDK: Dinucleótido quinasa

ORF: Marco abierto de lectura

PAP: Polifosfato AMP fosfotransferasa

PAO: Organismo acumulador de polifosfatos

PCB: Policlorobifenilo

- PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa
- PDVF:** Difloruro de polivinilideno
- PHB:** Poli- β -hidroxibutirato
- Pi:** Fosfato inorgánico
- PMSF:** Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
- poliP:** Polifosfatos inorgánicos
- poliP-:** Células incapaces de acumular polifosfatos inorgánicos
- (p)ppGpp:** Guanosina (penta) y tetrafosfato
- PPK1 y 2:** Polifosfato quinasa 1 y 2
- PPK1r:** PPK1 recombinante de *Escherichia coli*
- PPX:** Exopolifosfatasa
- PPX1r:** Exopolifosfatasa 1 recombinante de *Saccharomyces cerevisiae*
- PVC:** Cloruro de polivinilo
- ROS:** Especies reactivas de oxígeno
- SDS:** Dodecil sulfato de sodio
- SDS-PAGE:** Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturante.
- TAE:** Tris-acetato EDTA
- TBS:** Amortiguador Tris salino
- TEM:** Microscopía electrónica de transmisión
- TLC:** Cromatografía ascendente en capa delgada
- Tmp:** Trimetropin
- Tris:** 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol
- UFC:** Unidades formadoras de colonias
- X-Gal:** 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido
- α -GroEL:** Anticuerpo anti GroEL
- α -His6:** Anticuerpo anti epítipo codificante para 6 histidinas
- Ω :** Ohm
- μ F:** Microfaradios

RESUMEN

Los compuestos organoclorados representan uno de los principales contaminantes orgánicos en el medio ambiente y dentro de estos, particularmente los policlorobifenilos (PCBs) constituyen un problema medioambiental de preocupación debido a sus propiedades recalcitrantes a la degradación, su bioacumulación y toxicidad. La bioremediación bacteriana constituye una estrategia promisoría para la limpieza de los ambientes acuáticos y terrestres contaminados con PCBs.

Cuando los microorganismos son sometidos a condiciones de estrés, acumulan polifosfatos inorgánicos (poliP). La biosíntesis de poliP depende de la polimerización del fosfato terminal del ATP mediante la enzima polifosfato quinasa (PPK1), mientras que la enzima exopolifosfatasa (PPX) es responsable de su hidrólisis. Actualmente, existen numerosas evidencias sobre el papel de los poliP en la regulación de la respuesta de las bacterias frente a cambios ambientales y durante la fase estacionaria de crecimiento.

Teniendo en cuenta la toxicidad de los PCBs para las bacterias que los degradan y el papel de los poliP en los ajustes celulares a las condiciones de carencia y estrés, estudiamos los cambios en el metabolismo de los poliP y su influencia en procesos celulares importantes para la bioremediación de los PCB como la motilidad,

quimiotaxis y formación de biopelículas en la bacteria degradadora de bifenilo *Pseudomonas sp.* B4.

Durante el desarrollo de esta Tesis se determinó en *Pseudomonas sp.* B4 la presencia de gránulos densos a los electrones, crecidas en diferentes fuentes de carbono y en diferentes etapas del crecimiento así como sus variaciones ante trasposos a distintos medios de cultivo. Observamos que *Pseudomonas sp.* B4 acumula una gran cantidad de estos gránulos cuando crecen en todas las fases de crecimiento en bifenilo, y en glucosa sólo cuando las células entran en la fase estacionaria del crecimiento. Mediante el análisis de difracción de rayos-X acoplado a microscopía electrónica demostramos que los gránulos densos a los electrones acumulados por *Pseudomonas sp.* B4, durante su crecimiento en bifenilo como única fuente de carbono, están compuestos principalmente por fosfato y muy probablemente por poliP. Esto se corroboró mediante el empleo de un método enzimático específico para la determinación cuantitativa de los poliP en las células crecidas en las diferentes condiciones.

En esta Tesis sugerimos que estos cambios en los niveles de poliP constituyen un ajuste del metabolismo ante condiciones estresantes para la célula, lo que fue comprobado por el aumento de los niveles tanto de una proteína de estrés general (GroEL) como de las especies reactivas del oxígeno (ROS) cuando las células se enfrentaron a bifenilo y clorobifenilos como únicas fuente de carbono y energía.

Es posible que junto a la respuesta frente a las carencias nutricionales, los gránulos de poliP en *Pseudomonas sp.* B4 sean también una respuesta adaptativa al estrés oxidativo generado durante la degradación de estos compuestos. La capacidad de las células de *Pseudomonas sp.* B4 para detectar estos riesgos tempranamente les permitiría acumular poliP como un sistema de alarma y así activar o aumentar los sistemas de protección.

Para explorar más detalladamente el papel de los poliP en *Pseudomonas sp.* B4 se obtuvieron células recombinantes incapaces de acumular este biopolímero debido a la sobreexpresión de la exopolifosfatasa (PPX1) de *Saccharomyces cerevisiae* mediante el uso de dos vectores de expresión de amplio espectro. La sobreexpresión de la PPX1 nos permitió contar con células incapaces de acumular poliP (poliP-) y de esa forma poder conocer más detalladamente cuál es la función de este biopolímero en los procesos celulares de *Pseudomonas sp.* B4 y particularmente en aquellos relacionados con su crecimiento en bifenilo.

Estas células de *Pseudomonas sp.* B4 incapaces de acumular poliP resultaron deficientes en numerosas procesos celulares, como la motilidad y la quimiotaxis y también en la capacidad de formar biopelículas y en la división celular. También su crecimiento en bifenilo es más lento y alcanza un menor número de células que el cultivo control.

Es quizás una combinación de estas incapacidades fisiológicas lo que podría afectar el crecimiento de *Pseudomonas sp.* B4 poliP– en bifenilo. Frente a la ausencia de poliP, unido a una capacidad ineficiente para utilizar el bifenilo como única fuente de carbono, es probable que la bacteria responda dirigiendo tempranamente el metabolismo hacia la fase estacionaria. Esto respaldaría la importancia de los poliP en *Pseudomonas sp.* B4 cuando crece en bifenilo y clorobifenilos. El poliP puede contribuir a la coordinación de la respuesta frente a las condiciones desfavorables de crecimiento en estos contaminantes organoclorados.

Finalmente, y para tener un estudio preliminar a escala global de la función de los poliP en *Pseudomonas sp.* B4, analizamos comparativamente los cambios que tienen lugar en el proteoma de las bacterias poliP– con respecto a las células controles. Aunque sólo analizamos una condición de crecimiento y secuenciamos sólo aquellas proteínas cuya expresión cambió en mayor magnitud los resultados nos permitieron encontrar nuevas pistas sobre el papel de los poliP en las bacterias. Los cambios en el proteoma de *Pseudomonas sp.* B4 nos permitieron establecer una relación entre los poliP, el ciclo de Krebs y la síntesis de alginato. También encontramos cambios en algunas enzimas relacionadas con la síntesis de los aminoácidos y el estrés oxidativo, aspectos importantes que se refieren a la función energética y regulatoria de los poliP en *Pseudomonas sp.* B4.

ABSTRACT

Organochlorine compounds represent one of the main polluting agents in the environment and particularly polychlorinated-biphenyls (PCBs) constitute an unsolved problem due to their recalcitrant properties to degradation, their bioaccumulation and high toxicity to living organisms. Bacterial bioremediation constitutes a promissory strategy for the cleaning of aquatic and terrestrial environments contaminated with PCBs.

When microorganisms are under stressing conditions, they accumulate inorganic polyphosphate (polyP). Poly P is a linear polymer of many tens or hundreds of orthophosphate (Pi) residues linked by high-energy phosphoanhydride bonds. The biosynthesis of polyP depends on the polymerization of the terminal phosphate of ATP through the action of polyphosphate kinase 1 (PPK1) whereas the enzyme exopolyphosphatase (PPX) is responsible for its hydrolysis. At the moment, numerous evidences exist on the role of polyP in the regulation of the bacterial response to environmental changes and during the stationary phase of growth.

Considering that PCBs are also toxic for the bacteria capable to degrade them and the functions of polyP in the cellular adjustments to conditions of deficiency and stress, we studied the changes in polyP metabolism and its influence in important cellular processes for PCB bioremediation such as motility, chemotaxis

and biofilm formation abilities in the highly motile biphenyl-utilizing bacteria *Pseudomonas sp.* B4.

Electron-dense granules were observed in *Pseudomonas sp.* B4 when grown in different carbon sources and different stages of growth. Particularly, we observed that *Pseudomonas sp.* B4 accumulated a great amount of these granules only when grown in biphenyl in all phases of growth and in glucose only when the cells entered in the stationary phase growth. By means of X-ray diffraction analysis methods (EDAX and EELS) connected to electron microscopy (EM) we demonstrated that the granules accumulated by *Pseudomonas sp.* B4 during growth in biphenyl as the sole carbon source were composed mainly by phosphate and most likely by polyP. This was confirmed by using a specific enzymatic method for the quantitative determination of polyP in the cells observed by EM. In this Thesis we suggested that the changes in the levels of polyP are an adjustment of the cell metabolism to stressing conditions generated during PCBs degradation. This was verified by the increase of the general stress protein (GroEL) and reactive oxygen species (ROS) when cells were in the presence of biphenyl and chlorobiphenyls as the sole carbon and energy sources. In addition to the role of polyP in nutritional deficiencies, the accumulation of polyP in *Pseudomonas sp.* B4 may also be an adaptive response to the oxidative stress generated during the degradation of these compounds. By sensing any cellular stress, even at an early stage of growth,

Pseudomonas sp. B4 can sound an alarm by accumulating polyP, which will then activate or augment several protective systems. To further explore the role of polyP in *Pseudomonas sp.* B4 we obtained recombinant cells unable to accumulate this biopolymer. This was achieved by the overexpression of the exopolyphosphatase (PPX1) from *Saccharomyces cerevisiae* with two wide-range expression vectors. This overexpression of PPX1 allowed us to obtain cells in which more than 95% of the cellular polyP was removed.

Pseudomonas sp. B4 incapable of accumulating polyP (polyP⁻) were deficient in numerous cellular processes such as motility, chemotaxis, cellular division and in the ability to form biofilm. In addition, it was affected on its growth in biphenyl as the sole carbon source. It is perhaps a combination of these physiological incapacities that could affect the growth of *Pseudomonas sp.* B4 (polyP⁻) in biphenyl. The absence of polyP, confirmed by EM and quantification of the biopolymer, together with the inefficient use of the insoluble carbon source, constitute a cellular response directing metabolism towards the stationary phase of growth. The results obtained endorse the importance of polyP when *Pseudomonas sp.* B4 is grown in biphenyl and chlorobiphenyl as the sole carbon and energy sources. PolyP probably coordinates their answer to the unfavorable growth conditions in these organochlorinated compounds.

Finally, to have a preliminary global view of the role of polyP in *Pseudomonas sp.* B4, we analyzed comparatively the changes taking place in the proteome of the polyP- cells as compared with control cells. Although we analyzed only one condition of growth and sequenced only those proteins whose expression changed in a greater magnitude, the results obtained allowed us to discover new findings of the role of polyP in bacteria. We found a relationship between polyP, the Krebs cycle and the synthesis of alginate. We also found changes in enzymes involved in amino acids synthesis and oxidative stress, both important aspects that confirm the role of polyP not only in energy supply but also in the coordination of cellular responses in *Pseudomonas sp.* B4.

1. Introducción

1.1. La contaminación ambiental y la bioremediación de los policlorobifenilos

La contaminación ambiental con los compuestos orgánicos es un problema de creciente importancia en el mundo (Timmis, *et al.*, 1994). La industrialización y la globalización han permitido alcanzar un alto desarrollo socioeconómico en diferentes regiones geográficas del mundo. Esto ha originado la contaminación deliberada o accidental del entorno con diferentes compuestos químicos sintéticos, lo cual ocasiona un dramático impacto en los ecosistemas y la calidad de vida del hombre. Esta contaminación no solo ha afectado a las regiones más industrializadas, sino que también constituye un problema para toda la biosfera.

En general, se supone que todos los compuestos orgánicos de origen biosintético son degradados por los microorganismos nativos. En contraste, los xenobióticos, que son compuestos creados por el hombre y que difieren de la estructura de las moléculas naturales, son más difícilmente degradados por los microorganismos, debido a que ha transcurrido un tiempo insuficiente para la evolución de los sistemas enzimáticos requeridos (Gibson y Subramanian, 1984).

Los compuestos organoclorados representan uno de los principales contaminantes orgánicos en el medio ambiente (Tiedje *et al.*, 1993), constituyendo los policlorobifenilos (PCBs) uno de los contaminantes organoclorados más importantes

(Pieper y Reineke, 2000). Por su parte, el bifenilo es un compuesto aromático utilizado como fungicida en la agricultura y como sustrato industrial en las síntesis orgánicas y ha sido utilizado para estudios de biodisponibilidad y biodegradación de suelos contaminados con policlorobifenilos (PCBs) (Wu *et al.*, 2003; Pieper, 2005). En el medio ambiente, la contaminación con PCBs se presenta en forma de mezclas complejas de congéneres (Boyle *et al.*, 1993), y por ende, la biodegradación de estos compuestos requiere de sistemas enzimáticos capaces de degradar este amplio rango de sustratos.

Chile no está exento de estos problemas y numerosos estudios han encontrado altos niveles de PCBs en diversos ecosistemas contaminados (Mandakalis y Stephanou, 2002; Barra *et al.*, 2004). Teniendo en cuenta que recientemente el Parlamento chileno ratificó el Convenio de Estocolmo que Chile había suscrito en 1999, donde se prohíbe el uso de los PCBs y también se plantea su remoción de los sitios contaminados, debiera prestársele más atención científica a las consecuencias de la presencia de estos contaminantes en los ecosistemas chilenos y su posible descontaminación.

1.1.1. Bacterias degradadoras de PCBs

Algunas bacterias capaces de utilizar el bifenilo como única fuente de carbono son capaces de metabolizar los PCBs a sus respectivos clorobenzoatos mediante la vía oxidativa de la oxidación del bifenilo (Figura 1). Muchas bacterias aisladas de diferentes partes del mundo son capaces de degradar un amplio rango de PCBs y sus determinantes genéticos han sido estudiados (Furukawa *et al.*, 2004). Los

microorganismos que son capaces de degradar estos congéneres pertenecen predominantemente a los géneros *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Arthromobacter*, *Moraxella* y *Rhodococcus*.

El microorganismo modelo para la degradación de los PCBs se aisló a comienzos de los años 90 y se denominó *Pseudomonas sp.* LB400. Actualmente reclasificada como *Burkholderia xenovorans* LB400, la secuencia de su genoma (9,7 Mb) se conoce completamente (Denef *et al.*, 2004) y estudios posteriores de proteómica y genómica funcional han dado nuevas pistas de cómo este microorganismo coordina su respuesta global para la degradación de estos compuestos (Denef *et al.*, 2004, 2005, 2006).

B. xenovorans LB400 y otras bacterias que degradan PCBs presentan el locus *bph*, un operón involucrado en la degradación de los PCBs (Hofer *et al.*, 1993; Erickson y Mondello, 1992). Los genes del locus *bph* (*bphA1*-*bphA4*, *bphB*, *bphC* y *bphD*) codifican tanto para las proteínas de la vía superior de degradación de bifenilo a benzoato y 2 hidroxipenta-2,4-dienoato como aquellas de la vía alifática inferior que convierte este último compuesto en intermediarios del ciclo de Krebs (Figura 1, Hofer *et al.*, 1993). Las proteínas codificadas por los genes *bphA1*-*A4* conforman un complejo enzimático de dioxigenasas que convierte el bifenilo en dihidrodiol, el que es transformado por la dihidrodiol deshidrogenasa (*bphB*) a 2,3-dihidroxibifenilo. Otra dioxigenasa (*bphC*) rompe al anillo del 2,3-dihidroxibifenilo a un compuesto de color amarillo (ácido 2-hidroxi-6-oxo-fenilhexa-2,4-dienoico) que luego es transformado a benzoato y ácido pentanoico por *bphD* (Furakawa *et al.*, 1990; 2004). Además de *B. xenovorans* LB400,

otra bacteria muy estudiada como *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 presenta un rango diferente de congéneres de PCBs que puede degradar. El rango de congéneres de PCBs que es capaz de oxidar *B. xenovorans* LB400 es más amplio que el de *P. pseudoalcaligenes* KF707, la que sin embargo tiene una mayor actividad sobre los compuestos di y para sustituidos que la cepa LB400 (Gibson *et al.*, 1993).

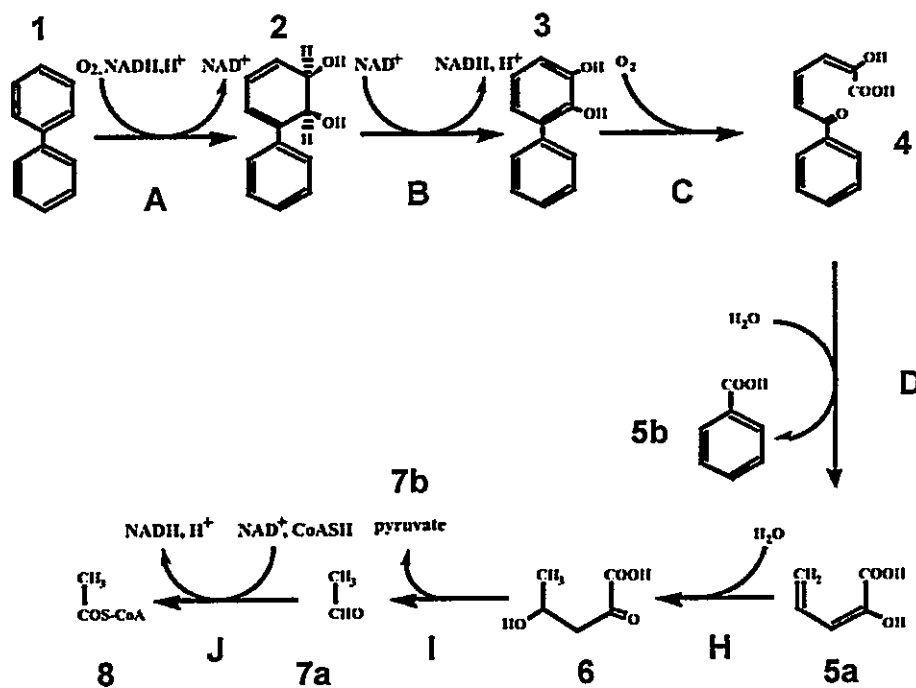


Figura 1. Vía para la degradación del bifenilo y el mapa genético del locus *bph* de *B. xenovorans* LB400. Metabolitos de la vía: 1: bifenilo; 2: bifenilo-2,3-dihidrodiol; 3: 2,3-dihidroxi-bifenilo; 4: ácido 2-hidroxi-6-oxo-fenilhexa-2,4-dienoico; 5a: ácido 2-hidroxipenta-2,4-dienoico; 5b: ácido benzoico; 6: ácido 4-hidroxipenta-2,4-dienoico; 7a: acetaldehído; 7b: ácido pirúvico; 8: acetil-CoA. Enzimas (genes): A: bifenilo-2,3-dioxigenasa (*bphA1A2A3A4*); B: bifenilo-2,3-dihidrodiol-2,3-deshidrogenasa (*bphB*); C: 2,3-dihidroxi-bifenilo-1,2-dioxigenasa (*bphC*); D: 2-hidroxi-6-oxo-6-fenilhexa-2,4-dienoato hidrolasa (*bphD*); H: 2-hidroxipenta-2,4-dienoato hidratasa (*bphH*); I: 4-hidroxi-2-oxoalderato aldolasa (*bphI*); J: acetaldehído deshidrogenasa (*bphJ*).

También nuevos aislados como *Pseudomonas sp.* B4 (Río Elba, Alemania) se han estudiado tanto a nivel molecular como fisiológico y forman parte de este trabajo de tesis doctoral (Bartels *et al.*, 1999).

Teniendo en cuenta no solo los aspectos bioquímicos y genéticos de la degradación de los PCBs sino también los ajustes metabólicos y fisiológicos que hacen las bacterias durante el proceso de bioremediación, el microorganismo ideal para la bioremediación de los PCBs debe cumplir las siguientes características:

- Ser capaz de expresar constitutivamente las enzimas necesarias para la degradación.
- Poseer enzimas con amplio rango de sustratos.
- Catalizar la degradación de PCBs sin acumular intermediarios tóxicos.
- Ser tolerante a los PCBs.
- Ser capaz de producir surfactantes para solubilizar los PCBs.
- Poseer quimiotaxis hacia los PCBs.
- Sobrevivir y propagarse en el sitio contaminado hasta la total eliminación de los PCBs.

Si bien se conoce mucho acerca del metabolismo y la enzimología que presentan estos microorganismos que les permite degradar estos compuestos, poco se conoce acerca de los ajustes fisiológicos y metabólicos que tienen que realizar estos microorganismos para degradar y adaptarse al crecimiento en estos compuestos organoclorados.

1.1.2. Adaptaciones fisiológicas de las bacterias degradadoras de PCBs

En las pasadas décadas han sido descubiertos muchos microorganismos capaces de mineralizar una gran variedad de compuestos. En muchos de estos casos, se conoce tanto los determinantes genéticos como bioquímicos de las vías catabólicas involucrados en el proceso de bioremediación (Ohtsubo *et al.*, 2004).

Numerosos estudios con bacterias tanto Gram negativas como Gram positivas capaces de utilizar bifenilo como única fuente de carbono han creado las bases bioquímicas y genéticas para la bioremediación de los PCBs. (Abramowicz, 1990; Brenner *et al.*, 1994; Furukawa, 1994). Es por lo tanto muy probable esperar que los avances biotecnológicos permitan obtener mejores cepas degradadoras para disminuir las limitaciones y los costos del proceso (Abraham *et al.*, 2002; Ohtsubo *et al.*, 2004; Pieper, 2005).

Una propiedad celular fundamental es la capacidad de responder al cambio medioambiental y particularmente ésta es más importante en los organismos unicelulares cuyo contacto con ese medio ambiente es de forma directa. A través de la evolución, los microorganismos desarrollaron mecanismos que les permitieron censar los cambios en el medio ambiente y regular sus funciones celulares de acuerdo al entorno (Storz y Hengge-Aronis, 2000).

Algunos procesos celulares en las bacterias capaces de degradar los PCBs influyen en su biodisponibilidad y por ende, en las etapas de la bioremediación. La capacidad de adherencia a las superficies sólidas, la hidrofobicidad celular, la producción de

biosurfactantes, así como la movilidad y los procesos quimiotácticos son características que reducen las distancias entre la bacteria y el sustrato sólido y permiten que la bacteria pueda buscar nuevos sustratos una vez que se hayan mineralizado en un sitio contaminado. A su vez, estas características son las que han permitido la creación de verdaderos consorcios bacterianos muy importantes en el desarrollo de biotecnologías asociadas a la bioremediación (Ohtsubo *et al.*, 2004; Pieper, 2005).

Paradójicamente, otra propiedad celular importante es la pérdida de las capacidades antes mencionadas durante los procesos de especialización ecológica. Por ejemplo, durante los cambios que sufre un microorganismo desde su aislamiento en los habitats naturales hasta las condiciones de investigación y conservación en el laboratorio causan la pérdida de algunos mecanismos de “socialización” bacteriano. Después de numerosas siembras consecutivas en cultivos líquidos se pueden seleccionar muchos mutantes en los mecanismos de comunicación celular, incluyendo los genes relacionados con la movilidad (Velicer, 1999; Velicer *et al.*, 1998; 2000; 2002). También se ha visto que la producción de exopolisacáridos y de estructuras aéreas es más robusta en biopelículas de aislados bacterianos recientes que de cepas de laboratorio, indicando claramente que los mecanismos de multicelularidad se pierden durante de la “domesticación” en las condiciones de laboratorio (Zinser *et al.*, 2003).

1.1.2.1. *Movilidad y quimiotaxis*

La movilidad sirve a los microorganismos para la búsqueda de nutrientes evitando los compuestos citotóxicos y además para encontrar las superficies adecuadas para la

agregación celular. Esto le permite responder directamente a los cambios ambientales y temporales de diferentes estímulos. La quimiotaxis, definida como el movimiento bacteriano bajo la influencia de un gradiente químico de concentración, ya sea a favor (positiva) o en contra (negativa), ayuda a las bacterias a encontrar las condiciones favorables para el crecimiento y sobrevivencia celular (Stock y Surette, 1996).

Muchos de los estudios sobre la quimiotaxis bacteriana se han concentrado en las sustancias hidrofílicas, generalmente nutrientes celulares (Stock y Surette, 1996). Sin embargo, en la última década se ha encontrado que muchos compuestos contaminantes son atrayentes para las bacterias que son capaces de catabolizarlos. Estas habilidades quimiotácticas han sido caracterizadas y en muchas ocasiones se han aislado los genes involucrados (Pandey y Jain, 2002; Parales y Harwood, 2002). Es evidente que la quimiotaxis es una ventaja selectiva que permite a las bacterias censar y localizar los contaminantes a degradar.

Recientemente se demostró que el bifenilo es un compuesto atrayente para las bacterias degradadoras de bifenilos *Pseudomonas putida* P106 y *Rhodococcus erythropolis* NY05 (Wu *et al.*, 2003). En resultados de nuestro laboratorio no solo corroboramos este fenómeno en *Pseudomonas sp.* B4 con el bifenilo, sino también mediante ensayos de capilares y movilidad en placas de cultivo también demostramos que derivados clorados, incluido los PCBs, son atrayentes (Gordillo *et al.*, resultados no publicados).

Por su parte, los clorobenzoatos son intermediarios que se forman durante la degradación de los PCBs y otros compuestos organoclorados y se acumulan en algunas

bacterias degradadoras de PCBs (Abramowicz, 1990, Abraham *et al.*, 2002). Para una bacteria incapaz de degradar estos compuestos como la *Pseudomonas putida* PRS2000, el 3- y el 4- clorobenzoato son atrayentes solo cuando la bacteria crece previamente en benzoato o 4-hidroxibenzoato (Harwood, 1989; Harwood *et al.*, 1990). Los genes relacionados con la quimiotaxis “fortuita” e inducible a compuestos que no constituyen fuentes de carbono o energía para la bacteria se encuentran usualmente en plasmidios catabólicos autotransmisibles (Harwood y Ornston, 1984). Esto representa una ventaja adaptativa, pues mediante la quimiotaxis y la transferencia de material genético se puede facilitar la transferencia de estos plasmidios catabólicos a bacterias que no posean la capacidad de degradar clorobenzoatos (Harwood y Ornston, 1984).

Finalmente, se ha demostrado que la quimiotaxis puede influir positivamente en el proceso de bioremediación de compuestos orgánicos contaminantes. En el caso del naftaleno la quimiotaxis positiva de *Pseudomonas putida* G7 aumentó la degradación de este compuesto tanto desde capilares en fase acuosa como desde líquidos de fase no acuosa (del inglés NAPL) (Marx y Aitken, 2000; Law y Aitken, 2003). Los NAPLs constituyen material orgánico extraído desde sitios contaminados y constituyen un reto para la bioremediación de sitios contaminados. También la quimiotaxis de *P. putida* G7 incrementa la tasa de degradación de naftaleno comparativamente con mutantes deficientes en la movilidad y la quimiotaxis (Law y Aitken, 2003).

1.1.2.2. *Biopelículas y comunidades bacterianas*

Las comunidades bacterianas son la forma más común en que existen los microorganismos en sus ambientes y presentan un alto grado estructural (O'Toole *et al.*, 2000). Estas estructuras multicelulares construidas por los microorganismos y asociadas a una superficie se denominan biopelículas. La estructura exacta y la fisiología de cada biopelícula dependen de la naturaleza del medio ambiente y de los microorganismos residentes (Stanley y Lazazzera, 2004; Branda *et al.*, 2005). Los minerales de arcilla son esenciales en la formación de biopelículas como un intermediario para la transferencia de nutrientes desde los PCBs a una forma más conveniente para la bacteria, y se sugiere que pueda realizar una función similar en los suelos contaminados. Recientemente, se observó la formación *de novo* de comunidades microbianas conformadas por bacterias degradadoras de PCBs y minerales de arcilla (Lünsdorf *et al.*, 2000a; 2000b).

La importancia de las relaciones comensales en la estructura especial se demostró en biopelículas compuestas por microorganismos con el potencial de interactuar para la eficiente degradación de los PCBs (Nielsen *et al.*, 2000). La cepa altamente móvil *Pseudomonas sp.* B13(FR1) puede metabolizar clorobenzoatos, los que son acumulados por *B. xenovorans* LB400 cuando degrada clorobifenilos. Interesantemente, el acercamiento espacial de *Pseudomonas sp.* B13(FR1) a *B. xenovorans* LB400 en el consorcio solo ocurre cuando se crece en clorobifenilo como única fuente de carbono. Otro aspecto importante en esta relación espacial es la movilidad y la quimiotaxis, pues

mutantes inmóviles de *Pseudomonas sp.* B13(FR1) no tuvieron ese acercamiento espacial en la biopelícula (Nielsen *et al.*, 2000).

La baja biodisponibilidad de los PCBs es debida a sus características de alta hidrofobicidad y muy baja solubilidad en agua. Uno de los mecanismos que los microorganismos utilizan para enfrentar esta barrera es la producción de biosurfactantes que aumentan el área de superficie entre el sustrato hidrofóbico y la bacteria. Por una parte aumentan la biodisponibilidad al incrementar la solubilidad del sustrato y a su vez coordinan la adhesión y separación del microorganismo de la superficie sólida (Sim *et al.*, 1997; Ron y Rosenberg, 2001). En el caso de la biodegradación de los PCBs, los resultados en el uso de diferentes biosurfactantes como lipopéptidos (Golyshin *et al.* 1999), ésteres de maltotriosa (Ferrer *et al.*, 2003) y surfactantes producidos químicamente (Singer *et al.*, 2000) han sido variables ya que produce en ocasiones un incremento en el grado de degradación y en otras una disminución. Sin dudas, teniendo en cuenta que el uso de algunos surfactantes produce cambios en la composición de la comunidad bacteriana y particularmente en la población degradadora (Colores *et al.*, 2000) y también produce una disminución de la adhesión bacteriana a las superficies (Stelmack *et al.*, 1999), el efecto neto de su uso en la degradación de los PCBs dependerá de un balance adecuado entre los beneficios al incrementar la solubilidad de los PCBs y las desventajas en cuanto a la disminución de la adhesión bacteriana a estos compuestos (Billingsley *et al.*, 1999). Interesantemente, con el uso simultáneo de bacterias genéticamente modificadas con la capacidad de

degradar, tanto los PCBs, como los surfactantes químicos, se lograron un incremento simultáneo de la población degradadora de PCBs y de la biodisponibilidad del contaminante (Lajoie *et al.*, 1992; 1997).

El nivel de biodegradación individual de cada congénere en la mezcla de los PCBs depende significativamente de su concentración inicial y de la composición y complejidad de la mezcla de PCBs (Bedard y Quensen, 1995). Los estudios sobre los productos de la biodegradación aeróbica de los PCBs en numerosas bacterias (Massé *et al.* 1989; Bedard y Haberl 1990; Maltseva *et al.*, 1999; Drenzek *et al.*, 2004) permitió establecer las bases para el diseño de comunidades bacterianas efectivas en bioreactores degradadores de PCBs (Kastanek *et al.*, 2004; Fava *et al.*, 1996; 2000).

La importancia del estudio de las biopelículas de comunidades degradadoras de PCBs se puede ilustrar con el diseño de un reactor anaeróbico/aeróbico de una sola etapa capaz de degradar la mezcla comercial Aroclor 1242. El contacto cercano de los microorganismos anaeróbicos con los aeróbicos en la biopelícula granular facilita el intercambio de metabolitos, lo que incrementa la estabilidad y el funcionamiento de la comunidad para la eliminación secuencial del Aroclor 1242 (Tartakovsky *et al.*, 2001). Los diversos cambios que ocurren en la comunidad degradadora de PCBs en respuesta a diferentes condiciones ambientales se puede monitorear *in situ* por técnicas moleculares basadas en el análisis de las secuencias de RNAr 16s (Ej. ARDRA, DGGE, TRFLP, del inglés amplified ribosomal DNA restriction analysis; denaturing gradient gel electrophoresis y terminal restriction fragment length polymorphism

,respectivamente) (Nogales *et al.* 2001, Watts *et al.*, 2001). Sin embargo, el modo exacto en que los PCBs son degradados por las comunidades microbianas bajo condiciones ambientales requiere de otras investigaciones.

1.2. Toxicidad de los PCBs y respuesta al estrés

Los PCBs presentan desde un aspecto aceitoso hasta de resinas duras y cristales blancos, dependiendo del grado de cloración de la molécula. Sus propiedades fisicoquímicas dependen del grado de cloración del anillo y estas características los hacen muy termoestables, difícilmente biodegradables y altamente tóxicos. Entre los 209 congéneres de PCBs sintetizados por el hombre existen algunos con muy alta toxicidad (Kimbrough, 1995).

Muchos estudios han discutido detalladamente la influencia de los PCBs en diversas enfermedades humanas tales como el cáncer, efectos neurotóxicos, tiroides anormales y disfunción inmune y bajo peso en los niños al nacimiento (Kimbrough y Krouskas, 2003). También constituye un serio problema medioambiental la toxicidad de algunos congéneres de los PCB tanto en ambientes terrestres como acuáticos (Seegal, 1996). La exposición a PCBs y otros compuestos aromáticos halogenados, particularmente durante la exposición en la gestación y la lactancia, inducen disfunciones del comportamiento tanto en animales de laboratorio como en residentes de los sitios contaminados. Aunque muchos trabajos genéticos, enzimológicos y bioquímicos han permitido dilucidar los mecanismos involucrados en la degradación de los PCBs y crear las bases para la bioremediación de estos contaminantes, mucho menos se conoce de

los cambios fisiológicos y los mecanismos celulares que tienen lugar en estas bacterias en respuesta a la presencia de estos compuestos organoclorados.

En algunas bacterias las proteínas de estrés relacionadas con un estímulo se pueden inducir durante la exposición a otros. Por ejemplo, las proteínas relacionadas con el estrés térmico también se inducen cuando las células se exponen a peróxido de hidrógeno (VanBogelen *et al.*, 1987; Dukan y Touati, 1996), luz UV (VanBogelen *et al.*, 1987), o agentes químicos incluyendo compuestos aromáticos (Ramos *et al.*, 1995; Vercellone-Smith y Herson, 1997). También, las células de *E. coli* en un ambiente con deficiencias nutricionales se desarrolla un estado de resistencia a varias condiciones de estrés, tales como el oxidativo, el osmótico y de temperatura (Matin, 1991).

El metabolismo aerobio produce subproductos reactivos tales como el peróxido y el superóxido de hidrógeno que están implicados en la generación de radicales libres citotóxicos que generan un estrés oxidativo en la célula (Imlay *et al.*, 1988; Imlay y Linn, 1988). Algunos compuestos organoclorados, incluidos los PCBs, generan una condición de estrés oxidativo en varios sistemas biológicos (Voie y Fonnum, 2000; Coteur *et al.*, 2001; Mariussen *et al.*, 2002; Ruiz-Leal y George, 2004).

Por otra parte, no solamente el bifenilo y sus cloroderivados, sino también sus intermedios metabólicos tales como los dihidrodioles, dihidroxibifenilos y catecoles son altamente tóxicos para las bacterias. Producto de la acumulación de estos intermedios metabólicos de la degradación de los PCBs en células recombinantes de *E. coli* que expresan subconjuntos de los genes del locus *bph* de *B. xenovorans* LB400, la viabilidad

de las células fue incluso menor que en presencia de los clorobifenilos mismos (Cámara *et al.*, 2004). La viabilidad de las células de *B. xenovorans* LB400 y *E. coli* expuestas directamente a 2,3-dihidroxibifenilo también disminuyó considerablemente. También los hidroxibifenilos inhiben la separación celular mientras continúa la replicación del DNA lo que incrementa el contenido de células con el doble de cromosomas (Hiroaka y Kimbara, 2002; Hiraoka *et al.*, 2002). Al igual que los dihidroxibifenilos, los catecoles en presencia de oxígeno molecular y combinado con metales pesados (Ej. Cu^{2+} , Fe^{3+}) pueden también causar daño oxidativo en el DNA (Schweigert *et al.*, 2001). Desde microorganismos a mamíferos, las reacciones químicas y los amplios modos de acción de estos intermediarios pueden ser los responsables de su toxicidad.

Por lo tanto es muy importante para la sobrevivencia de las bacterias degradadoras de PCBs no solo transformar sino mineralizar estos compuestos durante los procesos de biodegradación y bioremediación.

1.3. Polifosfatos inorgánicos

La principal fuente de energía en las bacterias como en la mayoría de los organismos vivos es el ATP, pero existen otras moléculas capaces de sustituir sus funciones como el polifosfato (poliP). Este es un polímero lineal formado por decenas y centenas de residuos de ortofosfato unidos por enlaces fosfoanhídrido ricos en energía (Figura 2; Kornberg, 1995, 1999; Kornberg *et al.*, 1999a y b).

Siendo el fosfato (Pi) un nutriente esencial, muchos organismos incluyendo bacterias, hongos, plantas y animales almacenan Pi y energía en la forma de poliP (Kornberg, 1995).

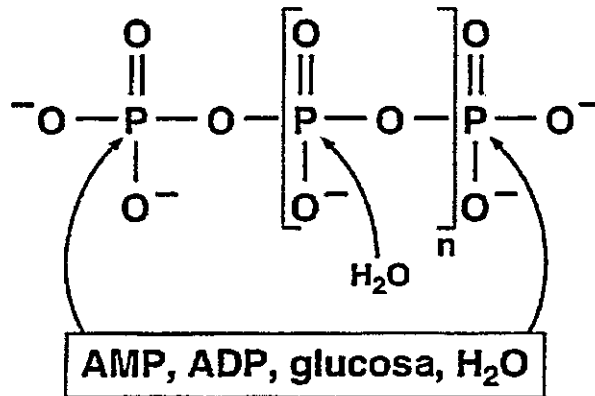


Figura 2. Los polifosfatos inorgánicos. *n* representa el número de los residuos de fosfato.

Aparte de sus funciones obvias de reserva energética y de Pi, la regulación y función de los poliP en los seres vivos permaneció desconocida por muchos años debido a la falta de métodos analíticos específicos. Las primeras descripciones de poliP dan cuenta de la presencia de gránulos metacromáticos en los microorganismos. Estas partículas teñidas de rosa con colorantes básicos fueron llamadas “volutina” (Meyer, 1904) y se los confundía con ácidos nucleicos. Luego, con el advenimiento de la microscopía electrónica los poliP se observaron como gránulos densos a los electrones que desaparecían rápidamente bajo el haz de electrones, diferenciándose así de la cromatina (Wiame, 1947). Actualmente los poliP se han encontrado en todos los seres vivos en los que se ha buscado: bacterias, hongos, protistas, plantas y animales (Kumble y

Kornberg, 1996; Wood y Clarck, 1988) y también en arqueas (Scherer y Bochem, 1983; Rudnick *et al.*, 1990).

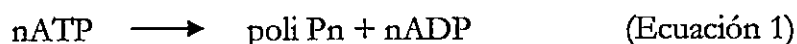
En bacterias, los poliP son principalmente citoplasmáticos, aunque se han encontrado asociados a otras estructuras celulares y se les puede observar como gránulos densos a los electrones o en forma soluble (Kulaev y Kulakovskaya, 2000). También existen pequeñas cantidades de poliP en las membranas plasmáticas en complejo con poli- β -hidroxibutirato (PHB) y calcio (Reusch y Sadoff, 1988; Castuma *et al.*, 1995). En eucariontes, los poliP se encuentran en distintos compartimentos celulares como vacuolas, pared celular y núcleo (Kulaev y Kulakovskaya, 1999; 2000).

Dentro de las funciones que se le han asignado en los microorganismos se encuentran las siguientes: 1) fuente de energía en la síntesis de ATP; 2) sustituto del ATP en la fosforilación de la glucosa y de algunas proteínas; 3) reserva de Pi; 4) ventaja osmótica sobre el Pi, debido a que como polímero ofrece baja solubilidad en agua; 5) quelante de cationes divalentes; 6) amortiguador intracelular de iones alcalinos en algunos microorganismos; 7) elemento estructural junto con el poli- β -hidroxibutirato y el Ca²⁺ en la membrana de células competentes para la transformación bacteriana; 8) regulador del desarrollo celular debido a que se ha encontrado que el poliP y las actividades enzimáticas involucradas en su metabolismo se modifican durante los cambios en el desarrollo de algunos microorganismos en respuesta a la deficiencia de uno o varios nutrientes; 9) componente de la cápsula bacteriana que podría contribuir en la patogénesis de la infección (Kornberg, 1995, 1999; Kornberg *et al.*, 1999).

1.3.1. Metabolismo de los poliP en las bacterias

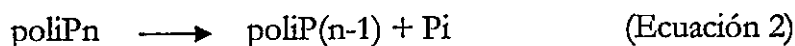
El nivel de los poliP presenta notables variaciones dependiendo de la condición fisiológica y/o ambiental en que se encuentren las bacterias (Kornberg *et al.*, 1999). Esto sugiere la existencia de enzimas responsables de su síntesis y degradación y de cuya actividad dependen las fluctuaciones observadas en las diferentes condiciones.

Los niveles celulares de los poliP en bacterias son regulados por dos tipos de enzimas, quinasas y fosfatasas. La única vía establecida hasta el momento para la biosíntesis de poliP en las bacterias es la polimerización del fosfato terminal del ATP mediante la enzima polifosfato quinasa (PPK1) según la reacción reversible:



La PPK1 de *E. coli* ha sido purificada y su gen clonado y secuenciado (Ahn y Kornberg, 1990; Akiyama *et al.*, 1992). La enzima es un homotetrámero con subunidades de 80 kDa, asociada a membranas. El gen estructural de la PPK1, que está presente en varios genomas bacterianos, presenta un alto grado de similitud entre distintas especies (Tzeng y Kornberg, 1998).

En *E. coli*, el gen *ppk1* es parte de un operón en el cual se encuentra río abajo un segundo gen cuyo producto es una exopolifosfatasa (PPX) que hidroliza los residuos terminales de poliP liberando Pi (Akiyama *et al.*, 1993) según la siguiente reacción:



Además de la PPK1 y la PPX, otras enzimas podrían contribuir a la síntesis y degradación del poliP en bacterias. Por ejemplo, se ha detectado actividad 1,3-difosfoglicerato-poliP fosfotransferasa (Kulaev *et al.*, 1999) y se ha caracterizado una enzima, la polifosfato glucoquinasa que es capaz de utilizar el poliP como sustituto de ATP en reacciones de fosforilación de glucosa en algunas bacterias (Hsieh *et al.*, 1993). Incluso recientemente se identificó una glucoquinasa estrictamente dependiente de poliP (Tanaka *et al.*, 2003).

Recientemente en *P. aeruginosa* se descubrió una nueva actividad PPK (PPK2) residente en una polinucleótido quinasa (NDK) que difiere de la PPK1 en dos aspectos fundamentales (Zhang *et al.*, 2002). Primero la PPK2 utiliza los poliP para generar GTP a una tasa 75-veces mayor que la síntesis de poliP a partir de GTP. Para la PPK1 es justo lo contrario, la síntesis de poliP está 4-veces favorecida sobre la utilización de poliP. El otro aspecto es la selectividad por los nucleótidos de guanosina y adenosina: la PPK2 utiliza GTP y ATP indistintamente en la síntesis de poliP, mientras que la PPK1 usa estrictamente ATP. Sin embargo en el uso de los poliP para la actividad NDK, la PPK2 prefiere GDP sobre ADP, y la PPK1 prefiere 30-veces el ADP sobre el GDP. Así, la PPK2 pareciera estar diseñada para la síntesis de GTP a partir de poliP y en contraste, la PPK1 favorece la síntesis de poliP exclusivamente a partir de ATP. Curiosamente, la PPK2 de *P. aeruginosa* se induce 100-veces cuando el cultivo alcanza la

fase estacionaria, un momento en que la síntesis de GTP es necesaria para la síntesis de alginato, el exopolisacárido (EPS) que envuelve la bacteria (Zhang *et al.*, 2002; Ishige *et al.*, 2002).

1.3.2. Los poliP y las condiciones de estrés y carencia

La dinámica de acumulación y utilización de los poliP sugiere que las principales funciones de esta molécula deben ser actuar como fuente de energía y reserva de Pi. Sin embargo, la asociación de la acumulación de poliP con la limitación de algunos nutrientes e incluso con condiciones de estrés, sugiere que probablemente el poliP sea un enlace entre estas situaciones y los sistemas globales de respuesta (Kornberg *et al.*, 1999).

Los poliP juegan una función esencial en la homeostasis de Pi en la célula. El Pi se mantiene dentro de las células en un rango cerca de los 5 mM y sin embargo gracias al poliP, la célula puede enfrentar cambios en el medio de 5 órdenes de magnitud: 0.01-1000 mM. También por su condición de polianión, puede unir una amplia variedad de cationes, específicamente Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , y Fe^{3+} , e influenciar en sus funciones biológicas y también puede secuestrar metales tóxicos, tales como Cd^{2+} y Hg^{2+} , y ayudar en su remoción (Keasling, 1997; Renninger *et al.*, 2004; Alvarez y Jerez, 2004, Remonsellez *et al.*, 2005).

Existen otras funciones del poliP, como por ejemplo participar en la regulación de la expresión de ciertos genes tales como *rpoS*, un factor sigma de fase estacionaria (Shiba *et al.*, 1997) y de los genes SOS, sistema global de respuesta ante distintos tipos

de estrés (Tsutsumi *et al.*, 2000). Recientemente y relacionado con la respuesta restringida (“*stringent response*”) se demostró que la proteasa Lon de *E. coli* forma un complejo con el poliP. Este complejo es responsable de la degradación específica de algunas proteínas ribosomales en respuesta a la carencia de aminoácidos que ocurre durante la fase estacionaria de crecimiento (Kuroda *et al.*, 2001). Este fenómeno sugiere que el poliP es importante en los ajustes celulares ante las condiciones de carencia y estrés que se genera en esa fase de crecimiento celular (Kuroda, 2006; Rao y Kornberg, 1999).

Otro ejemplo de la relación de los poliP con el estrés se demuestra en células mutantes con interrupciones en el gen *ppk1* de *E. coli*, que no solo son incapaces de sobrevivir durante la fase estacionaria de crecimiento sino también son mucho menos resistentes al calor, presencia de oxidantes, cambios osmóticos, antibióticos y luz UV (Crooke *et al.*, 1994; Rao y Kornberg, 1996; Rao *et al.*, 1998; Tsutsumi *et al.*, 2000). Recientemente se demostró que en la bacteria *Burkholderia cepacia* AM19 crecida en condiciones externas de bajo pH también aumenta la acumulación de este polímero, posiblemente como una respuesta global de los microorganismos ante condiciones externas estresantes de bajo pH (Mullan *et al.*, 2002).

La acumulación de poliP en respuesta a la carencia de nutrientes también ha sido reportada en el género *Pseudomonas* y estudios recientes demuestran que la PPK1 es esencial en *P. aeruginosa* no solo para los diferentes tipos de movilidad (Rashid y Kornberg, 2000; Rashid *et al.*, 2000b) sino también para procesos celulares importantes

como la formación de biopelículas, los mecanismos de “*quorum sensing*” y la producción de factores de virulencia (Rashid *et al.*, 2000a).

Existe un trabajo en la literatura que relaciona los poliP y la presencia de contaminantes orgánicos, en el que se demostró que cuando la esponja de agua dulce *Ephydatia muelleri* se expone ante la presencia de contaminantes orgánicos, se acumula una gran cantidad de poliP (Imsiecke *et al.*, 1996).

Teniendo en cuenta la toxicidad de estos compuestos para las bacterias que los degradan y la relación de los poliP con los ajustes celulares a las condiciones de carencia y estrés nos trazamos la siguiente hipótesis.

Hipótesis: Durante el crecimiento de *Pseudomonas sp.* B4 en bifenilo y sus derivados clorados se genera una condición de estrés que el microorganismo enfrenta mediante cambios en el metabolismo de los poliP.

Es de gran interés para esta Tesis doctoral estudiar la influencia de los poliP en procesos importantes para la bioremediación de los PCB como la movilidad, quimiotaxis y formación de biopelículas en *Pseudomonas sp.* B4.

Para validar esta hipótesis nos propusimos como **Objetivo General:** Estudiar los cambios en los poliP en *Pseudomonas sp.* B4 durante la degradación de estos compuestos y determinar su influencia en los procesos celulares importantes para la bioremediación de estos compuestos.

Durante el desarrollo de esta Tesis se determinó la presencia de gránulos de poliP en *Pseudomonas sp.* B4 cuando crece en diferentes fuentes de carbono y en diferentes

etapas del crecimiento así como sus variaciones ante distintos trasposos de medios. Estos cambios sugieren un ajuste del metabolismo de poliP ante condiciones estresantes para la célula, lo que fue comprobado por el aumento tanto de una proteína de estrés general (GroEL) como de especies reactivas de oxígeno (ROS). La función de los poliP en *Pseudomonas sp.* B4 se exploró más detalladamente al obtener células recombinantes incapaces de acumular este biopolímero por la sobreexpresión de la PPX1 de levadura. Estos recombinantes resultaron deficientes en numerosas capacidades como la movilidad, la capacidad de formar biopelículas e incluso el crecimiento en bifenilo. Un análisis global preliminar de los cambios en el proteoma de estas bacterias nos permitió encontrar algunas pistas tanto de las funciones energéticas como regulatorias de los poliP en *Pseudomonas sp.* B4.

2. Materiales y Métodos

2.1. Materiales

2.1.1. Reactivos

- AccuStandard (New Haven, EUA): clorobifenilos.
- Amersham Bioscience (Buckinghamshire, UK): [γ - ^{33}P] ATP.
- KODAK (Japón): pantalla de exposición de radioisótopos (K-Screen).
- Novagen (Madison, EUA): resina de afinidad con níquel (His-Bind).
- Pierce (Illinois, EUA): cassettes de diálisis, sistema comercial para la cuantificación de proteínas (Coomassie Plus Protein Assay Reagent).
- Roche (Indianápolis, EUA): sistema comercial para la cuantificación de ATP (ATP Bioluminiscence Assay).
- Qbiogene, Sistemas BIO101 (Morgan Irvine, CA, EUA): resina para purificación de DNA Glassmilk[®].
- Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA): bifenilo, creatina fosfato, creatina fosfoquinasa, DNasa, isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG), isocianato de guanidina (GITC), placas de polietilenimida-celulosa, estándares de polifosfatos (P15 y P75), RNasa pancreática.
- Difco: agarosa, triptona, agar granulado, peptona.

Otros reactivos utilizados se especifican en el método donde fueron utilizados.

2.1.2. Cepas bacterianas y medios de cultivo

2.1.2.1. Cepas degradadoras de PCBs

Las bacterias degradadoras de PCBs utilizadas en este trabajo se muestran en la Tabla 1. La cepa altamente móvil *Pseudomonas sp.* B4 fue aislada del Río Elba en Alemania y gentilmente suministrada por el Prof. Kenneth Timmis (Bartels *et al.*, 1999). Como cepa control en algunas ocasiones utilizamos la cepa modelo para la degradación de los PCBs *B. xenovorans* LB400 (Goris *et al.*, 2004), aislada del Río Hudson, New York (Bedard *et al.*, 1986; Bopp, 1986) y su genoma de 9,7 Mb fue completamente secuenciado recientemente en un esfuerzo del Departamento de Energía (EUA) (http://genome.jgi-psf.org/finished_microbes/burfu/burfu.home.html; Deneff *et al.*, 2004).

Tabla 1. Cepas degradadoras de PCBs y sus derivadas.

Cepa	Características relevantes	Referencia
<i>Burkholderia xenovorans</i> LB400	Cepa degradadora de PCBs (Río Hudson, EUA)	Bopp, 1986
<i>Pseudomonas sp.</i> B4	Cepa degradadora de PCBs (Río Elba, Alemania)	Bartels <i>et al.</i> , 1999
<i>Pseudomonas sp.</i> B4+pMLS7 (FCH5)	Transformada con el plasmidio pMLS7	Este trabajo
<i>Pseudomonas sp.</i> B4+pMLBAD (FCH6)	Transformada con el plasmidio pMLBAD	Este trabajo
<i>Pseudomonas sp.</i> B4+pS7PPX1 (FCH3)	Transformada con el plasmidio pS7PPX1	Este trabajo
<i>Pseudomonas sp.</i> B4+pBADPPX1 (FCH4)	Transformada con el plasmidio pBADPPX1	Este trabajo

Las cepas de *Pseudomonas sp.* B4 y sus derivadas se crecieron a 37°C, a diferencia de *B. xenovorans* LB400 que se creció a 30°C con agitación a 100 rpm.

2.1.2.2. Cepas de *Escherichia coli*

Las diferentes cepas de *E. coli* utilizadas en las este trabajo se muestran en la Tabla 2 y sus características son detalladas en las secciones de los métodos en que fueron utilizadas.

Tabla 2. Cepas de *E. coli* y sus derivadas.

Cepa	Características relevantes	Referencia
JM109	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> (rK-mk+), <i>e14</i> -(<i>mcrA</i> -), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , Δ (<i>lac-proAB</i>)/F' [<i>traD36</i> , <i>proAB</i> +, <i>lac Iq</i> , <i>lacZ</i> Δ M15]	Sambrook y Russell (2001)
DH5 α	F ⁻ , ϕ 80dlacZ Δ M15, Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rK-, mK+), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , λ -, <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	Sambrook y Russell (2001)
BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdSB</i> (rB-mB-) <i>gal dcm</i> (DE3). Es un huésped de expresión general.	Novagen
BL21(DE3)pLysS	F ⁻ <i>ompT hsdSB</i> (rB-mB-) <i>gal dcm</i> (DE3) pLysS (CmR).	Studier, 1991
NR100	Derivada de M15 (pREP) con el plasmidio pQE30PPK	Kumble <i>et al.</i> , 1996
FCH1	Derivada de BL21 (DE3)pLys con el plasmidio pTOPOYPPX1	Este estudio
FCH2	Derivada de BL21 (DE3)pLys con el plasmidio pTYPPX1	Este estudio

Todas las cepas de *E. coli* utilizadas se crecieron a 37°C con agitación a 100 rpm.

2.1.2.3. Otros microorganismos

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* W303 (*leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 can1-100 ade2-1 his3-11*) se utilizó como fuente de DNA para la obtención mediante PCR del gen *PPX1* que codifica para la principal exopolifosfatasa del citoplasma de la levadura (Wurst y Kornberg, 1994; Wurst *et al.*, 1995).

2.1.2.4. Medios de cultivo

Todas las cepas bacterianas se crecieron rutinariamente en medio Luria-Bertani (LB; triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l y NaCl 5 g/l) (Sambrook y Russell, 2001). Los medios se suplementaron con antibióticos según las condiciones y cepas de cultivo a las siguientes concentraciones finales: ampicilina (50 mg/l, LBA) y trimetoprin (50 mg/l para *E. coli* y 100 mg/l para *Pseudomonas sp.* B4, LBT). También cuando se requirió, las bacterias se crecieron en medio mínimo M9 (Na₂HPO₄ 50 mM, KH₂PO₄ 22 mM, NaCl 85 mM y NH₄Cl 7,5 mM). Para el crecimiento apropiado de *Pseudomonas*, 1 l de medio M9 se suplementó con 2,5 ml de una solución de elementos trazas mezclando un volumen de una solución que contenía MgSO₄ 250 mM y FeSO₄ x 7 H₂O 9mM con un volumen de otra solución que contenía FeSO₄ x 7 H₂O 2 g/l, ZnSO₄ x 7 H₂O 1,44 g/l, MnSO₄ x 4 H₂O 1,12 g/l, CuSO₄ x 5 H₂O 0,25 g/l, CoSO₄ x 7 H₂O 0,28 g/l, H₃BO₃ x 7 H₂O 0,06 g/l, 51,3 ml/l de HCl 37% y 2 ml/l de CHCl₃. Para la preparación de placas de agar se adicionó a estos medios agar a una concentración final de 1,5% (p/v). Para seguir el crecimiento celular se determinó la DO₆₀₀ y en algunos experimentos se determinó el número de células mediante el conteo

de las unidades formadoras de colonias (UFC). Para la preparación de las placas de medio LB sólido se adicionó agar granulado a una concentración final de 1,5 %. En algunos casos el medio LB se suplementó con los antibióticos requeridos y en otros casos con isopropil-tio- β -D-galactósido (IPTG) 1 mM y 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido (X-Gal) 80 μ g/ml.

2.1.2.5. Plasmidios

Tabla 3. Plasmidios empleados en *E. coli* y *Pseudomonas sp. B4*.

Cepa	Características relevantes	Referencia
pGEM [®] -T-easy	Vector para clonación de fragmentos de PCR	Promega
pCR [®] T7/CT-TOPO [®]	Vector de expresión para la clonación de fragmentos de PCR	Invitrogen
pMLBAD	Vector con expresión regulada	Lafebre y Valvano, 2002
pMLS7	Vector de expresión constitutiva	Lafebre y Valvano, 2002
pTOPOYPPX1	Derivado del pCR [®] T7/NT-TOPO [®] con inserción del gen PPX1 de <i>S. cerevisiae</i>	Este trabajo
pTYPPX1	Derivado del pGEM [®] -T-easy con inserción del gen PPX1 de <i>S. cerevisiae</i>	Este trabajo
pS7PPX1	Derivado del pMLS7 con inserción del gen PPX1 de <i>S. cerevisiae</i>	Este trabajo
pBADPPX1	Derivado del pMLBAD con inserción del gen PPX1 de <i>S. cerevisiae</i>	Este trabajo

pGEM[®]-T-easy: Plasmidio lineal con timidina en los extremos 3' (Robles y Doers, 1994). Posee un tamaño de 3.015 pb y un alto número de copias (300-700). Contiene los promotores de la RNA Polimerasa T7 y SP6 flanqueando un sitio de clonamiento múltiple que se encuentra dentro de la región codificante de la enzima β -galactosidasa, lo que permite la selección por el color de las colonias recombinantes. Contiene el gen de la β -lactamasa que provee resistencia al antibiótico ampicilina.

pTYPPX1: Derivado del *pGEM[®]-T-easy* con la inserción del gen *PPX1r* (4.244 pb).

pCR[®]T7/CT-TOPO[®]: Este vector de 2.702 pb permite el clonamiento directo de productos de PCR, sin necesidad de utilizar DNA ligasas. Igual que el *pGEM[®]-T-easy* tiene timidina en los extremos 3'. Además lleva unida covalentemente a estas timidinas moléculas de Topoisomerasa I de virus Vaccinia las cuales permiten la ligación del fragmento de PCR. Este vector adiciona al marco de lectura clonado una cola de 6 histidinas y un epítipo (Xpress) en el extremo carboxilo, además de un sitio de reconocimiento para la enteroquinasa. Contiene el gen de la β -lactamasa que provee resistencia al antibiótico ampicilina.

pTOPOYPPX1: Derivado del *pCR[®]T7/CT-TOPO[®]* con la inserción del gen *PPX1r* (3.931 pb).

pMLS7: Es un plasmidio de expresión constitutiva de amplio espectro derivado del *pBBR1* aislado originalmente del *Bordetella bronchiseptica*. Tiene un tamaño de 6.124 pb y se mantiene entre 20 y 30 copias en la célula. El vector codifica una proteína esencial para la replicación (*rep*) y otra para la movilización (*mob*) plasmidial. Tiene la región

promotora de la proteína ribosomal S7 y la potente señal terminadora del operón ribosomal (*rrnB*) de *Burkholderia sp.* LB400. Contiene el gen de la dihidrofolato reductasa (*dhfr*) que provee resistencia al antibiótico trimetropin.

pS7PPX1: Derivado del pMLS7 con la inserción del gen *PPX1r* entre los sitios *EcoRI* y *BamHI* (7.322 pb).

pMLBAD: Es un plasmidio de expresión regulada de amplio espectro con las características de movilización, replicación, terminación y resistencia del plasmidio pMLS7. Tiene un tamaño de 6.775 pb y contiene el promotor de *E. coli* inducible por arabinosa pBAD y el activador transcripcional AraC.

pBADPPX1: Derivado del pMLBAD con la inserción en la dirección correcta del gen *PPX1r* en el sitio *EcoRI* (8.022 pb).

2.2. Métodos

2.2.1. Métodos de biología molecular

2.2.1.1. Extracción de DNA cromosómico

Para la extracción del DNA cromosómico de la levadura *S. cerevisiae* W303 se utilizó el protocolo del kit “Wizard genomic DNA purification” (Promega®) con las modificaciones particulares para este microorganismo. El mismo se basa en una lisis celular seguido de la digestión enzimática del RNA, precipitación del DNA genómico con isopropanol y posterior solubilización en agua bidestilada estéril. El DNA cromosomal se conservó a 4 °C y fue diluido para posteriores reacciones de amplificación por PCR.

2.2.1.2. Extracción de DNA plasmidial

Se utilizó el protocolo del kit “Wizard Plus Minipreps DNA Purification System” (Promega®) y se siguió el protocolo recomendado por el proveedor. Este sistema se basa en una lisis celular alcalina, seguida de neutralización y centrifugación. Se utilizaron cultivos de *E. coli* crecidos en 5 ml de medio LBA o LBT.

2.2.1.3. Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Para visualizar el DNA plasmidial o cromosomal, ya sea íntegro o digerido con enzimas de restricción, se utilizaron geles de agarosa. Los geles se prepararon en amortiguador TAE 0,5 X (Tris-acetato 20 mM pH 8,0, EDTA 0,5 mM), con una

concentración de agarosa 1 % ultrapura (Gibco BRL®). Las muestras de DNA se mezclaron con solución de carga (azul de bromofenol 0,25 %, sacarosa 40 %). Como marcadores de estándares de peso molecular se utilizó 1 kb DNA Ladder (Gibco BRL®) y 1 kb Ladder (Promega®). La tinción se realizó durante 10 min en una solución de TAE 0,5 X con bromuro de etidio a una concentración de 0,5 µg/ml. Las bandas se visualizaron por la fluorescencia emitida por el DNA al irradiarlo con luz UV.

2.2.1.4. *Purificación de los fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa*

Se utilizó el protocolo del kit “Wizard PCR Preps DNA Purification System” (Promega®) sin modificaciones hasta el paso final. El método se basa en la escisión de la banda desde el gel de agarosa y su solubilización en presencia de una resina que une al DNA. La resina se aplica en una mini columna, luego se lava dos veces con isopropanol y el DNA se eluye con 50 µl de H₂O precalentada a 65 °C.

2.2.1.5. *Cuantificación del DNA*

Luego de visualizados los DNA mediante geles de agarosa, la cuantificación del DNA genómico se realizó midiendo la absorbancia a 260 nm (A_{260}) de una dilución 1:50 de la solución de DNA (Sambrook y Russell, 2001). Una unidad de A_{260} corresponde a 50 µg/ml de DNA en la solución. La pureza se comprobó mediante la relación A_{260}/A_{280} .

2.2.1.6. Digestiones de DNA con enzimas de restricción

Las digestiones del DNA plasmidial se realizaron de acuerdo a lo indicado por el proveedor de las enzimas de restricción de New England Biolabs® (NEB). Según cada caso, los plasmidios se digirieron a una concentración de 50-100 ng/μl durante 1 h a 37 °C con las unidades enzimáticas requeridas según sus características particulares.

2.2.1.7. Partidores y reacciones de PCR

Amplificación del gen PPX1 de S. cerevisiae fusionado a una cola de 6 histidinas. El gen *PPX1* que codifica para la exopolifosfatasa se obtuvo por PCR a partir del DNA genómico de *S. cerevisiae* W303 con la pareja de partidores 5'PPX1*Eco*RI y 3'PPX1H6*Bam*HI. El partidor del extremo 5' presenta el sitio de restricción *Eco*RI y el partidor del extremo 3' presenta el sitio de restricción *Bam*HI, un codón de término y anterior a éste una secuencia codificante para 6 histidinas (H6). El gen *PPX1* fusionado a la cola de H6 (*PPX1r*) se insertó en dos plasmidios de clonación de fragmentos de PCR (pGEMT-easy y el pCR®T7/CT-TOPO®) con vistas a verificar su secuencia y funcionalidad respectivamente (ver adelante). Las secuencias de los partidores empleados en la reacción fueron:

5' PPX1*Eco*RI : 5' GGAATTCATGTCGCCTTTGAGAAAGAC^{3'}

3' PPX1H6*Bam*HI :

5' CCGGATCCTCAATGATGATGATGATGATGCTCTTCCAGGTTGAGTACGC^{3'}

Los partidores se diseñaron a partir de la secuencia del gen *PPX1* presente en el cromosoma VIII de la secuencia genómica disponible de *S. cerevisiae* (Johnston *et al.*, 1994).

Para la reacción de PCR se utilizó la enzima Elongasa (Invitrogen) y se siguieron las especificaciones del fabricante. Se utilizó 120 ng de DNA genómico, 40 ng de cada partidor, dNTPs 0,1 mM, DMSO 5 %, 1 unidad de la correspondiente polimerasa en un volumen de reacción de 50 μ l. Para la amplificación se utilizó el siguiente programa: 3 min a 95°C, seguido de 25 a 30 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 65 °C y 1 min y 45 s a 72 °C, y luego un paso de 3 min a 72 °C.

Reacción de PCR sobre las colonias recombinantes. Todas las construcciones plasmidiales se comprobaron mediante PCR de las colonias recombinantes obtenidas. Esta reacción se realizó sin purificar el DNA plasmidial y se utilizaron partidores complementarios a las secuencias de cada vector que flanquean el sitio donde está clonado el inserto. Por lo tanto, si la colonia escogida tiene inserto, la reacción de PCR mostrará un amplificado del tamaño del inserto más un número de pares de bases, que corresponden al tamaño que se amplificaría si el vector no tuviese inserto. Se utilizó como templado 1 μ l de una suspensión de células obtenidas picando un tercio de una colonia en 150 μ l de agua destilada estéril. La reacción se realizó en un volumen de 10 μ l conteniendo 15 pmol de partidores, dNTPs 0,1 mM y 0,2 unidades de *Taq* polimerasa. Los programas de PCR utilizados fueron muy similares a los indicados en la sección anterior con la

particularidad que las temperaturas del paso de hibridación utilizadas fueron acorde a las características de los partidores utilizados.

Las secuencias de los partidores de los vectores fueron:

T7: 5' TAATACGACTCACTATAGGG3'

SP6: 5' GATTTAGGTGACACTATAG3'

sec1PPX1: 5' TTGCAAGGTGACCGTGAAGT3'

sec2PPX1: 5' CTCATATTTGAAGTGTCTAT3'

2.2.1.8. Clonación del gen *PPX1r* en los vectores pGEM[®]-T Easy y pCR[®]T7/CT-TOPO[®]

El gen *PPX1r* obtenido mediante amplificación por PCR a partir del DNA genómico de *S. cerevisiae* con los partidores 5'PPX1EcoRI y 3'PPX1H6BamHI se purificó mediante precipitación. Para ello se agregó 17 µl de acetato de sodio 3 M y 150 µl de etanol y se incubó 30 min a -80 °C, seguido de un lavado con etanol al 70 % y se redisolvió en agua bidestilada estéril. Para la ligación, se utilizó el sistema pGEM[®]-T Easy Vector System (Promega). 25 ng del vector pGEM[®]-T Easy Vector y 10 ng del amplificado de PCR se incubaron con 3 unidades de T4 DNA ligasa en un volumen final de 10 µl a 4 °C durante la noche o a 25 °C durante 4 h. Para la transformación se utilizaron 2 µl de la reacción.

Para la ligación del gen *PPX1r* en el vector pCR[®]T7/NT-TOPO[®] se incubó 3 µl del fragmento de PCR (25 ng) y 1 µl respectivamente de la solución salina y del vector

TOPO®. Luego de 5 min a temperatura ambiente se transformaron células competentes de *E. coli* JM109 con 1 µl de la reacción.

2.2.1.9. Clonación del gen *PPX1r* en los vectores de expresión *pMLS7* y *pMLBAD*

Para la sobreexpresión de la *PPX1r* en *Pseudomonas sp.* B4 utilizamos los vectores de expresión constitutiva (*pMLS7*) y regulada (*pMLBAD*) de amplio espectro anteriormente descritos (Lefebvre y Valvano, 2002). Para la clonación en el vector de expresión regulada se digirió tanto el vector *pMLBAD* como el fragmento de la *PPX1r* del vector *pTYPPX2* con *EcoRI* (NEB), luego se desfosforiló el vector con fosfatasa alcalina (CIP, NEB) en el mismo amortiguador de restricción para modificar los extremos e impedir la reunión de los extremos durante la ligación. La banda *EcoRI* producto de la digestión del vector *pTYPPX2*, se purificó por electroforesis en gel y 25 ng de ésta se ligaron con 10 ng del vector desfosforilado para obtener el plasmidio recombinante *pBADPPX1* (Figura 3).

Por su parte, para la clonación en el vector de expresión constitutiva se digirió tanto el vector *pMLS7* como el fragmento de la *PPX1r* del vector *pTYPPX2* con *EcoRI* y *BamHI* (NEB). La banda *EcoRI/BamHI* producto de la digestión del vector *pTYPPX2*, se purificó por gel y 25 ng se ligaron con 10 ng del vector digerido con las mismas enzimas para obtener el plasmidio recombinante *pS7DPPX1* (Figura 4).

Los plasmidios recombinantes se chequearon por PCR en colonias y por análisis de restricción con diferentes enzimas. Finalmente, ambos plasmidios se purificaron y secuenciaron para chequear la integridad de los fragmentos clonados.

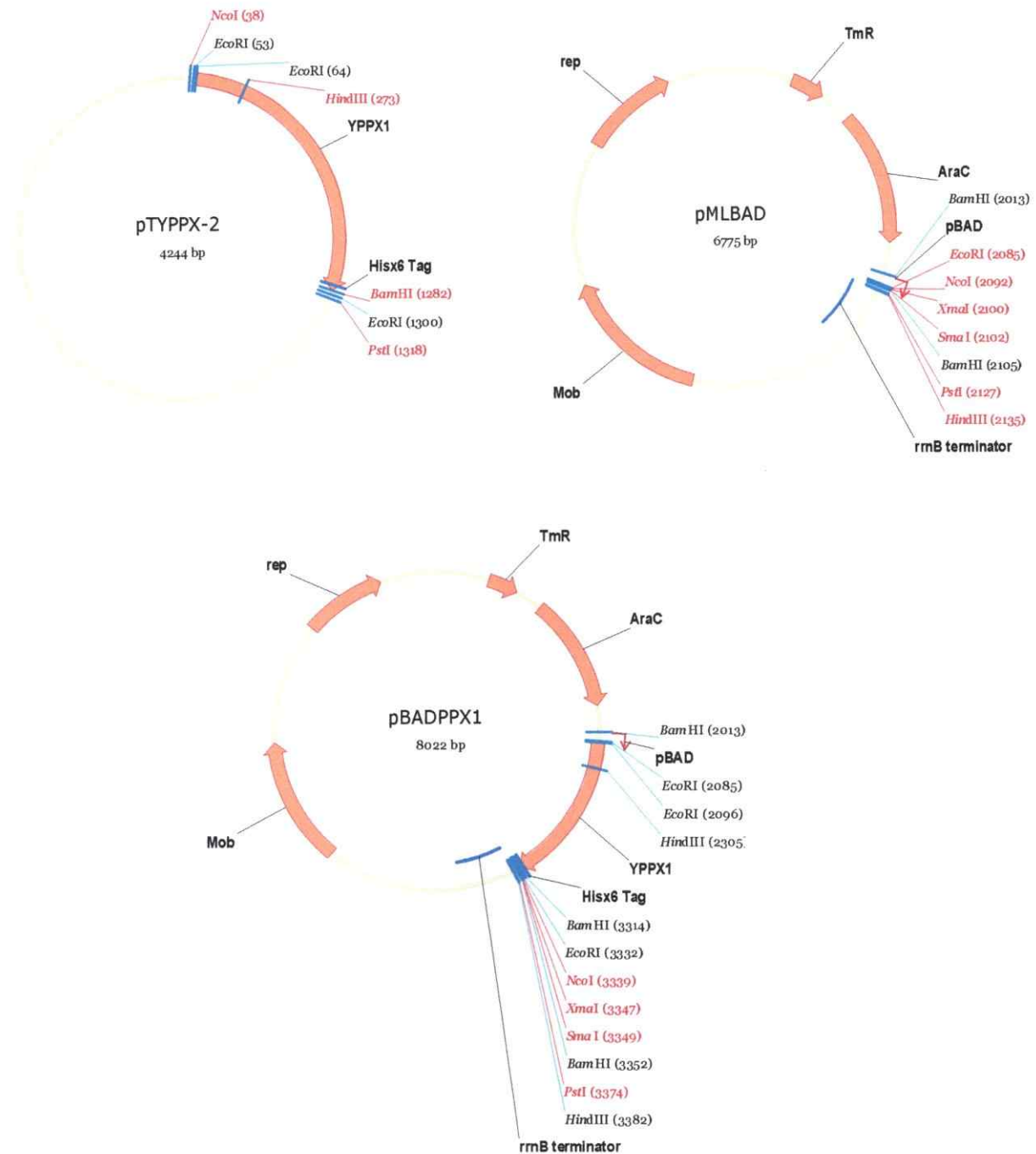


Figura 3. Estrategia de clonación del gen *PYPX1* de *S. cerevisiae* en el vector de expresión regulada *pMLBAD*. El vector resultante se denominó *pBADPPX1*.

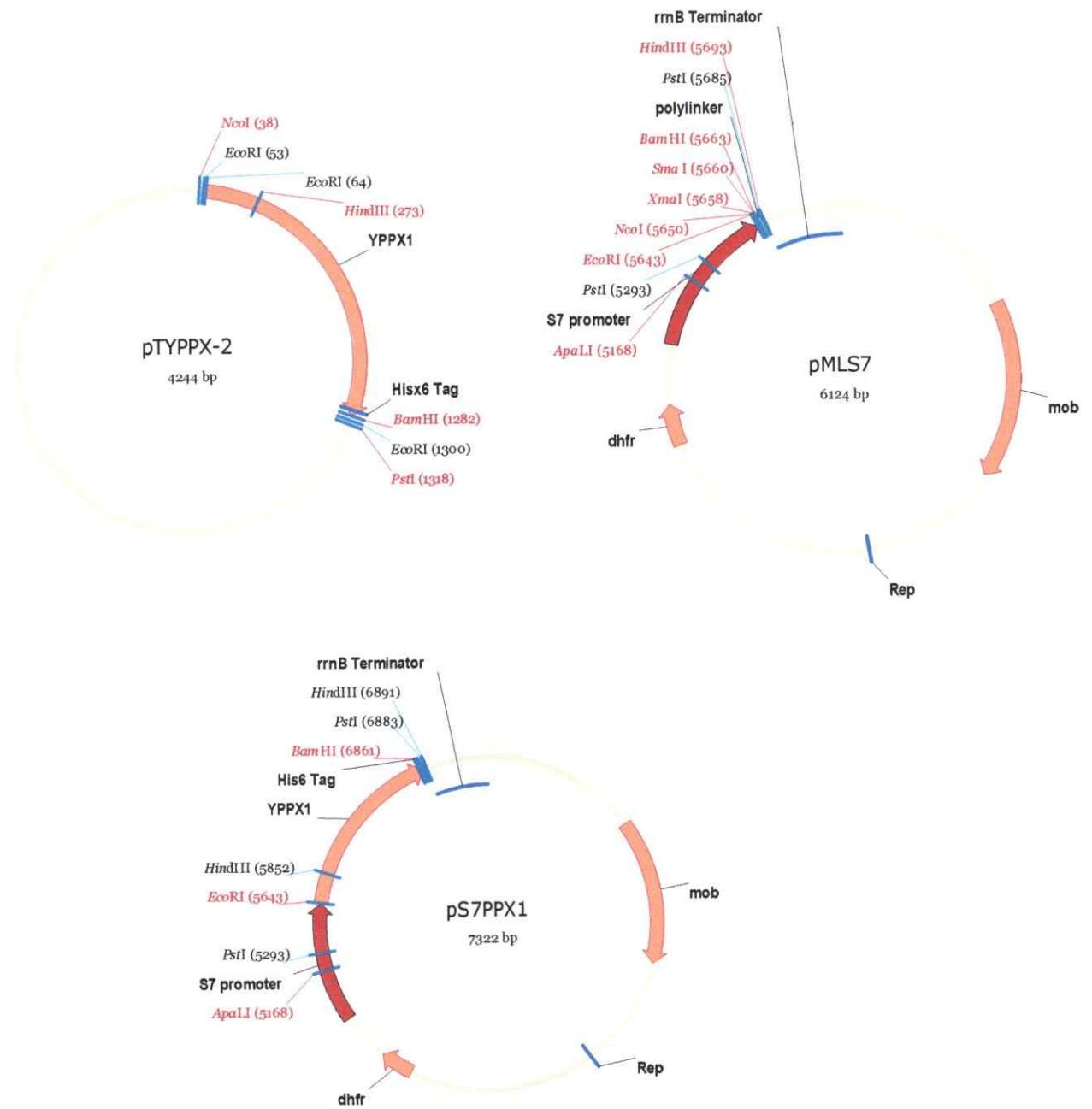


Figura 4. Estrategia de clonación del gen *PPX1r* de *S. cerevisiae* en el vector de expresión constitutiva *pMLS7*. El vector resultante se denominó *pS7PPX1*.

2.2.1.10. Secuenciación del DNA

Para la secuenciación del DNA se utilizó el método de la terminación por dideoxinucleótidos y se empleó el sistema “dsDNA Cycle Sequencing” de Gibco BRL®. Las secuencias de DNA obtenidas se compilaron y analizaron mediante el paquete de programas ChromasPro.

2.2.1.11. Transformaciones de *E. coli*

Se utilizó en las transformaciones productos de reacción de ligación o vectores. En el primer caso, se usó las células competentes JM109 (Promega®) que presentan una elevada eficiencia de transformación (1×10^8 UFC/ μg de DNA) por lo que son adecuadas para transformar productos de ligación. Se utilizaron 50 μl de la suspensión de células y 1-2 μl de la reacción de ligación. La mezcla se incubó 20 min en baño de hielo y 2 min a 42 °C, retornando rápidamente el tubo al hielo. Luego se agregó 950 μl del medio LB, se incubó por 1 h a 37 °C con agitación y se plaquearon alícuotas de 100 y 200 μl en placas Petri con agar LBA/IPTG/X-Gal o LBT según el caso.

Para la transformación con vectores se utilizó 25 μl de la suspensión de células JM109 o BL21(DE3) o (BL21DE3) pLysS y 10 ng de vector. La mezcla se incubó 20 min en baño de hielo y 2 min a 42 °C, retornando el tubo inmediatamente al hielo. Luego se agregó 950 μl del medio LB, se incubó por 1 h a 37 °C con agitación y se plaquearon alícuotas de 100 y 200 μl en placas Petri con agar LBA o LBT, según el caso.

2.2.1.12. Transformaciones de *Pseudomonas sp. B4*

La transformación de *Pseudomonas sp. B4* se realizó mediante electroporación. Para preparar las células electrocompetentes, se inoculó un cultivo de 250 ml de LB con 2,5 ml de un precultivo en LB crecido por 12 h. Luego de aproximadamente 5 h de incubación a 37 °C (DO 600nm ~0,5-0,7) el cultivo se enfrió en hielo por 15 min y se centrifugó a 5000 rpm (rotor Beckman JA14), a 4 °C, durante 10 min. Las células se lavaron dos veces con H₂O nanopura (MiliQ) fría y se resuspendieron en 500 µl de H₂O. Las cuvetas de 2 mm se prepararon con 50 µl de células electrocompetentes y 1 µl de cada plasmidio. Las condiciones de electroporación fueron: 2,5 kV, 2,5 µF, 200 Ω. Luego de electroporadas a las células se les añadió rápidamente 1 ml de medio rico LB y se incubó a 37 °C por una hora antes de sembrar 100- 200 µl en medio LBT.

Los plasmidios recombinantes fueron chequeados por PCR en colonias y por análisis de restricción con diferentes enzimas. Finalmente ambos plasmidios se purificaron y secuenciaron para chequear la integridad de los fragmentos clonados.

2.2.2. Métodos de análisis de los poliP

2.2.2.1. Extracción del poliP de las células bacterianas

Se realizó según Ault-Riché *et al.* (1998), para lo que se colectaron alícuotas de 1 ml de los cultivos, y se centrifugaron durante 5 min a 4.500 x g. Los sedimentos se resuspendieron en 0,3 ml de isotiocianato de guanidina 4 M (GITC), Tris-HCl 50 mM pH 7,0 precalentado a 95 °C. La suspensión se mezcló mediante agitación en un vortex y se incubó a 95°C durante 3 min. Se reservó una alícuota de 20 µl de esta fracción para

la determinación de la concentración de las proteínas. A cada muestra se le agregó 30 μ l de SDS 10% y luego de una incubación a 95 $^{\circ}$ C durante 2 min, se agregó 300 μ l de etanol absoluto (100%) y 5 μ l de una suspensión de microperlas de vidrio Glassmilk[®] (Bio 101). Luego de agitación por vortex e incubación durante 30 s a 95 $^{\circ}$ C, los tubos se centrifugaron a 13.000 x g durante 1 min y el sedimento de Glassmilk[®] se resuspendió por vortex en 200 μ l de tampón “New Wash” frío (Tris-HCl 5 mM pH 7,5; NaCl 50 mM; EDTA 5 mM; etanol 50%) y se centrifugó a 13.000 x g durante 30 s. El sedimento que contenía el poliP, DNA y RNA unido a las perlas de vidrio, se resuspendió en 100 μ l de una solución que contenía Tris-HCl 50 mM pH 7,0; MgCl₂ 5 mM; DNasa 5 μ g/ml y RNasa 5 μ g/ml y se incubó a 37 $^{\circ}$ C por 30 min. Luego el sedimento se lavó dos veces con 200 μ l del amortiguador “New Wash” frío para eliminar los productos de la degradación de los ácidos nucleicos. El poliP unido a Glassmilk[®] se eluyó en dos pasos resuspendiendo el sedimento por vortex en 50 μ l de agua cada vez, incubando 2 min a 95 $^{\circ}$ C y centrifugando a 13.000 x g para tomar el sobrenadante. El poliP soluble recuperado en esta fracción (100 μ l) se congeló a -20 $^{\circ}$ C hasta su cuantificación.

2.2.2.2. Purificación de la PPK1 recombinante de *E. coli*

La PPK1 recombinante de *E. coli* se purificó desde la cepa NR100 por cromatografía de afinidad a Ni²⁺, como lo describe Tzeng y Konberg (2000). *E. coli* NR100 es una cepa BL21(DE3), transformada con un vector de expresión de tipo pET-21b(+) que contiene como inserto el gen PPK1 de *E. coli* fusionado a un péptido de 6 histidinas

(PPK1r) para su posterior purificación mediante cromatografía de afinidad (Ault-Riché *et al.*, 1998). La cepa fue proporcionada por el Dr. Arthur Kornberg.

La cepa se cultivó en 1 l de medio LB suplementado con 100 µg/ml de Amp. El cultivo se incubó a 37 °C con agitación (200 rpm) y cuando alcanzó una DO₆₀₀ de 0,6 se agregó IPTG 1 mM. Luego de 2 h más de cultivo, las células se colectaron por centrifugación durante 20 min a 4.500 x g y el sedimento se resuspendió en Tris-HCl 50 mM, pH 7,4; glicerol 10 % (v/v) y MgCl₂ 5 mM en una proporción de 3 ml/g de células (peso húmedo). Se realizó una ruptura celular mediante tratamiento con lisozima (250 µg/ml), seguido de 3 ciclos de congelamiento y descongelamiento más 1 min de sonicación. Se agregó secuencialmente KCl 1 M, Na₂CO₃ 100 mM y Tritón X-100 0,05 %, y se incubó durante 2 h a 4 °C, para así liberar a la PPK1r de las membranas. Se centrifugó 20 min a 40.000 x g y el sobrenadante se aplicó a una columna con resina "His Bind" cargada con NiSO₄ y equilibrada con Tris-HCl 50 mM, pH 7,4; glicerol 10 % (v/v); MgCl₂ 5 mM; Tritón X-100 0,05 % e imidazol 100 mM. La elución se realizó en el mismo tampón con EDTA 1 M. La muestra se dializó contra Tris 50 mM pH 7,4; DTT 1 mM; glicerol 10 % y se almacenó a -80 °C.

2.2.2.3. Cuantificación de los poliP

El poliP se cuantificó midiendo la producción de ATP a partir del poliP, en base a la actividad reversa de la PPK1 de *E. coli* en exceso de ADP (Kumble *et al.*, 1996). El ensayo se realizó en un volumen final de 50 µl en amortiguador Hepes-KOH 50 mM pH 7,2; (NH₄)₂SO₄ 40 mM; MgCl₂ 4 mM; ADP 0,1 mM; 2500 unidades de PPK1r y 5

µl de la solución conteniendo el poliP a medir. La incubación se realizó durante 90 min a 37 °C. La reacción se interrumpió por calentamiento (2 min a 95 °C) y luego la mezcla se diluyó 1:20, 1:50, 1:200 y 1:500. Se ensayaron alícuotas de 50 µl de estas diluciones con 50 µl de luciferasa. El ATP generado por la PPKr se cuantificó midiendo la luz emitida en un luminómetro Lumi/96 (Bioscan Inc., USA) mediante una curva patrón de ATP.

2.2.2.4. *Análisis de los poliP por electroforesis en geles de poliacrilamida*

A las muestras de poliP obtenidas en la extracción anterior se les agregó amortiguador Tris-borato pH 8,3 y tampón de muestra antes de someterlas a un análisis mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. La electroforesis se realizó según lo publicado por Kumble y Kornberg (1995). Se utilizaron geles de poliacrilamida (20 %)-urea 7 M en amortiguador TBE a pH 8,3 (Tris-borato 90 mM y EDTA 2 mM). Los geles se prepararon en el sistema Protean® II (Bio-Rad) y se sometieron a 400 V hasta que el frente de corrida se desplazó 10 cm desde el punto de carga. Los geles se tiñeron con azul de toluidina 0,05 % en metanol 25 % y glicerol 5 % durante 30 min. Se destiñeron en la misma solución sin azul de toluidina durante 1 h. El rango de tamaño estimado para los poliP se determinó por la comparación con estándares de poliP (cadenas de largo P5, P15, P75) y poliP₇₅₀ (cadena de largo aproximado de 750), sintetizados *in vitro*.

2.2.2.5. Síntesis y purificación de los poliP *in vitro*

Síntesis in vitro de [^{33}P]poliP₇₅₀ con de PPK1r de *E. coli*. Se realizó según Ault-Riché *et al.* (1998) en un volumen de 10 ml de una solución que contenía Tris-HCl 50 mM pH 7,4; NH_4SO_4 ; 40 mM MgCl_2 4 mM creatina-fosfato 40 mM; creatina fosfoquinasa (CPK) 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$; [^{33}P]ATP 1 mM (100 μCi totales) y 90.000 unidades de PPK1r de *E. coli* (Kumble *et al.* 1996). La reacción se incubó 3 h a 37 °C y se detuvo agregando 1 ml de EDTA 0,5 M. La cinética de reacción se siguió mediante cromatografía ascendente en capa fina (TLC) en placas de polietilenimidacelulosa utilizando como fase móvil una solución de KH_2PO_4 0,75 M pH 3,5.

Purificación de [^{33}P]poliP₇₅₀ sintetizados in vitro. El producto de la reacción de síntesis en un volumen final de 10 ml se cargó en un colchón de 50 ml de CsCl 2,5 M en Tris-HCl 50 mM pH 7,4; EDTA 10 mM. La centrifugación se realizó durante 16 h a 30.000 rpm (rotor Sorval T-647.5). El gradiente se dividió en alícuotas de 5 ml, y en cada una de ellas se le determinó la cantidad de cuentas emitidas por minuto (cpm), en contador de centelleo líquido. A la alícuota que presentó la mayor cantidad de cpm, se le agregó 3,5 ml de isopropanol y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min, seguido de centrifugación por 30 min a 11500 rpm (rotor Beckman JA-20). El sedimento se lavó con 3,5 ml de etanol 70 %, se secó durante 30 min al vacío y se resuspendió en 600 μl de agua bidestilada estéril. La concentración de [^{33}P]poliP se determinó en alícuotas de 1 μl en un contador de centelleo líquido (Beckman Instruments LS 5000 TD, Fullerton,

EUA). Típicamente se obtuvo una solución de aproximadamente 10 mM de [^{33}P]poliP con una actividad específica de 13 cpm/pmol.

Obtención de [^{33}P]ortofosfato como estándar para calibrar la medición de la hidrólisis de poliP por la PPX. Para disponer de un estándar de ortofosfato marcado radiactivamente con ^{33}P que permitiera la cuantificación de la actividad exopolifosfatasa, se realizó una hidrólisis química del [^{33}P]poliP₇₅₀ sintetizado *in vitro*. Para ello se tomó una cantidad conocida de [^{33}P]poliP₇₅₀ y se incubó durante 1 h y 30 min a 98 °C en presencia de HCl 1 M pH 1,3; completando un volumen total de 200 μl . El progreso de la hidrólisis se siguió mediante cromatografía ascendente en capa fina (TLC) en placas de polietilenimidacelulosa, utilizando como fase móvil una solución de KH_2PO_4 0,75 M pH 3,5. El [^{33}P]ortofosfato de concentración conocida, se utilizó para la preparación de una curva de calibración de pmoles de [^{33}P]ortofosfato *versus* radiactividad, cuantificada en un equipo Phosphor imager (Molecular Imagen FX™ Systems) luego de su exposición en una pantalla K-Screen.

2.2.2.6. Determinación de la actividad exopolifosfatasa (PPX)

Para cuantificar la sobreexpresión de la *PPX1r* de *S. cerevisiae* en *Pseudomonas sp.* B4 y disminuir la actividad PPX bacteriana de fondo se utilizaron las condiciones óptimas para la actividad de la levadura. Para determinar la actividad PPX se cuantificó el ortofosfato que se obtiene de la hidrólisis de [^{33}P]poliP. La mezcla de reacción (50 μl) se preparó según lo publicado para Wurst *et al.* (1995) y contenía Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NH_4Ac 100 mM, MgCl_2 4mM, [^{32}P]poliP 250 μM . El MgCl_2 se agregó al final para

evitar la precipitación del poliP. Los ensayos de actividad en fracciones celulares se incubaron durante 30 min a 37 °C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se tomó una alícuota de 4 µl de la mezcla de reacción y se aplicó sobre una placa de polietilenimidacelulosa, la cual se sometió a una cromatografía ascendente en capa fina (TLC) para separar el fosfato producido en la reacción, utilizando como fase móvil una solución KH₂PO₄ 0,75 M pH 3,5. El fosfato producido se cuantificó en un equipo Phosphor imager (Molecular Imagen FXTM Systems) y se extrapoló a una curva de calibración de [³³P]ortofosfato. Una unidad se definió como la cantidad de enzima capaz de hidrolizar 1 pmol de Pi por min a 37 °C.

2.2.3. Técnicas de microscopía

2.2.3.1. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

El análisis visual de las células mediante microscopía electrónica de transmisión se realizó según González y Jensen (1998). Se colectaron células de *Pseudomonas sp.* B4 y se lavaron con agua bidestilada estéril. Luego se resuspendieron a una DO 600nm de 0,5 y 10 µl de esta suspensión se aplicaron durante 2 min sobre grillas de cobre o níquel cubiertas con Formvar, dejándolas sedimentar. El exceso de líquido se absorbió con papel de filtro y las grillas se secaron al aire; este procedimiento se repitió 2 veces. Las células se observaron sin tinción con un microscopio electrónico de transmisión Philips Tecnai 12 (Holanda) a 80 kV.

2.2.3.2. *Análisis dispersivo de rayos-X (EDAX)*

La espectroscopia de energía dispersiva de elementos químicos en bacterias se realizó con un microanalizador EDAX-PV 9800 a un voltaje de aceleración de 120 kV. El haz electrónico fue centrado en la localización en la cual la composición elemental debía ser determinada. Debido a la interacción entre el electrón primario y la muestra, las señales de la radiografía fueron recogidas por el espectrómetro de EDAX, que fue conectado con el microscopio electrónico.

2.2.3.3. *Espectroscopía de pérdida de energía del electrón (EELS)*

El análisis de EELS se realizó con un microscopio electrónico de transmisión de energía-filtrada integrado Zeiss CEM 902 (EFTEM). El microscopio funcionó en el modo de proyección de imagen espectroscópica del electrón (ESI-) para la representación del fosfato y el EELS paralelo se realizó para el registro del espectro con la ayuda del software ESI-Vision (Soft Imaging Systems, Münster, Alemania). Se utilizaron los ajustes de abertura según lo descrito por Lünsdorf *et al.* (2000b). La hidroxilapatita comercial se utilizó como estándar interno de fosfato.

2.2.4. **Ensayos de movilidad, quimiotaxis y formación de biopelículas**

2.2.4.1. *Swimming (natación)*

Para los ensayos de movilidad en placas se utilizó medio definido M9 con trimetropin (M9T) suplementado con casaminoácidos (0.1%) y medio rico LB. En cualquier caso para solidificar el medio sólo se agregó agarosa al 0,3 %. Las placas se

inocularon con bacterias crecidas toda la noche en LBT. Las placas luego fueron envueltas con Saran Wrap para prevenir la deshidratación a 30 °C por 12-14 h.

2.2.4.2. *Ensayo modificado de quimiotaxis con capilares*

Los ensayos para caracterizar la respuesta quimiotáctica se realizaron mediante una modificación del ensayo de los capilares (Mazumder *et al.*, 1999). Para esto y mediante el uso de jeringuillas de 1 ml (tuberculina, Becton Dickinson), se introducen 200 µl de la solución de quimiotaxis (Tris-HCl 10 mM, pH 7,4) en el émbolo de la jeringuilla con y sin el compuesto a ensayar (casaminoácidos 0,1%). Por otra parte en el extremo de la aguja se coloca una punta de pipeta amarilla (200 µl) con 100 µl de la suspensión bacteriana (generalmente 1×10^7 células). Después de 90 min de incubación a temperatura ambiente se removi6 la aguja de la jeringuilla y el contenido del embolo se diluy6 y sembr6 en medio rico LBT. La acumulaci6n de bacterias en los capilares se calcul6 por el conteo de las unidades formadoras de colonias (UFCs) obtenido en las placas. El 6ndice relativo de quimiotaxis (IRQ) se calcul6 como la fracci6n entre las bacterias que entraron en el capilar de ensayo y las que entraron al capilar control (solo amortiguador de quimiotaxis). Un IRQ mayor de 2 es considerado significativo lo que indica que el compuesto en el interior del capilar es atrayente para la bacteria (Adler, 1973, Mazumder *et al.*, 1999).

2.2.4.3. *Formaci6n de biopel6culas*

Una de las formas de estudiar una biopel6cula es el m6todo desarrollado por O'Toole *et al.* (1999), en el cual se inoculan placas de 96 pozos de PVC (cloruro de

polivinilo) con cultivos bacterianos en medio líquido LB. Luego se incuban a temperatura ambiente toda la noche para la formación de las biopelículas en las placas, se desechan las células en suspensión y los pozos se lavan dos veces con agua. Finalmente, las células presentes en las biopelículas adheridas se tiñen con cristal violeta al 0,1 %. Para cuantificar el biofilm se eluye este colorante con etanol al 80 % y se mide la absorbancia a 595 nm en un lector de placas de ELISA (Dynatech 5000, EUA).

2.2.5. Detección *in vivo* de las especies reactivas del oxígeno (ROS)

La producción de ROS en las células crecidas bajo diversas condiciones se detectó mediante la sonda sensible a estrés oxidativo, 2',7'-dicloro-dihidro-fluoresceína diacetato (DCFH-DA) (Crow, 1997). Los grupos acetilo en este compuesto son removidos por las esterasas de la membrana para formar 2',7'-2',7'-dicloro-dihidro-fluoresceína (DCFH) cuando el compuesto es incorporado por las células vivas. El DCFH no es fluorescente pero altamente sensible a ROS, siendo oxidado por estas especies activas originando el compuesto altamente fluorescente, 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) (Ischiropoulos *et al.*, 1999). DCFH se puede oxidar por varias especies reactivas incluyendo RO_2 , el RO , el $HOCl$ y $ONOO^-$ pero solamente los radicales de vida prolongada contribuyen al aumento de la fluorescencia (He *et al.*, 2002). De todos los radicales libre el OH resulta el más dañino dado que su presencia es capaz de destruir enzimas proteolíticas, de provocar la ruptura de polisacáridos (Ferrer *et al.*, 1999).

Para nuestros experimentos, el DCFH-DA (5 μ M) fue agregado a las células exponencialmente crecidas en glucosa, bifenilo, y 2Cl- o 4Cl-bifenilo como únicas fuentes de carbono. Las células se incubaron a 37 °C por 30 min en absoluta oscuridad. Las muestras se manipularon para evitar la presencia de la luz y la fluorescencia se midió con un espectrofluorímetro Fluoromax-2 (Instrumentos S.A, Inc.). El DCF se excita a 488 nm y emite la fluorescencia a 530 nm.

2.2.6. Métodos de análisis de las proteínas

2.2.6.1. Obtención de los extractos crudos de *Pseudomonas sp. B4*

Se colectó 5 ml del precultivo por centrifugación durante 20 min a 4.500 x g. El sedimento de las células se resuspendió en 10 μ l por mg de peso húmedo del tampón Tris-acetato 50 mM pH 7,0 y sacarosa 10 %. La lisis se realizó mediante 2 ciclos de congelamiento a -80 °C, seguido de un descongelamiento rápido y un programa de sonicación en hielo, que consistió en 6 ciclos de 15 s e intervalos de 30 s de detención. Las suspensiones se centrifugaron a 4.500 x g durante 5 min para eliminar las células enteras y restos celulares. El sobrenadante correspondió al extracto total o crudo (EC) y se utilizó para la determinación de la actividad PPX.

2.2.6.2. Obtención de los extractos crudos de *E. coli*

Se colectaron las células provenientes de 5 ml de cultivo y se resuspendieron en 1 ml de Tris 50 mM pH 7, sacarosa 10 % y se trató con 250 μ g/ml de lisozima durante 20 min en hielo y 10 min a 30 °C. Luego la suspensión se sonicó durante 1,5 min a

intervalos de 15 s. Finalmente, los lisados se centrifugaron a 3.000 x g durante 5 min para eliminar las células enteras y los restos celulares.

2.2.6.3. Preparación de las muestras para la electroforesis en geles de SDS-PAGE

Preparación de las muestras de proteínas totales para electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturantes (SDS-PAGE). Las muestras se prepararon según la siguiente proporción: 10 mg de células (peso húmedo) se resuspendieron en 100 μ l de agua destilada y se trataron con 50 μ l de amortiguador de muestra 3X: Tris-HCl 0,187 M pH 6,8, SDS 6 %, glicerol 30 %, β -mercaptoetanol 15 % y azul de bromofenol 0,06 % (Laemmli, 1970). Las muestras se calentaron a 95 °C por 5 min, se centrifugaron brevemente y 1 a 5 μ l del sobrenadante se aplicaron en los pocillos de los geles.

2.2.6.4. Electroforesis en minigeles de poliacrilamida-SDS

Los geles de poliacrilamida en presencia de SDS para electroforesis en placa (SDS PAGE) se prepararon según la técnica descrita por Laemmli (1970). El gel concentrador se preparó al 3 % y el gel separador al 10 %. La electroforesis se corrió a 200 V hasta que el colorante indicador alcanzara el borde inferior del gel. Para la tinción se empleó azul de Coomassie 0,2 % en metanol 25 % y ácido acético 7,5 % por 30 min. Luego los geles se destiñeron mediante lavados sucesivos con una solución de 25 % metanol y 7,5 % de ácido acético y se secaron por vacío a 80 °C.

2.2.6.5. Detección inmunológica de las proteínas mediante "Western blot"

La expresión de la PPX1r en *E. coli* y *Pseudomonas sp.* B4 se detectó mediante "Western-blot". Las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE y se electrotransferieron a una membrana de PVDF o nitrocelulosa. Se aplicó una corriente constante de 80 mA durante 60 min. La eficiencia de la electrotransferencia se confirmó mediante el uso de marcadores moleculares preteñidos (New England Biolabs®) y tiñendo el gel después de la electrotransferencia.

La membrana conteniendo las proteínas transferidas se incubó por 2 h con amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 7,6, NaCl 137 mM (TBS), Tween-20 0,1 % (TBS-T) y seroalbúmina bovina (BSA) 1 % (TBS-T-BSA). Luego se lavó tres veces por 15 min cada vez con TBS-T y se incubó por toda la noche con el antisuero de ratón anti-His6 diluido 1/5.000. Seguidamente la membrana se lavó tres veces por 20 min cada vez con TBS-T. Se incubó por 2 h con anticuerpos monoclonales anti-ratón conjugado con peroxidasa (Amersham®) como anticuerpo secundario a una dilución 1/5.000. Se repitieron los tres lavados de la membrana y se procedió a la detección de la reacción antígeno-anticuerpo sobre la membrana. Con este fin se aplicó el método colorimétrico recomendado por Promega®. Este consistió en incubar la membrana con amortiguador TBS que contenía metanol al 20 %, 0,5 mg/ml 4-Cloro-1-naftol (Biorad®), 0,15 % H₂O₂ (Merck®). La reacción se realizó en la oscuridad y luego se visualizaron las bandas.

2.2.6.6. *Determinación cuantitativa de las proteínas*

Se realizó según el método de Bradford (1976) usando el sistema comercial Coomassie Plus Protein Assay Reagent (Pierce, EUA).

2.2.6.7. *Electroforesis bidimensional (2D-PAGE)*

Preparación de la muestra. Las diferentes células de *Pseudomonas* sp B4 se lavaron y se suspendieron (a razón de 10 μ l por mg células), en Tris-HCl 20 mM, pH 8.0 frío. Se agregó RNAsa y DNasa a 50 μ g/ml en frío por 15 min y luego las células se sonicaron dos veces en intervalos de 1 min de congelación. La suspensión se centrifugó por 20 min a 10.000 x g, 4 °C y se descartó el precipitado (debris celular). La concentración de proteínas del sobrenadante fue aproximadamente 3-5 mg/ml. El sobrenadante se diluyó en el amortiguador de rehidratación (urea 8 M, CHAPS 2%, DTT 10 mM, amfolitos Bio-Lyte® 3-10 0,2 %) a una concentración final de la proteína de 0,3-0,5 mg/ml. Se agregó una alícuota de 200-350 μ l (según tinción) con una pipeta en la bandeja de focalización. Una tira de 11 cm de largo (ReadyStrips IPG, pH 5-8 y 3-10, Biorad) se moja en la solución que contenía la muestra y el amortiguador de rehidratación. Finalmente se agregó aceite mineral con una pipeta sobre la tira para prevenir la deshidratación y precipitación de la urea.

Primera Dimensión (Isoelectroenfoque): La secuencia de rehidratación se programó en el equipo PROTEAN IEF (Biorad). La temperatura de la plataforma de Peltier se fija a 20 °C y la tira se rehidrató para cerca de 12 h bajo condiciones pasivas (sin voltaje aplicado). El programa del equipo PROTEAN de IEF se programó para comenzar el

paso de focalización automáticamente después de 12 h. La tira se enfoca para un total de 40.000-50.000 V/h. Para este experimento, la tira de 11 cm ReadyStrip IPG fue focalizada con 6.000 V para un total de 40.000 V/horas. Se dispuso de un paso de espera después de la focalización (500 V) mientras comienza la segunda dimensión (SDS-PAGE). Para preparar la tira de ReadyStrip IPG para la segunda dimensión, esta se quitó de la bandeja de focalización y se equilibró durante 15 min en 5 ml del primer amortiguador de equilibrio (Tris-HCl 50 mM, pH 8,8, urea 6 M, SDS 2 %, glicerol 30 %, y DTT 1 %). Luego se pasaron las tiras a un segundo amortiguador de equilibrio con la misma composición que el paso anterior pero con yodoacetamida 1.5% en sustitución del DTT.

Segunda Dimensión (SDS-PAGE): La tira de ReadyStrip IPG se transfirió a un gel de SDS-PAGE (11,5 %) y se cubrió con agarosa 0,5 % en amortiguador de Laemmli luego de aplicar el patrón de peso molecular (BenchMark™ Ladder, Invitrogen). El gel se corrió toda la noche a bajo voltaje (~ 50 V). Luego de la electroforesis, el gel se removió y se tiñó toda la noche con una solución de azul de Coomassie 0,2 % en metanol 25 % y ácido acético 7,5 %. Luego los geles se destiñeron mediante lavados sucesivos con una solución de metanol 25 % y ácido acético 7,5 %.

2.2.6.8. Selección de proteínas de los geles 2D y secuenciación por espectrometría de masas

Las intensidades de las señales de las proteínas que más cambiaron en los geles 2D de las células recombinantes de *Pseudomonas sp.* B4 control y las que son incapaces de

acumular poliP se determinaron mediante un programa computacional de tratamiento de imágenes (Scion Image, USA). Estas muestras se aislaron del gel de SDS-PAGE y se enviaron para su posterior secuenciación mediante espectrometría de masas (MS) con un equipamiento de ionización por electro-spray y un analizador de tiempo de vuelo (ESI-QUAD-TOF). Las muestras fueron procesadas en el Centro de Proteómica de la Universidad de Cambridge (UK). Los datos de los iones MS/MS producidos con este método se utilizaron para identificar las proteínas mediante su búsqueda en las bases de datos de secuencias aminoacídicas de las proteínas (Mascot, Matrix Science). Los parámetros de tolerancia del péptido (± 2 Da) y la tolerancia de MS/MS (± 1.2 Da) se limitaron y el tipo de instrumento se fijó en ESI-QUAD-TOF. Las búsquedas se realizaron contra la base de datos de NCBI nr (6/6/2005; 2.503.385 secuencias) con la restricción taxonómica a los 7 genomas conocidos del género *Pseudomonas* (*Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Pseudomonas fluorescens* Pf-5, *Pseudomonas fluorescens* PfO-1, *Pseudomonas putida* KT2440, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 1448A, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* str. DC3000) y las secuencias proteicas del género *Pseudomonas*.

3. Resultados

3.1. Los poliP inorgánicos en *Pseudomonas sp. B4* y su relación con el medio de cultivo y la fase de crecimiento

3.1.1. Observación microscópica de los gránulos de poliP

Una de las formas de observar los poliP es examinar mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) la presencia de gránulos densos al paso de los electrones en células no teñidas. Estos gránulos se han descrito frecuentemente como acumulaciones de poliP (Wood y Clark, 1988; Harold, 1966). Cuando se analizaron las células de *Pseudomonas sp. B4* crecidas tanto en medio rico LB como en medio definido (M9) suplementado con glucosa y bifenilo como únicas fuentes de carbono en las diferentes fases del crecimiento, se observó la presencia diferencial de gránulos densos de forma esférica (Figura 5A). Una de las características de los gránulos de poliP es que hierven cuando se enfocan con un mayor aumento lo que se pudo observar en los gránulos examinados (detalle en Figura 5C). A diferencia de lo observado en la mayoría de las células que crecen en la fase exponencial en glucosa, en la misma fase de crecimiento el 90 % de las células crecidas en bifenilo presentan estas inclusiones. Los gránulos son grandes con diámetros entre de 50-200 nm y como promedio se encuentran tres por célula y llegan a ocupar entre un 20-30 % del área celular (Figura 5A y C). Contrariamente, cuando las células se encuentran en fase estacionaria de

crecimiento, tanto las crecidas en glucosa como en bifenilo como única fuente de carbono presentan estos gránulos (Figura 6A y B).

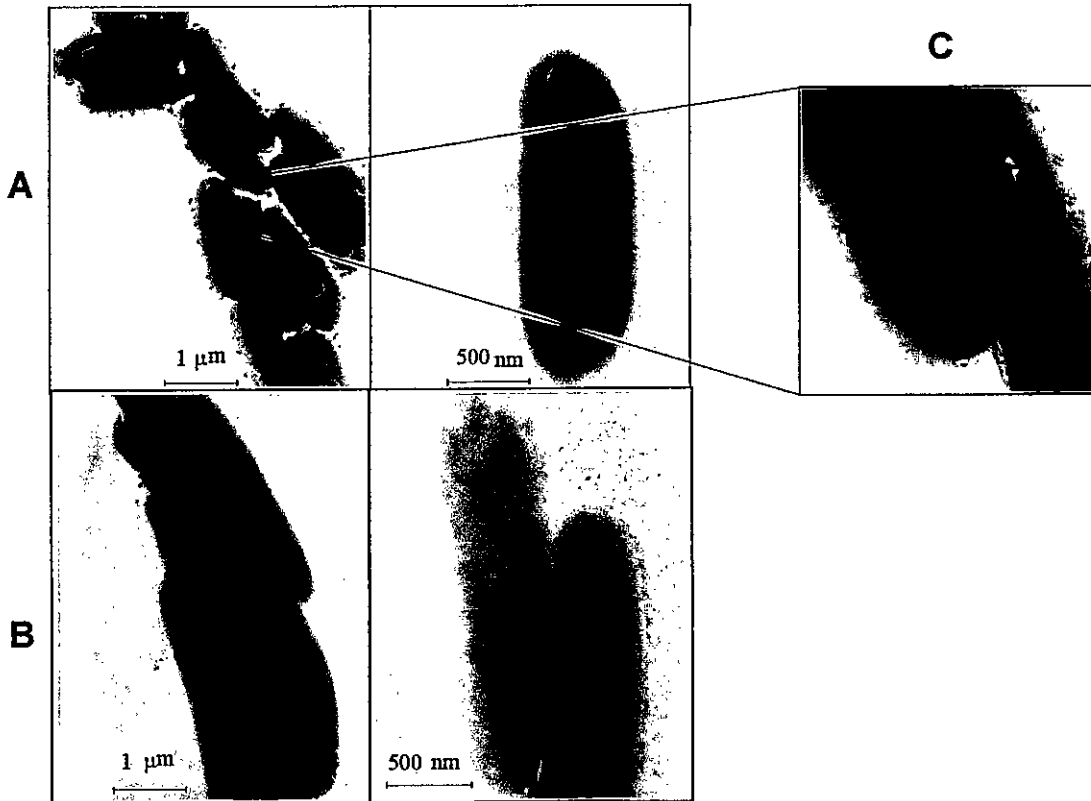


Figura 5. Presencia de gránulos densos a los electrones en las células de *Pseudomonas sp. B4* en la fase exponencial del crecimiento. Las células se crecieron en medio definido (M9) suplementado con bifenilo (A y C) y glucosa (B) y se colectaron en fase exponencial de crecimiento. Las células de los cultivos se aplicaron directamente, sin fijar ni teñir, sobre grillas de níquel para su observación al microscopio electrónico de transmisión (80 kV).

Por su parte las células crecidas en medio rico LB no presentaron estas inclusiones en ninguna fase del crecimiento (Figura 6C). Resumiendo, las bacterias degradadoras de PCBs *Pseudomonas sp. B4* acumulan una gran cantidad de gránulos densos a los electrones, los que posiblemente están compuestos de fosfato, cuando crecen en

bifenilo en todas las fases de crecimiento y en glucosa sólo cuando las células entran en la fase estacionaria del cultivo.

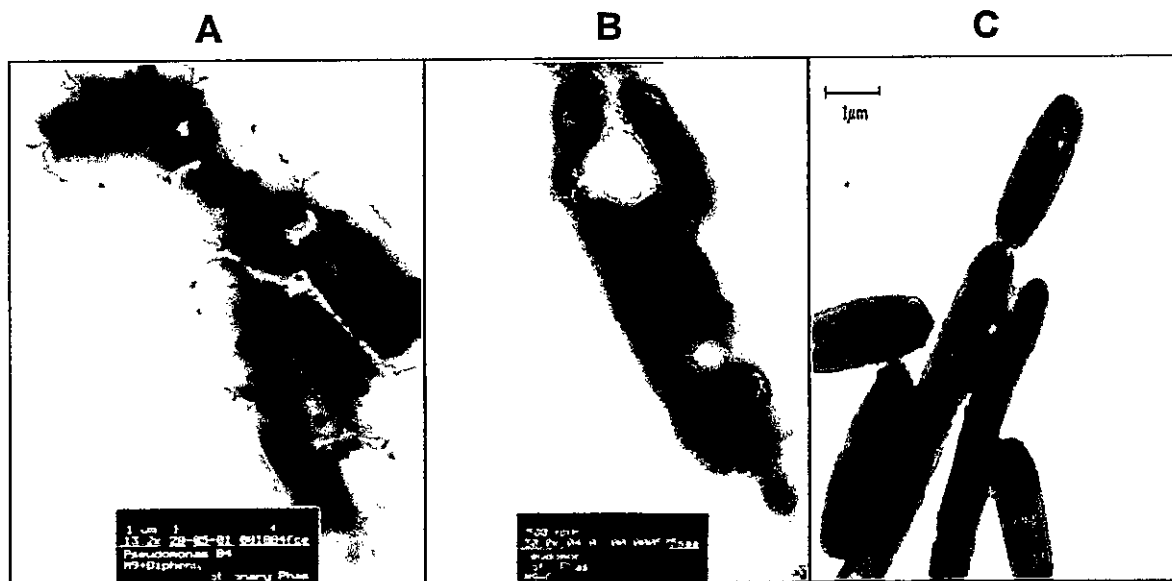


Figura 6. Presencia de gránulos densos a los electrones en las células de *Pseudomonas* sp. B4 en la fase estacionaria del crecimiento. Las células se colectaron en la fase estacionaria del crecimiento de cultivos crecidos en medio definido (M9) suplementado con bifenilo (A), glucosa (B) y en medio rico LB (C).

3.1.2. Análisis elemental de los gránulos densos a los electrones

Para investigar la naturaleza química de estas inclusiones se realizaron análisis de dispersión de energía de rayos-X (EDAX) y de espectroscopía de pérdida de energía de los electrones (EELS). El primero nos permite conocer la composición elemental de una región celular particular durante la observación microscópica y el segundo un análisis más detallado del compuesto químico en particular (González y Jensen, 1998; Alvarez y Jerez, 2004; Lünsdorf *et al.*, 2000b). Mediante EDAX la composición elemental de un gránulo mostró que éstos contenían una alta cantidad de oxígeno y

fósforo (Figura 7A), en comparación con lo observado al analizar una región citoplasmática (Figura 7B) lo que sugiere que estos gránulos podrían estar compuestos de fosfato. Además, estos espectros son similares a los de los gránulos de poliP de *Acinetobacter sp.* 210A (Bonting *et al.*, 1993), *Desulfovibrio gigas* (Hensgens *et al.*, 1996) y *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Alvarez y Jerez, 2004).

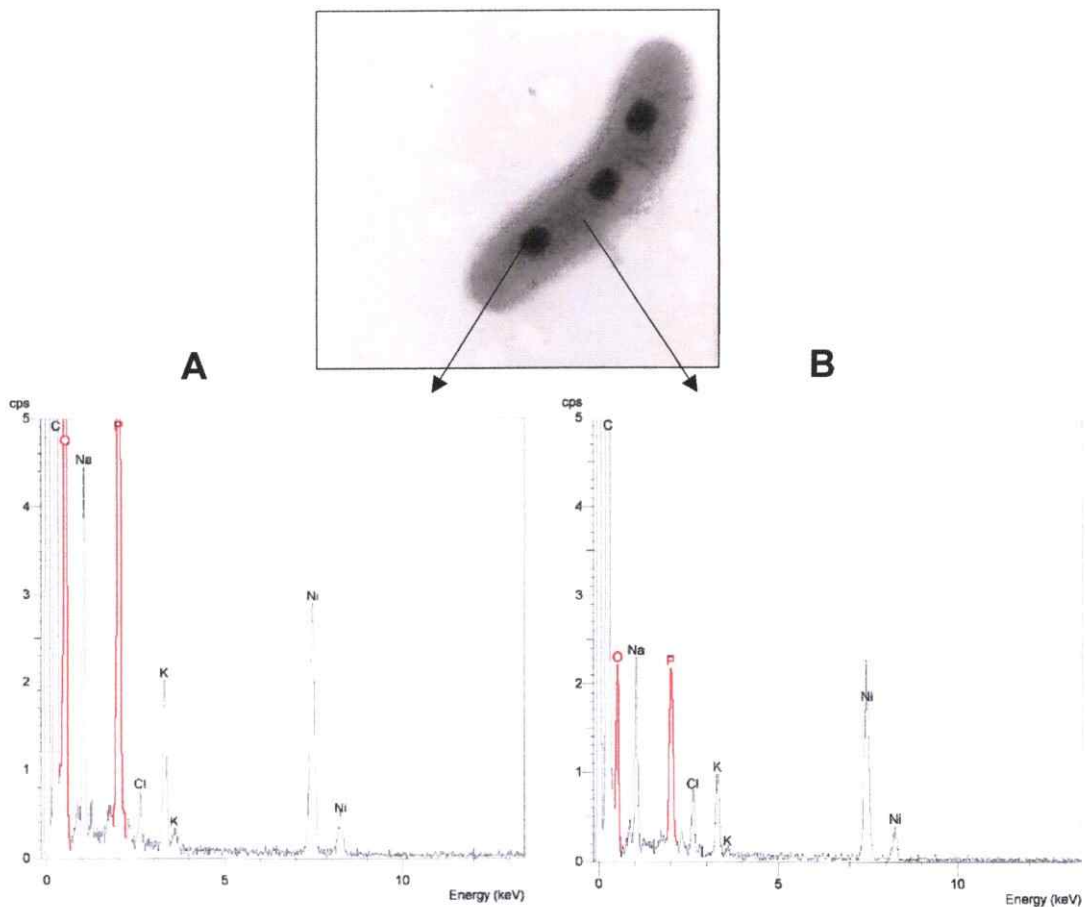


Figura 7. Espectros de análisis de dispersión de energía de rayos-X (EDAX) de las células de *Pseudomonas sp. B4*. Las células se prepararon igual como se indica en la Figura 5. Se muestra el espectro de la composición elemental de un gránulo (A) y la de una región citoplasmática (B). Las señales rojas corresponden a los elementos oxígeno (O) y fósforo (P).

Para obtener una información más detallada de los gránulos de poliP se realizaron determinaciones ultraestructurales mediante microscopía electrónica de barrido acoplada a espectroscopia de pérdida de energía de los electrones (EFTEM). Después de la substracción del ruido y filtrado del espectro se muestra que el perfil del gránulo (azul) es muy similar al del patrón de fosfato (hidroxilapatita, DHP, verde) en contraste con el de la región citoplasmática sin gránulos (rojo) (Figura 8).

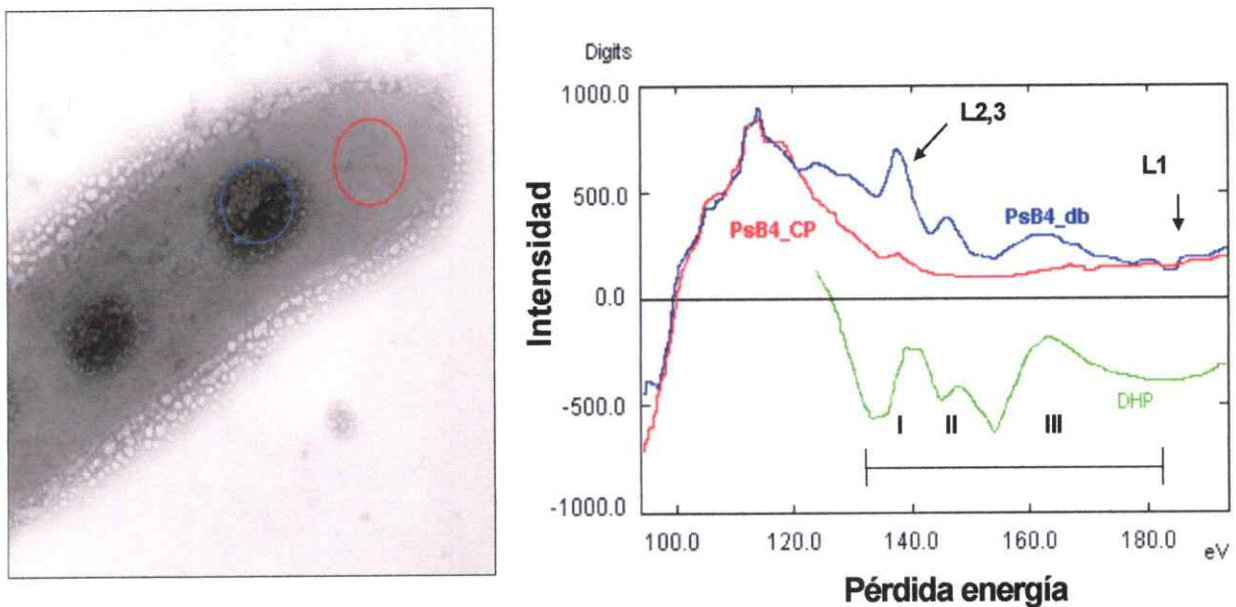


Figure 8. Espectros EELS de las células de *Pseudomonas sp. B4*. Se muestra el espectro abstraído del gránulo analizado (PsB4-db, azul) y del área citoplasmática no relacionada (PsB4-CP, rojo). El espectro de la hidroxilapatita de calcio se utilizó como control de fosfato (DHP, verde).

El inicio de la energía de ionización de la franja L2,3 coincide en los 135 eV para los tres espectros, seguido por la característica pérdida de energía cerca de las estructuras de los extremos (ELNES) con la región de pérdida de energía más alta alrededor de los

150 eV (indicado con una barra en la Figura 8). Los tres máximos principales (I, II, y III), están presente en ambos espectros (gránulo y control) pero el máximo III del espectro del gránulo es menor que en la hidroxilapatita. Esto indica diferencias en la vecindad electrónica de los átomos de fósforo en ambos compuestos, es decir, el carácter anhídrido ácido del fosfato del probable poliP contra el carácter no-anhídrido de la hidroxilapatita de calcio.

Al operar el microscopio en el modo ESI (imagen espectroscópica electrónica) es posible representar la distribución de fosfato en toda el área celular. Según lo muestra la Figura 9, la distribución de fosfato obtenida por ESI, coincidió exactamente con las áreas de los gránulos densos al paso de los electrones.

En resumen, mediante el análisis de difracción de rayos-X acoplados a microscopía electrónica demostramos que los gránulos densos a los electrones acumulados por *Pseudomonas sp.* B4 durante el crecimiento en bifenilo como única fuente de carbono están compuestos principalmente por fosfato y muy probablemente poliP.

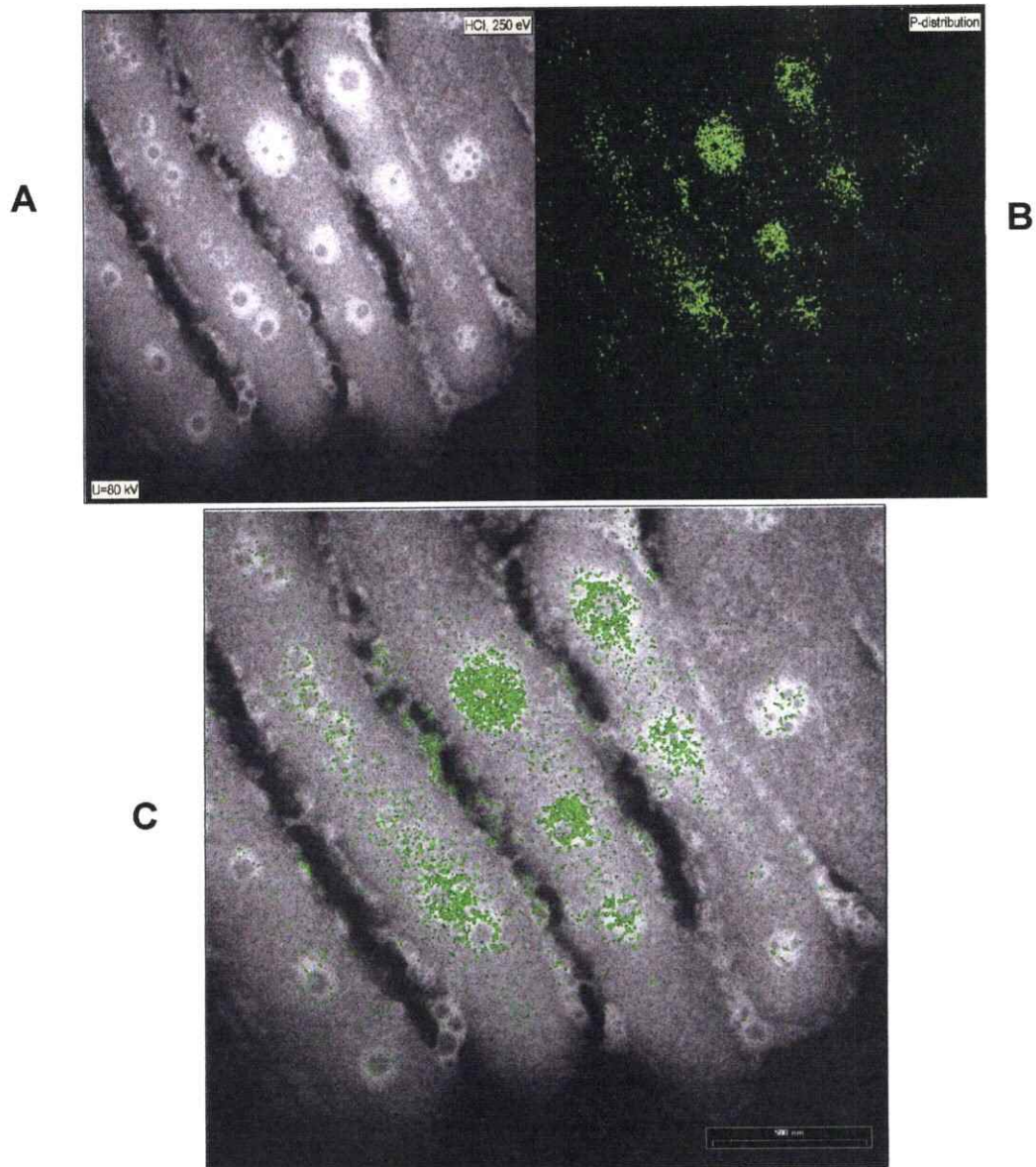


Figura 9. Distribución del fosfato en las células de *Pseudomonas* sp. **B4.** El mapa de distribución del fosfato (verde) obtenido por ESI (**B**) y el negativo de la micrografía electrónica (**A**) se superpusieron en la imagen **C**.

3.1.3. Análisis cualitativo y cuantitativo de los poliP de *Pseudomonas sp.* B4 en diferentes condiciones de crecimiento

Para determinar si el aumento en la cantidad de los gránulos densos compuestos de fosfato durante el crecimiento en bifenilo es realmente debido a un aumento en los niveles de poliP, cuantificamos este biopolímero en las mismas condiciones y medios de cultivo estudiados en las observaciones de microscopía electrónica. Esta metodología se basa en la conversión enzimática del poliP, previamente extraído de las células, a ATP mediante tratamiento con la PPK1r de *E. coli* en exceso de ADP y la posterior cuantificación del ATP mediante la producción de luz en presencia de luciferina/luciferasa (Ault-Riché *et al.*, 1998).

Como se muestra en la Figura 10A, el contenido de poliP en las células de *Pseudomonas sp.* B4 crecidos en las diferentes fases del crecimiento y medios de cultivo coincide exactamente con el patrón observado de los gránulos densos a los electrones. Es decir, los mayores niveles de poliP se observaron en bifenilo en todas las fases del crecimiento y en glucosa sólo cuando las células se encontraban en la fase estacionaria. Estos valores son 10 veces superiores a los observados durante el crecimiento exponencial en glucosa o en medio rico LB en todas las fases de crecimiento. Estos resultados confirman que la acumulación de los gránulos densos a los electrones en *Pseudomonas sp.* B4 es debida a un incremento en los niveles de los poliP inorgánicos. Los poliP purificados se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (Figura 10B, carril 4) y se observó que estos tenían un tamaño inferior a los 750

residuos de Pi del poliP sintetizado *in vitro* por la PPK1r de *E. coli* (Ault-Riché *et al.*, 1998; Figura 10B, carril 4), y superior al de los patrones de poliP empleados (15 y 75 residuos de Pi).

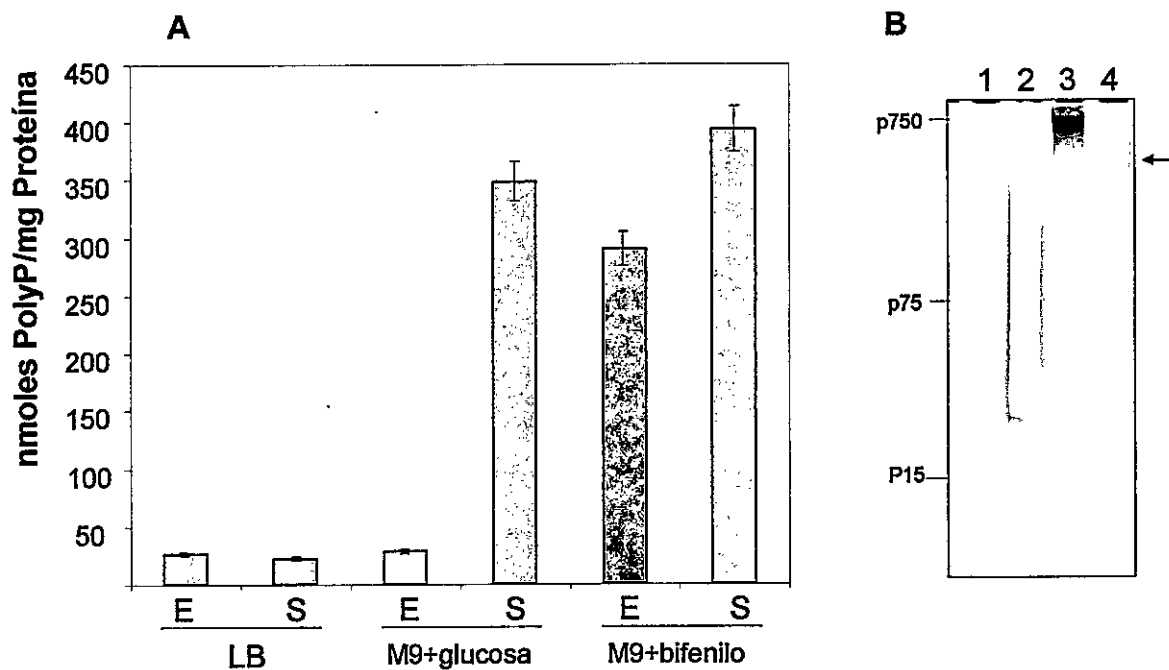


Figura 10. Influencia del medio y la fase de crecimiento en la acumulación de poliP en *Pseudomonas sp. B4*. (A). Cuantificación de los poliP extraídos mediante perlas de vidrio en diferentes fases exponencial (E) y estacionaria (S) de crecimiento. (B) Análisis del poliP extraído desde células de *Pseudomonas sp. B4* mediante electroforesis en gel de poliacrilamida. El gel se tiñó con Azul de Toluidina (línea 4, flecha) y se indican los patrones de poliP (línea 1, P15; línea 2, P75; línea 3, P750). Las barras indican el promedio de tres réplicas y las barras de error indican la desviación estándar.

Para establecer si las mismas condiciones en que se acumulan los poliP en *Pseudomonas sp. B4* crecidas en bifenilo ocurren en presencia de los clorobifenilos, se realizaron trasposos de células crecidas hasta fase exponencial de crecimiento ($OD_{600} \sim 0,5-0,8$) en medio definido (M9) con glucosa se al mismo medio pero con 2-,3- y 4-

clorobifenilo como únicas fuentes de carbono. En estas condiciones se observó una masiva acumulación de gránulos de poliP después de 6 h de haber sido traspasadas a los medios con lo clorobifenilos (Figura 11B, C y D). Este fenómeno no se observó cuando las células se traspasaron a glucosa (Figura 10A) y a glicerol (no mostrado), una fuente de carbono utilizada también como control, en las mismos tiempos estudiados.

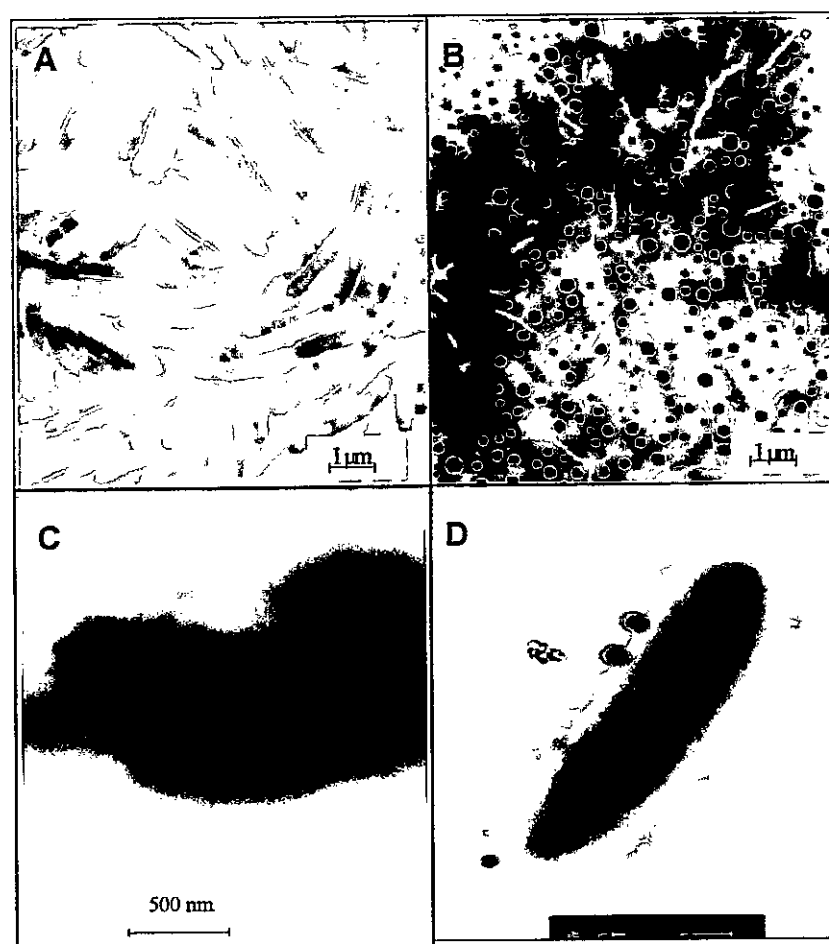


Figura 11. Presencia de gránulos de poliP en células de *Pseudomonas* sp. B4 expuestas a la presencia de clorobifenilos. Microfotografías electrónicas de células crecidas en medio M9 con glucosa y transferidas a otros medios suplementados con (A) glucosa, (B) 4Cl-bifenilo, (C) 3Cl-bifenilo y (D) 2Cl-bifenilo luego de 6 h del traspaso.

3.2. PCBs y estrés en *Pseudomonas sp. B4*

Aunque bastante se conoce sobre la genética y enzimología de las vías de degradación de los PCBs, poco se sabe de los ajustes fisiológicos y la respuesta adaptativa de estas bacterias degradadoras durante su crecimiento en estos contaminantes. Teniendo en cuenta que los poliP son importantes en los mecanismos de resistencia de los microorganismos a condiciones desfavorables y estresantes, estudiamos la posibilidad que en estos microorganismos se genere una condición de estrés durante la metabolización del bifenilo y los clorobifenilos como únicas fuentes de carbono y energía.

Para comprobar si en las células de *Pseudomonas sp. B4* se genera una condición de estrés cuando crece en bifenilo y sus derivados clorados, determinamos los niveles de la proteína general de estrés GroEL durante experimentos de traspaso de las bacterias a medios con bifenilo y sus derivados clorados. Según lo demuestra la Figura 12, los niveles de GroEL aumentaron en las células de *Pseudomonas sp. B4* cuando éstas se cambiaron desde un medio definido con glucosa a otros con bifenilo o clorobifenilos como únicas fuentes de carbono. Aunque la máxima inducción de GroEL (aproximadamente 8 veces) se observó cuando las células control se sometieron a un estrés de calor (45 °C), durante el cambio a 2 y 4-clorobifenilo, la proteína de estrés aumentó 3-4 veces comparado con las células control que se mantuvieron en glucosa. La inducción de GroEL fue mayor en todas las células expuestas a los clorobifenilos que en las células expuestas al bifenilo. Esta respuesta, típica de la respuesta al estrés

térmico, demuestra que el crecimiento en estos compuestos genera un estrés que puede involucrar diferentes mecanismos para que se adapten a estas condiciones.

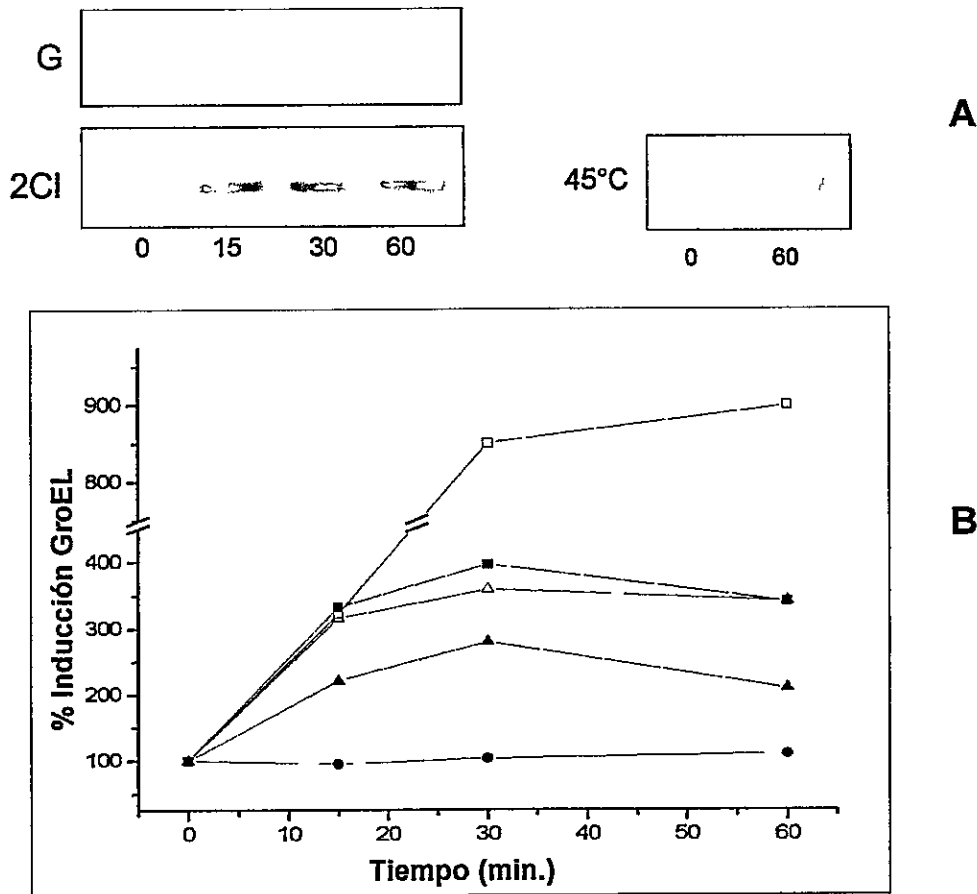


Figura 12. Inducción de los niveles de la proteína de estrés GroEL en presencia de bifenilo y clorobifenilos. Células de *Pseudomonas* sp. B4 crecidas en fase exponencial se traspasaron de un medio definido (M9) suplementado con glucosa (●, G) a otros con bifenilo (▲), 2-clorobifenilo (Δ, 2Cl), y 4-clorobifenilo (■) como únicas fuentes de carbono. Las células control se mantuvieron en glucosa (●) o sometieron a un estrés térmico (45 °C, □). Para cuantificar los niveles de GroEL se utilizaron los extractos proteicos de las células y mediante "Western-blotting" se detectaron, cuantificaron y graficaron los niveles de GroEL (B, Scion Image Program). Un ejemplo de los resultados de la inmunodetección se ejemplifica en (A) para el caso de las células controles [glucosa, G y estrés térmico (45 °C)] y las traspasadas a 2-clorobifenilo (2Cl).

Los compuestos organoclorados, incluidos los PCBs, producen un estrés oxidativo en los diversos sistemas biológicos donde se acumulan (Schilderman *et al.*, 2000). En las células vivas sometidas a diferentes tipos de estrés ambientales es causado tanto por la sobreproducción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) como por la disminución de los antioxidantes. Por esta razón medimos la generación de estrés oxidativo con el sensor DCFH-DA en las células crecidas exponencialmente en diferentes fuentes carbonadas (Crow, 1997). En la Figura 13 se muestra *Pseudomonas sp.* B4 crecida exponencialmente en glucosa tienen muy bajos niveles de fluorescencia. Sin embargo, se aprecia un aumento de la fluorescencia cuando crece en bifenilo e incrementos superiores cuando las células lo hacen en 2- y 4-clorobifenilo. Estos resultados muestran claras evidencias que en *Pseudomonas sp.* B4 se genera una condición de estrés oxidativo cuando crecen en estos compuestos organoclorados.

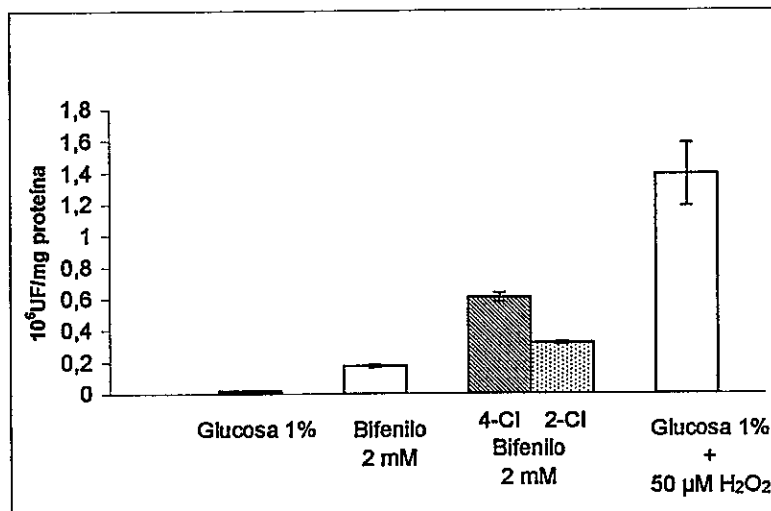


Figura 13. Estrés oxidativo en *Pseudomonas sp.* B4 expuestas a bifenilo y clorobifenilos. Las células de *Pseudomonas sp.* B4 se colectaron en fase exponencial en las condiciones señaladas y la fluorescencia se midió como está descrito en Materiales y Métodos. Las barras indican el promedio de tres mediciones de dos réplicas y las barras de error indican la desviación estándar.

Para analizar estas tres respuestas simultáneamente, determinamos los cambios en el curso del tiempo de los poliP, la proteína de estrés GroEL, y las especies reactivas de oxígeno (ROS) en células de *Pseudomonas sp.* B4 cuando se transfirieron a glucosa y 2-clorobifenilo como únicas fuentes de carbono (Figura 14). Poco después de la transferencia (2 h), no hubo una gran diferencia en las especies reactivas entre las células transferidas a glucosa y a 2-clorobifenilo, pero el nivel de GroEL era mucho más alto en las células traspasadas a 2-clorobifenilo (Figura 13 y 14C). Durante el tiempo restante aumentaron tanto los niveles de GroEL como de ROS en las células expuestas a 2-clorobifenilo (hasta 12 h). Esta síntesis prolongada de GroEL sugiere que hay acumulación lenta y continua de las proteínas anormales, parecido al fenómeno que ocurre en la respuesta al calor pero en esta ocasión como consecuencia del metabolismo del substrato 2-clorobifenilo. La Figura 14A demuestra una situación similar con los niveles de ROS, puesto que estos niveles aumentaron entre 6 y 7 veces cuando las células se transfirieron a 2-clorobifenilo (Figura 14A). En cuanto a los niveles de poliP, poco después del cambio de medio (hasta 4 h) había aumentos en los niveles de poliP en todas las condiciones (Figura 14B), probablemente reflejando la adaptación inicial de las células al cambio de medio. Sin embargo, a partir de las 4 h y hasta finalizado el traspaso, solamente las células cambiadas a 2-clorobifenilo, a diferencia de las mantenidas en glucosa, mostraron un aumento sostenido en los niveles de poliP. Para descartar que este fenómeno se debiera solo al cambio de la fuente carbonada utilizamos como control células crecidas en glicerol, una fuente de carbono

no relacionada y cuyo comportamiento fue muy similar al obtenido en glucosa (Figura 14B). Esto indica claramente que el efecto observado con 2-clorobifenilo no es simplemente debido a un cambio en la fuente de carbono del medio.

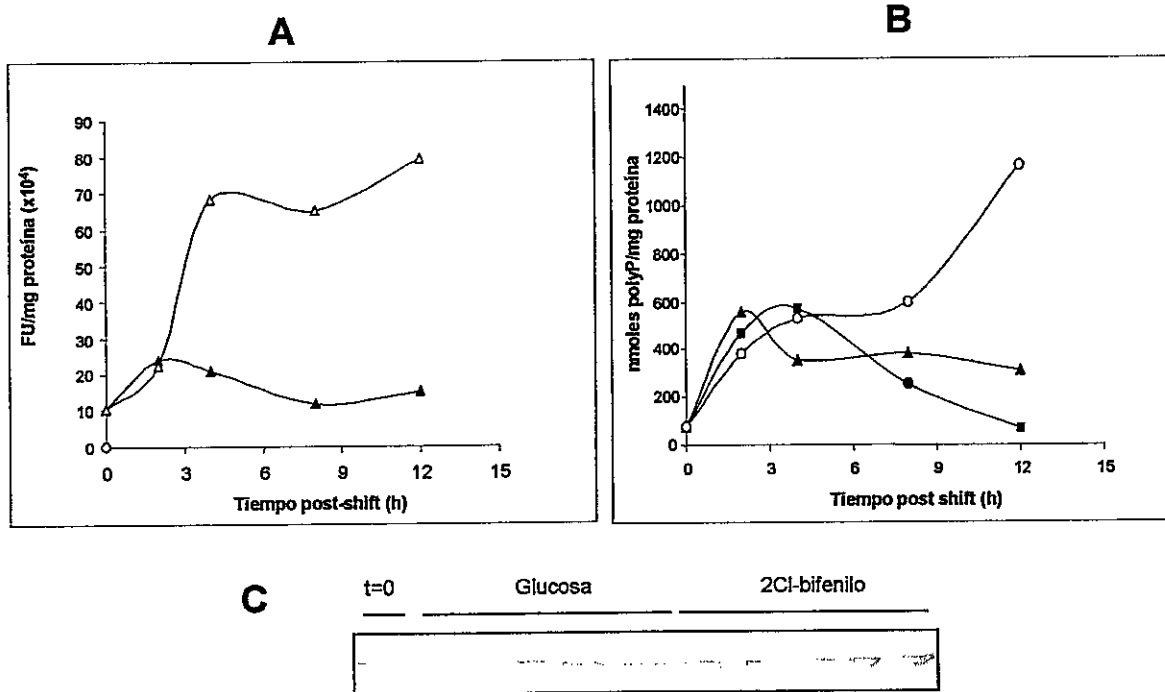


Figura 14. Cambios en el tiempo de los poliP, GroEL y ROS en células de *Pseudomonas sp. B4*. Células de *Pseudomonas sp. B4* crecidas en fase exponencial se traspasaron de un medio definido (M9) a un medio suplementado con glucosa (▲), glicerol (●) o 2-clorobifenilo (Δ en A y ○ en B) como únicas fuentes de carbono y energía. Los niveles de ROS (A), poliP (B) y GroEL (C) se determinaron según lo descrito en Materiales y Métodos.

Los altos niveles de poliP y estrés generados en *Pseudomonas sp. B4* durante el crecimiento en presencia de bifenilos y sus derivados clorados indica que estos contaminantes no solo son utilizados como fuente de carbono sino que también son generadores de una condición de estrés general a la que posiblemente la célula se adapta mediante cambios en el contenido de los poliP (ver Discusión).

3.3. Obtención de las bacterias incapaces de acumular poliP inorgánicos

Teniendo en cuenta los estudios que demuestran las funciones regulatorias de los poliP cuando un microorganismo se encuentra ante una carencia o condición de estrés y con el objetivo de dilucidar los mecanismos que involucran los poliP en *Pseudomonas sp.* B4, decidimos obtener bacterias incapaces de acumular poliP. Para lograr este objetivo se pueden seguir dos estrategias, una mediante la generación de mutantes del gen *ppk 1* (polifosfato quinasa1) que sintetiza los poliP y la otra mediante la sobre-expresión del gen *ppx* (exopolifosfatasa) que degrada los poliP de la célula. La primera estrategia presenta algunas desventajas debido por una parte a que el genoma de *Pseudomonas sp.* B4 no está secuenciado y además en dicho género se ha comunicado la existencia de otras enzimas capaces de sintetizar poliP (Zhang *et al.*, 2002). Esto, sumado a las ventajas de la segunda estrategia en cuanto a poder obtener un fenotipo condicional mediante una expresión regulada del gen *ppx* y poder usar los mismos vectores en diferentes bacterias degradadoras de PCBs nos sugirió sobre-expresar la PPX.

3.3.1. Diseño y estrategia de los vectores de expresión

Para eliminar todo el contenido de poliP y debido a que muchas PPX bacterianas sufren inhibiciones post-traduccionales por diversas biomoléculas (Wurst *et al.* 1995), en el diseño se utilizó el gen *PPX1* de *S. cerevisiae* que se ha logrado expresar sin dificultad

en *E. coli* y no presenta problemas de inhibición (Lichko *et al.*, 2003). Para la sobreexpresión de la PPX1 de levadura usamos vectores de amplio rango tanto de expresión altamente regulada (pMLBAD) como constitutiva (pMLS7, Lefebvre y Valvano, 2002).

3.3.1.1. Subclonación del gen PPX1 de levadura en *E. coli*

Para ello primeramente se subclonó el gen *PPX1*, amplificado por PCR con los partidores que contienen los sitios de restricción *EcoRI* y *BamHI* en los extremos 5' y 3' respectivamente, en los sistemas pGEM®-T-easy y pCR®T7/CT-TOPO®. De esta forma se insertó el gen *PPX1* en marco con seis codones codificantes para la histidina hacia el carboxilo terminal (*PPX1r*, Figura 15A). Los productos de ligación se usaron para transformar la cepa de *E. coli* JM109. Luego de la selección por resistencia a Amp y de verificar la presencia del gen *PPX1* mediante PCR en colonias, se eligió un clon positivo de los plasmidios pTYPPX1 y pTOPOYPPX1, respectivamente y se purificaron. Para verificar la sobreexpresión de la *PPX1r* se transformó el plasmidio pTOPOYPPX1 en la cepa de expresión regulada de *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Esta cepa tiene en el cromosoma una copia del gen *lacI* y de la RNA polimerasa de T7 bajo el control del promotor *lacUV5*. La adición de IPTG a los cultivos induce a la T7 RNA polimerasa que transcribe el gen clonado bajo el control del promotor T7. La cepa obtenida se llamó FCH1. La selección de las cepas transformantes y recombinantes se realizó por resistencia a Amp y PCR en colonias. Los cultivos se crecieron en medio LB y se indujeron con IPTG 2 mM durante 3 h. Cuando se analizaron los extractos crudos

provenientes de células FCH1 crecidas en ausencia o en presencia de IPTG, tanto por Western-blot (anticuerpo α -His6) como por tinción con azul de Coomassie de geles de SDS-PAGE, se observó la inducción de una banda proteica de peso molecular correspondiente a 45 kDa (Figura 15C). La secuencia del gen clonado se verificó mediante la secuenciación de ambas hebras, mostrando un 100 % de identidad con la secuencia de la proteína obtenida a partir del DNA genómico.

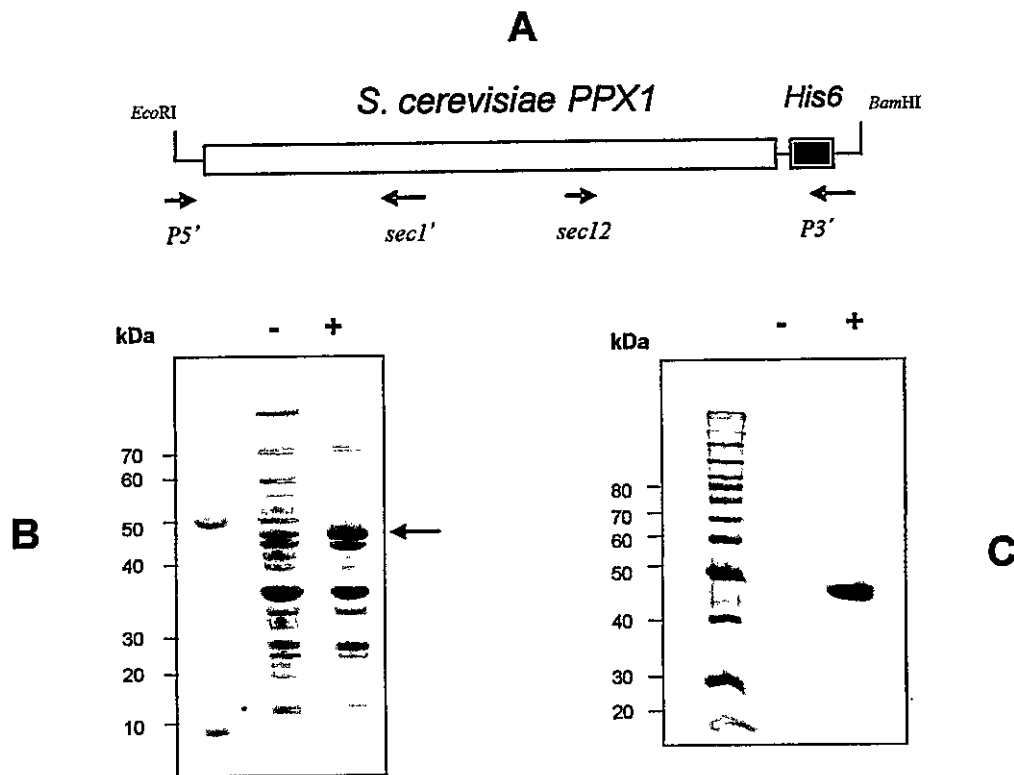


Figura 15. Subclonación y sobreexpresión del gen PPX1 de *S. cerevisiae* en *E. coli*. (A) El gen PPX1 unido a la cola HIS6 (PPX1r) se subclonó en el vector de expresión de fragmentos de PCR pCR[®]T7/CT-TOPO[®] y las células de la cepa resultante (FCH1) se crecieron durante 3 h en ausencia (-) o en presencia (+) de IPTG 2 mM. Las proteínas totales se analizaron por SDS-PAGE y se tiñeron con azul de Coomassie (B) y también se transfirieron a una membrana de nylon y se revelaron mediante Western-blot (α -His6, C). La flecha en (B) indica la posición de la banda de la PPX1r en el extracto total coincidente con la única banda observada en el western-blot (C).

3.3.1.2. Clonación del gen *PPX1r* en vectores de expresión para *Pseudomonas* sp. B4

Luego de subclonado el gen *PPX1r* en *E. coli* se clonó un fragmento *EcoRI* proveniente del pTYPPX1 en la orientación correcta en el vector de expresión regulada pMLBAD previamente digerido con *EcoRI* y desfosforilado con fosfatasa alcalina (CIP) para obtener el plasmidio pBADPPX1 (Figura 16A). Por otra parte, un fragmento *EcoRI/BamHI* del gen *PPX1r* se clonó en el vector de expresión constitutiva pMLS7 previamente digerido con las mismas enzimas de restricción para obtener el plasmidio pS7PPX1 (Figura 16B). Los plasmidios resultantes se transformaron en la cepa de *E. coli* JM109 y se seleccionaron por resistencia a Trimetropin (50 µg/ml). La integridad del gen *PPX1r* en estos plasmidios fue verificada tanto por análisis de restricción (Figura 16C) como mediante secuenciación de ambas hebras del DNA.

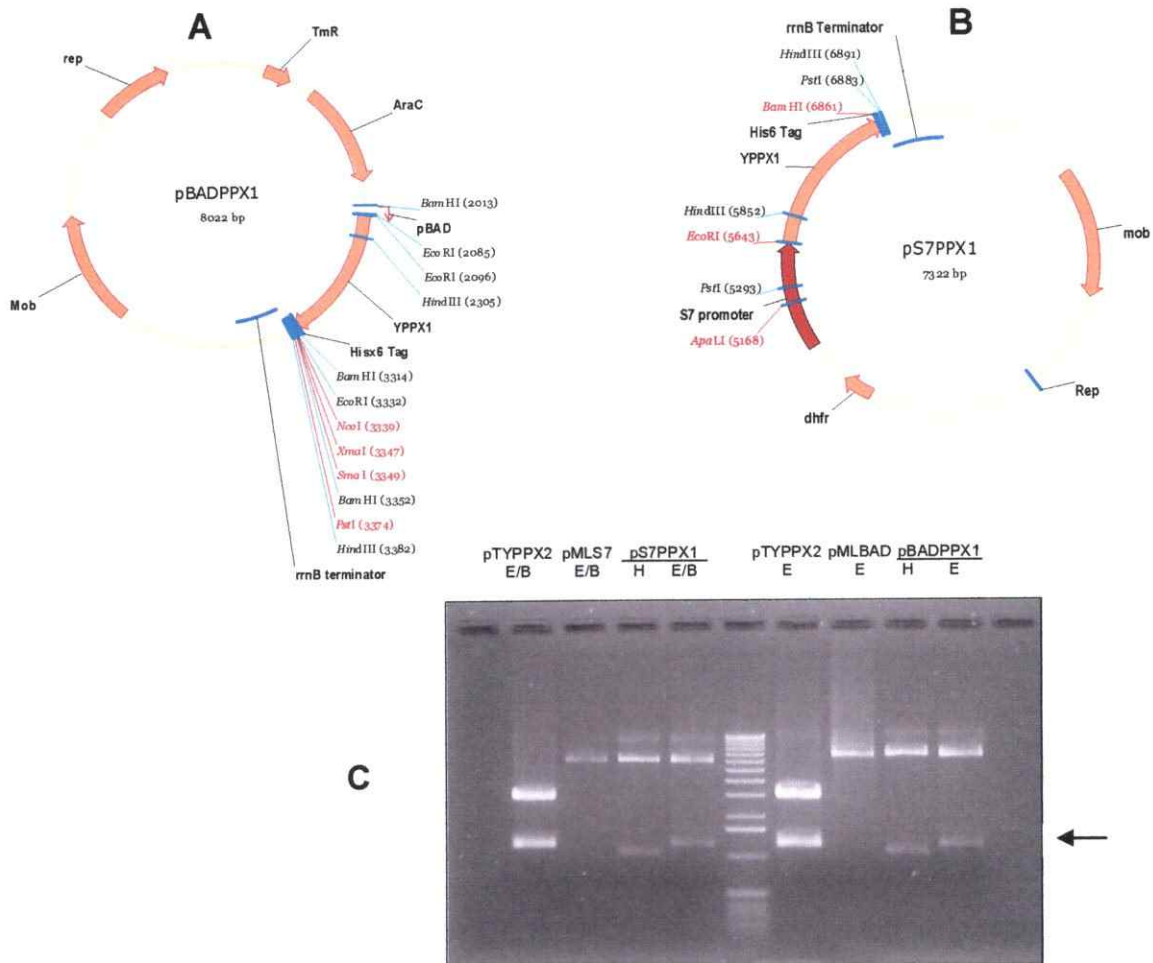


Figura 16. Clonación del gen PPX1r en vectores de expresión para Pseudomonas sp.
B4. Diagrama de los plasmidios de expresión regulada pBADPPX1 (A) y constitutiva pS7PPX1 (B). (C) Gel de agarosa (1%) de los fragmentos de DNA del análisis de restricción de los plasmidios recombinantes con las enzimas EcoRI (E), BamHI (B) y HindIII (H). El marcador de peso molecular utilizado es el 1kb ladder (Invitrogen) y la flecha indica las diferentes bandas que indican la presencia del gen PPX1r en los plasmidios recombinantes pTYPPX2, pS7PPX1 y pBADPPX1.

3.3.2. Análisis funcional de la expresión del gen *PPX1r* en *Pseudomonas sp.* B4

Una vez obtenidos los plasmidios de expresión constitutiva (pS7PPX1) y regulada (pBADPPX1) se purificaron y se utilizaron para transformar células de *Pseudomonas sp.* B4 por electroporación y los recombinantes se seleccionaron en placas de LB suplementadas con Trimetropin (LBT, Figuras 17A y B). Como controles se electroporaron los plasmidios sin el inserto PPX1r (pMLS7 y pMLBAD). Las colonias recombinantes se chequearon por PCR en colonia con los partidores del gen *PPX1r* (Figura 17C). Sólo con el objetivo de demostrar la versatilidad de estos vectores, también electroporamos las células de *B. xenovorans* LB400, la cepa modelo para la degradación de los PCBs, y logramos obtener satisfactoriamente colonias recombinantes para ambos plasmidios de expresión (resultados no mostrados).

Al inspeccionar ocularmente la morfología de las colonias recombinantes de *Pseudomonas sp.* B4 que sobreexpresan constitutivamente el gen *PPX1r* en comparación con las colonias controles se apreciaron diferencias tanto en la forma como en el tamaño. Las colonias controles (pMLS7, Figura 17A) son idénticas al tipo salvaje y debido a su alta movilidad se esparcen rápidamente por la placa. Curiosamente en las placas de las colonias recombinantes (pS7PPX1, Figura 17B) se mezclaban en igual medida colonias idénticas al fenotipo control (CG, de colonia grande) con colonias pequeñas (CP, de colonia pequeña). Ambos tipos de colonias son positivas al ser analizadas por PCR en colonia e igualmente observamos el fenómeno en las colonias

recombinantes que sobreexpresan reguladamente el gen *PPX1r* (pBADPPX1, Figura 8C). Aunque no sabemos exactamente la causa de este fenómeno, si observamos que solo en las colonias pequeñas (CP) se aprecia expresión de la *PPX1r* mediante análisis de *Western-blot* de los extractos totales (Figura 17D). Aunque no es el propósito de esta Tesis doctoral, sería muy interesante determinar las causas de este fenómeno que curiosamente se observó también en las colonias de recombinantes de *B. xenovorans* LB400 (resultados no mostrados).

La distinción de los recombinantes mediante la resistencia al trimetropin, el PCR en colonia y el *Western-blot* no permiten una caracterización funcional de la PPX sobreexpresada. Para esto determinamos tanto la actividad PPX como el contenido de poliP en las células recombinantes y demostrar que la sobreexpresión de la *PPX1r* en *Pseudomonas sp.* B4 causa la degradación de la mayoría del poliP celular (poliP-).

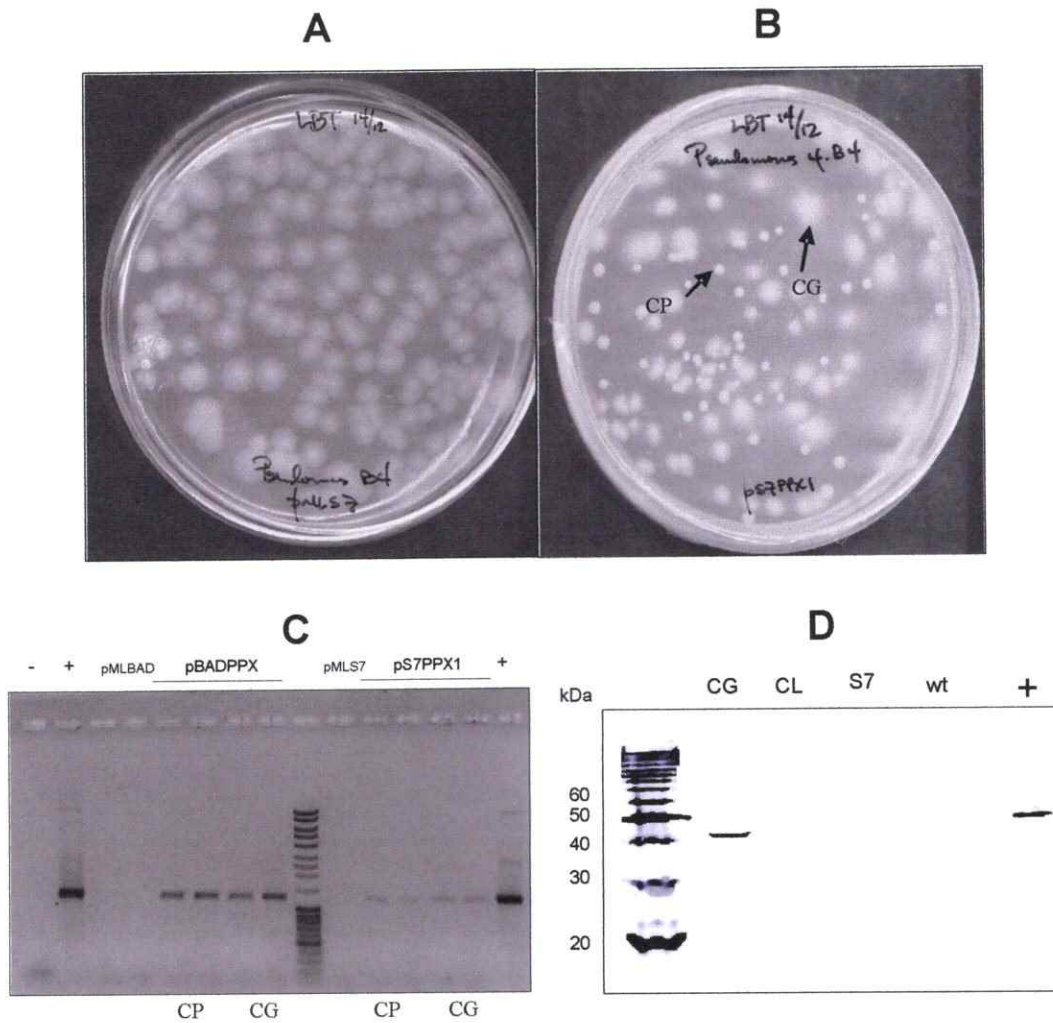


Figura 17. Sobreexpresión de la PPX1r en *Pseudomonas sp. B4*. Fotografía de las placas de LBT de las colonias de células recombinantes de *Pseudomonas sp. B4* transformadas con los plasmidios pMLS7 (A) y pS7PPX1 (B). Las flechas indican las colonias con el fenotipo colonia grande (CG) y colonia pequeña (CP). (C) Gel de agarosa (1 %) de los fragmentos de PCR a partir de las colonias. (D). Western-blot (α -His6) de extractos totales tanto de colonias controles (pMLS7, S7 y tipo salvaje, wt) como de fenotipos CP y CG.

3.3.2.1. *Actividad y regulación de la actividad de la exopolifosfatasa exógena de los recombinantes de Pseudomonas sp. B4*

El vector pMLBAD constituye un sistema regulado de expresión cuyo promotor (pBAD) es inducible por arabinosa y reprimible por glucosa. Por su parte, el vector pMLS7 expresa constitutivamente los genes bajo el promotor de la proteína ribosomal S7 (Lefebvre y Valvano, 2002). Para comprobar funcionalmente esta regulación en las cepas recombinantes de *Pseudomonas sp. B4*, determinamos la actividad PPX mediante cromatografías de capa fina y analizamos los extractos proteicos por *Western-blot* (α -His6) en las diferentes condiciones.

Las células recombinantes que contienen los plasmidios pMLBAD y pBADPPX1 se crecieron hasta la fase exponencial media y se incubaron con arabinosa 0,5 % y glucosa 1 % durante 2 h. Al analizar los extractos crudos de estas células por *Western-blot* se observó una clara inducción por arabinosa en las fracciones de la cepa pBADPPX1 con respecto al tiempo inicial (LB) donde igual había una ligera expresión basal (Figura 18B). En glucosa esa expresión basal desapareció por lo que se demostró que en *Pseudomonas sp. B4* el sistema no solo es inducible por arabinosa sino también reprimible por glucosa. Por otra parte, las células de las cepas recombinantes que contienen el plasmidio pS7PPX1 también expresaron constitutivamente la *PPX1r* en las fases exponencial y estacionaria del crecimiento celular a diferencia de las células control (pMLS7; Figura 18A).

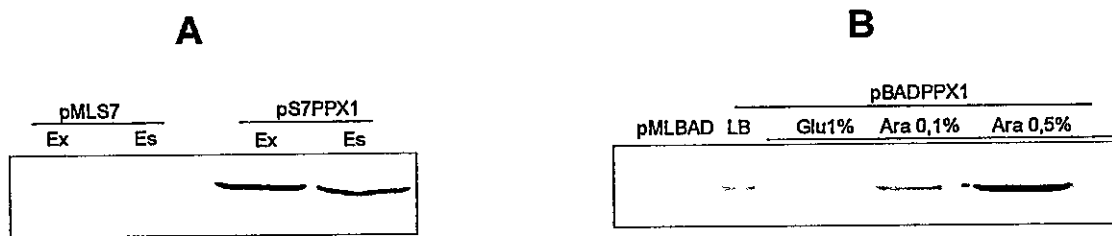


Figura 18. Expresión constitutiva y regulada de la *PPX1r* en *Pseudomonas sp. B4*. Western-blot (α -His6) de los extractos totales de células recombinantes de *Pseudomonas sp. B4*. (A) Células transformadas con los plasmidios pMLS7 y pS7PPX1 tomados en fase exponencial (Ex) y fase estacionaria (Es) de crecimiento en medio LB. (B) Células transformadas con los plasmidios pMLBAD y pBADPPX1 crecidas en medio rico (LB) y en condiciones de represión [glucosa (Glu) 1 %] e inducción [arabinosa (Ara) 0,1 y 0,5 %].

Para demostrar la funcionalidad de la *PPX1r* expresada constitutiva y reguladamente por las cepas recombinantes de *Pseudomonas sp. B4*, los extractos proteicos analizados anteriormente por *Western-blot* se utilizaron también para medir la actividad PPX. Para encontrar las condiciones óptimas para la actividad *PPX1r* en las cepas recombinantes de *Pseudomonas sp. B4*, primero realizamos ensayos de actividad PPX en las condiciones comunicadas para las enzimas heteróloga (levadura) y homóloga (bacteria). Esto permitió reducir notablemente la actividad basal de la PPX de *Pseudomonas sp. B4* y determinar con certeza los cambios en la actividad PPX de la levadura codificada en los plasmidios bajo diferentes condiciones (ver Métodos). Para ello se sintetizó y se purificó [32 P]poliP a gran escala para ser utilizado como sustrato de la reacción y el ensayo de actividad PPX se realizó según se indica en las condiciones optimizadas. La hidrólisis del sustrato poliP a Pi se confirmó mediante el análisis por cromatografía de capa fina (TLC, Figura 19).

Cuando la actividad PPX se ensayó en los extractos de las células con el vector constitutivo (pS7PPX1, Figura 19A) la actividad aumentó 10 veces (3.600 vs 370 pmoles Pi/min) respecto al control sin inserto (pMLS7). Resultados muy similares se obtuvieron en los cultivos de células con el vector de expresión regulada (pBADPPX1, Figura 19B) sin inducir y en represión (glucosa) respectivamente. Cuando se agregó arabinosa al 0,5% esta actividad se incrementó otras 7 veces (23.800 pmoles Pi/min) con respecto al cultivo sin inducir eliminando casi en su totalidad el poliP utilizado en el ensayo (Figura 19B).

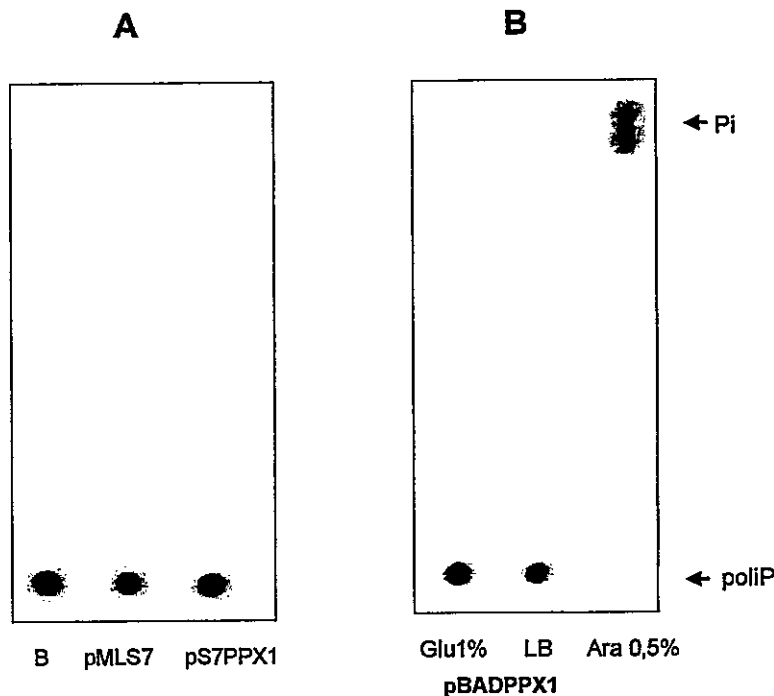


Figura 19. Actividad PPX en los extractos crudos de las células recombinantes de *Pseudomonas sp. B4*. Cromatografía en capa fina (TLC) de los productos de la actividad PPX de extractos totales de células transformadas tanto con los plasmidios de expresión constitutiva (pMLS7 y pS7PPX1, **A**; B-blanco de reacción) como de expresión regulada (pMLBAD y pBADPPX1, **B**) crecidas en medio rico (LB) y en condiciones de represión [glucosa (Glu) 1 %] e inducción [arabinosa (Ara) 0,1 y 0,5 %].

3.3.2.2. Contenido de poliP en los recombinantes de *Pseudomonas sp.* B4

Una vez demostrado el aumento regulado de la actividad PPX de los recombinantes de *Pseudomonas sp.* B4 que sobreexpresan la *PPX1r* sólo nos resta conocer si este aumento trae consigo la eliminación de la mayor parte (sino todo) el contenido celular de poliP. Para esto se purificó y cuantificó el poliP celular proveniente de las células controles (PMLS7 y pMLBAD) y de las recombinantes (pS7PPX1 y pBADPPX1) en las condiciones estudiadas anteriormente. Al menos en las condiciones de crecimiento analizadas (medio rico LB), donde se acumulan menos poliP que en el medio definido (M9), tanto la expresión constitutiva (pS7PPX1) como inducida (pBADPPX1-arabinosa 0,5%) son suficientes para remover más del 95% del contenido de poliP presente en los controles (pMLS7 y pMLBAD). Sólo en la condición de represión (pBADPPX1-glucosa 1 %) se vuelven a alcanzar los niveles de poliP de los controles (Figura 20).

Resumiendo, mediante el uso de los vectores de amplio espectro y bajo número de copias logramos la sobreexpresión regulada y constitutiva de la *PPX1r* en *Pseudomonas sp.* B4. Aunque no se muestra en esta Tesis doctoral, estos vectores se utilizaron exitosamente en *B. xenovorans* LB400, la cepa modelo para la degradación de los PCBs. Esta sobreexpresión de la *PPX1r* nos permitió contar con cepas incapaces de acumular poliP (poliP-) y de esa forma conocer más detalladamente cuál es la relación de este biopolímero con los procesos celulares de *Pseudomonas sp.* B4 y particularmente aquellos relacionados con su crecimiento en bifenilo.

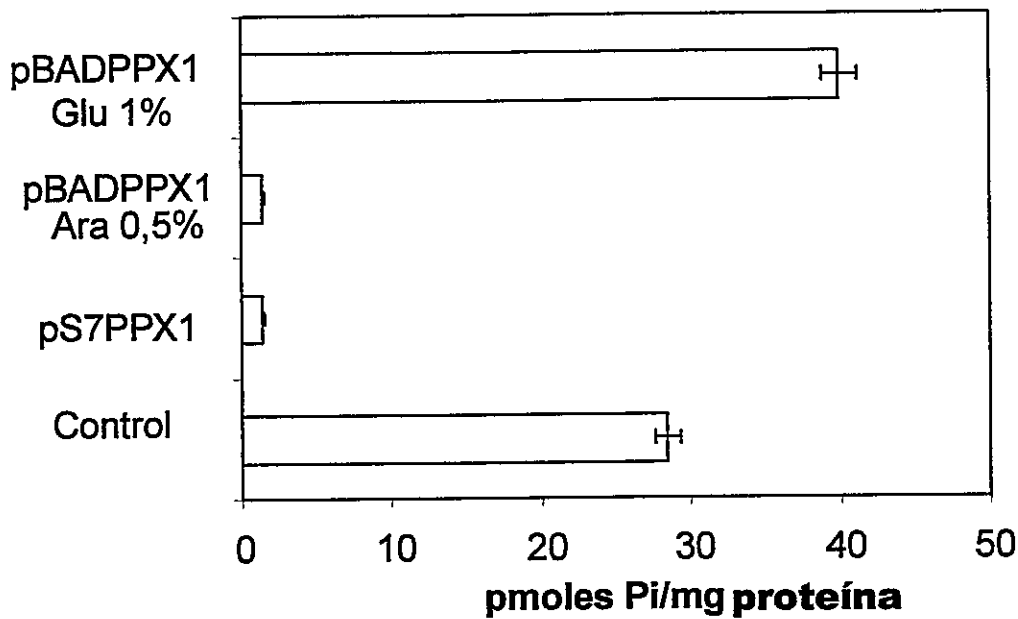


Figura 20. Contenido de poliP de los recombinantes de *Pseudomonas sp. B4*. Los poliP de las cepas recombinantes pS7PPX1 crecida en medio LB y pBADPPX1 crecida en el mismo medio (LB) y suplementada con glucosa 1 % (Glu) y arabinosa 0,5 % (Ara) se extrajeron, purificaron y cuantificaron según se detalló en Materiales y Métodos. Como control se utilizó las células recombinantes transformadas con los plasmidios controles (pMLS7 y pMLBAD) que dieron idénticos resultados. Las barras indican el promedio de tres réplicas y las barras de error indican la desviación estándar.

3.4. Caracterización de las bacterias incapaces de acumular poliP inorgánicos

La acumulación de poliP en bacterias es un proceso regulado y funciona no sólo como donante de fosfato y fuente de energía sino que además está implicado en el funcionamiento de sistemas reguladores globales (Kornberg *et al.*, 1999). La importancia de los poliP en la regulación, tanto de las actividades de las enzimas y complejos enzimáticos como de la expresión de un grupo de genes, es la base de la supervivencia para diversas bacterias, incluyendo patógenos bajo condiciones de carencia y estrés (Kulaev y Kulakovskaya, 2000).

Teniendo en cuenta que los poliP también han sido implicados como un factor esencial en diversos procesos celulares esenciales para la bioremediación, como la movilidad y la capacidad para formar biopelículas (Rashid y Kornberg, 2000; Rashid *et al.*, 2000a; Rashid *et al.*, 2000b), estudiamos éstas y otras características en las bacterias de *Pseudomonas sp.* B4 incapaces de acumular poliP. También analizamos el comportamiento de las bacterias recombinantes durante el crecimiento en bifenilo y las consecuencias de la ausencia de este biopolímero en la célula. Finalmente y para tener un estudio preliminar a escala global la función de los poliP en *Pseudomonas sp.* B4, analizamos comparativamente los cambios que tienen lugar en el proteoma de las bacterias poliP- con respecto a las células controles.

3.4.1. Movilidad y quimiotaxis en *Pseudomonas sp.* B4 (poliP-)

La movilidad sirve a los microorganismos planctónicos para buscar los nutrientes esenciales. Esto les permite responder directamente a las condiciones ambientales y a los cambios temporales en la intensidad del estímulo. A diferencia de *B. xenovorans* LB400, *Pseudomonas sp.* B4 es muy móvil y el bifenilo y sus derivados clorados son atractivos quimiotácticos (Gordillo *et al.*, resultados no publicados).

Teniendo en cuenta los resultados preliminares observados en el tamaño y la forma de las colonias recombinantes de *Pseudomonas sp.* B4, decidimos estudiar su movilidad y la quimiotaxis mediante ensayos de capilares y de movilidad en placas de cultivo. Como se aprecia en la Figura 21B, la cepa poliP- que expresa constitutivamente la *PPX1r* (pS7PPX1) esencialmente no se movió fuera del punto de inoculación luego de 48 h, apoyando el hecho que esta bacteria presenta un fenotipo inmóvil. Esta carencia de movilidad en principio no es debido a una pérdida apreciable de la estructura flagelar (ver Figuras 25 y 27).

Debido a esta falta de movimiento, los procesos de quimiotaxis también se ven afectados en estas células y como se ilustra en la Figura 21C sólo las células del tipo salvaje (WT) y las control (pMLS7) presentan índices relativos de quimiotaxis significativos. Sin embargo en las bacterias poliP- entraron menos células al capilar y no influyó la presencia de un atrayente (casaminoácidos) en el capilar.

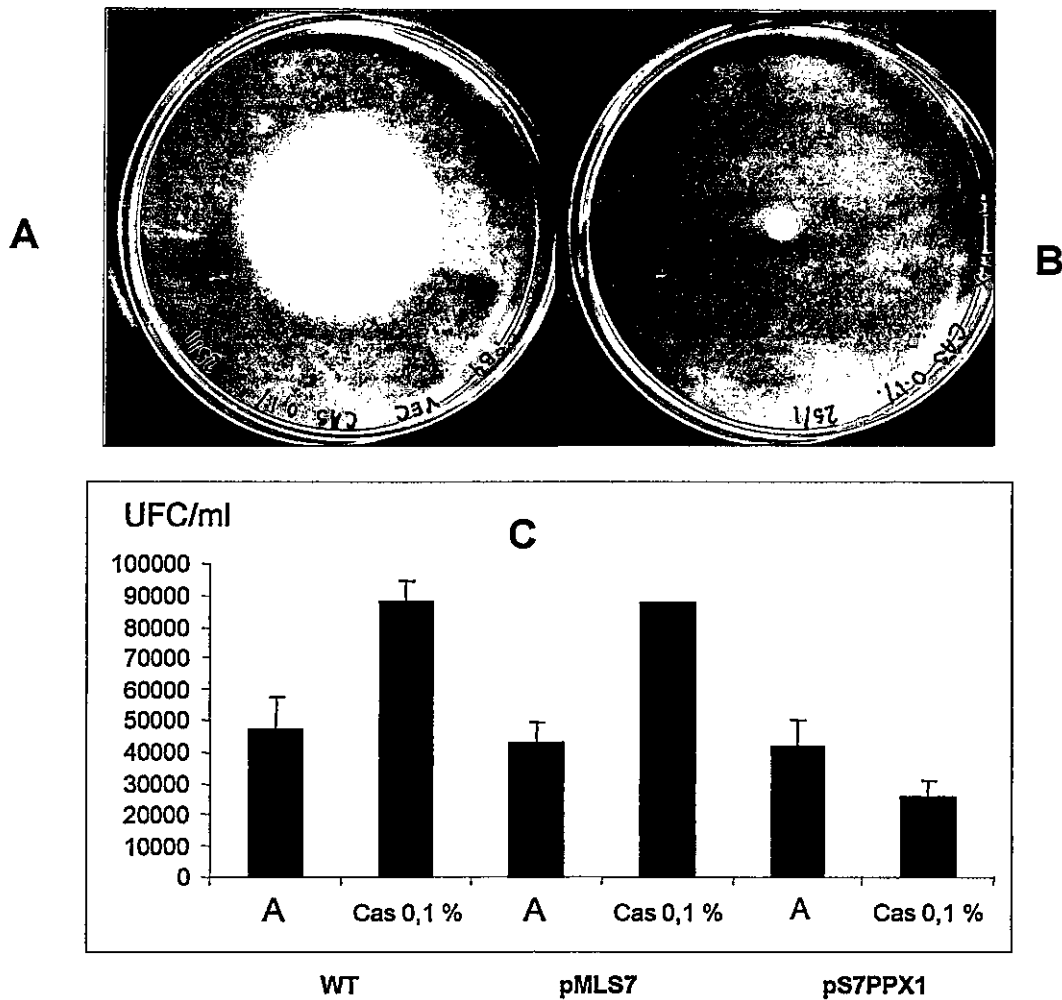


Figura 21. Movilidad y quimiotaxis en *Pseudomonas* sp. B4 poliP⁻. Placas de agar blando con medio definido suplementadas con casaminoácidos (0,1 %) del ensayo de movilidad (natación) de las cepas recombinantes pMLS7 (A) y pS7PPX1 (B) luego de 48 h de incubación a 37 °C. (C) Ensayo de quimiotaxis con capilares de las cepas de *Pseudomonas* sp. WT (tipo salvaje, IRQ 1,9), pS7PPX1 (IRQ 0,6) y pMLS7 (IRQ 2,1) utilizando casaminoácidos 0,1 % como atrayente químico. El índice relativo de quimiotaxis (IRQ) se define como la razón entre el número unidades formadoras de colonias (UFC) que ingresaron al capilar con el atrayente químico (Cas 0,1 %) y las que entran al capilar control (A, amortiguador). Las barras indican el promedio de tres determinaciones de dos réplicas y las barras de error indican la desviación estándar.

3.4.2. Formación de biopelículas en *Pseudomonas sp.* B4 (poliP⁻)

La movilidad no solo ayuda a las bacterias a alcanzar los ambientes más favorables y competir con éxito con otros microorganismos sino también desempeña una función importante en la adherencia a los sustratos sólidos y la formación de biopelículas (O'Toole y Kolter, 2003; Harshey, 2003). Los poliP están relacionados con éstos y otros procesos celulares que regulan el comportamiento "social" de las bacterias como el "quorum sensing", la virulencia y la depredación (Brown y Kornberg, 2004).

Para determinar si las capacidades de adherencia a superficies inertes estaban afectadas en las células de *Pseudomonas sp.* B4 poliP⁻, utilizamos la cepa recombinante que expresa reguladamente la *PPX1r* (pBADPPX1). Para eso utilizamos células crecidas en LB con el sistema de expresión de la *PPX1r* inducido (arabinosa 0,5%) y reprimido (glucosa 1 %) las que se inocularon e incubaron en placas de 96 pozos de PVC durante toda la noche. Luego de desechados los sobrenadantes con las bacterias no adheridas a las placas y lavados los pozos con las bacterias adheridas, éstas se tiñeron con una solución de cristal violeta 0,1 %.

De todas las condiciones ensayadas en las células recombinantes (pBADPPX1) solo en la condición en que el sistema de expresión está reprimido se observa una clara formación de biopelículas como en las células control (pMLBAD) en todas las condiciones (Figura 22A). Aunque no podemos descartar que las células poliP- formen biopelículas menos resistentes que sean eliminadas de la placa con la metodología empleada, todo indica que no solo la movilidad y la quimiotaxis, sino también la capacidad de adherencia a superficies están afectadas en las células de *Pseudomonas sp.* B4 incapaces de acumular poliP.

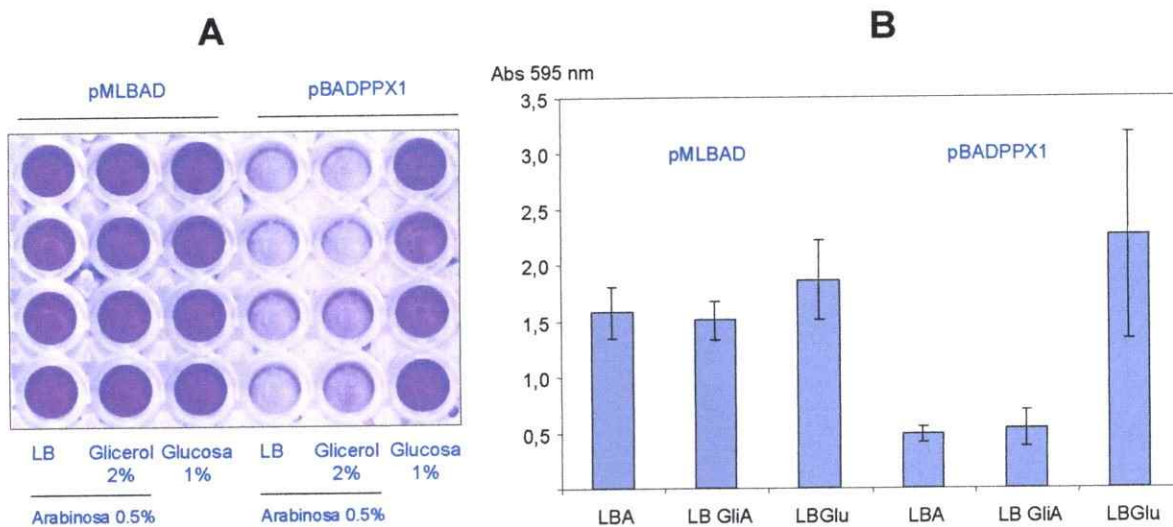


Figura 22. Formación de biopelículas de *Pseudomonas sp.* B4 poliP-. (A) Ensayo de formación de biopelículas de las células recombinantes de *Pseudomonas sp.* B4 transformadas con los plasmidios pBADPPX1 y pMLBAD crecidas en diferentes medios (LB) suplementados con glicerol 2 %, glucosa 1 % y arabinosa 0,5 %. Las células adheridas a las placas de PVC se tiñeron con cristal violeta 0,1 % y para cuantificar este fenómeno se eluye el colorante con etanol 90 % y se mide la absorbancia a 595 nm (B). Las barras indican el promedio de cuatro réplicas y las barras de error indican la desviación estándar.

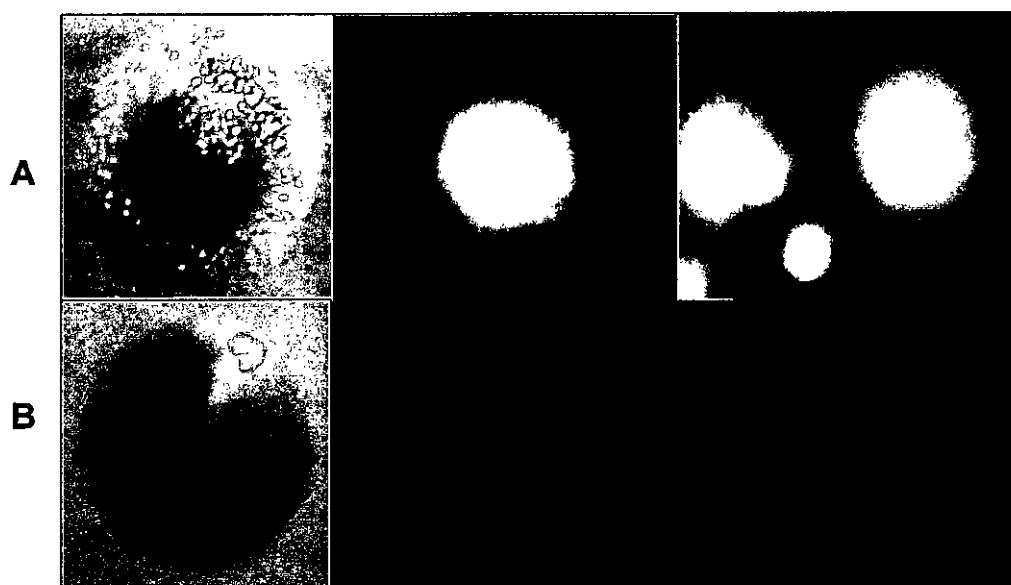


Figura 23. Morfología de las colonias de *Pseudomonas sp. B4 poliP*-. Fotografía de las colonias crecidas en medio rico LB de las células recombinantes de *Pseudomonas sp. B4* transformadas con los plasmidios *pMLS7* (A) y *pS7PPX1* (B).

Un estudio más detallado de la morfología de la colonia mediante microscopía óptica nos muestra una gran diferencia entre la colonia rugosa con forma irregular de la cepa control (Figura 23A) y la colonia lisa con forma redonda de la cepa recombinante poliP- (Figura 23B).

Estos cambios en la estructura espacial de la colonia y en la capacidad de adherencia a superficies indican cambios de la estructura y composición de la matriz de exopolisacáridos (EPS). Estos cambios tienen una gran influencia en los procesos de virulencia y protección contra condiciones ambientales adversas (Gómez-Suárez *et al.*, 2002) y su relación con los poliP será discutida más detalladamente el capítulo de Discusión.

3.4.3. Crecimiento en bifenilo y morfología de las células de *Pseudomonas sp. B4* (poliP-)

Durante el crecimiento de *Pseudomonas sp. B4* en bifenilo y clorobifenilos aumenta notablemente la presencia de los gránulos de poliP. Las células de *Pseudomonas sp. B4* incapaces de acumular este biopolímero (pS7PPX1) cuando crecen en medio definido (M9T) suplementado con bifenilo, presentan un retardo en el inicio del crecimiento y finalmente alcanzan una densidad celular menor que el cultivo de las células control (pMLS7, Figura 24B). Este fenómeno no se aprecia cuando las células crecen en glucosa como única fuente de carbono (Figura 24A).

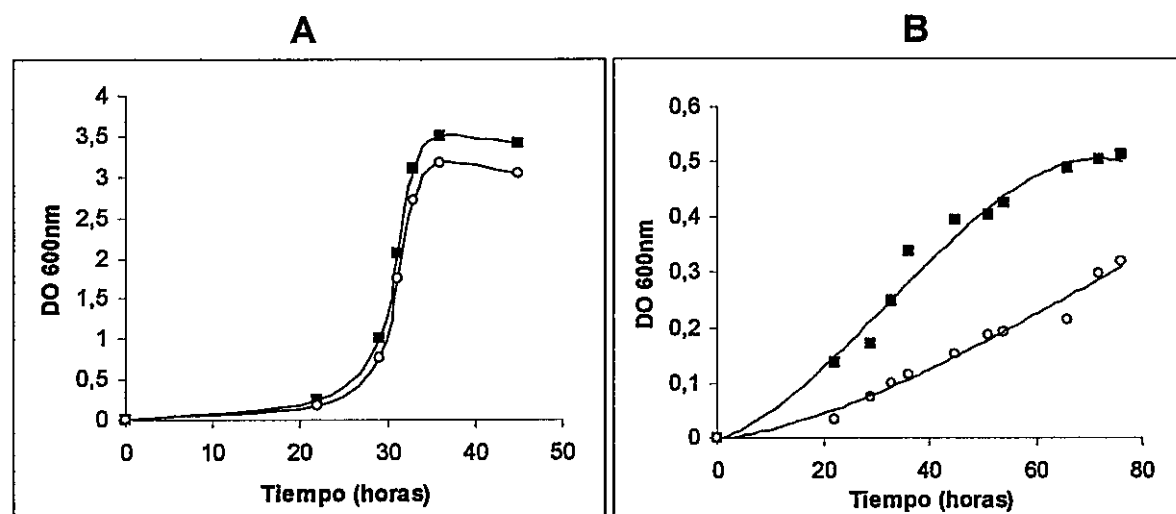


Figura 24. Crecimiento de las células recombinantes de *Pseudomonas sp. B4* en medio M9 con glucosa y bifenilo. Las células recombinantes de *Pseudomonas sp. B4* transformadas con los plasmidios pMLS7 (■) y pS7PPX1 (○) se crecieron a 37 °C con agitación en medio definido (M9T) suplementado con glucosa 1 % (A) y bifenilo 2 mM (B) como únicas fuentes de carbono.

Una inspección mediante microscopía electrónica de transmisión de las células obtenidas a las 48 h del cultivo crecido en bifenilo se muestra en la Figura 25. Las células se centrifugaron, se lavaron y sin tinción se aplicaron en las grillas de ME. Los gránulos de poliP claramente visibles en las células controles (Figura 25A) no se observaron en las células incapaces de acumular este biopolímero (Figura 25B).

Esta observación fue ratificada cuando se cuantificó el contenido de poliP en ambos tipos de células (Figura 25C) ya que la sobreexpresión de la *PPX1r* en las células poliP- causa la remoción de más del 95 % del contenido de poliP de las células control.

A pesar que las células no se sometieron a ningún tipo de tinción para generar un mayor contraste, se puede apreciar claramente los flagelos tanto en las células control como en las carentes de poliP (Figuras 25 y 26). Sin embargo debemos aclarar que a pesar de apreciar los flagelos por ME nuestra metodología no nos permite conocer más detalladamente si existen otros problemas en el resto de la estructura flagelar que den cuenta de la inmovilidad celular.

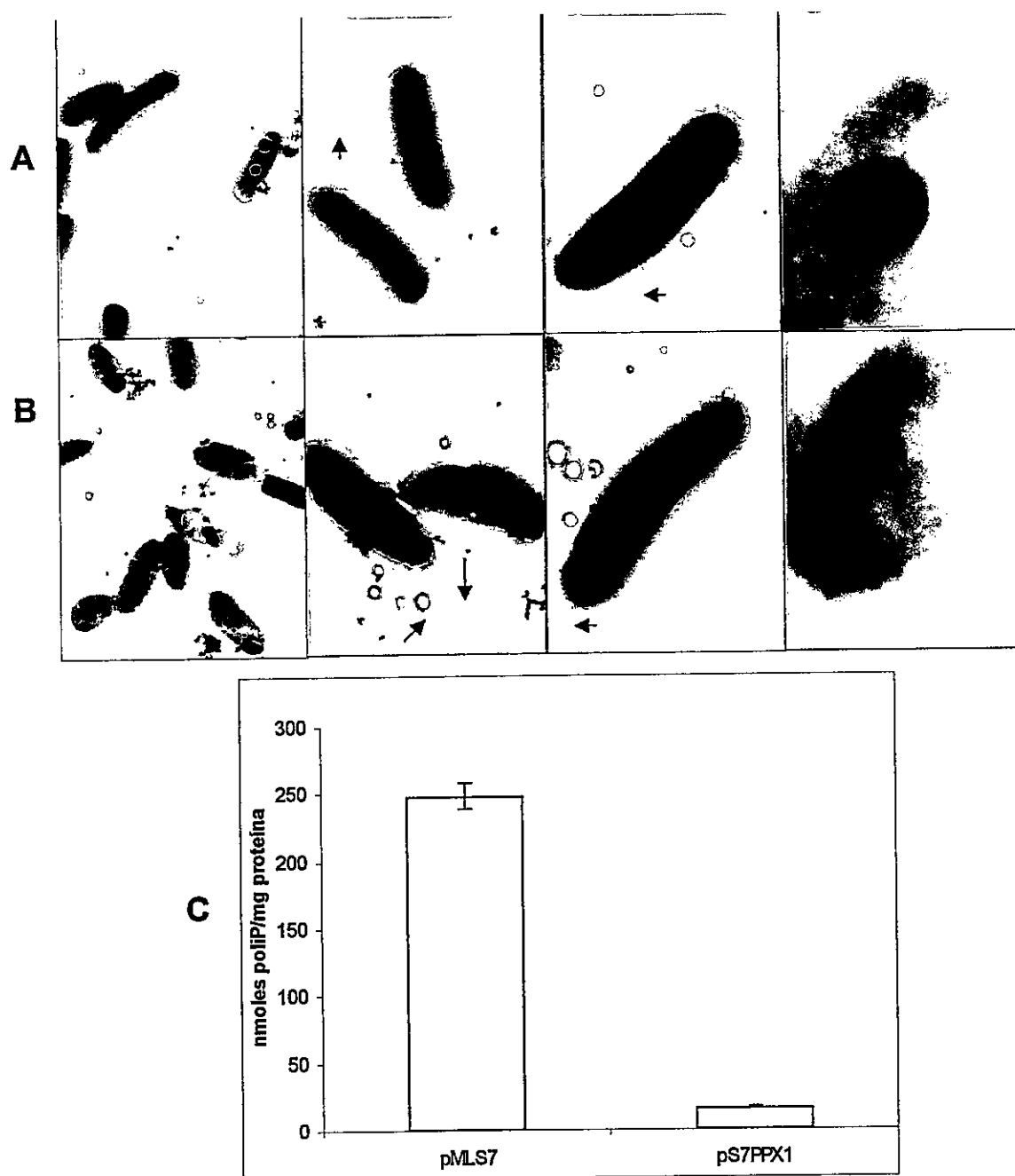


Figura 25. Presencia de gránulos de poliP en las células recombinantes de *Pseudomonas* sp. B4. Microfotografías electrónicas de las células recombinantes de *Pseudomonas* sp. B4 transformadas por los plasmidios pMLS7 (A) y pS7PPX1 (B) obtenidas luego de 48 h de crecimiento con agitación en medio definido (M9T) suplementado con bifenilo 2 mM como única fuente de carbono. (C) Contenido de poliP de las cepas recombinantes de *Pseudomonas* sp. B4. Las flechas indican la presencia de las estructuras flagelares en ambos tipos de células. Las barras indican el promedio de tres réplicas y las barras de error indican la desviación estándar.

Para poder degradar un sustrato como el bifenilo las bacterias secretan una serie de compuestos que permiten disminuir las distancias entre la célula y el sustrato sólido. Dentro de estos compuestos, los exopolisacáridos (EPS) son fundamentales en la formación de las biopelículas (Hall-Stoodley y Stoodley, 2002).

Normalmente, para visualizar los gránulos de poliP de las bacterias recombinantes de *Pseudomonas sp.* B4 crecidas en bifenilo al microscopio electrónico de transmisión, las células se centrifugaron y lavaron antes de aplicarlas a la grilla (Figura 25A y B). Teniendo en cuenta que durante este proceso las células pierden el EPS que las envuelve, se analizaron células de *Pseudomonas sp.* B4 crecidas exponencialmente en bifenilo sin centrifugar. En las células recombinantes poliP- (pS7PPX1, Figura 26A) no se observa el material extracelular que se observa alrededor de las células control (pMLS7, Figura 26B). Aunque está por demostrar definitivamente que este material constituye EPS si podemos sugerir que su ausencia sea una de las causas que explican la incapacidad de formar biopelículas y los cambios en la morfología de las colonia de las células carentes de poliP.

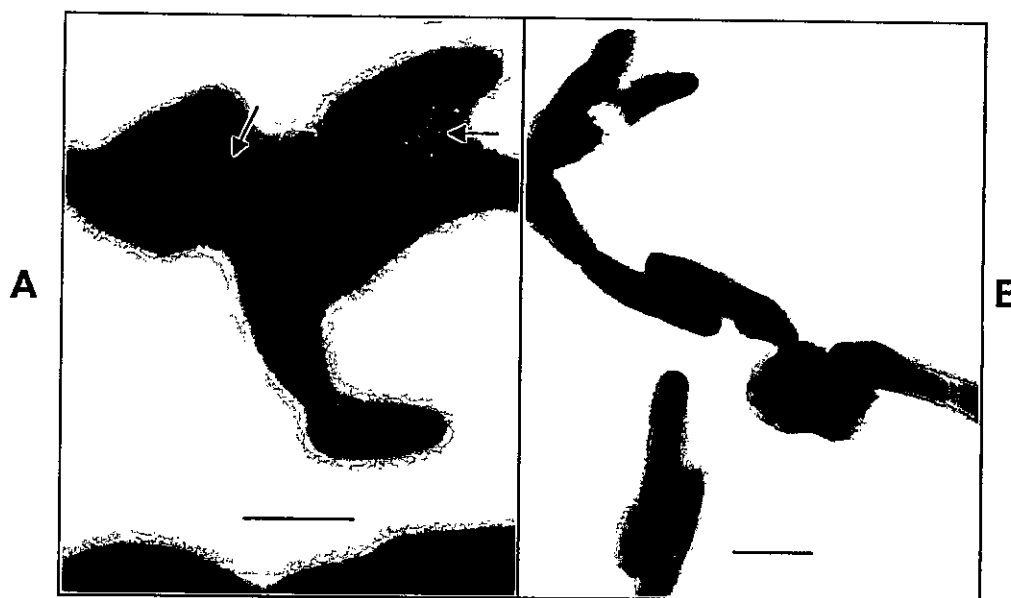


Figura 26. Presencia de material extracelular en células recombinantes de *Pseudomonas sp. B4*. Microfotografía electrónica de células sin centrifugar de las cepas recombinantes FCH5 (pMLS7, A) y FCH3 (pS7PPX1, B). Las flechas indican el material extracelular y la línea 500 nm.

3.4.4. Otros fenotipos de las células de *Pseudomonas sp. B4* (poliP-)

Uno de los fenotipos observados, hasta ahora no descritos en la literatura, fue el alargamiento de las células carentes de poliP por una posible deficiencia en la división celular (Figura 27). Curiosamente ese fenómeno solo se observó en la fase estacionaria del crecimiento en medio rico LB, nunca en medio definido M9, en ninguna de las fuentes de carbono utilizadas. Como se aprecia en el detalle ampliado, las células son aparentemente capaces de formar el septum (Figura 27C, flechas), pero incapaces de completar el proceso de separación de las células. Como se había visto anteriormente, en ninguna de las condiciones en LB se acumulan gránulos de poliP.

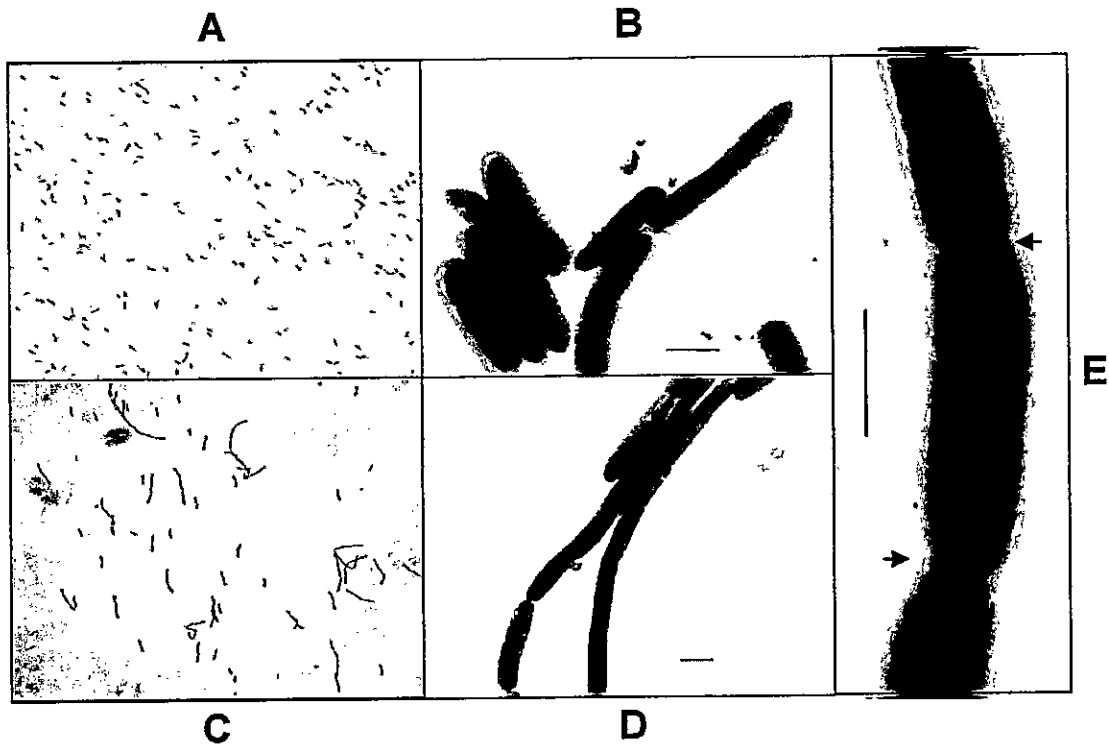


Figura 27. Efecto de la ausencia de los poliP en la división celular en las células recombinantes de *Pseudomonas sp. B4*. Fotografías de microscopía óptica (A y C) y electrónica (B, D y E) de las células recombinantes de *Pseudomonas sp. B4* transformadas con los plasmidios pMLS7 (A y B) y pS7PPX1 (C, D y E). Las flechas indican los septum y las líneas marcan 500 nm.

3.4.5. Cambios en el proteoma de las células de *Pseudomonas sp.* B4 (poliP-)

Gracias a la secuenciación del genoma de *B. xenovorans* LB400, los nuevos hallazgos en el metabolismo del benzoato y del bifenilo en *B. xenovorans* LB400 usando la genómica funcional y la proteómica, han permitido establecer las bases respecto a los mecanismos moleculares subyacentes en la biodegradación y aclarar los procesos celulares relevantes para la bioremediación de los PCBs (Denef *et al.*, 2004; 2005 y 2006).

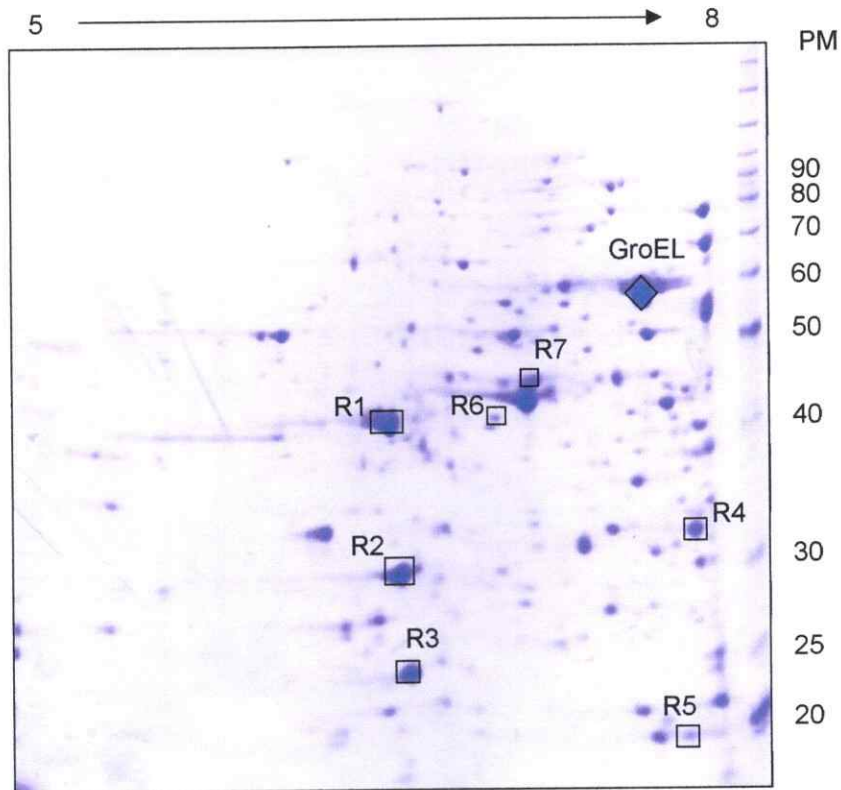
Teniendo en cuenta los diversos cambios fenotípicos observados en las células de *Pseudomonas sp.* B4 incapaces de acumular poliP, decidimos iniciar el estudio de los cambios que tienen lugar en el proteoma de estas células y que pudieran dar cuenta de las deficiencias observadas en la movilidad, adherencia a superficies y la división celular.

Para estudiar estos cambios se analizaron los proteomas de las células recombinantes de *Pseudomonas sp.* B4 transformadas con los plasmidios pMLS7 y pS7PPX1 crecidas exponencialmente en medio rico LB y se analizaron comparativamente los mayores cambios observados mediante electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2D-PAGE). Como se aprecia en las Figuras 28 y 29, observamos proteínas que aumentan o disminuyen su expresión en las células poliP- (pS7PPX1) con respecto a las células control (pMLS7). Los niveles relativos de las proteínas individuales en cada gel 2D se cuantificaron mediante un programa computacional para el procesamiento de imágenes y aquellas manchas que más

cambiaron se aislaron del gel de poliacrilamida para su posterior identificación. Los péptidos tripticos obtenidos de las proteínas de las muestras se analizaron por espectrometría de masa (ESI-QUAD-TOF). A pesar que el genoma de *Pseudomonas sp.* B4 no se conoce, gracias a la secuencia de los genomas de 7 bacterias del género *Pseudomonas* (ver Materiales y Métodos), se pudo identificar en casi todos los casos los iones de los espectros MS/MS y por consiguiente la identidad de la proteína.

Un resumen de las proteínas que logramos identificar y cuya expresión está incrementada en la cepa recombinante que sobreexpresa constitutivamente la *PPX1r* con respecto a la cepa control se muestra en la Figura 28. Por otra parte en la Figura 29 y la Tabla 5 se muestran aquellas cuya expresión está disminuida en la cepa poliP- con respecto al control.

Entre las proteínas que aumentan su expresión en las células poliP- (Figura 28) están las subunidades α y β de la Succinil-CoA sintetasa, enzima del ciclo de los ácidos tricarboxílicos que cataliza la hidrólisis del compuesto succinil-CoA y la síntesis acoplada de un nucleótido trifosfato. En mamíferos se produce la síntesis de GTP, en cambio en plantas y bacterias, se sintetiza exclusivamente ATP. Ambas reacciones son equivalentes, ya que ATP y GTP se interconvierten mediante la acción de la enzima nucleótido difosfato quinasa (NDK), reacción que posee un ΔG° igual a 0.

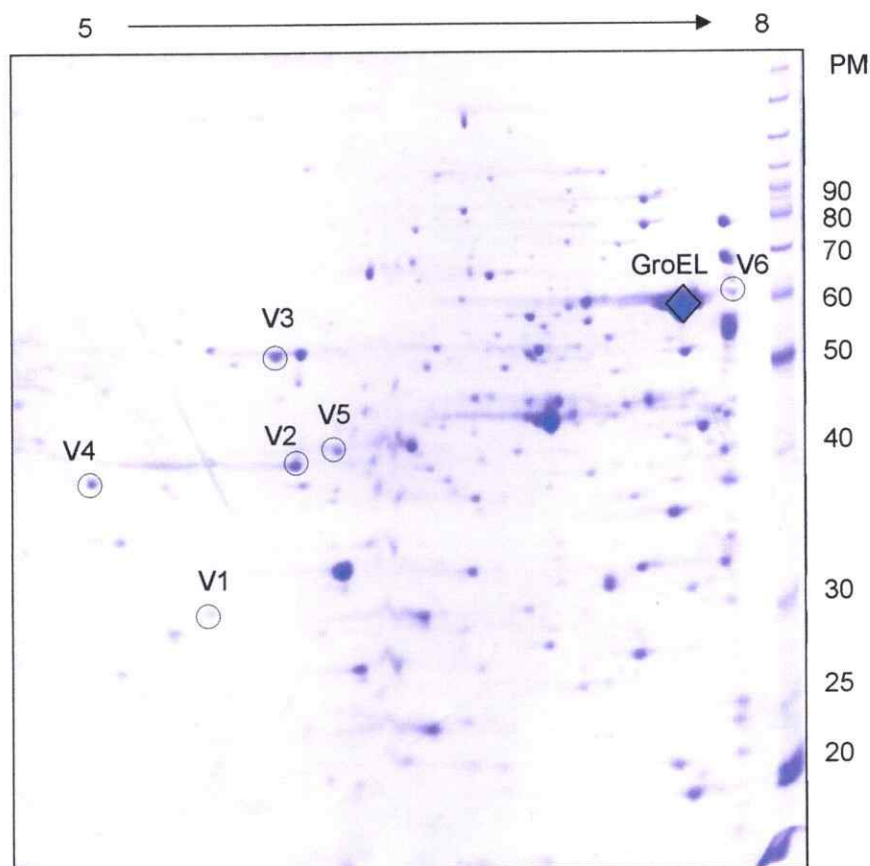


Muestra	Mejor puntaje de similitud	Puntuación (Mascot)	Microorganismo
R1	Succinil-CoA sintetasa, subunidad β	768	<i>P. putida</i> KT2440
R2	Succinil-CoA sintetasa, subunidad α	797	<i>P. aeruginosa</i> PAO1
R3	Alquil hidroperóxido reductasa, subunidad C	264	<i>P. aeruginosa</i> PAO1
R4	Succinil-CoA ligasa, subunidad α	181	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> B728a
R5	Acetil-CoA carboxilasa, (biotin carboxyl carrier protein)	159	<i>P. putida</i> KT2440
R6	ATP sintetasa, cadena α	178	<i>P. aeruginosa</i> PAO1

Figura 28. Cambios en el proteoma de *Pseudomonas* sp. B4 recombinante (pS7PPX1). Las proteínas totales de las células pS7PPX1 crecidas exponencialmente en medio rico LB se separaron mediante 2D-PAGE con un gradiente de pH 5-8. Las proteínas se tiñeron con azul de Coomassie y los cuadrados indican las proteínas que aumentan su nivel en las células carentes de poliP.

Una de las proteínas aumentadas en las células poliP⁻ es la acetil-CoA carboxilasa que cataliza la carboxilación del acetil-CoA a malonil-CoA. Este paso está considerado como el paso limitante en la biosíntesis de ácidos grasos de cadena larga. Otra proteína relacionada con la síntesis de los nucleótidos de la célula y particularmente de ATP, es la cadena α de la ATP sintetasa la que también aumenta en estas células. Finalmente una enzima relacionada con las actividades antioxidantes de la célula, como la alquil hidroperóxido reductasa también está incrementada. En *E. coli*, esta enzima está involucrada en la respuesta al estrés oxidativo y se encarga de la detoxificación no solo de los hidroperóxidos orgánicos sino que también su sitio activo es capaz de acomodar cualquier peróxido (ROOH), incluso el de hidrógeno (H₂O₂) (Server y Imlay, 2001).

Entre las proteínas que disminuyen su expresión en las células carentes de poliP (Figura 29) se encuentran dos enzimas involucradas con la biosíntesis de la arginina. La ornitina carbamiltransferasa cataliza la producción de citrulina a partir de carbamil-fosfato y ornitina con la consiguiente formación de fosfato (Bauer *et al.*, 1987). La otra enzima es la ornitina aminotransferasa que cataliza la conversión de la L-ornitina al L-aminoácido en el cuarto paso en la biosíntesis de la arginina. Completan la lista de las proteínas que disminuyen en las células poliP⁻, un componente del transportador ABC de aminoácidos, la flagelina y la dihidrolipoamida deshidrogenasa, una flavoproteína que actúa como componente de complejos de deshidrogenasas.



Muestra	Mejor puntaje de similitud	Puntuación (Mascot)	Microorganismo
V1	Ornitina transcarbamilasa	293	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1
V2	Dihidrolipoamida deshidrogenasa	155	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1
V3	Transportador ABC aminoácidos (proteína de unión de aminoácidos)	154	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440
V4	Ornitina/acetilornitina aminotransferasa	196	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato str. DC3000
V6	Flagelina	466	<i>Pseudomonas mendocina</i>

Figura 29. Cambios en el proteoma de *Pseudomonas* sp. B4 recombinante (pMLS7).

Las proteínas totales de las células pS7PPX1 crecidas exponencialmente en medio rico LB se separaron mediante 2D-PAGE con un gradiente de pH 5-8. Las proteínas se tiñeron con azul de Coomassie y los círculos indican las proteínas que disminuyen su nivel en las células carentes de poliP.

4. Discusión

4.1. Cambios en los niveles de los poliP en *Pseudomonas sp. B4*

Los mecanismos de resistencia y supervivencia bacterianos son importantes para la bioremediación y el biocontrol de las bacterias degradadoras de PCBs (Ohtsubo *et al.*, 2004). Durante estos procesos, las células deben coordinar los cambios en los índices de transcripción y traducción de los genes relacionados con estos procesos. El poliP podría proporcionar los fosfatos activados y coordinar una respuesta de adaptación al unir tanto metales como proteínas específicas y también se pueden localizar en la célula en una forma flexible, orientada, y relativamente estable en respuesta a una variedad amplia de necesidades metabólicas (Brown y Kornberg, 2004).

En esta Tesis encontramos que las células de *Pseudomonas sp. B4* acumulan una gran cantidad de gránulos densos al paso de los electrones cuando crecen en bifenilo y clorobifenilos en todas las etapas del crecimiento y en glucosa solamente cuando las células alcanzaron la fase estacionaria (Figuras 5 y 6). Este fenómeno se observó igualmente en la cepa modelo para la degradación de los PCB, *B. xenovorans* LB400 (resultados no mostrados). Dos tipos de evidencias espectroscópicas nos permiten afirmar que estos gránulos están compuestos fundamentalmente por acumulaciones de fosfato. Por una parte, el análisis elemental (EDAX) de los gránulos mostró que éstos están principalmente compuestos de fósforo y oxígeno (Figura 7), y mediante otro análisis espectroscópico más detallado (EELS, Figuras 8 y 9) pudimos concluir que

estos gránulos estaban compuestos de fosfato y podrían corresponder a gránulos de poliP. Esta observación se correlacionó adecuadamente con la determinación cuantitativa de poliP (Figura 10), la cual se basa en la conversión enzimática específica del poliP a ATP (Ault-Riché *et al.*, 1998). El análisis electroforético de los poliP extraídos desde las células de *Pseudomonas* reveló que éstos tenían un tamaño inferior al descrito para otras bacterias como *E. coli* y *A. ferrooxidans* (Ahn y Kornberg, 1990; Alvarez *et al.*, 2004). Sin duda, el análisis enzimático específico constituye, en definitiva, la prueba cabal de la existencia de poliP en *Pseudomonas sp. B4* los que se observan como gránulos densos a los electrones.

Teniendo en cuenta los altos niveles de poliP (~500 nmoles/mg proteína) encontrados en *Pseudomonas sp. B4* (Tabla 4) podemos clasificar este microorganismo como acumulador de poliP (PAO). Estos niveles son incluso más altos que los encontrados en *Acinetobacter johnsonii*, una bacteria que se caracteriza por presentar grandes cantidades de poliP, por lo que se le utiliza en plantas de tratamientos de agua en procesos de remoción de Pi (EBPR), donde puede llegar a acumular hasta el 30 % de su masa como poliP (Kulaev y Kulakovskaya, 2000). Teniendo en cuenta los altos niveles de poliP acumulados por *Pseudomonas sp. B4* y que los PCBs y los metales pesados comparten ambientes contaminados (Shin *et al.*, 2004; Gillan *et al.*, 2005), puede ser interesante estudiar si este microorganismo se podría utilizar no solamente en la bioremediación de PCBs sino también en la remoción de fósforo y metales pesados en estos sitios.

Tabla 4. Comparación de los niveles de poliP encontrados en diferentes microorganismos.

Especie	poliP (nmoles de Pi / mg de proteína)	Referencia
<i>Pseudomonas sp. B4</i>	400-500	Chávez <i>et al.</i> , 2004
<i>Shigella flexneri</i>	21	Kim <i>et al.</i> , 2002
<i>Salmonella enterica serovar typhimurium y Dublin</i>	15-25	Kim <i>et al.</i> , 2002
<i>E. coli</i>	50	Rao <i>et al.</i> , 1998
<i>Aerobacter aerogene</i>	250	Harold, 1966
<i>Vibrio cholera</i>	400	Ogawa <i>et al.</i> , 2000
<i>H. pylori</i>	12	Shirai <i>et al.</i> , 2000
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	300	Ault-Riché <i>et al.</i> , 1998
<i>P. aeruginosa PAO1</i>	300-400	Kim <i>et al.</i> , 1998
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	300-400	Alvarez <i>et al.</i> , 2004
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	20	Cardona <i>et al.</i> , 2002
<i>Sulfolobus metallicus</i>	200	Remonsellez <i>et al.</i> , 2006

La acumulación de poliP responde a diversos factores externos como a los nutrientes del medio y a las condiciones físicas y químicas de los mismos (Harold, 1966; Rao y Kornberg, 1999; Nesmeyanova, 2000). Este parece ser el caso cuando *Pseudomonas sp. B4* crece en medio definido suplementado con bifenilo y/o clorobifenilos como únicas fuentes de carbono, pues a diferencia de lo observado cuando las células crecieron en glucosa, en todas las fases del crecimiento se observó y cuantificó un aumento de los niveles de poliP. En las células que crecieron en medio rico (LB) nunca se observó la acumulación de estos gránulos, posiblemente debido a

que la acumulación de poliP en bacterias es un fenómeno natural y un proceso altamente regulado que depende de la disponibilidad de fosfato y de las fuentes de energía así como de la presencia de los contraiones (Kuroda y Ohtake, 2000; Nesmeyanova, 2000). La baja concentración de fosfato inorgánico en el medio LB (~1 mM vs 70 mM en medio M9) y la alta disponibilidad de fuentes de carbono pueden explicar este fenómeno. Otra consideración a tener en cuenta es que la acumulación de poliP está influenciada por el balance celular de ADP/ATP (Harold, 1966). Durante la fase exponencial en medios de crecimiento favorables (glucosa) hay una menor disponibilidad de ATP para la síntesis de poliP, de forma tal que quizás el crecimiento en un entorno más adverso (bifenilo) “simularía” las condiciones de la fase estacionaria de crecimiento donde los requerimientos de ATP para la replicación del DNA disminuyen y en principio podría haber una mayor disponibilidad de ATP para la síntesis de un polímero de reserva como el poliP.

Aunque no sabemos exactamente la causa de la acumulación de poliP en *Pseudomonas sp.* B4 cuando crece en bifenilo y clorobifenilos puede ser que ocurra lo mismo que cuando las células entran a la fase estacionaria del crecimiento donde deben enfrentar todo tipo de estrés y carencias para sobrevivir (Kuroda *et al.*, 2001, 2006). En estas condiciones aumentan los niveles del nucleótido guanosina tetrafosfato (ppGpp) que inhibe la actividad PPX (Kuroda *et al.*, 1997), lo que proporciona un mecanismo para la acumulación de poliP independiente de la actividad PPK1 (Rao *et al.*, 1998).

Para las células de *Pseudomonas sp.* B4 el poder detectar éstas señales tempranamente le permitiría acumular poliP como un sistema de alarma y así activar o aumentar los sistemas de protección. Es probable entonces que la acumulación de poliP observada en *Pseudomonas sp.* B4 contribuya no solo como fuente de energía sino también para coordinar la supervivencia a las condiciones de crecimiento en estos compuestos organoclorados.

4.2. PCBs, poliP y estrés

El aumento en los niveles de la proteína de estrés GroEL observado cuando *Pseudomonas sp.* B4 creció en la presencia de bifenilo y clorobifenilos como únicas fuentes de carbono, son similares al comportamiento observado en *Pseudomonas sp.* DJ-12 ante bifenilo y 4-clorobifenilo (Park *et al.*, 2001) y *Burkholderia sp.* YK-2 ante el herbicida 2,4-diclorofenoxiacetato (2,4-D) (Cho *et al.*, 2000). Esto indica que estos compuestos organoclorados no solo son fuentes de carbono y energía, sino que actúan también como generadores de estrés celular. Posiblemente, en algunas bacterias los PCBs ejercen sus efectos tóxicos acumulándose en la membrana citoplasmática e interrumpiendo su función. En este caso la capacidad degradativa es importante no solamente para la adquisición de energía, sino también para la desintoxicación del PCB (Delawary *et al.* 2003).

En los microorganismos vivos, el estrés oxidativo es causado tanto por la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS), como por el agotamiento de los antioxidantes. El estrés oxidativo se ha involucrado como posible mecanismo causal

de la toxicidad de estos compuestos organoclorados (Lee, 1999). Mediante la oxidación del 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA) es posible medir los niveles de ROS en células intactas. Empleando este método se comprobó la generación de estrés oxidativo cuando las células son expuestas a bifenilo y clorobifenilos en el medio de cultivo (Figuras 13 y 14). Estos resultados coinciden con los observados en la bacteria *Ochrobactrum anthropi* frente a concentraciones tóxicas de sustratos como fenol y 4-clorofenol, donde mediante electroforesis capilar y la sonda dihidrorodamina-123 no solo demostraron el aumento de ROS en las bacterias sino también el aumento de las enzimas destoxicantes glutatión S-transferasa (GST) y sulfóxido reductasa (MsrA) (Tamburro *et al.*, 2004).

Estos resultados sugieren que las células de *Pseudomonas sp.* B4 expuestas a estos compuestos estarían en situación de estrés oxidativo. Dado que esta situación puede ser controlada por la acción de enzimas antioxidantes, serán necesarios otros estudios para entender la respuesta celular antioxidante, que limita el daño, y su relación con los políP en *Pseudomonas sp.* B4.

Aunque la fuente exacta del estrés oxidativo debe ser investigada más a fondo, una posible explicación a este fenómeno podría radicar en que la degradación de los sustratos aromáticos por mono y dioxigenasas produce ROS que conducen a la generación de estrés oxidativo (Tamburro *et al.*, 2004). Estas enzimas, que participan en la degradación aeróbica bacteriana de los compuestos aromáticos, tienen unidos grupos sulfoférricos [2Fe-2S] del tipo Rieske como centros redox para la transferencia de los

electrones, que catalizan la adición enantio-específica del oxígeno (O₂) al bifenilo para formar los cis-dihidrodiolos respectivos (Gibson y Subramanian, 1984; Furukawa *et al.*, 2004). Curiosamente y como producto de la reacción de desacoplamiento por la presencia del benceno, un 40-50 % del O₂ consumido por la dioxigenasa es reducido a peróxido de hidrógeno. Mediante la reacción de Fenton, este peróxido puede descomponerse espontáneamente formando los radicales oxidantes hidroxilo (Lee, 1999).

La generación de estrés oxidativo en *Pseudomonas sp.* B4 durante el crecimiento en bifenilo y clorobifenilos coincide con los experimentos de genómica funcional y proteómica realizados recientemente en *B. xenovorans* LB400, donde se comparó los cambios globales durante el crecimiento en benzoato y bifenilo como únicas fuentes de carbono y energía (Denef *et al.*, 2005; 2006). Como resultados de estos estudios, muchas de las proteínas no-catabólicas encontradas más abundantes durante el crecimiento en bifenilo y/o benzoato con respecto a succinato, aparecen relacionadas a la respuesta a estrés.

Es posible que unido a la respuesta frente a carencias nutricionales, los gránulos de poliP en *Pseudomonas sp.* B4 sean también una respuesta adaptativa al estrés oxidativo, generado durante la degradación de los clorobifenilos. Esto se puede inferir porque en mutantes de *E. coli* en el gen *ppk1*, carentes de poliP, son más sensibles al estrés oxidativo sobre todo cuando las células entran en la fase estacionaria del crecimiento (Crooke *et al.*, 2002). Estos mutantes también son hipersensibles a la menadiona, un

agente redox que genera oxidantes citotóxicos (Wu y Wiess, 1991). Esta hipersensibilidad se debe a la falta de inducción de la actividad catalasa durante la fase estacionaria (Greenberg y Demple 1988; Ivanova *et al.*, 1994). Finalmente, la pérdida de virulencia ocular de mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* PAOM5 en el gen *ppk1* se ha relacionado con la desregulación de múltiples procesos, incluyendo aquellos responsables de la respuesta a estrés (Parks y Hobden, 2005). Todos estos ejemplos remarcan la importancia de los poliP en la regulación de la expresión de los genes relacionados con la respuesta adaptativa a las condiciones de carencia y estrés.

4.3. Obtención y caracterización de las bacterias incapaces de acumular los poliP

Para estudiar más detalladamente la función de los poliP en *Pseudomonas sp.* B4 decidimos obtener bacterias con fenotipo incapaces de acumular este biopolímero y caracterizar los cambios fisiológicos y moleculares que tienen lugar en estas bacterias.

Las células de *E. coli* que sobreexpresan la exopolifosfatasa (*PPX1*) de levadura (Wurst *et al.*, 1995) poseen un fenotipo similar al de los mutantes por delección en el gen *PPK1* (que sintetiza los poliP) en cuanto a la resistencia a diversos tipos de estrés (Shiba *et al.*, 2000). En esta Tesis y mediante vectores de amplio espectro (Lefebre y Valvano, 2002) demostramos que la sobreexpresión de la *PPX1* de levadura en *Pseudomonas sp.* B4 es capaz de remover más del 95 % de los poliP celulares en todas las condiciones de cultivo (Figuras 20 y 25). Además, el contar con un vector constitutivo y otro regulado,

nos permitió una mayor flexibilidad para planificar y diseñar los experimentos realizados.

Una de las modificaciones fisiológicas encontradas en las células de *Pseudomonas sp.* B4 poliP– fue la ausencia de movilidad, a pesar de que posee los flagelos intactos. Esta falta de movilidad tuvo como consecuencia que se afectó procesos celulares importantes en la bioremediación de los PCBs como la quimiotaxis y la formación de biopelículas (Figuras 21 y 22). Este fenotipo también ha sido encontrado en mutantes por delección del gen *PPK1* en *P. aeruginosa* (Rashid *et al.* 2000b; Rashid y Kornberg, 2000) y en otras bacterias, sobre todo patógenas (Rashid *et al.* 2000a; Kim *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 2004; Tan *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005b).

¿Cómo podrían los poliP afectar la movilidad y la quimiotaxis? La explicación puede radicar en el sistema de transducción de señales, ya que los poliP podrían sustituir al ATP en la fosforilación de CheY (o alguna proteína relacionada) afectando así las operaciones flagelares a un nivel funcional (Eisenbach, 1996). También el poliP podría interferir con los niveles celulares de Ca^{2+} y afectar la actividad de las proteínas relacionadas con CheY o puede actuar directamente en el motor flagelar (Margolin *et al.*, 1994). Curiosamente, se han encontrado gránulos de poliP en la base de los flagelos de *H. pylori*, bacteria que causa gastritis crónica y úlceras pépticas en los seres humanos (Bode *et al.*, 1993). El depósito de poliP cercano al flagelo podría estar relacionado con la generación de la energía protón-motriz para la movilidad bacteriana.

El modelo para describir los procesos de formación de biopelículas indica que las células en estado planctónico reciben señales ambientales que favorecen la adhesión inicial al substrato. Después de ello, las bacterias comienzan a comunicarse entre ellas en un proceso denominado “quorum sensing” y estas señales guían a la formación de microcolonias que formaran el biofilm maduro, una estructura tridimensional con forma de hongo embebida en una matriz de EPS. Finalmente, nuevas señales indican a la bacteria que se disgregue del biofilm para regresar al estadio planctónico, completando así el ciclo (O’Toole *et al.*, 2000).

¿Cómo podrían los poliP afectar la capacidad de formar biopelículas? Los exopolisacáridos (EPS) son componentes extracelulares bacterianos esenciales en los pasos iniciales de la adherencia a superficies y en la formación de las biopelículas en muchas bacterias y particularmente en *P. aeruginosa* (Matsukawa y Greenberg, 2004). Los cambios observados por ME son indicativos de la presencia de un material extracelular que podría corresponder a EPS (Figura 26). Esto podría afectar la capacidad de las células de formar biopelículas sobre superficies inertes y también ser los responsables de los cambios observados en la morfología de las colonias (Figura 23). La síntesis de alginato, uno de los componentes fundamentales de los EPS en bacterias y que requiere tanto azúcares fosforilados como GTP, está regulada por los poliP en *Pseudomonas aeruginosa* (Kim *et al.*, 1998). Aunque no se conoce exactamente como ocurre esta regulación, teniendo en cuenta que los poliP pueden ser sustitutos del ATP (Kornberg,

1995), es posible que participen en la síntesis de alginato y en la formación del EPS que contribuye a la protección bacteriana ante condiciones adversas.

Es quizás una combinación de estas incapacidades fisiológicas lo que hace que el crecimiento en bifenilo se vea afectado en las células de *Pseudomonas sp.* B4 poliP– (Figura 24). La prolongada fase de adaptación unida a retardo del crecimiento celular puede indicar que en ausencia de poliP (Figura 25) y con una ineficiente utilización de la fuente de carbono insoluble, la respuesta celular podría causar un retardo del crecimiento. Esto respaldaría la importancia de los poliP, y posiblemente las acumulaciones de este biopolímero observadas en *Pseudomonas sp.* B4 cuando crece en bifenilo y clorobifenilos como únicas fuentes de carbono y energía, contribuyan a programar a las células para coordinar la respuesta frente a las condiciones no favorables de crecimiento en estos compuestos organoclorados. Entender mejor la función de los poliP en *Pseudomonas sp.* B4 puede ser importante para mejorar la interacción del microorganismo con sus sustratos tóxicos y por lo tanto perfeccionar la eficiencia de los procesos de bioremediación.

Otra modificación morfológica no descrita en la literatura observada en las células de *Pseudomonas sp.* B4 poliP– en la fase estacionaria del crecimiento en medio rico LB, fue su alargamiento, probablemente por una inhibición de la septación celular (Figura 27). La formación del anillo de septación durante la división celular en muchos procariontes y organelos eucariontes depende de la proteína FtsZ (Margolin, 2006). La FtsZ es una GTPasa bacteriana homóloga a la tubulina eucariota, cuyo ensamblaje y desensamblaje,

dependiente de GTP, se piensa son esenciales para la formación, junto con otras proteínas, del dinámico anillo de septación (divisoma) durante la división celular (Romberg y Levin, 2003).

¿Cómo podrían los poliP afectar la división celular? Por una parte es posible que los poliP puedan tener un efecto en la proteína bacteriana FtsZ, ya que su actividad GTPasa es dependiente de iones bivalentes y de GTP. Teniendo en cuenta las características de los poliP que tanto suministran fosfatos para la generación de GTP (Ishige *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2002; Shiba *et al.*, 2005) y son quelantes de metales bivalentes (Kornberg, 1995), la ausencia de este biopolímero pudiera bloquear indirectamente la polimerización del anillo Z, lo que explicaría el fenotipo observado. La enzima encargada de utilizar el poliP en la generación de GTP en *P. aeruginosa* (PPK2), se induce 100-veces en la fase estacionaria, en esta etapa el GTP es necesario para la síntesis de alginato, el EPS que envuelve y da forma a la bacteria, y posiblemente para otras funciones como la división celular. Tampoco podemos descartar que otras proteínas relacionadas con el divisoma y también dependientes de GTP e iones divalentes para su actividad se vean afectados por la ausencia de poliP.

Dictyostelium discoideum, una ameba unicelular que se alimenta de bacterias que viven habitualmente en el suelo y se multiplica por división binaria, es el único eucarionte que presenta un ortólogo de la PPK1 bacteriana (DdPPK1, Zhang *et al.*, 2005a). Curiosamente, la DdPPK2 otro parálogo en su genoma, es capaz de formar filamentos de actina con la concomitante síntesis enzimática del poliP en una reacción

completamente reversible (Gómez-García y Kornberg, 2004). Así, este complejo particular puede polimerizar filamentos de actina sin la actividad “derrochadora” de ATP (ATPasa) atribuída a las actinas y conservando la energía como poliP.

4.4. Cambios en el proteoma de *Pseudomonas sp.* B4 (poliP–)

Los poliP tienen numerosas y variadas funciones biológicas dependiendo de su localización y disponibilidad (Brown y Kornberg, 2004; Kornberg *et al.*, 1999). Debido a las variaciones fisiológicas y morfológicas observadas en las células de *Pseudomonas sp.* B4 incapaces de acumular poliP (Chávez *et al.*, 2006), decidimos estudiar la respuesta global del proteoma de esta bacteria comparada con el de las células control. Aunque el análisis se puede considerar preliminar, pues solo analizamos una condición de crecimiento y secuenciamos sólo aquellas proteínas cuya expresión cambió en mayor magnitud comparativamente, se pueden discutir algunas consideraciones interesantes.

Las funciones energéticas de los poliP se pueden corelacionar con los incrementos encontrados en las células poliP– de varias de las enzimas del ciclo de Krebs y vías relacionadas (Figura 28). Teniendo en cuenta que la ausencia de poliP en estas condiciones puede disminuir los niveles de ATP en la célula, un aumento del funcionamiento del ciclo de Krebs y de la síntesis acoplada de los nucleótidos trifosfatos, pueden restaurar los niveles de ATP.

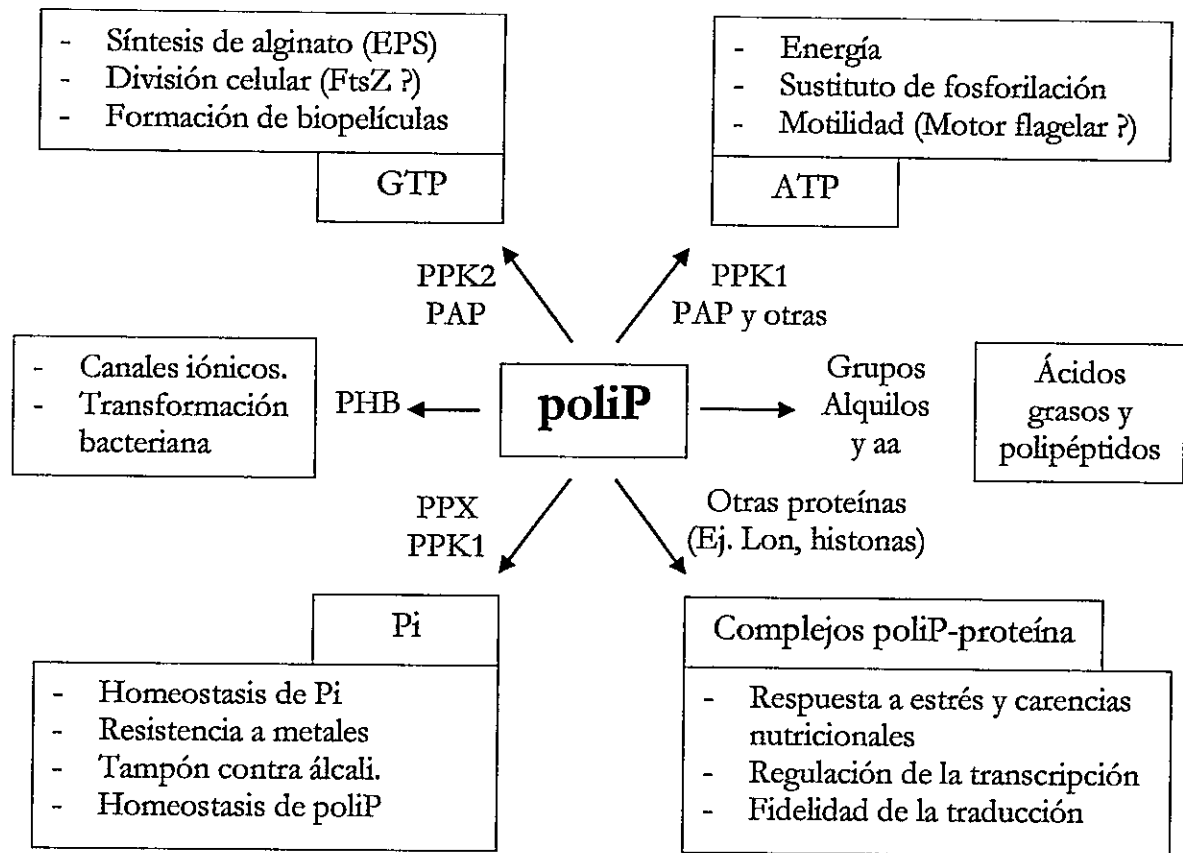


Figura 30. Los poliP: una molécula para muchas funciones. Múltiples funciones asociadas a los poliP junto con algunas enzimas relacionadas con su metabolismo y función en la célula (PPK1: polifosfato quinasa 1; PPK2: polifosfato quinasa 2; PPX: exopolifosfatasa, PAP: polifosfato AMP fosfotransferasa; Lon: Proteasa Lon; PHB: poli-β-hidroxic butirato).

Además, la producción de poliP y de alginato está coregulada en *P. aeruginosa* (Kim *et al.*, 1998) y las enzimas del metabolismo de los poliP se han relacionado con enzimas del ciclo de Krebs particularmente en la generación de precursores de la síntesis de alginato (Schlictman *et al.*, 1994; Kavanaugh-Black *et al.*, 1994). Incluso se ha postulado que los poliP pueden utilizarse directamente para la conversión del acetato en su

tioéster activado (acetil-CoA) (Kim *et al.*, 1998). Sería interesante continuar investigando la relación de los poliP con estos procesos celulares pues son muy importantes en la formación de los exopolisacáridos claves para los procesos de virulencia e infectividad de las bacterias patógenas (Kornberg *et al.*, 1999).

La enzima acetil-CoA carboxilasa, cuyos niveles están aumentados en las células poliP⁻, está considerada como el paso limitante en la biosíntesis de los ácidos grasos de cadena larga. Esto se puede deber a que los poliP son capaces de proveer fosfatos tanto a grupos alquilo activados como a los aminoácidos para formar ácidos grasos y proteínas, respectivamente (Figura 30, Brown y Kornberg, 2004).

Respecto a la relación de los poliP y el estrés oxidativo (Figura 30), la alquil hidropéroxido reductasa, enzima encargada de la destoxificación celular de cualquier peróxido (ROOH) (Server y Imlay, 2001), se encontró incrementada en las células incapaces de acumular poliP. Teniendo en cuenta que los poliP regulan la expresión de las enzimas fundamentales que participan en la destoxificación de ROS (catalasa y superóxido dismutasa), la alquil hidropéroxido reductasa puede ser una vía de destoxificación alternativa, no regulada por los poliP, que se activa en carencia de las actividades destoxificantes en las células poliP⁻. Curiosamente, en *E. coli* se descubrió que mutantes desprovistos de la actividad catalasa son capaces de eliminar concentraciones fisiológicas de H₂O₂ tan rápidamente como las células del tipo salvaje gracias precisamente a un incremento de la actividad alquil hidropéroxido reductasa (Zhang, 1996; Seaver y Imlay, 2001).

Al inspeccionar las proteínas que disminuyen su expresión en las células de *Pseudomonas sp* B4 carentes de poliP (Figura 29 y Tabla 5), es evidente que la ausencia de este biopolímero influye en el metabolismo de los aminoácidos y particularmente en el de la arginina. Los niveles de dos enzimas involucradas con la biosíntesis de arginina, la ornitina carbamiltransferasa y la ornitina aminotransferasa, están disminuídos. Finalmente un transportador de aminoácidos (tipo ABC) también disminuye en las células poliP-.

Como discutimos anteriormente, a pesar que las bacterias poliP- no son móviles, presentan estructuras flagelares. Sin embargo encontramos que los niveles de flagelina, componente principal del flagelo, está disminuído en las células carentes de poliP. Sería necesario un estudio más detallado de la posible función de los poliP en la polimerización y localización del flagelo para dilucidar esta aparente contradicción.

La síntesis y degradación de los poliP significa un problema intrigante al momento de considerar tanto la acumulación de los poliP como las funciones que éste es capaz de regular. De acuerdo a los diversos cambios fenotípicos vistos en los mutantes del gen *PPK1* de *E. coli*, mediante microarreglos de DNA se observaron grandes cambios globales en los niveles del mRNA (aumentan 240 genes y disminuyen 460). Por el contrario, en un mutante *PPK2* de *P. aeruginosa* solamente 20 genes cambian su expresión (Brown y Kornberg, 2004).

Aunque este análisis proteómico preliminar nos da algunas pistas, sin duda debe ser completado con estudios del proteoma en otros medios de cultivo y fuentes carbonadas

y también en condiciones de carencia y estrés para la célula. De esta forma podremos completar mejor el cuadro y dilucidar las conexiones que le permiten a los poliP realizar sus variadas funciones (Figura 30). También estos trabajos podrían ser complementados con estudios de genómica funcional mediante el uso de microarreglos de DNA, ya sea trabajando en la única bacteria degradadora de PCBs con genoma conocido (*B. xenovorans* LB400) o utilizando la *Pseudomonas* sp. B4 con microarreglos de otras bacterias relacionadas de genoma conocido (*P. putida* KT2440, Stjepandic *et al.*, 2002).

5. Referencias bibliográficas

- Abraham WR, Nogales B, Golyshin PN, Pieper DH, Timmis KN. 2002. Polychlorinated biphenyl-degrading microbial communities in soils and sediments. *Curr. Opin. Microbiol.* 5:246-253.
- Abramowicz DA. 1990. Aerobic and anaerobic biodegradation of PCBs: a review. *Crit. Rev. Biotechnol.* 10:241-251.
- Adler J. 1973. A method for measuring chemotaxis and use of the method to determine optimum conditions for chemotaxis by *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 74:77-91.
- Ahn K, Kornberg A. 1990. Polyphosphate kinase from *Escherichia coli*. Purification and demonstration of a phosphoenzyme intermediate. *J. Biol. Chem.* 265: 11734-11739.
- Akiyama M, Crooke E, Kornberg A. 1992. The polyphosphate kinase gene of *Escherichia coli*. Isolation and sequence of the *ppk* gene and membrane location of the protein. *J. Biol. Chem.* 267: 22556-22561.
- Akiyama M, Crooke E, Kornberg A. 1993. An exopolyphosphatase of *Escherichia coli*. The enzyme and its *ppx* gene in a polyphosphate operon. *J. Biol. Chem.* 268:633-639.
- Alvarez S, Jerez CA. 2004. Copper ions stimulate polyphosphate degradation and phosphate efflux in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:5177-5182.
- Ault-Riché D, Fraley CD, Tzeng CM, Kornberg A. 1998. A Novel assay reveals multiple pathways regulating stress-induced accumulations of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 180: 1841-1847.
- Barra R, Cisternas M, Suarez C, Araneda A, Pinones O, Popp P. 2004. PCBs and HCHs in a salt-marsh sediment record from South-Central Chile: use of tsunami signatures and ¹³⁷Cs fallout as temporal markers. *Chemosphere* 55:965-972.
- Bartels F, Backhaus S, Moore ER, Timmis KN, Hofer B. 1999. Occurrence and expression of glutathione-S-transferase-encoding *bphK* genes in *Burkholderia sp.* strain LB400 and other biphenyl-utilizing bacteria. *Microbiology* 145: 2821-2834.
- Baur H, Stalon V, Falmagne P, Luethi E, Haas D. 1987. Primary and quaternary structure of the catabolic ornithine carbamoyltransferase from *Pseudomonas aeruginosa*. Extensive sequence

- homology with the anabolic ornithine carbamoyltransferases of *Escherichia coli*. Eur. J. Biochem. 166: 111-117.
- Bedard DL, Haberl ML. 1990. Influence of chlorine substitution pattern on the degradation of polychlorinated biphenyls by eight bacterial strains. Microb. Ecol. 20:87-102.
- Bedard DL, Quensen JF III. 1995. Microbial reductive dechlorination of polychlorinated biphenyls. In: Young Y & Cerniglia CE (Eds), Wiley-Liss, Inc., NY. Microbial Transformation and Degradation of Toxic Organic Chemicals. pp.127-216.
- Bedard DL, Unterman R, Bopp LH, Brennan MJ, Haberl ML, Johnson C. 1986. Rapid assay for screening and characterizing microorganisms for the ability to degrade polychlorinated biphenyls. Appl. Environ. Microbiol. 51:761-768.
- Billingsley KA, Backus SM, Ward OP. 1999. Effect of surfactant solubilization on biodegradation of polychlorinated biphenyl congeners by *Pseudomonas sp.* LB400. Appl. Microbiol. Biotechnol. 52:255-260.
- Bode G, Mauch F, Ditschuneit H, Malfertheiner P. 1993. Identification of structures containing polyphosphate in *Helicobacter pylori*. J. Gen. Microbiol. 139:3029-3033.
- Bonting CFC, Rigoulet M, Guerin B, Canioni P. 1993. The elemental composition dynamics of large polyphosphate granules in *Acetobacter* strain 210A. Arch. Microbiol. 159:428-434.
- Bopp LH. 1986. Degradation of highly chlorinated PCBs by *Pseudomonas strain* LB400. J. Ind. Microbiol. 1: 23-29.
- Boyle AW, Blake CK, Price WA, May HD. 1993. Effects of polychlorinated biphenyl congener. Concentration and sediment supplementation on rates of methanogenesis and 2,3,6-trichlorobiphenyl dechlorination in an anaerobic enrichment. Appl. Environ. Microbiol. 59:3027-3031.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.
- Branda SS, Vik S, Friedman L, Kolter R. 2005. Biofilms: the matrix revisited. Trends Microbiol. 13:20-26.

- Brenner V, Arensdorf JJ, Focht DD. 1994. Genetic construction of PCB degraders. *Biodegradation* 5:359-377.
- Brown MR, Kornberg A. 2004. Inorganic polyphosphate in the origin and survival of species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:16085-16087.
- Cámara B, Herrera C, González M, Couve E, Hofer B, Seeger M. 2004. From PCBs to highly toxic metabolites by the biphenyl pathway. *Environ. Microbiol.* 6:842-850.
- Cardona ST, Chávez FP, Jerez CA. 2002. The exopolyphosphatase gene from *Sulfolobus solfataricus*: characterization of the first gene found to be involved in polyphosphate metabolism in Archaea. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 4812-4819.
- Castuma CE, Huang R, Kornberg A, Reusch RN. 1995. Inorganic polyphosphates in the acquisition of competence in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 270:12980-12983.
- Chávez FP, Lünsdorf H, Jerez CA. 2004. Growth of polychlorinated-biphenyl-degrading bacteria in the presence of biphenyl and chlorobiphenyls generates oxidative stress and massive accumulation of inorganic polyphosphate. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:3064-3072 (Anexo 1).
- Chávez FP, Gordillo F, Jerez CA. 2006. Adaptive responses and cellular behaviour of biphenyl-degrading bacteria toward polychlorinated biphenyls. *Biotechnol. Adv.* 24:309-20 (Anexo 2).
- Cho YS, Park SH, Kim CK, Oh KH. 2000. Induction of stress shock proteins DnaK and GroEL by phenoxyherbicide 2,4-D in *Burkholderia sp.* YK-2 isolated from rice field. *Curr. Microbiol.* 41:33-38.
- Colores GM, Macur RE, Ward DM, Inskeep WP. 2000. Molecular analysis of surfactant-driven microbial population shifts in hydrocarbon-contaminated soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2959-2964.
- Coteur G, Danis B, Fowler SW, Teyssie JL, Dubois P, Warnau M. 2001. Effects of PCBs on reactive oxygen species (ROS) production by the immune cells of *Paracentrotus lividus* (*Echinodermata*). *Mar. Pollut. Bull.* 42:667-672.
- Crooke E, Akiyama M, Rao NN, Kornberg A. 1994. Genetically altered levels of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 269:6290-6295.

- Crow JP. 1997. Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite *in vitro*: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. *Nitric Oxide: Biol.Chem.* 1:145-157.
- Delawary M, Ohtsubo Y, Ohta A. 2003. The dual functions of biphenyl-degrading ability of *Pseudomonas sp.* KKS102: energy acquisition and substrate detoxification. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67:1970-1975.
- Denef VJ, Klappenbach JA, Patrauchan MA, Florizone C, Rodrigues JL, Tsoi TV, Verstraete W, Eltis LD, Tiedje JM. 2006. Genetic and genomic insights into the role of benzoate-catabolic pathway redundancy in *Burkholderia xenovorans* LB400. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:585-595.
- Denef VJ, Park J, Tsoi TV, Rouillard JM, Zhang H, Wibbenmeyer JA, Verstraete W, Gulari E, Hashsham SA, Tiedje JM. 2004. Biphenyl and benzoate metabolism in a genomic context: outlining genome-wide metabolic networks in *Burkholderia xenovorans* LB400. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:4961-4970.
- Denef VJ, Patrauchan MA, Florizone C, Park J, Tsoi TV, Verstraete W, Tiedje JM, Eltis LD. 2005. Growth substrate- and phase-specific expression of biphenyl, benzoate, and C1 metabolic pathways in *Burkholderia xenovorans* LB400. *J. Bacteriol.* 187:7996-8005.
- Drenzek NJ, Eglinton TI, Wirsén CO, Sturchio NC, Heraty LJ, Sowers KR, Wu Q, May HD, Reddy CM. 2004. Invariant chlorine isotopic signatures during microbial PCB reductive dechlorination. *Environ. Pollut.* 128:445-448.
- Dukan S, Touati D. 1996. Hypochlorous acid stress in *Escherichia coli*: resistance, DNA damage, and comparison with hydrogen peroxide stress. *J. Bacteriol.* 178:6145-6150.
- Eisenbach M. 1996. Control of bacterial chemotaxis. *Mol. Microbiol.* 20:903-910.
- Erickson BD, Mondello FJ. 1992. Nucleotide sequencing and transcriptional mapping of the genes encoding biphenyl dioxygenase, a multicomponent polychlorinated-biphenyl-degrading enzyme in *Pseudomonas* strain LB400. *J. Bacteriol.* 174:2903-2912.
- Fava F, Di Gioia D, Marchetti L, Quattroni G. 1996. Aerobic dechlorination of low-chlorinated biphenyls by bacterial biofilms in packed-bed batch bioreactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45:562-568.

- Fava F, Di Gioia D, Marchetti L. 2000. Role of the reactor configuration in the biological detoxification of a dump site-polychlorobiphenyl-contaminated soil in lab-scale slurry phase conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53:243-248.
- Ferrer D, Fonseca CJ, Cutiño I, García RE, Arce DL. 1999. Radicales libres y su papel en la homeostasia neuronal. *Medisan* 3: 5-11.
- Ferrer M, Golyshin P, Timmis KN. 2003. Novel maltotriose esters enhance biodegradation of Aroclor 1242 by *Burkholderia cepacia* LB400. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 19:637-643
- Furukawa K, Hayase N, Taira K. 1990. Biphenyl/polychlorinated biphenyl catabolic gene (bph operon): organization, function, and molecular relationship in various pseudomonads. In S. Silver, A. M. Chakrabarty, B. Iglewski, and S. Kaplan (ed.), *Pseudomonas: biotransformations, pathogenesis, and evolving biotechnology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C., pp.111-120.
- Furukawa K, Suenaga H, Goto M. 2004. Biphenyl dioxygenases: functional versatilities and directed evolution. *J. Bacteriol.* 186:5189-5196.
- Furukawa K. 1994. Molecular genetics and evolutionary relationship of PCB-degrading bacteria. *Biodegradation* 5:289-300.
- Gibson DT, Cruden DL, Haddock JD, Zylstra GJ, Brand JM. 1993. Oxidation of polychlorinated biphenyls by *Pseudomonas sp.* strain LB400 and *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707. *J. Bacteriol.* 175:4561-4564.
- Gibson DT, Subramanian V. 1984. Microbial degradation of aromatic hydrocarbons. In D. T. Gibson (ed.). *Microbial degradation of organic compounds*. Marcel Dekker Inc., New York, NY, pp.181-251.
- Gillan DC, Danis B, Pernet P, Joly G, Dubois P. 2005. Structure of sediment-associated microbial communities along a heavy-metal contamination gradient in the marine environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:679-690.
- Golyshin PN, Fredrickson HL, Giuliano L, Rothmel R, Timmis KN, Yakimov MM. 1999. Effect of novel biosurfactants on biodegradation of polychlorinated biphenyls by pure and mixed bacterial cultures. *Microbiologica* 22:257-267.

- Gómez-García MR, Kornberg A. 2004. Formation of an actin-like filament concurrent with the enzymatic synthesis of inorganic polyphosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:15876-15880.
- Gómez-Suárez C, Pasma J, van der Borden AJ, Wingender J, Flemming HC, Busscher HJ, van der Mei HC. 2002. Influence of extracellular polymeric substances on deposition and redeposition of *Pseudomonas aeruginosa* to surfaces. *Microbiology* 148:1161-1169.
- González H, Jensen TE. 1998. Nickel sequestering by polyphosphate bodies in *Staphylococcus aureus*. *Microbios* 93:179-185.
- Goris J, De Vos P, Caballero-Mellado J, Park J, Falsen E, Quensen JF 3rd, Tiedje JM, Vandamme P. 2004. Classification of the biphenyl- and polychlorinated biphenyl-degrading strain LB400T and relatives as *Burkholderia xenovorans* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:1677-1681.
- Greenberg JT, Demple B. 1988. Overproduction of peroxide-scavenging enzymes in *Escherichia coli* suppresses spontaneous mutagenesis and sensitivity to redox-cycling agents in *oxyR2* mutants. *EMBO J.* 7:2611-2617.
- Hall-Stoodley L, Stoodley P. 2002. Developmental regulation of microbial biofilms. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13:228-233.
- Harold FM. 1966. Inorganic polyphosphates in biology: structure, metabolism, and function. *Bacteriol. Rev.* 30:772-794.
- Harshey RM. 2003. Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annu. Rev. Microbiol.* 57:249-273.
- Harwood CS, Ornston LN. 1984. TOL plasmid can prevent induction of chemotactic responses to aromatic acids. *J. Bacteriol.* 160:797-800.
- Harwood CS, Parales RE, Dispensa M. 1990. Chemotaxis of *Pseudomonas putida* toward chlorinated benzoates. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1501-1503.
- Harwood CS. 1989. A methyl-accepting protein is involved in benzoate taxis in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 171:4603-4608.
- He YY, Klisch M, Häder DP. 2002. Adaptation of cyanobacteria to UV-B stress correlated with oxidative stress and oxidative damage. *Photochem. Photobiol.* 76:188-196.

- Hensgens CMH, Santos H, Zhang C, Kruizinga WH, Hansen TA. 1996. Electron-dense granules in *Desulfovibrio gigas* do not consist of inorganic triphosphate but of a glucose pentakis (diphosphate). *Eur. J. Biochem.* 242:327-331.
- Hiraoka Y, Kimbara K. 2002. Rapid assessment of the physiological status of the polychlorinated biphenyl degrader *Comamonas testosteroni* TK102 by flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:2031-2035.
- Hiraoka Y, Yamada T, Tone K, Futaesaku Y, Kimbara K. 2002. Flow cytometry analysis of changes in the DNA content of the polychlorinated biphenyl degrader *Comamonas testosteroni* TK102: effect of metabolites on cell-cell separation. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:5104-5112.
- Hofer B, Eltis LD, Dowling DN, Timmis KN. 1993. Genetic analysis of a *Pseudomonas* locus encoding a pathway for biphenyl/polychlorinated biphenyl degradation. *Gene* 130:47-55.
- Hsieh PC, Shenoy BC, Haase FC, Jentoft JE, Phillips NF. 1993. Involvement of tryptophan(s) at the active site of polyphosphate/ATP glucokinase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry.* 32:6243-6249.
- Imlay JA, Chin SM, Linn S. 1988. Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction *in vivo* and *in vitro*. *Science* 240:640-642.
- Imlay JA, Linn S. 1988. DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* 240:1302-1309.
- Imstieck G, Munkner J, Lorenz B, Bachinski N, Muller WEG, Schroder HC. 1996. Inorganic polyphosphates in the developing freshwater sponge *Ephydatia muelleri*: effect of stress by pollutant waters. *Environ. Toxicol. Chem.* 15:1329-1334.
- Ischiropoulos H, Gow A, Thom SR, Kooy NW, Royall JA, Crow JP. 1999. Detection of reactive nitrogen species using 2,7-dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123. *Meth. Enzymol.* 301:367-373.
- Ishige K, Zhang H, Kornberg A. 2002. Polyphosphate kinase (PPK2), a potent, polyphosphate driven generator of GTP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 16684-16688.
- Ivanova A, Miller C, Glinsky G, Eisenstark A. 1994. Role of *rpoS* (*katF*) in *oxyR*-independent regulation of hydroperoxidase I in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 12:571-578.

- Johnston M, Andrews S, Brinkman R, Cooper J, Ding H, Dover J, Du Z, Favello A, Fulton L, Gattung S, *et al.* 1994. Complete nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome VIII. *Science* 265:2077-2082.
- Kastanek F, Kastanek P, Demnerova K, Maletterova Y. 2004. Decontamination of wastewater contaminated by polychlorinated biphenyls (PCBs). *Water Sci. Technol.* 50:131-138.
- Kavanaugh-Black A, Connolly DM, Chugani SA, Chakrabarty AM. 1994. Characterization of nucleoside-diphosphate kinase from *Pseudomonas aeruginosa*: complex formation with succinyl-CoA synthetase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:5883-5887.
- Keasling JD. 1997. Regulation of intracellular toxic metals and other cations by hydrolysis of polyphosphate. *Ann. NY. Acad. Sci.* 829: 242-249.
- Kim HY, Schlichtman D, Shankar S, Xie Z, Chakrabarty AM, Kornberg A. 1998. Alginate, inorganic polyphosphate, GTP and ppGpp synthesis co-regulated in *Pseudomonas aeruginosa*: implications for stationary phase survival and synthesis of RNA/DNA precursors. *Mol. Microbiol.* 27:717-725.
- Kim KS, Rao NN, Fraley CD, Kornberg 2002. A. Inorganic polyphosphate is essential for long-term survival and virulence factors in *Shigella* and *Salmonella sp.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:7675-7680.
- Kimbrough RD, Krouska CA. 2003. Human exposure to polychlorinated biphenyls and health effects: a critical synopsis. *Toxicol. Rev.* 22:217-233.
- Kimbrough RD. 1995. Polychlorinated biphenyls (PCBs) and human health: an update. *Crit. Rev. Toxicol.* 25:133-163.
- Kornberg A, Rao NN and Ault-Riché D. 1999. Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Annu. Rev. Biochem.* 68:89-125.
- Kornberg A. 1995. Inorganic polyphosphate: toward making a forgotten polymer unforgettable. *J. Bacteriol.* 177:491-496.
- Kornberg A. 1999a. Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 23:1-18.

- Kornberg A. 1999b. Inorganic polyphosphate: A molecule of many functions. En H.C. Schröder y W.E.G. Müller (eds.), *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, Vol. 23, pp 1-17. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Kulaev IS, Kulakovskaya T. 2000. Polyphosphate and phosphate pump. *Annu. Rev. Microbiol.* 54:709-734.
- Kulaev IS, Kulakovskaya TV, Andreeva NA, Lichko LP. 1999. Metabolism and function of polyphosphates in bacteria and yeast. En H.C. Schröder y W. E. G. Müller (eds.), *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, Vol. 23, pp. 27-43. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Kumble KD, Ahn K, Kornberg A. 1996. Phosphohistidyl active sites in polyphosphate kinase of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:14391-14395.
- Kumble KD, Kornberg A. 1995. Inorganic polyphosphate in mammalian cells and tissues. *J. Biol. Chem.* 270: 5818-5822.
- Kuroda A, Murphy H, Cashel M, Kornberg A. 1997. Guanosine tetra- and pentaphosphate promote accumulation of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 272:21240-21243.
- Kuroda A, Nomura K, Ohtomo R, Kato J, Ikeda T, Takiguchi N, Ohtake H, Kornberg A. 2001. Role of inorganic polyphosphate in promoting ribosomal protein degradation by the Lon protease in *E. coli*. *Science* 293: 705-708.
- Kuroda A, Ohtake H. 2000. Molecular analysis of polyphosphate accumulation in bacteria. *Biochemistry (Moscú)*. 65:304-308.
- Kuroda A. 2006. A polyphosphate-Lon protease complex in the adaptation of *Escherichia coli* to amino acid starvation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70:325-331.
- Kuroda, A., Murphy, H., Cashel, M. y Kornberg, A. 1997. Guanosine tetra- and pentaphosphate promote accumulation of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 272: 21240-21243.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

- Lajoie CA, Chen SY, Oh KC, Strom PF. 1992. Development and use of field application vectors to express nonadaptive foreign genes in competitive environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:655-663.
- Lajoie CA, Layton AC, Easter JP, Menn FM, Saylor CS. 1997. Degradation of nonionic surfactants and polychlorinated biphenyls by recombinant field application vectors. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 19:252-262.
- Law AM, Aitken MD. 2003. Bacterial chemotaxis to naphthalene desorbing from a nonaqueous liquid. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:5968-5973.
- Lee K. 1999. Benzene-induced uncoupling of naphthalene dioxygenase activity and enzyme inactivation by production of hydrogen peroxide. *J. Bacteriol.* 181:2719-2725.
- Lefebvre MD, Valvano MA. 2002. Construction and evaluation of plasmid vectors optimized for constitutive and regulated gene expression in *Burkholderia cepacia* complex isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:5956-5964.
- Lichko LP, Andreeva NA, Kulakovskaya TV, Kulaev IS. 2003. Exopolyphosphatases of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 3:233-238.
- Lünsdorf H, Erb RW, Abraham WR, Timmis KN. 2000a. 'Clay hutches': a novel interaction between bacteria and clay minerals. *Environ. Microbiol.* 2:161-168.
- Lünsdorf H, Strömpl C, Osborn AM, Bannasar A, Moore ERB, Abraham WR, Kenneth NT. 2000b. Approach to analyze interactions of microorganisms, hydrophobic substrates, biofilms and to study initial events in microbiogeological processes. *Meth. Enzymol.* 336: 317-331.
- Maltseva OV, Tsoi TV, Quensen JF 3rd, Fukuda M, Tiedje JM. 1999. Degradation of anaerobic reductive dechlorination products of Aroclor 1242 by four aerobic bacteria. *Biodegradation* 10:363-371.
- Mandalakis M, Stephanou EG. 2002. Polychlorinated biphenyls associated with fine particles (PM25) in the urban environment of Chile: concentration levels, and sampling volatilization losses. *Environ. Toxicol. Chem.* 21:2270-2275.
- Margolin W. 2005. FtsZ and the division of prokaryotic cells and organelles. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 6:862-871.

- Margolin Y, Barak R, Eisenbach M. 1994. Arsenate arrests flagellar rotation in cytoplasm-free envelopes of bacteria. *J. Bacteriol.* 176:5547-5549.
- Mariussen E, Myhre O, Reistad T, Fonnum F. 2002. The polychlorinated biphenyl mixture Aroclor 1254 induces death of rat cerebellar granule cells: the involvement of the N-methyl-D-aspartate receptor and reactive oxygen species. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 179:137-144.
- Marx RB, Aitken MD. 2000. Bacterial chemotaxis enhances naphthalene degradation in a heterogeneous aqueous system. *Environ. Sci. Technol.* 34:3379-3383.
- Massé RF, Messier F, Ayotte C, Lévesque M-F, Sylvestre M. 1989. A comprehensive gas chromatographic/mass spectrometric analysis of 4-chlorobiphenyl bacterial degradation products. *Biomed. Environ. Mass Spectrometry* 18:27-47.
- Matin A. 1991. The molecular basis of carbon-starvation-induced general resistance in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol* 5:3-10.
- Matsukawa M, Greenberg EP. 2004. Putative exopolysaccharide synthesis genes influence *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J. Bacteriol.* 186:4449-4456.
- Mazumder R, Phelps TJ, Krieg NR, Benoit RE. 1999. Determining chemotactic responses by two subsurface microaerophiles using a simplified capillary assay method. *J. Microbiol. Meth.* 37:255-263.
- Meyer A. 1904. Orientierende Untersuchungen über Verbreitung, Morphologie, und Chemie des Volutins. *Bot. Z.* 62:113-152.
- Mullan A, Quinn JP, McGrath JW. 2002. Enhanced phosphate uptake and polyphosphate accumulation in *Burkholderia cepacia* grown under low pH conditions. *Microb. Ecol.* 44:69-77.
- Nesmeyanova MA. 2000. Polyphosphates and enzymes of polyphosphate metabolism in *Escherichia coli*. *Biochemistry (Moscu)*. 65:309-314.
- Nielsen AT, Tolker-Nielsen T, Barken KB, Molin S. 2000. Role of commensal relationships on the spatial structure of a surface-attached microbial consortium. *Environ. Microbiol.* 2:59-68.
- Nogales B, Moore ERB, Llobet-Brossa E, Rossello-Mora R, Amann R, Timmis KN. 2001. Combined use of 16S ribosomal DNA and 16S rRNA to study the bacterial community of polychlorinated biphenyl-polluted soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1874-1884.

- Ogawa N, Tzeng CM, Fraley CD, Kornberg A. 2000. Inorganic polyphosphate in *Vibrio cholerae*: genetic, biochemical, and physiologic features. *J. Bacteriol.* 182:6687-6693.
- Ohtsubo Y, Kudo T, Tsuda M, Nagata Y. 2004. Strategies for bioremediation of polychlorinated biphenyls. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65:250-258.
- O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* 54:49-79.
- O'Toole GA, Kolter R. 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* 30:295-304.
- Pandey G, Jain RK. 2002. Bacterial chemotaxis toward environmental pollutants: role in bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:5789-5795.
- Parales RE, Harwood CS. 2002. Bacterial chemotaxis to pollutants and plant-derived aromatic molecules. *Curr. Opin. Microbiol.* 5:266-273.
- Park SH, Oh KH, Kim CK. 2001. Adaptive and cross-protective responses of *Pseudomonas sp.* DJ-12 to several aromatics and other stress shocks. *Curr. Microbiol.* 43:176-181.
- Parks QM, Hobden JA. 2005. Polyphosphate kinase 1 and the ocular virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46:248-251.
- Pieper DH, Reineke W. 2000. Engineering bacteria for bioremediation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11:262-270.
- Pieper DH. 2005. Aerobic degradation of polychlorinated biphenyls. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67:170-191.
- Ramos JL, Duque E, Huertas MJ, Haidour A. 1995. Isolation and expression of catabolic potential of a *Pseudomonas putida* strain able to grow in presence of high concentrations of aromatic hydrocarbons. *J. Bacteriol.* 177:3911-3916.
- Rao NN, Kornberg A. 1999. Inorganic polyphosphate regulates responses of *Escherichia coli* to nutritional stringencies, environmental stresses and survival in the stationary phase. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 23:183-195.
- Rao NN, Kornberg A. 1996. Inorganic polyphosphate supports resistance and survival of stationary-phase *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 178:1394-1400.

- Rao NN, Liu S, Kornberg A. 1998. Inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*: the phosphate regulon and the stringent response. *J. Bacteriol.* 180:2186-2193.
- Rashid MH, Kornberg A. 2000. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:4885-4890.
- Rashid MH, Rao NN, Kornberg A. 2000a. Inorganic polyphosphate is required for motility of bacterial pathogens. *J. Bacteriol.* 182:225-227.
- Rashid MH, Rumbaugh K, Passador L, Davies DG, Hamood AN, Iglewski BH, Kornberg A. 2000b. Polyphosphate kinase is essential for biofilm development, quorum sensing, and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:9636-9641.
- Remonsellez F, Orell A, Jerez CA. 2006. Copper tolerance of the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus metallicus*: possible role of polyphosphate metabolism. *Microbiology* 152:59-66.
- Renninger N, Knopp R, Nitsche H, Clark DS, Keasling JD. 2004. Uranyl precipitation by *Pseudomonas aeruginosa* via controlled polyphosphate metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:7404-7412.
- Reusch RN, Sadoff HL. 1988. Putative structure and functions of a poly-beta-hydroxybutyrate-calcium polyphosphate channel in bacterial plasma membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4176-4180.
- Robles J, Doers M. 1994. pGEM[®]-T vectors systems troubleshooting guide. Promega Notes 45:19.
- Romberg L, Levin PA. 2003. Assembly dynamics of the bacterial cell division protein FTSZ: poised at the edge of stability. *Annu. Rev. Microbiol.* 57:125-154.
- Ron EZ, Rosenberg E. Natural roles of biosurfactants. 2001. *Environ. Microbiol.* 3:229-236.
- Rudnick H, Hendrich S, Pilatus U, Blotevogel KH. 1990. Phosphate accumulation and the occurrence of polyphosphate and cyclic 2,3-diphosphoglycerate in *Methanosarcina frisia*. *Arch. Microbiol.* 154: 584-588.
- Ruiz-Leal M, George S. 2004. An *in vitro* procedure for evaluation of early stage oxidative stress in an established fish cell line applied to investigation of PHAH and pesticide toxicity. *Mar. Environ. Res.* 58:631-635.

- Sambrook J, Russell DW. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY.
- Scherer PA, Bochem HP. 1983. Ultrastructural investigation of *Methanosarcinae* and related species grown on methanol for occurrence of polyphosphate-like inclusion. *Can. J. Microbiol.* 29: 1190-1199.
- Schilderman PA, Maas LM, Pachen DM, de Kok TM, Kleinjans JC, van Schooten FJ. 2000. Induction of DNA adducts by several polychlorinated biphenyls. *Environ. Mol. Mutagen.* 36:79-86.
- Schlichtman D, Kavanaugh-Black A, Shankar S, Chakrabarty AM. 1994. Energy metabolism and alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: role of the tricarboxylic acid cycle. *J. Bacteriol.* 176:6023-6029.
- Schweigert N, Zehnder AJB, Eggen RIL. 2001. Chemical properties of catechols and their molecular modes of toxic action in cells, from microorganisms to mammals. *Environ. Microbiol.* 3:81-91.
- Seaver LC, Imlay JA. 2001. Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 183:7173-7181.
- Seegal RF. 1996. Epidemiological and laboratory evidence of PCB-induced neurotoxicity. *Crit. Rev. Toxicol.* 26:709-737.
- Shi X, Rao NN, Kornberg A. 2004. Inorganic polyphosphate in *Bacillus cereus*: motility, biofilm formation, and sporulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:17061-17065.
- Shiba T, Itoh H, Kameda A, Kobayashi K, Kawazoe Y, Noguchi T. 2005. Polyphosphate:AMP phosphotransferase as a polyphosphate-dependent nucleoside monophosphate kinase in *Acinetobacter johnsonii* 210A. *J. Bacteriol.* 187:1859-1865.
- Shiba T, Tsutsumi K, Ishige K, Noguchi T. 2000. Inorganic polyphosphate and polyphosphate kinase: their novel biological functions and applications. *Biochemistry (Moscow)*. 65:315-323.
- Shiba T, Tsutsumi K, Yano H, Ihara Y, Kameda A, Tanaka K, Takahashi H, Mukenata M, Rao N, Kornberg A. 1997. Inorganic polyphosphate and the induction of *rpaS* expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 11210-11215.

- Shin M, Barrington SF, Marshall WD, Kim JW. 2004. Simultaneous soil Cd and PCB decontamination using a surfactant/ligand solution. *J. Environ. Sci. Health. A. Tox. Hazard Subst. Environ. Eng.* 39:2783-2798.
- Shirai M, Kakada J, Shibata K, Morshed MG, Matsushita T, Nakazawa T. 2000. Accumulation of polyphosphate granules in *Helicobacter pylori* cells under anaerobic conditions. *J. Med Microbiol.* 49:513-519.
- Sim L, Ward OP, Li Z. 1997. Production and characterization of a biosurfactant isolated from *Pseudomonas aeruginosa* UW-1. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 19:232-238.
- Singer AC, Gilbert ES, Luepromchai E, Crowley DE. 2000. Bioremediation of polychlorinated biphenyl-contaminated soil using carvone and surfactant-grown bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54:838-843.
- Singer AC, Huang WE, Helm J, Thompson IP. 2005. Insight into pollutant bioavailability and toxicity using Raman confocal microscopy. *J. Microbiol. Methods* 60:417-422.
- Stanley NR, Lazazzera BA. 2004. Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. *Mol. Microbiol.* 52:917-924.
- Stelmack PL, Gray MR, Pickard MA. 1999. Bacterial adhesion to soil contaminants in the presence of surfactants. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:163-168.
- Stjepandic D, Weinel C, Hilbert H, Koo HL, Diehl F, Nelson KE, Tummler B, Hoheisel JD. 2002. The genome structure of *Pseudomonas putida*: high-resolution mapping and microarray analysis. *Environ. Microbiol.* 4:819-823.
- Stock JB, Surette MG. 1996. Chemotaxis. In Neidhardt FC, Curtiss III R, Ingraham JI, Lin ECC, Low KB, Magasanik B, Reznikoff WS, Riley M, Schaechter M, Umberger HE (ed.). *Escherichia coli* and *Salmonella*, 2nd ed., vol. 1. ASM Press, Washington, D.C.:1103-1129.
- Storz GT, Hengge-Aronis R. 2000. Bacterial stress responses. ASM Press, Washington, D.C.
- Studier FW. 1991. Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J. Mol. Biol.* 219:37-44.
- Tamburro A, Robuffo I, Heipieper HJ, Allocati N, Rotilio D, Di Ilio C, Favaloro B. 2004. Expression of glutathione S-transferase and peptide methionine sulphoxide reductase in

- Ochrobactrum anthropi* is correlated to the production of reactive oxygen species caused by aromatic substrates. FEMS Microbiol. Lett. 241:151-156.
- Tan S, Fraley CD, Zhang M, Dailidienė D, Kornberg A, Berg DE. 2005. Diverse phenotypes resulting from polyphosphate kinase gene (*ppk1*) inactivation in different strains of *Helicobacter pylori*. J. Bacteriol. 187:7687-7695.
- Tanaka S, Lee SO, Hamaoka K, Kato J, Takiguchi N, Nakamura K, Ohtake H, Kuroda A. 2003. Strictly polyphosphate-dependent glucokinase in a polyphosphate-accumulating bacterium, *Microlumatus phosphovorus*. J. Bacteriol. 185:5654-5656.
- Tartakovsky B, Michott A, Cadieux JC, Hawari J, Guiot SR. 2001. Degradation of Aroclor 1242 in a single-stage coupled anaerobic/aerobic bioreactor. Water Res. 35:4323-4330.
- Tiedje JM, Quensen JF 3rd, Chee-Sanford J, Schimel JP, Boyd SA. 1993. Microbial reductive dechlorination of PCBs. Biodegradation 4:231-240.
- Timmis KN, Steffan RJ, Unterman R. 1994. Designing microorganisms for the treatment of toxic wastes. Annu. Rev. Microbiol. 48:525-557.
- Tsutsumi K, Munekata M, Shiba T. 2000. Involvement of inorganic polyphosphate in expression of SOS genes. Biochim. Biophys. Acta 1493: 73-81.
- Tzeng C, Kornberg A. 2000. The multiple activities of polyphosphate kinase of *Escherichia coli* and their subunit structure determined by radiation target analysis. J. Biol. Chem. 275: 3977-3983.
- Tzeng CM, Kornberg A. 1998. Polyphosphate kinase is highly conserved in many bacterial pathogens. Mol. Microbiol. 29:381-382.
- VanBogelen RA, Kelley PM, Neidhardt FC. 1987. Differential induction of heat shock, SOS, and oxidation stress regulons and accumulation of nucleotides in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 169:26-32.
- Velicer GJ, Kroos L, Lenski RE. 1998. Loss of social behaviours by *Myxococcus xanthus* during evolution in an unstructured habitat Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:12376-12380.
- Velicer GJ, Kroos L, Lenski RE. 2000. Developmental cheating in the social bacterium *Myxococcus xanthus*. Nature 404:598-601.

- Velicer GJ, Lenski RE, Kroos L. 2002. Rescue of social motility lost during evolution of *Myxococcus xanthus* in an asocial environment. *J. Bacteriol.* 184:2719-2727.
- Velicer GJ. 1999. Pleiotropic effects of adaptation to a single carbon source for growth on alternative substrates. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:264-269.
- Vercellone-Smith P, Herson DS. 1997. Toluene elicits a carbon starvation response in *Pseudomonas putida* mt-2 containing the TOL plasmid pWWO. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:1925-1929.
- Voie OA, Fonnum F. 2000. Effect of polychlorinated biphenyls on production of reactive oxygen species (ROS) in rat synaptosomes. *Arch. Toxicol.* 73:588-593.
- Watts JE, Wu Q, Schreier SB, May HD, Sowers KR. 2001. Comparative analysis of polychlorinated biphenyl-dechlorinating communities in enrichment cultures using three different molecular screening techniques. *Environ. Microbiol.* 3:710-719.
- Wiame JM. 1947. Yeast metaphosphate. *Fed. Proc.* 6:302.
- Wood HG y Clark JE. 1988. Biological aspects of inorganic polyphosphates. *Annu. Rev. Biochem.* 57:235-260.
- Wu G, Feng Y, Boyd SA. 2003. Characterization of bacteria capable of degrading soil-sorbed biphenyl. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 71:768-775.
- Wu J, Wiess B. 1991. Two divergently transcribed genes, *soxR* and *soxS*, control a superoxide response regulon of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 173:2864-2871.
- Wu Q, Sowers KR, May HD. 2000. Establishment of a polychlorinated biphenyl-dechlorinating microbial consortium, specific for doubly flanked chlorines, in a defined, sediment-free medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:49-53.
- Wurst H, Kornberg A. 1994. A soluble exopolyphosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*. Purification and characterization. *J. Biol. Chem.* 269:10996-11001.
- Wurst H, Shiba T, Kornberg A. 1995. The gene for a major exopolyphosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 177: 898-906.
- Zhang H, Gomez-Garcia MR, Brown MR, Kornberg A. 2005a. Inorganic polyphosphate in *Dictyostelium discoideum*: influence on development, sporulation, and predation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:2731-2735.

-
- Zhang H, Ishige K, Kornberg A. 2002. A polyphosphate kinase (*PPK2*) widely conserved in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:16678-16683.
- Zhang H, Rao NN, Shiba T, Kornberg A. 2005b. Inorganic polyphosphate in the social life of *Mycococcus xanthus*: motility, development, and predation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:13416-13420.
- Zhang Y. 1996. Life without KatG. *Trends Microbiol.* 4:415-416.
- Zinser ER, Schneider D, Blot M, Kolter R. 2003. Bacterial evolution through the selective loss of beneficial genes. Trade-offs in expression involving two loci. *Genetics* 164:1271-1277.

6. Anexos

Artículos generados con los resultados de esta tesis doctoral:

Chávez FP, Lünsdorf H, Jerez CA. 2004. Growth of polychlorinated-biphenyl-degrading bacteria in the presence of biphenyl and chlorobiphenyls generates oxidative stress and massive accumulation of inorganic polyphosphate. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:3064-3072 (Anexo 1).

Chávez FP, Gordillo F, Jerez CA. 2006. Adaptive responses and cellular behaviour of biphenyl-degrading bacteria toward polychlorinated biphenyls. *Biotechnol. Adv.* 24:309-20 (Anexo 2).

Chávez FP, Gordillo F, Jerez CA. Characterization and proteomic studies of polyphosphate deficient phenotype in the biphenyl-degrading bacteria *Pseudomonas* sp. B4. Manuscrito en preparación.

Artículos relacionados pero no incluidos en esta Tesis doctoral:

Cardona ST, Chávez FP, Jerez CA. 2002. The exopolyphosphatase gene from *Sulfolobus solfataricus*: characterization of the first gene found to be involved in polyphosphate metabolism in archaea. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:4812-4819.

Gordillo F, Chávez FP, Jerez CA Motility and chemotaxis of biphenyl-degrading bacteria towards biphenyl and its chloroderivatives. Manuscrito enviado.

Growth of Polychlorinated-Biphenyl-Degrading Bacteria in the Presence of Biphenyl and Chlorobiphenyls Generates Oxidative Stress and Massive Accumulation of Inorganic Polyphosphate

Francisco P. Chávez,¹ Heinrich Lünsdorf,² and Carlos A. Jerez^{1*}

Laboratory of Molecular Microbiology and Biotechnology and Millennium Institute for Advanced Studies in Cell Biology and Biotechnology, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Chile, Santiago, Chile,¹ and Division of Microbiology, GBF-National Research Centre for Biotechnology, Braunschweig, Germany²

Received 2 September 2003/Accepted 22 January 2004

Inorganic polyphosphate (polyP) plays a significant role in increasing bacterial cell resistance to unfavorable environmental conditions and in regulating different biochemical processes. Using transmission electron microscopy of the polychlorinated biphenyl (PCB)-degrading bacterium *Pseudomonas* sp. strain B4 grown in defined medium with biphenyl as the sole carbon source, we observed large and abundant electron-dense granules at all stages of growth and following a shift from glucose to biphenyl or chlorobiphenyls. Using energy dispersive X-ray analysis and electron energy loss spectroscopy with an integrated energy-filtered transmission electron microscope, we demonstrated that these granules were mainly composed of phosphate. Using sensitive enzymatic methods to quantify cellular polyP, we confirmed that this polymer accumulates in PCB-degrading bacteria when they grow in the presence of biphenyl and chlorobiphenyls. Concomitant increases in the levels of the general stress protein GroEl and reactive oxygen species were also observed in chlorobiphenyl-grown cells, indicating that these bacteria adjust their physiology with a stress response when they are confronted with compounds that serve as carbon and energy sources and at the same time are chemical stressors.

Polyphosphate (polyP) is a ubiquitous linear polymer consisting of hundreds of orthophosphate residues (P_i) linked by high-energy phosphoanhydride bonds. The best-known enzymes involved in the metabolism of polyP in bacteria are the polyphosphate kinase (PPK) that catalyzes the reversible conversion of the terminal phosphate of ATP into polyP and the exopolyphosphatase that processively hydrolyzes the terminal residues of polyP to liberate P_i (15).

The involvement of polyP in the regulation of both enzyme activities and expression of large group of genes is the basis of survival for different bacteria, including pathogens, under stress conditions and of adaptation to the stationary growth phase (reviewed in reference 16). Mutant bacterial cells that lack polyP survive poorly during growth in the stationary phase and are less resistant to heat, oxidants, osmotic challenge, antibiotics, and UV radiation (6, 13, 24, 25, 35).

polyP accumulation in response to nutrient deprivation has also been reported in the genus *Pseudomonas*, and recent studies have demonstrated that PPK is essential in *Pseudomonas aeruginosa* not only for various forms of motility (26, 27) but also for biofilm development, quorum sensing, production of virulence factors, and virulence in the burned-mouse pathogenesis model (28).

Chlorinated biphenyls (CBs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) belong to one of the most widely distributed classes of

chlorinated chemicals in the environment (33, 34). The toxicities and carcinogenicities of some PCB congeners make them a serious environmental and health problem (14). For cleanup of large areas of PCB-contaminated soils and aquatic environments bioremediation seems to be a promising approach (22). Although many genetic, enzymological, and biochemical analyses of PCB-degradative pathways have provided the basis for the engineering of specific enzymes and genetically modified microorganisms in order to improve performance in bioremediation of PCBs, little is known about the physiological adjustments of PCB-degrading bacteria during growth with these kinds of organochlorine compounds.

Here we demonstrate that the PCB-degrading bacterium *Pseudomonas* sp. strain B4 accumulates much higher levels of polyP during exponential growth with biphenyl than when glucose is the sole carbon source. Following a shift from a defined medium with glucose to a medium with biphenyl or CBs as the single carbon source, numerous polyP granules accumulated in the cytoplasm. Additionally, induction of the general stress protein GroEl and oxygen reactive species (ROS) was observed, probably as a physiological adjustment to growth in the presence of these contaminating compounds, which appear to stress the cells.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. Biphenyl was purchased from Merck (Hohenbrunn, Germany). 2-Chlorobiphenyl and 4-chlorobiphenyl were obtained from Accustandard, Inc. (New Haven, Conn.).

Bacterial strains and growth conditions. The biphenyl-utilizing organisms *Burkholderia fungorum* strain LB490 and *Pseudomonas* sp. strain B4 were grown aerobically at 30°C on Luria-Bertani (LB) rich medium or M9 minimal salts

* Corresponding author. Mailing address: Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Universidad de Chile, Santiago 1, Casilla 653, Santiago, Chile. Phone: (56-2) 678 7376. Fax: (56-2) 271-2983. E-mail: cjerez@uchile.cl.

VOL. 70, 2004

polyP AND STRESS IN PCB-DEGRADING BACTERIA 3065

medium (30) supplemented with 0.5% biphenyl, 1% glucose, 0.1% (wt/vol) 2-chlorobiphenyl, 0.1% (wt/vol) 4-chlorobiphenyl, or 0.05% (vol/vol) 3-chlorobiphenyl. For the shift experiments, *Pseudomonas* sp. strain B4 cells that were exponentially grown in M9 medium with 1% glucose as the sole carbon source were collected by centrifugation, washed twice with M9 medium, and finally resuspended in the same medium supplemented with biphenyl or another CB.

Electron microscopy. Unstained cells from the different cultures were routinely examined for the presence of electron-dense bodies by transmission electron microscopy (9). Cells from the different cultures were mixed and dispersed in distilled water and then placed onto carbon-coated nickel grids. The drops containing the microorganisms were drained off with filter paper, and the preparations were air dried for 30 to 50 s. Electron microscopy was performed with a Philips Tecnai 12 electron microscope by using an accelerating voltage of 80 kV (Electron Microscopy Laboratory, Pontificia Universidad Católica de Chile).

EDAX analysis. Energy dispersive spectroscopy of chemical elements in bacteria was performed with an EDAX-FV 9800 energy-dispersive microanalyzer at an accelerating voltage of 120 kV (8). The electron beam was focused on the location at which the elemental composition was to be determined. Due to the interaction between the primary electron and the sample, X-ray signals were collected with the energy-dispersive X-ray (EDAX) analysis spectrometer, which was connected to the electron microscope.

EELS and element mapping. Electron energy loss spectroscopy (EELS) analysis (17) was performed with a Zeiss CEM 902 integrated energy-filtered transmission electron microscope. The microscope was operated in the electron spectroscopic imaging (ESI) mode for element mapping, and parallel EELS was performed for spectrum registration with the aid of ESI-Vision software (Soft Imaging Systems, Münster, Germany). Aperture settings described by Linsdorf et al. (17) were used. Commercial hydroxyapatite was used as the internal phosphorus standard.

Purification and analysis of proteins. Purified recombinant His₆-PPK was prepared by using *Escherichia coli* strain NR 100 as described previously (3), and this preparation was used in the polyP assay described below. The protein concentration was determined by the method of Bradford (Coomassie Plus protein assay reagent; Pierce, Rockford, Ill.).

Western immunoblotting. The total protein fractions corresponding to the different cells in the shift experiments were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and electrotransferred to a polyvinylidene difluoride membrane as described previously (23). For the antigen-antibody reaction, the membrane containing the transferred proteins was treated with an anti-*Acidithiobacillus ferrooxidans* GroEL polyclonal antibody (1:1,000 dilution) as the primary antibody and with monoclonal anti-rabbit antibodies conjugated with peroxidase (Amersham, Little Chalfont, United Kingdom) as the secondary antibodies (1:5,000 dilution). A colorimetric method was used to develop Western blots as recommended by Promega (Madison, Wis.).

polyP quantification. polyP was quantified by using a two-step conversion of polyP into ATP by PPK and quantification of ATP by luciferase to generate light (2). First, polyP was extracted from cell extracts by using Glassmilk, and then it was assayed by using the reverse reaction of *E. coli* PPK with excess ADP. Finally, the ATP content was determined by using the luciferase (Boehringer, Mannheim, Germany) reaction, and the luminescence was measured with a luminometer (BioScan Lumi96). The concentration of polyP was expressed in terms of P_n residues.

Analysis of polyP by gel electrophoresis. polyP samples extracted with Glassmilk were prepared for gel electrophoresis by the method of Robinson et al. (29). Polyacrylamide gel electrophoresis was performed as previously described (18) with Tris-borate-EDTA buffer (pH 8.3), using 18% urea gels and a Protean IIi cell system (Bio-Rad) for 90 min at 400 V. The gels were stained with toluidine blue (0.05%) in 25% methanol. The estimated size range of the polyP was determined by comparison with polyP standards having chain lengths of 45 and 75 P residues (Sigma) and PolyP₇₅₀ (chain length, ~750 P residues), synthesized *in vitro* as described previously (2, 4).

In vivo detection of ROS. Overproduction of ROS in cells exponentially grown under different conditions was detected by using the oxidative stress-sensitive probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) (7). The acetyl groups in this compound are removed by membrane esterases to form 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCFH) when the probe is taken up by living cells. DCFH is not fluorescent but is highly sensitive to ROS; it is oxidized by these active species to the highly fluorescent compound 2',7'-dichlorofluorescein (12). DCFH can be oxidized by several reactive species, including RO₂[•], RO[•], OH[•], HOCl[•], and ONOO[•], but only longer-lived radicals contribute to the increase in fluorescence (10). For our experiments, DCFH-DA was added at a final concentration of 5 μM from a 2 mM stock solution in ethanol to cells exponentially grown with glucose, biphenyl, 2-chlorobiphenyl, or 4-chlorobiphenyl as the sole

carbon source. The cells were incubated at 30°C for 1 h in the dark. The samples were handled to avoid light, and fluorescence was measured with a spectrofluorometer (Fluoromax-2; Instruments S.A., Inc.).

RESULTS

Formation of electron-dense granules by growth of cells with biphenyl and CBs. polyP have been detected as electron-dense bodies in several microorganisms (9). Both *Pseudomonas* sp. strain B4 and the PCB-degrading reference strain *B. fungorum* LB400 were found to contain electron-dense bodies in the cytoplasm, and the number and size of these bodies depended on the growth medium and the phase of growth. In all of the experiments performed, the results for the two microorganisms were the same. Figure 1 shows electron micrographs of *Pseudomonas* sp. strain B4 exponentially grown on M9 medium with either glucose (Fig. 1A) or biphenyl (Fig. 1B) as the sole carbon source. With unstained microorganisms like those used in this analysis, it is not possible to discern a well-defined outline of a bacterial cell. However, this method clearly showed that 80 to 90% of the cells collected in the exponential phase contained numerous large electron-dense granules when they were grown with biphenyl, in contrast to the less than 10% of the cells that contained very few much smaller granules when the organisms were grown with glucose. However, more than 90% of the cells collected in the stationary phase contained visible electron-dense granules when they were grown with either of the two carbon sources (data not shown). The granules were abundant and in many cells occupied 20 to 30% of the cell contour area (Fig. 1B). The largest granules had diameters of ~200 to 300 nm, and generally all cells contained three or more granules (Fig. 1B). The same phenomenon was observed with *B. fungorum* LB400 cells (Fig. 1C and D). Thus, the PCB-degrading bacteria *Pseudomonas* sp. strain B4 and *B. fungorum* LB400 accumulated large amounts of large electron-dense granules when they were grown with biphenyl at all stages of growth; when they were grown with glucose, they accumulated granules only when the cells entered the stationary phase.

When exponentially grown cells of *Pseudomonas* sp. strain B4 were shifted from a medium with glucose to the same medium containing CBs, such as 2-, 3-, and 4-chlorobiphenyls, as the sole carbon sources, after 4 h we observed massive accumulation of granules in all cases (as shown for cells grown with 4-chlorobiphenyl in Fig. 1E and F). After cells were shifted from glucose to biphenyl, a dramatic accumulation of electron-dense granules also occurred 4 h after the shift (data not shown). Neither *Pseudomonas* sp. strain B4 nor *B. fungorum* LB400 contained electron-dense granules in any of the growth phases when they were grown in LB medium (data not shown).

Elemental analysis of electron-dense granules by EDAX and EELS. EDAX analysis revealed that the electron-dense granules contained large amounts of phosphorus and oxygen (Fig. 2A and B) compared with the amounts in other cytoplasmic regions of the cells (Fig. 2A and C). The EDAX data on the chemical composition of the electron-dense granules from *Pseudomonas* sp. strain B4 were similar to those for intracellular polyP granules from *Acinetobacter* strain 210A (3) and *Desulfovibrio gigas* (11).

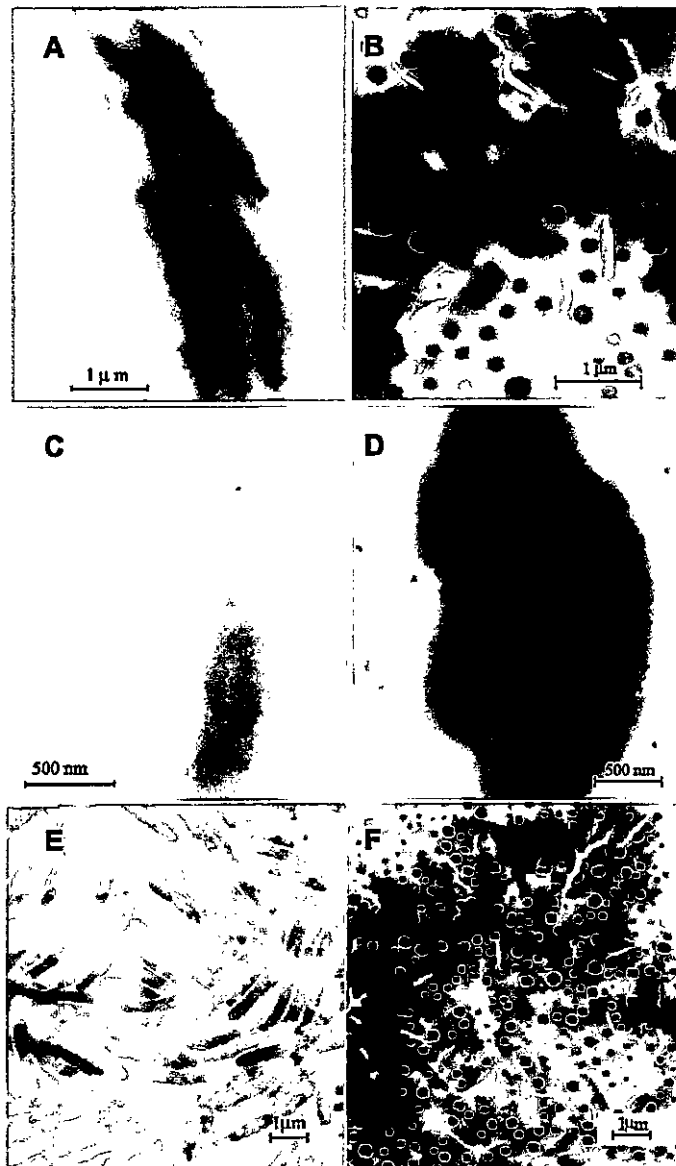


FIG. 1. Electron micrographs of exponentially grown cells of *Pseudomonas* sp. strain B4 (A, B, E, and F) and *B. fungorum* LB400 (C and D). Grids containing the unstained cells were prepared as described in Materials and Methods. Cells were grown to the exponential phase with glucose (A and C) or biphenyl (B and D) as the sole carbon source. A sample of exponentially growing cells of *Pseudomonas* sp. strain B4 in a defined medium supplemented with glucose (E) was shifted to a medium containing 4-chlorobiphenyl as the sole carbon source (F).

VOL. 70, 2004

polyP AND STRESS IN PCB-DEGRADING BACTERIA 3067

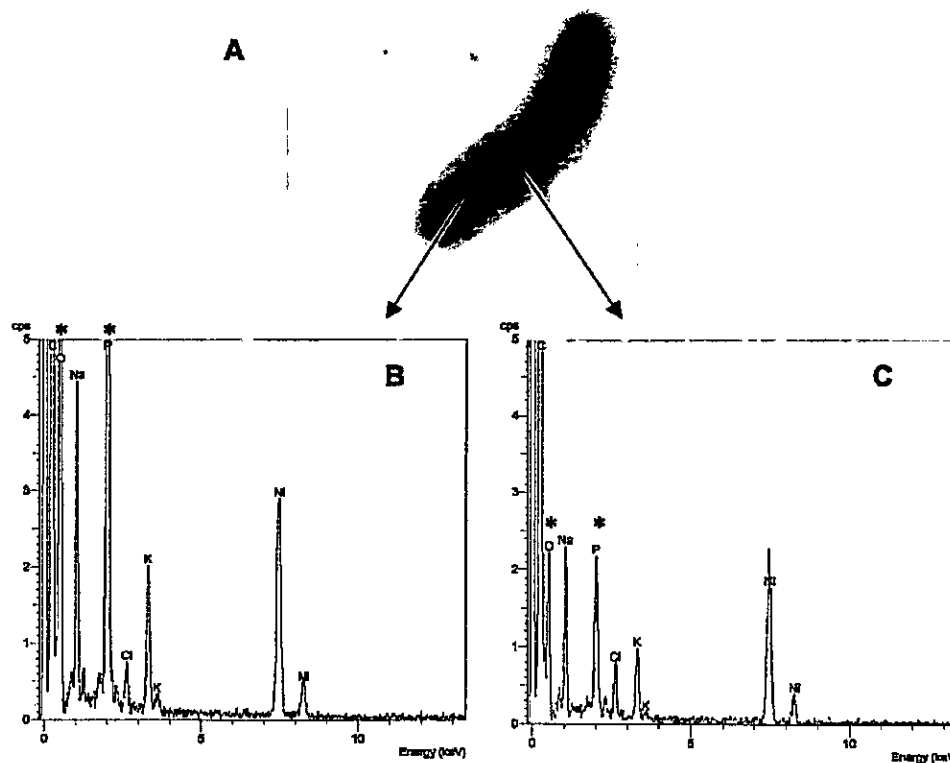


FIG. 2. EDAX spectra of *Pseudomonas* sp. strain B4 grown in a defined medium supplemented with biphenyl as the sole carbon source. (A) Electron micrograph of a single unstained cell used to analyze the chemical composition of different areas (indicated by arrows). (B) Spectrum obtained from an electron-dense body. (C) Spectrum of a cytoplasmic area. The asterisks indicate K_{α} peak intensities of phosphorus and oxygen.

To obtain more detailed information about the polyP-like inclusions, the ultrastructure was examined by scanning electron microscopy coupled to EELS analysis with an integrated energy-filtered transmission electron microscope. Figure 3A shows the electron energy loss spectrum for a cell area containing an electron-dense granule and a cytoplasmic area without such granules. As shown in Fig. 3B, the electron energy loss spectrum of the cell area containing the granules was similar to that of hydroxyapatite, which was used as a phosphate reference after background subtraction and spectrum filtering. The ionization energy onset of the $P_{L_{2,3}}$ edge is at 135 eV for all three spectra and is followed by characteristic energy loss near edge structure features in the 50-eV-higher energy loss region (Fig. 3B). Although all three main maxima (peaks I, II, and III) are present, the maximum of peak III is lower for the polyP granules than for the hydroxyapatite reference. This indicates that there are differences in the electronic vicinity of the phosphorus atoms in the two compounds (i.e., the phosphorus acid anhydride character of polyP and the nonanhydride character

of the calcium hydroxyapatite). By operating the microscope in the ESI mode it was possible to map the phosphorus distribution in the cell area. As shown in Fig. 3C, the distribution of phosphorus, obtained by ESI analysis, exactly matched the electron-dense polyP areas. Thus, by using electron microscopic microanalyses we demonstrated that the electron-dense granules that accumulated in PCB-degrading bacteria during growth with biphenyl or CBs as the sole carbon sources were mainly composed of phosphate and most likely were polyP granules.

Enzymatic determination of polyP in cells grown under different conditions. To determine whether the amazingly large increase in electron-dense granules composed of phosphate during growth with different CBs was indeed due to greater accumulation of polyP, we measured the polyP content under all the conditions analyzed during the electron microscopy observations. By using cell extracts, polyP was enzymatically quantified as described in Materials and Methods.

As shown in Fig. 4A, the polyP contents of *Pseudomonas* sp.

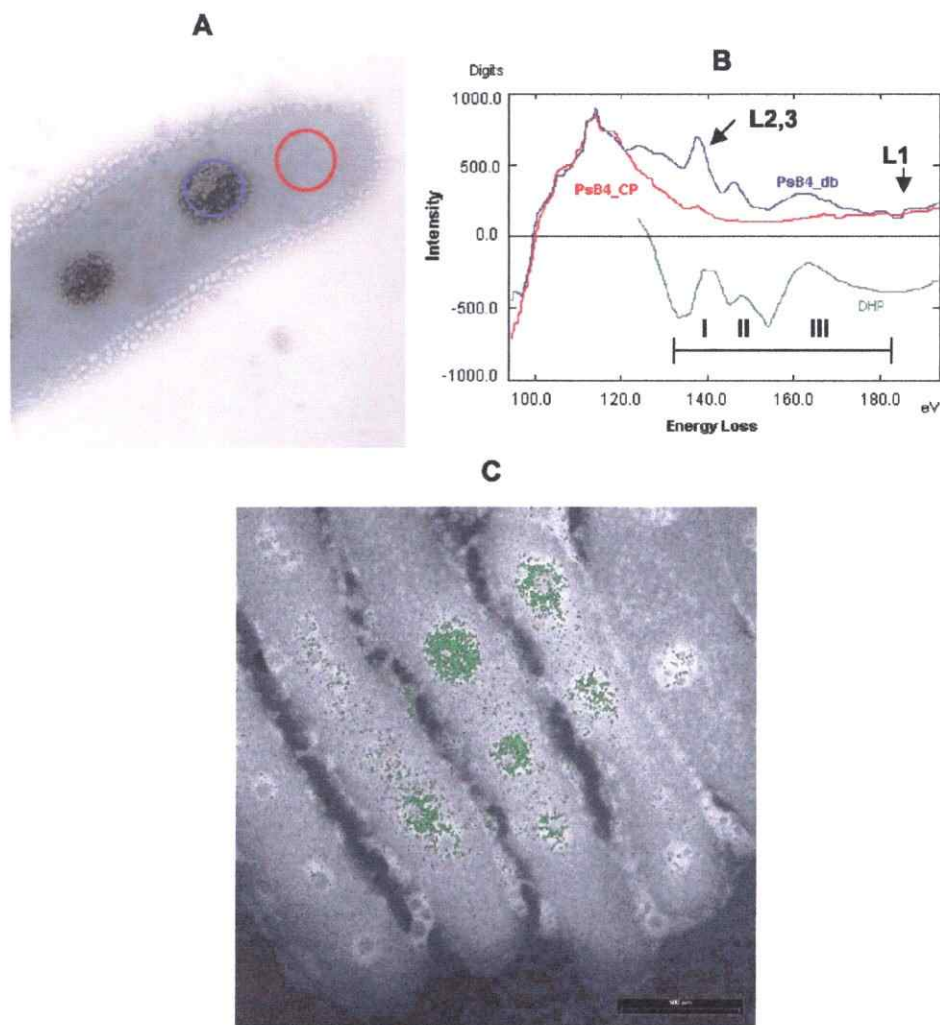


FIG. 3. EELS spectrum of electron-dense bodies present in unstained *Pseudomonas* sp. strain B4. (A) Electron micrograph of an unstained cell grown in a defined medium supplemented with biphenyl as the sole carbon source. The electron-dense granule analyzed is indicated by a blue circle, and the cytoplasmic reference area analyzed is indicated by a red circle. (B) EELS spectra (after background subtraction) of the electron-dense body (PsB4_db) (blue line) and the cytoplasmic area (PsB4_CP) (red line). The spectrum of hydroxyapatite was used as the phosphate reference standard (DHP) (green line). (C) Phosphate distribution image (green), obtained by ESI superimposed with the electron micrograph negative image of *Pseudomonas* sp. strain B4 cells.

strain B4 during growth under different conditions exactly matched the pattern observed for the appearance of electron-dense granules in the cells. Greater accumulations of polyP were observed in cells grown in the presence of biphenyl at all stages of growth and in glucose-grown cells only in the stationary phase. The values were more than 10-fold higher than

those seen during exponential growth of cells with glucose as the sole carbon source or in LB medium at all stages of growth. Identical results were obtained when *B. fungorum* LB400 cells were used (Fig. 4A). These results indicated that the accumulation of electron-dense bodies during growth in the presence of biphenyl was due to greater accumulation of polyP. The

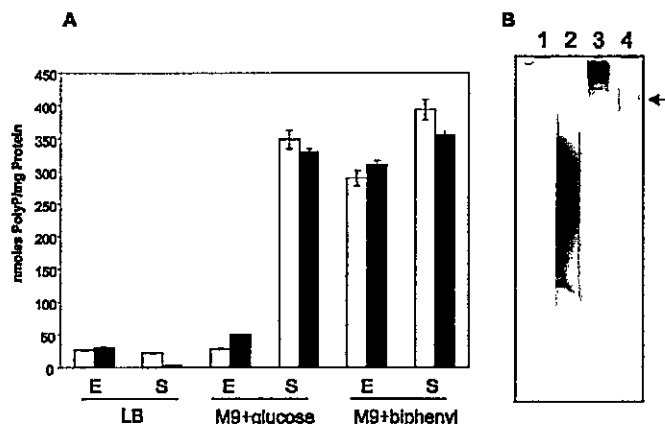


FIG. 4. Influence of the growth phase and different carbon sources on polyP accumulation by cells of *Pseudomonas* sp. strain B4 and *B. fungorum* LB400. (A) Cells of *Pseudomonas* sp. strain B4 (open bars) or *B. fungorum* LB400 (solid bars) were grown in LB medium or in M9 medium supplemented with glucose or biphenyl as the sole carbon source. Aliquots of the cells were analyzed to determine the polyP contents during the exponential (E) or stationary (S) phase of growth. The error bars indicate the standard deviations based on three different experimental values. (B) Polyacrylamide gel electrophoresis of polyP purified from *Pseudomonas* sp. strain B4 cells grown with biphenyl (lane 4, arrow). Lanes 1 to 3 contained polyP standards (lane 1, 45 residues; lane 2, 75 residues; lane 3, 750 residues).

same phenomenon was observed when CBs were tested (data not shown). The polyP synthesized under these conditions had an average chain length of more than 75 residues and less than 750 residues as determined by polyacrylamide gel electrophoresis (Fig. 4B).

polyP accumulation and stress. As polyP plays a significant role in increasing the resistance of bacterial cells to unfavorable and stressful environmental conditions, it was of interest to find out if these microorganisms were stressed while they metabolized CBs. Organochlorine compounds, including PCBs, are known to increase oxidative stress in several biological systems (31). In living microorganisms that have been subjected to environmental stresses, oxidative stress is caused by both overproduction of ROS and depletion of antioxidants. Therefore, we measured the possible oxidative stress in cells exponentially grown under different conditions by using the oxidative stress-sensitive probe DCFH-DA (7). Table 1 shows that exponentially growing cells of *Pseudomonas* sp. strain B4

grown with glucose had a minor background level of fluorescence generated by ROS. A 10-fold increase in fluorescence was seen in biphenyl-grown cells, whereas 40- and 20-fold increases were seen in cells grown in 2-chlorobiphenyl and 4-chlorobiphenyl, respectively. These results provided clear evidence that an oxidative stress was generated when the microorganism was grown with these compounds as the sole carbon sources.

It was of interest to determine if a more general stress response could take place. To do this, we determined the levels of the protein GroEL during shift experiments in the presence of chloroaromatic compounds. As shown in Fig. 5, the GroEL levels increased in PCB-degrading bacterial cells when they were shifted from growth with glucose to growth with different CBs. Although maximum induction of GroEL (approximately eightfold) occurred when control cells were heat shocked at 42°C, during the shift to 4-chlorobiphenyl the stress protein was induced fourfold compared to control cells maintained with glucose as the sole carbon source and showed a transient response, which is typical of heat shock responses. The induction of GroEL was greater in all the cells exposed to the CBs tested than in the cells exposed to biphenyl. Thus, CBs not only induced the synthesis of polyP and ROS but most likely generated a heat shock-like response in PCB-degrading bacteria.

To monitor these three responses simultaneously, we determined the time course changes in polyP, GroEL, and ROS in the same cells when they were shifted to different substrates (Fig. 6). Shortly after the shift (after 2 h), there was no great difference in ROS between the cells shifted to glucose and the cells shifted to 2-chlorobiphenyl, but the GroEL level was much higher in the cells shifted to 2-chlorobiphenyl (Fig. 5 and 6A). This great difference in induction of GroEL levels in cells shifted to 2-chlorobiphenyl remained or even increased during

TABLE 1. Growth with biphenyl and CBs greatly enhances generation of ROS^a

Carbon source	Growth (FU/mg) ^c
Glucose (1%).....	16,837
Biphenyl (2 mM).....	174,075
4-Chlorobiphenyl (2 mM).....	606,597
2-Chlorobiphenyl (2 mM).....	319,027
Glucose (1%) + H ₂ O ₂ (50 mM) ^b	1,384,377

^a DCFH-DA (5 μM) was added to *Pseudomonas* sp. strain B4 cells growing exponentially with different carbon sources, and the preparations were incubated for 1 h in the dark.

^b As a positive control, cells grown with glucose were incubated for the same time in the presence of 50 mM hydrogen peroxide.

^c Fluorescence was measured as described in Materials and Methods and was expressed in fluorescence units (FU).

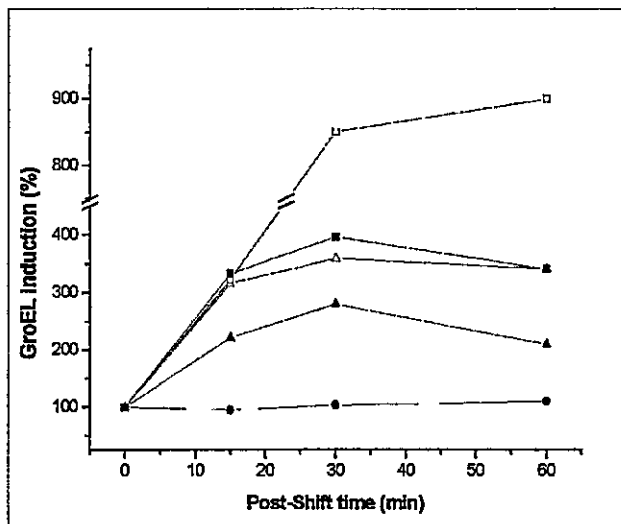


FIG. 5. GroEL is induced in PCB-degrading bacteria during growth with different CBs. *Pseudomonas* sp. strain B4 cells were shifted from a defined medium supplemented with glucose to a medium supplemented with biphenyl (▲), 2-chlorobiphenyl (△), or 4-chlorobiphenyl (■) as the sole carbon source. Control cells were maintained in the presence of glucose (●) or were subjected to heat shock at 42°C (○) for different times. The growth of the shifted cells was determined by measuring the optical density at 600 nm during the experiment. The only cells that grew during the experiment were the control cells grown with glucose. Cell extracts from the cells shifted to the different conditions were used to determine the levels of GroEL by Western blotting after separation of the total proteins by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Quantitation of the GroEL bands after Western blotting was done by using an image analysis program (Scion Image).

the remaining time (up to 12 h). This prolonged synthesis of GroEL suggests that there is slow and continuous accumulation of abnormal proteins which most likely trigger a heat shock-like response. In the present case, the abnormal proteins were generated by production of ROS as a consequence of metabolism of the 2-chlorobiphenyl substrate. Figure 6A shows a similar situation with the ROS levels, since these levels were between six- and sevenfold higher in the cells shifted to 2-chlorobiphenyl.

Since simply changing substrates in the cell could also induce a stress response, as a control we shifted the cells from glucose to another carbon source, such as glycerol. Shortly after the shift (up to 4 h after the shift) there were increases in the polyP levels with all the substrates employed (Fig. 6B), probably reflecting initial adaptation of the cells to the medium change. However, at later times after the shift (4 to 12 h) there was a marked increase in the level of polyP when the cells were shifted to 2-chlorobiphenyl compared with the level in cells shifted to glucose or glycerol, in which the level of polyP slowly decreased to a level that was 6- to 10-fold lower than that in cells grown with 2-chlorobiphenyl. This clearly indicates that the effect seen with 2-chlorobiphenyl was not simply due to a change in the substrate.

DISCUSSION

Bacterial survival and stress resistance studies are important for many aspects of bioremediation and biocontrol. For adap-

tation to stress, cells must coordinate major changes in the rates of transcription, translation, and replication, as well as changes in the genes expressed. polyP could provide activated phosphates or could coordinate an adaptive response by binding metals and/or specific proteins. Here, we describe the massive accumulations of polyP that occur in PCB-degrading bacteria during the exponential phase of growth in the presence of biphenyl and some CBs. The accumulations of polyP under these conditions are remarkable because they are so large and are sustained compared to those in *E. coli*, which does not form visible polyP granules under common growth conditions (15). The levels that were more than 400 nmol/mg of protein in the exponential phase of cells growing in a medium containing biphenyl and in the stationary phase of glucose-grown cells were roughly 100-fold greater than those seen in *E. coli*. The amounts of polyP accumulated by *Pseudomonas* sp. strain B4 were even larger than the amount reported previously (150 nmol/mg) for another microorganism accumulating polyP granules, *Vibrio cholerae*, during the exponential phase of growth in a rich medium (20). It is likely that the polyP accumulations observed in *Pseudomonas* sp. strain B4 and *B. fungorum* LB400 contribute not only to the energy supply but also to enhanced survival and stress resistance in the presence of CBs.

Regarding the physiological function of polyP as a regulatory factor for gene expression in *E. coli*, it has been shown that mutant *E. coli* cells that are unable to accumulate polyP have

Vol. 70, 2004

polyP AND STRESS IN PCB-DEGRADING BACTERIA 3071

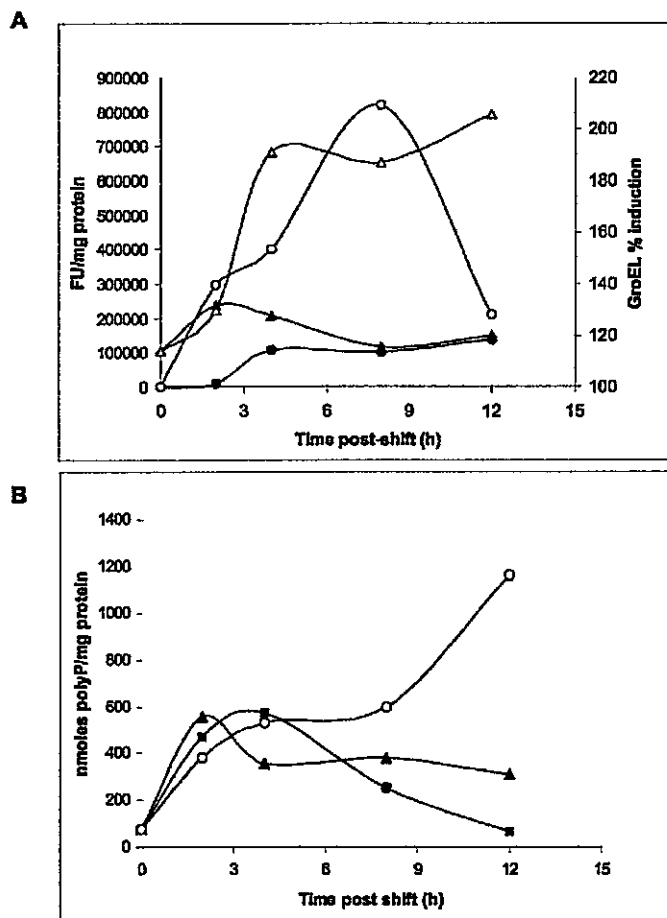


FIG. 6. Time course of production of ROS, GroEL, and polyP in *Pseudomonas* sp. strain B4. (A) Exponentially grown cells were shifted from a defined medium supplemented with glucose to a medium supplemented with 2-chlorobiphenyl (Δ and \circ) as the sole carbon source. Control cells were maintained in a medium containing glucose (\blacktriangle and \bullet). GroEL levels (\bullet and \circ) and ROS production (Δ and \blacktriangle) were measured as described in the text. (B) polyP content of cells shifted from a defined medium supplemented with glucose to a medium supplemented with 2-chlorobiphenyl (\circ), glycerol (Δ), or glucose (\blacksquare) as the sole carbon source. FU, fluorescence units.

reduced resistance to heat shock and to oxidative stress caused by H_2O_2 (32). On the other hand, organochlorine compounds, including PCBs, are known to increase oxidative stress in several biological systems (31). We found clear evidence of generation of oxidative stress in *Pseudomonas* sp. strain B4 cells grown in the presence of biphenyl and CBs. At present, we do not know how this oxidative stress correlates with the concomitant massive increase in polyP levels under these conditions. In *E. coli* it has been found that polyP controls *rpoS* and *recA* expression at the transcriptional level, thereby affecting the expression of many stress-inducible and stationary-phase-in-

ducible genes, including some genes related to oxidative stress and thermotolerance (32).

Our finding that there are increased levels of polyP and GroEL during growth in the presence of biphenyl and CBs not only indicates that the pollutant compounds used as carbon sources induce a chemical stress but is consistent with the behavior of mutant *E. coli* cells that are unable to accumulate polyP, which are less thermotolerant (15). In this regard, several stress shock proteins, including DnaK and GroEL, have been reported to be newly synthesized in *Pseudomonas* sp. strain DJ-12 when the organism is subjected to lethal stress

conditions, such as the presence of 4-chlorobiphenyl and biphenyl and heat shock (21). It has been found that in *Pseudomonas putida* the pollutant toluene not only serves as a carbon and energy source but also is a chemical inducer of stress (36). Also, the stress shock proteins, which contribute to the resistance to the cytotoxic effects of the phenoxy herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, were induced at different 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentrations in exponentially growing cultures of *Burkholderia* sp. strain YK-2 (5). Based on the similarities among polyP, ROS, and heat shock protein accumulations during several kinds of stress conditions, it might be assumed that CBs generate a stress response in bacteria when the organisms use these compounds as sole sources of carbon. Additionally, increased polyP synthesis requires enhanced phosphate uptake, a fact that should be taken into account when bioremediation of PCBs is undertaken.

Recently, it was shown that *Burkholderia cepacia* AM19 grown under low-pH conditions exhibited enhanced polyP accumulation, possibly representing a widespread microbial response to stressful low external pH values (19). polyP may therefore play an important role in the physiological adaptation of microorganisms during growth and development and in their responses to starvation and environmental stresses.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by projects ICM P-99-031-F and ICGEB, CRP/CHI00-04, contract 01/001. F.P.C. was the recipient of a DAAD Ph.D. scholarship.

We are very grateful to Arthur Kornberg for kindly providing *E. coli* strain NR 100, to Kenneth Timmis and Bernd Hofer for their kind gift of *Pseudomonas* sp. strain B4 and *B. fungorum* LB400, and to Ricardo B. Maccioni for providing the reagent DCFH-DA. We also thank Alejandro Munizaga for helpful collaboration during the electron microscopy sessions.

REFERENCES

- Alm, K., and A. Kornberg. 1990. Polyphosphate kinase from *Escherichia coli*. Purification and demonstration of a phosphoenzyme intermediate. *J. Biol. Chem.* 265:11734-11739.
- And-Richá, D., C. D. Fraley, C.-M. Tsang, and A. Kornberg. 1998. A novel assay reveals multiple pathways regulating stress-induced accumulations of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 180:1841-1847.
- Bonting, C. F. C., M. Higson, B. Goerin, and P. Cannon. 1993. The elemental composition dynamics of large polyphosphate granules in *Acetobacter* strain 210A. *Arch. Microbiol.* 159:423-434.
- Cardona, S. T., F. P. Chávez, and C. A. Jerez. 2002. The exopolyphosphatase gene from *Sulfolobus solfataricus*: characterization of the first gene found to be involved in polyphosphate metabolism in *Archaea*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:4812-4819.
- Cho, Y. S., S. H. Park, C. K. Kim, and K. H. Oh. 2000. Induction of stress shock proteins DnaK and GroEL by phenoxy herbicide 2,4-D in *Burkholderia* sp. YK-2 isolated from rice field. *Curr. Microbiol.* 41:33-38.
- Crooke, R., M. Akiyama, N. N. Rao, and A. Kornberg. 1994. Genetically altered levels of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 269:6290-6295.
- Crow, J. P. 1997. Dichlorodihydrofluorescein and dihydrothodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite *in vitro*: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. *Nitric Oxide Biol. Chem.* 1:145-157.
- Goldberg, J., H. Gonzalez, T. E. Jensen, and W. A. Corpe. 2001. Quantitative analysis of the elemental composition and the mass of bacterial polyphosphate bodies using STEM BDX. *Microbios* 106:177-185.
- Gonzalez, H., and T. E. Jensen. 1998. Nickel sequestering by polyphosphate bodies in *Staphylococcus aureus*. *Microbios* 93:179-185.
- He, Y. Y., M. Klisch, and D.-P. Häder. 2002. Adaptation of cyanobacteria to UV-B stress correlated with oxidative stress and oxidative damage. *Photochem. Photobiol.* 76:188-196.
- Hensgens, C. M. H., H. Santos, C. Zhang, W. H. Krulzinga, and T. A. Hansen. 1996. Electron-dense granules in *Desulfovibrio gigas* do not consist of inorganic triphosphate but of a glucose pentakis(diphosphate). *Eur. J. Biochem.* 242:327-331.
- Ichiropoulos, H., A. Gow, S. R. Thom, N. W. Kooy, J. A. Royall, and J. P. Crow. 1999. Detection of reactive nitrogen species using 2,7-dichlorodihydrofluorescein and dihydrothodamine 123. *Methods Enzymol.* 301:367-373.
- Kim, K. S., N. N. Rao, C. D. Fraley, and A. Kornberg. 2002. Inorganic polyphosphate is essential for long-term survival and virulence factors in *Shigella* and *Salmonella* spp. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99:7675-7680.
- Kimbrough, R. D. 1995. Polychlorinated biphenyls (PCBs) and human health: an update. *Crit. Rev. Toxicol.* 25:133-163.
- Kornberg, A., N. N. Rao, and D. And-Richá. 1999. Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Annu. Rev. Biochem.* 68:89-125.
- Kulsev, I., and T. Kolakovskaya. 2000. Polyphosphate and phosphate pump. *Annu. Rev. Microbiol.* 54:709-734.
- Landsort, H., C. Strümpf, A. M. Osborn, A. Bannasch, E. R. B. Moore, W.-R. Abraham, and N. T. Kereneth. 2000. Approach to analyze interactions of microorganisms, hydrophobic substrates, biofilms and to study initial events in microbiological processes. *Methods Enzymol.* 334:517-531.
- McGrath, J. W., and J. P. Quinn. 2000. Intracellular accumulation of polyphosphate by the yeast *Candida humicola* G-1 in response to acid pH. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:4068-4073.
- Mullen, A., J. P. Quinn, and J. W. McGrath. 2002. Balanced phosphate uptake and polyphosphate accumulation in *Burkholderia cepacia* grown under low pH conditions. *Microb. Ecol.* 44:69-77.
- Ogawa, N., C. M. Tsang, C. D. Fraley, and A. Kornberg. 2000. Inorganic polyphosphate in *Vibrio cholerae*: genetic, biochemical, and physiologic features. *J. Bacteriol.* 182:6687-6693.
- Park, S. H., K. H. Oh, and C. K. Kim. 2001. Adaptive and cross-protective responses of *Pseudomonas* sp. DJ-12 to several aromatics and other stress shocks. *Curr. Microbiol.* 43:176-181.
- Paper, D. H., and W. Reineke. 2000. Engineering bacteria for bioremediation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11:262-270.
- Ramírez, P., H. Toledo, N. Guillán, and C. A. Jerez. 2002. An exported rhodanese-like protein is induced during growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* in metal sulfides and different sulfur compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1837-1845.
- Rao, N. N., and A. Kornberg. 1996. Inorganic polyphosphate supports resistance and survival of stationary-phase *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 178:1394-1400.
- Rao, N. N., Lin, S., and A. Kornberg. 1998. Inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*: the phosphate regulon and the stringent response. *J. Bacteriol.* 180:2186-2193.
- Rashid, M. H., N. N. Rao, and A. Kornberg. 2000. Inorganic polyphosphate is required for motility of bacterial pathogens. *J. Bacteriol.* 182:225-227.
- Rashid, M. H., and A. Kornberg. 2000. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97:4885-4890.
- Rashid, M. H., K. Ramabough, I. Passador, D. G. Davies, A. N. Hemood, B. H. Iglewski, and A. Kornberg. 2000. Polyphosphate kinase is essential for biofilm development, quorum sensing, and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97:9636-9641.
- Robinson, N. A., J. E. Clark, and H. G. Wood. 1987. Polyphosphate kinase from *Propionibacterium shermanii*—demonstration that polyphosphates are primers and determination of the size of the synthesized polyphosphate. *J. Biol. Chem.* 262:5216-5222.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Schilderman, P. A., I. M. Masq, D. M. Pachon, T. M. de Kok, J. C. Klein-jans, and F. J. van Schooten. 2000. Induction of DNA adducts by several polychlorinated biphenyls. *Environ. Mol. Mutagen.* 36:79-86.
- Shiba, T., K. Tsutsumi, K. Uchige, and T. Noguchi. 2000. Inorganic polyphosphate and polyphosphate kinase: their novel biological functions and applications. *Biochemistry (Moscow)* 65:375-384.
- Tiedje, J. M., J. F. Quensen, J. Chee-Sanford, J. P. Schimel, and S. A. Boyd. 1993. Microbial reductive dechlorination of PCBs. *Biodegradation* 4:231-240.
- Timmis, K. N., R. J. Stefan, and R. Unterman. 1994. Designing microorganisms for the treatment of toxic wastes. *Annu. Rev. Microbiol.* 48:525-557.
- Tsutsumi, K., M. Manekata, and T. Shiba. 2000. Involvement of inorganic polyphosphate in expression of SOS genes. *Biochim. Biophys. Acta* 493:73-81.
- Varellone-Smith, P., and D. S. Herson. 1997. Toluene elicits a carbon starvation response in *Pseudomonas putida* mt-2 containing the TOL plasmid pWW0. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:1925-1932.

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

BIOTECHNOLOGY
ADVANCES

Biotechnology Advances 24 (2006) 309–320

www.elsevier.com/locate/biotechadv

Research review paper

Adaptive responses and cellular behaviour of biphenyl-degrading bacteria toward polychlorinated biphenyls

Francisco P. Chávez*, Felipe Gordillo, Carlos A. Jerez

Laboratory of Molecular Microbiology and Biotechnology and Millennium Institute for Advanced Studies in Cell Biology and Biotechnology (CBB), Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Chile, Santiago, Chile

Accepted 6 September 2005

Available online 18 January 2006

Abstract

Polychlorinated biphenyls (PCBs) are one of the most widely distributed classes of chlorinated chemicals in the environment. For cleanup of large areas of PCB-contaminated environments, bioremediation seems to be a promising approach. However, the multitude of PCB congeners, their low bioavailability and high toxicity are important factors that affect the cleanup progression. Elucidating how the PCB-degrading microorganisms involved in the process adapt to and deal with the stressing conditions caused by this class of compounds may help to improve the bioremediation process. Also specific physiological characteristics of biphenyl-utilizing bacteria involved in the degradation of PCBs may enhance their availability to these compounds and therefore contribute to a better microbial mineralization. This review will focus in the stress responses caused in aerobic biphenyl-utilizing bacteria by PCBs and its metabolic intermediates and will also analyze bacterial properties such as motility and chemotaxis, adherence to solid surfaces, biosurfactant production and biofilm development, all properties found to enhance bacteria pollutant interaction.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: PCB; Chemotaxis; Stress; Toxicity; Biosurfactant; Bioremediation; Biofilm; Polyphosphate

Contents

1. Introduction	310
2. Motility and chemotaxis	310
3. Biofilms and bacterial communities	312
4. PCBs toxicity and bacterial stress responses	313
5. Inorganic polyphosphate and stress responses	315
6. Concluding remarks	317
Acknowledgments	317
References	317

* Corresponding author. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Universidad de Chile, Santiago 1, Casilla 653, Santiago, Chile. Tel./fax: +56 2 9787377.

E-mail addresses: fehavez@odon.ciencias.uchile.cl (F.P. Chávez), cjerez@uchile.cl (C.A. Jerez).

0734-9750/\$ - see front matter © 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.biotechadv.2005.11.007

1. Introduction

In the past decades, a vast range of xenobiotic compounds have been found to be vulnerable to microbial mineralization. In most instances where bioremediation has been demonstrated, the catabolic pathway and its regulation have also been characterized.

Biphenyl is an aromatic compound used as a fungicide for citrus in agriculture and as a chemical feedstock for organic syntheses in industry. It has been used as a model compound to study bioavailability of soil-sorbed chemicals and polychlorinated biphenyls (PCBs) degradation studies (Wu et al., 2003; Pieper, 2005).

PCBs can be produced by the direct chlorination of biphenyl and up to 209 different congeners, containing from 1 to 10 chlorine substitutions, can thus be produced. Usual commercial PCB mixtures, marketed as Aroclor, Kaneclor, Clophen or Delor, generally contain 20–60 congeners, mostly tri-hexachlorinated derivatives. Because PCBs have been extensively used for a variety of industrial purposes, these recalcitrant compounds are recognized to be one of the most serious environmental pollutants worldwide (Kimbrough, 1995).

Biphenyl-utilizing bacteria are able to metabolize PCBs into chlorobenzoic acids by using biphenyl-catabolic enzymes via an oxidative route. Bacteria capable of degrading PCBs have been isolated from a range of sites and the pathways and encoding genes (*bph*) have been well studied (for a recent review see Furukawa, 2004). The genes encoding the degradative pathway are organized in an operon structure, *bphA1* to *bphA4*, *bphB*, *bphC* and *bphD*. Genes *bphA1* to *bphA4* encode a multicomponent dioxygenase enzyme complex that converts biphenyl to a dihydrodiol, which is transformed by the *bphB* gene product, a dihydrodiol dehydrogenase, to 2,3-dihydroxybiphenyl. Another dioxygenase enzyme, the *bphC* gene product, cleaves 2,3-dihydroxybiphenyl to yield a yellow colored meta-cleavage product, which is transformed subsequently to benzoate and a pentanoic acid derivative by the product of the *bphD* gene (Furukawa et al., 1990; Furukawa, 1994; Furukawa et al., 2004). *Burkholderia xenovorans* LB400 (formerly known as *B. cepacia* or *B. fungorum* LB400) and *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 have been the most extensively studied species with respect to the degradation of PCBs. These two microorganisms show distinct differences in the ranges of PCBs used as substrates. The range of PCB congeners oxidized by the LB400 enzymes is wider than that oxidized by KF707, which has a higher activity for several di-para-substituted PCBs (Bopp, 1986; Gibson

et al., 1993). Also, novel isolates such as *Pseudomonas* sp. B4 (Elbe River) have been studied and compared at molecular and physiological levels with the model PCB-degraders (Bartels et al., 1999; Chavez et al., 2004).

Studies with different biphenyl- and PCB-degrading bacteria, including both gram-negative and gram-positive strains, have created the biochemical and genetic bases for PCB bioremediation (Abramowicz, 1990; Bremner et al., 1994; Furukawa, 1994). Recent extensive reviews are available concerning the microbial advantages, limitations and economics of PCB bioremediation (Abraham et al., 2002; Ohtsubo et al., 2004; Pieper, 2005).

Responding to changes in the environment is a fundamental property of a living cell. It is particularly important for unicellular organisms, which interact directly with the changing microenvironment. Through evolution, microorganisms have developed useful mechanisms that help them to regulate their cellular function in response to changes in their environment (Storz and Hengge-Aronis, 2000).

The high toxicity of the many PCB congeners and their low bioavailability, which are significant factors that influence the bioremediation process in the contaminated environments, have not been extensively addressed. Therefore, the present article reviews some of the specific physiological characteristics of biphenyl-utilizing bacteria that enhance the bioavailability of PCBs. Cell adherence and surface hydrophobicity, biosurfactant production, motility and chemotaxis processes are bacterial abilities that reduce the distance between cells and solid substrates, and thus may enable biphenyl-utilizing bacteria to actively seek new substrates once they are depleted in a given contaminated area.

In this communication, we also review the stress response induced in microorganism grown in these pollutants with particular focus on the versatile possible role of inorganic polyphosphate as a protective agent against stress and as an essential factor in microbial mobility and biofilm formation.

2. Motility and chemotaxis

Mobility (swimming, swarming and twitching) serves the planktonic organism in seeking nutrients, avoiding toxins and finding a suitable surface for aggregation. Bacteria swim using flagella and move on surfaces by a gliding movement. They may respond directly to ambient conditions or, more frequently, to temporal changes in stimulus intensity. Bacterial chemotaxis, a movement under the influence of a chemical

gradient, either toward (positive chemotaxis) or away (negative chemotaxis) from the chemical gradient, helps bacteria to locate most advantageous conditions for their growth and survival. Although most of the chemotaxis studies have focused on hydrophilic substances that are not pollutants (Stock and Surette, 1996), in the last decade, chemotaxis toward different environmental pollutants has received more attention and many microorganisms with the chemotactic abilities toward different xenobiotic compounds have been isolated and characterized (review in Pandey and Jain, 2002; Parales and Harwood, 2002). It is clear that chemotaxis is a selective advantage to the bacteria for guiding them to sense and locate pollutants that are

present in the environment and, in many cases, the chemoattractant is a compound that serves as carbon and energy source, whereas a chemorepellent is toxic for the bacteria (Fig. 1).

Recently, it was reported that two motile biphenyl-degrading bacteria (*Pseudomonas putida* P106 and *Rhodococcus erythropolis* NY05) showed significant positive chemotactic response toward biphenyl (Wu et al., 2003). By using swarming motility and capillary assays, we found the same result toward biphenyl in *Pseudomonas* sp. B4, another highly motile biphenyl-utilizing bacterium (Gordillo et al., unpublished results). We also tested different chlorobiphenyls (CBs) and PCBs, and found these compounds to be

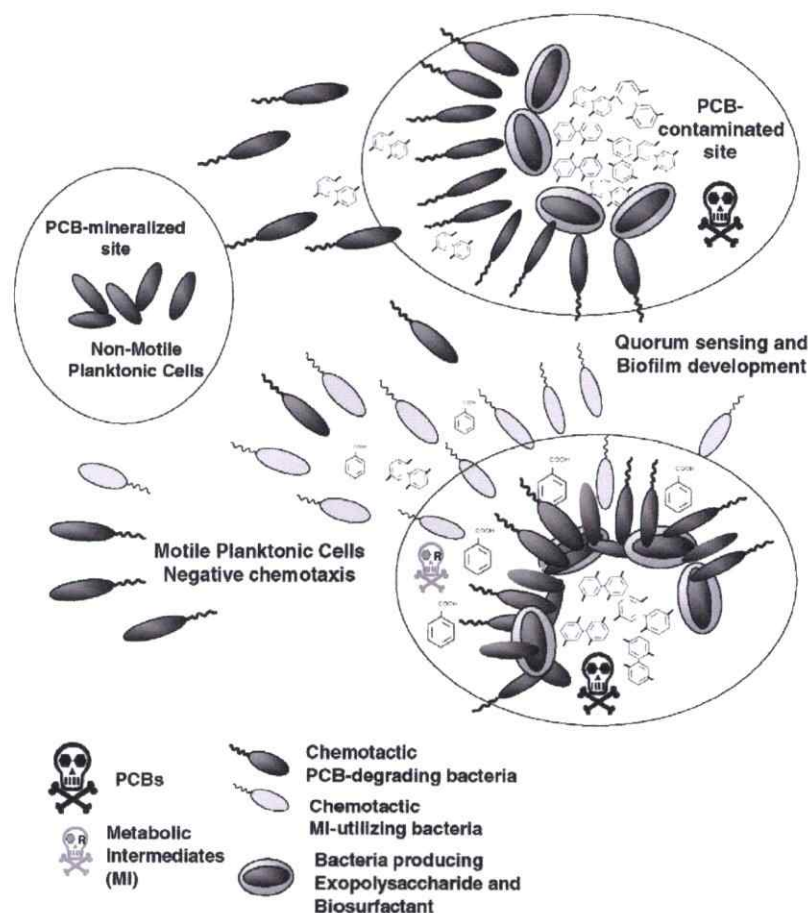


Fig. 1. Role of motility, chemotaxis and biofilm development in PCB-degradation by bacteria.

chemoattractants for *Pseudomonas* sp. B4 cells. The previous growth of cells in biphenyl did not induce chemoattraction toward biphenyl, suggesting that, unlike what has been described in the two naphthalene-degrading bacteria *Pseudomonas* sp. strain NCIB 9816-4 and *P. putida* G7 (Grimm and Harwood, 1997, 1999), chemotaxis of *Pseudomonas* sp. B4 toward biphenyl or CBs is not induced by previous growth of the cells in the substrate to be degraded.

Although *B. xenovorans* LB400 was described as a motile strain (Goris et al., 2004), recently, we and others have found this microorganism to be non-motile (Nielsen et al., 2000; Gordillo et al., unpublished results). Due to its lack of motility, chemotactic assays could not be performed with this bacterium. The loss of preexisting genes or gene activities during evolution is a major mechanism of ecological specialization and it is possible that laboratory domestication may have led to the loss of some functions required for chemotaxis in *B. xenovorans* LB400. Repeated passage of bacterial isolates in liquid culture can select for the loss of many "social" behaviours, including motility function (Velicer, 1999; Velicer et al., 1998, 2000, 2002). Also, exopolysaccharide and aerial structures were robust only in biofilm communities of recent natural isolates but not in laboratory strains, indicating that multicellularity has been lost during laboratory domestication (Zinser et al., 2003). In the future, it will be important to work with both genetically modified laboratory strains and recently isolated microbes, observing them in the context of structured communities to fully appreciate their developmental and degradation potentials.

Chlorobenzoates are intermediate metabolites that are formed and, in some bacteria accumulated, during degradation of PCBs and other chlorinated aromatic compounds (Abramowicz, 1990; Abraham et al., 2002). It was reported that 3- and 4-chlorobenzoate are attractants to *P. putida* PRS2000 previously grown on benzoate or 4-hydroxybenzoate (Harwood, 1989; Harwood et al., 1990). This fortuitous inducible chemoattraction to compounds that are not growth-supporting substrates for this particular strain is frequently found on self-transmissible catabolic plasmids and is possible that this chemotactic response facilitates the transfer of catabolic plasmids by bringing strains missing the appropriate catabolic genes to environments contaminated with chlorobenzoates (Harwood and Ormston, 1984).

How bacterial chemotaxis has the potential to influence the rate of degradation of the chemoattractants was recently demonstrated in the case of naphthalene. Chemotaxis by *P. putida* strain G7 was shown to enhance

the degradation of naphthalene diffusing not only from a naphthalene-saturated aqueous buffer contained in a capillary (Marx and Aitken, 2000) but also from a non-aqueous-phase liquid (NAPL) containing naphthalene (Law and Aitken, 2003). NAPLs are organic materials extracted from polluted sites that cause great challenges in the remediation of contaminated soils and sediments. Also, chemotaxis by wild-type *P. putida* G7 increased the rates of naphthalene desorption and degradation relative to rates observed with non-chemotactic and non-motile mutant strains (Law and Aitken, 2003).

Coordinated regulation of bacterial chemotaxis to many xenobiotic compounds and their respective mineralization and/or transformation indicates that this phenomenon might be an integral feature of degradation (Fig. 1). Understanding how microorganisms move and adjust themselves using environmental cues are integral to the complex structure and function of microbial communities. Although motility in response to biphenyl and CBs has been described, understanding the role of all components involved in PCBs chemotaxis is still lacking.

3. Biofilms and bacterial communities

In natural settings, microorganisms most commonly exist as multicellular communities exhibiting a high degree of structure (O'Toole et al., 2000). Microbes often construct and live within surface-associated multicellular communities known as biofilms. The exact structure and physiology of the biofilm all vary with the nature of its resident microbes and local environment (for recent reviews: Stanley and Lazazzera, 2004; Branda et al., 2005). Clay minerals performed an essential role in biofilm formation, possibly acting as a nutrient transfer from PCBs to a pleasant form to the bacteria, and it was suggested that clay minerals might perform a similar function in soil. De novo development of PCB-degrading microbial communities and the formation of combined biofilms consisting of bacteria and clay minerals were observed, in which the clay minerals were arranged around the bacteria to form hutch-like structures (Lunsdorf et al., 2000a,b).

The role of commensal relationships on the spatial structure of a surface-attached microbial consortium with the potential to interact metabolically in the biodegradation of PCB was studied (Nielsen et al., 2000). Highly motile *Pseudomonas* sp. B13(FR1) can metabolize the chlorobenzoate produced by *B. xenovorans* LB400 when grown on chlorobiphenyl and its spatial location close to the *B. xenovorans* LB400 microcolonies occurs only when the consortia is grown in chlor-

obiphenyl. Another important aspect in the spatial relationships in this microbial community is the motility of the secondary user involved in the structure development.

PCBs are poorly bioavailable because of its super-hydrophobic and very low solubility in water. Microorganisms that use hydrophobic substrates often produce biosurfactants that enlarge the surface area of the hydrophobic substrates and also their bioavailability by increasing the solubility or desorbing them from surfaces and coordinating attachment and detachment of microorganisms to and from the solid surfaces (Sim et al., 1997; Ron and Rosenberg, 2001). The influences in the PCBs biodegradation efficiency of different biosurfactants such as lipopeptides (Golyshin et al., 1999) or maltotriose esters (Ferrer et al., 2003) and chemically produced surfactants (Singer et al., 2000) have been studied in detail with contradictory results. Whereas in some cases, the addition of surfactants increases the degradation rates, in others the degradation rates decrease. Taking into account that addition of surfactants can produce changes in the community composition resulting in a decrease in the degrader population (Colores et al., 2000) and also reduce bacterial adhesion to surfaces (Stelmack et al., 1999), the net effect of a surfactant on biodegradation will depend on the right balance between the benefits that result from enhanced solubility of solid pollutants versus the reduction in direct adhesion of bacteria to those compounds (Billingsley et al., 1999).

Chemical surfactants have the advantage of low price but its toxicity to the cells reduces the rate of PCB biodegradation. The contrasting effects of the surfactant functions are a result of the poorly understood complexity of interactions between soil/sediment, pollutant, surfactant and microorganisms in different environments. Interestingly, genetically modified microorganism (GEM) with the capacity for degrading both, chemical surfactants and PCBs resulted in the simultaneous increase in PCB-degrader populations and contaminant bioavailability (Lajoie et al., 1992, 1997).

Because it is well known that the rates of degradation of the individual congeners can vary significantly depending on their initial concentrations and on the composition and complexity of the PCB mixtures (Bedard and Quensen, 1995), the aerobic PCB-degradation products formed by numerous bacterial strains (Massé et al., 1989; Bedard and Haberl, 1990; Maltseva et al., 1999; Drenzek et al., 2004), have established the basis for designing novel bacterial communities in ef-

fective PCB-biofilm reactors (Kastanek et al., 2004; Fava et al., 1996, 2000).

The importance to study PCB-biofilm communities in the degradation of these contaminants could be illustrated in the single-stage coupled anaerobic/aerobic reactor system for the degradation of Aroclor 1242. The close contact of aerobes and anaerobes within the granular biofilm facilitated the exchange of metabolites, thus improving the stability and system performance for the near-complete mineralization of Aroclor, and the sequential biodegradation process accomplished in the single reactor system (Tartakovsky et al., 2001). Another example was a stable PCB-dechlorinating consortium (2,3,4,5-CB enrichment culture) developed from the source of sediment that attacks only meta- and para-dechlorination of 2,3,4,5-CB and freshly added Aroclor 1260. The culture attacks only doubly flanked chlorines of PCBs, chlorines that are flanked on each side by another chlorine bound to a carbon atom, indicating a high degree of specificity for PCB dechlorination (Wu et al., 2000).

Microbial diversity changes in PCB-dechlorinating community in response to different culture conditions have been monitored in situ by molecular screening techniques based on 16S rRNA analysis (i.e. ARDRA: amplified ribosomal DNA restriction analysis, DGGE: denaturing gradient gel electrophoresis and TRFLP: terminal restriction fragment length polymorphism). All these procedures have provided an alternative approach to identify new species within a community and study the prevalence and survival of the PCB-degrader in the environment (Nogales et al., 2001; Watts et al., 2001). However, the exact modes in which PCBs are degraded by microbial communities under environmental conditions require further investigations.

4. PCBs toxicity and bacterial stress responses

Many studies discuss in more detail the extent of PCBs influence in different human diseases such as cancer, neurobehavioural effects, abnormal thyroid and immune function in children and low birth weight (Kimbrough, 1995; Kimbrough and Krouskas, 2003), and the overall toxicity of some PCB congeners in many soil and aquatic animals is well documented as a serious environmental problem (Seegal, 1996). Exposure to PCBs and related halogenated aromatic compounds induces significant behavioral dysfunctions in laboratory and contaminated resident animals, particularly following exposure during gestation and lactation.

Although many genetic, enzymological and biochemical analysis of PCB-degradative pathways have provided the basis for the bioremediation of PCBs, little is known about the adaptive responses of PCB-degrading bacteria during their growth in this kind of organochlorine compounds.

In some bacteria, it has been reported that stress proteins related with one stimulus can be induced during exposure to other stresses. For example, various heat shock proteins were synthesized when the cells were exposed to hydrogen peroxide (VanBogelen et al., 1987; Dukan and Touati, 1996), UV light (VanBogelen et al., 1987) or chemical agents including aromatic compounds (Ramos et al., 1995; Vercellone-Smith and Herson, 1997). Also, *Escherichia coli* cells in a nutrient-limited environment evolved into a state of enhanced resistance to various stress conditions, such as high osmotic pressure, high temperatures and oxidative stress (Matin, 1991).

The increase in the level of the stress protein GroEL observed when *Pseudomonas* sp. B4 was grown in the presence of biphenyl and different CBs (Chávez et al., 2004) is in agreement with the behaviour of *Pseudomonas* sp. DJ-12 where several stress-shock proteins, including DnaK and GroEL, were induced when subjected to stress conditions such as the presence of biphenyl and 4-chlorobiphenyl (Park et al., 2001), indicating that the pollutant compounds served both, as carbon sources and as chemical stressors. It was found that chlorinated derivatives were more toxic than the non-chlorinated compounds. In addition, the stress-shock proteins DnaK and GroEL, which contribute to the resistance of the cytotoxic effect of the phenoxyherbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), were induced at different 2,4-D concentrations in exponentially growing cultures of *Burkholderia* sp. YK-2 (Cho et al., 2000). In some bacteria, PCBs possibly exert their toxic effects by accumulating in the cytoplasmic membrane and disrupting its function. In this case, the degradation ability of biphenyl is important not only for energy acquisition but also for detoxification of biphenyl (Delawary et al., 2003).

Organochlorine compounds including PCBs are also well known as increasing oxidative stress in several biological systems (Voie and Fonnum, 2000; Coteur et al., 2001; Mariussen et al., 2002; Ruiz-Leal and George, 2004). Recent studies have implicated oxidative stress as a possible causative mechanism for the non-target toxicity of organochlorine compounds. In living microorganisms that have been subjected to environmental stresses, oxidative stress is caused by both overproduction of reactive oxygen species (ROS) and

depletion of antioxidants. Overproduction of ROS was found in *Pseudomonas* sp. B4 cells exponentially grown under different conditions by using the oxidative stress-sensitive probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) (Chávez et al., 2004). The exact source of this oxidative stress should be further investigated. However, it is possible that ROS might be generated by the oxidation reactions catalyzed by the biphenyl dioxygenases, which play a critical role in the bacterial aerobic degradation of aromatic compounds and contain mononuclear iron and Rieske-type (2Fe-2S) clusters. These enzymes catalyze the enantiospecific addition of oxygen (O_2) to substrates with pi-electron systems to form *cis*-dihydrodiols (Gibson and Subramanian, 1984; Furukawa et al., 2004). In the presence of benzene, by an uncoupling reaction, 40% to 50% of the O_2 consumed by NDO benzene was reduced to hydrogen peroxide, which spontaneously may decompose by forming strong oxidizing agent such as hydroxyl radicals via Fenton-type reaction (Lee, 1999).

Moreover, not only biphenyl and its chloroderivates, but also its metabolic intermediates such as dihydrodiols, dihydroxybiphenyls and catechols, were found to be highly toxic for bacteria. By using recombinant *E. coli* strains expressing different subsets of *B. xenovorans* LB400 *bph* genes as a model system, the concomitant accumulation of the two firsts CBs metabolic intermediates affected the cell viability much more than CBs themselves. Cell viability of *B. xenovorans* LB400 and of *E. coli* when exposed directly to 2,3-dihydroxybiphenyl also decreased considerably (Cámara et al., 2004). Also it has been reported that catechols, like dihydroxybiphenyls, in the presence of molecular oxygen and combined with heavy metals (e.g. Cu^{2+} , Fe^{3+}) can also cause oxidative DNA damage (Schweigert et al., 2001). From microorganisms to mammals, the wide chemical reactions and modes of action of catechols may be responsible for their toxicity.

Recently, Raman confocal microscopy was used to discriminate between cultures of *B. xenovorans* LB400 exposed to different pollutants (Singer et al., 2005). This novel bioassay could be used as a tool to study bioavailability and toxicity in PCB contaminated environments.

The increase in the levels of the general stress proteins and oxidative stress observed in many biphenyl-utilizing bacteria indicate that these bacteria adjust their physiology with a stress response when confronted with compounds that supply both as carbon and energy sources and, at the same time, as chemical stressors. This cross-protection against various

stresses is thought to be an adaptive response by bacteria in surviving increasingly complex natural environments.

5. Inorganic polyphosphate and stress responses

Inorganic polyphosphate (polyP) is a polymer of tens or hundreds of orthophosphate (Pi) residues linked by high-energy phosphoanhydride bonds. It has been detected in many bacteria and fungi and in smaller amounts in every microbe, plant and animal so far examined (Kornberg et al., 1999; Kulaev and Kulakovskaya, 2000). Since polyP contains phosphorus, one of the most important vital elements present in all major subunits of life: amino acids, nucleotides, sugars and phospholipids recently has been quite obviously shown to be a “molecule for many reasons” of living cells (Kornberg, 1999).

The principal enzyme that synthesizes polyP enzymes involved in the metabolism of polyP in bacteria are the polyphosphate kinase 1 (PPK1) that catalyzes the reversible conversion of the terminal phosphate of ATP into polyP and the exopolyphosphatase (PPX) that processively hydrolyzes the terminal residues of polyP to liberate Pi (Kornberg et al., 1999). Both PPK1 and PPX are highly conserved in many bacterial species, including some of the major pathogens (Tzeng and Kornberg, 1998; Kornberg et al., 1999; Cardona et al., 2002).

The accumulation of polyP in bacteria is a natural phenomenon and finely regulated process that depends on phosphate and energy sources availability as well as in the presence of K and Mg ions (Nesmeyanova, 2000). In essence, polyP accumulation responds to different external factors (e.g. nitrogen or sulfur deficiency or unfavorable pH conditions) whether they are components of the nutrient medium, or its physical and chemical conditions (Harold, 1966; Rao and Kornberg, 1999; Nesmeyanova, 2000).

The accumulation of polyP in bacteria is a tightly regulated process and functions as a phosphate donor, energy source and chelator for divalent cations. In addition, polyP can be involved in the functioning of global regulatory systems. The involvement of polyP in the regulation of both, enzyme activities and expression of large groups of genes is the basis of survival for different bacteria, including pathogens, under stress conditions and adaptation to the stationary-growth phase (Kornberg et al., 1999; Kulaev and Kulakovskaya, 2000). Mutant bacterial cells lacking polyP survive poorly during growth in the stationary phase and

are less resistant to heat, oxidants, osmotic challenge, antibiotics and UV (Crooke et al., 1994; Kim et al., 2002; Rao and Kornberg, 1996; Rao et al., 1998; Tsutsumi et al., 2000).

PolyP accumulation in response to nutrient deprivation has also been reported in the genus *Pseudomonas* and the PCB-degrading bacteria *Pseudomonas* sp. B4 and *B. xenovorans* LB400 accumulated a great amount of large electron-dense granules when grown in biphenyl and CBs in all stages of growth and in glucose only when the cells entered the stationary phase (Chávez et al., 2004). By means of energy dispersive X-ray (EDAX) analysis and electron energy loss spectroscopy (EELS) with an integrated energy-filtered transmission electron microscope (EFTEM), it was demonstrated that these granules were mainly composed by phosphate and most likely polyP (Fig. 2C–D; Chávez et al., 2004). Also, when exponentially grown cells of *Pseudomonas* sp. B4 were shifted from a medium with glucose to the same medium but containing biphenyls and different CBs, a great increase in polyP accumulation in the form of electron-dense granules was observed (Fig. 2A–B; Chávez et al., 2004).

Interestingly, PPK is essential in *P. aeruginosa* not only for various forms of motility (Rashid and Kornberg, 2000; Rashid et al., 2000a) but also for biofilm development, quorum sensing, production of virulence factors and for virulence in the burned-mouse pathogenesis model (Rashid et al., 2000b).

It has been shown that *E. coli* cells overproducing the yeast exopolyphosphatase (PPX1; Wurst et al., 1995) have the same behaviour of a mutant whose polyphosphate kinase gene is disrupted (Shiba et al., 2000). By using broad-range vectors (Lefebvre and Valvano, 2002), the recombinant yeast exopolyphosphatase (PPX1) was overproduced in *Pseudomonas* sp. B4 to remove as much of cellular polyP content as possible (Chávez et al., unpublished results). Examining the polyP-deficient phenotype by using this approach has some advantages over the PPK knockout strategy because it can be used in several strains with good reproducibility depending on the broad-range vector employed. Also it is possible to remove short-chain polyP that remain unaffected in a *ppk* mutant and avoid the appearance of the small-colony-size variant by using a fresh transformant carrying the PPX1 gene on the plasmids (Shiba et al., 2000).

Among other morphological and physiological modifications, it was found that polyP-minus *Pseudomonas* sp. B4 cells were non-motile in swarming motility plates and by examination under light microscopy (Fig. 2E–H; Chávez et al., unpublished results). Al-

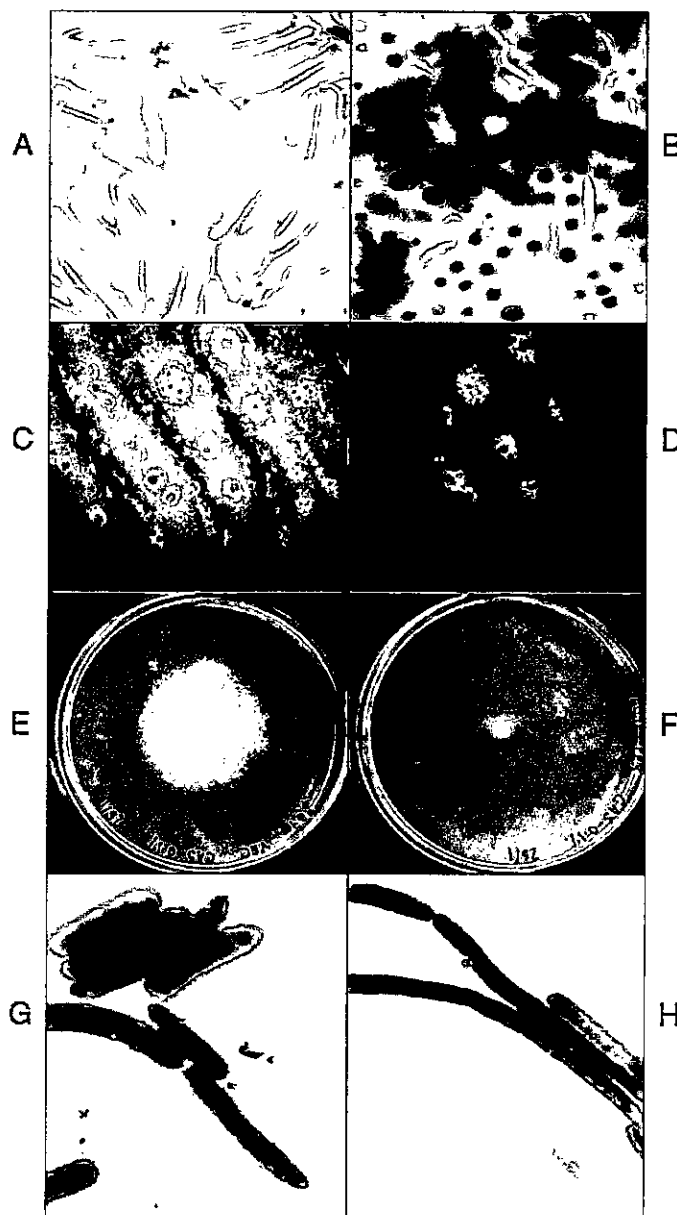


Fig. 2. PolyP accumulation in PCB-degrading bacteria. Presence of polyP granules in *Pseudomonas* sp. B4 grown in glucose (A) and 4Cl-biphenyl (B) as the sole carbon sources. Electron micrograph negative image of *Pseudomonas* sp. B4 cells with electron dense granules (C) and phosphate distribution image (green, D), obtained by electron spectroscopy imaging (ESI). Swarming motility assay plates of wt *Pseudomonas* sp. B4 cells (E; electron microscopy morphology detail in G) and *Pseudomonas* sp. B4 cells overexpressing yeast exopolyphosphatase (F; electron microscopy morphology in H). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

though the exact roles of polyP in the adaptive response of biphenyl-utilizing bacteria to PCBs remain to be elucidated, understanding polyP metabolism might be important to improve the interaction of the microorganism with their toxic substrates and therefore the efficiency of bioremediation processes.

Polyphosphate accumulating organisms also play a critical role in several environmental and biotechnological problems such as heavy metals detoxification (Alvarez and Jerez, 2004; Renninger et al., 2004) and biological phosphorus removal, a treatment process that is widely used to remove excess phosphate in wastewater (Keasling et al., 2000; McGrath and Quim, 2003; Seviour et al., 2003). Taking into account that *Pseudomonas* sp. B4 and *B. xenovorans* LB400 accumulated high levels of polyP (Chávez et al., 2004) and that PCBs and heavy-metals were found simultaneously in contaminated environments (Shin et al., 2004; Gillan et al., 2005), it should be interesting to find out if these PAOs could be used not only in bioremediation of PCBs but also in heavy metals and phosphorus removal in polluted sites.

6. Concluding remarks

Recently, a draft genome sequence of the model PCB-degrader *B. xenovorans* LB400 was generated by The Joint Genome Institute (JGI/ORNL annotation December 2003), suggesting a total of 9851 open reading frames (ORFs) in approximately 9.7 Mbp of genome size. By using microarray analysis, all the cellular processes and physiology adjustments relevant for PCBs degradation were studied in a genomic context (Denef et al., 2004). The use of this functional genomic approach as well as other proteomic and metagenomic studies will help to elucidate all the cellular processes relevant for PCB-degradation not only of bacterial strains in laboratory conditions but also of bacterial populations in their natural environments. These results may allow the development of strategies to remove the bottlenecks that limit efficient PCB-degradation and facilitate the construction of microorganism or bacterial communities with ideal PCB-degrading abilities.

Now is generally accepted that the ideal PCB-degrader should be a highly tolerant microorganism that not only constitutively expresses the degradation enzymes with wide substrate specificities without accumulating toxic intermediates, but also should be a microbe producing surfactants that solubilize PCBs, and that survives and propagates in the pollutant environment until the end of the clean-up process. Here we also reviewed other cellular characteristics that may

favor PCB bioavailability such as motility, attachment to surfaces and biofilm formation capabilities. These abilities may enable cells to actively seek new substrates once they are depleted in the contaminated area. Therefore, knowledge of all these cellular processes is essential to predict the survival and activity of bacteria exposed to such adverse conditions and to select for PCB-degraders with superior tolerances to these pollutants.

Acknowledgments

This research was supported by project ICM P-99-031-F. F.P.Ch. was the recipient of a DAAD PhD scholarship and F.G. was the recipient of a CONICYT doctoral fellowship.

References

- Abraham WR, Nogales B, Golyshin PN, Pieper DH, Timmis KN. Polychlorinated biphenyl-degrading microbial communities in soils and sediments. *Curr Opin Microbiol* 2002;5:246–53.
- Abramowicz DA. Aerobic and anaerobic biodegradation of PCBs: a review. *Crit Rev Biotechnol* 1990;10:241–51.
- Alvarez S, Jerez CA. Copper ions stimulate polyphosphate degradation and phosphate efflux in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl Environ Microbiol* 2004;70:5177–82.
- Bartels F, Backhaus S, Moore ERB, Timmis KN, Hofer B. Occurrence and expression of glutathione-S-transferase-encoding *bphK* genes in *Burkholderia* sp. strain LB400 and other biphenyl-utilizing bacteria. *Microbiology* 1999;145:2821–34.
- Bedard DL, Haberl ML. Influence of chlorine substitution pattern on the degradation of polychlorinated biphenyls by eight bacterial strains. *Microb Ecol* 1990;20:87–102.
- Bedard DL, Quensen III JF. Microbial reductive dechlorination of polychlorinated biphenyls. In: Young Y, Cerniglia CE, editors. *Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals*. New York: Wiley-Liss, Inc.; 1995. p. 127–216.
- Billingsley KA, Backus SM, Ward OP. Effect of surfactant solubilization on biodegradation of polychlorinated biphenyl congeners by *Pseudomonas* LB400. *Appl Microbiol Biotechnol* 1999; 52:255–60.
- Bopp LH. Degradation of highly chlorinated PCBs by *Pseudomonas* strain LB400. *J Ind Microbiol* 1986;1:23–9.
- Brandt SS, Vik S, Friedman L, Kolter R. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol* 2005;13:20–6.
- Bremner V, Arensdorf JJ, Focht DD. Genetic construction of PCB degraders. *Biodegradation* 1994;5:359–77.
- Cámara B, Herrera C, Gonzalez M, Couve E, Hofer B, Seeger M. From PCBs to highly toxic metabolites by the biphenyl pathway. *Environ Microbiol* 2004;6:842–50.
- Cardona ST, Chavez FP, Jerez CA. The exopolyphosphatase gene from *Sulfolobus solfataricus*: characterization of the first gene found to be involved in polyphosphate metabolism in Archaea. *Appl Environ Microbiol* 2002;68:4812–9.
- Chávez FP, Lünsdorf H, Jerez CA. Growth of polychlorinated-biphenyl-degrading bacteria in the presence of biphenyl and chlorobiphenyls generates oxidative stress and massive accumulation of

- inorganic polyphosphate. *Appl Environ Microbiol* 2004;70:3064–72.
- Cho YS, Park SH, Kim CK, Oh KH. Induction of stress shock proteins DnaK and GroEL by phenoxyherbicide 2,4-D in *Burkholderia* sp YK-2 isolated from rice field. *Curr Microbiol* 2000;41:33–8.
- Colares GM, Macur RE, Ward DM, Inskip WP. Molecular analysis of surfactant-driven microbial population shifts in hydrocarbon-contaminated soil. *Appl Environ Microbiol* 2000;66:2959–64.
- Coteur G, Danis B, Fowler SW, Teyssie IL, Dubois P, Warnau M. Effects of PCBs on reactive oxygen species (ROS) production by the immune cells of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata). *Mar Pollut Bull* 2001;42:667–72.
- Crooke E, Akiyama M, Rao NN, Kornberg A. Genetically altered levels of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 1994;269:6290–5.
- Delawary M, Ohtsubo Y, Ohta A. The dual functions of biphenyl-degrading ability of *Pseudomonas* sp KKS102: energy acquisition and substrate detoxification. *Biosci Biotechnol Biochem* 2003;67:1970–5.
- Denef VJ, Park J, Tsai TV, Rouillard JM, Zhang H, Wibbenmeyer JA, et al. Biphenyl and benzoate metabolism in a genomic context: outlining genome-wide metabolic networks in *Burkholderia xenovorans* LB400. *Appl Environ Microbiol* 2004;70:4961–70.
- Drenzek NJ, Eglinton TI, Wirsen CO, Sturchio NC, Heraty LJ, Sowers KR, et al. Invariant chlorine isotopic signatures during microbial PCB reductive dechlorination. *Environ Pollut Microbiol* 2004;128:445–8.
- Dukan S, Touati D. Hypochlorous acid stress in *Escherichia coli*: resistance, DNA damage, and comparison with hydrogen peroxide stress. *J Bacteriol* 1996;178:6145–50.
- Fava F, Di Gioia D, Marchetti L, Quattroni G. Aerobic dechlorination of low-chlorinated biphenyls by bacterial biofilms in packed-bed batch bioreactors. *Appl Microbiol Biotechnol* 1996;45:562–8.
- Fava F, Di Gioia D, Marchetti L. Role of the reactor configuration in the biological detoxification of a dump site-polychlorobiphenyl-contaminated soil in lab-scale slurry phase conditions. *Appl Microbiol Biotechnol* 2000;53:243–8.
- Ferrer M, Golyshin P, Timmis KN. Novel maltotriose esters enhance biodegradation of Aroclor 1242 by *Burkholderia cepacia* LB400. *World J Microbiol Biotechnol* 2003;19:637–43.
- Furukawa K. Molecular genetics and evolutionary relationship of PCB-degrading bacteria. *Biodegradation* 1994;5:289–300.
- Furukawa K, Hayase N, Taira K. Biphenyl/polychlorinated biphenyl catabolic gene (*bph* operon): organization, function, and molecular relationship in various pseudomonads. In: Silver S, Chakrabarty AM, Iglewski B, Kaplan S, editors. *Pseudomonas: biotransformations, pathogenesis, and evolving biotechnology*. Washington, D.C.: American Society for Microbiology; 1990. p. 111–20.
- Furukawa K, Suenaga H, Goto M. Biphenyl dioxygenases: functional versatility and directed evolution. *J Bacteriol* 2004;186:5189–96.
- Gibson DT, Subramanian V. Microbial degradation of aromatic hydrocarbons. In: Gibson DT, editor. *Microbial degradation of organic compounds*. New York, NY: Marcel Dekker, Inc.; 1984. p. 181–251.
- Gibson DT, Cruden DL, Haddock JD, Zylstra GJ, Brand JM. Oxidation of polychlorinated biphenyls by *Pseudomonas* sp strain LB400 and *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707. *J Bacteriol* 1993;175:4561–4.
- Gillan DC, Danis B, Pernet F, Joly G, Dubois P. Structure of sediment-associated microbial communities along a heavy-metal contamination gradient in the marine environment. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:679–90.
- Golyshin PN, Fredrickson HL, Giuliano L, Rothmel R, Timmis KN, Yakimov MM. Effect of novel biosurfactants on biodegradation of polychlorinated biphenyls by pure and mixed bacterial cultures. *Microbiologica* 1999;22:257–67.
- Goris J, De Vos P, Cahallero-Mellado J, Park J, Falsen E, Quensen III JE, et al. Classification of the biphenyl- and polychlorinated biphenyl-degrading strain LB400T and relatives as *Burkholderia xenovorans* sp nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004;54:1677–81.
- Grimm AC, Harwood CS. Chemotaxis of *Pseudomonas* sp to the polycyclic aromatic hydrocarbon, naphthalene. *Appl Environ Microbiol* 1997;63:4111–5.
- Grimm AC, Harwood CS. NahY, a catabolic plasmid-encoded receptor required for chemotaxis of *Pseudomonas putida* to the aromatic hydrocarbon naphthalene. *J Bacteriol* 1999;181:3310–6.
- Harold FM. Inorganic polyphosphates in biology: structure, metabolism, and function. *Bacteriol Rev* 1966;30:772–94.
- Harwood CS. A methyl-accepting protein is involved in benzoate taxis in *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* 1989;171:4603–8.
- Harwood CS, Ormston LN. TOL plasmid can prevent induction of chemotactic responses to aromatic acids. *J Bacteriol* 1984;160:797–800.
- Harwood CS, Parales RE, Dispensa M. Chemotaxis of *Pseudomonas putida* toward chlorinated benzoates. *Appl Environ Microbiol* 1990;56:1501–3.
- Kastanek P, Kastanek P, Demnerova K, Maletkova Y. Decontamination of wastewater contaminated by polychlorinated biphenyls (PCBs). *Water Sci Technol* 2004;50:131–8.
- Keasling JD, Van Dien SJ, Trelstad P, Renninger N, McMahon K. Application of polyphosphate metabolism to environmental and biotechnological problems. *Biochemistry (Moscow)* 2000;65:324–31.
- Kim KS, Rao NN, Fraley CD, Kornberg A. Inorganic polyphosphate is essential for long-term survival and virulence factors in *Shigella* and *Salmonella* sp. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:7675–80.
- Kimbrough RD. Polychlorinated biphenyls (PCBs) and human health: an update. *Crit Rev Toxicol* 1995;25:133–63.
- Kimbrough RD, Krouskas CA. Human exposure to polychlorinated biphenyls and health effects: a critical synopsis. *Toxicol Rev* 2003;22:217–33.
- Kornberg A. Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Prog Mol Subcell Biol* 1999;23:1–18.
- Kornberg A, Rao NN, Aull-Riche D. Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Annu Rev Biochem* 1999;68:89–125.
- Kulaev I, Kulakovskaya T. Polyphosphate and phosphate pump. *Annu Rev Microbiol* 2000;54:709–34.
- Lajoie CA, Chen SY, Oh KC, Strom PF. Development and use of field application vectors to express nonadaptive foreign genes in competitive environments. *Appl Environ Microbiol* 1992;58:655–63.
- Lajoie CA, Layton AC, Easter JP, Menn FM, Saylor CS. Degradation of nonionic surfactants and polychlorinated biphenyls by recombinant field application vectors. *J Ind Microbiol Biotechnol* 1997;19:252–62.
- Law AM, Aitken MD. Bacterial chemotaxis to naphthalene desorbing from a nonaqueous liquid. *Appl Environ Microbiol* 2003;69:5968–73.

- Lee K. Benzene-induced uncoupling of naphthalene dioxygenase activity and enzyme inactivation by production of hydrogen peroxide. *J Bacteriol* 1999;181:2719–25.
- Lefebvre MD, Valvano MA. Construction and evaluation of plasmid vectors optimized for constitutive and regulated gene expression in *Burkholderia cepacia* complex isolates. *Appl Environ Microbiol* 2002;68:5956–64.
- Lunsdorf H, Erb RW, Abraham WR, Timmis KN. 'Clay hatches': a novel interaction between bacteria and clay minerals. *Environ Microbiol* 2000;2:161–8.
- Lünsdorf H, Strümpf C, Osborn AM, Bemisar A, Moore ERB, Abraham WR, et al. Approach to analyze interactions of microorganisms, hydrophobic substrates, biofilms and to study initial events in microbiogeological processes. *Methods Enzymol* 2000;336:317–31.
- Maltseva OV, Tsoi TV, Quensen III JF, Fukuda M, Tiedje JM. Degradation of anaerobic reductive dechlorination products of Aroclor 1242 by four aerobic bacteria. *Biodegradation* 1999;10:363–71.
- Mariussen B, Myhre O, Reistad T, Fonnaum F. The polychlorinated biphenyl mixture Aroclor 1254 induces death of rat cerebellar granule cells: the involvement of the *N*-methyl-D-aspartate receptor and reactive oxygen species. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002;179:137–44.
- Marx RB, Aitken MD. Bacterial chemotaxis enhances naphthalene degradation in a heterogeneous aqueous system. *Environ Sci Technol* 2000;34:3379–83.
- Massé RF, Messier F, Ayotte C, Lévesque M-F, Sylvestre M. A comprehensive gas chromatographic/mass spectrometric analysis of 4-chlorobiphenyl bacterial degradation products. *Biomed Environ Mass Spectrom* 1989;18:27–47.
- Matin A. The molecular basis of carbon-starvation-induced general resistance in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 1991;5:3–10.
- McGrath JW, Quinn JP. Microbial phosphate removal and polyphosphate production from wastewaters. *Adv Appl Microbiol* 2003;52:75–100.
- Nesmeyanova MA. Polyphosphates and enzymes of polyphosphate metabolism in *Escherichia coli*. *Biochemistry (Moscow)* 2000;65:309–14.
- Nielsen AT, Tolker-Nielsen T, Barken KB, Molin S. Role of commensal relationships on the spatial structure of a surface-attached microbial consortium. *Environ Microbiol* 2000;2:59–68.
- Nogales B, Moore ERB, Llobet-Brossa E, Rossello-Mora R, Amann KN, Timmis KN. Combined use of 16S ribosomal DNA and 16S rRNA to study the bacterial community of polychlorinated biphenyl-polluted soil. *Appl Environ Microbiol* 2001;67:1874–84.
- Ohtsubo Y, Kudo T, Tsuda M, Nagata Y. Strategies for bioremediation of polychlorinated biphenyls. *Appl Microbiol Biotechnol* 2004;65:250–8.
- O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 2000;54:49–79.
- Pandey G, Jain RK. Bacterial chemotaxis toward environmental pollutants: role in bioremediation. *Appl Environ Microbiol* 2002;68:5789–95.
- Parales RE, Harwood CS. Bacterial chemotaxis to pollutants and plant-derived aromatic molecules. *Curr Opin Microbiol* 2002;5:266–73.
- Park SH, Oh KH, Kim CK. Adaptive and cross-protective responses of *Pseudomonas* sp. DJ-12 to several aromatics and other stress shocks. *Curr Microbiol* 2001;43:176–81.
- Pieper DH. Aerobic degradation of polychlorinated biphenyls. *Appl Microbiol Biotechnol* 2005;67:170–91.
- Ramos JL, Duque E, Huerfias MJ, Haidour A. Isolation and expression of catabolic potential of a *Pseudomonas putida* strain able to grow in presence of high concentrations of aromatic hydrocarbons. *J Bacteriol* 1995;177:3911–6.
- Rao NN, Kornberg A. Inorganic polyphosphate supports resistance and survival of stationary-phase *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1996;178:1394–400.
- Rao NN, Kornberg A. Inorganic polyphosphate regulates responses of *Escherichia coli* to nutritional stringencies, environmental stresses and survival in the stationary phase. *Prog Mol Subcell Biol* 1999;23:183–95.
- Rao NN, Liu S, Kornberg A. Inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*: the phosphate regulon and the stringent response. *J Bacteriol* 1998;180:2186–93.
- Rashid MH, Kornberg A. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:4885–90.
- Rashid MH, Rao NN, Kornberg A. Inorganic polyphosphate is required for motility of bacterial pathogens. *J Bacteriol* 2000;182:225–7.
- Rashid MH, Rumbaugh K, Passador L, Davies DG, Hamood AN, Iglewski BH, et al. Polyphosphate kinase is essential for biofilm development, quorum sensing, and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:9636–41.
- Renninger N, Knopp R, Nitsche H, Clark DS, Keasling JD. Uranyl precipitation by *Pseudomonas aeruginosa* via controlled polyphosphate metabolism. *Appl Environ Microbiol* 2004;70:7404–12.
- Ron EZ, Rosenberg E. Natural roles of biosurfactants. *Environ Microbiol* 2001;3:229–36.
- Ruiz-Leal M, George S. An in vitro procedure for evaluation of early stage oxidative stress in an established fish cell line applied to investigation of PFAH and pesticide toxicity. *Mar Environ Res* 2004;58:631–5.
- Schweigert N, Zehnder AJB, Eggen RIL. Chemical properties of catechols and their molecular modes of toxic action in cells, from microorganisms to mammals. *Environ Microbiol* 2001;3:81–91.
- Seegal RF. Epidemiological and laboratory evidence of PCB-induced neurotoxicity. *Crit Rev Toxicol* 1996;26:709–37.
- Seviour RI, Mino T, Onuki M. The microbiology of biological phosphorus removal in activated sludge systems. *FEMS Microbiol Rev* 2003;27:99–127.
- Shiba T, Tsutsumi K, Ishige K, Noguchi T. Inorganic polyphosphate and polyphosphate kinase: their novel biological functions and applications. *Biochemistry (Moscow)* 2000;65:315–23.
- Shin M, Barrington SE, Marshall WD, Kim JW. Simultaneous soil Cd and PCB decontamination using a surfactant/ligand solution. *J Environ Sci Health A. Tox Hazard Subst Environ Eng* 2004;39:2783–98.
- Sim L, Ward OP, Li Z. Production and characterization of a biosurfactant isolated from *Pseudomonas aeruginosa* UW-1. *J Ind Microbiol Biotechnol* 1997;19:232–8.
- Singer AC, Gilbert ES, Luepromchai E, Crowley DB. Bioremediation of polychlorinated biphenyl-contaminated soil using carvone and surfactant-grown bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 2000;54:838–43.
- Singer AC, Huang WE, Helm J, Thompson IP. Insight into pollutant bioavailability and toxicity using Raman confocal microscopy. *J Microbiol Methods* 2005;60:417–22.
- Stanley NR, Lazzizzera BA. Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. *Mol Microbiol* 2004;52:917–24.

- Stelmack PL, Gray MR, Pickard MA. Bacterial adhesion to soil contaminants in the presence of surfactants. *Appl Environ Microbiol* 1999;65:163–8.
- Stock JB, Surette MG. Chemotaxis. In: Neidhardt FC, Curtiss III R, Ingraham JL, Lin ECC, Low KB, Magasanik B, Reznikoff WS, Riley M, Schaechter M, Umberger HE, editors. *Escherichia coli and Salmonella*, 2nd ed. vol. 1. Washington, D.C.: ASM Press; 1996. p. 1103–29.
- Storz GT, Hengge-Aronis R. 2000. Bacterial stress responses. Washington, DC: ASM Press; 2000. p. 1–502.
- Tartakovsky B, Michott A, Cadieux JC, Hawari J, Guiot SR. Degradation of Aroclor 1242 in a single-stage coupled anaerobic/aerobic bioreactor. *Water Res* 2001;35:4323–30.
- Tsutsumi K, Munekata M, Shiba T. Involvement of inorganic polyphosphate in expression of SOS genes. *Biochim Biophys Acta* 2000;493:73–81.
- Tzeng CM, Kornberg A. Polyphosphate kinase is highly conserved in many bacterial pathogens. *Mol Microbiol* 1998;29:381–2.
- VanBogelen RA, Kelley PM, Neidhardt FC. Differential induction of heat shock, SOS, and oxidation stress regulons and accumulation of nucleoides in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1987; 169:26–32.
- Velicer GJ. Pleiotropic effects of adaptation to a single carbon source for growth on alternative substrates. *Appl Environ Microbiol* 1999;65:264–9.
- Velicer GJ, Kroos L, Lenski RE. Loss of social behaviours by *Myxococcus xanthus* during evolution in an unstructured habitat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:12376–80.
- Velicer GJ, Kroos L, Lenski RE. Developmental cheating in the social bacterium *Myxococcus xanthus*. *Nature* 2000;404:598–601.
- Velicer GJ, Lenski RE, Kroos L. Rescue of social motility lost during evolution of *Myxococcus xanthus* in an asocial environment. *J Bacteriol* 2002;184:2719–27.
- Vercellone-Smith P, Herson DS. Toluene elicits a carbon starvation response in *Pseudomonas putida* mt-2 containing the TOL plasmid pWWO. *Appl Environ Microbiol* 1997;63:1925–32.
- Vois OA, Fonnum F. Effect of polychlorinated biphenyls on production of reactive oxygen species (ROS) in rat synaptosomes. *Arch Toxicol* 2000;73:588–93.
- Watts JE, Wu Q, Schreier SB, May HD, Sowers KR. Comparative analysis of polychlorinated biphenyl-dechlorinating communities in enrichment cultures using three different molecular screening techniques. *Environ Microbiol* 2001;3:710–9.
- Wu Q, Sowers KR, May HD. Establishment of a polychlorinated biphenyl-dechlorinating microbial consortium, specific for doubly flanked chlorines, in a defined, sediment-free medium. *Appl Environ Microbiol* 2000;66:49–53.
- Wu G, Feng Y, Boyd SA. Characterization of bacteria capable of degrading soil-sorbed biphenyl. *Bull Environ Contam Toxicol* 2003;71:768–75.
- Wurst H, Shiba T, Kornberg A. The gene for a major exopolyphosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 1995;177: 898–906.
- Zinser ER, Schneider D, Blot M, Kolter R. Bacterial evolution through the selective loss of beneficial Genes Trade-offs in expression involving two loci. *Genetics* 2003;164:1271–7.