

JCH-FC
Biotecnología
S L H
C.1

ESCUELA DE PREGRADO – FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD DE CHILE



**“CONSTRUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS
RECOMBINANTES DEGRADADORAS DE POLICLOROBIFENILOS”**

**Memoria de Título entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento
parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.**

JUAN MATIAS SAAVEDRA SALINAS

Director de Memoria de Título
Dr. Michael Seeger Pfeiffer

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. Seeger Pfeiffer', written over a horizontal line.

Comisión de Evaluación de la Memoria de Título

Dr. Carlos Jerez Guevara
Presidente Comisión

A handwritten signature in black ink, written over a horizontal line.

Dr. Nicolás Guiliani
Corrector

A handwritten signature in black ink, written over a horizontal line.



Santiago de Chile, _____ 2005



**“CONSTRUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS
RECOMBINANTES DEGRADADORAS DE POLICLOROBIFENILOS”**

**Memoria de Título entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento
parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.**

JUAN MATIAS SAAVEDRA SALINAS



Director de Memoria de Título

Dr. Michael Seeger Pfeiffer

Profesor Patrocinante

Dr. Carlos Jerez Guevara

Santiago de Chile, 2005



Quisiera contar el camino que recorrí hasta la generación de esta Memoria de Título, con el fin de contextualizar el trabajo realizado, y resaltar aspectos ajenos a la ciencia propiamente tal.

Esta historia comienza a finales del año 1999. Estaba cursando mi penúltimo año de carrera, y me quedaba sólo un semestre adicional para terminar los ramos obligatorios y empezar mi Memoria de Título. A través de triviales conversaciones de pasillo, me enteré de la existencia de un programa de intercambio estudiantil para efectuar estadías de un semestre en la Universidad Estatal de New York en Plattsburgh. Se comenzó a perfilar un grupo de distintos compañeros de carrera atraídos por el programa. El interés y la ilusión crecieron rápidamente, pero el tiempo fue transcurriendo y no se emprendían acciones concretas. Así, hasta que una noche cualquiera, recibí un llamado telefónico clave: era Felipe Opazo, el único miembro del grupo original que seguía con intenciones serias de participar en el programa de intercambio. El motivo del llamado era muy simple, el plazo para postular terminaba el día siguiente, y había que presentar una carta de intenciones. Tuve unos pocos minutos para decidir mi inclusión en el programa. Hice la carta, la presenté al día siguiente, y ya estaba en camino. El proceso fue bastante largo, y poco a poco fui conociendo a los chilenos que tenían intenciones de viajar, aunque sus rostros aún no significaban nada.

Transcurrieron tiempo y trámites, hasta el momento de partir a Estados Unidos por seis meses.

Viajamos juntos con Felipe Opazo, dibujando historias fantásticas en nuestras cabezas que intentaban adivinar lo que íbamos a vivir durante los próximos meses.

Mi estadía en el país del norte fue entretenida e interesante. Pero en lo que respecta la génesis de esta memoria, un hecho clave fue mi amistad con Danilo Perez Pantoja. Danilo, estaba terminando su tesis de pregrado en la facultad de Ciencias biológicas de la P. Universidad Católica, bajo la tutela del Dr. Bernardo González Ojeda. Durante una de las varias conversaciones que sosteníamos a diario, Danilo me contó que trabajaba en el tema de la Biodegradación de contaminantes aromáticos. Eso me interesó muchísimo, ya que justamente ésa era una de las áreas que más me atraía, y podía significar mi tema de Memoria. Acordé con Danilo visitar su laboratorio a nuestro regreso a Chile.

Una semana después de haber vuelto a Chile, estaba entrevistándome con el Dr. Bernardo González, evaluando mi eventual integración a su grupo de investigación como estudiante en pasantía. En ese momento, (segundo semestre del año 2000) no tenía ramos en la Universidad, ya que los únicos que me faltaban se impartían durante el primer semestre. Por esta razón, contaba con todo mi tiempo para dedicarlo a una pasantía. Como resultado, una semana después estaba trabajando en el grupo del Dr. González, bajo la tutela de Danilo.

Trabajé todo el segundo semestre del año 2000 en el llamado "BG Lab". Ahí, no solo consolidé mi amistad con Danilo, sino que hice nuevas y sólidas amistades con compañeros del lab, Miguel Angel Sánchez, Thomas Ledger, Nicole Trefault y Mario Tello. Viví bonitos momentos en mi pasada por el BG Lab.

Al terminar el año 2000, tuve que tomar la decisión acerca del laboratorio en el cual realizaría mi trabajo de Memoria. Producto de variados problemas administrativos, no me pude quedar en el mítico BG Lab. En ese momento, mis amigos y compañeros de trabajo me sugirieron dirigirme hacia el Dr. Michael Seeger, con laboratorio en la Universidad Federico Santa María de Valparaíso, y que desarrollaba su línea de investigación en el área de la

biodegradación de contaminantes también. De hecho, existían colaboraciones informales entre los dos laboratorios.

Me reuní con Michael, en Valparaíso y visité su laboratorio. No me costó mucho decidirme por hacer mi Memoria con él, y radicarme por un año y medio en el mítico puerto de Valparaíso. Era toda una aventura. Al poco tiempo descubrí que Paula Martínez, una cercana amiga y compañera de carrera, también realizaría su Memoria con Michael.

Junto con Paula, nos instalamos en Valparaíso, y nuestra interacción nos ayudó a enfrentar el importante cambio de vida que se nos presentaba.

El tiempo transcurrió y los resultados eran esquivos. Caí repetidas veces en las trampas de mi ambición y curiosidad, lo que me llevaba a desviarme frecuentemente del hilo conductor principal de mi Memoria, y abarcar más de lo que podía efectivamente controlar. Esta experiencia me enseñó mucho, y me expuso claramente mis capacidades y limitaciones. Así, mi trabajo de tesis se extendió mucho más de lo presupuestado.

Durante mi estadía en Valparaíso y en el "Micho Lab" nuevamente hice lindas amistades, y conocí gente valiosa. En especial mi relación de tutor-alumno con Michael, se fue convirtiendo en genuina amistad, lo que generó un ambiente de trabajo muy grato. El Dr. Bernardo González fue clave en el desarrollo de mi memoria al abrirme las puertas de su laboratorio en todo momento, y ofrecerme apoyo de todo tipo. Estoy muy agradecido de la generosidad y buena voluntad de Bernardo. Además, en los laboratorios de Michael y Bernardo tuve la suerte de interactuar con personas de extraordinarias cualidades humanas y científicas. Esta interacción fue clave en el resultado de esta Memoria.

Hoy, mi desarrollo profesional continúa, y ya no trabajo en los laboratorios citados arriba. Sin embargo, muchas de las personas que conocí en esos lugares son grandes amigos, que normalmente debieran quedar para toda la vida.

El proceso que culminó con la entrega de este manuscrito fue un aporte en mi vida, desde variados puntos de vista.

AGRADECIMIENTOS

No quisiera extenderme mucho en esta clásica sección de agradecimientos, por lo que seré lo mas escueto posible.

Agradezco el importante apoyo científico y amistad de Danilo Pérez-Pantoja, Miguel Angel Sánchez, Mario Tello y Thomas Ledger del BG Lab con quienes he conformado una sólida amistad, proyectada en el llamado grupo G4. Extiendo este agradecimiento a todo el BG Lab (Nicole Trefault, Rodrigo De la Iglesia, Heidi Pérez, Ana Morán, Marlene Manzano, Macarena Stuardo) que de una manera u otra manera me ayudó enormemente en momento difíciles.

Agradezco además la ayuda y amistad de todos los integrantes del Departamento de Microbiología de la P. Universidad Católica de Chile, que aún definiendo en el clásico campeonato de baby fútbol de la Facultad de Ciencias Biológicas.

Agradezco a todo el Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología Ambiental de la UTFSM (Paula Martínez, Luis Gómez, Marta González, Beatriz Cámara, Myriam González, Cristina Herrera, Viviana Pérez) por haber sido mis compañeros de trabajo y amigos.

Agradezco a mis amigos de la Quinta Compañía de Bomberos "Pompe France" de Valparaíso, con quienes compartí momentos inolvidables durante la realización de esta memoria. En efecto, gran parte de mi estadía en Valparaíso la pasé en la Guardia Nocturna de la Quinta. Gracias Pablo González Pignol, Francisco Salas, Alonso Altamirano, Andrés Abaceta, Mario Contreras, Mario Olea, Eduardo Acuña Saavedra, Waldo Oyarzún y Juan Carlos Torres.

Agradezco a Alejandro Dintrans por su participación directa en la mejora de ciertas fotos de esta Memoria.

Agradezco a Christopher Fleet y Mathias DeSmet, mis compañeros de departamento y amigos, por su apoyo en la última parte de este proceso.

Agradezco al Dr. Bernardo González Ojeda por su apoyo incondicional y su excelente disposición cada vez que recurrí a él. Bernardo y su equipo significaron un gran apoyo para mí.

Agradezco a los profesores miembros de mi Comisión Evaluadora, Carlos Jeréz Guevara y Nicolás Guillani por la buena disposición que demostraron al compatibilizar las fechas de evaluación con mis actividades académicas.

Agradezco especialmente a mi tutor y amigo Michael Seeger Pfeiffer por todo lo que significa para mí como profesor, científico y persona.

Mi Memoria de Título está dedicada a Anamaria Salinas Abel y Juan Saavedra Gorriateguy, mis padres, que siempre han luchado por mi bienestar y desarrollo.



INDICE GENERAL

ABREVIATURAS.....	i
RESUMEN.....	ii
ABSTRACT.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
INDICE DE TABLAS.....	vii
1. INTRODUCCION.....	1
1.1 Contaminación ambiental.....	1
1.2 Contaminantes orgánicos persistentes (COPs).....	1
1.3 Convención de Estocolmo.....	2
1.4 Policlorobifenilos.....	2
1.5 Toxicidad de los PCBs.....	4
1.6 PCBs en Chile.....	5
1.7 Tecnologías para destruir PCBs.....	6
1.8 Biodegradación de PCBs y <i>Burkholderia xenovorans</i> LB400.....	7
1.9 Degradación de clorobenzoatos y <i>Ralstonia eutropha</i> X3.....	11
1.10 Acoplamiento de vías catabólicas de policlorobifenilos y clorobenzoatos.....	13
2. MATERIALES Y METODOS.....	17
2.1 Materiales.....	17
2.1.1 Reactivos.....	17
2.1.2 Cepas bacterianas.....	17
2.1.3 Plásmidos.....	17
2.1.4 Medios de cultivo.....	18
2.1.4.1 Medio Luria-Bertani.....	18
2.1.4.2 Medio mínimo Ksal.....	18
2.1.4.3 Medios sólidos.....	18
2.2 Métodos.....	19

2.2.1 Cultivo de los microorganismos.....	19
2.2.1.1 Mantenición de los microorganismos.....	19
2.2.1.2 Crecimiento de cepas en cultivos líquidos.....	19
2.2.2 Incorporación de material genético en células huésped.....	19
2.2.2.1 Conjugación biparental.....	20
2.2.3 Métodos de biología molecular.....	20
2.2.3.1 Extracción de ADN total.....	20
2.2.3.2 Extracción de ADN plasmidial.....	21
2.2.3.3 Amplificación de ADN por PCR.....	21
2.2.3.3.1 Mezcla de reacción.....	21
2.2.3.3.2 Partidores y programas de amplificación.....	21
2.2.3.4 Digestión de ADN.....	22
2.2.3.5 Hibridización Southern.....	22
2.2.3.5.1 Obtención de sondas.....	22
2.2.3.5.2 Marcación de sondas.....	22
2.2.3.5.3 Preparación del gel y electrotransferencia a membrana.....	23
2.2.3.5.4 Hibridización.....	23
2.2.4 Degradación de clorobenzoatos (CBAs).....	24
2.2.5 Degradación de PCBs.....	25
2.2.5.1 Cinética de degradación.....	25
2.2.5.2 Extracción orgánica.....	25
2.2.6 Análisis por HPLC.....	26
2.2.7 Determinación de actividades enzimáticas.....	26
2.2.7.1 Preparación de extractos crudos.....	26
2.2.7.2 Actividad clorocatecol-1,2-dioxigenasa (TfdC).....	27
2.2.7.3 Actividad dihidroxibifenilo dioxigenasa (BphC).....	27
2.2.7.4 Cuantificación de proteínas.....	28
2.2.8 Cuantificación de cloruro.....	28
3. RESULTADOS.....	29



3.1 Construcción de bacterias degradadoras de PCBs y clorobenzoatos.....	29
3.2 Análisis de las capacidades catabólicas de los transconjugantes.....	29
3.3 Caracterización genética de las cepas recombinantes.....	31
3.4 Efecto de CBAs sobre el crecimiento de la cepa X31 en bifenilo.....	34
3.5 Crecimiento de la cepa X34 en bifenilo y CBAs.....	36
3.6 Actividades enzimáticas específicas de BphC y TfdC en la cepa X34.....	36
3.7 Degradación de CBAs por <i>Ralstonia eutropha</i> X34.....	38
3.8 Degradación de PCBs por <i>Ralstonia eutropha</i> X34.....	39
4. DISCUSION.....	42
5. CONCLUSIONES.....	52
6. REFERENCIAS.....	53



ABREVIATURAS

3-CB	3-clorobifenilo
3-CBA	3- clorobenzoato
3-CC	3-clorocatecol
4-CB	4-clorobifenilo
4-CBA	4-clorobenzoato
2,4'-dCB	2,4'-diclorobifenilo
3,5-dCB	3,5-diclorobifenilo
3,5-dCBA	3,5-diclorobenzoato
ADN	acido desoxirribonucleico
CONAMA	Comisión Nacional del Medio Ambiente
COP	compuesto orgánico persistente
dCTP	desoxicitosina trifosfato
DHB	dihidroxibifenilo
D.O.	densidad óptica
HPLC	cromatografía líquida de alta presión
Kan	kanamicina
kb	kilobases
LB	Luria Bertani
PCB	policlorobifenilo
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
rpm	revoluciones por minuto
SDS	dodecil sulfato de sodio
U	unidades enzimáticas

RESUMEN

Los policlorobifenilos (PCBs) son compuestos organoclorados sintéticos usados masivamente en la industria durante el siglo pasado. Debido a su toxicidad, capacidad de bioacumulación, resistencia a la degradación natural, y amplia distribución en el ambiente, los PCBs representan un grave problema ambiental, siendo considerados contaminantes prioritarios a escala global. Chile firmó y ratificó el convenio de Estocolmo que establece una serie de medidas para normalizar, fiscalizar y mitigar la liberación al ambiente de contaminantes orgánicos persistentes (COPs) tales como los PCBs. Sin embargo, en la actualidad siguen en uso equipos eléctricos con PCBs en Chile.

Pese a la recalcitrancia de los PCBs, diversos microorganismos son capaces de biodegradar estos compuestos. Sin embargo, esta degradación es generalmente incompleta, acumulándose clorobenzoatos (CBAs). En este trabajo se construyó una cepa bacteriana capaz de degradar completamente PCBs, sin acumular intermediarios. Se incorporó el locus *bph* de *Burkholderia xenovorans* LB400, que codifica para una de las vías de degradación de PCBs más potentes, en el genoma de *Ralstonia eutropha* X3, cepa recombinante capaz de mineralizar 3-CBA, 4-CBA y 3,5-dCBA. Los genes *bph* se transfirieron mediante conjugación al genoma de la cepa X3. La cepa recombinante X34 se caracterizó genética y bioquímicamente. Además se analizó el clon X31 por haber perdido la totalidad de las capacidades catabólicas de CBAs conferidas por los genes *xyl*.

Se comprobó que el 4-CBA y el 3,5-dCBA afectan negativamente el crecimiento de *Ralstonia eutropha* en bifenilo, usando como modelo de estudio la cepa X31, que es incapaz de degradar estos compuestos.

Las cepas X34 y X31 contienen una copia estable del locus *bph* en su cromosoma, producto de un único evento de transposición. La cepa X34 es capaz de degradar bifenilo, 3-CBA, 4-CBA y 3,5-dCBA. Sin embargo, requiere la presencia de *meta*-toluato, inductor natural de los genes *xyl*, para la degradación de 3,5-dCBA. Este fenómeno parece ser consecuencia de un complejo circuito regulatorio. Por otra parte, la pérdida de capacidades catabólicas en la cepa X31 se debe a la aparente pérdida del cassette *xyl* de su genoma.

La cepa recombinante X34 presenta actividad BphC inducible por bifenilo. La presencia de BphC no interfiere con la actividad TfdC (catecol dioxigenasa), esencial en la degradación de variados cloroaromáticos. La cepa X34 es capaz de degradar 3-CB, 4-CB, 3,5-dCB y 2,4'-dCB, sin acumular clorobenzoatos y liberando cantidades estequiométricas de cloruro.

El acoplamiento de las vías catabólicas provenientes de distintas fuentes en un solo microorganismo genera un sistema biológico altamente complejo. Las interacciones que se establecen entre las nuevas vías incorporadas, y la maquinaria fisiológica del huésped suelen generar resultados inesperados. El avance en este tipo de estudios constituye un aporte sustancial en la generación de cepas con nuevas capacidades catabólicas de interés comercial.

ABSTRACT

Polychlorobiphenyls (PCBs) are synthetic chlorinated compounds widely used in the industry during the past century. Due to their toxicity, bioaccumulation capacity, resistance to natural degradation and wide distribution in the environment, PCBs represent a serious environmental problem, and are high-priority pollutants at a global scale. Chile signed and ratified the Stockholm Convention, which establishes a series of conditions to normalize, control and mitigate the release of persistent organic pollutants (POPs), such as PCBs in the environment. Nevertheless, in Chile electric equipments with PCBs are still in use.

Despite of the recalcitrance of PCBs, several microorganisms are able to degrade these compounds. However, biodegradation is generally incomplete, leading to the accumulation of chlorobenzoates (CBAs). In this work, a bacterium with the ability to degrade PCBs completely with no accumulation of CBAs was constructed. The *bph* locus from *Burkholderia xenovorans* LB400, which codifies for one of the most potent PCBs degradation pathways, was incorporated into the genome of *Ralstonia eutropha* X3, a recombinant strain able to mineralize 3-CBA, 4-CBA and 3,5-dCBA. The *bph* genes were transferred by conjugation to the genome of strain X3. Recombinant strain X34 was characterized genetically and biochemically. Another recombinant, strain X31 was also analyzed because of its complete loss of *xyl*-encoded capacities.

4-CBA and 3,5-dCBA negatively affected growth of *Ralstonia eutropha* in biphenyl. This was demonstrated using strain X31, which was unable to degrade these compounds.

Strains X34 and X31 contained a stable single copy of the *bph* locus in the chromosome. Bacterial strain X34 had the ability to degrade biphenyl, 3-CBA, 4-CBA and 3,5-dCBA. Nevertheless, to achieve total degradation of 3,5-dCBA this strain required the presence of *meta*-toluate, a natural inducer of *xyl* genes. This phenomenon seems to be a consequence of a complex regulatory circuit. On the other hand, the phenotype of strain X31 was due to the apparent loss of the *xyl* cassette from its genome.

Recombinant strain X34 showed an inducible BphC activity, one of the key enzymes in the *bph* locus encoded pathway. The presence of BphC did not interfere with TfdC activity (catechol-dioxygenase), a key enzyme in the degradation of chloroaromatics. Strain X34 was able

to degrade 3-CB, 4-CB, 3,5-dCB and 2,4'-dCB, with no accumulation of chlorobenzoates, and releasing stoichiometric amounts of chloride.

Coupling of metabolic pathways from distinct sources in one microorganism generates a highly complex biological system. Interactions between the new incorporated pathways and the physiological system of the host, frequently gives place to unexpected results. Progress in this field is essential for the development of commercially attractive bacterial strains with new catabolic capacities.

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	: Vía catabólica del bifenilo de <i>Burkholderia xenovorans</i> LB400.....	7
Figura 2	: Producción de protoanemonina a partir de clorocatecoles por enzimas de la vía del 3-oxoadipato.....	9
Figura 3	: Vías catabólicas involucradas en la degradación de CBAs en <i>Ralstonia eutropha</i> X3.....	11
Figura 4	: Rutas metabólicas improductivas generadas a través del rompimiento en <i>meta</i> del anillo aromático de los clorocatecoles.....	14
Figura 5	: Perfiles de crecimiento de la <i>Ralstonia eutropha</i> X3 y sus tranconjugantes en bifenilo y CBAs.....	30
Figura 6	: Hibridación Southern de cepas recombinantes derivadas de <i>Ralstonia eutropha</i> X3.....	31
Figura 7	: Amplificación por PCR del gen <i>tnp</i> desde cepas recombinantes derivadas de <i>Ralstonia eutropha</i> JMP134.....	33
Figura 8	: Amplificación por PCR de los genes <i>xyfX</i> y <i>xyfS162</i> desde cepas recombinantes derivadas de <i>Ralstonia eutropha</i> JMP134.....	34
Figura 9	: Efecto de los clorobenzoatos sobre el crecimiento de la cepa X31 en bifenilo y fructosa.....	35
Figura 10	: Crecimiento de la cepa recombinante X34 en distintas concentraciones de bifenilo y CBAs.....	37
Figura 11	: Degradación de clorobenzoatos por la cepa recombinante X34 de <i>Ralstonia eutropha</i>	39
Figura 12	: Cinética de degradación de 4-CB y liberación de cloruro por la cepa recombinante X34 de <i>Ralstonia eutropha</i>	41
Figura 13	: Esquema resumen de las capacidades catabólicas de <i>Ralstonia eutropha</i> X34.....	45

INDICE DE TABLAS

Tabla 1	: Lista de COPs definidos en el Convenio de Estocolmo.....	2
Tabla 2	: Actividades enzimáticas específicas de BphC y TfdC en la cepa X34 crecida en distintas fuentes de carbono.....	38
Tabla 3	: Degradación de diversos PCBs monoclorados y diclorados por <i>Ralstonia eutropha</i> X34.....	40

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Contaminación ambiental

La actividad industrial del hombre ha experimentado una importante expansión a lo largo del siglo recién pasado. El desarrollo de tecnologías más productivas y de menor costo ha significado la masificación del empleo de productos e insumos industriales. Este auge industrial, si bien ha generado enormes beneficios para el ser humano, también ha provocado problemas ambientales de importancia a escala global.

La liberación deliberada o casual al ambiente de gran cantidad y diversidad de compuestos químicos de origen industrial se ha constituido en una poderosa amenaza para el equilibrio natural del planeta, comprometiendo en forma directa la calidad de vida de los seres humanos.

1.2 Contaminantes orgánicos persistentes (COPs)

Dentro de la gran variedad de compuestos tóxicos para el medio ambiente, existe un grupo que despierta especial preocupación: los Contaminantes Orgánicos Persistentes (COPs). Los COPs son sustancias químicas que persisten en el ambiente por largos períodos, tienen la capacidad de bioacumularse a través de cadenas tróficas y causan efectos adversos a la salud humana y los ecosistemas naturales (United Nations Environment Program (UNEP), www.chem.unep.ch/pops/; Chaudry & Chapalamadugu, 1991).

Tomando en consideración la detección de COPs en regiones donde nunca han sido utilizados, y la consecuente amenaza global que generan, la comunidad internacional ha realizado numerosos llamados para restringir y finalmente eliminar su uso (UNEP, www.chem.unep.ch/pops/). En Mayo del año 2001, se establece un histórico acuerdo internacional orientado a normar y minimizar el uso de COPs en el planeta: el Convenio de Estocolmo.

1.3 Convención de Estocolmo

La Convención de Estocolmo, realizada en mayo de 2001, constituyó una instancia en la cual se debatió globalmente el problema de los contaminantes orgánicos persistentes. Como resultado de esta reunión mundial, se elaboró una lista con 12 COPs de acción prioritaria, que corresponden a compuestos organoclorados (Tabla 1), junto con una serie de medidas para normalizar, fiscalizar y mitigar su liberación al ambiente (UNEP, www.pops.int).

El Convenio de Estocolmo fue firmado por 151 países de los cinco continentes. Chile firmó junto a otros países sudamericanos el 23 de Mayo de 2001. Para poner en marcha las medidas adoptadas en Estocolmo, los países inscritos en la convención deben ratificar su acuerdo. Hasta el día de hoy, solo 41 países han llevado a cabo dicha ratificación incluyendo Chile. En América, solamente Bolivia, Canadá, México, Panamá y Chile han cumplido con este requisito. El congreso chileno ratificó el convenio el 21 de julio de 2004 (UNEP, www.pops.int).

1.4 Policlorobifenilos

Los policlorobifenilos (PCBs) son compuestos organoclorados sintéticos derivados del bifenilo. Existen 209 congéneres que se distinguen por el número y posición de átomos de cloro en el esqueleto de bifenilo (Ballschmiter & Zell, 1980). Estos compuestos se produjeron y comercializaron principalmente en Norte-América y Europa durante 60 años, desde comienzos de la década de 1930. Las mezclas comerciales de PCBs, como el Aroclor (Estados Unidos), Clophen (Alemania) y Kanechlor (Japón) contienen entre 60 y 80 congéneres distintos (Ballschmiter & Zell, 1980; Rochkind *et al.*, 1986). Los PCBs han sido empleados en la industria como fluidos dieléctricos en transformadores y capacitores, componentes de sistemas hidráulicos y de transferencia de calor y agentes ignífugos, entre otras aplicaciones. Además se pueden encontrar en lubricantes, pinturas, plásticos y adhesivos (National Research Council, 1979). La enorme aplicación industrial que han tenido estos compuestos se debe a sus extraordinarias propiedades físicas y químicas: consistencia aceitosa, gran estabilidad, inercia química, resistencia al calor y alta constante dieléctrica (Hutzinger, 1974). Sin embargo, la estabilidad de los PCBs, también impide su degradación en el ambiente y su alta hidrofobicidad permite que se

Tabla 1. Lista de COPs definidos en el Convenio de Estocolmo.

COP	REFERENCIA
Dioxinas y furanos	Contaminantes no deseados, generados como subproductos en procesos industriales que involucran cloro, carbono y oxígeno.
Hexaclorobenzeno	Subproducto no deseado de la fabricación de disolventes y otras sustancias cloradas, como el cloruro de vinilo y ciertos pesticidas, y de la incineración de residuos urbanos.
DDT	Ha sido utilizado desde los años 40 como plaguicida en agricultura, pesticida doméstico y en campañas sanitarias en contra de la malaria.
Dieldrina, Aldrina y Endrina	Pesticidas clorados usados principalmente como insecticidas. La endrina se utiliza también para el control de roedores y pájaros.
Clordano	Pesticida utilizado como insecticida para el control de termitas entre otros. Puede permanecer en el ambiente por más de 20 años.
Heptacloro	Es un componente del clordano, representa aproximadamente un 10% de su peso. Se ha utilizado para eliminar a las termitas, hormigas y otros insectos del suelo.
Mírex	Compuesto utilizado como pirorretardante en pinturas, plásticos, equipos eléctricos, y como insecticida, para el control de hormigas, termitas y avispas.
Toxafeno	Mezcla comercial de al menos 177 congéneres clorados, utilizada como insecticida.
PCBs (Policlorobifenilos)	Mezcla de congéneres clorados utilizados principalmente como aceites para transformadores.

mezclen fácilmente con solventes orgánicos, aceites y grasas, lo que favorece su acumulación a través de las cadenas tróficas o biomagnificación.

Se ha detectado PCBs en todo el planeta, incluidas zonas no industrializadas alejadas de toda fuente emisora, como el Ártico y la Antártica (Atlas *et al.*, 1981; Ballschmitter, 1991; Bacon *et al.*, 1992)

Los PCBs no despertaron preocupación mundial hasta que desastres, como la contaminación accidental de aceite de arroz en Japón a fines de 1968, los relacionaron con graves efectos sobre la salud humana y animal (Fischbein *et al.*, 1982). A la luz de los acontecimientos, la comunidad internacional toma conciencia sobre la necesidad de regular la producción, uso y eliminación de PCBs a fines de la década de 1970 (U.S. Environmental Protection Agency, 1994).

1.5 Toxicidad de los PCBs

Estudios llevados a cabo en animales han relacionado la exposición a PCBs con distintos tipos de cáncer, especialmente cáncer de hígado (Schaeffer *et al.*, 1984; Norback & Weltman, 1985), trastornos reproductivos (Sager & Girard, 1994; Arnold *et al.*, 1995), déficit en el desarrollo (Pantaleoni *et al.*, 1988; Lilienthal *et al.*, 1990), anomalías en el sistema inmunológico (Tryphonas *et al.*, 1989) y trastornos del sistema endocrino (Jansen *et al.*, 1993).

El efecto de la exposición de seres humanos a mezclas comerciales de PCBs ha sido extensamente estudiado. Sin embargo, la limitada información sobre los tiempos de exposición y la discrepancia de los resultados impiden determinar con claridad la relación causa-efecto (Faroon *et al.*, 2003). Por otro lado, se ha encontrado contaminantes tóxicos como policlorodibenzofuranos y policlorodibenzodioxinas en mezclas comerciales de PCBs, lo que complica aún más el análisis de los resultados (Faroon *et al.*, 2003).

En humanos, los PCBs han sido relacionados con el cáncer del sistema digestivo (Bertazzi *et al.*, 1987; Brown, 1987), la infertilidad (Buck *et al.*, 2000), los trastornos del desarrollo (Jacobson *et al.*, 1984; Stewart *et al.*, 2000), efectos sobre el sistema inmune (Svensson *et al.*, 1994), efectos neurológicos (Kuroiwa *et al.*, 1969; Kuratsune, 1989) y lesiones cutáneas (Ouw *et al.*, 1976; Fischbein *et al.*, 1979).

La contaminación accidental con PCBs de productos alimenticios para consumo humano ha permitido evaluar el nivel de toxicidad de estos compuestos al ser consumidos en dosis altas como parte de la dieta. Un caso emblemático es el incidente Yusho, ocurrido en Japón durante 1968, en el que aproximadamente 2000 personas consumieron aceite de arroz contaminado con Kanechlor, una mezcla comercial de PCBs (Nagayama *et al.*, 1981; Chen *et al.*, 1992).

La toxicidad de los PCBs se basa en un amplio rango de mecanismos de acción, que dependen del patrón de sustitución de cada congénere (Faroon *et al.*, 2003). Los congéneres coplanares que no contienen cloro en posición orto son considerados los más tóxicos y tienen un mecanismo de acción muy similar al de 2,3,7,8-clorodioxinas y dibenzofuranos clorados, interactuando con el receptor de aril-hidrocarburos (Ah) (Loose *et al.*, 1978; Safe, 1990). Los congéneres con múltiples sustituciones en posición orto han sido asociados con mecanismos de acción tipo estrógeno (Jansen *et al.*, 1993).

Además, se ha documentado que los productos de degradación incompleta de PCBs pueden ser aún más tóxicos que las moléculas originales (Cámara *et al.*, 2004).

1.6 PCBs en Chile

Por resolución número 610 de la Superintendencia de Electricidad y Combustibles (SEC), desde el 3 de septiembre de 1982, en Chile está prohibido el uso de PCBs en equipos eléctricos nuevos, tales como transformadores y condensadores. Sin embargo, en la actualidad siguen en uso equipos eléctricos con PCBs construidos antes de la fecha de prohibición. El gobierno de Chile en conjunto con el Ministerio de Salud ha confeccionado una "lista de sustancias peligrosas" que incluye a los PCBs (CONAMA www.conama.cl).

En mayo del año 2001, Chile firmó el Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes (COPs), que fue ratificado por el Congreso el 21 de Julio de 2004. Con el fin de garantizar el cumplimiento de este convenio, el gobierno de Chile está desarrollando un conjunto de estudios y actividades, entre las que se cuenta la realización de un "Plan Nacional de Implementación para la Gestión de los COPs" financiado con capitales internacionales (CONAMA <http://www.conama.cl/portal/1255/article-27826.html>). Chile fue seleccionado, junto a 11 países, como país piloto para la ejecución de este proyecto.

Por ser punto focal del Convenio de Estocolmo en el país, la Comisión Nacional para el Medio Ambiente (CONAMA) del gobierno de Chile, ha impulsado, desde 1999, diversas actividades referidas a los PCBs. Resultado de esto es la edición de un "Manual para el manejo de PCBs", que incluso será difundido en varios idiomas por el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA).

Durante el año 2000 la CONAMA puso en marcha el proyecto "Diagnóstico Nacional de Contaminantes Orgánicos Persistentes" con el objetivo de determinar la cantidad de PCBs almacenados y en uso dentro de Chile, y establecer un procedimiento estandarizado de muestreo, análisis y elaboración de perfiles de sustancias químicas y sus residuos en el ambiente. El centro EULA-Chile de la Universidad de Concepción realizó el estudio, obteniendo los siguientes resultados:

- Existe un importante volumen de PCBs almacenados y en uso dentro de Chile (396 705 litros al menos), siendo las regiones II y III las que contienen la mayor cantidad, seguidas por las regiones VIII y metropolitana.
- Existe contaminación ambiental en Chile por PCBs. Diversos congéneres se han detectado en bivalvos, músculo de peces, huevos y músculo de aves en distintas regiones a lo largo de todo el país (Focardi *et al.*, 1996; Fuentealba, 1996; Muñoz y Becker, 1999; Pérez *et al.*, 2002).

1.7 Tecnologías para destruir los PCBs

Los PCBs se pueden destruir por medio de variadas metodologías, basadas en sistemas físicos, químicos o fisicoquímicos. La incineración es la tecnología más aceptada en la actualidad (Piver y Lindstrom, 1985). Sin embargo existen también otros métodos, como la desorción térmica (Risoul *et al.*, 2002), la descloración química (Nam *et al.*, 2001), la extracción por solventes (Luque-García y de Castro, 2003), el lavado de suelos (Sheets y Bergquist, 1999) y la inmovilización (No y Meyers, 2000). Todas estas técnicas, sin embargo presentan altos costos de operación (U.S. Environmental Protection Agency, 1993).

Recientemente se ha recurrido a procesos biológicos para tratar contaminantes orgánicos persistentes. El empleo de microorganismos para remediar PCBs representa una atractiva y

prometedora alternativa (Pieper & Reineke, 2000). Se han tenido experiencias exitosas de bioremediación de PCBs en sitios contaminados (Harkness *et al.*, 1993; Fava *et al.*, 2003). Tal es el caso del río Hudson en la ciudad de New York.

1.8 Biodegradación de PCBs y *Burkholderia xenovorans* LB400

Se ha descrito numerosos microorganismos capaces de degradar bifenilos y sus derivados clorados, tanto en forma aerobia como anaerobia (Bopp, 1986; Bedard *et al.*, 1986; 1987; Abraham *et al.*, 2002; Manzano *et al.*, 2003). Los mecanismos aerobios de degradación han sido ampliamente estudiados. Sin embargo, poco se conoce acerca de los mecanismos del catabolismo anaerobio.

Varios géneros bacterianos han sido asociados con la degradación aeróbica de PCBs, incluyendo *Acinetobacter*, *Rhodococcus*, *Alcaligenes* y *Pseudomonas*. Sin embargo, la mayoría de estos microorganismos han mostrado ser incapaces de atacar PCBs que contienen más de tres átomos de cloro (Ahmed y Focht, 1973; Baxter *et al.*, 1975; Tulp *et al.*, 1978; Reichardt *et al.*, 1981; Furukawa, 1982). A mediados de los años ochenta, investigaciones científicas de la compañía General Electric permitieron aislar una bacteria Gram-negativa denominada inicialmente *Pseudomonas* sp. LB400, con extraordinarias capacidades para degradar PCBs, desde un vertedero contaminado en el estado de New York (Bopp, 1986). Esta cepa, conocida hoy en día como *Burkholderia xenovorans* LB400, no tardó en ser considerada uno de los microorganismos aerobios más potentes para degradar PCBs. Esta bacteria es capaz de atacar un considerable número de congéneres altamente clorados incluyendo hexaclorados debido a la relajada especificidad de sus enzimas catabólicas (Bedard *et al.*, 1986; Bopp, 1986; Seeger *et al.*, 1995a; 1995b; 1997; 1999). A consecuencia de esto, se ha desarrollado numerosos estudios tendientes a incrementar la capacidad degradativa de esta cepa y sus enzimas catabólicas.

Los genes *bph* que codifican para la vía degradativa de los (cloro)bifenilos en la cepa LB400 y otras bacterias, han sido secuenciados y ampliamente caracterizados (Ahmad *et al.*, 1990; Erickson & Mondello, 1992; Hofer *et al.*, 1993; 1994; Masai *et al.*, 1995). La cepa LB400 cuenta con once cistrones contiguos que conforman el locus *bph*. De estos once genes estructurales, diez han sido relacionados directamente con la degradación de (cloro)bifenilos

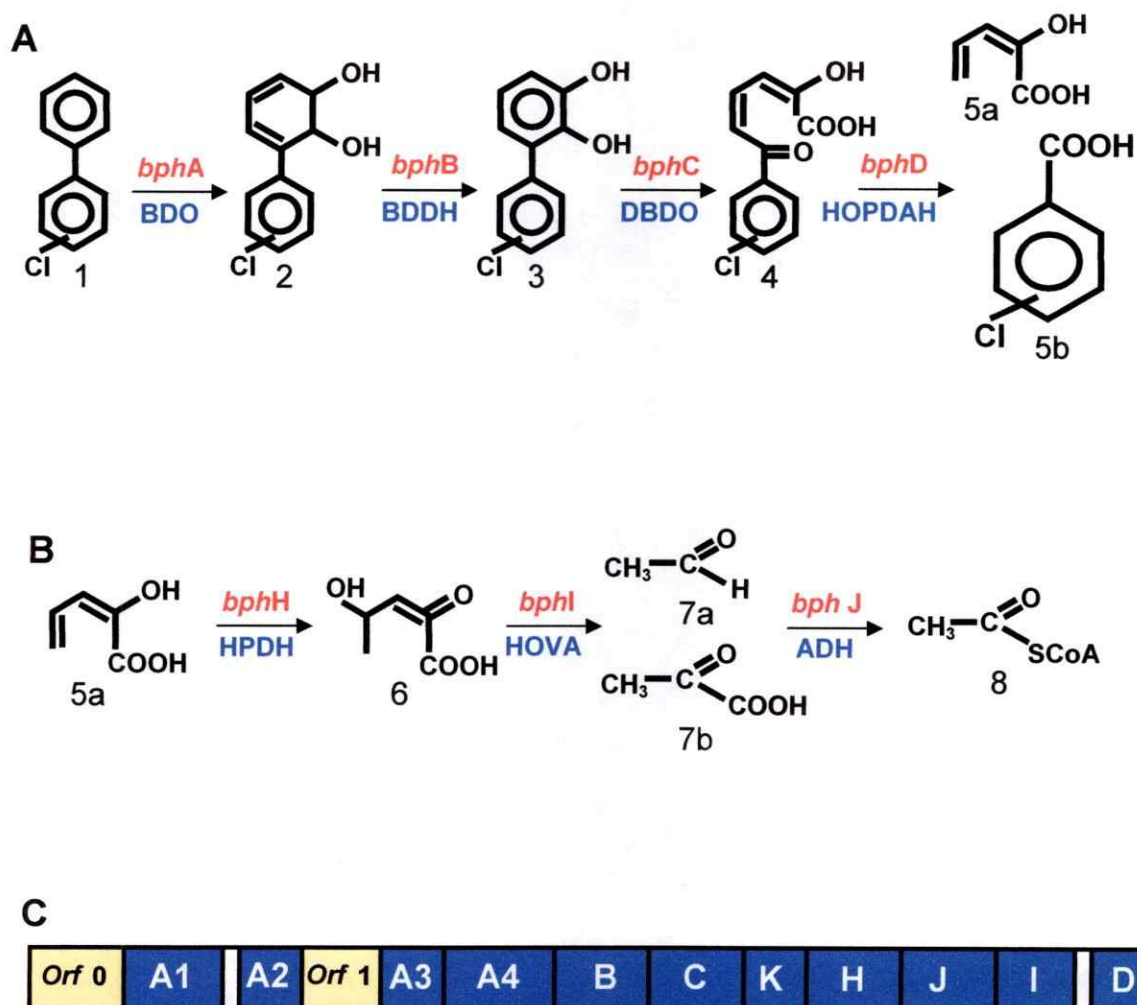


Figura 1. Vía catabólica del bifenilo de *Burkholderia xenovorans* LB400. A, Vía superior. (1) bifenilo; (2) bifenil 2,3-dihidrodiol; (3) 2,3-dihidroxi-bifenilo; (4) 2-hidroxi-6-oxo-6-fenilhexa-2,4-dienoato; BDO: bifenil-2,3-dioxigenasa (*bphA1A2A3A4*, subunidades de la enzima BPHA); BDDH: bifenil-2,3-dihidrodiol-2,3-dioxigenasa (*bphB*); DBDO: 2,3-dihidroxi-bifenil-1,2-dioxigenasa (*bphC*); HOPDAH: 2-hidroxi-6-oxo-6-fenilhexa-2,4-dienoato hidrolasa (*bphD*); **B, Vía inferior.** (5a) 2-hidroxi-penta-2,4-dienoato; (5b) ácido benzoico; (6) 4-hidroxi-2-oxovalerato; (7a) acetaldehído; (7b) piruvato; (8) acetil-CoA. HPDH: 2-hidroxi-penta-2,4-dienoato hidratasa (*bphH*); HOVA: 4-hidroxi-2-oxovalerato aldolasa (*bphI*); ADH: acetaldehído deshidrogenasa (*bphJ*). **C, estructura del locus *bph*.**

(Hofer *et al.*, 1993; 1994; Seeger *et al.*, 1995a; 1995b; 1997; 1999) (Fig. 1). El gen *bphK* codifica para una glutatión S-transferasa, cuyo rol podría estar asociado a la detoxificación celular (Bartels *et al.*, 1999; Gilmartin *et al.*, 2003).

El metabolismo aeróbico de los clorobifenilos se divide en dos vías complementarias: una superior y una inferior. La vía superior es responsable de la oxidación del clorobifenilo a clorobenzoato y un compuesto alifático de cinco carbonos, a través del rompimiento en *meta* de uno de los anillos. La vía inferior produce, a partir del compuesto alifático, piruvato y acetil-coA, metabolitos que empalman con el ciclo de los ácidos tricarbóxicos (Seeger *et al.*, 1997) (Fig. 1).

A pesar de su versatilidad, el locus *bph* carece de los genes catabólicos para benzoato, producto final de la vía superior en la degradación del bifenilo. Esto, sin embargo, no representa un problema mayor, considerando la ubicuidad de estos genes entre las bacterias degradadoras de compuestos aromáticos. La cepa LB400 no constituye una excepción y cuenta con las actividades enzimáticas necesarias para degradar benzoato.

En el caso de la biodegradación de PCBs, la situación es distinta. La gran mayoría de las bacterias capaces de biodegradar clorobifenilos, incluyendo la cepa LB400, carecen de enzimas capaces de atacar clorobenzoatos (CBAs) (Stratford, 1996). Estas enzimas, son mucho menos frecuentes en la naturaleza y están restringidas a un pequeño grupo de microorganismos. Por consiguiente, los CBAs tienden a acumularse en el medio de cultivo durante la degradación bacteriana de clorobifenilos (Bedard y Haberl, 1990; Rybkina *et al.*, 2003).

Estudios previos han permitido detectar metabolitos resultantes de la degradación incompleta de clorobenzoatos por parte de diversos microorganismos ambientales. Estos metabolitos, que incluyen clorocatecoles y semialdehídos clorados, han sido reconocidos como tóxicos (Arensdorf y Focht, 1994). Un metabolito especialmente tóxico, el antibiótico protoanemonina, es producido a partir de 3-cloromuconato, intermediario de la degradación del 4-clorocatecol por enzimas de la vía catabólica del 3-oxoadipato (Fig. 2), vía ampliamente repartida entre la microflora ambiental (Blasco *et al.*, 1995; Kaulmann *et al.*, 2001). La vía del 3-oxoadipato también puede producir protoanemonina a partir de 3-clorocatecol (Skiba *et al.*, 2002) (Fig. 2). Este hecho es de enorme relevancia ya que influye directamente sobre el potencial degradativo

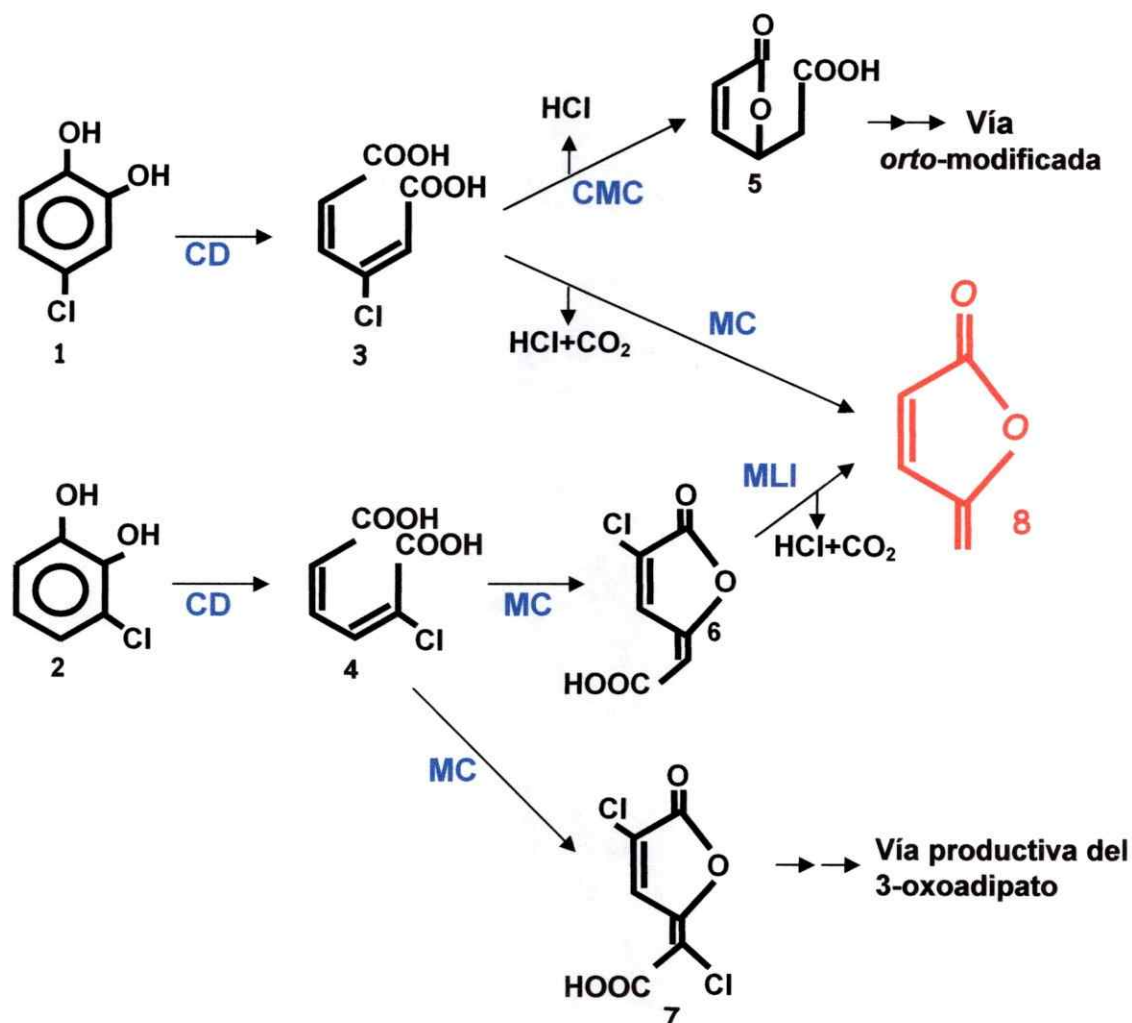


Figura 2. Producción de protoanemonina a partir de clorocatecoles por enzimas de la vía del 3-oxoadipato. 1: 4-clorocatecol; 2: 3-clorocatecol; 3: cloromuconato; 4: 2-cloromuconato; 5: dienolactona; 6: 2-cloromuconolactona; 7: 5-cloromuconolactona; 8: protoanemonina. CD: catecol-dioxigenasa; MC: muconato cicloisomerasa; CMC: cloromuconatocicloisomerasa; MLI: muconolactona isomerasa.

de las cepas involucradas en la bioremediación de PCBs, como *Burkholderia xenovorans* LB400 (Blasco *et al.*, 1997).

1.9 Degradación de clorobenzoatos y *Ralstonia eutropha* X3

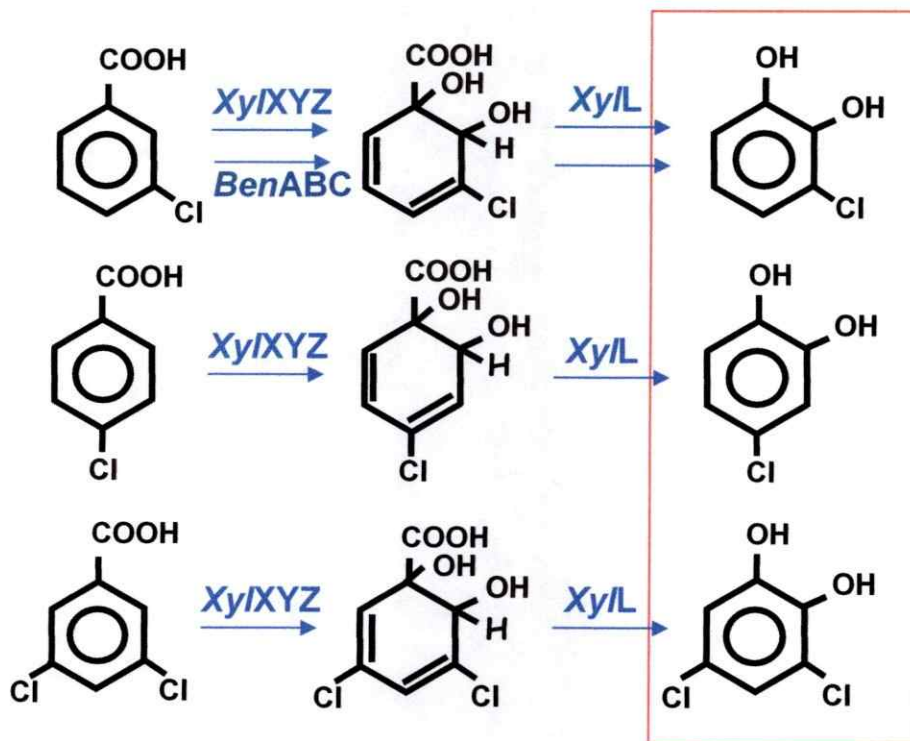
Los procesos metabólicos para la degradación de CBAs, se pueden dividir en una vía periférica y una vía central (Reineke y Knackmuss, 1988). Las llamadas vías periféricas consisten en reacciones específicas, que oxidan clorobenzoatos para producir clorocatecoles (Fig. 3A). La vía central, por su parte, oxida los clorocatecoles generados por las vías periféricas para formar β -cetoadipato, compuesto canalizado hacia el ciclo de Krebs. Los anillos catecólicos pueden ser atacados ya sea en posición *orto* o *meta* por las enzimas catabólicas. Sin embargo, los catecoles clorados sufren el rompimiento del anillo aromático generalmente en posición *orto*, a través de la vía central *orto*-modificada, denominada así por analogía con la vía *orto* de degradación de catecoles no sustituidos (Fig. 3B).

Ralstonia eutropha JMP 134, bacteria gram-negativa aislada en Australia a principios de los años 80 por su capacidad para crecer eficientemente en el herbicida 2,4 D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) (Don y Pemberton, 1981; Pieper *et al.*, 1988), es considerada uno de los más versátiles microorganismos conocidos capaces de mineralizar compuestos cloroaromáticos de un anillo. Las vías catabólicas que posee *R. eutropha* JMP134, así como los genes que las codifican han sido ampliamente estudiados (Perkins, 1990; Laemmli *et al.*, 2004). El genoma de esta bacteria ha sido recientemente secuenciado (Trefault *et al.*, 2004).

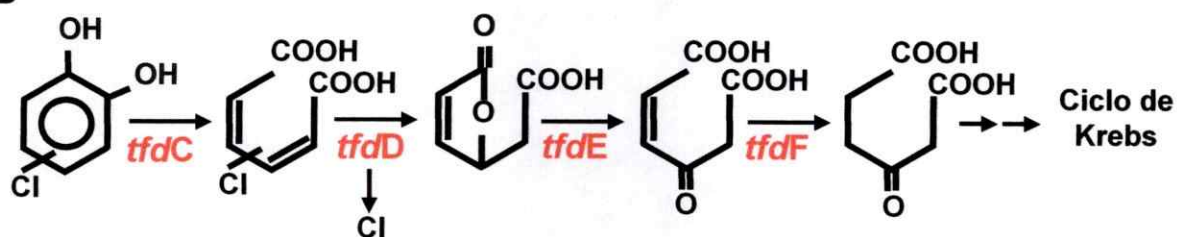
Ralstonia eutropha JMP 134 posee, además del ADN cromosomal, un plásmido conjugativo de 88 kb, perteneciente al grupo de incompatibilidad IncP- β y de amplio rango de huésped, denominado pJP4 (Don y Pemberton, 1985; Trefault *et al.*, 2004).

La cepa JMP 134 es capaz de mineralizar 3-clorobenzoato, a través de una vía periférica codificada por los genes cromosomales *benABC*, regulados por el producto del gen *catR*, y una vía *orto*-modificada codificada por dos módulos genéticos homólogos, ubicados en el plásmido pJP4; *tfd* I y *tfd* II (Pérez-Pantoja *et al.*, 2000) (Fig. 3C). El sistema modular de los genes *tfd* es complejo y ha sido motivo de numerosos estudios (Varela, 1998; Pérez-Pantoja *et al.*, 2000).

A



B



C

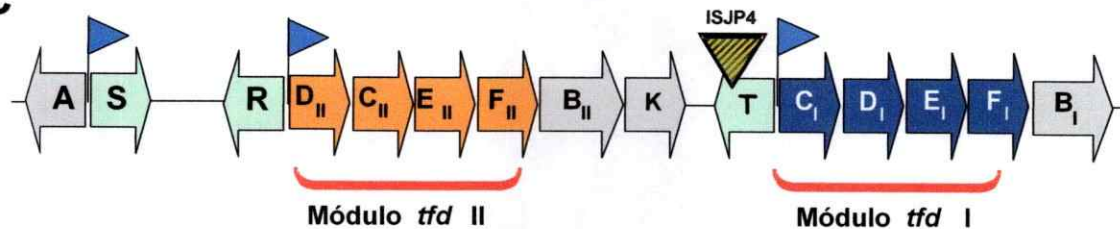


Figura 3. Vías catabólicas involucradas en la degradación de CBAs en *Ralstonia eutropha* X3. A, Vías periféricas para la degradación de 3-, 4- y 3,5-dCBA. B, Vía *orto*-modificada para la degradación de clorocatecoles. C, Módulos genéticos *tfd* que codifican las enzimas de la vía *orto*-modificada de clorocatecoles.

Ralstonia eutropha X3, es una cepa recombinante derivada de JMP 134, con capacidades mejoradas para la degradación de clorobenzoatos (Ledger *et al.*, 2002). Se obtuvo incorporando los genes *xyl*XYZL y el regulador *xyi*S, provenientes del plásmido catabólico pWWO de *Pseudomonas putida* mt-2, responsables de la ruta meta de degradación de derivados de xileno y tolueno, en el genoma de JMP 134-F3, una cepa derivada de JMP134 con un reordenamiento genético en el plásmido pJP4, que se traduce en la duplicación de los módulos genéticos *ffd* (Ledger *et al.*, 2002). El plásmido pJP4 reordenado, denominado pJP4-F3, mejora las capacidades catabólicas de la cepa JMP 134-F3 (Clement *et al.*, 2001). Los genes *xyi* codifican actividades toluato dioxigenasa y toluato dihidrodiol deshidrogenasa de especificidad relajada, que atacan benzoatos sustituidos en posiciones *meta* y *para*, oxidándolos hasta clorocatecoles (Fig. 3) (Reineke y Knackmuss, 1978; Lehrbach *et al.*, 1984; Abril *et al.*, 1989). La cepa X3 es capaz de mineralizar 3-CBA; 4-CBA y 3,5-dCBA y utilizar estos compuestos como única fuente de carbono y energía. El sistema enzimático codificado por los genes *xyi* puede degradar 3-CBA, 4-CBA y 3,5-dCBA hasta clorocatecol, pero es incapaz de reconocer 3,5-dCBA como inductor. A pesar de esto, la cepa X3 crece en 3,5-dCBA como única fuente de carbono. En relación a esto, se ha comprobado la existencia, de al menos 1 regulador capaz de inducir el sistema *xyi* en ausencia de *Xyi*S en el genoma de JMP134 (Ledger *et al.*, 2002). Este regulador, denominado *Xyi*S162, desencadena la inducción del sistema *xyi* en respuesta a 3,5-dCBA y podría ser responsable del crecimiento de la cepa X3 en este compuesto.

1.10 Acoplamiento de las vías catabólicas de policlorobifenilos y clorobenzoatos

La biodegradación de PCBs podría ser optimizada combinando vías catabólicas de clorobifenilos y clorobenzoatos, en un solo microorganismo. Esta idea fue propuesta hace ya varios años atrás (Furukawa y Chakrabarty, 1982; Reineke, 1998). Diversas bacterias recombinantes se han construido con las dos vías catabólicas, ya sea *in vivo* (Mokross *et al.*, 1990; Havel y Reineke, 1991; Focht *et al.*, 1996; Hofer *et al.*, 1996) o *in vitro* (Hrywna *et al.*, 1999). Sin embargo, las cepas recombinantes construidas no han sido eficientes, debido a bajas tasas de crecimiento, capacidad degradativa restringida y precario conocimiento de las vías catabólicas involucradas.

La combinación de vías metabólicas es un problema complejo. No es suficiente incorporar a un microorganismo determinado los genes adecuados para que la operación sea exitosa. Los fenómenos degradativos son procesos que dependen del establecimiento de un frágil equilibrio, finamente regulado, con el fin de evitar la acumulación de intermediarios no deseados o tóxicos.

La coexistencia de vías *orto* y *meta* para la degradación de cloroaromáticos ha sido descrita como problemática. El rompimiento *meta* del 3-clorocatecol, un intermediario de la degradación *orto* del 3-CBA, genera un compuesto altamente reactivo, capaz de formar enlaces covalentes con las enzimas que lo producen inactivándolas irreversiblemente (Reineke *et al.*, 1982; Bartels *et al.*, 1984; Arensdorf y Focht, 1994). Además, el rompimiento *meta* del 4-clorocatecol, otro intermediario de la vía *orto* de los CBAs, produce semialdehídos que generalmente no son degradados, por lo que representa una ruta metabólica improductiva desde el punto de vista energético (Arensdorf y Focht, 1994) (Fig. 4). Luego, combinar la vía *meta* de los bifenilos (vía superior) con una vía *orto*-modificada de clorobenzoatos puede representar un problema, más aún considerando que la enzima 2,3-dihidroxibifenil 1,2-dioxigenasa (BphC) de LB400, es capaz de atacar clorocatecoles (Eltis *et al.*, 1993; Vaillancourt *et al.*, 2002). La supuesta incompatibilidad entre vías *meta* y *orto* no es absoluta, dependiendo en gran medida de las variables impuestas por cada sistema. La intensidad relativa de los flujos catabólicos puede ser un factor clave, controlando los niveles de intermediarios problemáticos. Las características de los sistemas enzimáticos involucrados también determinan el nivel de incompatibilidad. Se ha descrito, por ejemplo, la existencia de una vía *meta* para la degradación completa de 3-clorocatecol en *Pseudomonas putida* GJ31 y 4-clorocatecol en *Pseudomonas cepacia* P166 (Arensdorf y Focht, 1995; Kaschabek *et al.*, 1998; Mars *et al.*, 1999).

La combinación de los sistemas catabólicos para la degradación completa de PCBs presentes en *Burkholderia xenovorans* LB400 y *Ralstonia eutropha* X3 marca una gran ventaja comparativa, por ser éstos altamente eficientes y estar ampliamente caracterizados.

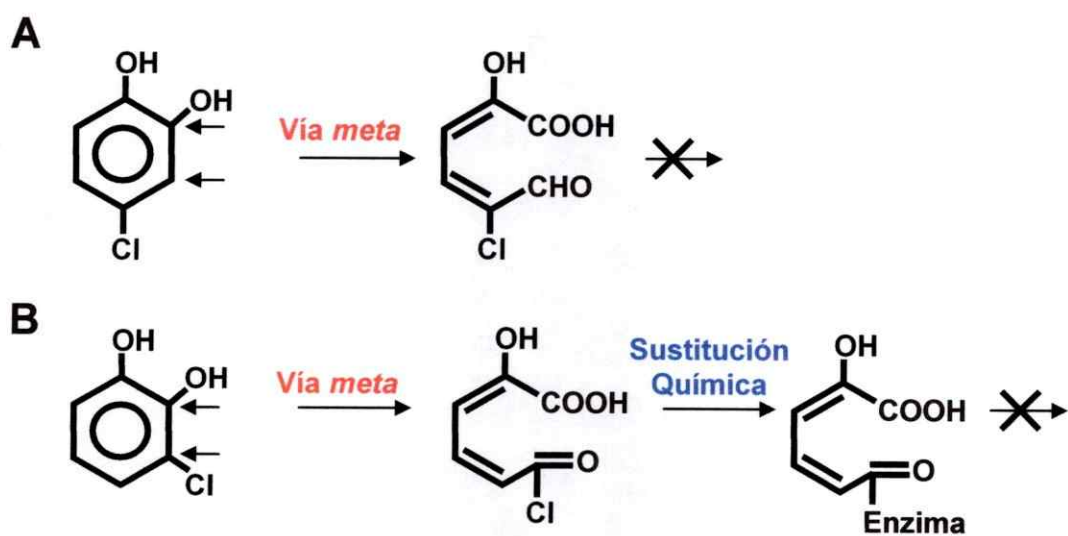


Figura 4. Rutas metabólicas improductivas generadas a través del rompimiento en *meta* del anillo aromático de los clorocatecoles. A, 4-clorocatecol. B, 3-clorocatecol.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Se postula que la incorporación del locus *bph* de la bacteria *Burkholderia xenovorans* LB400, que codifica una vía catabólica de clorobifenilos, a una cepa degradadora de clorobenzoatos (CBAs), permite generar una cepa recombinante capaz de mineralizar clorobifenilos (CBs) sin acumular CBAs.

OBJETIVO GENERAL

Construir una cepa bacteriana capaz de degradar policlorobifenilos (PCBs) y clorobenzoatos (CBAs), por medio de la combinación de las vías catabólicas de los clorobifenilos y clorobenzoatos provenientes de las cepas *Burkholderia xenovorans* LB400 y *Ralstonia eutropha* X3.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Generar una bacteria recombinante mediante la incorporación del locus genético *bph* de *Burkholderia xenovorans* LB400 en el genoma de *Ralstonia eutropha* X3.
- Estudiar el crecimiento de las cepas recombinantes obtenidas, usando bifenilo y CBAs como fuente de carbono.
- Caracterizar genéticamente las cepas recombinantes de interés, determinando la presencia, estabilidad y número de copias del locus *bph* en su genoma.
- Determinar los niveles de expresión de los genes claves en el catabolismo de PCBs y CBAs mediante la medición de las respectivas actividades enzimáticas.
- Caracterizar una cepa recombinante en relación a su capacidad para degradar CBAs y PCBs.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MATERIALES

2.1.1 Reactivos

Los CBAs (98%) se adquirieron en Fluka AG (Buchs, Suiza) o Lancaster Síntesis (Reino Unido). Bifenilo (99%), alcohol isoamílico y cloroformo se adquirieron de Merck (Darmstadt, Alemania). La ampicilina se obtuvo de Sigma (Steinheim, Alemania), la kanamicina de Calbiochem (Darmstadt, Alemania). Reactivo de Bradford y didesoxinucleótidos (dNTPs) fueron adquiridos en Winkler (Santiago, Chile). Taq ADN polimerasa se adquirió en GeneLab (Santiago, Chile), la endonucleasa de restricción *SacI* y los marcadores de peso molecular de ADN (1kb DNA extensión Ladder) provienen de Invitrogen (Carlsbad, Estados Unidos).

2.1.2 Cepas bacterianas

- *E. coli* cepa DH5 α : F⁻, *endA1*, *hsdR17*, *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *gyrA96*, *relA1*, *deoR*, Δ (*lacZYA-argF*), U169 (*lacZ* Δ M15). Resistencia a ácido nalidíxico (Ausubel *et al.*, 1992).
- *E. coli* SM10 (λ pir): *thi-1*, *thr*, *leu*, *tonA*, *lacY*, *supE*, *recA::RP4-2-Tc::Mu*, λ pir. Resistencia a Kanamicina. Cepa que contiene plásmido pT5K012.
- *Burkholderia xenovorans* LB400, cepa silvestre degradadora de PCBs (Bopp, 1986).
- *Ralstonia eutropha* X3, cepa recombinante degradadora de CBAs, derivada de *Ralstonia eutropha* JMP134 (Ledger *et al.*, 2002).

2.1.3 Plásmidos

- pT5K012: plasmidio de integración cromosomal derivado de pUT-kan, con el locus *bph* clonado entre los límites de un transposón del tipo mini-Tn5 (Dowling *et al.*, 1993; Hofer *et al.*, 1996).
- pSPM100: plasmidio de integración cromosomal derivado de pUT-telurito, con los genes *xyiXYZL* y *xyiS* clonados entre los límites de un transposón del tipo mini-Tn5 (de Lorenzo *et al.*, 1990).

2.1.4 Medios de cultivo

2.1.4.1 Medio Luria-Bertani

El medio LB contiene por cada 100 ml de solución: 1g de triptona, 0,5 g de extracto de levadura y 0,5 g de cloruro de sodio por cada 100 ml de solución. Se esteriliza por autoclave y puede ser almacenado a temperatura ambiente.

2.1.4.2 Medio mínimo Ksal

Se empleó un medio salino libre de cloruro denominado Ksal, que contiene sales de amonio y fosfato, además de concentraciones trazas de minerales (Adriaens *et al.*, 1989). Este medio permite efectuar la cuantificación de cloruro.

La solución de Ksal se preparó por dilución en agua estéril de las soluciones stock K, M, F y T, cuya composición fue la siguiente:

Solución K (100 X): 40 g/l de KH_2PO_4 , 160 g/l de K_2HPO_4 y 50 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, pH final aproximado a 7,2. Solución esterilizada en autoclave.

Solución M (400 X): 80 g/l de MgSO_4 . Solución esterilizada en autoclave.

Solución F (1000 X): 2 g/l de $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$. Esta solución se acidifica con ácido sulfúrico hasta pH 2-3 y se esteriliza por filtración con filtros de nitrocelulosa de 0,2 μm Millipore (Bedford, MA, USA).

Solución T (1000 X): 2 g/l de $\text{CaSO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g/l de $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 0,2 g/l de $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g/l de $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,12 g/l de $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g/l de $\text{NaMoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,05 g/l de H_3BO_3 . Solución esterilizada por filtración con filtros de nitrocelulosa de 0,2 μm .

2.1.4.3 Medios sólidos

Para la preparación de placas con medio sólido se agregó a los medios líquidos agar al 1,5% P/V. En el caso de las placas de medio mínimo suplementado con una única fuente de carbono, se utilizó un agar de alta pureza (Agar Noble). Los antibióticos y las fuentes de carbono se esterilizaron por filtración antes de ser agregados al medio de cultivo.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Cultivo de microorganismos

2.2.1.1 Mantención de microorganismos

Las cepas de *E. coli* se mantuvieron en placas con medio LB en agar al 1,5% p/v, suplementado con los antibióticos correspondientes. Las cepas de *Ralstonia eutropha* y *Burkholderia xenovorans* se mantuvieron en placas con medio salino mínimo Ksal en agar ultrapuro al 1,5% p/v, suplementado con un compuesto aromático como única fuente de carbono y energía, o de manera similar a las cepas de *E. coli*. Las cepas stock se mantuvieron a 4°C y traspasaron a placas frescas cada 30 días. Para el almacenamiento de las cepas por períodos largos, éstas se criopreservaron a -80°C en medio salino mínimo Ksal con glicerol al 25% v/v.

2.2.1.2 Crecimiento de cepas en cultivos líquidos

Las cepas de *E. coli* se inocularon en medio líquido LB suplementado con los antibióticos requeridos, y se incubaron a 37°C en un agitador orbital hasta alcanzar la D.O. deseada.

Las cepas de *Ralstonia eutropha* se crecieron en medio mínimo salino Ksal suplementado con fructosa, compuestos aromáticos o en medio rico LB, eventualmente en presencia de antibióticos (kanamicina 75 µg/ml; ampicilina 100 µg/ml, merbromin 0,5 mg/ml). La incubación se realizó a 30°C en agitador orbital.

En el caso de los cultivos con bifenilo como única fuente de carbono, éste se agregó disuelto en acetona al recipiente. Luego, se dejó evaporar la acetona para agregar el medio mínimo Ksal y el inóculo bacteriano correspondiente. Esto se efectúa ya que el bifenilo no es soluble en medio acuoso.

2.2.2 Incorporación de material genético en células huésped

Para la construcción de cepas recombinantes derivadas de *Ralstonia eutropha* X3, fue necesario incorporar material genético en células receptoras mediante la técnica de conjugación biparental. A su vez, el material genético de interés se insertó en el cromosoma de las células

huésped por medio de transposición. En efecto, el locus *bph* se encuentra clonado entre los límites de un sistema de transposición conservativo mini-Tn5 (DeLorenzo *et al.*, 1990).

2.2.2.1 Conjugación biparental

Para incorporar en *R. eutropha* X3 el vector plasmidial derivado de pUT-kan (mini Tn5), pT5K012, se utilizó la técnica de conjugación biparental. Esta técnica también se usó para traspasar el plásmido catabólico pJP4 desde distintas cepas de *R. eutropha* hacia la cepa receptora *E. coli* DH5 α .

Las cepas dadoras y receptoras se crecieron en 2 ml de medio LB usando agentes de selección apropiados. Se centrifugó 1 ml de dadora y 1 ml de receptora durante 2 min a 6000 rpm (en centrifuga de mesón). Las células dadoras y receptoras sedimentadas se lavaron tres veces con agua estéril. Las células dadoras se resuspendieron en 100 μ l de agua estéril y esta suspensión se usó para resuspender las células receptoras. Finalmente, la suspensión celular obtenida se depositó sobre una placa de agar LB, sin ningún tipo de selección. Las placas se incubaron a 30°C por toda la noche. Al día siguiente, una fracción de las células crecidas en la placa se suspendieron en un volumen entre 400 μ l y 1000 μ l de agua estéril. La suspensión final se diluyó en caso necesario, y alícuotas de 100 μ l se sembraron en placas de selección (agar LB en presencia de los agentes de selección merbromin/kanamicina para *R. eutropha* y merbromin/ácido nalidíxico para *E. coli*) con el fin de obtener las cepas receptoras que hubieran adquirido el ADN de interés.

2.2.3 Métodos de biología molecular

2.2.3.1 Extracción del ADN total

Para extraer el ADN total de las cepas bacterianas, se utilizó el kit "Wizard Genomic DNA Purification Kit" de Promega (Madison, EE.UU.). El protocolo de extracción con este kit se basa en la lisis de las células a alta temperatura (80°C), la precipitación de las proteínas a altas concentraciones salinas y la precipitación y posterior purificación del ADN con isopropanol. El ADN obtenido es de alta pureza y puede ser empleado directamente en otras técnicas de biología molecular tales como amplificación por PCR o hibridización Southern.

2.2.3.2 Extracción de ADN plasmidial

Para obtener ADN plasmidial se utilizó el kit QIAprep Spin Plasmid, QIAGEN Inc. (Chatsworth, EE.UU.). Este kit está basado en el método de lisis alcalina (Birboim y Doly, 1979), y en la unión específica del ADN a sílica en presencia de una elevada concentración salina. El protocolo consta de tres etapas principales: lisis celular con SDS y NaOH, adsorción del ADN a una columna de sílica y lavado/elución del ADN.

2.2.3.3 Amplificación del ADN por PCR

2.2.3.3.1 Mezcla de reacción

Para preparar la mezcla de reacción usada para la amplificación de ADN por PCR, se empleó soluciones stock de tampón para *Taq* ADN polimerasa (10 X), partidores específicos (50 μ M), mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTPs) (2,5 mM c/u) y $MgCl_2$ (50 mM). Para las reacciones de PCR se utilizó una concentración de 2 μ M para cada partidor, 0,25 mM para los dNTPs y 1,5 mM para el $MgCl_2$. Se usó 1,5 U de *Taq* ADN polimerasa y 1 μ l de ADN templado.

2.2.3.3.2 Partidores y programas de amplificación

El diseño de los partidores para PCR se realizó basado en las secuencias de los genes *bphC*, *bphD*, *xyIX* y *tnp* (transposasa) previamente publicadas (Berg *et al.*, 1989; Hofer *et al.*, 1993; Greated *et al.*, 2002) Los números de acceso en la base de datos GeneBank de algunos de estos genes son: X66122 (*bphC*), X66123 (*bphD*) y AJ344068 (*xyIX*). Para la amplificación de un fragmento de *bphC* se utilizó los partidores *bphC*1: 5'-TTTGGGATACATGGGGTTTGC-3' y *bphC*2: 5'-TGTTGTTTCATGCTTTGTTGCG-3'. Para la amplificación de un fragmento de *bphD* se utilizó los partidores *bphD*1: 5'-AAATGACCGCACTCACCGAAA-3' y *bphD*2: 5'-TGCCGCAGGAAGTCAATCA-3'. Para la amplificación de un fragmento de *xyIX* se utilizó los partidores *FwxyIX*: 5'-ATGCACCTGGGGCTCG-3' y *RevxyIX*: 5'-ACACGCCCTCCGCATG-3'. Finalmente, para la amplificación de un fragmento de *tnp* se utilizó los partidores TNP480: 5'-GCGCTGGGTGATCCTCGCCG-3' y TNP120: 5'-GCGCAGGCTCAAGCTCGC-3'.

Se agradece al Dr. Victor deLorenzo y al Dr. Berndt Hofer por facilitar los partidores específicos para *xyIX* y *tnp*, respectivamente.

Para amplificar las sondas *bphC* y *bphD* y el gen *xyIS162*, se usó el siguiente programa: un ciclo de desnaturación (5 min a 95°C), 35 ciclos de amplificación (45 s a 95°C, 45 s a 58°C y 2 min a 72°C) y un ciclo de extensión final (10 min a 72°C). Para la amplificación del gen *xyIX* se utilizó el mismo programa, pero con una temperatura de hibridización de 55°C. Para la amplificación del gen de la transposasa de los vectores pT5K012 y pSPM100 se empleó una temperatura de hibridización de 60°C.

Para realizar las distintas reacciones de amplificación se utilizó un termociclador Perkin-Elmer modelo Gene Amp PCR System 2400.

2.2.3.4 Digestión del ADN

Para digerir el ADN se usaron endonucleasas de restricción según protocolos estándares (Ausubel *et al.*, 1992). El ADN genómico bacteriano se digirió durante toda la noche.

2.2.3.5 Hibridización Southern

2.2.3.5.1 Obtención de las sondas

Se utilizó dos sondas complementarias a los genes *bphC* y *bphD* para efectuar los ensayos de hibridación Southern. Las sondas se amplificaron por PCR usando como templado el plásmido pT5K012 y purificaron por precipitación con etanol, con el fin de separarlas de los partidores usados en la reacción de PCR.

2.2.3.5.2 Marcación de las sondas

La hibridación Southern del ADN total de las cepas de *R. eutropha* estudiadas se llevó a cabo haciendo uso de sondas marcadas por el sistema "Random Primer DNA Biotinylation" de KPL, Inc. (Gaithersburg, EE.UU.). Este sistema se basa en la amplificación del ADN usando el fragmento Klenow de la ADN polimerasa, con partidores al azar de 6 nucleótidos y en la incorporación de dCTP biotinilado a las nuevas moléculas de ADN generadas. Se utilizó como sondas, fragmentos de ADN amplificados por PCR y purificados desde geles de agarosa.

Se tomaron 24 μ l de la solución de ADN junto con 20 μ l de solución de partidores (2,5 X). Se desnaturalizó el ADN templado y los partidores calentando la muestra a 95°C por 5 min. Inmediatamente después, la muestra se incubó en hielo, donde se le agregó 5 μ l de una mezcla de dNTPs (10 X) con dCTP biotinilado y 1 μ l del fragmento Klenow de la ADN polimerasa. La mezcla final se incubó a 37°C por 2 h. Al cabo de este tiempo, se agregaron 5 μ l de tampón de término, con lo cual se detuvo la reacción de polimerización.

2.2.3.5.3 Preparación del gel y electrotransferencia a membrana

El ADN total de las cepas, digerido con la endonucleasa *SacI* se sometió a una electroforesis en gel de agarosa. Después de ser fotografiado, el gel se desnaturalizó mediante dos incubaciones de 10 min en una solución de NaCl 1,5 M y NaOH 0,5 M. Posteriormente se lavó con agua destilada, y se neutralizó por 20 min en amortiguador TAE (TAE 10 X: Tris 0,4 M, EDTA 0,01 M, ácido acético 0,2 M).

Para la electrotransferencia se usó una membrana de nylon marca BioRad modelo "Zeta-Probe GT" de aproximadamente el mismo tamaño que el gel. Antes de la transferencia, la membrana se incubó en amortiguador TAE (0,5 X) por 5 min.

La transferencia se realizó en amortiguador TAE 0,5 X a una tensión eléctrica de 80 V por 4 h, utilizando una cámara BioRad "Trans-Blot Cell". Para evitar el recalentamiento del sistema, se usó un dispositivo de recirculación de agua fría.

Después de la transferencia, se extrajo la membrana del cassette de transferencia, se dejó secar a temperatura ambiente y se incubó por 1 h a 80°C para fijar el ADN. Una vez fijada, la membrana se guardó a temperatura ambiente hasta ser hibridizada con las sondas de interés.

2.2.3.5.4 Hibridización

Para efectuar la prehibridización, se colocó la membrana con el ADN transferido en un frasco, en presencia del amortiguador de hibridización con formamida provisto en el kit "DNA Detector HRP Southern Blotting Kit" de KPL Inc. (Gaithersburg MD, EE.UU.), al cual se le agregó ADN de espermio de arenque desnaturalizado, en una concentración final de 200 μ g/ml. La

membrana se incubó de esta manera en un homo con rotación Hybaid (Franklin, EE.UU.) a 42°C por 16 h aproximadamente.

Posteriormente, se procedió a la hibridización, para lo cual se utilizó la misma solución, a la cual se agregó la sonda previamente desnaturalizada a 100°C por 10 min. La membrana se incubó con la sonda a 42°C por 16 h. Todas las incubaciones se hicieron con rotación constante.

Para eliminar la sonda en exceso, se realizó una serie de lavados: dos veces por 15 min a temperatura ambiente en una solución SSPE 2 X (NaCl 3M, NaH₂PO₄ 20 mM y EDTA 2 mM pH 7,4) y SDS al 0,1%, dos veces por 15 min a 55°C en una solución SSPE 0,2 X y SDS al 0,1% y finalmente 5 min a temperatura ambiente en una solución SSPE 2 X para remover el SDS residual.

Después del lavado, se realizó el bloqueo de los sitios inespecíficos de unión a proteína incubando la membrana a temperatura ambiente por 45 min en la solución de bloqueo al 1%, provista en el kit. Posteriormente, se agregó al medio de incubación el conjugado estreptavidina-fosfatasa alcalina en una dilución 1:500, y se incubó por 30 min adicionales. La membrana se lavó 3 veces por 5 min a temperatura ambiente con un amortiguador de lavado final (Tris-base 100 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ x 6 H₂O 50 mM, pH 9,5).

Finalmente, el revelado se realizó incubando la membrana por 1 min en la solución de sustrato de fosfatasa alcalina "LumiGLO", y se expuso a un film fotográfico tipo "Hyperfilm ECL" de Amersham Life Science (Buckinghamshire, Inglaterra) entre dos hojas de mica transparente, en oscuridad por 15 min aproximadamente, a temperatura ambiente. El film se reveló con las soluciones de revelado correspondientes.

2.2.4 Degradación de clorobenzoatos (CBAs)

Se evaluó la transformación de CBAs por suspensiones celulares de *R. eutropha* X34 creciendo en medio mínimo Ksal suplementado con fructosa 5 mM. Al alcanzar los cultivos la fase exponencial de crecimiento (D.O._{600 nm} de 0,7), se agregó el CBA en estudio, a una concentración final de 0,5 mM y se tomaron alícuotas de 1 ml a diversos tiempos. Las alícuotas obtenidas se procesaron en el momento, o se guardaron a -20°C.

El procesamiento de las muestras consistió en una centrifugación a 20.000 g. Se tomaron 500 μ l del sobrenadante. Las muestras se guardaron a -20°C hasta el análisis analítico.

2.2.5 Degradación de PCBs

2.2.5.1 Cinética de degradación

Se evaluó la transformación de PCBs por suspensiones celulares en reposo de *R. eutropha* X34. Para esto se realizaron cultivos de 80 ml con células en fase exponencial de crecimiento, utilizando bifenilo 2 mM como fuente de carbono y energía. Las células se lavaron 3 veces con medio mínimo Ksal, a través de centrifugaciones sucesivas, para finalmente ser resuspendidas en 8 ml del mismo medio. Paralelamente, se prepararon 8 tubos con cada uno de los PCBs estudiados (ver cultivos líquidos con bifenilo) a una concentración final de 250 μM en duplicado. Se repartió 1 ml de la suspensión celular concentrada 10 veces en cada uno de los tubos, que a su vez se incubaron por 24 h en un agitador orbital a 30°C y una velocidad de agitación de 350 rpm. Al cabo de este tiempo se procedió al procesamiento de los cultivos para poder obtener muestras para análisis por HPLC.

Uno de los duplicados para cada PCB estudiado se destinó al análisis de los compuestos en fase acuosa, es decir los CBAs que eventualmente puedan haberse acumulado durante el período de incubación. Para esto, se efectuó el mismo tratamiento ya descrito para el análisis de CBAs. El contenido de los tubos restantes se sometió a extracciones orgánicas para obtener y posteriormente cuantificar los PCBs, compuestos insolubles en agua.

2.2.5.2 Extracción orgánica

Para realizar la extracción orgánica de las muestras, se adicionó un volumen de hexano y se agitó vigorosamente por inversión y por vórtex durante 1 min. Después de la agitación y una vez estabilizada la interfase entre las fases orgánicas y acuosas, se rescató la fase superior desde el tubo, cuidando de no tomar parte de la fase acuosa. Esta operación se repitió dos veces más con el fin de aumentar el rendimiento de la extracción. Se obtuvo un volumen de aproximadamente 2,5 ml de fase orgánica. El siguiente paso consistió en evaporar todo el hexano usando una corriente de gas nitrógeno inerte, y agregar un volumen conocido del mismo

solvente para así poder cuantificar los PCBs por HPLC. El volumen final de hexano agregado fue de 1 ml y las muestras se guardaron a -20°C hasta el estudio analítico. Cabe señalar que antes de las extracciones, se adicionó a cada tubo fenantreno como estándar interno, a una concentración final de $500\ \mu\text{M}$. Todas las manipulaciones con solventes orgánicos durante este protocolo se realizaron con material de vidrio, para evitar contaminaciones por plásticos.

2.2.6 Análisis por HPLC

Se utilizó un sistema HPLC marca Beckman modelo System Gold equipado con un detector de arreglo de diodos y una columna Lichrosphere RP-C18 de $5\ \mu\text{m}$ de espesor de film, 150 mm de largo y 4,6 mm de diámetro marca Supelco (Bellefonte, USA).

Para el análisis de CBAs, la fase móvil utilizada fue una mezcla de metanol 80%, ácido ortofosfórico 0,5% y agua 19,5%, previamente desgasificada. La bomba del equipo se operó con un flujo de 1 ml/min y el detector se programó para cuantificar longitudes de onda de 230 nm. Los CBAs se cuantificaron por comparación con estándares auténticos de alta pureza.

Para el análisis de PCBs se utilizó una fase móvil compuesta por acetonitrilo 80% y agua 20%, previamente desgasificada. El equipo se operó con un flujo de 1 ml/min y programó para cuantificar una longitud de onda de 230 nm. Los PCBs se cuantificaron por comparación con estándares auténticos de alta pureza.

2.2.7 Determinación de actividades enzimáticas

2.2.7.1 Preparación de extractos crudos

Cultivos de 100 ml de *Ralstonia eutropha* X34 se crecieron en bifenilo 2 mM como única fuente de carbono y energía, en agitador orbital a 30°C y 325 rpm. Se agregó un determinado CBA a los cultivos en fase exponencial de crecimiento ($D.O_{600\ \text{nm}}$ de 0,6). Las bacterias se incubaron en presencia de CBAs por 2 h bajo las mismas condiciones de crecimiento, para la inducción de los genes relacionados con el catabolismo de CBAs. Los cultivos se detuvieron en fase exponencial tardía y se centrifugaron a 10.730 g durante 10 min. El sobrenadante se descartó, y las células se resuspendieron en 30 ml de tampón 50 mM Tris-acetato pH 7,5 para determinar la actividad TfdC o tampón fosfato 10 mM pH 7,0 para determinar la actividad BphC.

Después de una serie de tres lavados, las células se resuspendieron en 1 ml del mismo tampón, y sometieron a ruptura por sonicación usando un homogenizador ultrasónico Microson modelo XL2000 (5 ciclos de 15 s, con intervalos de 15 s a una potencia de salida de 6 watts). El producto de la sonicación se centrifugó a 20.000 g por 45 min. El sobrenadante se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones. Finalmente el extracto crudo obtenido luego de la última centrifugación se recolectó, y utilizó directamente para los ensayos de actividad enzimática. Todas las manipulaciones durante el protocolo recién descrito se realizaron a 4°C. Los tampones se enfriaron a 4°C antes de su utilización, y los extractos crudos se mantuvieron siempre en hielo.

Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de producto (μmol) generado por minuto por mg de proteína..

2.2.7.2 Actividad clorocatecol-1,2-dioxigenasa (TfdC)

La actividad clorocatecol-1,2-dioxigenasa se midió por formación de 2,4-dicloromuconato a partir de 3,5-diclorocatecol. La mezcla de reacción en 3 ml de volumen final contenía 3,5-diclorocatecol (3,5-dCC) 50 μM , tampón Tris-acetato 33 mM pH 7,5 y entre 20 μl y 60 μl de extracto crudo. La mezcla fue puesta en una cubeta de cuarzo de 3 ml y la reacción se inició por adición de 3,5-dCC. Se siguió la cinética de la reacción en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 11 a una longitud de onda de 260 nm, que corresponde al máximo de absorción del 2,4-dicloromuconato.

Para el cálculo de las actividades se utilizó el coeficiente de extinción molar del 2,4-dicloromuconato $\epsilon_{260\text{ nm}} = 12.000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Dorn *et al.*, 1978).

2.2.7.3 Actividad dihidroxibifenilo dioxigenasa (BphC)

La actividad dihidroxibifenilo dioxigenasa se midió por la formación de ácido 2-hidroxi-6-oxo-6-fenilhexa-2,4-dienoico (HOPDA) a partir de dihidroxibifenilo (DHB). La mezcla de reacción en 3 ml de volumen final contenía DHB 60 μM , buffer fosfato de potasio 100 mM pH 7,5 y entre 20 μl y 60 μl del extracto crudo. La mezcla se puso en una cubeta de cuarzo de 3 ml y la reacción se inició por adición del sustrato DHB. Se siguió la cinética de la reacción de la misma

forma que en el punto anterior, a una longitud de onda de 434 nm, que corresponde al máximo de absorción del HOPDA.

Para el cálculo de las actividades se utilizó el coeficiente de extinción molar del HOPDA, $\epsilon_{434 \text{ nm}} = 25.700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Seah *et al.*, 2000).

2.2.7.4 Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976). Los extractos crudos se diluyeron de 100 a 200 veces en 1 ml de agua destilada. Se combinó 800 μl de esta dilución, con 200 μl del reactivo de Bradford. La mezcla se incubó por 10 min a temperatura ambiente. Finalmente, se midió la absorbancia de las muestras a 595 nm. Se calculó la concentración de proteínas interpolando las mediciones en una curva de calibración de BSA realizada en un rango de 0 a 25 $\mu\text{g/ml}$.

2.2.8 Cuantificación de cloruro

Para cuantificar cloruro, se empleó un método espectrofotométrico basado en el método del tiocianato de mercurio (Florence y Farrar, 1971). Alícuotas de 200 μl de la solución a cuantificar se mezclaron con 150 μl de una solución de nitrato férrico 0,375 M preparada en 5,25 M de ácido perclórico, y 150 μl de una solución de etanol saturada en tiocianato de mercurio II. Después de incubar por 5 min, se midió la absorbancia de la mezcla a 460 nm. La concentración de cloruro se obtuvo interpolando las mediciones en una curva de calibración de KCl realizada en un rango de 0 a 1 mM.

3. RESULTADOS

3.1 Construcción de bacterias degradadoras de PCBs y clorobenzoatos

En este trabajo se propuso construir una bacteria recombinante capaz de mineralizar PCBs. Como huésped se empleó *Ralstonia eutropha* X3, una bacteria degradadora de CBAs (Ledger *et al.*, 2002). En este microorganismo se insertó el locus *bph* de *Burkholderia xenovorans* LB400 que codifica para la vía catabólica de bifenilo (Erickson y Mondello, 1992). Los genes *bph* se transfirieron al genoma de la cepa X3 mediante el vector suicida pT5K012, derivado de pUT-kan, que contiene el locus *bph* completo y un marcador de resistencia a kanamicina entre los extremos de un transposón mini-Tn5. Dado que el vector pT5K012 es incapaz de replicar en la cepa X3, es posible aislar clones en los que el locus *bph* se ha incorporado al genoma, mediante la aplicación de presiones selectivas.

El vector pT5K012 se transfirió de *E. coli* a *Ralstonia eutropha* X3 por medio de una conjugación bi-parental. Para seleccionar aquellos transconjugantes que incorporaron el locus *bph* a su genoma, se utilizaron placas de medio LB suplementado con merbromin que permite seleccionar el plásmido pJP4 de la cepa X3 y kanamicina que permite seleccionar clones que contienen el mini-transposón Tn5. con los genes *bph*.

En cada placa de medio selectivo usada en la conjugación biparental de los genes *bph*, se obtuvieron en promedio 100 colonias. Se eligieron 9 colonias al azar para una caracterización preliminar.

3.2 Análisis de las capacidades catabólicas de los transconjugantes

La figura 5 muestra el crecimiento de los clones seleccionados en medios de cultivo empleando bifenilo y distintos CBAs como única fuente de carbono y energía. Todos los transconjugantes analizados adquirieron la capacidad de crecer utilizando bifenilo como única fuente de carbono y energía, hasta una densidad óptica (600 nm) superior a 1,0. La cepa parental X3 no es capaz de crecer a expensas de este compuesto. Todas las cepas recombinantes mantuvieron la capacidad de crecer empleando 3-CBA. Sin embargo, del total de transconjugantes, solo dos fueron capaces de crecer en 4-CBA y no hubo clones capaces de

crecer en 3,5-dCBA como única fuente de carbono y energía. Ningún clon recombinante mantuvo las capacidades catabólicas de la cepa parental X3.

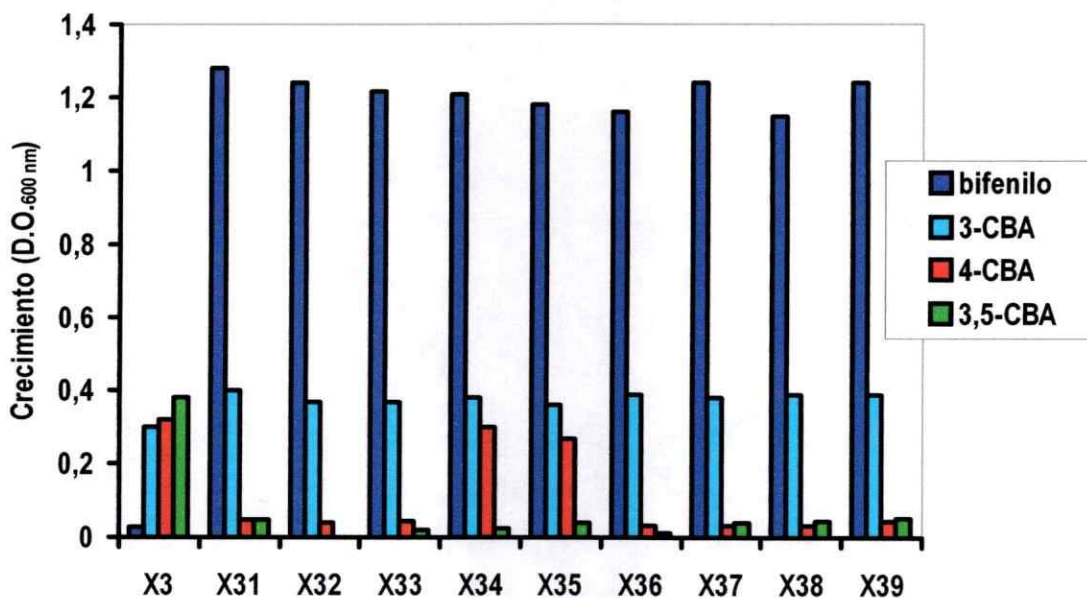


Figura 5. Perfiles de crecimiento de *Ralstonia eutropha* X3 y tranconjugantes en bifenilo y CBAs. Las cepas se cultivaron en medio mínimo K-sal, suplementado con la correspondiente fuente de carbono, a una concentración de 2 mM. En la figura se muestra la D.O._{600 nm} alcanzada por los cultivos después de una incubación de 72 h a 30°C.

Con el fin de determinar si la pérdida de crecimiento observada en los tranconjugantes es atribuible a la acumulación de algún metabolito tóxico, se realizaron estudios de degradación de CBAs. Para esto se agregó 4-CBA o 3,5-dCBA a cultivos en fase exponencial de crecimiento, en un medio de cultivo que contiene fructosa 2 mM como fuente de carbono y energía. Se monitoreó la concentración de CBA en los cultivos a distintos tiempos. Las cepas incapaces de crecer en 4-CBA y 3,5-dCBA no degradaron estos compuestos, descartándose la acumulación de metabolitos tóxicos.

De las cepas recombinantes que demostraron tener las mejores capacidades catabólicas se seleccionó la cepa X34 para una caracterización más extensa. La cepa X31 se seleccionó como modelo para estudiar la pérdida total de funciones otorgadas por el sistema *xyI* evidenciada por el 80% de las cepas recombinantes.

3.3 Caracterización genética de las cepas recombinantes

Un factor clave en los sistemas catabólicos es el número de copias de los genes que codifican para las enzimas involucradas en los procesos degradativos (Perez-Pantoja *et al.*, 2003). Para determinar el número de eventos de integración del locus *bph* en el genoma de las cepas recombinantes X31 y X34, se realizó un ensayo de hibridación Southern empleando ADN total (Fig. 6).

El ensayo Southern se efectuó con dos sondas distintas para confirmar el resultado obtenido, y descartar la posibilidad de que dos bandas con similar movilidad electroforética aparezcan como una sola. Las dos sondas empleadas hibridaron una sola vez con el ADN de las cepas X31 y X34. El control positivo mostró una banda de 15 kilobases aproximadamente, lo que concuerda con el peso del plásmido pT5K012. El ADN de la cepa X3 no hibridizó con las sondas.

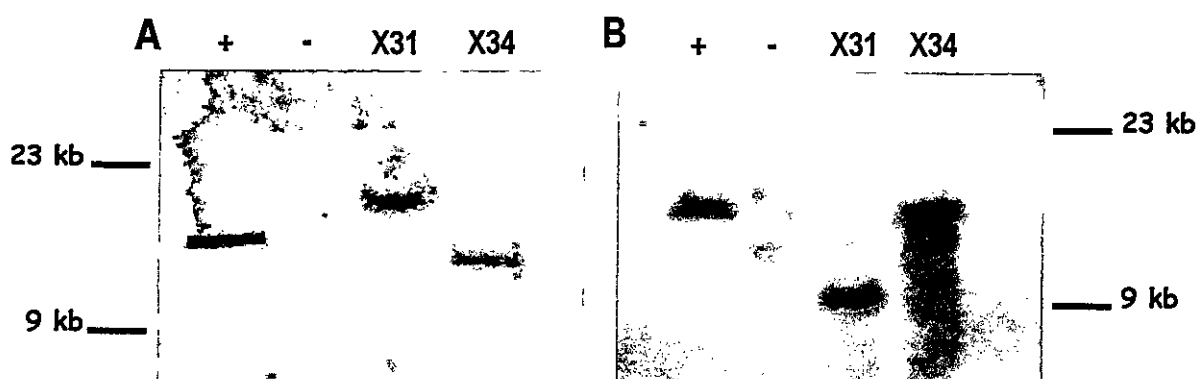


Figura 6. Hibridación Southern de cepas recombinantes derivadas de *Ralstonia eutropha* X3. ADN digerido con *SacI* se hibridizó con las sondas complementarias a *bphC* (A) y *bphD* (B). +, pT5K012 (control positivo); -, ADN total cepa X3 (control negativo); X31 ADN total cepa X31 y X34, ADN total cepa X34.

Este ensayo confirma la presencia física del locus *bph* en las cepas recombinantes estudiadas, producto de un evento único de integración.

Para determinar el número de copias del locus *bph* en las cepas recombinantes se estudió su localización en el genoma. En el cromosoma, el locus *bph* se encontraría en copia única, mientras que en el plásmido pJP4, este número sería igual a la cantidad de plásmidos por célula, es decir aproximadamente 5 en *Ralstonia eutropha* JMP134 (Trefault *et al.*, 2002).

Se traspasó el plásmido pJP4-F3 de las cepas X3, X31 y X34, a *E. coli* DH5 α por medio de una conjugación biparental y se estudió la presencia del locus *bph* en las cepas receptoras seleccionando con merbromín y ácido nalidíxico. La totalidad de los transconjugantes analizados mostraron ser sensibles a kanamicina indicando que el locus *bph* no fue transferido junto al plásmido pJP4-F3. Por consiguiente, los genes *bph* se encuentran integrados en el cromosoma de las cepas X31 y X34.

La estabilidad de un microorganismo modificado genéticamente representa un factor crítico en su manipulación, y determina el potencial riesgo ambiental asociado con su utilización. En relación a esto, se propuso evaluar la estabilidad de los genes *bph* en el genoma de las cepas X31 y X34, cultivadas en medio no selectivo por 100 generaciones. Se inoculó pre-cultivos de cada cepa en medio LB a un 1% V/V. Una vez alcanzada la fase estacionaria de crecimiento, se colectó una alícuota de los cultivos para reinocular medio LB fresco. Esta operación se repitió 10 veces. Cada cultivo independiente representa un crecimiento de 10 generaciones. Ambas cepas mantuvieron la capacidad de crecer en bifenilo, conferida por el locus *bph*, aún después de 100 generaciones creciendo en medio no selectivo, lo que da cuenta de la incorporación estable de los genes *bph* en su genoma.

Por otra parte, se buscó determinar si la integración del locus *bph* en el genoma de las cepas X34 y X31 fue consecuencia de un evento de transposición o de una cointegración del vector suicida pT5K012 completo. Para esto se estudió la presencia del gen *tnp* que codifica para la transposasa del sistema mini-Tn5, propio del esqueleto plasmidial en las cepas mencionadas, por amplificación mediante PCR (Fig. 7).

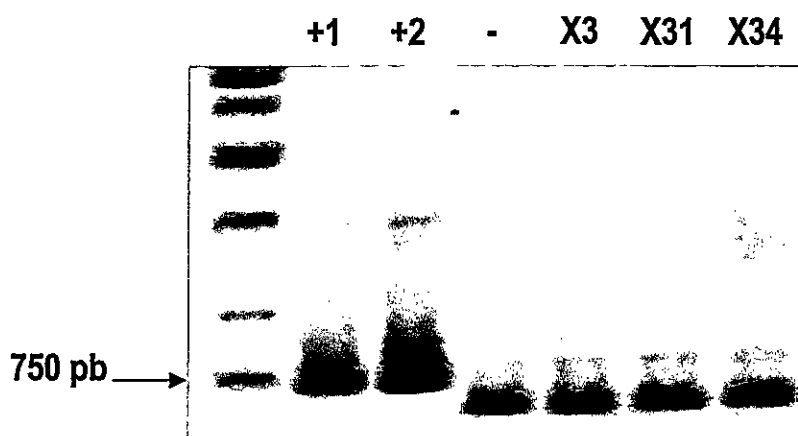


Figura 7. Amplificación por PCR del gen *tnp* desde cepas recombinantes derivadas de *Ralstonia eutropha* JMP134. +1, pSPM100 (control positivo 1); +2, pT5K012 (control positivo 2); -, cepa JMP134 (control negativo); X3, ADN total de cepa recombinante X3; X31, ADN total de cepa recombinante X31; X34, ADN total de cepa recombinante X34.

En los controles positivos utilizados, los plásmidos pSPM100 y pT5K012, se obtuvo un amplicón de 730 kb aproximadamente, que corresponde al tamaño esperado para el gen *tnp*. En el caso de las cepas JMP134, X3, X31 y X34 se amplificó un fragmento de menor tamaño (680 pb) que no debería corresponder al gen *tnp*. Este fragmento debiera ser resultado de una amplificación inespecífica sin embargo su secuencia exacta no fue determinada. Este resultado permite suponer que los genes *xyl* y *bph* fueron incorporados al genoma de *Ralstonia eutropha* por medio de un evento de transposición.

Finalmente, se estudió la presencia de los genes relacionados con las capacidades catabólicas perdidas por las cepas recombinantes, en el genoma de las cepas X31 y X34. Los genes seleccionados fueron *xy/S162*, que codifica para un regulador capaz de reemplazar a XylS en la inducción de los genes *xyl* en respuesta a 3,5-dCBA, y *xyIX*, que codifica para la subunidad catalítica de la enzima toluato-dioxigenasa, responsable de la degradación de 4-CBA y 3,5-dCBA. Se realizó una amplificación mediante PCR de los genes mencionados cuyos resultados aparecen en la figura 8. En todas las cepas recombinantes estudiadas se pudo observar la amplificación de un fragmento de 1800 pb correspondiente al gen *xy/S162* (Fig. 8A). El amplicón

de 1349 pb correspondiente al gen *xyIX* se detectó en las cepas X3 y X34 y no en la cepa X31 (Fig. 8B). Considerando estos resultados, se descarta la eventual interrupción física del regulador *xyIS162* como explicación para la pérdida de capacidades catabólicas en las cepas X31 y X34. La falta de detección del gen *xyIX* en la cepa X31 explica su incapacidad para crecer usando 4-CBA y 3,5-dCBA como única fuente de carbono y energía. Con el fin de complementar el resultado anterior, se realizó un ensayo de sensibilidad a telurito, que es el marcador de selección contenido en el cassette *xyI*, para las cepas X3, X31 y X34. Se inoculó medio LB en presencia de telurito con las cepas mencionadas y evaluó el crecimiento de éstas. Las cepas X3 y X34 fueron capaces de crecer en el medio selectivo. La cepa X31 mostró ser sensible a telurito.

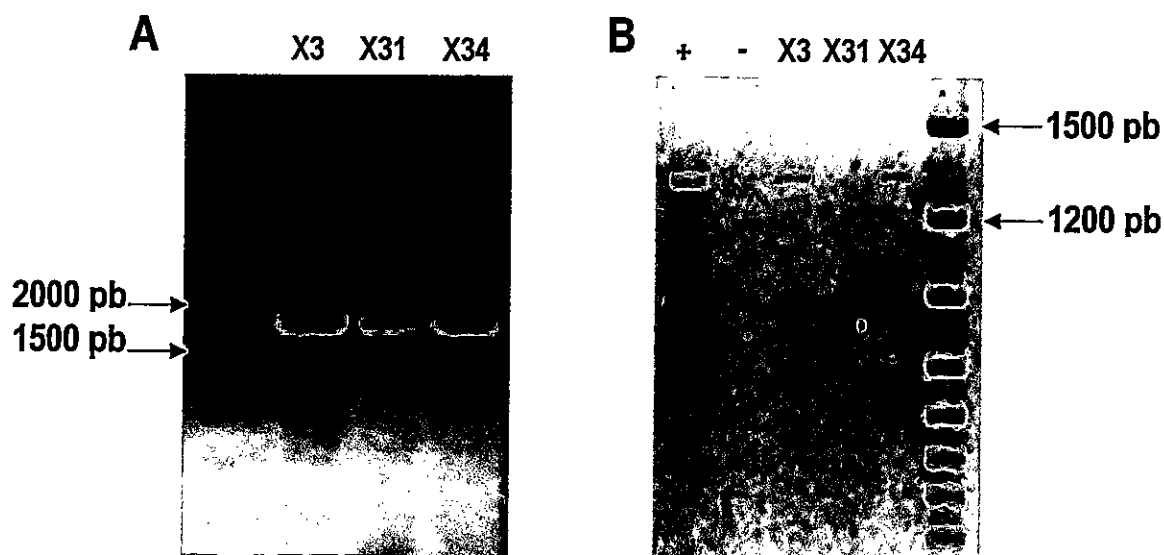


Figura 8. Amplificación por PCR de los genes *xyIS162* y *xyIX* desde cepas recombinantes derivadas de *Ralstonia eutropha* JMP134. A, gen *xyIS162*; B, gen *xyIX*. +, plásmido pSPM100 (control positivo); -, ADN total de cepa JMP134 (control negativo); X3, ADN total de cepa recombinante X3; X31, ADN total de cepa recombinante X31; X34, ADN total de cepa recombinante X34.

3.4 Efecto de CBAs sobre el crecimiento de la cepa X31 en bifenilo

Con el objeto de evaluar el efecto de la presencia de CBAs, sobre el sistema catabólico del bifenilo, se estudió el crecimiento de la cepa X31 usando bifenilo como única fuente de

carbono y energía, en presencia de concentraciones crecientes de 4-CBA y 3,5-dCBA. En el experimento control se empleó fructosa como única fuente de carbono y energía (Fig. 9). La cepa X31 es incapaz de degradar 4-CBA y 3,5-dCBA, por lo que se descartan efectos debidos a la acumulación de metabolitos derivados del catabolismo de CBAs.

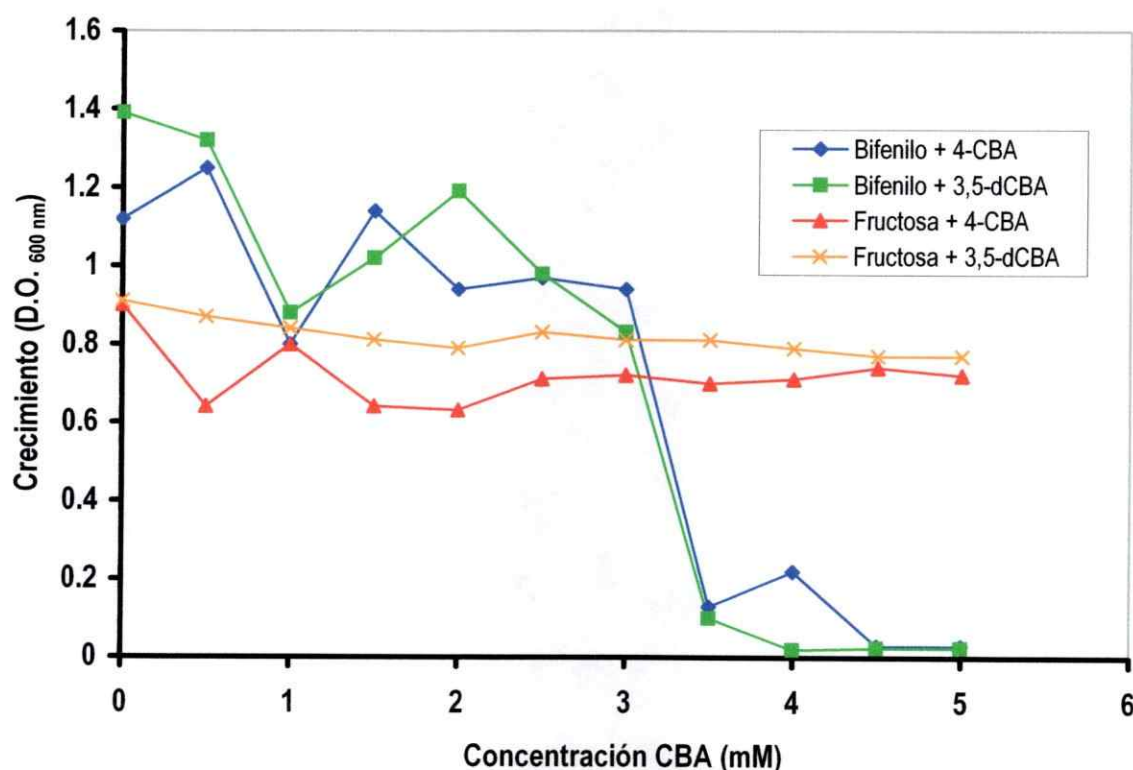


Figura 9. Efecto de clorobenzoatos sobre crecimiento de cepa X31 en bifénilo y fructosa. Las células se cultivaron en medio mínimo K-sal, por 72 h a 30°C utilizando fructosa o bifénilo como fuente de carbono, suplementado con CBA en las concentraciones indicadas.

Se puede observar que el 4-CBA y el 3,5-dCBA en concentraciones mayores a 3 mM afectan negativamente el crecimiento de la cepa X31 en bifénilo. A partir de una concentración de 4 mM, estos CBAs inhiben completamente el crecimiento de la cepa. Este efecto no se observó empleando fructosa como fuente de carbono y energía.

3.5 Crecimiento de la cepa X34 en bifenilo y CBAs

Se caracterizó la capacidad de la cepa X34 para crecer empleando bifenilo y CBAs como única fuente de carbono y energía. Para esto se estudió su crecimiento en un rango de concentraciones de sustrato desde 0 mM hasta 18 mM (Fig. 10).

La cepa X34 fue capaz de crecer en todo el rango de concentraciones de bifenilo estudiadas, alcanzando una densidad óptica máxima a 600 nm de 1,6 a partir de 4 mM. En 3-CBA y 4-CBA, el crecimiento observado estuvo acotado a un rango de concentraciones más pequeño, produciéndose una brusca caída en concentraciones superiores a 10 mM. La densidad óptica máxima alcanzada por la cepa X34 en 3-CBA fue de 1,1 a una concentración de 3-CBA de 8 mM. En 4-CBA, la densidad óptica máxima fue de 1,3 a una concentración de 10 mM. Para todos los compuestos estudiados, se observó un incremento lineal del crecimiento bacteriano con respecto a la concentración de sustrato, antes de alcanzar el máximo. La cepa X34 fue incapaz de crecer en 3,5-dCBA como única fuente de carbono y energía en todas las concentraciones estudiadas.

3.6 Actividades enzimáticas específicas de BphC y TfdC en la cepa X34.

Las enzimas BphC y TfdC juegan un papel clave en el catabolismo de PCBs y CBAs, respectivamente ya que son responsables de la apertura del anillo aromático. Diversos antecedentes bibliográficos indican que existe cierta incompatibilidad entre estas enzimas, al coexistir en un mismo microorganismo (Reineke *et al.*, 1982; Bartels *et al.*, 1984; Brenner *et al.*, 1994; Tsoi *et al.*, 1999). En este contexto, se propuso evaluar la actividad enzimática BphC y TfdC durante el crecimiento de la cepa X34 empleando bifenilo y CBAs, con el fin de evaluar potenciales interferencias.

Se creció la cepa X34 en medio mínimo suplementado con bifenilo 5 mM hasta la fase exponencial de crecimiento. Se adicionó un determinado CBA para alcanzar una concentración final de 0,5 mM, y se incubó el cultivo 2 h más en las mismas condiciones de crecimiento. Finalmente, se prepararon extractos crudos y se midió la actividad enzimática. La condición control sin inducción de los genes *bphC* y *tfdC* se obtuvo empleando fructosa como fuente de carbono y energía.

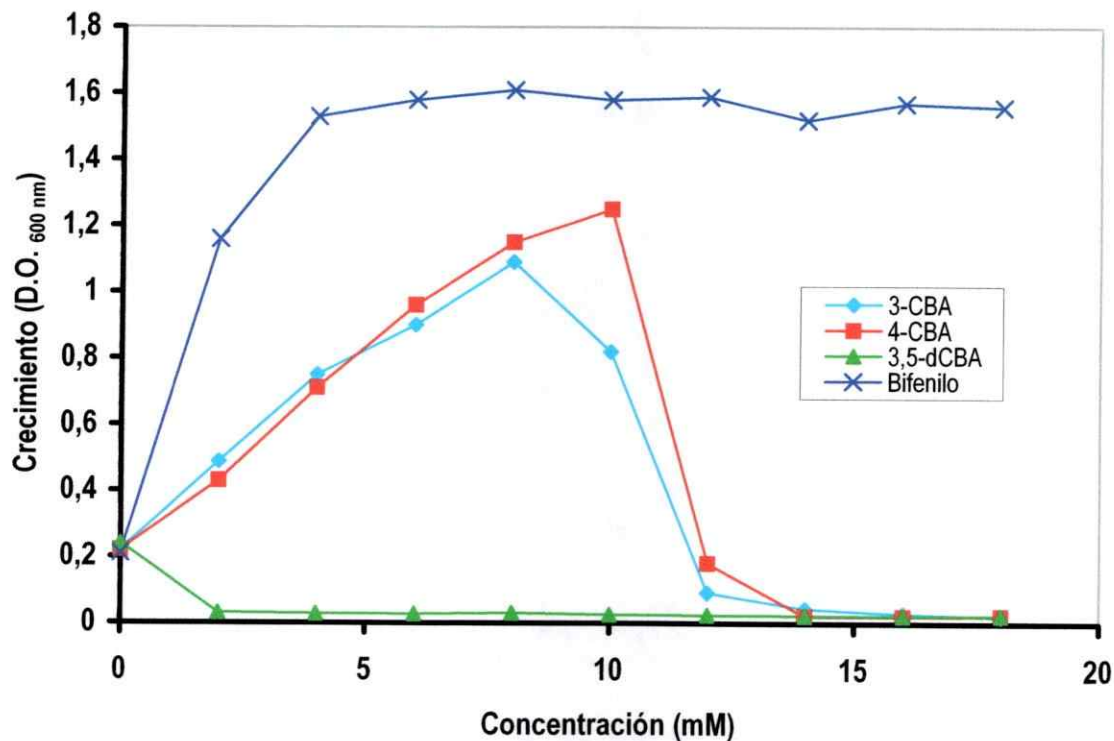


Figura 10. Crecimiento de la cepa recombinante X34 en distintas concentraciones de bifenilo y CBAs. Los cultivos se incubaron por 72 h, hasta la fase estacionaria de crecimiento, en medio mínimo K-sal, suplementado con la correspondiente fuente de carbono a distintas concentraciones.

La Tabla 2 muestra actividades BphC y TfdC en extractos crudos de la cepa X34 crecida en bifenilo y CBAs. La actividad BphC es fuertemente inducida por bifenilo. Cuando la cepa X34 se crece en bifenilo en presencia de 4-CBA, la inducción de BphC es mayor. La actividad TfdC es levemente inducida por bifenilo y aumenta durante el crecimiento en bifenilo en presencia de 4-CBA. En presencia de 3,5-dCBA las actividades BphC y TfdC no se inducen.

En presencia de 3-CBA las actividades observadas tanto de BphC como de TfdC son muy bajas. Esto corresponde a un artefacto experimental. En efecto, durante el crecimiento de la cepa X34 en bifenilo, es probable que se encuentre inducida una actividad benzoato dioxigenasa en respuesta a la presencia de benzoato como metabolito intermedio del catabolismo de bifenilo.

Tabla 2. Actividades enzimáticas específicas de BphC y TfdC en la cepa X34 crecida en distintas fuentes de carbono.

Fuente de Carbono	Actividad Enzimática (U/mg)		Inducción	
	BphC	TfdC	BphC	TfdC
Fructosa	0,003 (0,0007)	0,007 (0,0018)	1	1,0
Bifenilo	0,520 (0,1800)	0,025 (0,0065)	157	3,6
Bifenilo + 3-CBA	0,076 (0,0100)	0,003 (0,0007)	23	0,5
Bifenilo + 4-CBA	1,000 (0,0550)	0,072 (0,0002)	303	10,5
Bifenilo + 3,5-dCBA	0,620 (0,1400)	0,033 (0,0020)	187	4,8

() Error del promedio entre dos mediciones independientes

Esta actividad, dada en la cepa X34 por las enzimas BenABC y/o XylXYZL, podría transformar 3-CBA en 3-CC a una alta tasa, no compensada por la baja actividad residual de la clorocatecol dioxigenasa, detectada en estas condiciones de crecimiento. A pesar que el sistema *tfd* es inducido por 3-CBA, el fenómeno de inducción requiere de un determinado período de tiempo, que permitiría la acumulación de 3-CC hasta niveles tóxicos para la célula.

3.7 Degradación de CBAs por *Ralstonia eutropha* X34.

Para obtener información acerca de las capacidades catabólicas de la cepa X34, se realizó una cinética de degradación de CBAs. Para esto, cultivos en fase exponencial de *Ralstonia eutropha* X34, crecidos usando fructosa como única fuente de carbono y energía, se incubaron con distintos CBAs. La concentración de cada CBA se determinó por HPLC (Fig. 11).

La cepa X34 degrada en forma eficiente 3-CBA y 4-CBA, siendo la tasa de degradación de 3-CBA ligeramente mayor. En concordancia con los estudios de crecimiento descritos anteriormente en estas condiciones, la cepa X34 es incapaz de degradar 3,5-CBA. Sin embargo, en presencia de 3-metil-benzoato, inductor natural de los genes *xylXYZL* (Ramos *et al.*, 1986), la cepa X34 degrada 3,5-dCBA. La degradación de 3,5-dCBA es mas lenta que la degradación de 3-CBA y de 4-CBA.

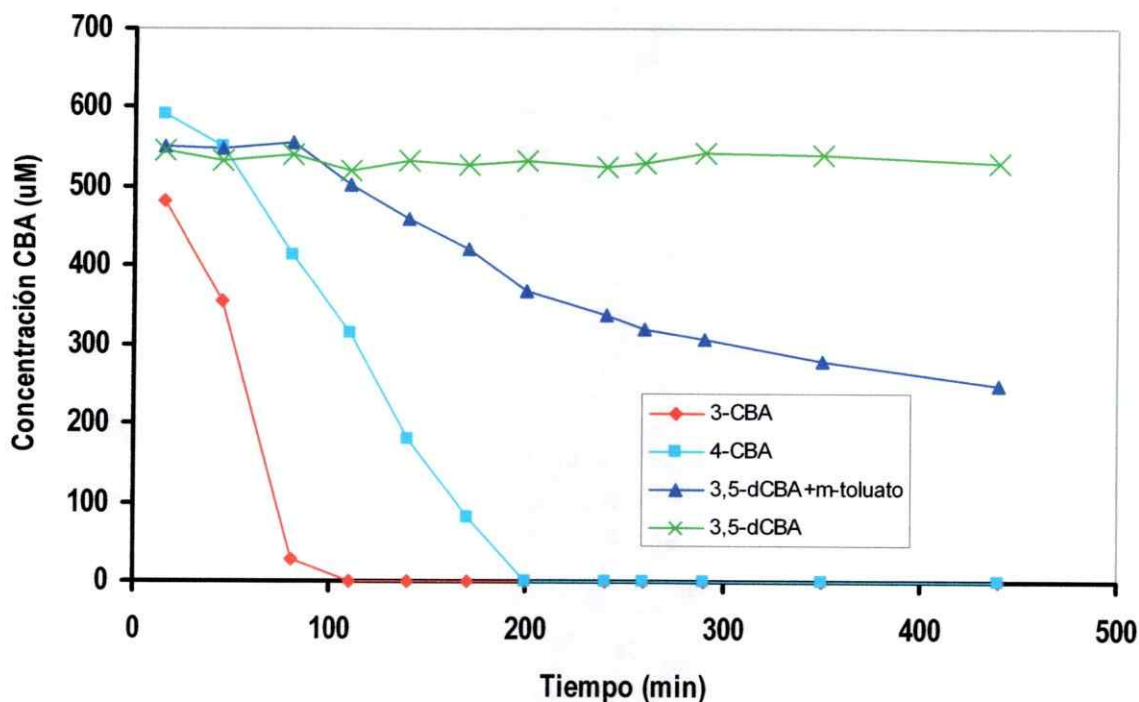


Figura 11. Degradación de clorobenzoatos por la cepa recombinante *Ralstonia eutropha* X34. Se tomaron alícuotas de los cultivos crecidos en fructosa a distintos tiempos de incubación con un determinado CBA. La concentración de cada CBA se determinó por HPLC.

3.8 Degradación de PCBs por *Ralstonia eutropha* X34.

Una vez comprobada la efectividad de la cepa X34 para degradar diversos CBAs y bifenilo, se evaluó su capacidad de catabolizar PCBs. Se estudió la degradación de cuatro congéneres distintos de PCBs: dos bifenilos monoclorados, 3-CB y 4-CB, y dos bifenilos diclorados, 3,5-dCB y 2,4'-dCB.

Células en reposo de la cepa X34 previamente crecidas en bifenilo o en una mezcla de bifenilo con m-toluato (3-metilbenzoato), se incubaron durante 72 h con congéneres de PCBs. Al finalizar el período de incubación, se determinó la concentración de PCB remanente en el medio, el tipo y la concentración de CBA acumulado, y la concentración de cloruro liberado (Tabla 3). La liberación de cloruro es consecuencia de la deshalogenación del sustrato inicial, y por lo tanto representa un buen parámetro para evaluar la degradación de PCBs.

La cepa X34 es capaz de degradar completamente 3-CB, 4-CB y 2,4'-dCB, sin acumular CBAs y liberando cantidades estequiométricas de cloruro. La degradación completa de 3,5-dCB se obtuvo utilizando células en reposo previamente crecidas en presencia de m-toluato. Sin el efecto inductivo ejercido por m-toluato sobre el sistema de genes *xyI*, aproximadamente un 50% del 3,5-dCB existente al inicio de la incubación es acumulado como 3,5-dCBA en el medio.

Tabla 3. Degradación de diversos PCBs monoclorados y diclorados por *Ralstonia eutropha* X34. Células crecidas en bifenilo se lavaron con K-sal, concentraron 10 veces e incubaron con clorobifenilo 0,5 mM por 72 h. Se determinó la concentración de clorobifenilos, clorobenzoatos y cloruro.

Sustrato	Bifenilo			Bifenilo + m-Toluato		
	% CB	% CBA acumulado	% Cloruro liberado	% CB	% CBA acumulado	% Cloruro liberado
3-CB	N.D.	0	115	N.D.	N.D.	91
4-CB	N.D.	0	123	N.D.	N.D.	125
3,5-CB	N.D.	52	76	N.D.	8,6	104
2,4'-CB	N.D.	0	98	N.D.	N.D.	101

N.D. No detectado

Para estudiar más detalladamente el fenómeno degradativo de CBs expuesto en la Tabla 3, se realizó una cinética de degradación para 4-CB, usando cultivos de la cepa X34 (Fig. 11).

En las condiciones experimentales del estudio, la cepa X34 degrada completamente 4-CB en 6 h aproximadamente. La cinética de degradación de 4-CB se correlaciona con la cinética de liberación de cloruro al medio. No se observa acumulación transiente de 4-CBA.

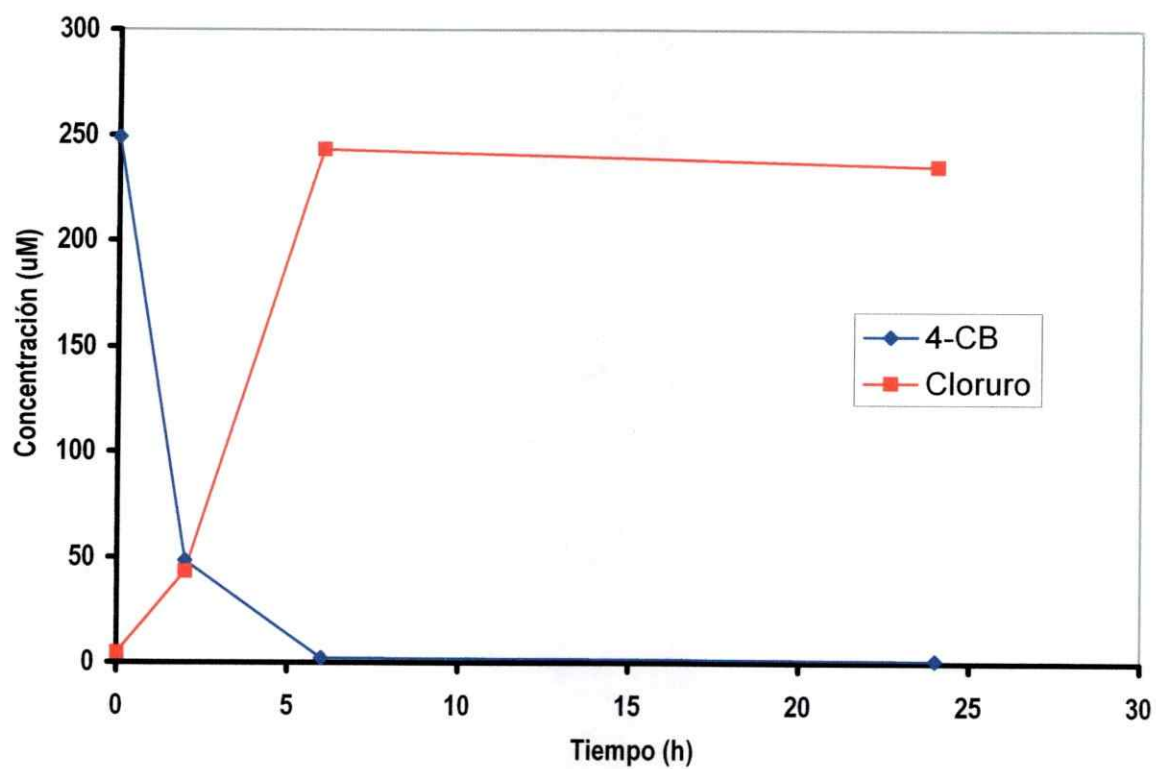


Figura 12. Cinética de la degradación de 4-CB y la liberación de cloruro por la cepa recombinante *Ralstonia eutropha* X34. Células crecidas en bifenilo se lavaron con K-sal, concentraron 10 veces e incubaron con 4-clorobifenilo 0,25 mM. Se determinó la concentración de clorobifenilos, clorobenzoatos y cloruro a distintos tiempos de incubación.

4. DISCUSION

Diversos microorganismos capaces de degradar PCBs han sido aislados desde el medio ambiente (Furukawa y Chakrabarty, 1982; Bopp, 1986; Bedard *et al.*, 1986; 1987; Abraham *et al.*, 2002; Manzano *et al.*, 2003). Sin embargo, la mayoría de estos microorganismos acumulan clorobenzoatos, metabolitos intermedios en el catabolismo de PCBs (Bedard y Haberl, 1990; Stratford, 1996; Seeger *et al.*, 1997, 1999; Rybkina *et al.*, 2003), lo que afecta considerablemente el resultado del proceso degradativo y constituye un problema significativo al diseñar estrategias de biorremediación para PCBs (Blasco *et al.*, 1997). Una solución a este problema es la combinación de las vías catabólicas de PCBs y CBAs en un solo microorganismo. A través de este procedimiento es posible obtener sistemas biológicos capaces de mineralizar PCBs sin acumular metabolitos intermedios.

El objetivo principal de esta tesis fue construir y caracterizar una cepa bacteriana modificada genéticamente capaz de mineralizar PCBs. Para esto, el locus genético *bph* que codifica para la ruta metabólica de degradación de (cloro)bifenilos en *Burkholderia xenovorans* LB400, se incorporó al genoma de la cepa degradadora de CBAs, *Ralstonia eutropha* X3.

Burkholderia xenovorans LB400 degrada PCBs a través de la vía catabólica para CBs codificada por el locus *bph*. Esta vía le confiere a la cepa LB400 la capacidad para degradar CB hasta CBA y acetilCoA. El benzoato generado durante el proceso degradativo del bifenilo se oxida a través de otras vías catabólicas, y constituye una fuente de carbono y energía para la cepa. En el caso de los bifenilos halosustituídos como los PCBs, se genera CBAs como productos de la degradación. A excepción del 3-CBA, la cepa LB400 no degrada CBAs (Potrawfke *et al.*, 1998). Esta incapacidad para dioxigenar CBAs es muy recurrente entre las cepas nativas degradadoras de PCBs. Esto se traduce en la acumulación de CBAs durante el catabolismo de PCBs. Lo anterior puede llevar a la potencial generación de compuestos altamente tóxicos por parte de la microflora ambiental, tales como el antibiótico protoanemonina (Blasco *et al.*, 1995). Se ha observado que la viabilidad de bacterias degradadoras de PCBs en suelos no estériles disminuye considerablemente en presencia de 4-CB, estando este efecto

asociado con la producción de protoanemonina a partir de 4-clorocatecol, intermediario de la degradación de 4-CB, por parte de la microflora ambiental (Blasco *et al.*, 1997). Con el fin de soslayar este problema y optimizar la biorremediación de PCBs, se han llevado a cabo numerosas investigaciones conducentes a la obtención de microorganismos y consorcios microbianos capaces de degradar una amplia gama tanto de PCBs como de CBAs (Mokross *et al.*, 1990; Havel y Reineke, 1991; Adams *et al.*, 1992; Hofer *et al.*, 1996; Potrawfke *et al.*, 1998; Hrywna *et al.*, 1999; Klemba *et al.*, 2000; Rodrigues *et al.*, 2001; Sanggoo *et al.*, 2001). A continuación se describen los resultados de algunos de estos trabajos.

Havel y Reineke (1991) lograron obtener una cepa bacteriana, *Pseudomonas cepacia* JHR22, capaz de mineralizar 2-CB, 3-CB, 4-CB, 2,4-dCB y 3,5-dCB. Esta cepa se obtuvo por conjugación, incorporando genes provenientes de bacterias ambientales degradadoras de PCBs previamente aisladas, a una cepa receptora, *Pseudomonas cepacia* JH230, capaz de degradar una amplia gama de CBAs.

Adams y colaboradores construyeron la cepa recombinante *Pseudomonas* sp. CB15 que es capaz de mineralizar 3-CB (Adams *et al.*, 1992). Este microorganismo se generó mediante trasplante *in vivo* de material genético entre *Pseudomonas* sp. HF1, una cepa degradadora de 3-CBA, y *Acinetobacter* sp. P6, una cepa degradadora de PCBs.

La capacidad catabólica de las cepas JHR22 y CB15 es el resultado de transformaciones genéticas desconocidas, por lo que representa un sistema de difícil manipulación y control. El limitado entendimiento del funcionamiento de las cepas recombinantes recién descritas responde a los métodos empleados en su construcción. Estas cepas derivan de un intercambio genético no caracterizado, tal como ocurre en la naturaleza, donde la aparición de nuevas cepas bacterianas es consecuencia, entre otros factores, del flujo aleatorio de información genética entre células presentes en un ambiente común (Focht *et al.*, 1996).

Hrywna y colaboradores construyeron dos cepas recombinantes VP44(pE43) y VP44(pPC3), capaces de mineralizar 2-CB y 4-CB, respectivamente. Estas cepas se generaron a través de la incorporación de los genes *ohb* de *Pseudomonas aeruginosa* 142 y *pcb* de *Arthrobacter globiformis* KZT1, responsables de la degradación de orto- y para-halobenzoatos,

respectivamente, en el genoma de *Comamonas testosteroni* VP44, una cepa degradadora de PCBs (Hrywna *et al.*, 1999).

Posteriormente, Rodrigues y colaboradores generaron una cepa recombinante capaz de mineralizar 4-CB. Esta bacteria se generó incorporando en el genoma de *Rhodococcus* sp. RHA1, una bacteria Gram-positiva degradadora de PCBs, el operón *pcb* de *Arthrobacter globiformis* KZT1, que codifica para la vía catabólica del 4-CBA (Rodrigues *et al.*, 2001).

Los sistemas recombinantes citados en los dos últimos ejemplos presentan un alto nivel de caracterización por encontrarse los genes manipulados, secuenciados y clonados en vectores conocidos. Sin embargo, presentan una importante limitación al ser capaces de mineralizar sólo un congénere de PCB.

Los resultados obtenidos en la construcción de bacterias recombinantes con capacidades mejoradas para degradar PCBs han sido discretos. Esto se explica por el limitado rango de sustratos catabolizados, y el deficiente entendimiento de los sistemas genéticos involucrados. Una forma de minimizar dificultades como las mencionadas, es utilizar sistemas bien caracterizados, con capacidades catabólicas reconocidas.

En esta tesis se incorporó el locus genético *bph* de *Burkholderia xenovorans* LB400, que codifica para una de las vías de degradación de PCBs más potentes y mejor caracterizadas (Hofer *et al.*, 1993; 1994; Seeger *et al.*, 1995, 1997, 1999, 2001 y Beltrametti *et al.*, 2001), en el genoma de *Ralstonia eutropha* X3, cepa recombinante derivada de *Ralstonia eutropha* JMP134. Por su capacidad para degradar diversos contaminantes cloroaromáticos, la cepa ambiental *Ralstonia eutropha* JMP134 ha sido ampliamente estudiada, y recientemente se ha completado la secuenciación de su genoma (Don y Pemberton, 1985; Pieper *et al.*, 1993; Clément *et al.*, 1995 y Trefault *et al.*, 2004).

El locus *bph* de la cepa LB400 se traspasó al genoma de la cepa X3 a través de una conjugación biparental. De nueve transconjugantes seleccionados, solo dos, X34 y X35, mostraron capacidades degradativas comparables a la cepa parental X3. Para realizar estudios más detallados se eligió finalmente la cepa X34. La figura 12 esquematiza las capacidades catabólicas de la cepa X34. Además se consideró en estos estudios la cepa X31 por haber perdido la totalidad de las capacidades catabólicas conferidas por los genes *xyl*.

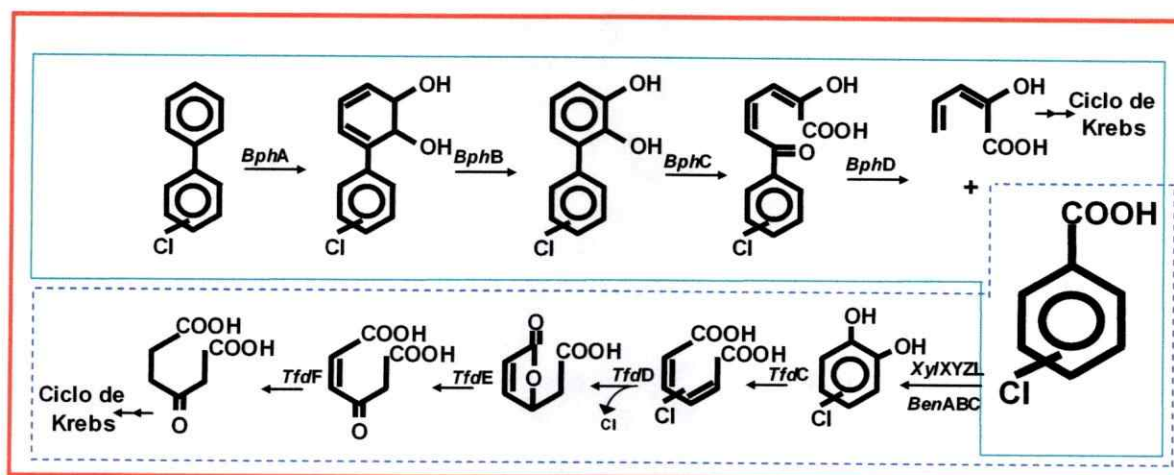


Figura 13. Esquema de las capacidades catabólicas de PCBs y CBAs de *Ralstonia eutropha* X34. La línea continua delgada verde encierra las capacidades de *Burkholderia xenovorans* LB400, la línea punteada azul encierra las capacidades de *Ralstonia eutropha* X3 y la línea continua gruesa roja encierra las capacidades de la cepa recombinante *Ralstonia eutropha* X34.

Considerando los antecedentes acerca de los efectos negativos relacionados con la acumulación de CBAs sobre las bacterias degradadoras de PCBs (Sondossi *et al.*, 1992; Blasco *et al.*, 1995; Vrana *et al.*, 1996), se decidió estudiar el efecto directo causado por ciertos CBAs sobre las células de *Ralstonia eutropha*. La cepa X34, no puede ser utilizada en este estudio, debido a que es capaz de degradar 4-CBA y 3,5-dCBA, lo que impide ver el efecto de los CBAs per se. Para esto se optó por utilizar la cepa recombinante X31, que constituye un excelente modelo de estudio dado a que puede crecer usando bifenilo como única fuente de carbono y energía y es incapaz de degradar CBAs sustituidos en posiciones *meta* y *para*. Se analizó el crecimiento de la cepa X31 empleando fructosa o bifenilo como fuentes de carbono, en presencia de 4-CBA o 3,5-dCBA. Concentraciones de 4-CBA y 3,5-dCBA superiores a 4 mM, impidieron el crecimiento de la cepa X31 en bifenilo, pero no afectaron el crecimiento en fructosa. Esto deja en evidencia un efecto negativo específico sobre el metabolismo de bifenilo en *Ralstonia eutropha* ejercido por estos compuestos. Se ha observado también una disminución en la tasa de crecimiento de *Burkholderia xenovorans* LB400 causada por 2-CBA y 4-CBA (Martínez, 2004).

Se evaluó la estabilidad, el número de copias y la ubicación del locus *bph* en el genoma de las cepas bacterianas X34 y X31. El locus *bph* se mantiene estable por más de 100 generaciones en ambas cepas recombinantes creciendo en condiciones no selectivas. Mediante hibridación Southern, se comprobó la ocurrencia de un único evento de inserción del cassette *bph* en el genoma de las cepas X34 y X31. Para determinar la ubicación cromosomal o plasmidial del locus *bph* en las cepas recombinantes, se traspasó el plásmido pJP4-F3 por conjugación desde las cepas X34 y X31 a la bacteria *E. coli*, estudiando la presencia del locus *bph* en *E. coli* mediante selección con kanamicina y ácido nalidixico. El plásmido pJP4-F3, pero no el locus *bph*, fue transferido a *E. coli*. Esto demuestra que el locus *bph* se incorporó en el cromosoma de las bacterias X34 y X31. Los datos obtenidos confirman la presencia de una copia única del locus *bph* en el genoma de las cepas recombinantes. La localización cromosomal del locus *bph*, concuerda con la estabilidad mostrada por las cepas recombinantes en condiciones de cultivo no selectivas.

El número de copias de elementos genéticos incorporados en cepas receptoras durante la construcción de nuevos microorganismos catabólicos, puede determinar el éxito o fracaso de la operación. Los fenómenos degradativos son procesos complejos que dependen del establecimiento de un frágil equilibrio entre las vías catabólicas involucradas, que evita la acumulación de intermediarios no deseados o tóxicos. Es así como la dosis génica de los módulos *tfd* en *Ralstonia eutropha* JMP134 tiene un efecto dramático sobre la capacidad de esta cepa para degradar compuestos cloroaromáticos como el 3-CBA (Pérez-Pantoja *et al.*, 2000; Ledger *et al.*, 2002).

Pese a la utilización del elemento móvil mini-Tn5 para transferir el cassette con los genes *bph* desde el plásmido pT5K012 al genoma de la cepa X3 es posible que ocurra una cointegración del vector completo. Esta incógnita se aclaró a través de la amplificación por PCR del gen codificante para la transposasa del sistema mini-Tn5, el cual resultó no estar contenido en las cepas X34 y X31. Esto indica que la integración de los genes *xyl* y *bph* en el genoma de las cepas recombinantes mencionadas ocurrió vía transposición.

La cepa recombinante *Ralstonia eutropha* X34 adquirió en forma exitosa las capacidades catabólicas codificadas en el locus *bph*. Sin embargo, la adquisición de estos genes coincidió con la pérdida de algunas capacidades en las cepas receptoras. Ninguno de los clones recombinantes analizados mantuvo intactas las capacidades catabólicas de la cepa X3.

La pérdida de capacidades como resultado de la expresión de genes heterólogos en cepas recombinantes representa un hecho relativamente común al acoplar vías catabólicas provenientes de distintos organismos (Reineke *et al.*, 1982; Ledger *et al.*, 2002). Se ha demostrado que la inserción de los genes *xyI*/*XYZL*, provenientes de *Pseudomonas putida* mt-2, bajo el control de su regulador *xyI*S, en el genoma de *Ralstonia eutropha* JMP134, provoca la pérdida de la capacidad de esta cepa para crecer usando 3-CBA como única fuente de carbono y energía (Ledger *et al.*, 2002; Perez-Pantoja *et al.*, 2003). En este caso, la adquisición de una actividad benzoato-dioxigenasa de baja especificidad se traduce en un considerable aumento de la velocidad de conversión de 3-CBA a 3-CC, acumulándose este último compuesto hasta niveles tóxicos (Schweigert *et al.*, 2001). Este fenómeno puede ser evitado aumentando la actividad enzimática responsable del catabolismo de 3-CC. Otro caso lo constituye la cepa recombinante WR211 (Reineke *et al.*, 1982) derivada de *Pseudomonas putida* B13, que a pesar de contar con la vía catabólica codificada por los genes *xyI* de *Pseudomonas putida* mt-2, es incapaz de crecer usando 4-CBA como única fuente de carbono y energía. La incapacidad de la cepa WR211 para crecer en 4-CBA se explica por la coexistencia en un solo microorganismo de vías *orto* y *meta* de degradación de catecoles, codificadas por los genes *clc* y *xyI*, respectivamente. La vía *xyI* de rompimiento del anillo catecólico en posición *meta* es inducida directamente por benzoatos sustituidos, mientras que la vía *orto*-modificada *clc* de la cepa B13 utiliza como activador cloromuconato, un metabolito intermediario en la degradación *orto* de clorocatecoles (Reineke *et al.*, 1982; McFall *et al.*, 1998). Producto de esto, la inducción de la vía *orto*-modificada se encuentra temporalmente desfasada con respecto a la de la vía *xyI*. El sistema *xyI* inducido, canaliza la degradación de catecoles a través del rompimiento en *meta* del anillo aromático. Esto impide la formación de cloromuconato y la consiguiente inducción de la vía *orto*-modificada. El rompimiento en *meta* del anillo catecólico cloro-sustituído en posición *para*, genera semi-aldehídos como metabolitos finales, constituyendo una vía improductiva desde el punto de vista

energético (Arensdorf *et al.*, 1994). Este fenómeno no ocurre con catecoles no sustituidos o metilados que pueden ser metabolizados productivamente a través de vías *meta* (Ampe y Lindley, 1996; Franck-Mokross y Schmidt, 1998).

Por otra parte, la enzima catecol 2,3-dioxigenasa (XylE) de la cepa WR211 es inactivada durante el crecimiento de esta bacteria en 3-CBA, al interactuar con el catabolito central, 3-CC. En efecto, XylE dioxigena el 3-CC en posiciones *orto* y *meta*, transformándolo en un semi-aldehído altamente reactivo, susceptible de formar enlaces covalentes con todo tipo de macromoléculas. La unión covalente de este semi-aldehído a la enzima resulta en su inmediata e irreversible inactivación (Reineke *et al.*, 1982; Bartels *et al.*, 1984; Arensdorf *et al.*, 1994). Se ha documentado también la inhibición de la enzima TfdC por dihidroxi-bifenilo, intermediario catecólico en la degradación *meta* del bifenilo (Adams *et al.*, 1992).

Todos estos antecedentes ponen de manifiesto los inconvenientes asociados con la canalización de compuestos catecólicos a través de vías *meta* de degradación, y por ende, la aparente incompatibilidad entre las vías *orto* y *meta* de degradación. De hecho, se ha tratado de evitar la combinación de vías *orto* y *meta* en la construcción de cepas mineralizadoras de PCBs (Hrywna *et al.*, 1999).

Las cepas recombinantes X34 y X31 cuentan con vías catabólicas *orto* y *meta* para la degradación de compuestos catecólicos. La primera, vía *orto*-modificada codificada por los módulos *tfd* en el plásmido pJP4-F3 y la segunda, vía de degradación de (cloro)bifenilos codificada por el locus *bph*. Las enzimas involucradas en el rompimiento de los anillos catecólicos en cada una de estas vías son (cloro)catecol 1,2-dioxigenasa (TfdC) y 2,3-dihidroxi-bifenilo 1,2-dioxigenasa (BphC), respectivamente, siendo esta última capaz de dioxigenar clorocatecoles en posición *meta* (Vaillancourt *et al.*, 2002). A pesar de esto, la cepa X34 no presenta los fenómenos de interferencia *orto/meta* recién descritos. En efecto, la actividad BphC en esta cepa es inducible por bifenilo y no se ve afectada por la presencia de CBAs en el medio. La actividad TfdC se induce en presencia de 4-CBA durante el crecimiento en bifenilo, lo que permite descartar una desviación significativa del catabolismo de CCs hacia la vía *meta* y la posible inhibición de TfdC por dihidroxi-bifenilo. El 3,5-dCBA no induce la actividad TfdC debido a la incapacidad de la cepa X34 para degradar este compuesto y producir cloromuconato, agente inductor del operón *tfd*.

Las vías *bph* y *tfd* demuestran ser compatibles en el contexto biológico impuesto por la cepa X34. Este hecho tiene validez considerando que el establecimiento de interacciones catabólicas improductivas depende de variables como la especificidad de sustrato, intensidad de flujos metabólicos y tipo de reacciones catalizadas, impuestas por los distintos sistemas biológicos. Así, se ha descrito dos cepas bacterianas, *Pseudomonas putida* GJ31 y *Pseudomonas cepacia* P166, capaces de degradar 3-CBA y 4-CBA respectivamente, a través de vías *meta* (Arensdorf *et al.*, 1995; Kaschabek *et al.*, 1998; Mars *et al.*, 1999). Adicionalmente, una 2,3-dihidroxi-bifenilo 1,2-dioxigenasa capaz de oxidar 3-CC sin sufrir un efecto inhibitorio se caracterizó en *Sphingomonas* sp. BN6 (Riegert *et al.*, 1998 y 1999).

Los fenotipos de las cepas X34 y X31 son el resultado de fenómenos diferentes a la denominada incompatibilidad *orto-meta*. El fenotipo de la cepa X34, parece ser resultado de un complejo esquema regulatorio. Esta cepa cuenta con las actividades enzimáticas necesarias para mineralizar y obtener energía de 3-CBA, 4-CBA y 3,5-dCBA. Sin embargo, sólo es capaz de crecer utilizando 3-CBA y 4-CBA como única fuente de carbono y energía. En este trabajo se demostró que la falta de crecimiento de la cepa X34 en 3,5-dCBA no obedece a la acumulación de algún metabolito tóxico, sino más bien a la incapacidad en estas condiciones de efectuar el ataque inicial sobre este clorobenzoato. El crecimiento de la bacteria X34 en 4-CBA, sumado al restablecimiento de la capacidad para degradar 3,5-dCBA en presencia del inductor natural de la vía catabólica *xyl*, *m*-toluato (3-metil benzoato) y la detección del gen *xylX* por PCR confirman la presencia y expresión de los genes *xyl* en su genoma. Por lo tanto, la falta de crecimiento en 3,5-dCBA probablemente es consecuencia de un efecto regulatorio, que impide la normal inducción de estos genes. Descubrir las causas de la incapacidad de la cepa X34 para crecer en 3,5-dCBA, requiere una comprensión cabal de los mecanismos regulatorios involucrados en el proceso catabólico de este compuesto. Se ha demostrado que el activador transcripcional *xylS*, regulador de los genes *xylXYZL* en *Pseudomonas putida* mt-2, es incapaz de reconocer 3,5-dCBA como un agente inductor (Ramos *et al.*, 1986). A pesar de esto, la actividad de los genes *xyl* en *Ralstonia eutropha* X3, puestos bajo el control de *xylS*, es inducida por 3,5-dCBA. Una interesante alternativa para explicar lo anterior es que la inducción del operón *xyl* en respuesta a 3,5-dCBA sea obra de uno o varios elementos reguladores codificados en el genoma de la cepa parental

Ralstonia eutropha JMP134. Este tipo de regulación cruzada ha sido previamente descrita en varias vías catabólicas (Cowles *et al.*, 2000), incluida la codificada por el operón *xyl*, que es capaz de responder al regulador de la vía catabólica de benzoatos, BenR (Jeffrey *et al.*, 1992). Estudios en *Ralstonia eutropha* han permitido identificar al menos un regulador homólogo a *xyIS* capaz de inducir el operón *xyl* en respuesta a 3,5-dCBA, *XyIS162* (Ledger *et al.*, 2002). La amplificación por PCR de este gen permitió descartar su eventual interrupción física en el genoma de las cepas X31 y X34, sin embargo su expresión no puede ser garantizada. En el caso de la cepa X31, la sensibilidad a telurito sumada a la falta de detección del gen *xyIX* por PCR concuerda con la aparente pérdida del cassette genético *xyl* completo. El mecanismo a través del cual pudiese haber sido eliminado el cassette *xyl* del genoma de X31, se desconoce. Sin embargo, considerando que tanto los genes *xyl* como los genes *bph* se incorporaron en el genoma de las cepas recombinantes a través del mismo sistema, el transposón mini-Tn5, es probable que la transposasa codificada en el plásmido entrante haya contribuido a escindir el cassette *xyl* del genoma de X31.

El acoplamiento de vías catabólicas provenientes de distintas fuentes en un solo microorganismo genera un sistema biológico altamente complejo. Las interacciones que se establecen entre las nuevas vías incorporadas, y la maquinaria fisiológica del huésped suelen generar resultados inesperados. El avance en este tipo de estudios constituye un aporte sustancial en la generación de cepas con nuevas capacidades catabólicas de interés comercial.

La cepa recombinante *Ralstonia eutropha* X34, obtenida en este trabajo es capaz de mineralizar bifenilos mono- y di-clorados. Se comprobó su habilidad para degradar 3-CB, 4-CB, 3,5-CB y 2,4'-CB, liberando cantidades estequiométricas de cloruro. La liberación de cloruro da cuenta de la degradación de los CBAs producidos durante el catabolismo de PCBs. En este caso da cuenta de la degradación de 3-CBA, 4-CBA y 3,5-CBA. Estudios futuros deberán avocarse a analizar la mineralización de otros congéneres de PCBs.

Esta memoria deja planteadas diversas incógnitas, que deberían ser abordadas en otros estudios. Sería de gran interés aclarar los mecanismos bioquímicos responsables de la incapacidad de la cepa X34 para utilizar 3,5-dCBA como única fuente de carbono y energía. Por otra parte es necesario evaluar el comportamiento de la cepa recombinante X34 en microcosmos

ambientales contaminados con PCBs, con el fin de proyectar posibles aplicaciones en biorremediación. Además, se podría incorporar en el genoma de la cepa X34 genes catabólicos adicionales que permitiesen ampliar sus capacidades degradativas. Para esto, una alternativa concreta es la inserción del locus *ohb* de *Pseudomonas aeruginosa* JB2 que codifica para una enzima benzoato dioxigenasa capaz de oxidar CBAs sustituidos en posición *orto*.

5. CONCLUSIONES

- La incorporación del locus *bph* de *Burkholderia xenovorans* a la cepa *Ralstonia eutropha* X3 permitió generar cepas recombinantes capaces de utilizar bifenilo como única fuente de carbono y energía.
- Las cepas recombinantes X34 y X31 contienen una copia del locus *bph* en el cromosoma y son genéticamente estables.
- 4-CBA y 3,5-dCBA en concentraciones superiores a 5 mM inhiben el crecimiento de *Ralstonia eutropha* X31 empleando bifenilo como única fuente de carbono y energía.
- Los genes *bphC* y *ffdC*, esenciales para las vías catabólicas de bifenilo y CBAs se inducen durante el crecimiento de la cepa X34 en presencia de estos compuestos.
- La cepa recombinante X34 es capaz de degradar 3-CBA, 4-CBA y 3,5-dCBA. Sin embargo, requiere la presencia de *meta*-toluato, inductor natural de los genes *xyl*, para la degradación de 3,5-dCBA.
- La cepa recombinante X34 es capaz de degradar 3-CB, 4-CB, 3,5-dCB y 2,4'-dCB sin acumular CBAs y liberando cantidades estequiométricas de cloruro.
- Las vías catabólicas codificadas por los genes *bph* y *ffd*, rutas de degradación *meta* y *orto* respectivamente, coexisten sin establecer interacciones negativas en *Ralstonia eutropha* X34.

6. REFERENCIAS

- Abraham, W. R., Nogales, B., Golyshin, P. N., Pieper, D. H. y Timmis, K. N. 2002. Polychlorinated biphenyl-degrading microbial communities in soils and sediments. *Curr Opin Microbiol.* **5**: 246-253.
- Abril, M., Michan, C., Timmis, K. N. y Ramos, J. L. 1989. Regulator and enzyme specificities of the TOL plasmid-encoded upper pathway for the degradation of aromatic hydrocarbons and expansion of the substrate range of the pathway. *J. Bacteriol.* **171**: 6782-6790.
- Adams, R. H., Huang, C. M., Higson, F. K., Brenner, V. y Focht, D. D. 1992. Construction of a 3-chlorobiphenyl-utilizing recombinant from an intergeneric mating. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 647-654.
- Ahmad, D., Masse, R. y Sylvestre, M. 1990. Cloning and expression of genes involved in 4-chlorobiphenyl transformation by *Pseudomonas testosteroni*: homology to polychlorobiphenyl-degrading genes in other bacteria. *Gene* **86**: 53-61.
- Ahmed, M. y Focht, D. D. 1973. Degradation of polychlorinated biphenyls by two species of *Achromobacter*. *Can. J. Microbiol.* **19**: 47-52.
- Ampe, F. y Lindley, N. D. 1996. Flux limitations in the ortho pathway of benzoate degradation of *Alcaligenes eutrophus*: metabolite overflow and induction of the meta pathway at high substrate concentrations. *Microbiology* **142**: 1807-1817.
- Arendorf, J. J. y Focht, D. D. 1994. Formation of chlorocatechol meta cleavage products by a *Pseudomonad* during metabolism of monochlorobiphenyls. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 2884-2889.
- Arendorf, J. J. y Focht, D. D. 1995. A meta cleavage pathway for 4-chlorobenzoate, an intermediate in the metabolism of 4-chlorobiphenyl by *Pseudomonas cepacia* P166. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 443-447.
- Arnold, D. L., Bryce, F. y McGuire, P. F. 1995. Toxicological consequences of Aroclor 1254 ingestion by female rhesus (*macaca mulatta*) monkeys. Part 2. Reproduction and infant findings. *Food Chem. Toxicol.* **33**: 457-474.
- Atlas, E. y Giam, C. S. 1981. Global transport of organic pollutants: ambient concentrations in remote marine atmosphere. *Science* **211**: 163-165.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingstone, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J. y Struhl, K. (ed.). 1992. Short Protocols In Molecular Biology. Green Publishing Associates and John Wiley & Sons.

- Bacon, C. E., Jarman, W. M. y Costa, D. P.** 1992. Organochlorine and polychlorinated biphenyl levels in pinniped milk from the Arctic, the Antarctic, California, and Australia. *Chemosphere* **24**: 779-791.
- Ballschmitter, K. y Zell, M.** 1980. Analysis of polychlorinated biphenyls by a glass capillary gas chromatography; composition of technical Aroclor and Clophen-PCB mixtures. *Fresenius Zeitschrift für Analytische Chemie*. **302**: 20-31.
- Ballschmitter, K.** 1991. Global distribution of organic compounds. *Environ. Carcinogen. Rev.* **9**: 1.
- Bartels, I., Knackmuss, H.-J. y Reineke, W.** 1984. Suicide inactivation of catechol 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas putida* mt-2 by 3-halocatechols. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 500-505.
- Bartels, F., Backhaus, S., Moore, E. R., Timmis, K. N. y Hofer, B.** 1999. Occurrence and expression of glutathione-S-transferase-encoding bphK genes in *Burkholderia* sp. strain LB400 and other biphenyl-utilizing bacteria. *Microbiology*. **145**: 2821-2834.
- Baxter, R. A., Gilbert, R. E., Lidgett, R. A., Mainprize, J. H. y Vodden, H. A.** 1975. The degradation of polychlorinated biphenyls by microorganisms. *Sci. Total Environ.* **4**: 53-61.
- Bedard, D. L., Unterman, R., Bopp L. H., Brennan, M. J., Haberl, M. L. y Johnson, C.** 1986. Rapid assay for screening and characterizing microorganisms for the ability to degrade polychlorinated biphenyls. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**: 761-768.
- Bedard, D. L., Wagner, R. E., Brennan, M. J., Haberl, M. L. y Brown, J. F. Jr.** 1987. Extensive degradation of Aroclors and environmentally transformed polychlorinated biphenyls by *Alcaligenes eutrophus* H850. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 1094-1102.
- Bedard, D. L. y Haberl, M. L.** 1990. Influence of chlorine substitution pattern on the degradation of polychlorinated biphenyls by eight bacterial strains. *Microb. Ecol.* **20**: 87-102.
- Beltrametti, F., Reniero, D., Backhaus, S. y Hofer, B.** 2001. Analysis of transcription of the *bph* locus of *Burkholderia* sp. strain LB400 and evidence that the ORF0 gene product acts as a regulator of the *bphA1* promoter. *Microbiology* **147**: 2169-2182.
- Berg, C. M., Berg, D. E. y Groisman, E.** 1989. Transposable elements and the genetic engineering of bacteria. American Society for Microbiology.
- Bertazzi, P. A., Ribaldi, L., Pesatori, A., Radice, L. y Zocchetti, C.** 1987. Cancer mortality of capacitor manufacturing workers. *Am. J. Ind. Med.* **11**: 165-176.

Birnboim, H. C. y Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**: 1513-1523.

Blasco, R., Wittich, R. M., Mallavarapu, M., Timmis, K. N., Pieper, D. H. 1995. From xenobiotic to antibiotic, formation of protoanemonin from 4-chlorocatechol by enzymes of the 3-oxoadipate pathway. *J. Biol. Chem.* **270**: 29229-29235.

Blasco, R., Mallavarapu, M., Wittich, R. M., Timmis, K. N. y Pieper, D. H. 1997. Evidence that formation of protoanemonin from metabolites of 4-chlorobiphenyl degradation negatively affects the survival of 4-chlorobiphenyl-cometabolizing microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 427-434.

Bopp, L. H. 1986. Degradation of highly chlorinated PCBs by *Pseudomonas* strain LB400. *J. Ind. Microbiol.* **1**: 23-29.

Bradford, M. M. 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.

Brenner, V., Arensdorf, J. J. y Focht, D. D. 1994. Genetic construction of PCB degraders. *Biodegradation.* **5**: 359-377.

Brown, D. P. 1987. Mortality of workers exposed to polychlorinated biphenyls – an update. *Arch. Environ. Health.* **42**: 333-339.

Buck, G. M., Vena, J. E., Schisterman, E. F., Dmochowski, J., Mendola, P., Sever, L. E., Fitzgerald, E., Kostyniak, P., Greizerstein, H. y Olson, J. 2000. Parental consumption of contaminated sport fish from lake Ontario and predicted fecundability. *Epidemiology.* **11**: 388-393.

Cámara, B., Herrera, C., Gonzalez, M., Couve, E., Hofer, B. y Seeger, M. 2004. From PCBs to highly toxic metabolites by the biphenyl pathway. *Environ. Microbiol.* **6**: 842-850.

Chaudry, G. R. y Chapalamadugu, S. 1991. Biodegradation of Halogenated Organic Compounds. *Microbiol. Reviews* **55**: 59-79

Chen, Y. C., Guo, Y. L., Hsu, C. C. y Rogan, W. J. 1992. Cognitive development of Yu-Cheng ("oil disease") children prenatally exposed to heat-degraded PCBs. *J. Am Med. Assoc.* **268**: 3213-3218.

Clément, P., Matus, V., Cárdenas, L. y González, B. 1995. Degradation of trichlorophenols by *Alcaligenes eutrophus* JMP134. *FEMS Microbiol. Lett.* **127**: 51-55.

Clément, P., Pieper, D. H. y Gonzalez, B. 2001. Molecular characterization of a deletion/duplication rearrangement in *tfd* genes from *Ralstonia eutropha* JMP134(pJP4) that

improves growth on 3-chlorobenzoic acid but abolishes growth on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Microbiology* **147**: 2141-2148.

Cowles, C. E., Nichols, N. N. y Harwood, C. S. 2000. BenR, a XylS homologue, regulates three different pathways of aromatic acid degradation in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **182**: 6339-6346.

de Lorenzo, V., Herrero, M., Jakubzik, U. y Timmis, K. N. 1990. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J. Bacteriol.* **172**: 6568-6572.

Don, R. H. y Pemberton, J. M. 1981. Properties of six pesticide degradation plasmids isolated from *Alcaligenes paradoxus* and *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* **145**: 681-686.

Don, R. H. y Pemberton, J. 1985. Genetic and physical map of the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradative plasmid pJP4. *J. Bacteriol.* **161**: 466-468.

Dorn, E. y Knackmuss, H.-J. 1978. Chemical structure and biodegradability of halogenated aromatic compounds. Substituent effects on 1,2-dioxygenation of catechol. *Biochem. J.* **174**: 85-94.

Dowling D. N., Pipke R. y Dwyer D. F. 1993. A DNA module encoding *bph* genes for the degradation of polychlorinated biphenyls (PCBs). *FEMS Microbiol. Lett.* **113**: 149-154.

Erickson, B. D. y Mondello, F. J. 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.

Eltis, L. D., Hofmann, B., Hecht, H. J., Lunsdorf, H. y Timmis, K. N. 1993. Purification and crystallization of 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase. *J. Biol. Chem.* **268**: 2727-2732.

Faroon, O. M., Keith, L. S., Smith-Simon, C. y DeRosa, C. T. 2003. Polychlorinated Biphenyls: Human Health Aspects. Concise International Chemical Assessment document 55.

Fava, F., Gentilucci, S. y Zanaroli, G. 2003. Anaerobic biodegradation of weathered polychlorinated biphenyls (PCBs) in contaminated sediments of Porto Marghera (Venice Lagoon, Italy). *Chemosphere* **53**: 101-109.

Fischbein, A., Wolff, M. S., Lillis, R., Thornton, J. y Selikoff, I. J. 1979. Clinical findings among PCB-exposed capacitor manufacturing workers. *Ann. N. Y. Acad. Scien.* **320**: 703-715.

- Fischbein, A., Thornton, J., Wolff, M. S., Bernstein, J. y Selifoff, I. J. 1982. Dermatological findings in capacitor manufacturing workers exposed to dielectric fluids containing polychlorinated biphenyls (PCBs). *Arch. Environ. Health*. **37**: 69-74.
- Florence, T. M. y Farrar, Y. J. 1971. Spectrophotometric determination of chloride at the parts-per-billion level by the mercury(II) thiocyanate method. *Anal. Chim. Acta*. **54**: 373-377.
- Focardi, S., Fossi, C., Leoncio, C., Corsolini, S. y Parra O. 1996. Persistent organochlorine residues in fish and water birds from the Bio Bio river, Chile. *Environ. Monitor. Assess.* **43**: 73-92.
- Focht, D., Searles, D. y Koh, S.-C. 1996. Genetic exchange in soil between introduced chlorobenzoate degraders and indigenous biphenyl degraders. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 3910-3913.
- Franck-Mokross, A. C. y Schmidt E. 1998. Simultaneous degradation of chloro- and methyl-substituted aromatic compounds: competition between *Pseudomonas* strains using the *ortho* and *meta* pathway or the *ortho* pathway exclusively. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**: 233-240.
- Fuentealba, M. 1996. Pesticidas organoclorados y bifenilos policlorados en *Trachurus murphyi* en la zona centro sur de Chile. *Bol. Soc. Biol. Concepción* **68**: 39-46.
- Furukawa, K. y Chakrabarty, A. M. 1982. Involvement of plasmids in total degradation of polychlorinated biphenyls. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**: 619-626.
- Gilmartin, N., Ryan, D., Sherlock, O. y Dowling, D. 2003. BphK shows dechlorination activity against 4-chlorobenzoate, an end product of *bph*-promoted degradation of PCBs. *FEMS Microbiol. Lett.* **222**: 251-255.
- Greated, A., Lambertsen, L., Williams, P. A. y Thomas, C. M. 2002. Complete sequence of the IncP-9 TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida*. *Environ. Microbiol.* **4**: 856-871.
- Harkness, M. R., McDermott, J. B., Abramowicz, D. A., Salvo, J. J., Flanagan, W. P., Stephens, M. L., Mondillo, F. J., May, R. J., Lobos, J. H. y Carroll, K. M. 1993. In situ stimulation of aerobic PCB biodegradation in Hudson River sediments. *Science*. **59**: 503-507.
- Havel, J. y Reineke, W. 1991. Total degradation of various chlorobiphenyls by cocultures and in vivo constructed hybrid *Pseudomonads*. *FEMS Microbiol. Lett.* **62**: 163-169.
- Hofer, B., Eltis, L. D., Dowling, D. N. y Timmis, K. N. 1993. Genetic analysis of a *Pseudomonas* locus encoding a pathway for biphenyl/polychlorinated biphenyl degradation. *Gene*. **130**: 47-55.

- Hofer, B., Backhaus, S., Timmis, K. N. 1994. The biphenyl/polychlorinated biphenyl-degradation locus (*bph*) of *Pseudomonas* sp. LB400 encodes four additional metabolic enzymes. *Gene* **144**: 9-16.
- Hofer, B., Blasco, R., Mallavarapu, M., Seeger, M., McKay, D., Wittich, R. -M., Pieper, D. H. y Timmis, K. N. 1996. *Pseudomonads* designed for bioremediation and circumvention of undesirable routes. *Molecular Biology of Pseudomonads*.
- Hrywna, Y., Tosí, T., Maltseva, O., Quensen III, J. y Tiedje, J. 1999. Construction and characterization of two recombinant bacteria that grow on *ortho*- and *para*-substituted chlorobiphenyls. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 2163-2169.
- Hutzinger, O. 1974. *Chemistry of PCBs*. Westport Publishing Group.
- Jacobson, J. L., Jacobson, S. W., Schwartz, P. M., Fein, G. G. y Dowler, J. K. 1984. Prenatal exposure to an environmental toxin: a test of the multiple effects model. *Develop. Psychobiol.* **20**: 523-532.
- Jansen, H. T., Cooke, P. S., Porcelli, J., Liu, T. C. y Hansen, L. G. 1993. Estrogenic and antiestrogenic actions of PCBs in the female rat: *in vitro* and *in vivo* studies. *Reprod. Toxicol.* **7**: 237-248.
- Jeffrey, W. H., Cuskey, S. M., Chapman, P. J., Resnick, S. y Olsen, R. H. 1992. Characterization of *Pseudomonas putida* mutants unable to catabolize benzoate: cloning and characterization of *Pseudomonas* genes involved in benzoate catabolism and isolation of a chromosomal DNA fragment able to substitute for *xylS* in activation of the TOL lower-pathway promoter. *J. Bacteriol.* **174**: 4986-4996.
- Kaschabek, S. R., Kasberg, T., Muller, D., Mars, A. E., Janssen, D. B. y Reineke, W. 1998. Degradation of chloroaromatics: purification and characterization of a novel type of chlorocatechol 2,3-dioxygenase of *Pseudomonas putida* GJ31. *J. Bacteriol.* **180**: 296-302.
- Kaulmann, U., Kaschabek, S. R. y Schlomann, M. 2001. Mechanism of chloride elimination from 3-chloro- and 2,4-dichloro-*cis,cis*-muconate: new insight obtained from analysis of muconate cycloisomerase variant CatB-K169A. *J. Bacteriol.* **183**: 4551-4561.
- Kil' lu V., Llu. Goryshin, and V. A. Lantsov. 1994. The recombination mechanism for precise excision of the IS50 mobile element in *Escherichia coli* K12 cells. *Mol Biol (Mosk)*. **28**:563-573.
- Kuroiwa, Y., Murai, Y. y Santa, T. 1969. Neurological and nerve conduction velocity studies on 23 patients with chlorobiphenyl poisoning. *Fukuoka Igaku Zasshi.* **60**: 462-463.

- Klemba, M., Jakobs, B., Wittich, R. -M. y Pieper, D. 2000. Chromosomal integration of *tcb* chlorocatechol degradation pathway genes as a means of expanding the growth substrate range of bacteria to include haloaromatics. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 3255-3261.
- Kuratsune, M. 1989. *Yusho, with reference to Yu-Cheng*. Halogenated biphenyls, terphenyls, naphthalenes, dibenzodioxins and related products. Kimbrough R. D., Jensen A. A., eds. Elsevier Science Publishers.
- Laemmli, C., Werlen, C. y van der Meer, J. R. 2004. Mutation analysis of the different *tfd* genes for degradation of chloroaromatic compounds in *Ralstonia eutropha* JMP134. *Arch. Microbiol.* **181**: 112-121.
- Ledger, Th., Pieper, D., Pérez-Pantoja, D. y González B. 2002. Novel insights into the interplay between peripheral reactions encoded by *xyl* genes and the chlorocatechol pathway encoded by *tfd* genes for the degradation of chlorobenzoates by *Ralstonia eutropha* JMP 134. *Microbiology* **148**: 3431-3440.
- Lehrbach, P. R., Zeyer, J., Reineke, W., Knackmuss, J. M. y Timmis, K. N. 1984. Enzyme recruitment *in vitro*: use of cloned genes to extend the range of haloaromatics degraded by *Pseudomonas* sp. Strain B13. *J. Bacteriol.* **158**: 1025-1032.
- Lilienthal, H., Manfred, N., Carmen, M. y Winneke, G. 1990. Behavioral effects of pre- and postnatal exposure to a mixture of low chlorinated PCBs in rats. *Fund. Appl. Toxicol.* **15**: 457-467.
- Loose, L. D., Pittman, K. A., Benitz, K. F., Silkworth, J. B., Mueller, W. y Coulston, F. 1978. Environmental chemical induced immune dysfunction. *Ecotoxicol. Environ. Safety* **2**: 173-198.
- Luque-Garcia, J. L. y de Castro, L. 2003. Extraction of polychlorinated biphenyls from soils by automated focused microwave-assisted Soxhlet extraction. *J Chromatogr. A.* **998**: 21-29.
- Manzano, M. A., Perales, J. A., Sales, D. y Quiroga, J. M. 2003. Enhancement of aerobic microbial degradation of polychlorinated biphenyl in soil microcosms. *Environ. Toxicol. Chem.* **22**: 699-705.
- Mars, A. E., Kingma, J., Kaschabek, S. R., Reineke, W. y Janssen, D. B. 1999. Conversion of 3-chlorocatechol by various catechol 2,3-dioxygenases and sequence analysis of the chlorocatechol dioxygenase region of *Pseudomonas putida* GJ31. *J. Bacteriol.* **181**: 1309-1318.
- Martínez, P. 2004. Respuesta de *Burkholderia* sp. LB400 frente a clorobenzoatos. Tesis de Ingeniero en Biotecnología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Masai, E., Yamada, A., Healy, J. M., Hatta, T., Kimbara, K., Fukuda, M. y Yano, K. 1995. Characterization of biphenyl catabolic genes of gram-positive polychlorinated biphenyl degrader *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2079-2085.

- McFall, S. M., Chugani, S. A. y Chakrabarty, A. M.** 1998. Transcriptional activation of the catechol and chlorocatechol operons: variations on a theme. *Gene*. **223**: 257-267.
- Mokross, H., Schmidt, E. y Reineke, W.** 1990. Degradation of 3-chlorobiphenyl by *in vivo* constructed hybrid *Pseudomonads*. *FEMS Microbiol. Lett.* **59**: 179-185.
- Muñoz, J. y Becker, P.** 1999. The Kelp Gull as bioindicator of environmental chemisclas in the Magellan Region. A comparison with other coastal sites in Chile. *Sci. Marina* **63**: 495-502.
- Nagayama, J., Kuratsune, M. y Masuda, Y.** 1981. Formation of polychlorinated dibenzofurans by heating polychlorinated biphenyls. *Fukuoka Acta Medica* **72**: 136-141.
- Nam, P., Kapila, S., Liu, Q., Tumiatti, W., Porciani, A. y Flanigan, V.** 2001. Solvent extraction and tandem dechlorination for decontamination of soil. *Chemosphere* **43**: 485-491.
- National Research Council.** 1979. Polychlorinated biphenyls. National Academy of Sciences.
- No, H. K. y Meyers, S. P.** 2000. Application of chitosan for treatment of wastewaters. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **163**: 1-27.
- Norback, D. H. y Weltman, R. H.** 1985. Polychlorinated biphenyl induction of hepatocellular carcinoma in the Sprague-Dawley rat. *Environ. Health Perspect.* **60**: 97-105.
- Ouw, H. K., Simpson, G. R. y Silyali, D. S.** 1976. Use and health effects of Aroclor 1242, a polychlorinated biphenyl in an electrical industry. *Arch. Environ. Health.* **31**: 189-194.
- Pantaleoni, G., Fanini, D., Sponta, A. M., Palumbo, G., Giorgi, R. y Adams, P. R.** 1988. Effects of maternal exposure to plichlorobiphenyls (PCBs) on F1 generation behavior in the rat. *Fund. Appl. Toxicol.* **11**: 440-449.
- Perez-Pantoja, D., Guzman, L., Manzano, M., Pieper, D. H. y Gonzalez, B.** 2000. Role of *tfdC(I)D(I)E(I)F(I)* and *tfdD(II)C(II)E(II)F(II)* gene modules in catabolism of 3-chlorobenzoate by *Ralstonia eutropha* JMP134(pJP4). *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 1602-1608.
- Perez-Pantoja, D., Ledger, T., Pieper, D. H. y Gonzalez, B.** 2003. Efficient turnover of chlorocatechols is essential for growth of *Ralstonia eutropha* JMP134(pJP4) in 3-chlorobenzoic acid. *J. Bacteriol.* **185**: 1534-1542.
- Perkins, E. J., Gordon, M. P., Cáceres, O. y Lurquin, P. F.** 1990. Organization and sequence analysis of the 2,4-dichlorophenol hydroxylase and dichlorocatechol oxidative operons of plasmid pJP4. *J. Bacteriol.* **172**: 2352-2359.

Pieper, D. H., Reineke, W., Engesser, K. H. y Knackmuss, H. J. 1988. Metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid and 2-methylphenoxyacetic acid by *Alcaligenes eutrophus* JMP134. Arch. Microbiol. **150**: 95-102.

Pieper, D. H. y Reineke, W. 2000. Engineering bacteria for bioremediation. Curr. Opin. Biotechnol. **11**: 262-270.

Pieper, D. H., Knackmuss, H.-J. y Timmis, K. N. 1993. Accumulation of 2-chloromuconate during metabolism of 3-chlorobenzoate by *Alcaligenes eutrophus* JMP134. Appl. Microbiol. Biotechnol. **39**: 563-567.

Piver, W. T. y Lindstrom, F. T. 1985. Waste disposal technologies for polychlorinated biphenyls. Environ. Health Perspect. **59**: 163-177.

Potrawfke, T., Löhnert, T. H., Timmis, K. N. y Wittich, R. M. 1998. Mineralization of low-chlorinated biphenyls by *Burkholderia* sp. strain LB400 and by a two-membered consortium upon directed interspecies transfer of chlorocatechol pathway genes. Appl. Microbiol. Biotechnol. **50**: 440-446.

Kröckel, L. y Focht D. D. 1987. Construction of chlorobenzene-utilizing recombinants by progenitive manifestation of a rare event. Appl. Environ. Microbiol. **53**: 2470-2475.

Ramos, J. L., Stolz, A., Reineke, W. y Timmis, K. N. 1986. Altered effector specificities in regulators of gene expression: TOL plasmid *xyIS* mutants and their use to engineer expansion of the range of aromatics degraded by bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **83**: 8467-8471.

Reichardt, P. B., Chadwick, B. L., Cole, M. A., Robertson, B. R. y Button, D. K. 1981. Kinetic study of the biodegradation of biphenyl and its monochlorinated analogues by a mixed marine microbial community. Environ. Scien. Technol. **15**: 75-79.

Reineke, W. y Knackmuss, H. J. 1978. Chemical structure and biodegradability of halogenated organic compounds. Substituent effect on 1,2-dioxygenation of benzoic acid. Biochim. Biophys. Acta. **542**: 412-423.

Reineke, W. y Knackmuss, H. J. 1988. Microbial degradation of haloaromatics. Annu. Rev. Microbiol. **42**: 263-287.

Reineke, W. 1998. Development of hybrid strains for the mineralization of chloroaromatics by patchwork assembly. Annu. Rev. Microbiol. **52**: 287-331.

Reineke, W., Jeenes, D. J., Williams, P. A. y Knackmuss, H. J. 1982. TOL plasmid pWW0 in constructed halobenzoate-degrading *Pseudomonas* strains: prevention of *meta* pathway. J. Bacteriol. **150**: 195-201.

- Riegert, U., Heiss, G., Fischer, P. y Stolz, A. 1998. Distal cleavage of 3-chlorocatechol by an extradiol dioxygenase to 3-chloro-2-hydroxyomuconic semialdehyde. *J. Bacteriol.* **180**: 2849-2853.
- Riegert, U., Heiss, G., Kuhm, A. E., Muller, C., Contzen, M., Knackmuss, H. J. y Stolz, A. 1999. Catalytic properties of the 3-chlorocatechol-oxidizing 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase from *Sphingomonas* sp. strain BN6. *J. Bacteriol.* **181**: 4812-4817.
- Risoul, V., Renaud, V., Trouve, G. y Gilot, P. 2002. A laboratory pilot study of thermal decontamination of soils polluted by PCBs. Comparison with thermogravimetric analysis. *Waste Manag.* **22**: 61-72.
- Rodrigues, J., Maltseva, O., Tsoi, T., Helton, R., Quensen III, J., Fukuda, M. y Tiedje, J. 2001. Development of a *Rhodococcus* recombinant strain for degradation of products from anaerobic dechlorination of PCBs. *Environ. Scien. Technol.* **35**: 663-668.
- Rochkind, M. L., Blackburn, J. W. y Saylor, G. W. 1986. Microbial decomposition of chlorinated aromatic compounds. U.S. Environmental Protection Agency.
- Rybkina, D. O., Plotnikova, E. G., Dorofeeva, L. V., Mironenko, I. y Demakov, V. A. 2003. A new aerobic gram-positive bacterium with a unique ability to degrade *ortho*- and *para*-chlorinated biphenyls. *Mikrobiologiya* **72**: 759-765.
- Safe, S. 1990. Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-p-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs) and related compounds: environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors (TEFs). *Crit. Rev. Toxicol.* **21**: 51-88.
- Sager, D. B. y Girard, D. M. 1994. Long-term effects on reproductive parameters in female after translactational exposure to PCBs. *Environ. Res.* **66**: 52-76.
- Sanggo, K. y Picardal, F. 2001. Microbial growth on dichlorobiphenyls chlorinated on both rings as a sole carbon and energy source. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 1953-1955.
- Schaeffer, E., Grein, H. y Goessner, W. 1984. Pathology of chronic polychlorinated biphenyl (PCB) feeding in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **75**: 278-288.
- Schweigert, N., Hunziker, R. W., Escher, B. I. y Eggen, R. I. 2001. Acute toxicity of (chloro)catechols and (chloro-)catechol-copper combinations in *Escherichia coli* corresponds to their membrane toxicity in vitro. *Environ. Toxicol. Chem.* **20**: 239-247.
- Seah, S., Labbé, G., Nerdinger, S., Johnson, M. R., Snieckus, V. y Eltis, L. D. 2000. Identification of a serine hydrolase as a key determinant in the microbial degradation of polychlorinated biphenyls. *J. Biol. Chem.* **275**: 15701-15708.

- Seeger, M., Timmis, K. N. y Hofer, B.** 1995a. Degradation of chlorobiphenyls catalyzed by the *bph*-encoded biphenyl-2,3-dioxygenase and biphenyl-2,3-dihydrodiol-2,3-dehydrogenase of *Pseudomonas* sp. LB400. *FEMS Microbiol. Lett.* **133**: 259-264.
- Seeger, M., Timmis, K. N. y Hofer, B.** 1995b. Conversion of chlorobiphenyls into phenylhexadienoates and benzoates by the enzymes of the upper pathway for polychlorobiphenyl degradation encoded by the *bph* locus of *Pseudomonas* sp. strain LB400. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2654-2658.
- Seeger, M., Timmis, K. N. y Hofer, B.** 1997. Bacterial pathways for the degradation of polychlorinated biphenyls. *Mar. Chem.* **58**: 327-333.
- Seeger, M., Zielinski, M., Timmis, K. N. y Hofer, B.** 1999. Regiospecificity of dioxygenation of di- to pentachlorobiphenyls and their degradation to chlorobenzoates by the *bph*-encoded catabolic pathway of *Burkholderia* sp. strain LB400. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 3614-3621.
- Sheets, R. G. y Bergquist, B. A.** 1999. Laboratory treatability testing of soils contaminated with lead and PCBs using particle-size separation and soil washing. *J. Hazard. Mater.* **66**: 137-150.
- Skiba, A., Hecht, V. y Pieper, D. H.** 2002. Formation of protoanemonin from 2-chloro-cis,cis-muconate by the combined action of muconate cycloisomerase and muconolactone isomerase. *J. Bacteriol.* **184**: 5402-5409.
- Sondossi, M., Sylvestre, M., and Ahmad, D.** 1992. Effects of chlorobenzoate transformation on the *Pseudomonas testosteroni* biphenyl and chlorobiphenyl degradation pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 485-495.
- Stewart, P., Reihman, J., Lonky, E., Darvill, T y Pagano, J.** 2000. Prenatal PCB exposure and neonatal behavioral assessment scale (NBAS) performance. *Neurotoxicol. Teratol.* **22**: 21-29.
- Stratford, J., Wright, M. A., Reineke, W., Mokross, H., Havel, J., Knowles, C. J. y Robinson, G. K.** 1996. Influence of chlorobenzoates on the utilisation of chlorobiphenyls and chlorobenzoate mixtures by chlorobiphenyl/chlorobenzoate-mineralising hybrid bacterial strains. *Arch. Microbiol.* **165**: 213-218.
- Svensson, B. G., Hallberg, T., Nilsson, A., Schultz, A. y Hagmar, L.** 1994. Parameters of immunological competence in subjects with high consumption of fish contaminated with persistent organochlorine compounds. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* **65**: 351-358.
- Trefault, N., Clement, P., Manzano, M., Pieper, D. H. y Gonzalez, B.** 2002. The copy number of the catabolic plasmid pJP4 affects growth of *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4) on 3-chlorobenzoate. *FEMS Microbiol. Lett.* **212**: 95-100.

- Trefault, N., de la Iglesia, R., Molina, A. M., Manzano, M., Ledger, Th., Perez-Pantoja, D., Sanchez, M. A., Stuardo, M. y Gonzalez, B. 2004. Genetic organization of the catabolic plasmid pJP4 from *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4) reveals mechanisms of adaptation to chloroaromatic pollutants and evolution of specialized chloroaromatic degradation pathways. *Environ. Microbiol.* **6**: 655-668.
- Tryphonas, H., Hayward, S., O'Grady, L., Loo, J., Arnold, D. L., Bryce, F. y Zawidzka, Z. Z. 1989. Immunotoxicity studies of PCB (Aroclor 1254) in the adult rhesus (*macaca mulatta*) monkey – preliminary report. *Int. J. Immunopharmacol.* **11**: 199-206.
- Tsoi, T. V., Plotnikova, E. G., Cole, J. R., Guerin, W. F., Bagdasarian, M. y Tiedje, J. M. 1999. Cloning, expression, and nucleotide sequence of the *Pseudomonas aeruginosa* 142 *ohb* genes coding for oxygenolytic *ortho* dehalogenation of halobenzoates. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 2151-2162.
- Tulp, M., Schmitz, R. y Hutzinger, O. 1978. The bacterial metabolism of 4,4'-dichlorobiphenyl, and its suppression by alternative carbon sources. *Chemosphere* **1**: 103-108.
- U.S. Environmental Protection Agency. 1993. EPA engineering issue: Technology alternatives for remediation of PCB-contaminated soil and sediment. Office of Research and Development and Office of Solid Waste and Emergency Response.
- U.S. Environmental Protection Agency. 1994. PCB Q&A Manual. Office of Pollution Prevention and Toxics.
- Vaillancourt, F., Labbe, G., Drouin, N. M., Fortin, P. D. y Eltis, L. D. 2002. The mechanism-based inactivation of 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase by catecholic substrates. *J. Biol. Chem.* **277**: 2019-2027.
- Varela C. 1998. Expresión del operón *ffdCDEF* responsable del catabolismo de clorocatecoles, bajo distintos sistemas de regulación. Tesis Magister Pontificia Universidad Católica de Chile.
- Vrana, B., Decorová, K., Baláz, S., and Sevciková, A. (1996). Effect of chlorobenzoates on the degradation of polychlorinated biphenyls (PCB) by *Pseudomonas stutzeri*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **12**: 323-326.