

UCH-FC
DOC-B
S 951

BIODEGRADACIÓN DE POLICLOROBIFENILOS: CAPACIDADES CATABÓLICAS
DE LA VÍA SUPERIOR CODIFICADA POR EL LOCUS *bph* DE *Pseudomonas* sp.
LB400 Y CONSTRUCCIÓN DE NUEVAS CEPAS DEGRADADORAS

Tesis
Entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de
Doctor en Ciencias con mención en Biología

por

MICHAEL SEEGER PFEIFFER

Abril de 1996

Directores de Tesis: CARLOS A. JEREZ G.

KENNETH N. TIMMIS



Facultad de Ciencias
Universidad de Chile

INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Comisión de Doctorado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el Candidato

Michael Seeger Pfeiffer

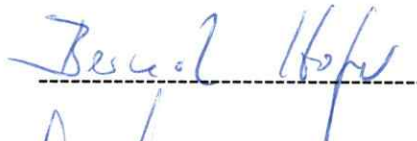
ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito de tesis para el grado de Doctor en Ciencias con Mención en Biología, en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 19 de Junio de 1996.

Director de Tesis:
Dr. Carlos A. Jerez



Director de Tesis:
Dr. Kenneth N. Timmis

Dr. Bernd Hofer
(en Representación del Dr. Timmis)

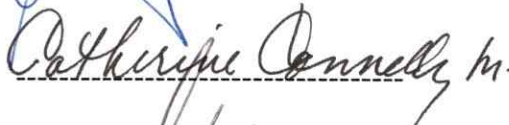


Comisión Informante de Tesis:

Dr. Víctor Cifuentes



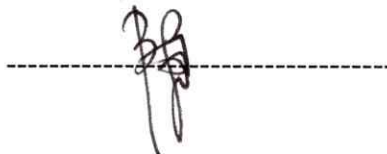
Dra. Catherine Connelly



Dr. Davor Cotorás



Dr. Bernardo Gonzales



Esta tesis fue realizada en el Departamento de Microbiología, Gesellschaft für Biotechnologische Forschung —Braunschweig, Alemania— y en el Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile —Santiago, Chile— bajo la dirección de los Profesores doctores Kenneth N. Timmis y Carlos A. Jerez.

Agradecimientos

Quiero agradecer muy especialmente a Romilio Espejo y a Kenneth N. Timmis por abrirme la puerta de esta temática y de esta tesis, por dada confianza a este proyecto y por su generoso apoyo durante los temporales y la calma de esta travesía.

Agradezco a Carlos A. Jerez y Kenneth N. Timmis por asumir la dirección y a Bernd Hofer por asumir la codirección de este estudio binacional. Su guía, orientación y apoyo creativo en la planificación, en el desarrollo y en las discusiones de esta tesis fueron claves para llegar a puerto.

Deseo agradecer la generosa colaboración dada por mis compañeros de ruta durante la travesía alemana: Antonio Suárez, Birgitta Happe, Dave McKay, Ute Jakubzik, Rafael Blasco, Eduardo Díaz, Frank Bartels, Isabel Möhler, Jean Armengaud, Mathias Prucha, Silke Backhause *et al.*

Quiero expresar un agradecimiento especial a Enrique Pemjean, Mario Penna, Dietmar Pieper y Valeria Sabaj, por su generosa y valiosa ayuda proporcionada en la corrección, la impresión, la escritura y la presentación de este trabajo.

Quiero agradecer a todos aquellos que me ayudaron en los diversos pasos dados durante este trabajo.

Quiero agradecer en particular el generoso apoyo de Alejandra, mi amada esposa, quien se aventuró en esta travesía.

Asimismo, agradezco el financiamiento dado a esta tesis y a este tesista por las siguientes instituciones: Conicyt, Deutscher Akademischer Austauschdienst, Gesellschaft für Biotechnologische Forschung y Fondecyt.

Michael Seeger Pfeiffer

A mis padres
A mis hermanos
y en especial a Alejandra

Es war spät abends, als K. ankam. Das Dorf lag in tiefem Schnee. Vom Schlossberg war nichts zu sehen, Nebel und Finsternis umgaben ihn, auch nicht der schwächste Lichtschein deutete das grosse Schloss an. Lange stand K. auf der Holzbrücke, die von der Landstrasse zum Dorf führte, und blickte in die scheinbare Leere empor.

Franz Kafka

Sucedé que me canso de ser hombre.
Sucedé que entro en las sastrerías y en los cines
marchito, impenetrable, como ún cisne de fieltro
navegando en un agua de origen y ceniza.

El olor de las peluquerías me hace llorar a gritos.
Sólo quiero un descanso de piedras o de lana,
sólo quiero no ver establecimientos ni jardines,
ni mercaderías, ni anteojos, ni ascensores.

Sucedé que me canso de mis pies y mis uñas
y mi pelo y mi sombra.
Sucedé que me canso de ser hombre.

Sin embargo sería delicioso
asustar a un notario con un lirio cortado
o dar muerte a una monja con un golpe de oreja.
Sería bello
ir por las calles con un cuchillo verde
y dando gritos hasta morir de frío.

Pablo Neruda

ÍNDICE DE MATERIAS

| | página |
|---|-----------|
| ÍNDICE DE FIGURAS | x |
| ÍNDICE DE TABLAS | xii |
| LISTA DE ABREVIATURAS | xiv |
| RESUMEN..... | xv |
| ABSTRACT. | xviii |
| | |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1.1. LA CONTAMINACIÓN AMBIENTAL | 1 |
| 1.2. LOS POLICLOROBIFENILOS | 2 |
| 1.3. TÉCNICAS DE DESCONTAMINACIÓN AMBIENTAL | 3 |
| 1.4. DEGRADACIÓN BACTERIANA DE PCBs. | 4 |
| 1.5. <i>Pseudomonas</i> sp. LB400 | 5 |
| 1.6. ESTRATEGIAS PARA MEJORAR LA BIODEGRADACIÓN DE PCBs | 9 |
| 1.7. ANÁLISIS DE VÍAS CATABÓLICAS DE PCBs..... | 10 |
| 1.8. CONSTRUCCIÓN DE NUEVAS CEPAS DEGRADADORAS DE PCBs | 11 |
| 1.9. RESPUESTA MOLECULAR GLOBAL DE BACTERIAS FRENTE A CONDICIONES AMBIENTALES ADVERSAS. | 13 |
| 1.10. HIPÓTESIS DE TRABAJO..... | 14 |
| 1.11. OBJETIVOS DE LA TESIS..... | 14 |
| | |
| 2. MATERIALES Y MÉTODOS | 16 |
| 2.1. REACTIVOS | 16 |

| | |
|---|----|
| 2.2. CEPAS BACTERIANAS | 16 |
| 2.3. PLASMIDIOS | 16 |
| 2.4. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO | 19 |
| 2.5. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR..... | 19 |
| 2.5.1. Aislamiento y purificación de plasmidios | 20 |
| 2.5.2. Digestión del DNA con endonucleasas de restricción | 20 |
| 2.5.3. Relleno de extremos cohesivos con la T ₄ ADN polimerasa | 20 |
| 2.5.4. Ligazón | 20 |
| 2.5.5. Transformación | 21 |
| 2.5.6. Amplificación por PCR | 21 |
| 2.5.7. Electroforesis en geles de agarosa | 22 |
| 2.5.8. Construcción del plasmidio pAIA50 | 22 |
| 2.6. CONSTRUCCIÓN DE NUEVAS CEPAS DEGRADADORAS DE PCBs | 23 |
| 2.7. ANÁLISIS DE LA ESTABILIDAD DEL FENOTIPO Bph | 24 |
| 2.8. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DIOXIGENASA | 24 |
| 2.9. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS ... | 25 |
| 2.10. ENSAYOS CON CÉLULAS EN REPOSO..... | 25 |
| 2.11. ANÁLISIS DE METABOLITOS | 26 |
| 2.11.1. Identificación de HOPDAs | 26 |
| 2.11.2. Identificación de CBAs | 26 |
| 2.11.3. Identificación de BDs y DBs | 27 |
| 2.12. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN | 28 |
| 2.13. ANÁLISIS DE LA RESPUESTA MOLECULAR GLOBAL | 28 |
| 2.13.1. Marcación de proteínas totales | 29 |
| 2.13.2. Preparación de muestras para electroforesis | 29 |
| 2.13.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS..... | 30 |
| 2.13.4. Electroforesis bidimensional..... | 30 |
| 2.13.5. Determinación de los niveles de proteínas analizadas por geles 2D..... | 31 |
| 2.14. INMUNOELECTROTRANSFERENCIA | 32 |

| | |
|---|----|
| 3. RESULTADOS | 33 |
| 3.1. CAPACIDADES CATABÓLICAS DE LA VÍA SUPERIOR | |
| CODIFICADA EN EL LOCUS <i>bph</i> DE <i>Pseudomonas</i> sp. LB400 ... | 33 |
| 3.1.1. Construcción de cepas recombinantes y descripción del | |
| sistema de ensayo | 34 |
| 3.1.2. Conversión de PCBs a HOPDAs | 36 |
| 3.1.3. Conversión de PCBs a CBAs | 40 |
| 3.1.4. Degradación de 4-, 2,2'- y 2,4'-CB por la BDO y la BDDH ... | 45 |
| 3.1.5. Degradación de CBs: dos derivados de TMS pueden | |
| representar un solo compuesto | 49 |
| 3.1.6. Oxidación de diversos CBs por la BDO | 53 |
| 3.1.7. Visión global | 60 |
| 3.2. CONSTRUCCIÓN DE NUEVAS CEPAS DEGRADADORAS DE | |
| PCBs | 63 |
| 3.2.1. Construcción de las nuevas cepas | 63 |
| 3.2.2. Estudio de la estabilidad de los clones recombinantes | 65 |
| 3.2.3. Regulación de los genes <i>bph</i> | 68 |
| 3.2.4. Crecimiento en CBs | 70 |
| 3.3. RESPUESTA MOLECULAR GLOBAL DE BACTERIAS FRENTE | |
| A LOS PCBs | 73 |
| 3.3.1. Respuesta molecular global de la cepa C11 frente a 2-CB | 73 |
| 3.3.2. Efecto de la exposición a bifenilo, 2-CB o 4-CB sobre el | |
| nivel de la proteína GroEL de la cepa C11 | 74 |
| 3.3.3. Respuesta molecular global de la cepa P111 frente a 2-CB | 77 |
| 4. DISCUSIÓN | 80 |
| 4.1. CAPACIDADES CATABÓLICAS DE LA VÍA SUPERIOR | |
| CODIFICADA EN EL LOCUS <i>bph</i> DE <i>Pseudomonas</i> sp. LB400 ... | 80 |
| 4.2. CONSTRUCCIÓN DE NUEVAS CEPAS DEGRADADORAS DE | |
| PCBs | 88 |
| 4.3. RESPUESTA MOLECULAR GLOBAL DE BACTERIAS FRENTE A LOS | |
| PCBs | 91 |

| | |
|--|----|
| 5. CONCLUSIONES Y PROYECCIONES | 94 |
| 5.1. CAPACIDADES CATABÓLICAS DE LA VÍA SUPERIOR CODIFICADA EN EL LOCUS <i>bph</i> DE <i>Pseudomonas</i> sp. LB400 ... | 94 |
| 5.2. CONSTRUCCIÓN DE NUEVAS CEPAS DEGRADADORAS DE PCBs | 95 |
| 5.3. RESPUESTA MOLECULAR GLOBAL DE BACTERIAS FRENTE A LOS PCBs | 95 |
| BIBLIOGRAFÍA | 97 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | página |
|--|--------|
| Fig. 1. Rango de PCBs oxidados por diversas cepas bacterianas nativas. | 6 |
| Fig. 2. La bacteria degradadora de policlorobifenilos <i>Pseudomonas</i> sp. LB400. | 6 |
| Fig. 3. La vía degradativa de bifenilo y el mapa genético del locus <i>bph</i> de <i>Pseudomonas</i> sp. LB400. | 8 |
| Fig. 4. Los vectores de expresión recombinantes pAIA50 y pAIA74 | 35 |
| Fig. 5. Los vectores de expresión recombinantes pAIA11 y pAIA13. | 36 |
| Fig. 6. Cinética de conversión de PCBs a HOPDAs por <i>E. coli</i> que expresa <i>bphABC</i> | 40 |
| Fig. 7. Espectros UV/visible de HOPDAs formados por <i>E. coli</i> que expresa <i>bphABC</i> | 41 |
| Fig. 8. Caracterización del derivado con TMS del metabolito producido desde 2,4'-CB por la bifenilo-2,3-dioxigenasa | 47 |
| Fig. 9. Espectro de masas de ionización por "electrospray" del metabolito no derivatizado producido desde 2,4'-CB por la bifenilo-2,3-dioxigenasa. | 48 |
| Fig. 10. Espectro de masas del derivado con PFP del metabolito producido desde 2,4'-CB por la bifenilo-2,3-dioxigenasa. | 49 |
| Fig. 11. Caracterización de los derivados con TMS del metabolito producido desde 2,4-CB por la bifenilo-2,3-dioxigenasa. | 51 |
| Fig. 12. Espectro de masas del metabolito derivatizado con TMS producido desde 2,4-CB por células que expresan <i>bphAB</i> | 52 |
| Fig. 13. Modelo tridimensional de los conformeros propuestos de derivados con TMS del metabolito producido desde 2,4-CB por la bifenilo-2,3-dioxigenasa..... | 53 |

| | |
|--|----|
| Fig. 14. Catabolismo de mono y diCBs por la vía superior de bifenilo de <i>Pseudomonas</i> sp. LB400. | 61 |
| Fig. 15. Catabolismo de tri a pentaCBs por la vía superior de bifenilo de <i>Pseudomonas</i> sp. LB400. | 62 |
| Fig. 16. Estructura del vector de entrega recombinante pT5K102 que contiene el locus <i>bph</i> de la cepa LB400. | 64 |
| Fig. 17. Los loci <i>bph</i> contenidos en los vectores de entrega recombinantes pT5K102, pT5K202 y pT5K302. | 64 |
| Fig. 18. Estabilidad fenotípica de clones derivados de P111 que contienen diferentes cassettes con genes <i>bph</i> | 67 |
| Fig. 19. Detección de las actividades enzimáticas codificadas por <i>bphABC</i> en cepas bacterianas | 68 |
| Fig. 20. Crecimiento en 2-CB de las cepas C11, C12, C13, C14 y C19 | 71 |
| Fig. 21. Crecimiento de la cepa C12 en CBs | 72 |
| Fig. 22. Análisis de las proteínas totales sintetizadas por la cepa C11 expuesta a 2-CB por electroforesis 2D de alta resolución. | 75 |
| Fig. 23. Identificación de la proteína GroEL de la cepa C11. | 77 |
| Fig. 24. Efecto de la exposición a bifenilo, 2-CB o 4-CB sobre la síntesis de la proteína 5 (GroEL) y de la proteína 1 en la cepa C11 | 78 |
| Fig. 25. Análisis de las proteínas sintetizadas por la cepa silvestre P111 expuesta a 2-CB por electroforesis 2D de alta resolución. | 79 |
| Fig. 26. Oxidación de 2,3,2'- (A) y 3,4,2'-CB (B) por la bifenil-2,3-dioxigenasa codificada en el locus <i>bph</i> de LB400 | 83 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | página |
|--|--------|
| Tabla 1. Cepas de <i>E. coli</i> K12 empleadas | 17 |
| Tabla 2. Cepas de <i>Pseudomonas</i> empleadas | 17 |
| Tabla 3. Plasmidios empleados. | 18. |
| Tabla 4. Formación de HOPDAs desde mono y diCBs por <i>E. coli</i> que expresa <i>bphABC</i> de LB400 | 37 |
| Tabla 5. Formación de HOPDAs desde tri, tetra y pentaCBs por <i>E. coli</i> que expresa <i>bphABC</i> de LB400 | 38 |
| Tabla 6. Formación de CBAs desde mono- y diCBs por <i>E. coli</i> que expresa <i>bphABCD</i> de LB400 | 43 |
| Tabla 7. Formación de CBAs desde tri-, tetra- y pentaCBs por <i>E. coli</i> que expresa <i>bphABCD</i> de LB400. | 44 |
| Tabla 8. Caracterización de metabolitos producidos desde CBs por la bifenilo-2,3-dioxigenasa (BDO) y la bifenilo-2,3-dihidrodiol-2,3-deshidrogenasa (BDDH). | 46 |
| Tabla 9. Caracterización de metabolitos producidos desde mono y diCBs por la bifenilo-2,3-dioxigenasa. | 56 |
| Tabla 10. Caracterización de metabolitos producidos desde tri, tetra y pentaCBs por la bifenilo-2,3-dioxigenasa. | 57 |
| Tabla 11. Descloración de PCBs catalizada por la bifenilo-2,3-dioxigenasa de LB400 | 58 |
| Tabla 12. Caracterización de de cepas estables P111:: <i>bph</i> | 67 |

| | |
|--|----|
| Tabla 13. Actividad de la bifenilo-2,3-dioxigenasa de cepas estables P111:: <i>bph</i> crecidas en bifenilo o succinato | 69 |
| Tabla 14. Crecimiento de las cepas C11, C12 y C13 en CBs | 71 |

Lista de abreviaturas

| | |
|------------------------|--|
| B: | bifenilo |
| BD: | bifenilodihidrodiol |
| BDDH: | bifenilo-2,3-dihidrodiol-2,3-deshidrogenasa |
| BDO: | bifenilo-2,3-dioxigenasa |
| BOR: | N-butil-boronato |
| CB: | clorobifenilo |
| CBA: | clorobenzoato |
| DB: | dihidroxibifenilo |
| DBDO: | 2,3-dihidroxibifenilo-1,2-dioxigenasa |
| EDTA: | Acido etilendiaminotetraacético |
| ESI: | ionización por electrospray |
| GC: | cromatografía de gases |
| HOPDA: | 2-hidroxi-6-oxo-6-fenilhexa-2,4-dienoato |
| HOPDAH: | 2-hidroxi-6-oxo-6-fenilhexa-2,4-dienoato hidrolasa |
| HPLC: | cromatografía líquida de alta resolución |
| MS: | espectroscopía de masas |
| <i>m/z</i> : | masa/carga |
| ND: | no detectado |
| NE: | no estudiado |
| PCB: | policlorobifenilo |
| PCR: | reacción de cadena de la DNA polimerasa |
| PFP: | pentafluoropropiónico |
| SDS: | sulfato disódico de dodecilo |
| TMS: | trimetilsilil |
| Tris: | Tris-(hidroximetil)-aminometano |
| <i>t_r</i> : | tiempo de retención |
| U: | unidad de enzima |
| λ : | longitud de onda |
| 2D: | bidimensional |

Biodegradación de policlorobifenilos: capacidades catabólicas de la vía superior codificada por el locus *bph* de *Pseudomonas* sp. LB400 y construcción de nuevas cepas degradadoras

RESUMEN

Los policlorobifenilos (PCBs) se encuentran entre los contaminantes clorados más ampliamente distribuidos en la biosfera. Los PCBs son xenobióticos que han causado una gran preocupación debido a sus propiedades de persistencia en el medio ambiente, bioacumulación, toxicidad y cancerogenicidad, que los convierten en un serio problema ambiental y de salud. La biorremediación parece ser una estrategia promisoría para la limpieza de suelos y ambientes acuáticos contaminados con PCBs. Tanto las bacterias anaerobias como las aerobias tienen el potencial de atacar los PCBs. Sin embargo, estas degradaciones son ineficientes o incompletas. La *Pseudomonas* sp. LB400 es una bacteria gram-negativa capaz de oxidar un espectro inusualmente amplio de PCBs. Para determinar los espectros de sustratos y los mecanismos de las enzimas catabólicas de bifenilo de la cepa LB400 se investigaron los productos de degradación de PCBs y la extensión de esta degradación por *Escherichia coli* que expresan genes *bph* apropiados de LB400. Los metabolitos formados desde los PCBs se analizaron por técnicas analíticas, como la cromatografía líquida de alta resolución, la cromatografía gaseosa/espectrometría de masas, la ionización por electrospray/espectrometría de masas y la espectroscopía UV y visible. Se estudió el metabolismo de 34 clorobifenilos (CBs) por las enzimas de la vía catabólica superior de bifenilo codificada por el locus *bph* de *Pseudomonas* sp. LB400. La bifenilo-2,3-dioxigenasa (BDO) atacó los CBs sustituidos sólo en un anillo de un modo esperado: el sustrato fue hidroxilado en las posiciones *orto* y *meta* del anillo no clorado. En contraste, cuando la BDO atacó 2,2'- y 2,4'-CB estos compuestos sufrieron una deshalogenación en forma cuantitativa y exclusiva en el anillo *orto* clorado. Este fenómeno también se detectó con CBs de mayor grado de cloración que poseen un anillo *orto*-monoclorado. La deshalogenación llevó directamente a la formación de 2,3-

dihidroxibifenilo, y de esta manera se obvió la necesidad de la bifenilo-2,3-dihidrodiol-2,3-deshidrogenasa en el catabolismo de tales CBs. Esto indica que, en estos casos, la dioxigenación se dirigió a un carbono *orto*-clorado y a su vecino no sustituido. Hasta ahora la eliminación de cloro, mediada por la BDO, sólo se ha observado en la posición *orto*. A pesar de haberse detectado dos productos por cromatografía de gases/espectrometría de masas de los derivados de trimetilsililación de la oxidación de 2,4-CB por la BDO, se obtuvo evidencia de que ellos representan dos conformeros y que la hidroxilación ocurre exclusivamente en los carbonos *orto* y *meta* del anillo no clorado. En general, las enzimas de la vía superior metabolizaron completamente mono- y diCBs a clorobenzoatos (CBAs). Sin embargo, la mayoría de los CBs con mayor grado de cloración sólo se degradaron parcialmente. La identificación de los metabolitos de punto final indica que, dependiendo del congénere, diferentes reacciones de la ruta metabólica limitan la degradación de los PCBs. Trece de 15 mono y diCBs y sólo 8 de 19 tri a pentaCBs fueron convertidos a CBAs. Se determinó la siguiente correlación entre el anillo oxidado y la degradabilidad a través de la vía superior: no \approx *orto*- > *meta*- > *para*-clorado. Todos los mono y al menos 8 de 12 diCBs fueron atacados por la BDO en forma exclusiva en los carbonos *orto* y *meta*. Casi todos los congéneres clorados en ambos anillos y con un anillo monoclorado en *meta* o clorado en posiciones 2 y 5 fueron atacados por la BDO adicionalmente en los carbonos *meta* y *para*. Esta enzima exhibió un alto grado de selectividad por el anillo aromático atacado, con la siguiente preferencia de anillo: no > *orto*- > *meta*- > *para*-sustituido. La influencia del patrón de sustitución del anillo metabolizado sobre la formación de CBAs se asemeja a la influencia sobre la dioxigenación inicial, sugiriendo que la velocidad de formación de CBA podría estar determinada frecuentemente por la velocidad del ataque inicial. Adicionalmente, se determinó que los espectros de absorción de los fenilhexadienoatos formados se correlacionan con la presencia o la ausencia del sustituyente cloro en posición *orto*.

Para evitar los problemas de la acumulación y de la liberación de CBAs y de la inestabilidad genética de las cepas degradadoras de PCBs actualmente disponibles, se debe combinar una vía superior degradativa de PCBs con una apropiada vía inferior degradativa de CBAs. Se construyeron cepas recombinantes por la transferencia del locus *bph* que

codifica la bien caracterizada vía degradativa de PCBs de LB400 en una *Pseudomonas* capaz de utilizar diversos CBAs. Como receptora del locus *bph* se empleó la cepa degradadora de CBAs *P. putida* P111. Después de la conjugación se obtuvieron diferentes clones por selección mediante crecimiento en 2-CB. La presencia del locus *bph* completo se confirmó por PCR y por ensayos de las actividades enzimáticas codificadas por *bphABCD*. Cinco de estas nuevas cepas fueron estables en condiciones no selectivas, siendo además inducible la expresión de sus genes *bph*. Las cepas recombinantes C11, C12 y C13 fueron capaces de crecer en todos los mono- y en diversos diCBs clorados en uno o ambos anillos como única fuente de carbono y energía. La expansión de las funciones metabólicas de tales *Pseudomonas* para degradar contaminantes podría ser una estrategia útil para la biorremediación.

Cuando las bacterias son expuestas a condiciones ambientales adversas manifiestan una rápida respuesta molecular global. Se analizaron las respuestas globales moleculares de C11, una de las nuevas cepas degradadoras de PCBs, y de la cepa parental P111 frente a CBs. Los cambios en los patrones de proteínas sintetizadas se identificaron después de una marcación de las células con [³⁵S]metionina y [³⁵S]cisteína y posterior electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida. El análisis reveló que ambas cepas sufrieron cambios en su expresión génica al ser expuestas a 2-CB. Las células mostraron un aumento de la síntesis de diversas proteínas, así como la represión de otras. Los cambios en los patrones de proteínas observados fueron temporales y la mayoría de las proteínas se indujeron o reprimieron sólo transitoriamente. Una de las proteínas inducidas durante la exposición a 2-CB en la cepa C11, pero no en la cepa P111, se identificó como la chaperona GroEL. La GroEL se indujo en C11 también frente a la exposición a bifenilo o 4-CB. Por lo tanto, la respuesta de C11 a 2-CB, 4-CB o bifenilo constituye una respuesta de estrés. Este estudio, junto con otros, demuestra que el análisis por electroforesis bidimensional de la síntesis de proteínas es un método alternativo y muy sensible para determinar condiciones de estrés y efectos tóxicos de contaminantes ambientales a niveles subletales.

Biodegradation of polychlorobiphenyls: catabolic capabilities of the upper pathway encoded by the *bph* locus of *Pseudomonas* sp. LB400 and construction of novel degrading strains

ABSTRACT

Polychlorobiphenyls (PCBs) are among the most widely distributed chlorinated pollutants in the environment. PCBs are xenobiotics which have attracted concern because of their persistence, bioaccumulation, toxicity and cancerogenicity which make them a serious environmental and health problem. Bioremediation seems to be a promising approach for the clean-up of PCB-contaminated soils and aquatic environments. Both anaerobic and aerobic bacteria have the potential to attack PCBs. However, these degradations are inefficient and/or incomplete. *Pseudomonas* sp. LB400 is a gram-negative bacterium capable of oxidizing an unusually broad spectrum of PCBs. In order to determine the substrate spectra and the mechanism of the individual PCB catabolic enzymes of the strain LB400, PCB degradation products and the extent of PCB degradation by *Escherichia coli* derivatives expressing appropriate *bph* genes from LB400 was investigated. PCB metabolites were analysed by analytical techniques such as high performance liquid chromatography, gas chromatography/mass spectrometry, electrospray ionization/mass spectrometry, UV and visible spectroscopy. Metabolism of 34 chlorobiphenyls (CBs) by the enzymes of the upper biphenyl catabolic pathway encoded by the *bph* locus of *Pseudomonas* sp. strain LB400 was investigated. CBs substituted in only one ring were attacked by biphenyl-2,3-dioxygenase (BDO) in the expected manner: the substrate was hydroxylated at the *ortho* and *meta* positions of the non-chlorinated ring. In contrast, 2,2'- and 2,4'-CB after attack of BDO were found to undergo dehalogenation exclusively and quantitatively at the *ortho*-chlorinated ring. This has also been detected with more highly chlorinated congeners containing an *ortho*-monochlorinated ring. Dehalogenation directly leads to formation of 2,3-dihydroxybiphenyls, and thus obviates the need for biphenyl-2,3-dihydrodiol-2,3-dehydrogenase in the catabolism of such CBs. This indicates that in these cases dioxygenation was directed towards the chlorinated

ortho-carbon and its unsubstituted neighbour. So far, chlorine elimination, mediated by BDO, was only observed at the *ortho*-position. Although two products of the BDO-catalyzed reaction were detected by gas chromatography/mass spectrometry analysis after trimethylsilylation, evidence is provided indicating that both represent two conformers and that oxidation of 2,4-CB was directed exclusively towards *ortho* and *meta* carbons of the non-chlorinated ring. The enzymes of the upper pathway were generally able to metabolize completely mono- and diCBs to chlorobenzoates (CBAs). However, more highly chlorinated CBs were incompletely degraded in most instances. Identification of dead-end metabolites indicated that, depending on the congener, different reactions of this metabolic route limit the degradation of PCBs. Thirteen of 15 mono- and diCBs and only 8 of 19 tri- to pentaCBs were converted into CBAs. The following correlation between the oxidized rings and the degradability through the entire upper pathway was determined: non \approx *ortho* > *meta* > *para*-chlorinated phenyl. All mono- and at least 8 of 12 diCBs were attacked by the BDO exclusively at *ortho* and *meta* carbons. Almost all the congeners chlorinated on both rings and with one ring mono-*meta*-chlorinated or chlorinated at positions 2 and 5 were attacked by the BDO also at *meta* and *para* carbons. This enzyme exhibited a high degree of selectivity for the aromatic ring to be attacked with the order of ring preference: non- > *ortho*- > *meta*- > *para*-substituted. The influence of the chlorine substitution pattern of the metabolized ring on benzoate formation resembled its influence on the reactivity of initial dioxygenation, suggesting that the rate of benzoate formation may frequently be determined by the rate of initial attack. The absorption spectra of phenylhexadienoates formed correlated with the presence or absence of a chlorine substituent at an *ortho* position.

In an attempt to circumvent the problems of CBA accumulation and liberation and of genetic instability of PCB degraders, an upper-PCB degradative-pathway must be combined with an appropriate lower-CBA degradative-pathway. Recombinant strains were constructed by transfer of the *bph* locus encoding the well-characterized PCB-degradative pathway of LB400 into a *Pseudomonad* capable of utilizing several CBAs. The CBA degrading strain *P. putida* P111 was used as recipient for the *bph* gene cluster. After mating different clones were obtained by selection for growth on 2-CB. The presence of

the entire *bph* locus was confirmed by PCR and by assays for the *bphABCD*-encoded enzymatic activities. Five of these novel strains were stable under non-selective conditions and their expression of *bph*-encoded genes were inducible. The recombinant strains C11, C12 and C13 were able to grow on all mono- and on various diCBs chlorinated in one and in both rings as the only carbon and energy source. Expanding the metabolic functions of such Pseudomonad to degrade pollutants may prove to be a useful strategy for bioremediation.

Bacteria display a rapid global molecular response when they are exposed to adverse environmental conditions. The global molecular response of C11, one of the novel PCB-degrading strains, and of the parental strain P111 to CBs were examined. Changes in protein patterns were identified after labelling of proteins with [³⁵S]methionine and [³⁵S]cysteine and subsequent two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. The analysis revealed in both strains changes in total protein synthesis when they are exposed to 2-CB. The cells showed an increased synthesis of several proteins as well as a repression of others. The observed changes in protein pattern were temporal and most of the proteins were induced or repressed only transiently. One of the proteins induced during exposure to 2-CB in C11, but not in P111, was identified as the chaperone GroEL. GroEL was also induced in C11 during exposure to biphenyl or 4-CB. Therefore the response of C11 to 2-CB, 4-CB or biphenyl constitute a stress response. This study demonstrates that the two-dimensional electrophoretic analysis of the synthesis of proteins might serve as an alternative and sensitive method for assessing stress conditions and toxic effects of environmental pollutants at sublethal levels.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LA CONTAMINACIÓN AMBIENTAL

La contaminación de la biosfera con compuestos orgánicos sintéticos recalcitrantes a la biodegradación es un problema de creciente importancia en el mundo (Alexander, 1981; van der Meer *et al.*, 1992; Timmis *et al.*, 1994). La industrialización ha permitido alcanzar un elevado desarrollo socioeconómico en diferentes regiones geográficas del mundo. Pero, al mismo tiempo, el desarrollo industrial ha ocasionado la liberación deliberada o accidental al entorno de diferentes compuestos químicos sintéticos, lo cual ha conllevado un dramático impacto para los ecosistemas y la calidad de vida del hombre. Esta contaminación ambiental no sólo ha afectado a las regiones más industrializadas, sino que se ha transformado en un problema de toda la biosfera.

Chile no está exento de los problemas de contaminación ambiental. La contaminación masiva del entorno con compuestos químicos sintéticos no ha sido controlada, observándose en los últimos años un alarmante aumento de la polución ambiental. Los procesos mineros, agrícolas, pesqueros, forestales y químicos, entre otros, han provocado considerables y preocupantes contaminaciones del medio ambiente natural. Entre las causas de esta problemática figuran una legislación muy permisiva e incompleta, una escasa fiscalización, la ineficiencia de muchos procesos industriales y algunos accidentes.

En general, se supone que todos los compuestos orgánicos de origen biosintético son degradados por los microorganismos nativos. En contraste, los xenobióticos, que son compuestos sintetizados por el hombre y que no tienen la estructura de moléculas

naturales, difícilmente son degradadas por microorganismos, debido a que ha transcurrido un tiempo insuficiente para la evolución de los sistemas enzimáticos requeridos (Gibson y Subramanian, 1984; Timmis *et al.*, 1994). Los compuestos orgánicos clorados son algunos de los contaminantes más recalcitrantes a la biodegradación (Fredrickson *et al.*, 1993), siendo la halogenación fundamental en la resistencia a la degradación (Chaundry y Chapalamadugu, 1991). Los compuestos organoclorados representan uno de los principales contaminantes orgánicos en el medio ambiente (Tiedje *et al.*, 1993). Los policlorobifenilos (PCBs) son uno de los contaminantes clorados más relevantes.

1.2. LOS POLICLOROBIFENILOS

Los PCBs son uno de los contaminantes orgánicos clorados más ampliamente distribuidos en la biosfera (Tiedje *et al.*, 1993). Los PCBs empezaron a producirse en 1929, en los Estados Unidos (Reinecke y Knackmuss, 1988). Desde entonces, estos compuestos han sido sintetizados en enormes cantidades en los países industrializados, llegando su producción mundial total acumulada a principios del decenio de 1980, a alrededor de dos millones de toneladas (Furukawa, 1982). Los PCBs se han utilizado principalmente como fluidos dieléctricos, intercambiadores de calor y líquidos hidráulicos (Reinecke y Knackmuss, 1988; Bedard, 1990; Abramowicz, 1990). Adicionalmente, han sido empleados como componentes de pinturas y de tintas de impresión, como pesticidas y en la elaboración de plásticos (Reinecke y Knackmuss, 1988; Bedard, 1990; Abramowicz, 1990). Aunque en los últimos años muchos países industrializados han limitado la producción y los usos de los PCBs, esta producción ha continuado en algunas regiones (World Health Organization, 1993).

Los PCBs están constituidos por un núcleo de bifenilo que está sustituido por 1 a 10 cloros. Existen 209 congéneres diferentes de PCB que difieren en el número o en la posición de los cloros. Una mezcla comercial típica, como Arochlor, Clophen o

Kanechlor, contiene entre 60 y 80 congéneres diferentes. La contaminación ambiental con PCBs se presenta, generalmente, en forma de estas complejas mezclas comerciales (Abramowicz, 1990).

Los PCBs son térmica y químicamente estables y recalcitrantes a la biodegradación. Se acumulan en suelos y sedimentos acuáticos. Su fuerte adsorción a la materia orgánica y a los tejidos grasos lleva a su bioacumulación en la cadena alimenticia. Esto ha causado gran preocupación, debido a que los efectos a largo plazo de los PCBs no son bien conocidos. El más importante efecto observado de los PCBs sobre los animales en el medio ambiente natural ha sido la disminución de la reproducción de mamíferos (World Health Organization, 1993). Se ha descrito que algunos de los congéneres de PCBs son tóxicos y cancerígenos (Kimbrough, 1987; Silberhorn *et al.*, 1990; Safe, 1992, 1994; Birnbaum, 1994; Davis y Bradlow, 1995). El receptor de aril hidrocarbano mediaría los efectos carcinogénicos y teratogénicos de contaminantes como determinados congéneres de PCBs y algunas dioxinas cloradas (Fernández-Salguero *et al.*, 1995). El ser humano está expuesto a los PCBs principalmente a través de los alimentos contaminados, como el pescado, los mariscos, la carne, la leche y los productos lácteos (World Health Organization, 1993). Estos antecedentes convierten a los PCBs en un serio problema de salud pública y de contaminación ambiental.

1.3. TÉCNICAS DE DESCONTAMINACIÓN AMBIENTAL

Existe una gran variedad de técnicas para descontaminar, o para contener en áreas restringidas la contaminación de compuestos orgánicos clorados. Se han utilizado técnicas físicas, químicas, térmicas y procesos de solidificación y estabilización (Tadesse *et al.*, 1994). Sin embargo, estas metodologías no han sido capaces de solucionar la problemática que representan algunos contaminantes orgánicos clorados. La biorremediación ofrece una solución alternativa al tratamiento de tierras y aguas

contaminadas con compuestos orgánicos por la conversión de estos compuestos mediante microorganismos en productos inocuos. Este proceso biotecnológico ofrece muchas ventajas respecto a los procesos físico-químicos. La biorremediación puede lograr la destrucción completa de los contaminantes orgánicos, tiene un bajo costo y es aplicable *in situ* (Singleton, 1994; Timmis *et al.*, 1994).

Los métodos tradicionales empleados en la descontaminación de PCBs han sido la incineración a altas temperaturas y la remoción del material contaminado para su depósito en rellenos seguros (Unterman *et al.*, 1988; World Health Organization, 1993; Focht, 1995). Sin embargo, estas metodologías son muy caras, su aplicación a suelos y sedimentos contaminados es difícil y en general son rechazadas por la opinión pública (Focht, 1995). Para la descontaminación de grandes áreas de suelos y ambientes acuáticos contaminados con PCBs, la biorremediación ofrece una de las estrategias más promisorias. A pesar de la recalcitrancia de los PCBs a la biodegradación, se han descubierto diversas bacterias nativas capaces de degradar estos compuestos.

1.4. DEGRADACIÓN BACTERIANA DE PCBs

En el medio ambiente, la contaminación con PCBs se presenta en forma de mezclas complejas de congéneres (Abramowicz, 1990; Boyle *et al.*, 1992). Por lo tanto, la biodegradación de esta gran variedad de congéneres requiere de sistemas enzimáticos capaces de catabolizar un amplio rango de sustratos. Tanto consorcios de microorganismos anaerobios como bacterias aerobias son capaces de atacar los PCBs utilizando diferentes mecanismos. La participación de bacterias anaerobias en la degradación de PCBs ha sido evidenciada en los estudios fundamentales de Brown *et al.* (1987) y de Quensen III *et al.* (1988, 1990). En ambientes naturales anaerobios se observó la desaparición de bifenilos alta y medianamente clorados y la aparición de bifenilos mono- y diclorados mediada por la actividad de consorcios de microorganismos.

Estas transformaciones son catalizadas por comunidades naturales mixtas (Tiedje *et al.*, 1993), en las que participan consorcios metanogénicos (Bedard, 1990; Ye *et al.*, 1995). La descloración reductiva de PCBs es específica para ciertos congéneres. Este proceso involucra la remoción selectiva de cloro desde posiciones *para* y *meta*, mientras que el cloro de la posición *orto* se conserva (Quensen III *et al.*, 1988, 1990; Tiedje *et al.*, 1993).

La degradación aerobia de bifenilo comenzó a ser estudiada a comienzos de la década de los años setenta. Los diversos metabolitos de la vía catabólica de bifenilo a benzoato fueron descritos por Lunt y Evans (1970), Catelani *et al.* (Catelani *et al.*, 1971; 1973; Catelani y Colombi, 1974), Gibson *et al.* (1973) y Ahmed y Focht (1973). Los estudios pioneros sobre el catabolismo bacteriano aerobio de los PCBs son los de Ahmed y Focht (1973) y fueron profundizados por Furukawa *et al.* (Furukawa *et al.*, 1978; Furukawa, 1982). Se han descrito varias especies de bacterias aerobias que son capaces de atacar por oxidación bifenilos moderada y bajamente clorados. Estos microorganismos pertenecen, predominantemente, a los géneros *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Achromobacter*, *Moraxella* y *Rhodococcus* (Furukawa, 1982; Abramowicz, 1990; Bedard, 1990; Furukawa, 1994). El espectro de los PCBs que pueden ser atacados por diferentes bacterias aerobias ha sido caracterizado (Furukawa, 1982; Bopp, 1986; Abramowicz, 1990; Bedard, 1990). La figura 1 ilustra las capacidades catabólicas de varias bacterias nativas, entre las cuales se destaca, en particular, la *Pseudomonas* sp. LB400.

1.5. *Pseudomonas* sp. LB400

Pseudomonas sp. LB400 (figura 2) es una bacteria gram-negativa capaz de oxidar un rango particularmente amplio de PCBs (Bopp, 1986; Abramowicz, 1990; Bedard y Haberl, 1990). Este microorganismo es capaz de atacar desde congéneres mono hasta hexaclorados, mostrando una preferencia degradativa por los *orto*-CBs. Recientemente, se aisló de la bacteria LB400 un segmento de ADN involucrado en la degradación de PCBs

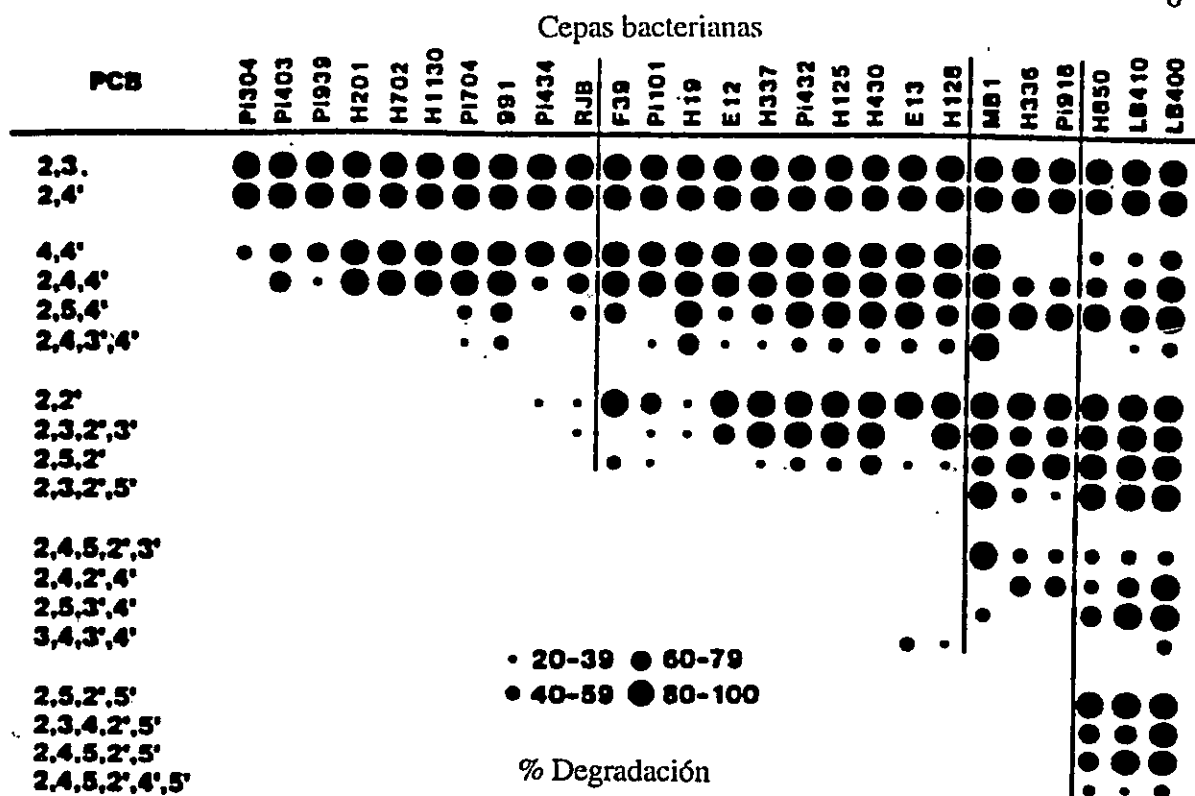


Figura 1. Rango de PCBs oxidados por diversas cepas bacterianas nativas. Fuente: adaptado de Unterman *et al.* (1988).



Figura 2. La bacteria degradadora de policlorobifenilos *Pseudomonas sp.* LB400. La microelectrografía corresponde a células crecidas en un medio mínimo utilizando bifenilo como única fuente de carbono, tratadas mediante tinción negativa y examinadas por microscopía electrónica de transmisión. La barra representa 1 μ m.

(Mondello, 1989; Dowling *et al.*, 1993). Mediante el clonamiento en vectores de expresión, la secuenciación del ADN y ensayos enzimáticos, se determinó la localización y la función de once cistrones vecinos llamados *bph* (Erickson and Mondello, 1992; Hofer *et al.* 1993, 1994). El mapa actualizado de este locus se muestra en la figura 3. El mismo orden de los genes *bph* en el locus se ha descrito en *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 (Hayase *et al.*, 1990), pero en otras cepas este orden es diferente (Hayase *et al.*, 1990; Kikuchi *et al.*, 1994).

Diez genes estructurales de este locus *bph* están relacionados con la degradación de bifenilo (Erickson y Mondello, 1992; Hofer *et al.*, 1993, 1994). El locus *bph* de LB400 codifica la vía superior de degradación de bifenilo, vía que degrada el bifenilo a benzoato y 2-hidroxipenta-2,4-dienoato y la vía "alifática inferior" de degradación de bifenilo, ruta que transforma el 2-hidroxipenta-2,4-dienoato a intermediarios del ciclo de Krebs (figura 3). Adicionalmente, este locus codifica una glutatión *S*-transferasa (Hofer *et al.*, 1994). Estos estudios hacen de *Pseudomonas* sp. LB400 la primera cepa bacteriana cuyas secuencias completas se conocen tanto a nivel de ADN como de proteínas de la vía superior y de la vía "alifática inferior" de degradación de bifenilo.

Las enzimas de este vía catabólica superior de bifenilo codificadas en el locus *bph* son la bifenilo-2,3-dioxigenasa (BDO) codificada por *bphA1A2A3A4* (estos genes se han llamado también *bphAEFG* (Erickson y Mondello, 1992); en adelante, todos estos genes se designarán como *bphA*), la bifenilo-2,3-dihidrodiol-2,3-deshidrogenasa (BDDH) codificada por *bphB*, la 2,3-dihidroxibifenilo-2,3-dioxigenasa (DBDO) codificada por *bphC* y la 2-hidroxi-6-oxo-6-fenilhexa-2,4-dienoato hidrolasa (HOPDAH) codificada por *bphD*. La BDO es un sistema enzimático multicomponente compuesto de una hidroxilasa (también llamada oxigenasa terminal), que es una proteína Fe-S de 2 subunidades, y dos proteínas de transferencia de electrones: una ferredoxina y una NADH-ferredoxina reductasa (Erickson y Mondello, 1992; van der Meer *et al.*, 1992; Hofer *et al.*,

1993). La BDO de LB400 es un miembro de las dioxigenasas hidroxilantes de anillo de clase IIB (Batie *et al.*, 1991). La BDDH de LB400 es un miembro de la familia de deshidrogenasas de alcoholes de cadena corta que consisten en un dominio N-terminal de unión de NAD y un dominio C-terminal de unión de dihidrodiol (Persson *et al.*, 1991). La DBDO es similar a otras dioxigenasas de ruptura extradiol de microorganismos aerobios degradadores de compuestos aromáticos (Hofer *et al.*, 1993). Recientemente, se ha determinado la estructura tridimensional de esta enzima (Han *et al.*, 1995). La HOPDAH de LB400 es homóloga a otras hidrolasas involucradas en la biodegradación de compuestos aromáticos. Se ha postulado que la enzima HOPDAH contiene una tríada catalítica típica de serina hidrolasas (Ollis *et al.*, 1992; Hofer *et al.*, 1993). Las enzimas de la vía "alifática inferior" de degradación de bifenilo son la 2-hidroxipenta-2,4-dienoato hidratasa codificada por *bphH*, la acetaldéhidio deshidrogenasa codificada por *bphJ*, y la 4-hidroxi-2-oxovalerato aldolasa codificada por *bphI* (Hofer *et al.* 1994). La región entre los genes *bphC* y *bphD* incluye además una glutatión *S*-transferasa codificada por *bphK*, cuyo rol en la degradación de PCBs es desconocido. En células de hígado de rata se observó que algunos PCBs inducen la síntesis de una glutatión *S*-transferasa (Aoki *et al.*, 1992). La glutatión *S*-transferasa de LB400 podría tener funciones similares a otras glutatión *S*-transferasas en la unión, el transporte y la remoción de xenobióticos o sus metabolitos (Daniel, 1993; Jakoby y Ziegler, 1990), en particular de los PCBs.

1.6. ESTRATEGIAS PARA MEJORAR LA BIODEGRADACIÓN DE PCBs

Si bien los estudios sobre la degradación bacteriana de PCBs se han incrementado notablemente en los últimos años, la ineficiencia del proceso degradativo sigue siendo el gran escollo para la implementación de la biorremediación de PCBs. El descubrimiento de la degradación de PCBs alta y moderadamente clorados por consorcios bacterianos anaerobios creó muchas expectativas para la biorremediación. Sin embargo, la

deshalogenación anaerobia de PCBs es un proceso muy lento y mal caracterizado. Tanto los sistemas enzimáticos como los microorganismos involucrados no han podido ser caracterizados, por lo que actualmente se desconoce cómo podría ser acelerado este proceso (Focht, 1995; Ye *et al.*, 1995).

A diferencia de lo que ocurre en los procesos anaerobios, las bacterias aerobias degradadoras de PCBs y sus respectivas vías metabólicas están mejor caracterizadas. Sin embargo, los procesos aerobios de degradación de PCBs en condiciones ambientales actualmente disponibles son ineficientes (Abramowicz, 1990; Boyle *et al.*, 1992; Furukawa, 1994; Timmis *et al.*, 1994). Los problemas asociados a esta ineficiencia son, entre otros: a) degradación incompleta de PCBs por la carencia de una vía de degradación de clorobenzoatos (CBAs) o porque las enzimas catabólicas tienen un rango de sustrato insuficiente; b) liberación al ambiente de CBAs que son transformados en productos tóxicos por la microflora nativa; c) toxicidad de algunos PCBs y sus metabolitos; d) inestabilidad de los genes *bph*, y e) enzimas catabólicas sólo inducibles por bifenilo. El desarrollo de procesos aerobios eficientes de biodegradación de PCBs requiere de microorganismos con capacidades catabólicas mejoradas. Para generar bacterias degradadoras de PCBs más eficientes deben conocerse previamente las capacidades catabólicas de las vías metabólicas que se desean emplear.

1.7. ANÁLISIS DE VÍAS CATABÓLICAS DE PCBs

El rango de los PCBs que pueden ser transformados por diferentes bacterias aerobias ha sido caracterizado (Furukawa, 1982; Bopp, 1986; Abramowicz, 1990; Bedard, 1990). Sin embargo, existen muy pocos estudios sobre los metabolitos formados a partir de los diversos congéneres. Por consiguiente, en general las etapas catabólicas limitantes no se conocen. Adicionalmente, la mayoría de los estudios se realizaron con los microorganismos parentales. En estos casos, las transformaciones no se pueden atribuir a

enzimas específicas, debido a la posible presencia de isoenzimas (Asturias y Timmis, 1993; Timmis *et al.*, 1994; Seto *et al.*, 1995).

El clonamiento de los genes es una estrategia adecuada para dilucidar los metabolitos de una vía metabólica. Los genes codificantes de una enzima, o de parte de una vía metabólica, pueden ser expresados en un huésped incapaz de metabolizar los substratos y sus productos. Esta estrategia experimental permite la caracterización *in vivo* de actividades enzimáticas individuales y la identificación de los metabolitos producidos. Como parte de esta tesis, se ha utilizado esta estrategia experimental para dilucidar las capacidades metabólicas de la vía catabólica superior de bifenilo codificada en el locus *bph* de *Pseudomonas* sp. LB400. Parte de estos resultados han sido publicados durante el desarrollo de este trabajo (Seeger *et al.*, 1995a, 1995b; Pieper *et al.*, 1995; Hofer *et al.*, 1996; Seeger *et al.*, 1996b).

1.8. CONSTRUCCIÓN DE NUEVAS CEPAS DEGRADADORAS DE PCBs

Para la construcción, mediante ingeniería genética, de nuevas cepas con vías catabólicas mejoradas se han empleado dos grandes estrategias. Una de éstas consiste en la expansión vertical de la vía por la incorporación de genes que codifican para enzimas adicionales (Timmis *et al.*, 1994). Para esto se deben conocer las diferentes etapas de la degradación del compuesto problema, para luego poder reunir todas las enzimas involucradas en un solo microorganismo. Con esta finalidad se puede usar la conjugación simple o el clonamiento de los genes para su posterior inserción en el huésped adecuado. La ingeniería genética de bacterias permitió el ensamblaje de una nueva ruta mediante la combinación de secciones adecuadas de diferentes vías catabólicas (Rojo *et al.*, 1987; Bailey, 1991). Es importante destacar que en la degradación de PCBs las bacterias son capaces sólo de transformar los CBs a CBAs, productos que —en la mayoría de estas cepas— son metabolitos de punto final. Cultivos mixtos de degradadores de CBs y

degradadores de CBAs mineralizan algunos PCBs (Adriaens *et al.*, 1989; Havel y Reinecke, 1991; Fava *et al.*, 1994). Por consiguiente, la combinación de vías metabólicas de CBs y de CBAs debiera producir bacterias capaces de mineralizar PCBs (Furukawa y Chakrabarty, 1982). Asimismo, de esta manera se evitan tanto limitaciones en la difusión como la transformación de los intermediarios por otros microorganismos en metabolitos de punto final, o en productos tóxicos que desestabilizan la comunidad e inhiben el proceso biodegradativo (Havel y Reinecke, 1992; Timmis *et al.*, 1994). La liberación de 4-CBA durante el metabolismo de PCBs posibilita la transformación por otros microorganismos en protoanemonina, un antibiótico de amplio espectro (Blasco *et al.*, 1995). Diversos procedimientos experimentales permitieron generar bacterias que contienen tanto las enzimas degradadoras de CBs como las degradadoras de CBAs (Mokross *et al.*, 1990; Havel y Reinecke, 1991; Hickey *et al.*, 1992; Adams *et al.*, 1992; Dowling *et al.*, 1993; McCullar *et al.*, 1994; Brazil *et al.*, 1995).

La segunda estrategia involucra la expansión horizontal del rango de sustratos de una vía mediante el reclutamiento de isoenzimas de otras vías (Lehrbach *et al.*, 1984) o mediante modificación por mutagénesis de las enzimas claves (Ramos *et al.*, 1987). La modificación de enzimas claves de la vía catabólica existente permitió expandir el rango de sustratos de la vía TOL (Ramos *et al.*, 1987). En el caso de la degradación de PCBs, las bacterias disponibles son capaces de atacar solamente un rango limitado de congéneres. Por consiguiente, cambios en la actividad o especificidad de enzimas críticas pueden generar vías catabólicas con un mayor rango de sustratos. Al respecto, mediante mutagénesis se amplió el rango de sustrato de la BDO (Erickson y Mondello, 1993).

Para superar los problemas de la acumulación y de la liberación de CBAs de las cepas degradadoras de PCBs actualmente disponibles, en esta tesis se ha propuesto la construcción de nuevas cepas degradadoras de CBs. En particular, se construyeron nuevas cepas mediante inserción de la vía catabólica superior de bifenilo codificada por el

locus *bph* de *Pseudomonas* sp. LB400 en una cepa degradadora de un amplio rango de CBAs. Parte de estos resultados han sido publicados durante el desarrollo de esta tesis (Hofer *et al.*, 1996).

1.9. RESPUESTA MOLECULAR GLOBAL DE BACTERIAS FRENTE A CONDICIONES AMBIENTALES ADVERSAS

Las respuestas regulatorias globales permiten a las bacterias adaptarse a cambios en el medio ambiente o a la presencia de compuestos químicos. Estas respuestas globales incluyen cambios en la velocidad de la transcripción de grandes grupos de genes y controlan varios procesos celulares. En respuesta a condiciones de estrés, las bacterias reducen la expresión génica de la mayoría de las proteínas celulares, induciendo al mismo tiempo una sobreproducción transitoria de las llamadas proteínas del estrés (Gene Groat *et al.*, 1986; Jouper Jaan *et al.*, 1986; Spector *et al.*, 1986; Matin *et al.*, 1989; Amaro *et al.*, 1991; Seeger y Jerez, 1992, 1993a, 1993b; van Dyk *et al.*, 1994; Seeger *et al.*, 1996a). En sus ambientes naturales, las bacterias son expuestas continuamente a situaciones de estrés. La regulación de las respuestas de estrés es, por lo tanto, fundamental para la actividad metabólica y para la sobrevivencia de estos microorganismos. Diferentes grupos de genes y proteínas son inducidos por diferentes tipos de estrés. Ejemplos bien caracterizados incluyen la respuesta al estrés térmico, la respuesta SOS, el estrés oxidativo, la respuesta a la hambruna y la respuesta al etanol. Recientemente, se ha descrito la respuesta molecular de *E. coli* expuesta a diferentes contaminantes ambientales, tales como hexaclorobenceno y pentaclorofenol (Blom *et al.*, 1992; Faber *et al.*, 1993). Adicionalmente se describió la respuesta molecular de *P. putida* KT2442 frente a la exposición de 2-clorofenol (Lupi *et al.*, 1995).

En los estudios de la respuesta molecular global de las bacterias se ha utilizado la electroforesis bidimensional (2D) en geles de poliacrilamida. Este tipo de electroforesis

permite determinar las cantidades relativas de muchos polipéptidos, sin que muchas veces sea necesaria la purificación previa de las proteínas de interés (Pedersen *et al.*, 1978; Van Bogelen *et al.*, 1992). Este sistema permite, además, la determinación simultánea del peso molecular aparente y del punto isoeléctrico aproximado de cada proteína individualizada en el gel (O'Farrell, 1975). Así, esta técnica se ha convertido en una herramienta esencial para estudiar la regulación global de una célula bajo diversas condiciones ambientales (Pedersen *et al.*, 1978; Hames, 1983).

Las bacterias que participan en el proceso de biodegradación de PCBs están expuestas a diferentes congéneres. Asimismo, las diversas bacterias nativas de medios ambientes contaminados con los PCBs están expuestas a estos compuestos. La respuesta molecular de las bacterias frente a los CBs no ha sido descrita. En esta tesis se evalúa la respuesta molecular bacteriana frente a dos CBs. Adicionalmente, fue posible determinar si las exposiciones a estos CBs representan situaciones de estrés para las bacterias.

1.10. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Se postula que la incorporación del locus *bph* de la bacteria LB400 —el que codifica una vía catabólica de bifenilo— a una cepa degradadora de clorobenzoatos (CBAs) permite generar una nueva cepa capaz de contener este locus en el genoma en forma estable, degradar un amplio rango de clorobifenilos (CBs) y ser resistente a la exposición a ellos.

1.11. OBJETIVOS DE LA TESIS

Los objetivos específicos de esta tesis son:

1. Analizar las capacidades catabólicas de la vía codificada en el locus *bph* de *Pseudomonas* sp. LB400
2. Construir nuevas cepas degradadoras de CBs por la incorporación del locus *bph* de

LB400 a una cepa degradadora de CBAs.

3. Estudiar la respuesta molecular global de una nueva cepa degradadora de CBs y su cepa parental frente a los CBs.

La primera parte de esta tesis comprendió el estudio de las capacidades catabólicas de PCBs de la vía superior codificada en el locus *bph* de *Pseudomonas* sp. LB400. En una primera fase se determinaron las capacidades catabólicas de PCBs de la vía superior, para lo cual se analizaron los PCBs que eran degradados a CBAs o HOPDAs. En una fase posterior, se analizaron las capacidades de las primeras dos enzimas de la vía: la BDO y la DBDH. Este estudio permitió la determinación de las etapas limitantes en la degradación de diferentes PCBs, las preferencias de anillo de las enzimas y el novedoso mecanismo de la BDO de LB400.

La segunda parte de la tesis se dedicó a la construcción y a la posterior caracterización de nuevas cepas degradadoras de CBs. El locus *bph* de LB400 —que codifica para las enzimas de la vía catabólica superior de bifenilo caracterizadas en la primera parte de esta tesis— se incorporó a una bacteria degradadora de CBAs. La generación de estas nuevas cepas permitió caracterizar la estabilidad del fenotipo Bph, la regulación de la expresión de los genes *bph* y el crecimiento en CBs. En una etapa posterior se utilizó una de estas cepas para el estudio de la respuesta molecular global.

La tercera parte de esta tesis se abocó al estudio de la respuesta molecular de bacterias frente a la exposición de los CBs. Para ello, se analizaron los cambios en la síntesis de proteínas totales en una nueva cepa degradadora de CBs y en su cepa parental frente a la exposición a 2-CB. Se caracterizó, además, la respuesta de algunas proteínas específicas de la nueva cepa frente a bifenilo, 2-CB y 4-CB, identificándose una proteína de estrés de esta cepa. Estos estudios ayudan a entender los mecanismos de adaptación y respuesta de bacterias frente a la exposición a CBs, como también a determinar si constituye una respuesta de tipo estrés.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. REACTIVOS

Los congéneres de PCBs (pureza > de 99%) se adquirieron de Lancaster Synthesis (White Lund, Morecambe, Inglaterra), Promochem (Wesel, Alemania), o Restek (Sulzbach, Alemania). Los CBAs (pureza > de 98%) se obtuvieron de Fluka AG (Buchs, Suiza) o Lancaster Synthesis. 2,3- y 3,4-DB se adquirieron de Wako Chemicals (Neuss, Alemania) y Ultra Scientific (North Kingston, Inglaterra), respectivamente. Las enzimas de restricción, las ADN polimerasas y la ligasa se obtuvieron de Boehringer (Mannheim, Alemania), New England Biolabs (Schwalbach/Taunus, Alemania) y BRL (Gaithersburg, MD, Estados Unidos). La mezcla de compuestos radiactivos L-[³⁵S]metionina (70%) y L-[³⁵S]cisteína (25%) (1190 Ci/mmol) se adquirió de American Radiolabeled Chemicals (St. Louis, MO, Estados Unidos). El antisuero de conejo anti GroEL de *T. ferrooxidans* ya había sido preparado en el laboratorio del Dr. Carlos Jerez en Chile.

2.2. CEPAS BACTERIANAS

Las cepas de *E.coli* K12 empleadas se describen en la Tabla 1. Las cepas de *Pseudomonas* empleadas se describen en la Tabla 2.

2.3. PLASMIDIOS

Todos los plasmidios empleados en este trabajo se describen en la Tabla 3. La construcción de los plasmidios pAIA50 y pAIA74 fue especificada anteriormente (Seeger

Tabla 1. Cepas de *E. coli* K12 empleadas

| Cepa | Características relevantes | Referencia |
|-----------------------|--|----------------------------|
| DH5 α | F ⁻ , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>deoR</i> , Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>lacZ</i> Δ M15 | Grant <i>et al.</i> , 1990 |
| BL21(DE3)[pLysS] | F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> , (λ CIts857 <i>ind 1</i> Sam 7 <i>nin5 lac UV5-T7genl</i>), plasmidio con gen de la T7 lisozima | Studier, 1991 |
| SM10 (λ pir) | <i>thi-1</i> , <i>thr</i> , <i>leu</i> , <i>tonA</i> , <i>lacY</i> , <i>supE</i> , <i>recA::RP4-2-Tc::Mu</i> , Km ^r , λ pir | Miller y Mekalanos, 1988 |

Tabla 2. Cepas de *Pseudomonas* empleadas

| Cepa | Características relevantes | Referencia |
|-----------------------|---|--------------------------------|
| <i>P. sp.</i> LB400 | cepa silvestre degradadora de PCBs | Bopp, 1986 |
| <i>P. putida</i> P111 | cepa silvestre degradadora de CBAs | Hernández <i>et al.</i> , 1991 |
| <i>P. putida</i> C11 | P111, con el locus <i>bph</i> de LB400 insertado en el genoma | este trabajo |
| <i>P. putida</i> C12 | P111, con el locus <i>bph</i> de LB400 insertado en el genoma | este trabajo |
| <i>P. putida</i> C13 | P111, con el locus <i>bph</i> de LB400 insertado en el genoma | este trabajo |
| <i>P. putida</i> C14 | P111, con el locus <i>bph</i> de LB400 insertado en el genoma | este trabajo |
| <i>P. putida</i> C19 | P111, con el locus <i>bph</i> de LB400 insertado en el genoma | este trabajo |

Tabla 3. Plasmidios empleados

| Plasmidio | Características relevantes | Referencias |
|-----------|---|--|
| pAIA11 | derivado de pT7-6 con inserción de <i>bphAK</i> | Seeger <i>et al.</i> , 1995b |
| pAIA13 | derivado de pT7-6 con inserción de <i>bphAB</i> | Seeger <i>et al.</i> , 1995b |
| pAIA5 | derivado de pT7-6 con inserción de <i>bphABCK</i> | Seeger <i>et al.</i> , 1995a |
| pAIA50 | derivado de pT7-6 con inserción de <i>bphABC</i> | Seeger <i>et al.</i> , 1995a |
| pAIA74 | derivado de pT7-6 con inserción de <i>bphABCD</i> | Seeger <i>et al.</i> , 1995a |
| pT5K102 | derivado de pUTKm que contiene el cassette <i>bph-1</i> | Herrero <i>et al.</i> , 1990; Hofer <i>et al.</i> , resultados no publicados |
| pT5K202 | derivado de pUTKm que contiene el cassette <i>bph-2</i> | Herrero <i>et al.</i> , 1990; Hofer <i>et al.</i> , resultados no publicados |
| pT5K302 | derivado de pUTKm que contiene el cassette <i>bph-3</i> | Herrero <i>et al.</i> , 1990; Hofer <i>et al.</i> , resultados no publicados |

et al., 1995a) y estos plasmidios se ilustran en detalle en el capítulo correspondiente a los Resultados de esta tesis. La construcción del plasmidio pAIA50 se realizó en el curso de este estudio. Los plasmidios recombinantes pAIA11 y pAIA13 ya han sido descritos (Seeger *et al.*, 1995b). Como vector de expresión se usó el plasmidio pT7-6, el cual presenta una región de múltiples sitios de restricción río abajo del promotor de la RNA polimerasa del fago T7 (Tabor y Richardson, 1985). El plasmidio suicida pT5K102 es un derivado del sistema de vectores desarrollados por Herrero *et al.* (1990) y por de Lorenzo *et al.* (1990). Los plasmidios pT5K102, pT5K202 y pT5K302 contienen diferentes segmentos del locus *bph*, segmentos que se ilustran en detalle en los Resultados.

2.4. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

El medio LB (Sambrook *et al.*, 1989) contenía triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l y NaCl 5 g/l. El medio mínimo M9 (Sambrook *et al.*, 1989) contenía Na₂HPO₄ 50 mM, KH₂PO₄ 22 mM, NaCl 85 mM y NH₄Cl 7,5 mM. Como fuente de carbono se utilizó succinato, glucosa, bifenilo o un determinado congénere de PCB a una concentración 2 mM. El medio mínimo M9 (volumen de 1 l) fue suplementado para el crecimiento de *Pseudomonas* con 2,5 ml de una solución de elementos trazas. Esta solución de elementos trazas se obtenía mezclando un volumen de una solución que contenía MgSO₄ 250 mM y FeSO₄ 9 mM con un volumen de una solución que contenía MgO 0,75 g/l, FeSO₄ x 7 H₂O 2 g/l, ZnSO₄ x 7 H₂O 1,44 g/l, MnSO₄ x 4 H₂O 1,12 g/l, CuSO₄ x 5 H₂O 0,25 g/l, CoSO₄ x 7 H₂O 0,28 g/l, H₃BO₃ x 7 H₂O 0,06 g/l, 51,3 ml/l de HCl 37% y CHCl₃ 2 ml/l. Cuando se requería, los medios de cultivo fueron suplementados con antibióticos, de manera de obtener las siguientes concentraciones finales: ampicilina 50 mg/l, kanamicina 50 mg/l y cloramfenicol 20 mg/l. Para la preparación de placas de agar, se adicionó a estos medios agar al 1,5% (p/v). El bifenilo o un congénere de PCB se adicionaba como sólido en la tapa de la placa, estando disponible en su fase gaseosa para las bacterias. Las bacterias *E. coli* se cultivaron a 30°C o 37°C, con agitación rotatoria. Las bacterias *P. putida* o *P. sp.* LB400 se cultivaron a 30°C, con agitación rotatoria. Para seguir el crecimiento bacteriano se determinó la absorbancia a 525 o a 600 nm y en algunos casos se determinó adicionalmente las unidades formadoras de colonias. En general, para los cultivos se utilizó un inóculo de un 1% v/v de bacterias.

2.5. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Se utilizaron técnicas de ADN recombinante estándares similares a las descritas por Sambrook *et al.* (1989).

2.5.1. Aislamiento y purificación de plasmidios

La obtención del ADN plasmidial se realizó mediante el método descrito por Ish-Horowicz y Burke (1981). Para la purificación del ADN por fenol se utilizó el procedimiento descrito por Sambrook *et al.* (1989).

2.5.2. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción

En un volumen final de 10-100 μ l se digirieron 0,2-3 μ g de ADN. Para un volumen de 10 μ l se preparó la siguiente mezcla: 0,2-1 μ g de ADN, agua destilada estéril, 1 μ l de solución amortiguadora 10 X y 1-3 U de endonucleasa de restricción. Esta mezcla se incubó durante 1 a 2 h a la temperatura óptima de la enzima. La reacción se detuvo por inactivación térmica de la enzima.

2.5.3. Relleno de extremos cohesivos con la T₄ ADN polimerasa

Los extremos cohesivos del ADN digerido se rellenaron incubando con la ADN polimerasa del fago T₄. Para ello, a la mezcla de digestión del ADN se le adicionaron los deoxirribonucleótidos, de manera de tener una solución final conteniendo 100 mM de cada uno de los compuestos: dATP, dCTP, dGTP y dTTP. A continuación se adicionaron 5 U de ADN polimerasa del fago T₄ y se incubó por 30 min a temperatura ambiente. La reacción se detuvo por inactivación térmica de la enzima.

2.5.4. Ligazón

Para realizar la ligazón de los fragmentos de ADN, se adicionaron 2 μ l de solución amortiguadora 10 X (Tris-HCl 500 mM (pH 8,0) y MgCl₂ 100 mM), 2 μ l de ditiotreitól 200 mM, 2 μ l de seroalbúmina de bóvido 1 mg/ml, 2 μ l de ATP 10 mM a una solución de 3 μ l de ADN 14 μ g/ml. A continuación se adicionó agua bidestilada y 1 U de la ADN ligasa del fago T₄, de manera de llevar la mezcla a un volumen final de 20 μ l. Esta mezcla

se incubó toda la noche a temperatura ambiente.

2.5.5. Transformación

La preparación de células competentes y la transformación de cepas de *E. coli* con ADN plasmidial se realizó de acuerdo a los métodos de Hanahan (1983) o por electroporación (Dower *et al.*, 1988). Este último procedimiento permitió obtener mayores eficiencias de transformación.

2.5.6. Amplificación por PCR

La amplificación por la aplicación de la reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR) se realizó en un volumen total de 20 µl en tubos de 0,5 ml bajo una capa de aceite mineral liviano utilizando un termociclador de ADN programable Landgraf. Cada mezcla de reacción contenía dATP 0,25 mM, dCTP 0,25 mM, dGTP 0,25 mM y dTTP 0,25 mM, cada partidor a una concentración de 1 µM, y 1,5 U de *Taq* ADN polimerasa en un amortiguador que contenía Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM y gelatina 0,01% (p/v). El protocolo de PCR utilizado consistía en una desnaturalización a 95°C por 30 s, una hibridización de partidores a 40°C por 30 s, y la extensión de partidores a 72°C por 60 s, con una etapa de extensión final de 10 min a 72°C en el último ciclo.

El diseño de los partidores para PCR se realizó basado en las secuencias de *bphA*, *bphD* y el gen de la transposasa *tnp*, previamente publicadas (Erickson y Mondello, 1992; Hofer *et al.*, 1993; Berg *et al.*, 1989). Para la amplificación de un fragmento de *bphA*, se utilizaron los partidores BPHA34T y BPHA4A3B1. Las secuencias de los partidores BPHA34T y BPHA4A3B1 fueron 5'-CAAGAAGCGTTATGAAATTTACCAGA-3' y 5'-GGTCCGGTCATAGGCCTGATGCG-3', respectivamente. Para la amplificación de un fragmento de *bphD*, se utilizaron los partidores BPHD4 y BPHD9. Las secuencias de

BPHD4 y BPHD9 fueron 5'-CATTTCGGCCTGAAGCTTACCCCGTACCGAC-3' y 5'-GCTGTTCAAGCTGTATG-3', respectivamente. Para la amplificación de un fragmento del gen *mp*, se utilizaron los partidores TNP480 y TNP120. Las secuencias de los partidores TNP480 y TNP120 fueron 5'-GCGCTGGGTGATCCTCGCCG-3' y 5'-GCGCAGGCTCAAGCTCGC-3', respectivamente.

2.5.7. Electroforesis en geles de agarosa

Para la separación del ADN por electroforesis en geles de agarosa, las muestras de ADN se mezclaron con 0,1 volumen de solución de carga (glicerol 60%, azul de bromofenol 0,05%, xilencianol 0,05% y RNAsa 10 µg/ml). La electroforesis en geles de agarosa se realizó de acuerdo al método descrito por Sambrook *et al.* (1989). Dependiendo del tamaño de los fragmentos de ADN que se quería separar, se utilizaron geles de 0,7% o de 2% de agarosa. La agarosa se disolvió en amortiguador TAE (Tris-HCl 40 mM (pH8,0), acetato de sodio 20 mM, EDTA 1 mM) y se calentó hasta ebullición. Se dejó enfriar hasta 70°C y se vertió a placas de vidrio, dejándose solidificar a temperatura ambiente. La electroforesis se efectuó a 80 V, en solución amortiguadora TAE. Los geles de agarosa fueron teñidos por inmersión en una solución recién preparada de bromuro de etidio 1 µg/ml, donde fueron mantenidos por 10 minutos y posteriormente visualizados bajo luz UV. Cuando fue preciso hacer un registro del resultado obtenido, el gel se fotografió con un equipo Polaroid.

2.5.8. Construcción del plasmidio pAIA50

En la construcción del plasmidio recombinante pAIA50 se utilizó el siguiente procedimiento. El plasmidio pAIA5 fue digerido sucesivamente con las enzimas de restricción *SacI* y *XhoI*, se rellenaron los extremos cohesivos con la enzima ADN polimerasa del fago T₄ y a continuación se procedió a la ligación con la ADN ligasa del

fago T₄. El ADN ligado se utilizó para transformar *E. coli* DH5 α , seleccionándose luego las transformantes que contenían el plasmidio recombinante. Para esto, los clones resultantes se analizaron por PCR y por digestiones en separado con las enzimas de restricción *Sall* y *PstI*, seguido de electroforesis en gel de agarosa.

2.6. CONSTRUCCIÓN DE NUEVAS CEPAS DEGRADADORAS DE PCBs

Para la inserción estable de los genes *bph* al genoma de la cepa silvestre de *P. putida* P111 se utilizó el sistema de minitransposones (de Lorenzo *et al.*, 1990; Herrero *et al.*, 1990). Los plasmidios pT5K102, pT5K202 o pT5K302 se transfirieron desde cepas dadoras de *E. coli* Sm10 λ pir a la cepa receptora de *P. putida* P111 por conjugación en filtro (Herrero *et al.*, 1990). En cada caso, la cepa dadora de *E. coli* Sm10 λ pir fue cultivada a 37°C en medio LB en presencia del correspondiente antibiótico para seleccionar la retención del plasmidio. La cepa receptora de *P. putida* P111 se cultivó en medio LB (30°C). Para la conjugación en filtro, 80 μ l de la cepa receptora y 20 μ l de la cepa dadora se mezclaron en un tubo Eppendorf. Esta mezcla se depositó sobre un papel filtro Millipore tipo HA (tamaño de poro de 0,45 μ m) sobre una placa de LB-agar. Después de incubar por 15 h a 30°C, las células se removieron del filtro por agitación fuerte en 1 ml de solución de MgCl₂ 50 mM. Alícuotas de 20 μ l se inocularon en 5 ml de medio mínimo M9 modificado utilizando 2-CB como única fuente de carbono y energía. Como controles se inocularon alícuotas de 100 μ l de la cepa dadora o de la cepa receptora en este mismo medio. Los medios se incubaron a 30°C con agitación rotatoria hasta observar crecimiento bacteriano. Alícuotas (100 μ l) de diluciones apropiadas se plaquearon en medio mínimo utilizando 2-CB como única fuente de carbono y energía. Los transconjugantes que poseen el operón *bph* se identificaron después por amplificación por PCR de segmentos de los genes *bphA* y *bphD* y por crecimiento en un medio mínimo líquido con 2-CB como única fuente de carbono y energía.

2.7. ANÁLISIS DE LA ESTABILIDAD DEL FENOTIPO Bph

Para determinar la estabilidad del fenotipo Bph, las cepas fueron cultivadas en condiciones no-selectivas por más de 100 generaciones. La estabilidad del fenotipo Bph de las cepas nuevas construidas se sometió a un análisis de estabilidad en el medio rico LB en condiciones no selectivas. Muestras de cada subcultivo se diluyeron y se plaquearon en medio LB-agar. La biosíntesis de las cuatro enzimas codificadas en el locus *bph* se verificó mediante una combinación de ensayos de spray (Hofer *et al.*, resultados no publicados). Para determinar la presencia y expresión de las enzimas BDO, BDDH y DBDO, las colonias fueron sometidas a un ensayo de spray con dibenzofurano al 5% en dietileter. Estas tres enzimas convierten en 30-60 min el dibenzofurano en un metabolito de color amarillo intenso. Para determinar la presencia y expresión de las enzimas DBDO y HOPDAH, las colonias fueron sometidas a un ensayo de spray con 2,3-DB al 0,1% en etanol. Las células que sintetizan la DBDO convierten el 2,3-DB en el producto amarillo HOPDA. La rápida desaparición de HOPDA indica la presencia de la HOPDAH. Adicionalmente, se estudió la capacidad de colonias individuales de crecer en bifenilo y monoCBs como única fuente de carbono. Asimismo, se analizaron colonias individuales por PCR.

2.8. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DIOXIGENASA

Para medir la actividad de la DBDO, se prepararon extractos de célula mediante la prensa French. Las células se cultivaron en medio líquido hasta una densidad óptica de 0,6 a 600 nm. A continuación fueron centrifugadas y lavadas con amortiguador fosfato de sodio 50 mM (pH 7,5) y se resuspendieron en 1/10 de volumen del mismo amortiguador. Se centrifugaron nuevamente y se lavaron con amortiguador fosfato de sodio 50 mM (pH 7,5). Finalmente, se resuspendieron en el mismo amortiguador en 1/100 del volumen inicial. La lisis celular se realizó pasando la suspensión celular por la celda de French

preenfriada a una presión de 130 mPa. Las células, restos de células y proteínas no solubles se separaron por centrifugación a 150.000 x g por 45 min a 4°C. El sedimento se descartó y el sobrenadante se usó para determinar la actividad enzimática.

Para determinar la actividad dioxigenasa en extractos celulares se utilizó una modificación del método descrito por Eltis *et al.* (1993). Para las mediciones de las cinéticas de formación de HOPDA se utilizó un espectrofotómetro equipado con un portacubetas termorregulado. Las mediciones se realizaron a 25°C en una solución de Tris 50 mM (pH 8,0) y 2,3-DB 250 µM. El ensayo de la DBDO se inició agregando una alícuota (1-10 µl) del extracto crudo de células a esta solución. El producto HOPDA formado se midió a 434 nm. En todas las determinaciones se usó como control la reacción no enzimática. La unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que libera 1 µmol de HOPDA por minuto por mg de proteína, en las condiciones anteriormente descritas.

2.9. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

La concentración de proteínas se determinó según el método de Bradford (1976), usando seroalbúmina de bóvido como estándar.

2.10. ENSAYOS CON CÉLULAS EN REPOSO

Las cepas de *E. coli* BL21(DE3)[pLysS] con sus respectivos plasmidios se crecieron en medio LB a 37°C hasta una densidad óptica de 0,6 a 600 nm. A continuación se adicionó isopropil-β-D-galactopiranosido, dando una concentración final de este inductor de 0,4 mM y se incubaron las células por 30 min a 30°C. Posteriormente, las células se centrifugaron y se lavaron con amortiguador fosfato de sodio 50 mM (pH 7,5). Finalmente, se resuspendieron en 1/10 de volumen del mismo amortiguador. Las células se incubaron con un determinado PCB por hasta 24 h a 30°C con agitación rotatoria. Para

los experimentos de determinación de HOPDA o de CBA se utilizó una concentración nominal de PCB de 62 o 125 μM y las células se incubaron por hasta 24 h. Para los experimentos de determinación de BD o de DB se utilizó una concentración nominal de PCB de 0,5 o 2,0 mM y las células se incubaron por 6 h.

2.11. ANÁLISIS DE METABOLITOS

Los metabolitos generados por la degradación de diferentes PCBs se determinaron mediante extracción con solventes orgánicos y análisis con técnicas analíticas, como cromatografía líquida de alta presión (HPLC), espectroscopía visible y UV, cromatografía de gases (GC), espectrometría de masas (MS) y ionización por electrospray/espectrometría de masas (ESI/MS) (Seeger *et al.*, 1995a, 1995b). La ionización por electrospray es un método de ionización muy suave, que está basado en la dispersión de la solución del analito en una “nube” de pequeñas gotas desde la cual los iones son desorbidos a un “gas de baño”.

2.11.1. Identificación de HOPDAs

La formación de los productos HOPDAs se monitoreó realizando espectros en la región visible de los ensayos de células en reposo usando un espectrofotómetro Beckman DU-70. La longitud de onda máxima de los HOPDAs y su absorbancia se determinaron en los respectivos espectros.

2.11.2. Identificación de CBAs

La acumulación de CBAs se determinó por HPLC. Los sobrenadantes filtrados libres de células (20 μl), de incubaciones de células en reposo, se analizaron con un cromatógrafo líquido Beckman equipado con un detector de arreglo de diodo usando una columna SC125/Lichrospher de 5 μm (Bischoff, Leonberg, Alemania) y un sistema de

solvente acuoso que contiene 1 ml de ácido *orto*-fosfórico al 85% y 640 ml de metanol por l. Los CBAs se identificaron y se cuantificaron por comparación con estándares auténticos.

2.11.3. Identificación de BDs y DBs

Para la identificación de los metabolitos BDs y DBs se empleó fundamentalmente GC/MS. Con algunos metabolitos se utilizaron adicionalmente las técnicas de ESI/MS y HPLC.

Para el análisis por GC/MS, los sobrenadantes filtrados libres de células se extrajeron con un volumen de acetato de etilo. La fase orgánica se reextrajo dos veces con un volumen de carbonato ácido de sodio 0,1 M (pH 7,0), se secó con sulfato de magnesio anhidro y se evaporó a sequedad bajo una corriente de nitrógeno a 45°C. Las derivatizaciones con trimetilsilil (TMS) y con anhídrido pentafluoropropiónico (PFP) empleadas ya han sido descritas (Seeger *et al.*, 1995). La derivatización con *N*-butilboronato (BOR) se realizó de acuerdo a un procedimiento establecido (Kirsch y Stan, 1994). Para obtener los derivados de TMS, alícuotas secas de los extractos de acetato de etilo se disolvieron en una mezcla de 50 µl de *N*-*o*-bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida que contiene 1% de trimetilclorosilano y 100 µl de piridina o acetonitrilo y se incubaron a 70°C por 30 min. Para obtener los derivados de PFP, los extractos secos de acetato de etilo se disolvieron en una mezcla de 100 µl de anhídrido pentafluoropropiónico y 100 µl de diclorometano y se incubaron a 70°C por 30 min. Para obtener los derivados de BOR, los extractos secos de acetato de etilo se disolvieron en 80 µl de acetona, a los cuales se les adicionó 20 µl de una solución de BOR en acetona de 2 µg/µl y luego se incubaron a 50°C por 10 min. Después de las derivatizaciones, las mezclas se evaporaron a sequedad bajo una corriente de nitrógeno y se disolvieron en 50 µl de ciclohexano, en 50 µl de ciclohexano y cloroformo (2:1, v/v), o en 10 µl de octano, respectivamente.

El análisis GC/MS fue realizado con un cromatógrafo de gases equipado con una columna capilar de sílice fundida DB-1 de 30 m. Como gas portador se utilizó helio. Las muestras (1µl) se inyectaron directamente a la columna, y el espectrómetro de masas operó en el modo de ionización de electrones (70 eV) a un voltaje de aceleración de 8 kV y a una resolución de 1000 (m/m 10% de valle). Para la técnica de ESI/MS en el modo de ionización negativa se utilizó un espectrómetro de masas cuatropol equipado con una fuente de ion de electrospray. Los metabolitos de PCBs se disolvieron en metanol y fueron inyectados a una velocidad de flujo de 2 µl/min a la cámara de electrospray. A la aguja de electrospray se le aplicó un voltaje de -4,5 kV. El análisis por HPLC se realizó como se ha descrito más arriba.

2.12. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Para poder observar las bacterias por microscopía electrónica de transmisión, las células se sometieron al siguiente tratamiento: después de cultivar las bacterias hasta la fase exponencial, fueron lavadas 3 veces con la solución amortiguadora TE (Tris-HCl 10 mM (pH8,0) y EDTA 1 mM), centrifugadas y luego resuspendidas en la misma solución TE. Las bacterias se absorbieron sobre una película de carbón ultra delgada y se trataron mediante tinción negativa con acetato de uranilo al 4% (Walker *et al.*, 1991). La película de carbón se depositó sobre una grilla y se secó al aire. Las observaciones se realizaron en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss CEM 920, para lo cual se contó con la valiosa colaboración del Dr. Manfred Rohde.

2.13. ANÁLISIS DE LA RESPUESTA MOLECULAR GLOBAL

Para analizar el patrón global de síntesis de proteínas de las bacterias, las células se marcaron con una mezcla de [³⁵S]metionina y [³⁵S]cisteína en presencia o ausencia de un determinado congénere de PCB. Las proteínas radiactivas se separaron por electroforesis

2D en geles de poliacrilamida, seguido de fluorografía y autorradiografía (O'Farrell, 1975; O'Farrell *et al.*, 1977; Amaro *et al.*, 1991; Seeger y Jerez, 1993a). Una de las proteínas de interés se extrajo de geles 2D secados por calor y fue identificada mediante anticuerpos (Amaro *et al.*, 1991).

2.13.1. Marcación de proteínas totales

Para los ensayos de marcación se cultivaron las bacterias en el medio mínimo M9 suplementado, utilizando glucosa como fuente de carbono. Las células se cultivaron hasta una densidad óptica de 0,6 a 600 nm. A continuación a 1 ml de cultivo se adicionó bifenilo o un determinado congénere de PCB de manera de dar una concentración nominal final de 2 mM. A los 30 o 90 min de incubación en presencia o ausencia del correspondiente congénere de PCBs o de bifenilo, se agregó al medio 5 μ l de una mezcla de [³⁵S]metionina y [³⁵S]cisteína de 10 mCi/ml y las células se incubaron por 20 min adicionales. A continuación se colectaron las células y se lavaron 2 veces con el mismo medio de cultivo. Posteriormente, las células se trataron para análisis por electroforesis mono o bidimensional.

2.13.2. Preparación de las muestras para electroforesis

Las muestras para la electroforesis en geles de poliacrilamida-SDSs se trataron con amortiguador de muestra (Laemmli, 1970) que contenía: Tris-HCl 0,0625 M (pH 6,8), SDS al 2%, glicerol al 10%, β -mercaptoetanol al 5% y azul de bromofenol al 0,001% como colorante. Se calentaron a 100°C por 5 min. Luego se centrifugaron por 5 min para tomar sólo el sobrenadante con las proteínas solubilizadas para la electroforesis.

Las muestras para la electroforesis 2D se trataron como lo describe O'Farrell (1975). Las células se centrifugaron y se resuspendieron en 100 μ l de una solución de amortiguador que contenía Tris-HCl 0,01 M (pH 7,4), MgCl₂ 5 mM y RNasa pancreática

50 µg/ml. Para romper las células, éstas se sometieron a la acción del ultrasonido 3 veces por 30 s a 200 Watts en un equipo Braunsonic 1510. Después de la sonicación, se agregó DNasa para alcanzar una concentración final de 50 µg/ml, manteniendo las muestras en hielo por 5 min. A continuación, las muestras se congelaron a -80°C, para luego ser liofilizadas, luego de lo cual las muestras se resuspendieron en un volumen adecuado de amortiguador de lisis (urea 9,5 M, Nonidet P-40 al 2%, anfolitos al 2% y β-mercaptoetanol al 5%), para ser finalmente aplicadas directamente en un gel. Para un gel 2D radiactivo se aplicaron 1.200.000 cpm.

2.13.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS

Los geles de poliacrilamida en presencia de SDS para electroforesis en placa se prepararon según la técnica descrita por Laemmli (1970). Para el análisis de las proteínas totales se usaron geles con un gel concentrador al 3% y un gel separador en una gradiente de concentración del 7 al 15% en poliacrilamida, en presencia de SDS al 0.1%. El gel separador se elaboró con la ayuda de un aparato para la preparación de soluciones en gradiente de concentración, marca Büchler. Las electroforesis se corrieron a 80 V, hasta que el colorante indicador alcanzara el borde inferior del gel. Las proteínas se fijaron y se tiñeron con una solución que contenía Azul de Coomassie al 0,2% en metanol al 50% y ácido acético al 7% por 1 h. Se destiñeron luego mediante lavados sucesivos con una solución de metanol al 20% y ácido acético al 7%.

2.13.4. Electroforesis bidimensional

Esta electroforesis 2D se realizó en la forma descrita por O'Farrell *et al.* (1977). La primera dimensión consistía en una electroforesis en gradiente de pH sin alcanzar el equilibrio (NEPHGE). Para los geles en gradiente de pH sin alcanzar el equilibrio se estableció una gradiente de pH de 3 a 10. La mezcla del gel contenía urea 9,2 M, Nonidet

P-40 al 2%, acrilamida al 3,8%, bisacrilamida al 0,2%, anfolitos al 2% (del rango de pH 3 a 10), persulfato de amonio al 0,02% y N,N,N',N'-tetrametilendiamina al 0,014%. La electroforesis se realizó de manera que el reservorio superior contuviese la solución de H₃PO₄ 10 mM y el inferior la solución de NaOH 20 mM. Los geles se sometieron a electroforesis a 400 V por un tiempo de 5,5 h. A continuación, los geles se equilibraron durante 2 h en amortiguador de muestra-SDS. Los geles equilibrados fueron sometidos inmediatamente a la segunda dimensión. La segunda dimensión consistía básicamente en el sistema de electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS en placa, con algunas modificaciones. Se usó un gel separador de 11,5% de poliacrilamida y un gel concentrador de 4,75% de poliacrilamida. Sobre el gel concentrador se colocó una solución de agarosa al 1% en amortiguador de muestra-SDS. Con esta solución aún líquida, se colocó el gel de la primera dimensión, cubriéndolo nuevamente con esta solución de agarosa. La electroforesis, la tinción y el destañido se realizaron en la forma descrita para la electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS en placa. Adicionalmente, los geles con muestras radiactivas se incubaron por 30 min con una solución para la detección fluorográfica, marca Amplify. Luego de secarse a 80°C y al vacío, se expusieron a películas radiográficas Fuji tipo Rx a -80°C. Finalmente, las películas se revelaron y fijaron mediante procedimientos estándares.

2.13.5. Determinación de los niveles de proteínas analizadas por geles 2D

Algunas de las proteínas de los geles 2D se analizaron utilizando el programa Gel Perfect (programa desarrollado por el Dr. Salvador Bozzo). Mediante imágenes computacionales de los geles, este programa permite la cuantificación de los niveles relativos de proteínas individuales en cada gel 2D. Estas cuantificaciones de las proteínas de los geles permitieron, a su vez, valorar el cambio (inducción o represión) o la mantención del polipéptido en respuesta de la bacterias a la exposición a CBs. En los geles

2D se destacaron algunas de las proteínas inducidas (encerradas por círculos) y proteínas reprimidas (encerradas por cuadrados) por la exposición a 2-CBs. De las proteínas analizadas, se seleccionaron aquellas relativamente abundantes en una u otra condición, y que presentaban un cambio significativo frente al CB. Estas se enumeraron arbitrariamente desde el borde inferior del gel al superior y desde la derecha a la izquierda.

2.14. INMUNOELECTROTRANSFERENCIA

Para la identificación de la proteína GroEL, se utilizó la técnica de inmunoelectrotransferencia, también conocida como "western blot" (Towin *et al.*, 1979). Las proteínas separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida en gradiente del 7 al 15%, se transfirieron a nitrocelulosa, en condiciones de corriente constante (300 mA) por un tiempo de 4 h. Una vez secada, la nitrocelulosa fue bloqueada preincubando en solución amortiguadora A (Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), NaCl 0,15 M y leche descremada al 5%). Se incubó en esta solución con antisuero de conejo contra la proteína GroEL de *T. ferrooxidans* (dilución 1:1.000) durante 1 h. Posteriormente se eliminó el antisuero no unido, lavando con la solución A. Para la detección de los anticuerpos unidos a la nitrocelulosa se usó el siguiente procedimiento colorimétrico (Jerez y Arredondo, 1991): la nitrocelulosa se lavó con solución amortiguadora TBS (Tris-HCl 20 mM (pH 7,5); NaCl 0,5 M). Se incubó con antiinmunoglobulina de conejo (dilución 1:500), en solución TBS, seroalbúmina de bóvido al 1% por 1 h. Luego, la nitrocelulosa se incubó con el complejo peroxidasa de rabanito-estreptavidina biotilada (dilución 1:400) en solución TBS por 30 min. Enseguida se lavó con solución TBS. En la oscuridad se le agregó el reactivo de desarrollo de color HRP recién preparado, que contenía 4-Cl-1-naftol en solución amortiguadora TBS, metanol al 17% y H₂O₂ al 0,015%, incubando por 60-180 min, para finalmente lavar con solución TBS.

3. RESULTADOS

3.1. CAPACIDADES CATABÓLICAS DE LA VÍA SUPERIOR CODIFICADA EN EL LOCUS *bph* DE *Pseudomonas* sp. LB400

Los diversos estudios realizados sobre la degradación aerobia de los PCBs con la bacteria *Pseudomonas* sp. LB400 han aportado importantes conocimientos. Sin embargo, aún subsisten muchas interrogantes sobre varios aspectos fundamentales de esta biodegradación. A pesar de haberse ya caracterizado un amplio rango de PCBs que pueden ser atacados por la cepa LB400 (Bopp, 1986; Bedard *et al.*, 1986), existe poca información sobre la extensión de esta degradación y sobre los metabolitos formados desde estos congéneres. Por consiguiente, en general, las etapas limitantes del catabolismo de los PCBs en la cepa LB400 no se conocen. Asimismo, se han descrito metabolitos formados desde CBs por LB400 que no se acomodan en la secuencia de reacciones mostradas en la figura 3. Por ejemplo, se ha descrito la formación de acetofenonas con anillos clorados y PCBs hidroxilados en posiciones *meta* y *para* (Nadim *et al.*, 1987; Bedard, 1990; Bedard y Haberl, 1990). Como los estudios de los metabolitos de CBs se realizaron con la cepa parental LB400, las transformaciones no han podido ser atribuidas a enzimas específicas, debido a la posible presencia de isoenzimas, como se ha detectado en otras cepas (Ahmad *et al.*, 1990; Asturias *et al.*, 1993; Timmis *et al.*, 1994; Seto *et al.*, 1995).

El clonamiento de los genes codificantes de las enzimas involucradas es una estrategia adecuada para dilucidar los metabolitos de una vía metabólica. Los genes codificantes de una enzima —o de parte de una vía metabólica— pueden ser expresados

en un huésped incapaz de metabolizar los substratos y sus productos catabólicos. Esta estrategia experimental permitió la caracterización *in vivo* de actividades enzimáticas individuales y la identificación de diversos metabolitos producidos. Como parte de esta tesis se utiliza dicha estrategia experimental para dilucidar las capacidades metabólicas de la vía catabólica superior de bifenilo codificada en el locus *bph* de *Pseudomonas* sp. LB400. Parte de estos resultados ya han sido publicados (Seeger *et al.*, 1995a, 1995b; Pieper *et al.*, 1995; Hofer *et al.*, 1996; Seeger *et al.*, 1996).

3.1.1. Construcción de cepas recombinantes y descripción del sistema de ensayo

Los vectores recombinantes de expresión utilizados en este estudio contenían los genes *bph* río abajo del promotor tardío del fago T7 y se describieron previamente (Seeger *et al.*, 1995a, Seeger *et al.*, 1995b). El plasmidio pAIA50, que contiene *bphABC*, se genera a partir del plasmidio pAIA5, como se describe en la figura 4. La construcción del vector de expresión pAIA74, que contiene *bphABCD*, se realizó previamente a este trabajo (Seeger *et al.*, 1995a). Los plasmidios pAIA11 y pAIA13 que contienen *bphAK* y *bphAB* se muestran en la figura 5. La presencia en pAIA11 de *bphK*, que codifica una glutatión *S*-transferasa, no tiene influencia en los metabolitos producidos por la BDO. Esto será evidente en los resultados presentados más adelante. Asimismo, algunos experimentos realizados posteriormente utilizando el plasmidio pAIA111, que contiene sólo *bphA*, dieron los mismos metabolitos.

Los plasmidios pAIA50, pAIA74, pAIA11 o pAIA13 se transfirieron a *E. coli* BL21(DE3)[pLysS], una cepa que permite la inducción de la transcripción de genes clonados a partir de promotores tardíos del fago T7 (Studier, 1991). Después de la inducción de la biosíntesis de las enzimas codificadas en *bph*, las células en reposo se incubaron con un determinado congénere de PCB. Para la identificación de los posibles

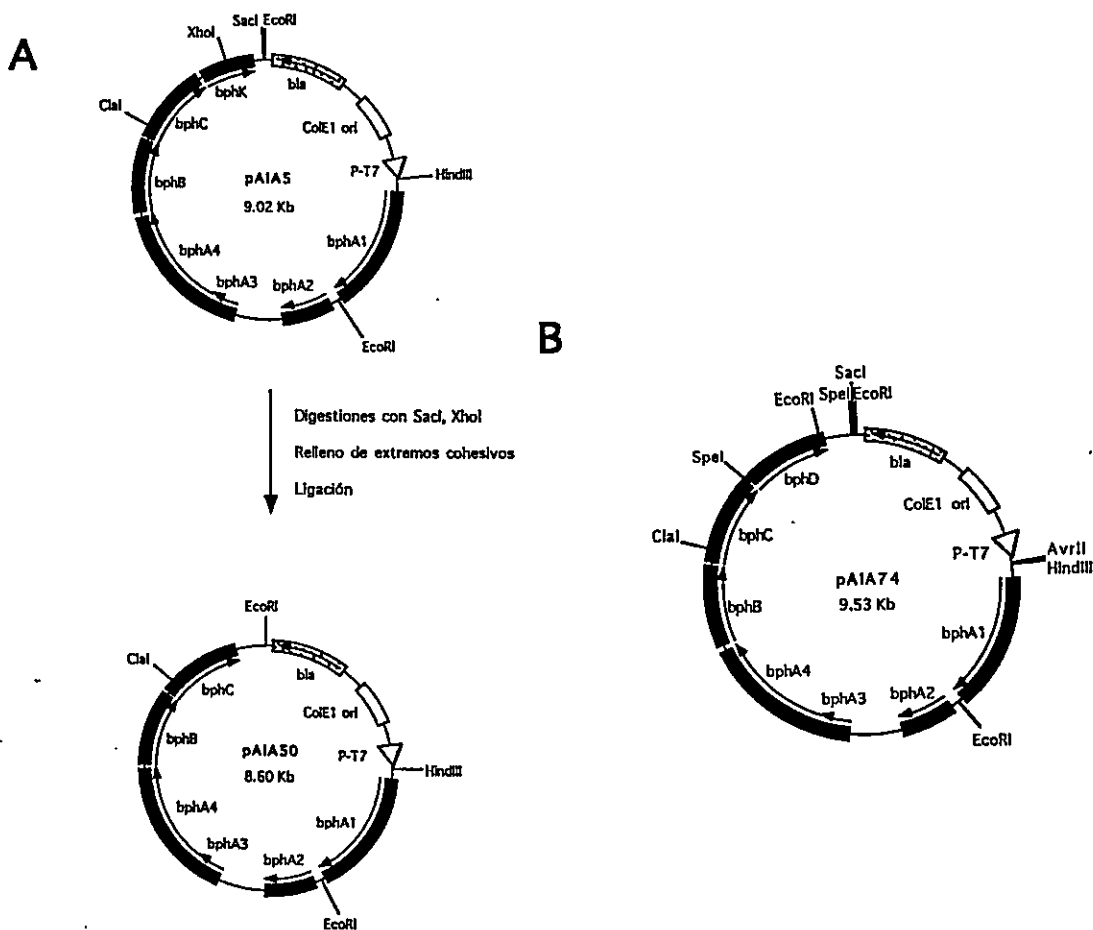


Figura 4. Los vectores de expresión recombinantes pAIA50 y pAIA74. Las direcciones del sentido de la transcripción de los genes se indican por flechas. P-T7: promotor del gen 10 del fago T7, que inicia la transcripción en la dirección indicada por la punta de flecha; ori: origen de replicación; *bla*: gen que codifica la β -lactamasa, enzima que confiere resistencia a la ampicilina. A: Construcción de pAIA50. Un fragmento *SacI-XhoI* se eliminó desde pAIA5 para inactivar *bphK*; B: pAIA74. Fuente: adaptado de Seeger *et al.* (1995a).

metabolitos HOPDAs o CBAs, las mezclas de ensayo se analizaron directamente por espectroscopía visible o por HPLC y espectroscopía UV. Para la identificación de los metabolitos bifenilodihidrodiol (BD) o dihidroxibifenilo (DB), los sobrenadantes se extrajeron con acetato de etilo, se derivatizaron y sometieron a análisis por GC/MS. Algunos metabolitos se analizaron en forma adicional por ESI/MS o por HPLC.

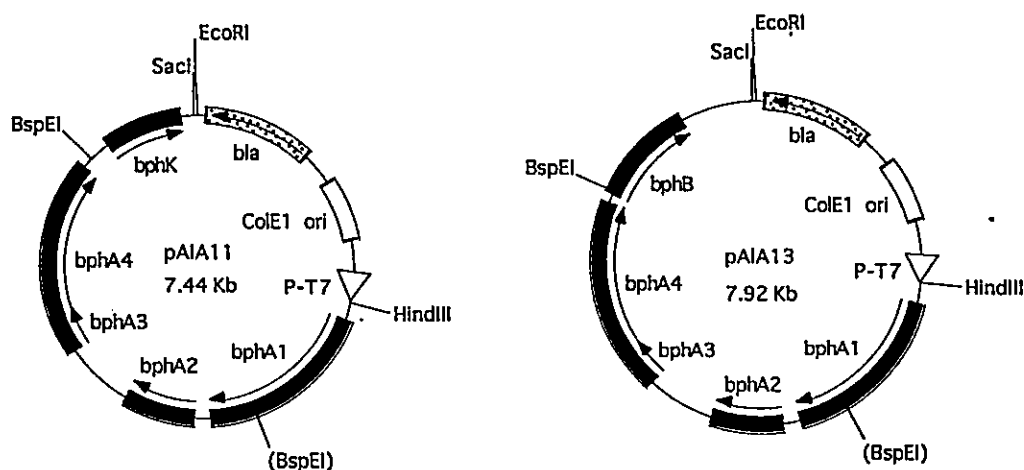


Figura 5. Los vectores de expresión recombinantes pAIA11 y pAIA13. Las direcciones del sentido de la transcripción de los genes se indican por flechas. Se indican los genes *bph* y *bla*, el origen de replicación, el promotor del fago T7 (P-T7) y los sitios de restricción. El sitio de restricción entre paréntesis está protegido por metilación *dam*. Fuente: Seeger *et al.* (1995b).

Experimentos controles mostraron que *E. coli* BL21(DE3)[pLysS], que carece de genes *bph*, es incapaz de metabolizar los CBs y los metabolitos derivados de ellos.

3.1.2. Conversión de PCBs a HOPDAs

Para investigar las capacidades catabólicas de la vía superior codificada en el locus *bph* de LB400, en una primera aproximación se analiza la formación de HOPDAs desde bifenilos mono a pentaclorados. Mediante espectroscopía visible se estudia la conversión de todos los bifenilos mono y diclorados y de algunos bifenilos tri, tetra y pentaclorados en HOPDAs por células de *E. coli* que expresan *bphABC*. Todos los monoCBs y 11 de 12 diCBs son metabolizados por las enzimas BDO, BDDH y DBDO a HOPDAs (Tabla 4). No se detectan HOPDAs sólo para el sustrato doblemente clorado en *orto* 2,6-diCB. De los CBs con mayor cloración analizados, las enzimas BDO, BDDH y DBDO convierten 10 de 14 tri, 1 de 3 tetra y 1 de 2 pentaCBs a HOPDAs (Tabla 5). Ninguno de

Tabla 4. Formación de HOPDAs desde mono y diCBs por *E. coli* que expresa *bphABC* de LB400

| CB | HOPDA | |
|----------------|--------------------------------------|--|
| | Absorbancia λ_{\max} (nm) | Velocidad de formación ^a |
| 2- <i>b</i> | 393 +/- 2 | 1 |
| 3- <i>b</i> | 436 +/- 2 | 1 |
| 4- <i>b</i> | 437 +/- 2 | 1 |
| 2,3- <i>c</i> | 392 +/- 2 | 1 |
| 2,4- <i>c</i> | 392 +/- 2 | 1 |
| 2,5- <i>c</i> | 392 +/- 2 | 1 |
| 2,6- <i>c</i> | ND ^d | |
| 3,4- <i>c</i> | 440 +/- 2 | 1 |
| 3,5- <i>b</i> | 439 +/- 2 | 1 |
| 2,2'- <i>b</i> | 392 +/- 2 | 1 |
| 2,3'- <i>c</i> | 435 +/- 2 | 1 |
| 2,4'- <i>c</i> | 438 +/- 2 | 1 |
| 3,3'- <i>c</i> | 430 +/- 5 ^e | 3 |
| 3,4'- <i>c</i> | 432 +/- 5 | 3 |
| 4,4'- <i>c</i> | 430 +/- 10 | 3 |

^a 1: rápida; 3: lenta.

^b incubación por 20 h ; CB 62 mM.

^c incubación por 24 h; CB 125 mM.

^d ND, no detectado.

^e Medido a las 2 h; cambió a 410 +/- 5 nm durante la incubación.

los CBs con un anillo doblemente clorado en *orto* fue metabolizado a HOPDA. La no conversión a HOPDA de 2,6,2',6'- o 2,4,6,2',4'-CB a HOPDAs fue un resultado esperado, ya que se ha descrito que estos compuestos son refractarios a la oxidación por el microorganismo parental LB400 (Bopp, 1986; Nadim *et al.*, 1987). Para 2,5,3'-triCB no

Tabla 5. Formación de HOPDAs desde tri, tetra y pentaCBs por *E. coli* que expresa *bphABC* de LB400

| CB | HOPDA | |
|-----------------------|--------------------------------------|--|
| | Absorbancia λ_{\max} (nm) | Velocidad de formación ^a |
| 2,3,4- <i>b</i> | 393 +/- 2 | NE ^c |
| 2,3,5- <i>b</i> | 393 +/- 2 | 1 |
| 2,3,6- <i>b</i> | ND ^d | |
| 2,4,5- <i>b</i> | 393 +/- 2 | NE |
| 2,4,6- <i>b</i> | ND | |
| 2,3,2'- <i>b</i> | 392 +/- 2 | 1 |
| 2,3,3'- <i>b</i> | 400 +/- 5 ^e | 2 |
| 2,4,4'- <i>b</i> | 437 +/- 2 | 2 |
| 2,5,2'- <i>b</i> | 392 +/- 2 | 1 |
| 2,5,3'- <i>b</i> | ND | |
| 2,5,4'- <i>b</i> | 394 +/- 2 | 2 |
| 2,6,2'- <i>b</i> | ND | |
| 3,4,2'- <i>b</i> | 439 +/- 2 | 1 |
| 3,5,2'- <i>b</i> | 438 +/- 2 | NE |
| 2,4,6,2'- <i>b</i> | ND | |
| 2,5,2',5'- <i>b</i> | ND | |
| 2,6,2',6'- <i>b</i> | ND | |
| 2,3,4,5,2'- <i>b</i> | 393 +/- 2 | NE |
| 2,4,6,2',4'- <i>b</i> | ND | |

^a 1: rápida; 2: moderada.

^b incubación de 24h; CB 125 mM.

^c NE, no estudiado.

^d ND, no detectado.

^e Medido después de 1 h; cambió a 370 +/- 5 nm durante la incubación.

se pudo determinar HOPDA, pero se verificó la oxidación de 2,5,3'-triCB por la BDO (véase más adelante).

Los congéneres de PCBs que fueron transformados a HOPDAs pueden ser divididos en tres clases, de acuerdo a su velocidad de conversión de CBs a estos productos de ruptura meta. Las cinéticas de conversión de un representante de cada clase se muestran en la figura 6. Los congéneres de clase 3, que son congéneres sustituidos en ambos anillos en posiciones *meta* o *para* (3,3'-, 3,4'- y 4,4'-diCB), son convertidos a velocidades lentas. Es particularmente interesante resaltar que análogos con mayor grado de cloración que contienen un cloro adicional en posición *orto* (2,3,3'-, 2,5,4'- y 2,4,4'-triCB) son convertidos a velocidades moderadas (congéneres de clase 2). Este fenómeno indica que un cloro adicional puede facilitar la degradación de ciertos PCBs. Los congéneres restantes (congéneres de clase 1) son convertidos en HOPDAs en forma rápida y en una mayor proporción. A pesar de que los coeficientes de extinción molar de estos HOPDAs son desconocidos, es posible inferir —con excepción de dos casos— una conversión completa a HOPDAs de los mono y diCB, debido a la producción cuantitativa de los correspondientes CBAs (véase la Tabla 6, más adelante).

Los máximos de absorción de los HOPDAs formados se pueden clasificar en dos diferentes regiones de longitud de onda: entre 430 nm y 440 nm (como en el caso del HOPDA no sustituido) o entre 390 nm y 400 nm (figura 7). Se encontró una estricta correlación entre estos valores de longitud de onda y la presencia (baja $\lambda_{\text{máx}}$) o ausencia (alta $\lambda_{\text{máx}}$) de un cloro en posición *orto* en el anillo del HOPDA, como se deduce de la identificación del correspondiente CBA (véanse las Tablas 6 y 7, más adelante). Se postula que el cloro en posición *orto* impide la conformación coplanar del sistema de electrones π del anillo aromático y de la cadena lateral alifática, lo cual lleva a un desplazamiento hipsocrómico del $\lambda_{\text{máx}}$ (Seeger *et al.*, 1995a). Un fenómeno similar se ha observado para los dihidrodioles (Haddock *et al.*, 1995).

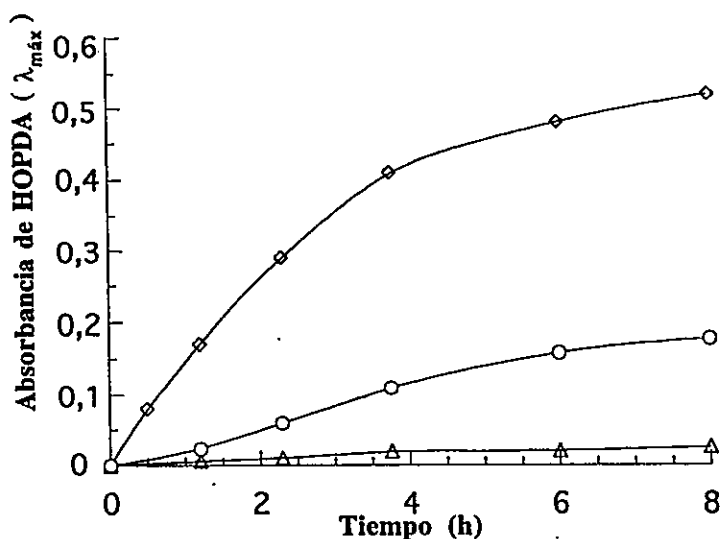


Figura 6. Cinética de conversión de PCBs a HOPDAs por *E. coli* que expresan *bphABC*. Las absorciones se determinaron a la longitud de onda máxima de cada HOPDA (véanse las Tablas 4 y 5). Se muestran los HOPDAs formados por la degradación de 4-CB (cuadrados), 3,3'-CB (triángulos) y 2,3,3'-CB (círculos). Fuente: Seeger *et al.* (1995a).

Los valores de $\lambda_{máx}$ son, en general, estables. Sin embargo, cambios importantes hacia valores de menor longitud de onda se observaron durante la incubación de 3,3'-di- y 2,3,3'-triCB, lo cual sugiere que los compuestos formados inicialmente sufren una transformación posterior.

3.1.3. Conversión de PCBs a CBAs

En el análisis de las capacidades catabólicas de la vía codificada en el locus *bph* de LB400, se estudia —en una segunda etapa— la formación de CBAs desde bifenilos mono a pentaclorados. La conversión de CBs a CBAs por células de *E. coli* que expresan *bphABCD* se analiza después de incubaciones de 20 o 24 h de las células con un determinado congénere. Las cinéticas con algunos congéneres mono y diclorados de clase I indican que la conversión a CBAs es completa en estos tiempos (datos no mostrados). Los CBAs se identifican mediante HPLC y espectroscopía UV por comparación con

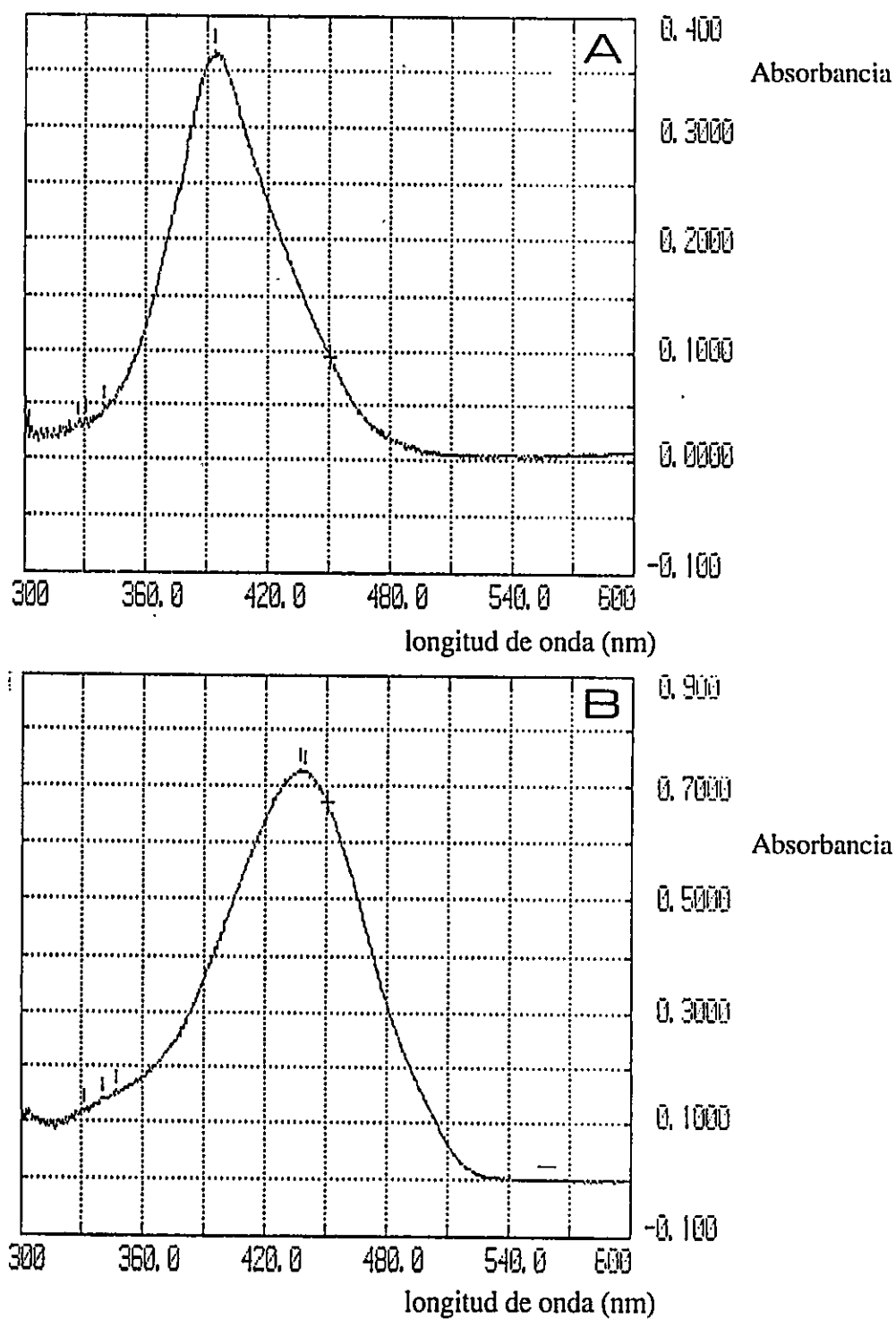


Figura 7. Espectros UV/visible de HOPDAs formados por *E. coli* que expresa *bphABC*. HOPDAs formados desde 2,3,5-CB (A) y 2,4'-CB (B), cuyos máximos de absorción están en dos diferentes regiones de longitud de onda, debido a la presencia (A) o ausencia (B) de un cloro en posición *orto* en el anillo bencénico.

estándares auténticos. Los resultados obtenidos con diversos mono y diCBs se ilustran en la Tabla 6. Los resultados obtenidos con diversos tri a pentaCBs se muestran en la Tabla 7. Con la excepción de 4,4'-diCB, todos los congéneres mono y diclorados que son degradados a HOPDAs son también catabolizados a CBAs. Sin embargo, de diez triCBs convertidos a HOPDAs, solamente siete son metabolizados a CBAs. De los cinco tetra y pentaCBs estudiados, sólo uno es convertido a CBA. Por lo tanto, 21 de los 34 congéneres analizados son degradados a CBAs. En 12 casos los CBAs se obtienen en cantidades cuantitativas.

La identificación de los CBAs producidos permite predecir en algunos CBs cual de los anillos bencénicos es atacado por la BDO. Todos los CBs mono y diclorados que son convertidos a CBAs y que están substituidos en un sólo anillo son oxidados en forma exclusiva en el anillo no halogenado. En los casos de congéneres diclorados que poseen un anillo monoclorado en *orto*, este anillo fue el único oxidado. También con los congéneres 3,4'-, 2,3,4-, 2,3,5-, 2,4,5-, 2,3,2'-, 2,5,2'-, 3,4,2'-, 3,5,2'- y 2,3,4,5,2'-CB, se detectó solamente un tipo de CBA (Tablas 6 y 7) indicando un ataque en anillos monoclorado en *meta*, no clorado o monolorado en *orto*, respectivamente. Con la excepción de 2,3,2'-CB, la conversión a CBAs fue incompleta en estos casos. Con los resultados obtenidos en esta fase, no se podía descartar una oxidación adicional del otro o del mismo anillo.

Con tres congéneres triclorados no se observa CBA, pero se determina la formación de HOPDA. Para estos CBs la correlación observada entre el $\lambda_{\text{máx}}$ y la substitución de cloro en posición *orto* permite la predicción del anillo que fue oxidado. Los valores de $\lambda_{\text{máx}}$ sugieren que 2,3,3'- y 2,5,4'-triCB son oxidados en el anillo monoclorado con la consiguiente formación de un HOPDA que posee un anillo substituido en *orto*, mientras que 2,4,4'-triCB se oxida en el anillo diclorado, formando luego un HOPDA con su anillo clorado en *para*. Estas conclusiones son consistentes con los

Tabla 6. Formación de CBAs desde mono y diCBs por *E. coli* que expresa *bphABCD* de LB400

| CB | | CBA | |
|--------------------------|--------------------------|-----------------|--|
| Posiciones de los cloros | Posiciones de los cloros | Conversión (%) | |
| 2 ^a | 2 | 95-100 | |
| 3 ^b | 3 | 95-100 | |
| 4 ^a | 4 | 95-100 | |
| 2,3 ^b | 2,3 | 95-100 | |
| 2,4 ^b | 2,4 | 95-100 | |
| 2,5 ^b | 2,5 | 95-100 | |
| 2,6 ^b | | ND ^c | |
| 3,4 ^b | 3,4 | 95-100 | |
| 3,5 ^a | 3,5 | 95-100 | |
| 2,2' ^a | 2 | 95-100 | |
| 2,3' ^b | 3 | 95-100 | |
| 2,4' ^b | 4 | 95-100 | |
| 3,3' ^b | 3 | 20-25 | |
| 3,4' ^b | 4 | 25-30 | |
| 4,4' ^b | | ND | |

^a incubación de 20 h , CB 62 mM.

^b incubación de 24.h , CB 125 mM.

^c ND, no detectado.

resultados obtenidos con la oxidación de 2,3,3'- y 2,4,4'-triCB por la cepa LB400 (Bedard y Haberl, 1990). Sin embargo, en estos casos, con este análisis no se puede descartar una oxidación adicional del mismo o del otro anillo.

Tabla 7. Formación de CBAs desde tri, tetra y pentaCBs por *E. coli* que expresa *bphABCD* de LB400

| CB | | CBA | |
|--------------------------|--------------------------|-----------------|--|
| Posiciones de los cloros | Posiciones de los cloros | Conversion (%) | |
| 2,3,4 ^a | 2,3,4 | 80-85 | |
| 2,3,5 ^a | 2,3,5 | 40-45 | |
| 2,3,6 ^a | | ND ^b | |
| 2,4,5 ^a | 2,4,5 | 80-85 | |
| 2,4,6 ^a | | ND | |
| 2,3,2' ^a | 2,3 | 95-100 | |
| 2,3,3' ^a | | ND | |
| 2,4,4' ^a | | ND | |
| 2,5,2' ^a | 2,5 | 35-40 | |
| 2,5,3' ^a | | ND | |
| 2,5,4' ^a | | ND | |
| 2,6,2' ^a | | ND | |
| 3,4,2' ^a | 3,4 | 80-85 | |
| 3,5,2' ^a | 3,5 | 85-90 | |
| 2,4,6,2' ^a | | ND | |
| 2,5,2',5' ^a | | ND | |
| 2,6,2',6' ^a | | ND | |
| 2,3,4,5,2' ^a | 2,3,4,5 | 60-65 | |
| 2,4,6,2',4' ^a | | ND | |

^a incubación por 24 h , CB 125 mM.

^b ND, no detectado.

3.1.4. Degradación de 4-, 2,2'- y 2,4'-CB por la BDO y la BDDH

Para caracterizar los metabolitos producidos *in vivo* por la BDO y la BDDH se analiza en una primera fase la degradación de 4-, 2,2'- y 2,4'-CB. Para este estudio, las células en reposo se incubaron por 6 h con un determinado PCB y los sobrenadantes se extrajeron con acetato de etilo. Posteriormente, los metabolitos se derivatizaron con TMS y se analizaron por GC/MS. Al incubar 4-CB con cepas recombinantes de *E. coli* que sintetizan solamente BDO o BDO y BDDH, se observa la formación de un metabolito BD o DB, respectivamente, identificado por GC/MS (Tabla 8). En contraste, al incubar 2,4'-CB ambas cepas transforman este congénere en el mismo producto (Tabla 8), que fue identificado por MS como un dihidroxi-monoCB (figura 8). Este metabolito mostró un tiempo de retención y un espectro de masas muy similar a aquel del dihidroxi-monoCB son característicos de los compuestos catecol (Horvat y Senter, 1980, 1983; Massé *et al.*, 1989). La incubación de 2,2'-CB con células productoras de BDO o BDO y BDDH también forma dihidroxi-monoCB. Sin embargo, este compuesto es claramente diferente del metabolito derivado de 2,4'-CB (Tabla 8). Esto sugiere que la dioxigenación catalizada por la BDO de 2,2'- and 2,4'-CB lleva a la formación de compuestos DB a través de la eliminación de ácido clorhídrico.

Previamente se había observado que esta deshalogenación puede ser causada en el proceso de derivatización con TMS y separación por GC de dihidrodioles clorados (Seeger, M., Timmis, K.N. y Hofer, B., resultados no publicados). Sin embargo, diversas evidencias experimentales excluyen esta posibilidad para los metabolitos obtenido desde 4-CB por células que expresan *bphAB*. El espectro de masas de este producto simple se caracteriza principalmente por un ion molecular de m/z 364 y fragmentos de m/z 349 $[M - CH_3]^+$ y 276 $[M - SiMe_4]^+$. Los fragmentos $[M - SiMe_4]^+$ producidos desde 2,2'- y 2,4'-CB. La caracterización directa del metabolito sin derivatizar de 2,4'-CB por ESI/MS determina el ion molecular desprotonado esperado de m/z 219 (figura 9). Los

Tabla 8. Caracterización de los metabolitos producidos desde CBs por la bifenilo-2,3-dioxigenasa (BDO) y la bifenilo-2,3-dihidrodiol-2,3-desidrogenasa (DBDH)

| Sustrato | Enzimas en <i>E. coli</i> | Producto | | |
|----------|------------------------------|---|------------------------------|--|
| | | t _r (GC) ^a (min) | m (MS) ^a (min) | t _r (HPLC) (min) λ _{max} ^b (nm) identificado como |
| 4-CB | BDO | 18:30 | 366 | 4:26 306 2,3-dihidrodiol-4'-CB |
| | BDO y DBDH | 18:36 | 364 | 4:12 272 2,3-dihidroxi-4'-CB |
| 2,4-CB | BDO | 19:04 | 400 | 6:10 283 2,3-dihidrodiol-2',4'-CB |
| | BDO y DBDH | 19:12 | 400 | 6:10 283 2,3-dihidrodiol-2',4'-CB |
| 2,4'-CB | BDO | 18:35 | 364 | 4:09 272 2,3-dihidroxi-4'-CB |
| | BDO y DBDH | 18:36 | 364 | 4:11 272 2,3-dihidroxi-4'-CB |
| 2,2'-CB | BDO | 17:53 | 364 | NE ^c NE 2,3-dihidroxi-2'-CB |
| | BDO y DBDH | 17:53 | 364 | NE NE 2,3-dihidroxi-2'-CB |

^aLos datos de GC y MS se refieren a derivados con TMS.

^bDeterminado con un detector arreglo de diodo.

^cNE, no estudiado.

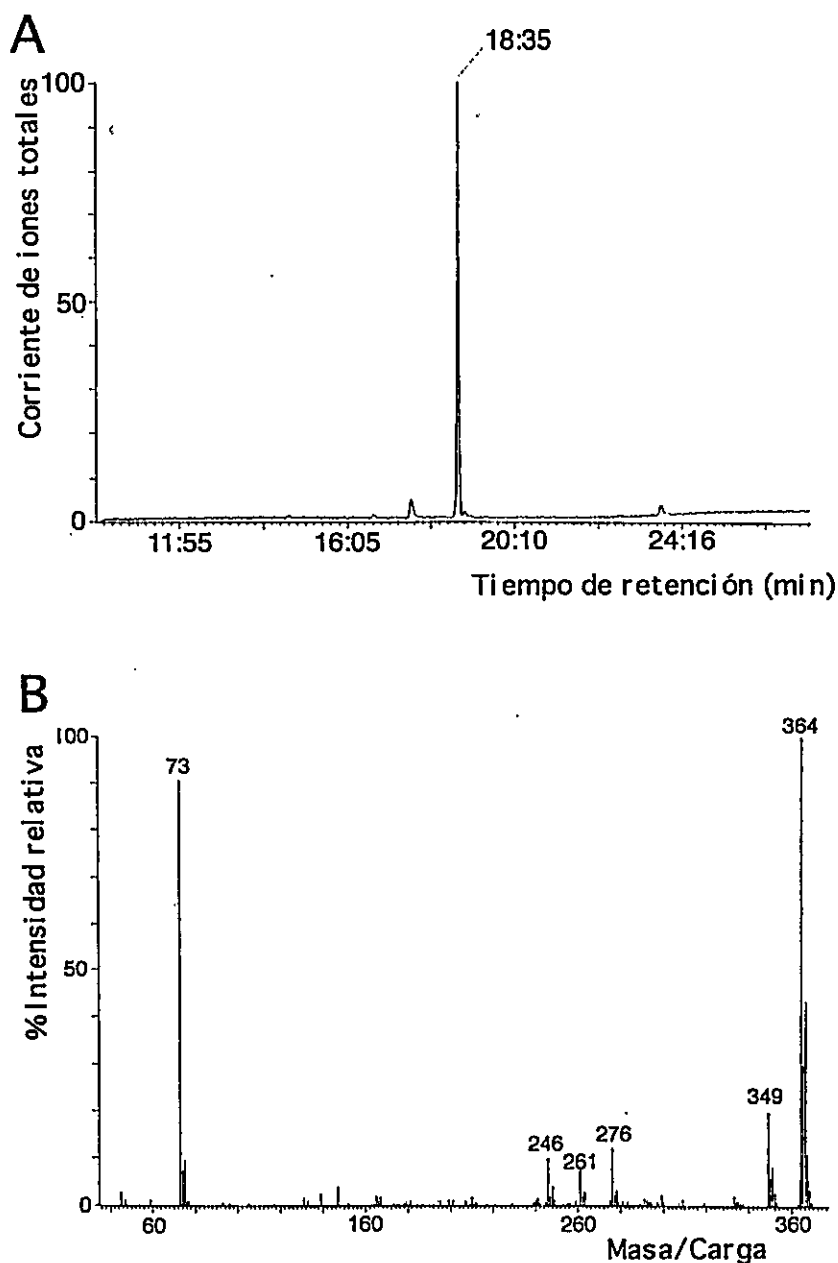


Figura 8. Caracterización del derivado con TMS del metabolito producido desde 2,4'-CB por la bifenilo-2,3-dioxigenasa. El metabolito se derivatizó con TMS y se analizó por GC/MS. (A) Cromatograma de iones totales. (B) Espectro de masas del metabolito detectado. El metabolito fue identificado como 2,3-dihidroxi-4'-CB.

derivados con PFP proporcionan espectros de masas consistentes con dihidroxi-monoCBs (figura 10). Adicionalmente, cuando se incubó 4-CB con la cepa recombinante que

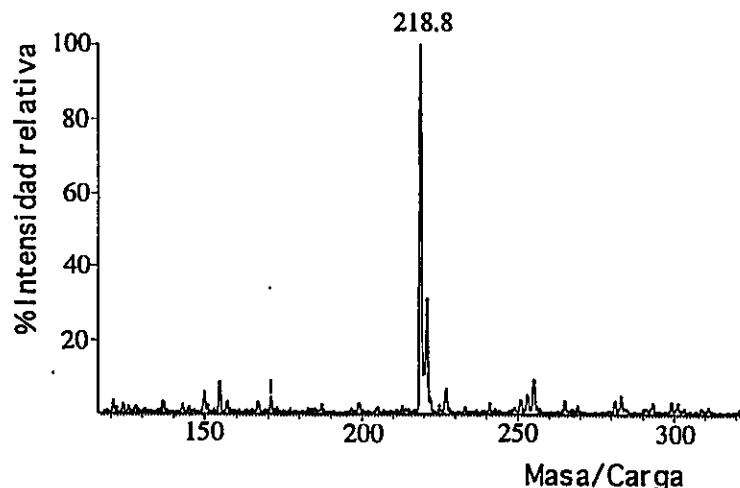


Figura 9. Espectro de masas de ionización por electrospray del metabolito no derivatizado producido desde 2,4'-CB por la bifenilo-2,3-dioxigenasa. El metabolito fue identificado como 2,3-dihidroxi-4'-CB.

expresa *bphAB*—y se analizó el sobrenadante por HPLC— pudo observarse que tanto el tiempo de retención como el espectro UV de los compuestos derivados de 4- y 2,4'-CB son indistinguibles (Tabla 8). Una evidencia adicional para la formación de DBs independiente de BDDH se obtuvo al adicionar DBDO purificada (Eltis *et al.*, 1993) a los metabolitos en cuestión, lo cual llevó a su inmediata y completa conversión a los correspondientes HOPDAs. Estos resultados demuestran que la descloración observada no corresponde a artefactos del análisis de GC/MS de derivados de TMS.

La hidroxilación del anillo en posiciones *meta/para* por una BDO ha sido descrita para diversas bacterias (Furukawa, 1982; Nadim *et al.*, 1987; Massé *et al.*, 1989; Bedard, 1990). Sin embargo, la completa conversión de los dihidroxi-CBs obtenidos en HOPDAs por la DBDO de la cepa LB400 indica que los tres congéneres son dioxigenados exclusivamente en las posiciones *orto/meta*, debido a que esta enzima no convierte 3,4-DB (Eltis *et al.*, 1993). Este hecho concuerda con el probable mecanismo de deshidrohalogenación de 2,2'- y 2,4'-CB, que requiere una hidroxilación en un carbono clorado (véase el capítulo Discusión). Y, lo que es aún más importante, concuerda con los

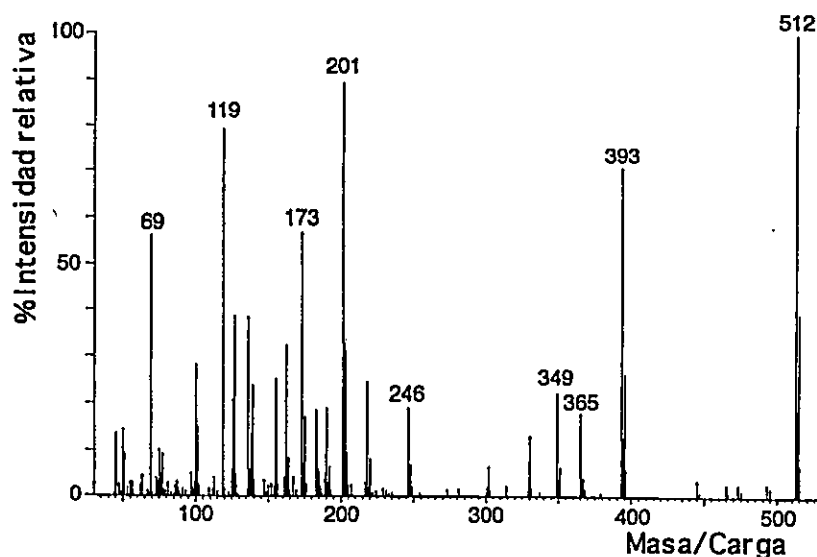


Figura 10. Espectro de masas del derivado con PFP del metabolito producido desde 2,4'-CB por la bifenilo-2,3-dioxigenasa. El metabolito fue identificado como 2,3-dihidroxi-4'-CB.

resultados en el sentido de que 2,2'-, 2,4'- y 4-CB son convertidos en cantidades estequiométricas a 2- o 4-CBA, respectivamente, por una cepa de *E. coli* que expresa *bphABCD* (véase más arriba). La ruptura de tipo extradiol y la posterior hidrólisis del anillo dihidroxilado en posiciones *meta/para*, si fuera posible, no produciría benzoatos. La identificación de los CBAs también demuestra que los CBs son atacados ya sea en el anillo no clorado o en el anillo *orto*-clorado. La eliminación de cloro con la concomitante formación de un catecol hace que la actividad de la BDDH sea innecesaria para el catabolismo de 2,2'- y 2,4'-CB. El fenómeno de *orto*-descloración mediado por la BDO se observó también con CBs de mayor cloración que contienen un anillo monoclorado en posición *orto* (Tabla 11, más adelante).

3.1.5. Degradación de CBs: dos derivados de TMS pueden representar un solo compuesto

Cuando una cepa recombinante de *E. coli* que sintetiza BDO se incubó con 2,4'-CB, el análisis de sobrenadantes de células en reposo por HPLC determinó la formación

de un solo pico de producto (Tabla 8). Sin embargo, el análisis por GC/MS de derivados de TMS muestra dos picos de producto de similares áreas y tiempos de retención (figura 11 y Tabla 8). Ambos productos se observaron en cantidades similares durante un experimento de cinética de oxidación de 2,4-CB por BDO (tiempos de 10, 30, 120 y 360 min). Los espectros de masas de los dos productos son muy similares (figura 11) e indican que ambos productos son compuestos dihidrodioles de diCBs. Aparentemente, el mismo fenómeno ha sido observado por Massé *et al.* (1989), quien analizó la degradación de 4-CB por una cepa bacteriana gram-negativa e interpretó que estos picos correspondían a 2,3- y 3,4-dihidroxiación de este congénere.

Sin embargo, cuando una cepa recombinante de *E. coli* que sintetiza BDO y BDDH se incubó con 2,4-CB, sólo un pico de producto se detecta por las técnicas de HPLC y GC/MS (Tabla 8). El espectro de masas de este producto único indica que se trata de un compuesto dihidroxi-diCB (figura 12). Este resultado se confirmó por incubación del sobrenadante que contiene dihidrodiol(es) derivados de 2,4-CB con células que sintetizan ambas enzimas. El análisis por GC/MS muestra la completa desaparición de ambos picos de dihidrodiol y la formación de un sólo pico que representa un dihidroxi-diCB. Por diferentes criterios, se puede descartar la posibilidad de que este pico único represente una mezcla de bifenilos dihidroxilados en posiciones *orto/meta* y *meta/para*. La incubación del producto con DBDO purificada, enzima que no ataca 3,4-DB (Eltis *et al.*, 1993), lleva a su completa conversión en HOPDA. Este resultado indica, además, que 2,4-CB es oxidado en posiciones *orto* y *meta*. Asimismo, se observó que los tiempos de retención de derivados de TMS de 2,3- y 3,4-DB en las mismas condiciones difieren en más de un minuto. Adicionalmente, la oxidación en posiciones *orto* y *meta* está de acuerdo con la observación de que la cepa de *E. coli* que expresa *bphABCD* degrada 2,4-CB en cantidades estequiométricas a 2,4-CBA (véase más arriba). Este resultado indica que la oxidación ocurrió en el anillo no clorado. La ruptura y la posterior hidrólisis del anillo

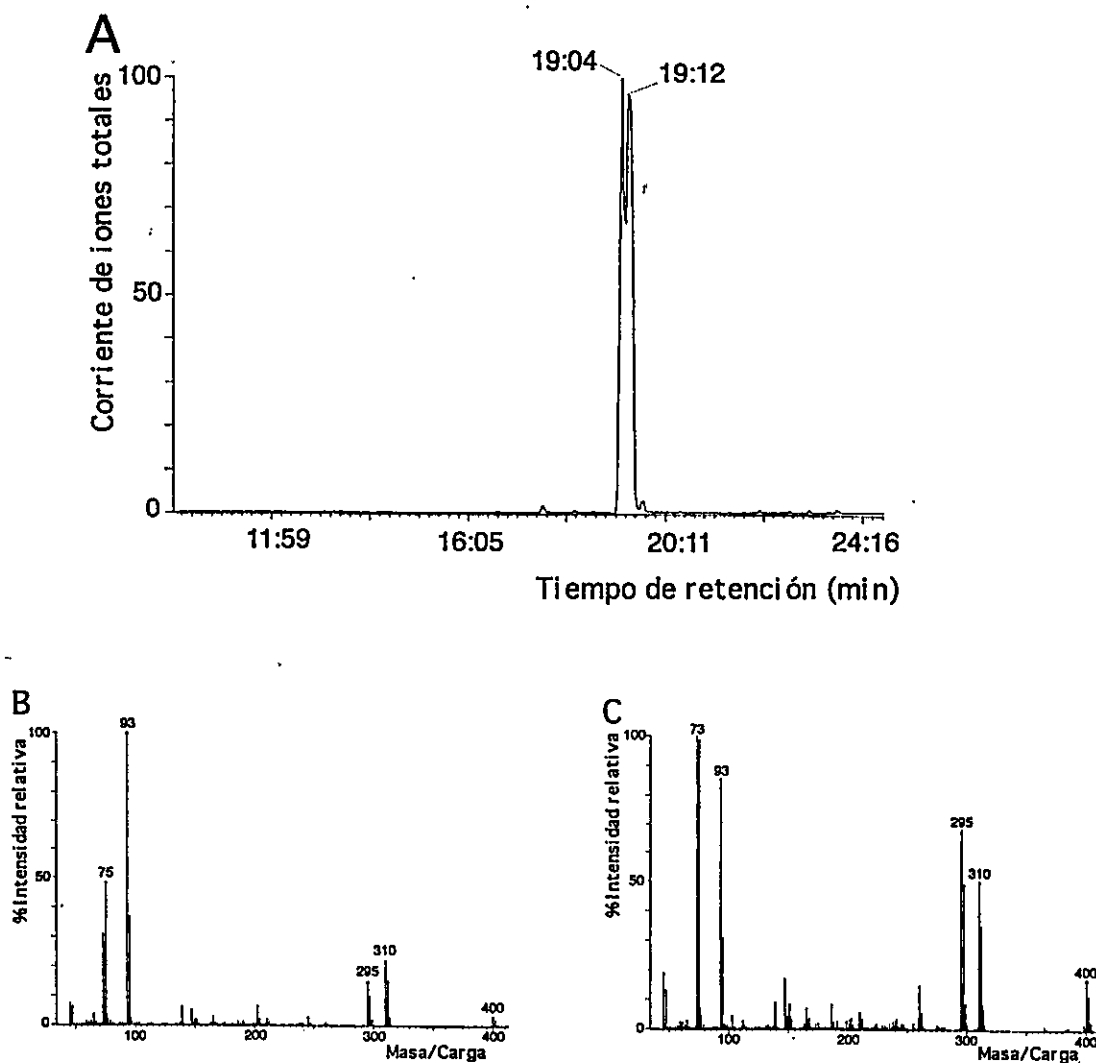


Figura 11. Caracterización de los derivados con TMS del metabolito producido desde 2,4-CB por la biphenilo-2,3-dioxigenasa. El extracto se derivatizó con TMS y se analizó por GC/MS. A: Cromatograma de iones totales. B: Espectro de masas del producto con menor tiempo de retención. C: Espectro de masas del producto con mayor tiempo de retención. El metabolito fue identificado como 2,3-dihidrodiol-2',4'-CB.

clorado por las enzimas codificadas por *bphCD* no producirían CBAs. La ruptura de tipo extradiol y la posterior hidrólisis del anillo dihidroxilado en posiciones *meta/para*, si fuera posible, no producirá benzoatos.

Estas evidencias indican que la aparición de dos derivados TMS de dihidrodioles

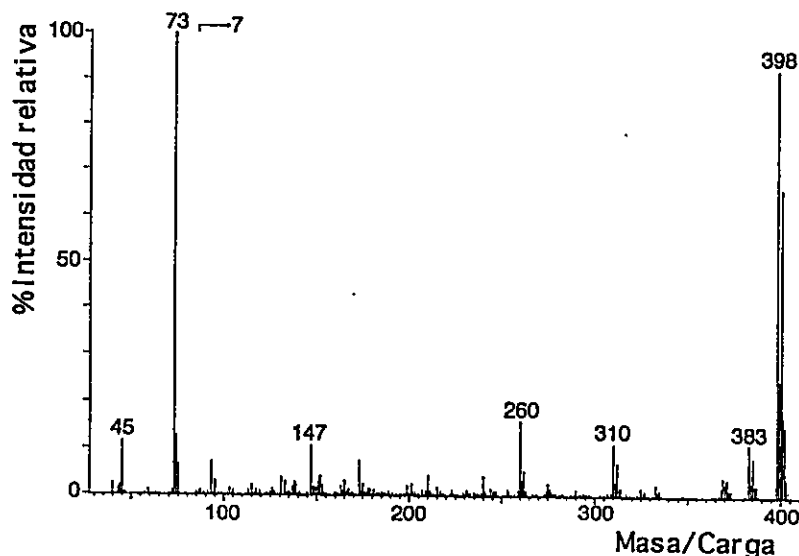


Figura 12. Espectro de masas del derivado con TMS del metabolito producido desde 2,4-CB por células que expresan *bphAB*. El metabolito fue identificado como 2,3-dihidroxi-2',4'-CB.

no reflejan una dihidroxilación en forma “relajada” involucrando diferentes pares de carbonos vecinos. Más bien, ambos derivados representan un compuesto único que corresponde a un 2,3-dihidrodiol. Como la BDO de *Pseudomonas* sp. LB400 (Haddock *et al.*, 1993) —al igual que otras dioxigenasas iniciales que atacan compuestos aromáticos (Jeffrey *et al.*, 1975; Jerina *et al.*, 1976; Cerniglia *et al.*, 1979; Klecka y Gibson, 1980; Gibson y Subramanian, 1984)— produce en forma exclusiva *cis*-dihidrodiol, los dos derivados de TMS no pueden representar los isómeros *cis* y *trans*. Por consiguiente, se propone que estos dos derivados de TMS representan los dos conformeros del anillo no planar (figura 13). Esto implica que la interconversión está fuertemente restringida por los grupos TMS relativamente grandes. Esta interpretación es consistente con la observación que derivados de BOR del (los) producto(s) de oxidación de 2,4-CB por la BDO eluyen en el análisis por GC/MS como un pico simple, fenómeno que ya había sido observado por Massé *et al.* (1989).

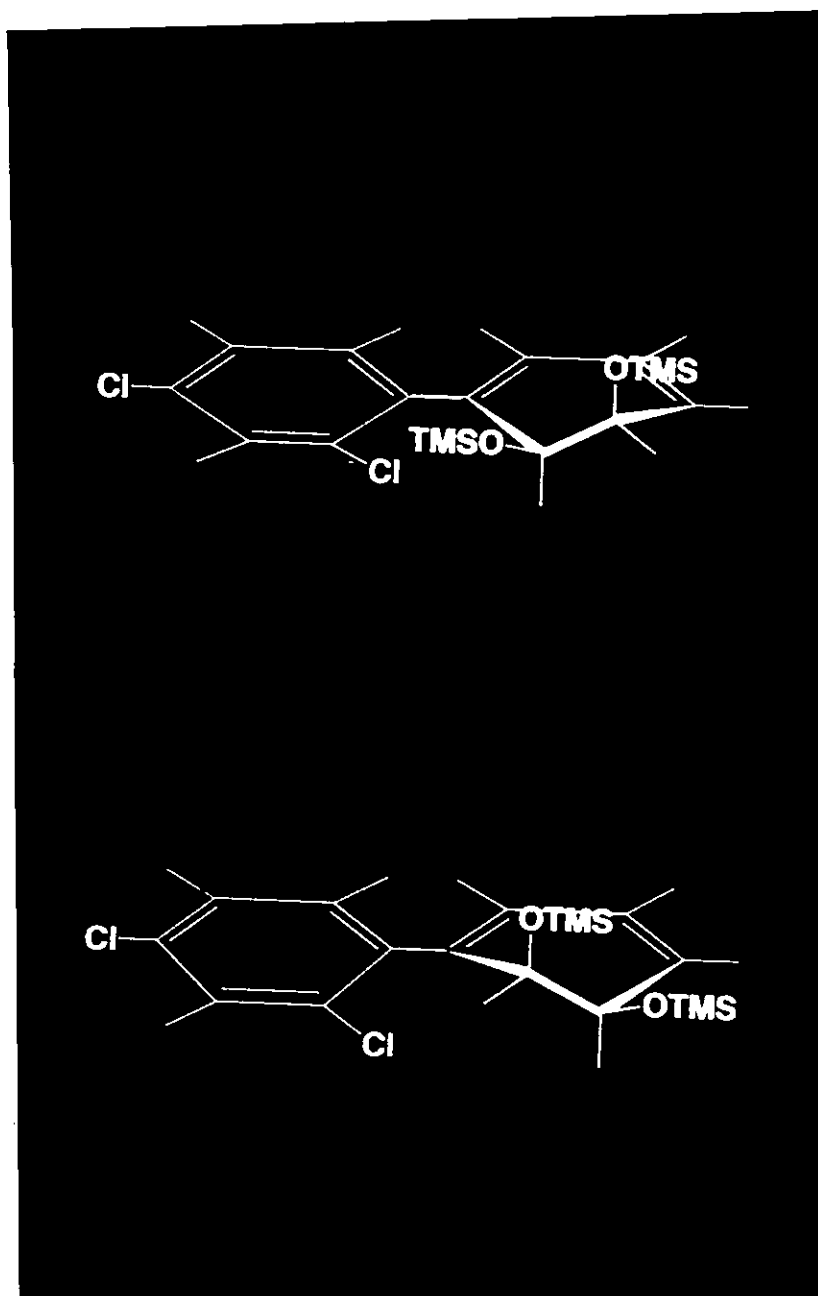


Figura 13. Modelo tridimensional de los confórmeros propuestos para los derivados trimetilsililados del metabolito producido desde 2,4-CB por la bifenilo-2,3-dioxigenasa.

3.1.6. Oxidación de diversos CBs por la BDO

Para clarificar los mecanismos utilizados por la enzima BDO codificada en el locus *bph* de LB400 en la degradación de los PCBs se identificaron los productos formados *in vivo* por la BDO desde una serie adicional de congéneres. Se estudió la oxidación de

PCBs representativos de aquellos congéneres que no eran convertidos en forma cuantitativa a CBAs. En esta aproximación experimental, las células en reposo se incubaron por 6 h con un determinado PCB y los sobrenadantes se extrajeron con acetato de etilo. Los metabolitos formados desde los PCBs se derivatizaron con BOR y se separaron por GC. La identificación de los analitos se realizó por MS y por diversos criterios adicionales. Los criterios adicionales que ayudaron en forma fundamental a la identificación de los metabolitos fueron los siguientes:

- 1.- *Los estudios anteriores de formación de CBAs desde CBs.* La conversión de un CB a un CBA indica que la hidroxilación inicial había ocurrido en posiciones *orto* y *meta* del anillo que sufrió la ruptura. La conversión estequiométrica de un CB a un CBA indica que la hidroxilación inicial había ocurrido exclusivamente en las posiciones *orto* y *meta* del anillo que sufrió la ruptura.
- 2.- *Los estudios anteriores de formación de HOPDAs desde CBs.* La formación de HOPDA indica que la hidroxilación inicial había ocurrido en posiciones *orto* y *meta* del anillo que sufrió la ruptura, pues CBs oxidados en posiciones *meta* y *para* no son oxidados por la enzima DBDO de LB400 (Eltis *et al.*, 1993). Si el HOPDA poseía una absorbancia máxima alrededor de 395 nm, entonces poseía un anillo *orto*-clorado. Si el HOPDA poseía una absorbancia máxima alrededor de 435 nm, no poseía un anillo clorado en *orto*.
3. *Experimentos realizados con la BDO de Rhodococcus globerulus P6* (McKay *et al.*, 1996). Algunos metabolitos de LB400 se identificaron por la comparación de los tiempos de retención y del espectro de masas con los de metabolitos producidos por la BDO de P6, previamente identificados.
4. *Los tiempos de retención.* En el caso de dos productos resultantes de la oxidación en el mismo anillo en posiciones *orto/meta* y *meta/para*, el producto oxidado en los carbonos *orto/meta* se identifica por ser el que tenía un menor tiempo de retención (Dufek *et al.*,

1981; Korhonen y Knuutinen, 1983; Massé *et al.*, 1989).

5. *En algunos casos de oxidación, en los cuales no se produce deshalogenación, existe solamente una posibilidad de producto.* Eso es, por ejemplo, lo que sucede en la oxidación de 4,4'- y de 2,5,2',5'-CB.

6. *Información de la literatura.* Los metabolitos de 2,5,2'- y 2,5,3'-CB se asignaron con base en lo descrito recientemente por Haddock *et al.* (1995).

Los resultados obtenidos con diversos mono y diCBs se ilustran en la Tabla 9. Los productos formados desde diversos tri a pentaCBs se muestran en la Tabla 10. La formación de derivados de BOR indicó que los grupos hidroxilos en los productos tienen una estereoquímica relativa *cis*. Con todos los CBs clorados en un solo anillo se observó un solo metabolito, que correspondía a un BD. Los CBs clorados en ambos anillos y con un anillo mono *orto*-clorado fueron hidroxilados por la BDO, a excepción de 2,5,2'-CB, sólo en el anillo mono *orto*-clorado. A excepción de 2,3'-CB, el ataque del anillo mono *orto*-clorado ocurrió exclusivamente en los carbonos *orto*-clorado y *meta*, con la concomitante deshalogenación y formación de DBs (Tabla 11). Es interesante hacer notar que esta deshalogenación también ocurrió con un pentaCB (2,3,4,5,2'-CB), fenómeno no descrito para ningún otro microorganismo. Las excepciones la constituyen los compuestos 2,3' y 2,5,2'-CB, que además de la reacción de deshidrohalogenación y la formación de cateoles por oxidación de los carbonos *orto*-clorado y *meta*, sufren de hidroxilación en posiciones 5,6 y 3,4, respectivamente. Esto indica la importancia de la sustitución de ambos anillos para los mecanismos de oxidación de la BDO.

Todos los CBs clorados en ambos anillos y con al menos un anillo diclorado en posiciones 2 y 5 son oxidados a 2 productos, siendo hidroxilados en ambos anillos. En todos estos casos el anillo clorado en posiciones 2 y 5 es hidroxilado en posiciones *meta* y *para*. 2,5,4'-CB es oxidado por la BDO a dos productos sin observarse la reacción de deshidrohalogenación. Esto fue determinado por derivatizaciones con TMS o con PFP y

Tabla 9. Caracterización de los metabolitos producidos desde mono y diCBs por la bifenilo-2,3-dioxigenasa

| Sustrato | Producto | | | |
|----------|---|---------------------|--|-------------------------------------|
| | t _r (GC) ^a (min) | m (MS) ^a | Rendimiento relativo ^a (%) | Cantidad relativa ^{a,b} |
| 3-CB | 23.55 | 288 | 100 | +++ |
| 2,6-CB | 24.19 | 322 | 100 | + |
| 2,3'-CB | 24.67 | 286 | 59 | +++ |
| | 25.49 | 322 | 41 | +++ |
| 3,3'-CB | 24.82 | 322 | 88 | +++ |
| | 25.25 | 322 | 12 | +++ |
| 3,4'-CB | 25.03 | 322 | 54 | +++ |
| | 25.18 | 322 | 34 | +++ |
| | 25.45 | 322 | 12 | ++ |
| 4,4'-CB | 25.37 | 322 | 100 | + |

^aDatos de GC y MS se refieren a derivados con N-butilboronato.

^bPor la carencia de estándares se realizó una estimación semicuantitativa basada en el área del pico cromatográfico. Cantidad relativa: +++: grande; ++: moderada; +: poca.

^cCriterios de identificación: 1, formación de CBA; 2, asignación tentativa; 3, formación de HOPDA; 4, por comparación con metabolitos de la cepa P6 identificados; 5, tiempos de retención relativos; 6, única posibilidad.

Tabla 10. Caracterización de los metabolitos producidos desde tri, tetra y pentaCBs por la bifenilo-2,3-dioxigenasa

| Sustrato | Producto | | | |
|---------------|---|---------------------|--|-------------------------------------|
| | t _r (GC) ^a (min) | m (MS) ^a | Rendimiento relativo ^a (%) | Cantidad relativa ^{a,b} |
| 2,3,5-CB | 25.59 | 356 | 100 | +++ |
| 2,4,6-CB | 25.50 | 356 | 100 | + |
| 2,3,2'-CB | 24.29 | 320 | 100 | +++ |
| 2,3,3'-CB | 25.64 | 356 | 96 | +++ |
| | 26.42 | 356 | 4 | ++ |
| 2,4,4'-CB | 25.68 | 356 | 100 | + |
| 2,5,2'-CB | 23.91 | 320 | 30 | +++ |
| | 25.13 | 356 | 70 | +++ |
| 2,5,3'-CB | 25.85 | 356 | 28 | +++ |
| | 25.97 | 356 | 72 | +++ |
| 3,4,2'-CB | 25.61 | 320 | 100 | ++ |
| 3,5,2'-CB | 24.98 | 320 | 100 | + |
| 2,5,2',5'-CB | 26.52 (23.10) ^d | 390 | 77 | +++ |
| | (27.51) ^d | 390 | 23 | +++ |
| 2,3,4,5,2'-CB | 27.54 | 388 | 100 | + |

^aDatos de GC y MS se refieren a derivados con N-butilboronato.

^bPor la carencia de estándares se realizó una estimación semicuantitativa basada en el área del pico cromatográfico. Cantidad relativa: +++: grande; ++: moderada; +: poca.

^cCriterios de identificación: 1, formación de CBA; 2, formación de HOPDA; 3, asignación tentativa; 4, por comparación con metabolitos de la cepa P6 identificados; 5, tiempos de retención relativos; 6, por datos de literatura; 7, única posibilidad.

^dObtenido con un programa cromatográfico diferente.

2',3'-dihidrodiol-2,3,3'-CB^{3,5}

2',3'-dihidrodiol-2,3,3'-CB^{3,5}

2',3'-dihidroxi-2,3-CB^{1,2}

5,6-dihidrodiol-2,3,3'-CB^{2,4}

4',5'-dihidrodiol-2,3,3'-CB^{3,5}

5,6-dihidrodiol-2,4,4'-CB²

5',6'-dihidroxi-2,5-CB^{1,5,6}

3,4-dihidrodiol-2,5,2'-CB^{5,6}

5',6'-dihidrodiol-2,5,3'-CB⁶

3,4-dihidrodiol-2,5,3'-CB⁶

2',3'-dihidroxi-3,4-CB^{1,2}

2',3'-dihidroxi-3,5-CB^{1,2}

3,4-dihidrodiol-2,5,2',5'-CB⁷

bis -3,4-dihidrodiol-2,5,2',5'-CB⁷

2',3'-dihidroxi-2,3,4,5-CB^{1,2}

Tabla 11. Descloración de PCBs catalizada por la bifenil-2,3-dioxigenasa de LB400

| CB | Descloración del anillo oxidado ^a |
|------------|--|
| 2,2' | ++ |
| 2,3' | + |
| 2,4' | ++ |
| 3,3' | - |
| 3,4' | - |
| 4,4' | - |
| 2,3,2' | ++ |
| 2,3,3' | - |
| 2,4,4' | - |
| 2,5,2' | + |
| 2,5,3' | - |
| 2,5,4' | - |
| 3,4,2' | ++ |
| 3,5,2' | ++ |
| 2,5,2',5' | - |
| 2,3,4,5,2' | ++ |

^a Símbolos: ++, descloración total; +, descloración parcial;

-, sin descloración.

posterior análisis por GC/MS (resultados no mostrados). 2,5,2',5'-CB es oxidado sin producirse una reacción de deshalogenación. Esto implica que es hidroxilado en las posiciones *meta* y *para* dando como metabolito un BD. Este congénere después de ser hidroxilado en un anillo es hidroxilado en el segundo anillo, formando un *bis*-3,4-dihidrodiol-2,5,2',5'-CB. Este interesante fenómeno no se ha observado con ninguno de los otros congéneres analizados.

Los CBs analizados que están clorados en ambos anillos con un anillo mono *meta*-clorado (2,3'-, 3,3'-, 3,4'-, 2,3,3'- y 2,5,3'-CB) fueron oxidados a dos o tres metabolitos, dependiendo de la sustitución del otro anillo. Cuando el segundo anillo es mono *orto*-clorado, éste es el único anillo oxidado. En contraste, cuando el segundo anillo es mono clorado en *para*, o es diclorado en posiciones 2 y 5, ambos anillos son

hidroxilados. La oxidación de 3,4'-CB lleva a la formación de 3 diferentes metabolitos, lo que da cuenta de la relajada regioespecificidad de la BDO de LB400. Con 2,3,3' sólo fue posible identificar las posiciones de los hidroxilos del producto principal, por lo que al producto minoritario se le asignaron, tentativamente, los hidroxilos. 2,5,3'-CB es hidroxilado en ambos anillos, como ya ha sido descrito.

De los CBs que poseen un anillo doblemente clorado en *orto* se analiza solamente la oxidación por la BDO de 2,6- y de 2,4,6-triCB, congéneres atacados por la cepa parental LB400 (Nadim *et al.*, 1987), determinándose que estos congéneres son atacados débilmente por la BDO. En estos casos, sólo se observa BD en pequeñas cantidades, lo que refleja lo refractario a la oxidación por BDO que son estos compuestos. Las posiciones de los hidroxilos pudo ser determinada, por lo que fueron asignados en forma tentativa.

Finalmente, 4,4' y 2,4,4'-CB son oxidados por BDO a un solo producto, siendo oxidados en el anillo mono y diclorado, respectivamente. En estos casos sólo se observan los metabolitos en pequeñas cantidades, lo cual probablemente refleje fenómenos de inhibición de la BDO por el sustrato o el producto, o de toxicidad de los BD formados, o de los propios CBs. Es interesante notar que el anillo atacado exclusivamente por la dioxigenasa en 2,4,4'-CB es el anillo más clorado, lo que indica que el cloro en posición *orto*, lo hace más susceptible a la oxidación. Este ejemplo es contrario a una de las reglas de Furukawa (1982), que dice que a mayor cloración de los congéneres se observa una menor degradación aerobia de los PCBs. Asimismo, este resultado es consistente con la mayor conversión a HOPDA de 2,4,4'- comparado con 4,4'-CB.

En este estudio se estableció que la regioselectividad de la hidroxilación por la BDO de un congénere está muy influenciada por el patrón de sustitución del anillo atacado. Cuando este anillo está clorado en posiciones 2 y 5, se observa sólo hidroxilación de las posiciones *meta* y *para*. Cuando este anillo está clorado en *meta*, la hidroxilación

ocurre, en general, en posiciones *orto/meta* y *meta/para*. En los demás casos analizados se determinó oxidación exclusiva en los carbonos *orto* y *meta*.

3.1.7. Visión global

Las figuras 14 y 15 entregan una visión global sobre la degradación de PCBs por las enzimas codificadas en el locus *bph* de *Pseudomonas* sp. LB400. La figura 14 da una visión global de la extensión del catabolismo de los PCBs mono- y diclorados por la vía superior de bifenilo codificada en el locus *bph* de LB400. Todos los monoCBs, y casi todos los diCBs, exceptuando 2,6- y 4,4'-CB, fueron catabolizados a CBAs. En la mayoría de estos casos, estos PCBs son metabolizados en 24 horas en cantidades estequiométricas a CBAs. Todos los CBs metabolizados sustituidos en sólo un anillo sufren oxidación, en forma exclusiva, del anillo no halogenado. Los diCBs que poseen un anillo mono *orto* clorado son oxidados exclusivamente en este anillo. Mientras 2,6-CB es sólo débilmente atacado por la BDO, 4,4'-CB es transformado hasta HOPDA. El tipo y el porcentaje de benzoatos producidos reflejan la siguiente correlación entre el anillo atacado y la degradabilidad a través de toda la vía superior: fenil no \approx *orto* \rightarrow *meta* \rightarrow *para*-clorado.

En la figura 15 se presenta una visión global de la extensión del catabolismo de los PCBs tri a pentaclorados por la vía superior de bifenilo codificada en el locus *bph* de LB400. De los 14 triCBs analizados sólo 7 son convertidos en CBAs y 3 son transformados en HOPDAs. De los 5 tetra y pentaCBs analizados, sólo 2,3,4,5,2'-CB es convertido en CBA. Todos los CBs metabolizados sustituidos solamente en un anillo sufrieron oxidación en forma exclusiva del anillo no halogenado. Varios triCBs y un tetraCB analizados son sólo parcialmente catabolizados, acumulándose diferentes metabolitos finales. Muchos de los CBs parcialmente metabolizados son oxidados a más de un producto por la BDO.

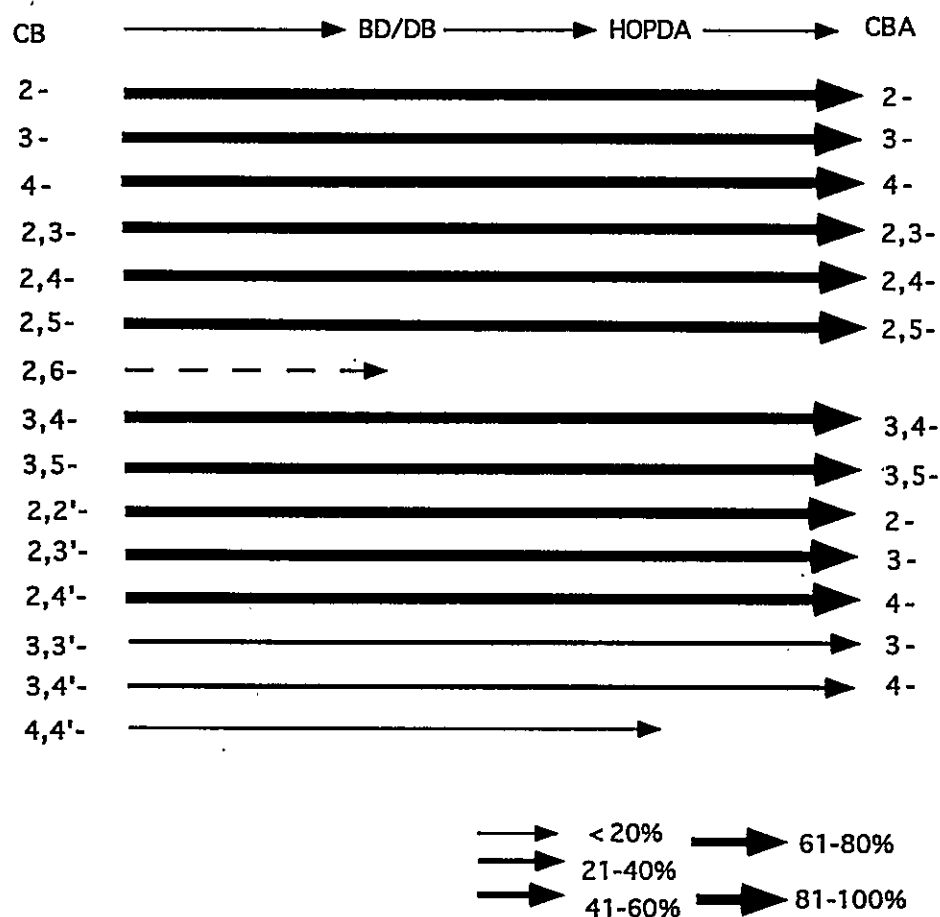


Figura 14. Catabolismo de mono y diCBs por la vía superior de bifenilo de *Pseudomonas* sp. LB400. El grosor de las flechas indica el rango de porcentaje de metabolito final producido a partir del correspondiente PCB. Las estructuras de los metabolitos de la vía se indican en la figura 3. CB: clorobifenilo; BD: bifenilo-dihidrodiol; DB: dihidroxibifenilo; HOPDA: 2-hidroxi-6-oxo-6-fenilhexa-2,4-dienoato; CBA: clorobenzoato. Las flechas no continuas indican identificación de los metabolitos por GC/MS (no indican cuantificación).

En resumen, de los PCBs analizados, la vía catabólica codificada por el locus *bph* de LB400 es capaz de catabolizar todos los mono-, casi todos los di-, algunos tri- y un pentaCBs a CBAs. De los 34 congéneres de PCBs analizados, 21 son catabolizados a CBAs. En 12 casos se obtuvieron CBAs virtualmente en cantidades cuantitativas. 4 de los 34 congéneres de PCBs estudiados son degradados solamente a HOPDAs. Al menos 4 de los PCBs que no son metabolizados a HOPDAs son oxidados por la BDO inicial. Los CBs con un anillo doblemente clorado en *orto* son muy refractarios a la degradación por la

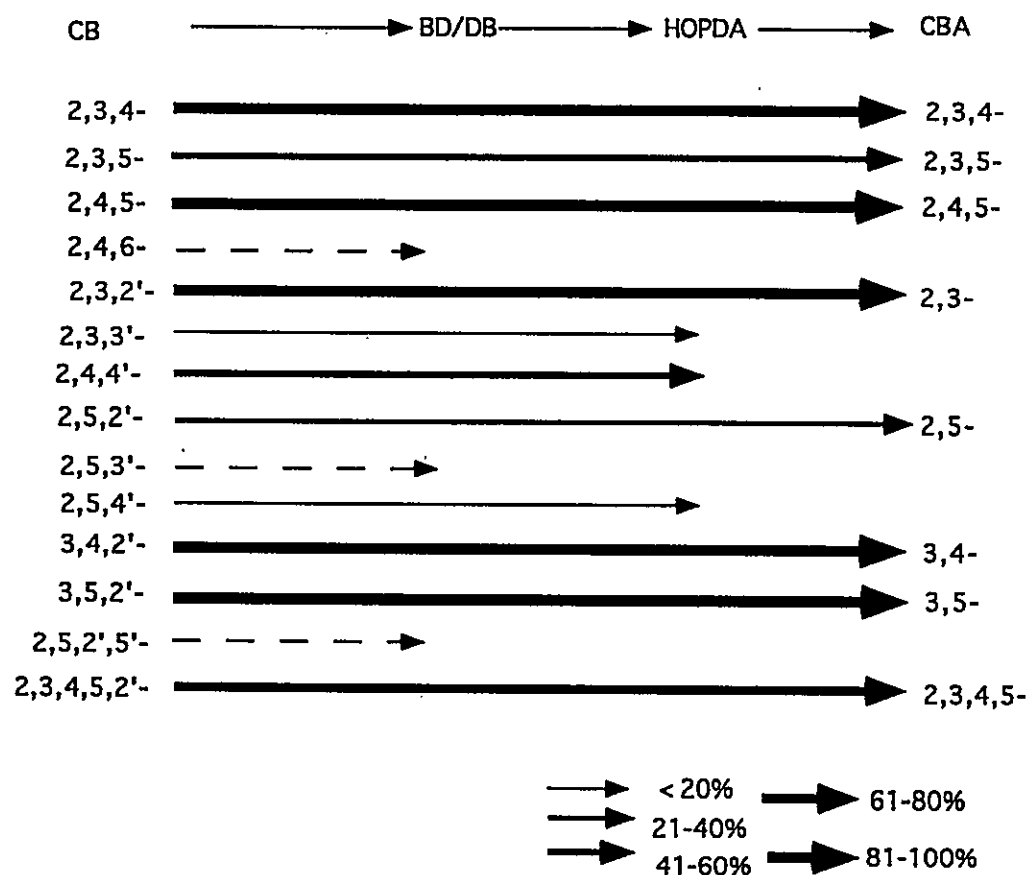


Figura 15. Catabolismo de tri a pentaCBs por la vía superior de bifenilo de *Pseudomonas* sp. LB400. El grosor de las flechas indica el rango de porcentaje de metabolito final producido a partir del correspondiente PCB. Las estructuras de los metabolitos de la vía se indican en la figura 3. CB: clorobifenilo; BD: bifenilo-dihidrodiol; DB: dihidroxibifenilo; HOPDA: 2-hidroxi-6-oxo-6-fenilhexa-2,4-dienoato; CBA: clorobenzoato. Las flechas no continuas indican identificación de los metabolitos por GC/MS (no indican cuantificación).

vía superior de bifenilo de LB400. Todos los CBs metabolizados sustituidos sólo en un anillo sufrieron oxidación en forma exclusiva del anillo no halogenado. Casi todos los CBs metabolizados que poseen un anillo mono *orto*-clorado fueron oxidados exclusivamente en este anillo. Todos los CBs clorados en ambos anillos y que poseen un anillo mono *meta* clorado o un anillo clorado en posiciones 2 y 5 fueron oxidados al menos a dos productos. En la mayoría de estos casos se observó una oxidación en posiciones *meta/para*.

3.2. CONSTRUCCIÓN DE NUEVAS CEPAS DEGRADADORAS DE PCBs

Para superar los problemas de la acumulación y de la liberación de CBAs de las cepas degradadoras de PCBs actualmente disponibles, en esta tesis se propone la construcción y la caracterización de nuevas cepas degradadoras de PCBs. En particular, se propone la construcción de nuevas cepas degradadoras de CBs mediante la inserción de la vía catabólica superior de bifenilo codificada por el locus *bph* de *Pseudomonas* sp. LB400 en una cepa degradadora de un amplio rango de CBAs. Como se puede apreciar en las Tablas 6 y 7, la vía superior de bifenilo codificada en el locus *bph* de LB400 es capaz de catabolizar varios CBs a CBAs. Varios de estos CBAs pueden ser utilizados como única fuente de carbono y energía por la cepa *P. putida* P111, una cepa degradadora de un rango muy amplio de CBAs (Hernández *et al.* 1991). Por consiguiente, se utilizó esta cepa P111 como bacteria receptora del locus *bph* de LB400. Parte de los resultados obtenidos han sido publicados previamente (Hofer *et al.*, 1996).

3.2.1. Construcción de las nuevas cepas

Para la inserción del locus *bph* de la cepa LB400 en el genoma de la cepa de *P. putida* P111 se utilizan vectores que poseían un sistema de minitransposones (de Lorenzo *et al.*, 1990; Herrero *et al.*, 1990). El minitransposón utilizado posee las características de transposición de Tn5 y las propiedades de un vector de entrega suicida basado en R6K. Para la transferencia de diferentes loci *bph* de una bacteria dadora *E. coli* Sm10 λ pir a la bacteria receptora *P. putida* P111 se utilizaron tres plasmidios, que contienen diferentes cassettes genéticos. Los plasmidios empleados en los experimentos de conjugación son los plasmidios pT5K102, pT5K202 y pT5K302, que se ilustran en las figura 16 y 17. La figura 16 muestra el plasmidio suicida recombinante pT5K102. La figura 17 muestra los cassettes del locus *bph*, que están contenidos en los plasmidios pT5K102, pT5K202 y pT5K302. El cassette *bph*-1 contiene el fragmento completo del locus *bph* de 12.5 kb. El

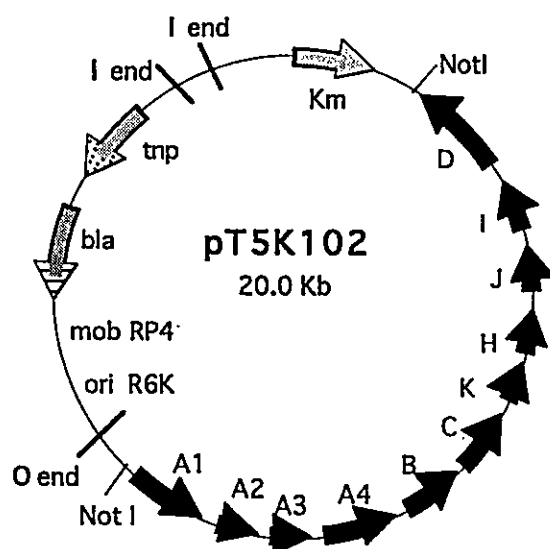


Figura 16. Estructura del vector de entrega recombinante pT5K102 que contiene el locus *bph* de la cepa LB400. Las direcciones del sentido de la transcripción de los genes se indican por flechas. Las flechas negras representan los diversos genes *bph* de LB400, que se ilustraron en la figura 3. Asimismo, se indica la localización aproximada de la región *oriT* de RP4 (mobRP4), el origen de replicación R6K (oriR6K), el gen *bla* —que confiere resistencia a diversos antibióticos β -lactámicos— el gen *trp* de IS50_R de Tn5 que carece de sitios *NotI*, el gen de resistencia a kanamicina (Km), las secuencias de término de Tn5 I y O de 19 kb, y los sitios de restricción *NotI*.

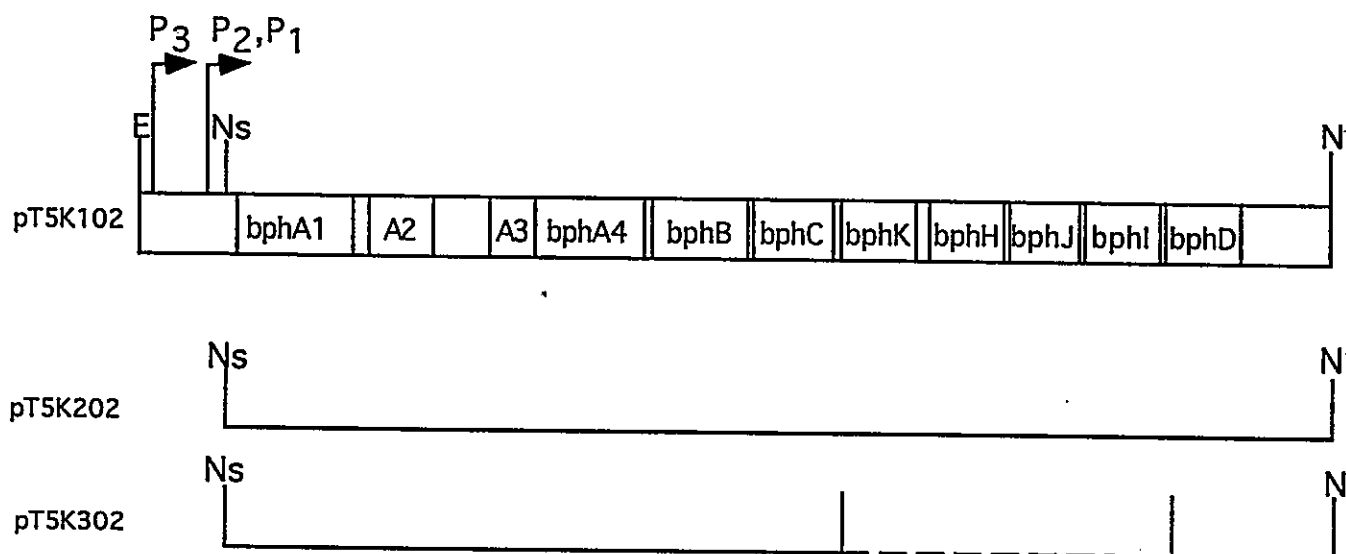


Figura 17. Los loci *bph* contenidos en los vectores de entrega recombinantes pT5K102, pT5K202 y pT5K302. Se indican los tres promotores del locus *bph*. Las enzimas de restricción se indican por E: *EcoRI*; N: *NotI*; Ns: *NsiI*.

cassette *bph-2* es un derivado por deleción de *bph-1* que contiene el locus *bph* modificado, que carece del primer marco de lectura abierto y del promotor regulado por bifenilo. El cassette *bph-3* contiene un segmento reestructurado del locus *bph*, que contiene sólo los genes *bphABCD*, que codifican para las enzimas de la vía superior de bifenilo y el marco de lectura abierto entre *bphA2* y *bphA3*. Estos cassettes se introdujeron en un vector de entrega suicida que contenía un minitransposón artificial basado en Tn5. Como el vector de entrega sólo es capaz de replicar en una cepa especial que sintetiza la proteína π (Miller y Mekalanos, 1988) el establecimiento de los genes *bph* dentro de la cepa receptora requiere su integración en el genoma. Los plasmidios pT5K102, pT5K202 y pT5K302 se transfirieron desde las respectivas cepas de *E. coli* Sm10 λ pir a *P. putida* P111 por conjugación bacteriana en filtro. Las mezclas de conjugación se seleccionan según su capacidad de crecer en un medio mínimo con 2-CB como única fuente de carbono y energía.

Después de realizar las conjugaciones y las inoculaciones en medio mínimo suplementado con 2-CB como fuente de carbono, se observa crecimiento sólo en experimentos de transferencia que involucran los cassettes *bph-1* y *bph-2*. La presencia del locus *bph* en los transconjugantes se confirmó por amplificación por PCR de segmentos de *bphA* y *bphD*. La presencia de las enzimas BDO, BDDH, DBDO y HOPDAH se verificó mediante diferentes ensayos con spray, como se indica en el capítulo de Materiales y Métodos.

3.2.2. Estudio de la estabilidad de los clones recombinantes

La estabilidad genética del locus *bph* insertado en el genoma de las cepas que contienen los cassettes *bph-1* y *bph-2* es analizado en condiciones no selectivas. Utilizando un ensayo de spray con 2,3-DB se determina el porcentaje de células que poseen la enzima DBDO en forma activa durante más de 100 generaciones de crecimiento

en condiciones no selectivas. Los resultados del estudio de estabilidad se ilustran en la figura 18. Todos los clones analizados que contienen el cassette *bph-2* son inestables, perdiendo completamente la actividad DBDO en las primeras 20 generaciones. Cuatro clones que contienen el cassette *bph-1* perdieron su actividad DBDO durante las primeras 70 generaciones. En contraste, cinco clones transconjugantes con el cassette *bph-1* fueron estables durante las más de 100 generaciones de crecimiento en condiciones no selectivas. Estos cinco clones estables se denominaron como C11, C12, C13, C14 y C19, y fueron seleccionados para diferentes estudios posteriores.

La presencia del locus *bph* completo en los 5 clones estables después de más de 100 generaciones de crecimiento en condiciones no selectivas se confirmó mediante la amplificación por PCR de fragmentos de los genes *bphA* y *bphD* y por ensayos de las actividades enzimáticas BDO, BDDH, DBDO y HOPDAH, codificadas por *bphABCD* (Tabla 12). La figura 19 ilustra la detección de las actividades de las enzimas BDO, BDDH y DBDO mediante el ensayo con dibenzofurano. La integración en el genoma del recipiente se debe a una transposición que involucra los extremos Tn5 o a otros eventos recombinatorios de entrecruzamiento doble o simple. La utilización de PCR con los partidores TNP480 y TNP120 —que hibridizan con el gen codificante de la transposasa *tnp* del vector de entrega, gen que está localizado fuera del transposón artificial— revela la presencia del gen *tnp*. Esto indica la existencia de secuencias del vector diferentes a las del elemento miniTn5 en los 5 clones estables (Tabla 12). Por consiguiente, en la integración de los genes *bph* de LB400 al genoma de P111 no hubo una transposición auténtica del mini-Tn5. Probablemente, sólo ocurrió el primer evento de la transposición, produciéndose la cointegración completa del plasmidio de entrega al genoma de P111. Una explicación alternativa es que la integración de los genes *bph* haya sido mediada por un mecanismo diferente al sistema de minitransposones, como, por ejemplo, una recombinación homóloga.

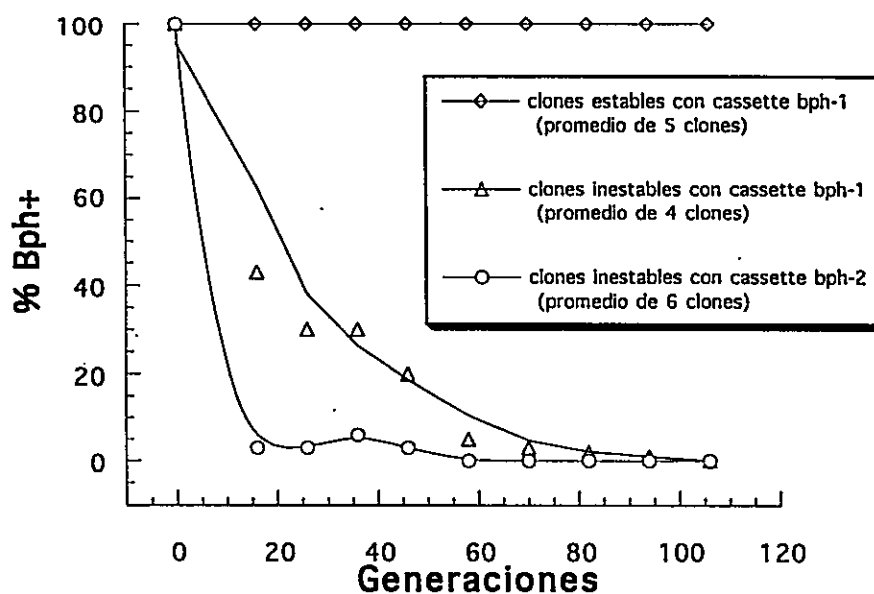


Figura 18. Estabilidad fenotípica de clones derivados de P111 que contienen diferentes cassettes con genes *bph*. Para determinar la estabilidad, los clones se cultivaron en condiciones no selectivas y se determinó la presencia de la 2,3-dihidroxibifenilo-1,2-dioxigenasa mediante un ensayo de spray con 2,3-DB al 0,1%.

Tabla 12. Caracterización de las cepas estables P111::*bph*

| cepa | Actividades enzimáticas | | PCR | | |
|------|-------------------------|------|-------------|-------------|------------|
| | BphABC | BphD | <i>bphA</i> | <i>bphD</i> | <i>tnp</i> |
| C11 | + | + | + | + | + |
| C12 | + | + | + | + | + |
| C13 | + | + | + | + | + |
| C14 | + | + | + | + | + |
| C19 | + | + | + | + | + |
| P111 | - | - | - | - | - |



Figura 19. Detección de las actividades enzimáticas codificadas por *bphABC* en cepas bacterianas. Para determinar la presencia y expresión de las enzimas codificadas por *bphABC*, las colonias fueron sometidas a un ensayo de spray con dibenzofurano al 5% en dietiléter. La presencia o la ausencia de estas tres enzimas se detectó por la presencia (placa derecha) o ausencia (placa izquierda) de un color amarillo intenso.

3.2.3. Regulación de los genes *bph*

Para estudiar la regulación y la expresión de los genes *bph* en las nuevas cepas, se determina la actividad de una de las enzimas de la vía, la DBDO, que es el producto génico de *bphC*. Los niveles de expresión de los genes *bph* se evaluaron en extractos crudos de células en fase exponencial crecidas en un medio mínimo, utilizando bifenilo o succinato como única fuente de carbono. Para determinar estas actividades dioxigenasas se utilizó 2,3-DB como sustrato y se determinó la formación de HOPDA, utilizando una modificación del método descrito por Eltis *et al.* (1993). Las actividades enzimáticas de DBDO de las 5 cepas recombinantes crecidas en bifenilo son similares entre sí (Tabla 13), siendo, aproximadamente, un 75% mayores que la actividad DBDO de la cepa silvestre

Tabla 13. Actividad de la DBDO de cepas estables P111::bph cultivadas en bifenilo o succinato

| Cepa | Actividad DBDO (U/mg) | | Razón Actividad DBDO bifenilo/succinato |
|-------|-----------------------|-----------|---|
| | bifenilo | succinato | |
| C11 | 2,42 | 0,14 | 17 |
| C12 | 2,99 | 0,12 | 25 |
| C13 | 2,80 | 0,15 | 19 |
| C14 | 3,55 | 0,18 | 19 |
| C19 | 2,65 | 0,13 | 20 |
| LB400 | 1,63 | 0,06 | 27 |

LB400 crecida en bifenilo. Las actividades enzimáticas de DBDO de las cepas recombinantes cultivadas en succinato son bastante menores a la actividad DBDO de células cultivadas en bifenilo, siendo nuevamente similares entre sí. La actividad de DBDO es aproximadamente 20 veces mayor en las células cultivadas en bifenilo respecto a células cultivadas en succinato. La diferencia en la actividad DBDO entre las células cultivadas en bifenilo y las cultivadas en succinato es comparable a la diferencia observada en la cepa LB400 (Tabla 13). Estos resultados indican que la expresión del locus *bph* en las cepas C11, C12, C13, C14 y C19 no es constitutiva sino regulada. Sin embargo, existe un nivel basal de expresión de los genes *bph* en ausencia de bifenilo. Adicionalmente, estos resultados sugieren que el bifenilo actúa como un inductor del locus *bph* en las nuevas cepas recombinantes, al igual que lo observado en la cepa LB400. Previamente, en la cepa LB400 se han descrito 2 promotores del locus *bph* activos en células crecidas en succinato

y un tercer promotor activo sólo en células crecidas en bifenilo (Erickson y Mondello, 1992). Como se muestra en la Tabla 14, las cepas recombinantes son capaces de utilizar, además de bifenilo, diversos CBs como única fuente de carbono y energía. El potencial de estos sustratos para actuar como inductores de la expresión de los genes *bph* en las cepas recombinantes debe ser motivo de mayor estudio.

3.2.4. Crecimiento en CBs

Se estudia la capacidad de las cepas recombinantes de crecer en medios mínimos líquidos utilizando como única fuente de carbono y energía un determinado CB. Se analiza el crecimiento en diferentes CBs. La selección de los CBs estuvo basada en los resultados obtenidos en el análisis de las capacidades catabólicas de la vía codificada en el locus *bph*. Se seleccionaron aquellos mono y diCBs que eran degradados a CBAs por la vía superior de bifenilo codificada en el locus *bph* de LB400. Para acotar el estudio, de las 5 cepas recombinantes se eligieron sólo las cepas C11, C12 y C13. El crecimiento de estas tres cepas recombinantes en CBs se determinó por aumento de la absorbancia a 525 y a 600 nm. Adicionalmente, se determinó el aumento en unidades formadoras de colonias de la cepa C12 en 4-, 2,5-, y 2,4'-CB. Experimentos controles mostraron que la cepa silvestre P111 es incapaz de crecer en bifenilo o en monoCBs.

Las tres cepas recombinantes analizadas mostraron un crecimiento similar entre sí en las diferentes fuentes de carbono (Tabla 14). El análisis del crecimiento en monoCBs permitió determinar que estas cepas son capaces de crecer en 2-, 3-, y 4-CB como única fuente de carbono y energía. El crecimiento de las diferentes cepas en una placa utilizando 2-CB como única fuente de carbono se ilustra en la figura 20. Además, en esta placa se detectaron los halos de la degradación del PCB. Al analizar el crecimiento de las cepas en diCBs clorados en un anillo, se observó un crecimiento en medios mínimos suplementados con 2,3-, 2,4-, 2,5-, o 3,4-CB como única fuente de carbono y energía.

Tabla 14. Crecimiento de las cepas C11, C12 y C13 en CBs

| Cepa | Crecimiento en los siguientes sustratos ^a | | | | | | | | | | | | | |
|------|--|------|------|------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | B | 2-CB | 3-CB | 4-CB | 2,3-CB | 2,4-CB | 2,5-CB | 3,4-CB | 3,5-CB | 2,2'-CB | 2,3'-CB | 2,4'-CB | 3,3'-CB | 3,4'-CB |
| C11 | +++ | ++ | ++ | ++ | +++ | ++ | + | ++ | - | + | + | ++ | - | - |
| C12 | +++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | - | ++ | + | ++ | - | - |
| C13 | +++ | ++ | ++ | ++ | + | ++ | + | ++ | - | + | + | ++ | - | - |
| P111 | - | - | - | - | NE | NE | NE | NE | NE | NE | NE | NE | NE | NE |

^aEl crecimiento se determinó después de 5, 15, 30 y 55 días de incubación a 30°C. Símbolos: +++: gran crecimiento ($A_{525} > 0,7$); ++: moderado crecimiento ($A_{525} 0,2-0,7$); +: leve crecimiento ($A_{525} 0,1-0,2$); -: sin crecimiento ($A_{525} 0,0$); NE, no estudiado.

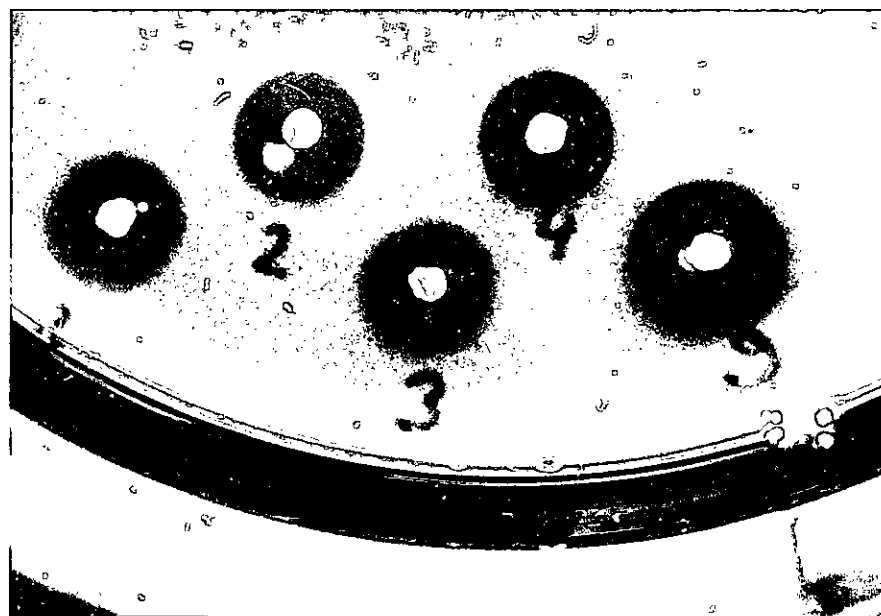


Figura 20. Crecimiento en 2-CB de las cepas C11, C12, C13, C14 y C19. Los números 1, 2, 3, 4 y 9 representan a las cepas C11, C12, C13, C14 y C19, respectivamente. Alrededor de cada colonia se observa una halo de degradación de 2-CB.

Es interesante hacer notar que con los congéneres diclorados 2,3-, 2,4- y 2,5-CB se observó el crecimiento principalmente en la interfase líquido/aire. De los diCBs clorados en sólo un anillo, no se observó crecimiento de las cepas recombinantes solamente en 3,5-

CB. Finalmente, se estudió el crecimiento de las cepas recombinantes C11, C12 y C13 en diCBs clorados en ambos anillos, determinándose crecimiento de las cepas en medio mínimos con 2,2'-, 2,3'- o 2,4'-CB. Los compuestos 3,3'- y 3,4'-CB, congéneres que sufren oxidación *orto/meta* y *meta/para*, no permitieron el crecimiento de estas cepas. El seguimiento del crecimiento bacteriano por recuento en placas de las unidades formadoras de colonias reflejó el crecimiento de la cepa C12 en medios mínimos suplementados con 4-CB, 2,4-CB o 2,5-CB como fuente de carbono (figura 21). En estas condiciones, esta cepa es capaz de incrementar el número de unidades formadoras de colonias —en los tres medios de cultivo— en más de 10 veces (figura 21).

En resumen, los resultados de los estudios de crecimiento mostraron que estas cepas bacterianas son capaces de crecer en todos los mono y en diversos diCBs como única fuente de carbono y energía.

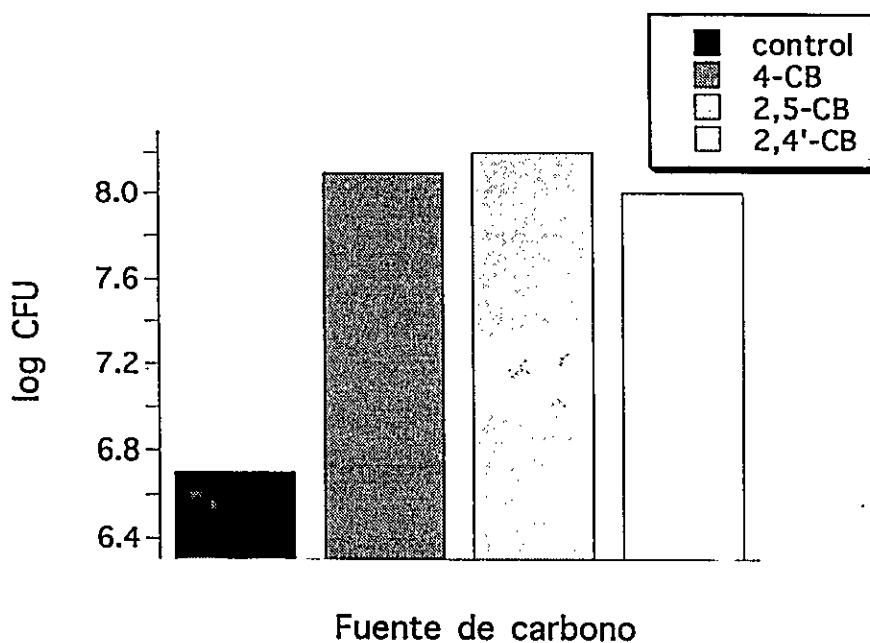


Figura 21. Crecimiento de la cepa C12 en PCBs. Como control se utilizó un medio sin fuente de carbono (-C). El crecimiento fue determinado mediante recuento de las unidades formadoras de colonias.

3.3. RESPUESTA MOLECULAR GLOBAL DE BACTERIAS FRENTE A LOS PCBs

Frente a cambios ambientales y a la presencia de algunos compuestos químicos, las bacterias manifiestan un reordenamiento global de su expresión génica. La respuesta molecular global de bacterias frente a la exposición de algunos compuestos orgánicos clorados, como el 2-clorofenol, el pentaclorofenol y el hexaclorobenceno (Blom *et al.*, 1992; Faber *et al.*, 1993; Lupi *et al.*, 1995) ha sido ya descrita. La respuesta molecular global de bacterias frente a CBs no se ha descrito. En esta parte de la tesis se evaluó la respuesta de dos cepas bacterianas frente a CBs. Para este estudio se seleccionaron la cepa recombinante C11, una cepa bacteriana degradadora de CBs, y su cepa parental P111, una cepa no degradadora de CBs.

Se analizó, mediante electroforesis 2D, la síntesis de proteínas totales de las cepas C11 y P111 expuestas a bifenilo, 2- o 4-CB. Células en la fase exponencial de crecimiento se preexpusieron a 2-CB, 4-CB o bifenilo por 30 o 90 min y se marcaron con una mezcla de [³⁵S]metionina y [³⁵S]cisteína en presencia de estos bifenilos. Para la marcación de células controles se procedió de manera similar, pero la incubación se realizó en ausencia de bifenilo y CB. La velocidad de la síntesis de proteínas fue afectada por la exposición a bifenilos, pues la incorporación de [³⁵S]metionina y [³⁵S]cisteína fue menor para estos cultivos respecto a los controles (datos no mostrados). Las proteínas radiactivas se separaron por electroforesis 2D en geles de poliacrilamida (O'Farrell *et al.*, 1977; Seeger y Jerez, 1992, 1993a). Los niveles relativos de proteínas individuales en cada gel 2D se cuantificaron mediante un programa computacional para el procesamiento de imágenes.

3.3.1. Respuesta molecular global de la cepa C11 frente a 2-CB

Los cambios en la síntesis de proteínas totales de la cepa C11 en respuesta a la exposición de 2-CB se identificaron por comparación de los patrones de geles 2D de

cultivos expuestos a 2-CB y sus controles. Al comparar los patrones de síntesis de proteínas a los 30 y a los 90 min de exposición a 2-CB con sus controles, pudo determinarse que hubo mayor cantidad de cambios en los primeros 30 min de exposición. Los cambios observados en el patrón de síntesis de proteínas fueron temporales y la mayoría de los polipéptidos se indujeron o reprimieron sólo transitoriamente.

La figura 22 muestra el patrón de síntesis de las proteínas de la cepa C11 incubadas por 30 min en ausencia (A) o presencia (B) de 2-CB, analizadas por electroforesis 2D y reveladas por autorradiografía. Frente a 2-CB la cepa C11 indujo fuertemente varias proteínas (véanse en la figura las manchas encerradas por círculos; por ejemplo, los polipéptidos 1 y 5). Algunas de las proteínas inducidas por C11 frente a la exposición a 2-CB pueden corresponder a las enzimas codificadas en el locus *bph* de LB400 que está inserto en su genoma. Aparentemente, otros polipéptidos sólo son sintetizados frente a 2-CB (por ejemplo, manchas 7 y 13). Simultáneamente, se reprime la síntesis de diversas proteínas (véase las manchas encerradas por cuadrados; por ejemplo, las proteínas 3, 12 y 18). Los resultados sugieren que la represión de la síntesis de ciertas proteínas es tan frecuente como la inducción. La mayoría de las proteínas conservaron su nivel de síntesis en presencia del compuesto 2-CB.

3.3.2. Efecto de la exposición a bifenilo, 2-CB o 4-CB sobre el nivel de la proteína GroEL de la cepa C11

La GroEL, una de las proteínas más conservadas en la naturaleza, protege a las células de agentes injuriantes, debido a que impide la agregación de polipéptidos dañados y participa en su replegamiento al estado nativo (Ellis y Hemmingsen, 1989; Craig *et al.*, 1993; Hartl *et al.*, 1994). Además, esta chaperona molecular cumple un rol fundamental en el plegamiento y el ensamblaje de proteínas en condiciones normales (Bochkareva *et al.*, 1988; LaRossa *et al.*, 1991). La GroEL es una proteína de 60 kDa inducida por

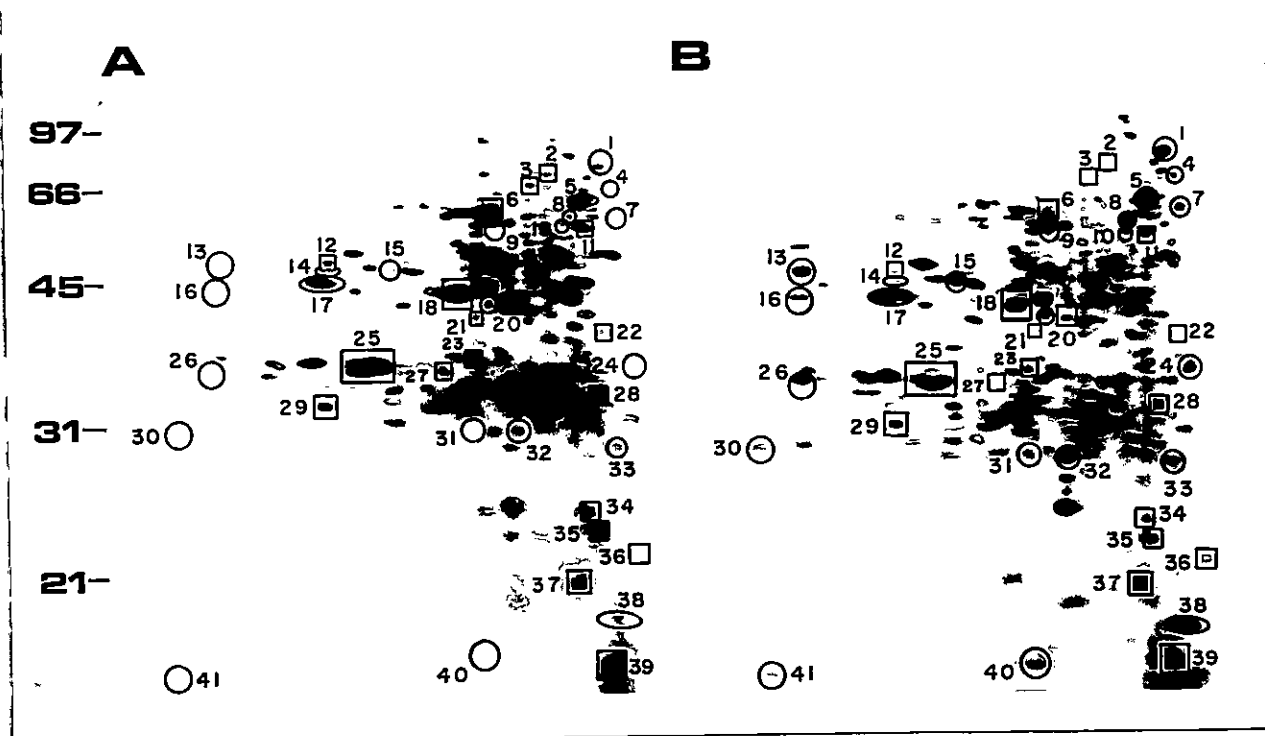


Figura 22. Análisis de las proteínas totales sintetizadas por la cepa C11 expuesta a 2-CB por electroforesis 2D de alta resolución. Las proteínas totales de la cepa C11 incubada en ausencia (A) o presencia (B) de 2-CB se marcaron con $[^{35}\text{S}]$ metionina y $[^{35}\text{S}]$ cisteína, se separaron por electroforesis bidimensional (pH 3 a 10) y fueron revelados por autorradiografía. El extremo ácido de cada gel está a la derecha. Los números en el lado izquierdo del gel indican los marcadores de masa molecular expresados en kilodaltons. Las principales proteínas que cambian su síntesis frente a 2-CB se señalan por círculos (inducidas) y cuadrados (reprimidas). Los números de las manchas en los gels se asignaron según lo descrito en el texto.

diferentes condiciones de estrés, entre ellas el estrés térmico y la hambruna de nutrientes (Gottesman, 1984; Matin, 1991). Una fracción de esta proteína está fosforilada (Craig *et al.*, 1993; Seeger *et al.*, 1996a).

Con el objeto de determinar si la respuesta de la cepa C11 frente a 2-CB es una respuesta de tipo estrés, se procedió a identificar una proteína indicadora de estrés en esta cepa, en particular, la chaperona molecular GroEL. Para ello se utilizó la técnica de inmunoelectrotransferencia. Las manchas de proteínas de masa molecular aproximada a 60 kDa se extrajeron desde gels 2D secos y se sometieron a una nueva electroforesis en

gradiente de poliacrilamida-SDS. Posteriormente fueron sometidas a inmunoelectrotransferencia con antisuero anti GroEL de *T. ferrooxidans* para ser revelados por una reacción colorimétrica. La reacción positiva de esta proteína con el antisuero correspondiente se puede observar en la figura 23. Las dos bandas que dan reacción positiva representan, probablemente, las formas fosforilada y desfosforilada de la GroEL, de la misma forma descrita en otras bacterias (Seeger *et al.*, 1996a). Esta identificación de la GroEL permitió su localización en geles 2D. Esta localización proporciona una herramienta muy importante para el estudio de la GroEL de *P. putida* C11 frente a CBs en particular y frente a otros estímulos en general. Así, se pudo establecer que la GroEL de *P. putida* corresponde a la anteriormente denominada proteína 5, una de las proteínas inducidas frente a la exposición a 2-CB (véase la figura 22). Por consiguiente, se postula que la respuesta molecular de la cepa C11 frente a 2-CB sería una respuesta de tipo estrés.

Para estudiar el efecto de la exposición a bifenilo o 4-CB sobre los niveles de la GroEL en la cepa C11, se analizaron los niveles de síntesis de esta proteína por electroforesis 2D. En la figura 24 se observan los niveles de las proteínas 5 y 1 en condiciones de exposición por 30 min a bifenilo, 2-CB o 4-CB. La síntesis de ambas proteínas está fuertemente inducida por la presencia de estos compuestos. La mayor inducción de ambos polipéptidos se observó frente a 2-CB. La proteína 5 corresponde a la GroEL, como se ha descrito más arriba. Es probable que la proteína 1 corresponda a la proteína DnaK, debido a su masa molecular, punto isoeléctrico y cantidad relativa, que son similares a la de la DnaK de bacterias filogenéticamente cercanas, como *E. coli* (Matin, 1991) y *T. ferrooxidans* (Seeger y Jerez, 1992; Varela y Jerez, 1992). Basados en la inducción de la GroEL y de una proteína que probablemente corresponde a la DnaK, se postuló que la respuesta de la cepa C11 frente a la exposición a bifenilo, 2- o 4-CB constituiría una respuesta de tipo estrés.

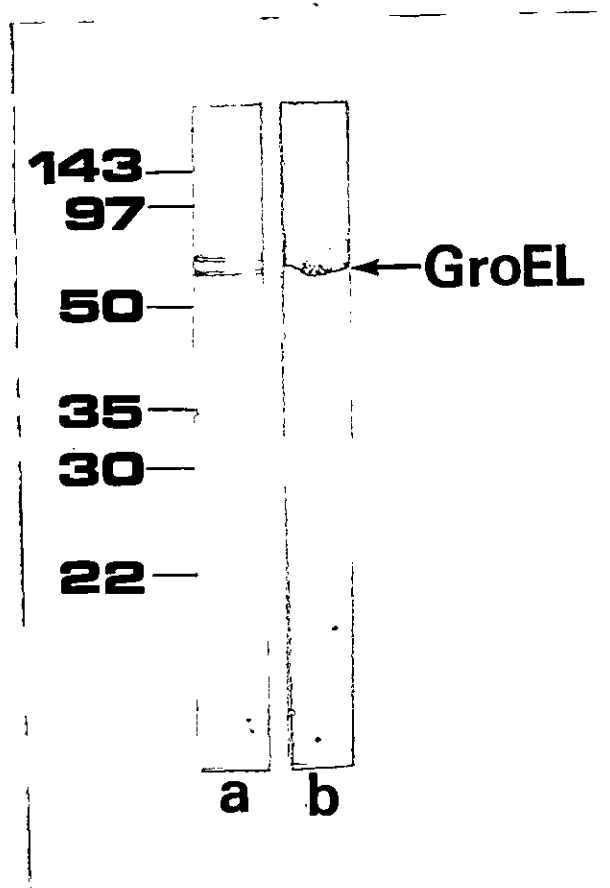


Figura 23. Identificación de la proteína GroEL de la cepa C11. Las proteínas totales (a) y la mancha de aproximadamente 60 kDa (b) —indicada como mancha 5 en el gel 2D de la figura 22— se separaron por una electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS y fueron sometidas a una inmunoelectrotransferencia con antisuero anti GroEL de *T. ferrooxidans*. La reacción antígeno-anticuerpo se detectó por revelado colorimétrico. La flecha indica las bandas de la GroEL. Los números corresponden a los marcadores de masa molecular expresados en kilodaltons.

3.3.3. Respuesta molecular global de la cepa P111 frente a 2-CB

Se estudió la respuesta molecular global frente a CBs de la cepa parental P111, una bacteria incapaz de metabolizar los CBs. Los cambios temporales en la velocidad de síntesis de las proteínas celulares individuales se identificaron por la comparación de los patrones de geles 2D de cultivos expuestos a 2-CB y sus controles. Al comparar los patrones de síntesis de las proteínas de la cepa P111 frente a 2-CB por 30 o 90 min con sus respectivos controles, fue posible determinar una mayor cantidad de cambios en la síntesis de polipéptidos en los primeros 30 min de exposición. La mayoría de estos

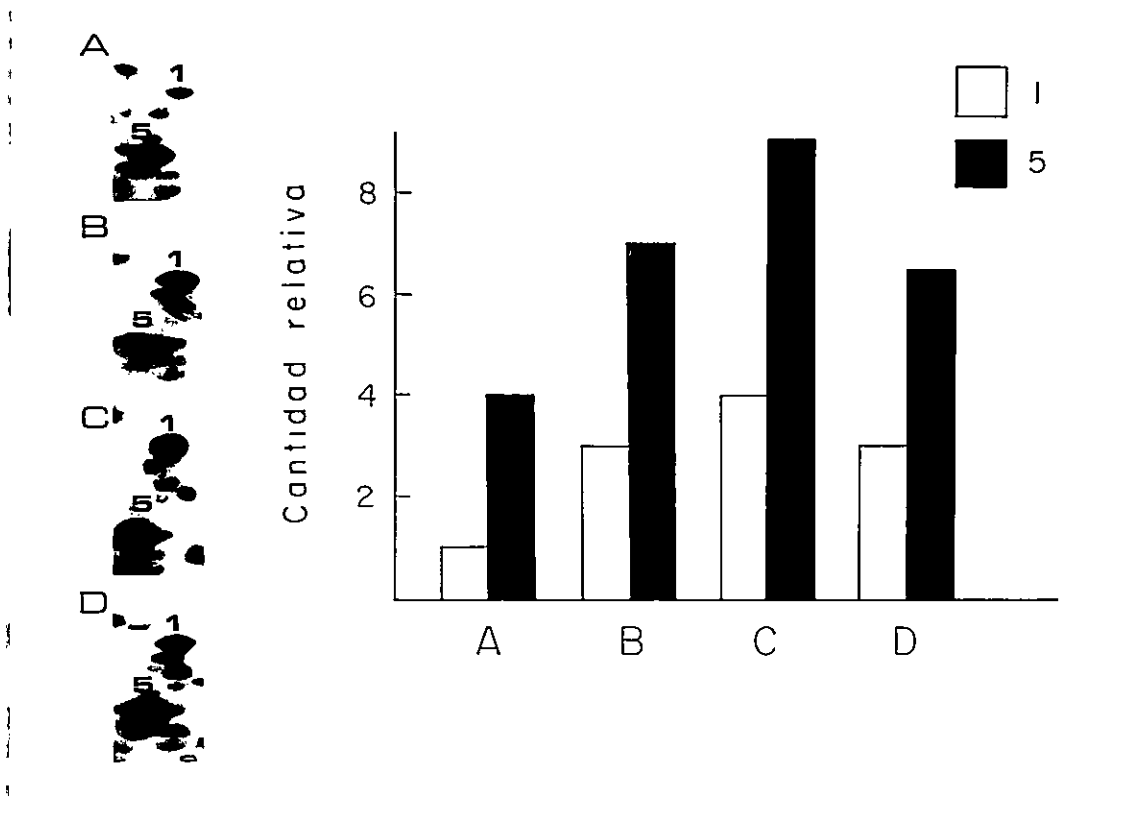


Figura 24. Efecto de la exposición a 2-CB, 4-CB o bifenilo sobre la síntesis de la proteína 5 (GroEL) y de la proteína 1 en la cepa C11. A la izquierda se muestran porciones de los gels 2D en los que se aprecia la síntesis de las proteínas de células en condiciones controles (A), frente a bifenilo (B), 2-CB (C) o 4-CB (D). A la derecha se muestran los niveles de estas proteínas, cuantificadas mediante un programa computacional.

cambios fueron transitorios.

La figura 25 muestra el patrón de síntesis de las proteínas de la cepa P111 incubadas por 30 min en ausencia (A) o presencia (B) de 2-CB, analizadas por electroforesis 2D y reveladas por autorradiografía. Frente a la exposición a 2-CB, la cepa P111 indujo la síntesis de varios polipéptidos (véanse las proteínas encerradas por círculos; por ejemplo, las manchas 4 y 24). Algunas proteínas se sintetizaron sólo frente a 2-CB (por ejemplo las manchas, 13 y 15). Diversas proteínas se reprimieron (véanse los polipéptidos encerrados por cuadrados; por ejemplo, las proteínas 1 y 27). La mayoría de las proteínas de la cepa P111 conservaron su nivel en presencia de 2-CB, entre ellas la

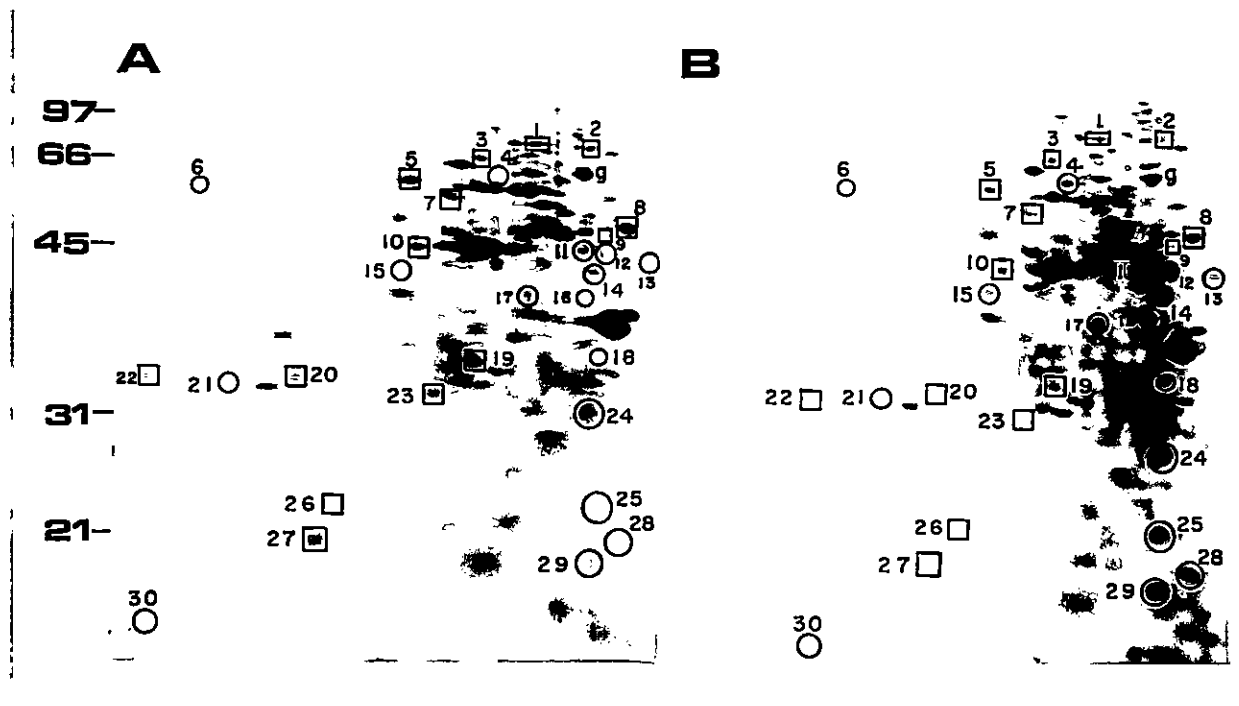


Figura 25. Análisis de las proteínas sintetizadas por la cepa silvestre P111 expuesta a 2-CB por electroforesis 2D de alta resolución. Las proteínas totales de la cepa P111 incubada en ausencia (A) o presencia (B) de 2-CB se marcaron con [³⁵S]metionina y [³⁵S]cisteína, se separaron por electroforesis bidimensional (pH 3 a 10) y fueron reveladas por autorradiografía. El extremo ácido de cada gel está a la derecha. Los números en el lado izquierdo del gel indican los marcadores de masa molecular expresado en kilodaltons. Las principales proteínas que cambian su síntesis frente a 2-CB se señalan por círculos (inducidas) y por cuadrados (reprimidas). Los números de las manchas en los gels se asignaron según lo descrito en el texto.

proteína GroEL (mancha g). En este estudio preliminar no se identificó ninguna de las proteínas de la cepa P111 inducidas frente a 2-CB, tarea que deberá ser abordada en estudios posteriores.

En este estudio preliminar no se procedió a identificar a ninguna de las proteínas inducidas frente a la exposición a 2-CB de la cepa P111. Por lo tanto, no se pudo determinar si la exposición a 2-CB representa una situación de estrés para la cepa P111. Estudios futuros deberán caracterizar e identificar los polipéptidos cuya síntesis es inducida o reprimida frente a la exposición a 2-CB.

4. DISCUSIÓN

4.1. CAPACIDADES CATABÓLICAS DE LA VÍA SUPERIOR CODIFICADA EN EL LOCUS *bph* DE *Pseudomonas* sp. LB400

Esta parte de la tesis se dedica a dilucidar las capacidades metabólicas de la vía catabólica superior de bifenilo codificada en el locus *bph* de *Pseudomonas* sp. LB400. El clonamiento de los genes *bph* codificantes de las enzimas de la vía superior de bifenilo de la cepa LB400 permitió realizar, por primera vez, un extenso análisis bioquímico de una vía catabólica de PCBs (Seeger *et al.*, 1995a, Seeger *et al.*, 1995b; Pieper *et al.*, 1995; Hofer *et al.*, 1996; Seeger *et al.*, 1996b; Seeger, M. Timmis, K. N. y Hofer, B., resultados no publicados). Para este análisis, los genes *bph* codificantes de una parte o de toda esta vía catabólica fueron expresados en un huésped incapaz de metabolizar bifenilos y sus productos, lo cual permitió la caracterización *in vivo* de actividades enzimáticas individuales, la identificación de diversos metabolitos producidos y la determinación de las etapas limitantes de la degradación de diferentes congéneres de PCBs. En un primer acercamiento de este estudio se analizó la formación de HOPDAs y de CBAs desde bifenilos mono a pentaclorados. Los resultados obtenidos en esta etapa proporcionaron importantes informaciones sobre la localización del ataque inicial de oxidación en muchos CBs. Se pudo establecer, asimismo, una correlación entre el patrón de sustitución de cloro y la degradabilidad de los congéneres de CBs por la vía codificada en el locus *bph* de LB400. La BDO codificada en *bphA* de la cepa LB400 es capaz de hidroxilar tanto los carbonos *orto* y *meta* como los carbonos *meta* y *para*. Dado el repertorio de enzimas codificadas en los genes *bph* clonados, la cepa recombinante solamente puede producir benzoato si la oxidación inicial está dirigida a posiciones *orto* y *meta*. Por consiguiente, el

porcentaje de benzoato formado proporcionó el valor mínimo de oxidación *orto/meta* por la BDO. Por lo tanto, todos los monoCBs, al menos 8 de 12 diCBs y un triCB, se oxidaron prácticamente en forma exclusiva en posiciones *orto/meta*. La degradación parcial a CBAs de diversos CBs permitió determinar la existencia en estos compuestos de una oxidación en posiciones *orto/meta*, sin que en esta fase del estudio pudiera descartarse una oxidación adicional en las posiciones *meta/para*. Esta interrogante fue dilucidada posteriormente.

Cuando los CBAs se obtuvieron en forma cuantitativa desde congéneres asimétricos, su porcentaje de formación reflejó la razón de oxidación de los dos anillos por la BDO. La formación aproximadamente cuantitativa de un solo CBA desde congéneres asimétricos reflejó una fuerte preferencia de la enzima por uno de los dos anillos aromáticos. Los tipos de benzoatos producidos indicaron que la reactividad de los anillos de los bifenilos frente a la oxidación por la BDO disminuyó en el siguiente orden: no *orto*- > *meta*-sustituido. Asimismo, la formación exclusiva de 4-CBA desde 3,4'-diCB sugirió que el anillo *meta*-clorado es más fácilmente oxidado que el anillo *para* clorado. Esto es consistente con la observación que la formación de HOPDA es menor desde 4,4'-diCB que desde 3,3'-diCB. Para los congéneres mono y diclorados los porcentajes de benzoato formado correlacionan con el patrón de sustitución de cloro del anillo metabolizado. A partir de congéneres oxidados en el anillo no clorado u *orto*- clorado se obtuvieron benzoatos en cantidades virtualmente cuantitativas. Los CBs atacados en el anillo *meta* clorado se convirtieron sólo parcialmente a CBAs. Cuando se oxidó el anillo *para* clorado no se observó la formación de CBAs. Esto sugiere que el patrón del anillo metabolizado disminuye la eficiencia de degradación a través de la vía superior en el orden no \approx *orto*- > *meta*- > *para*-clorado. Los congéneres con mayor cloración analizados dieron resultados similares. Solamente congéneres que contienen anillos no o mono *orto*-clorados fueron convertidos a CBAs. Congéneres con un anillo doblemente clorado en

orto no se degradaron a CBAs ni a HOPDAs. La influencia del patrón de sustitución de cloro en el anillo atacado sobre la formación de benzoato se parece a su influencia sobre la reactividad de la oxidación catalizada por BDO. Esto sugiere que la velocidad de formación de CBA podría estar frecuentemente determinada por la velocidad del ataque inicial de la BDO.

Las dioxigenasas iniciales cumplen un rol crucial en la degradación bacteriana de compuestos aromáticos clorados (Mason y Cammack, 1992; Harayama *et al.*, 1992). Muchos congéneres de PCBs son refractarios a la degradación aerobia, debido a la incapacidad de la BDO de aceptarlos como sustratos. Por lo tanto, es fundamental caracterizar los mecanismos utilizados y el rango de sustratos de estas enzimas. Para clarificar los mecanismos utilizados por la BDO codificada en el locus *bph* de LB400 en la degradación de los PCBs se identificaron los productos formados *in vivo* por la BDO desde una serie de congéneres. El anillo *orto*-monoclorado de un CB es fácilmente atacado por la BDO codificada en el locus *bph* de *Pseudomonas* sp. LB400, a menos que el segundo anillo no esté sustituido. Cuando la BDO ataca un anillo mono *orto*-clorado, la reacción principal puede ser una oxidación que cataliza la eliminación de ácido clorhídrico y la concomitante formación de DB. Se observó que la hidroxilación de un anillo clorado no llevó necesariamente a una deshalogenación. Esto sugiere que la oxidación de "deshalogenación" debe ocurrir en una posición vecina espacialmente muy cercana al cloro que será eliminado. El mecanismo más probable parece ser que los CBs sustituidos en *orto* son atacados en posiciones *orto* y *meta*, formando compuestos 2-cloro-3-hidro-2,3-dihidroxi como intermediarios inestables que rearomatizan por eliminación espontánea de ácido clorhídrico (Seeger *et al.*, 1995b). El mecanismo propuesto se ilustra en la figura 26. Una interpretación similar ha sido postulada por Bedard (1990) que describió descloración de congéneres *orto*-clorados por actividades dioxigenasas en células de *Alcaligenes eutrophus* H850 y de *Pseudomonas* sp. LB400.

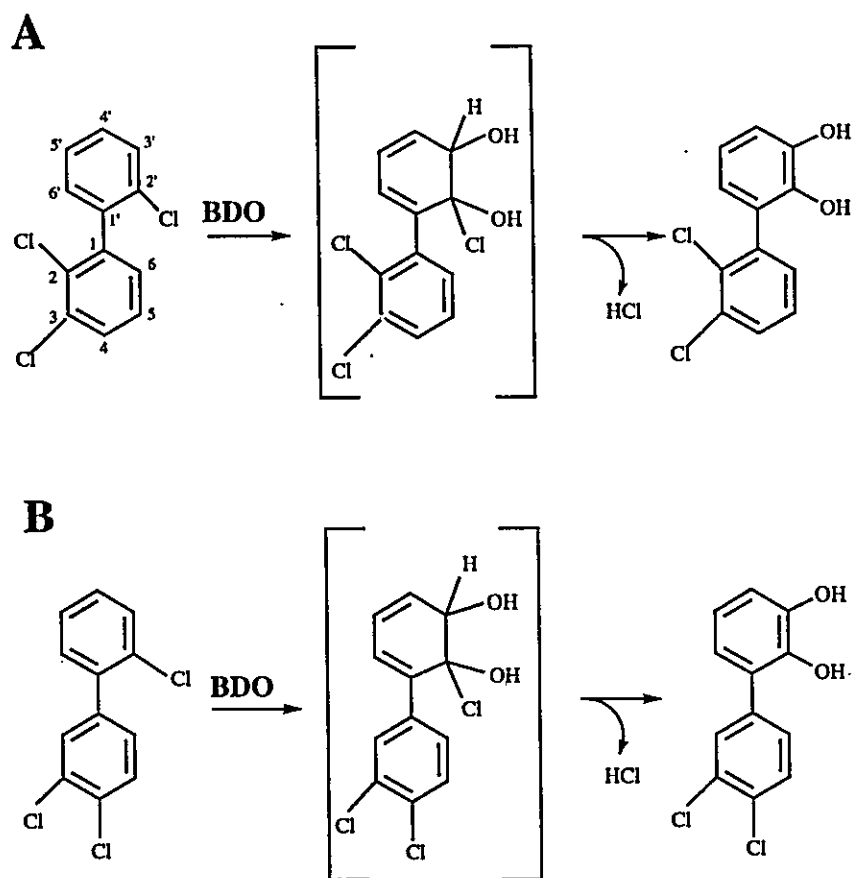


Figura 26. Oxidación de 2,3,2'- (A) y 3,4,2'-CB (B) por la bifeníl-2,3-dioxigenasa codificada en el locus *bph* de LB400. BDO: bifeníl-2,3-dioxigenasa. Los compuestos entre paréntesis representan intermediarios inestables propuestos.

Ahmad *et al.* (1991) describieron deshalogenación de CBs en la presencia de la BDO y la BDDH de *P. testosteroni* B-356. Estos autores propusieron hidroxilación en o cerca de un carbono clorado. Los resultados obtenidos en el presente estudio demostraron que la segunda explicación de estos autores no es correcta, pues la hidroxilación en *orto/meta* no provoca la eliminación de un cloro en posición *para* vecina (véase, por ejemplo, el ataque sobre los compuestos 4,4'- y 3,4'-CB). Asimismo, la dioxigenación con la concomitante formación de cateoles ha sido descrita para *orto*-halobenzoatos (Fetzner *et al.*, 1992; Romanov y Hausinger, 1994). Los autores explicaron esta observación por la oxidación

de las posiciones 1 y 2 y la espontánea pérdida de ácido clorhídrico y de dióxido de carbono. Sin embargo, la mayoría de los microorganismos que degradan compuestos aromáticos clorados no poseen sistemas de enzimas capaces de catalizar una deshalogenación inicial (Pieper *et al.*, 1995).

La *orto*-deshalogenación virtualmente cuantitativa de diversos PCBs con un anillo mono *orto*-clorado demuestra que el ataque a un par de carbonos parcialmente clorados puede estar fuertemente favorecido respecto a la hidroxilación de dos átomos no sustituidos, que están disponibles en ambos anillos de estos congéneres. El ataque preferencial de la BDO en carbonos *orto*-clorados es consistente con la preferencia degradativa de LB400 por *orto*-CBs (véase más arriba; Bedard, 1990). Con 2,3'- y 2,5,2'-CB sólo se observó una descloración parcial, observándose —además de la hidroxilación de los carbonos *orto*-clorado y *meta*— una oxidación en otro par de carbonos. Esto indica la importancia de las sustituciones en ambos anillos para la deshalogenación de *orto*-CBs en particular y para los mecanismos de oxidación de la BDO en general. La eliminación de cloro iniciada por la BDO de la cepa LB400 sólo se ha observado en la posición *orto*. La deshalogenación de *orto*-CBs complementa la descloración de PCBs por comunidades bacterianas anaerobias que remueven el cloro desde posiciones *meta* y *para* (Quensen III *et al.*, 1988, 1990; Tiedje *et al.*, 1993). La deshalogenación temprana de los xenobióticos disminuye el rango de sustratos que debe ser metabolizado por las enzimas catabólicas subsiguientes. La eliminación de un cloro y la concomitante formación de un catecol hacen que la actividad de la BDDH sea innecesaria para el catabolismo de estos CBs, y el intermediario —al tener un cloro menos— debiera ser mejor sustrato para las enzimas subsiguientes. Asimismo, el rango de compuestos que el microorganismo puede utilizar debiera expandirse. En el caso de la cepa LB400, ésta es capaz de utilizar como única fuente de carbono y energía no sólo 2- y 4-CB, sino que también 2,2'- y 2,4'-CB (Seeger, M., Timmis, K.N. y Hofer, B.,

resultados no publicados).

El análisis por GC de los derivados con TMS de el(los) metabolito(s) formado(s) desde 2,4-CB por la BDO reveló la presencia de 2 productos. En el presente estudio se demuestra que ambos productos no representan a los metabolitos de oxidación *orto/meta* y *meta/para* —como había sido propuesto por Massé *et al.* (1989) y citado ampliamente en la literatura (Haddock *et al.*, 1995)— y aquí se postula que ambos representan dos conformeros de un dihidrodiol simple.

La BDO de LB400 tiene la capacidad de oxidar CBs que contienen desde uno hasta 5 cloros por introducción de grupos hidroxilos en posiciones *orto/meta* o *meta/para*. La regioespecificidad relajada de la BDO se ilustra en la oxidación de 3,4'-CB. En este compuesto la BDO oxidó ambos anillos en posiciones *orto/meta* y adicionalmente se observó oxidación de las posiciones *meta/para* del anillo *meta*-clorado. Por consiguiente, la capacidad de LB400 de atacar un rango particularmente amplio de CBs puede ser atribuida a la actividad de la BDO. Las BDOs de LB400 y de *Rhodococcus globerulus* P6 (Furukawa, 1982; McKay *et al.*, 1996) exhiben diferencias dramáticas en los rangos de sustratos de PCBs oxidados. La combinación de ambas BDOs debiera expandir la extensión de la degradación de los PCBs. Experimentos realizados con células en reposo indicaron que la utilización simultánea de las BDOs de las cepas LB400 y P6 mantiene las respectivas buenas degradaciones de congéneres *orto*-clorados y *para*-clorados, incrementando de esta manera notablemente la extensión de la degradación de PCBs (Seeger, M., McKay, D., Timmis, K. N. y Hofer, B., resultados no publicados).

El presente estudio de las capacidades metabólicas proporciona una visión global sobre la degradación de PCBs por las enzimas codificadas en el locus *bph* de *Pseudomonas* sp. LB400. La identificación de los metabolitos de punto final indica que —dependiendo del congéneres— diferentes reacciones de esta ruta metabólica limitan la degradación de los PCBs. Por lo tanto —y dependiendo del congéneres de PCB—

diferentes enzimas de la vía catabólica son incapaces de aceptar ciertos patrones de sustitución de los intermediarios. Evidentemente, las posiciones de los átomos de cloro afectan críticamente la interacción entre las enzimas y las moléculas de sustrato. Los efectos de los sustituyentes podrían producir impedimentos estéricos, influencia en las densidades electrónicas alteradas sobre la velocidad de reacción y/o inhibiciones reversibles o irreversibles de la catálisis. Todos los monoCBs y casi todos los diCBs —exceptuando 2,6- y 4,4-CB— fueron catabolizados a CBAs. En la mayoría de estos casos, estos PCBs se metabolizaron en cantidades estequiométricas a CBAs. Mientras 2,6-CB fue oxidado sólo débilmente por la BDO, el compuesto 4,4'-CB fue transformado hasta HOPDA. De los 14 triCBs analizados sólo 7 se convirtieron a CBAs, 3 se transformaron solamente en HOPDAs y 2 sufrieron al menos la oxidación por la BDO. De los PCBs con mayor cloración analizados, el congénere 2,3,4,5,2'-CB fue catabolizado en CBA mientras que 2,5,2',5'-CB sufrió solamente oxidación por la BDO. Muchos de los CBs parcialmente metabolizados fueron oxidados a más de un producto por la BDO. Todos los CBs clorados en ambos anillos y que poseen un anillo mono *meta* clorado o un anillo clorado en posiciones 2 y 5 fueron oxidados al menos a dos productos observándose, en la mayoría de estos casos, una oxidación adicional en posiciones *meta/para*. La oxidación en posiciones *meta/para* no es productiva para la degradación de los PCBs, porque los productos de oxidación son metabolitos de punto final. 3,4-DB no es sustrato para la DBDO (Eltis *et al.*, 1993). Asimismo, los metabolitos hidroxilados son más tóxicos que los CBs de los que derivan (Sondossi *et al.*, 1991). Por lo tanto, la oxidación *meta/para* desvía estos CBs de la ruta de degradación aerobia de estos compuestos y los transforma en metabolitos problema.

Existe poca información en la literatura sobre los metabolitos de CBs producidos por la cepa parental *Pseudomonas* sp. LB400. La comparación de estos escasos datos (Nadim *et al.*, 1987; Bedard y Haberl, 1990) con los resultados obtenidos en este trabajo

con la cepa de *E. coli* que expresa *bphABCD* de LB400 muestran similitud. En ambos casos se detectó 4-CBA como metabolito de 2,4'-CB. Asimismo, se detectó 3-CBA en forma exclusiva (en el presente estudio) o predominante (Bedard y Haberl, 1990) como metabolito de 2,3'-diCB. Además, estos autores describieron la formación de 2-cloroacetofenona y 2-CBA como metabolitos minoritarios de 2,3'-CB. En ambos estudios 2,3,3'- y 2,4,4'-triCB fueron oxidados en forma preferente en el anillo mono o diclorado, respectivamente. Sin embargo, Bedard y Haberl describieron —desde estos dos congéneres— la formación de 2,3-diCBA y 2',3'-cloroacetofenona o 4-CBA, respectivamente, mientras en este estudio sólo se detectaron HOPDAs. En el presente estudio no se detectó la formación de cloroacetofenona desde CBs. El origen de las cloroacetofenonas descritas por Bedard y Haberl aún no ha sido dilucidado. La formación de los CBAs desde 2,3,3'- y 2,4,4'-triCB podría deberse a una HOPDAH adicional existente en la cepa LB400. Al respecto, en una cepa recombinante que contenía sólo los genes *bphABC* de *Pseudomonas testosteroni* se detectó la conversión de 4-CB en 4-CBA, cuya última etapa probablemente fue catalizada por una hidrolasa inespecífica del huésped (Ahmad *et al.*, 1990). Una explicación alternativa estaría en la existencia de una razón mayor de HOPDAH respecto al sustrato en los experimentos de estos autores. Tanto la cepa de *E. coli* recombinante como la cepa LB400 fueron incapaces de convertir 2,5,3'-triCB en HOPDA, identificándose metabolitos de BDs. El congénere 2,5,2',5'-CB sufrió oxidación por ambas cepas en posiciones *meta/para* a 3,4-dihidrodiol y a *bis*-3,4-dihidrodiol. La similitud entre los datos obtenidos con los genes *bph* clonados y la cepa parental es consistente con la visión que los genes *bph* aislados de LB400 dan cuenta de las capacidades catabólicas de la cepa LB400 para la conversión de CBs a CBAs. Asimismo, sugiere que las permeabilidades de *E. coli* y de *P. sp.* LB400 a los CBs serían similares.

El análisis funcional de vías degradativas de PCBs complementado con el análisis

estructural de las enzimas involucradas permitirá la ingeniería de enzimas específicas y el diseño de cepas bacterianas con capacidades mejoradas en la biorremediación.

4.2. CONSTRUCCIÓN DE NUEVAS CEPAS DEGRADADORAS DE PCBs

Para superar los problemas de la acumulación y de la liberación de CBAs de las cepas degradadoras de PCBs actualmente disponibles se generaron nuevas cepas degradadoras de CBs. Estas cepas degradadoras de CBs fueron construidas mediante la inserción del locus *bph* de *Pseudomonas* sp. LB400 en *P. putida* P111, una cepa degradadora de un amplio rango de CBAs (Hernández *et al.*, 1991). Las capacidades catabólicas de la vía superior de bifenilo codificado en el locus *bph* de LB400 ya se caracterizaron extensamente en la primera parte de esta tesis. Para la transferencia de las capacidades catabólicas de PCBs se utilizaron tres diferentes loci *bph* de LB400. De las cepas analizadas, solamente las cepas C11, C12, C13, C14 y C19, transconjugantes con el cassette *bph-1*, pudieron crecer en 2-CB y mantener en condiciones no selectivas los genes *bph*. Estas cepas contienen el locus *bph* en forma más estable en condiciones no selectivas que otras cepas de *Pseudomonas putida* degradadoras de PCBs generadas por ingeniería genética (de Lorenzo y Timmis, 1992; Dowling *et al.*, 1993). No se observó pérdida del fenotipo Bph+ de estas cepas en ausencia de selección, aún después de más de 100 generaciones en medio LB. Esto indica que en estas cepas no existe una selección fuerte para la eliminación del locus *bph* en condiciones no selectivas.

La expresión del locus *bph* introducido se investigó mediante la determinación de la actividad de DBDO en células crecidas en diferentes fuentes de carbono. Los resultados indican que en succinato existe una expresión basal de los genes *bph*. Sin embargo, al crecer las cepas recombinantes en bifenilo se observa una fuerte inducción de la expresión de los genes *bph*. Estos resultados sugieren que el bifenilo actúa como inductor del locus *bph* en las nuevas cepas recombinantes, al igual como se ha observado en la cepa LB400.

A pesar que el locus *bph* contenido en el cassette *bph-1* contenía un promotor inducible por bifenilo, se desconoce si la(s) proteína(s) regulatoria(s) requerida(s) son proporcionadas por la cepa receptora o si el marco de lectura abierto que precede *bphA1* puede jugar algún rol en la regulación de la expresión. Este marco de lectura abierto codifica una secuencia de aminoácidos que muestra alguna similitud con reguladores transcripcionales (Hofer *et al.*, 1996).

Las nuevas capacidades catabólicas de las cepas recombinantes se evaluaron analizando el crecimiento en medios mínimos mediante el uso de diferentes congéneres de PCBs como única fuente de carbono y energía. El crecimiento en un determinado PCB indica que la cepa bacteriana es capaz de vivir a expensas de la degradación de este congénere y, por consiguiente, es además resistente a su exposición. Las cepas recombinantes C11, C12 y C13 son las primeras cepas bacterianas descritas capaces de utilizar un rango tan amplio de CBs como única fuente de carbono y energía. Estas cepas pudieron crecer en todos los monoCBs. Crecieron asimismo en diversos diCBs, clorados tanto en un anillo como en ambos anillos. A pesar de que diversas bacterias pueden crecer en bifenilo (Furukawa *et al.*, 1989; Furukawa, 1994), se han descrito pocas cepas capaces de utilizar los CBs como fuente de carbono. Por conjugación se construyeron algunas cepas bacterianas capaces de crecer en mono y diCBs clorados en un anillo (Mokross *et al.*, 1990; Havel y Reinecke, 1991; Adams *et al.*, 1992; Hickey *et al.*, 1992). Recientemente se ha descrito una cepa con la capacidad de utilizar un diCB clorado en ambos anillos como única fuente de carbono y energía (McCullar *et al.*, 1994).

Este estudio demuestra que la vía codificada por el locus *bph* de LB400 se puede intergrar en forma estable, inducible y funcional en una cepa degradadora de CBAs. En estudios posteriores se deberá realizar un análisis genético de las nuevas cepas, lo cual permitirá determinar en que lugar se insertó el locus *bph* en cada cepa y diferenciar genéticamente las cinco cepas recombinantes. Asimismo, los estudios futuros deberán

incluir investigaciones detalladas del catabolismo de CBs y de CBAs de estas cepas recombinantes. Recientemente, se ha descrito que los CBAs pueden interferir con el flujo de sustratos a través de la vía degradativa combinada (Sondossi *et al.*, 1992; Guilbeault *et al.*, 1994). Asimismo, en estudios posteriores se deberá analizar el comportamiento de estas nuevas cepas degradadoras de CBs en microcosmos modelo, de manera de evaluar su capacidad de sobrevivencia y su eficiencia en la degradación de PCBs en presencia de la microflora nativa.

Los experimentos realizados en esta parte del estudio permitieron poner a prueba la validez de la hipótesis de trabajo. Se demostró que la incorporación del locus *bph* de LB400 en una cepa degradadora de CBAs permite generar nuevas cepas degradadora de CBs capaces de contener este locus en el genoma en forma estable, resistir a la exposición y degradar un amplio rango de CBs. El estudio más acabado de la respuesta frente a la exposición a CB de estas nuevas cepas se realizó y se reseña en la siguiente parte de la tesis.

Los PCBs *orto*-clorados pertenecen a los congéneres más problemáticos en el ambiente, formados por la degradación anaerobia de PCBs altamente clorados por poblaciones microbianas mixtas (Tiedje *et al.*, 1993). El desarrollo de las cepas aerobias capaces de degradar *orto*-CBs es fundamental para los procesos de biorremediación de estos compuestos. La construcción de las cepas como C11, C12 y C13 —bacterias capaces de crecer a expensas de varios PCBs *orto*-clorados— debieran ayudar a desarrollar procesos eficientes para la biodegradación de PCBs. El diseño de microorganismos por combinación y/o modificación de diversas vías catabólicas parece ser la estrategia más promisoría para lograr una efectiva biorremediación de los contaminantes orgánicos más recalcitrantes.

4.3.- RESPUESTA MOLECULAR GLOBAL DE BACTERIAS FRENTE A LOS PCBs

Para estudiar la respuesta molecular global de bacterias frente a la exposición de PCBs se caracterizó la respuesta molecular de C11 —una cepa bacteriana recombinante degradadora de CBs— y de P111, una cepa no degradadora de CBs. Los resultados demostraron que ambas cepas sufrieron un reordenamiento global de su expresión génica frente a la exposición de CBs. Los cambios observados en el patrón de síntesis de proteínas fueron temporales y la mayoría de estas proteínas se indujeron o reprimieron sólo transitoriamente. Este efecto temporal se ha observado también en el shock térmico (Lindquist, 1988) y en la hambruna de nutrientes (Gene Groat *et al.*, 1986; Matin, 1991). Es probable que estos cambios en la síntesis reflejen una rápida adaptación para proteger a las células de influencias dañinas como la exposición a CBs.

La respuesta de la cepa C11 frente a 2-CB es una respuesta de tipo estrés, observándose una fuerte inducción de la proteína GroEL, una de las proteínas características del estrés. Adicionalmente, GroEL se induce frente a la exposición de bifenilo y frente a 4-CB. La cepa P111 respondió frente a la exposición a 2-CB con la inducción y la represión de diversas proteínas. Sin embargo, en estas condiciones la chaperona GroEL no cambió su nivel de síntesis frente a 2-CB. La no inducción de la GroEL en la cepa P111 contrasta con lo observado en la cepa C11. Como la cepa C11 es capaz de degradar estos bifenilos, no se puede descartar que metabolitos de esta degradación hayan desencadenado la respuesta de estrés. Al respecto es importante mencionar que algunos de los posibles metabolitos de la degradación de bifenilos pueden ser tóxicos para la célula (Bartels *et al.*, 1984; Sondossi *et al.*, 1991). La cepa P111 carece de la vía de degradación de bifenilo, por lo que en este experimento no se expuso a estos metabolitos. Una explicación alternativa es que en los tiempos analizados en este estudio no se haya detectado la inducción de la GroEL en la cepa P111, debido a que la respuesta

a 2-CB de la cepa P111 es temporalmente diferente a la de la cepa C11. Tampoco puede descartarse que la cepa C11 haya inducido la síntesis de la chaperona GroEL en respuesta a la inducción de la expresión de los genes *bph*, expresión que a su vez se indujo por la presencia de bifenilo o CB. En esta parte del estudio, y dado su carácter preliminar, no se procedió a identificar a ninguna de las proteínas inducidas por P111 frente a la exposición a 2-CB, por lo que no fue posible determinar si representó una situación de estrés para esta cepa.

En otras bacterias se han observado cambios en el patrón de la síntesis de proteínas como respuesta a la presencia de compuestos orgánicos clorados (Blom *et al.*, 1992; Faber *et al.*, 1993; Lupi *et al.*, 1995). En presencia de hexaclorobenceno o pentaclorofenol, *E. coli* sufrió un reordenamiento de su expresión génica, observándose varias proteínas inducidas específicamente frente a un determinado compuesto (Blom *et al.*, 1992). Frente a la exposición de monoclorofenol y pentaclorofenol en *E. coli* se observó la represión transitoria de la síntesis de la OmpF y la aspartato transcarbamilasa (Faber *et al.*, 1993). La respuesta molecular global de *P. putida* KT2442 frente a 2-clorofenol fue descrita recientemente (Lupi *et al.*, 1995). En *E. coli* se ha identificado un gran número de proteínas en geles 2D (Van Bogelen *et al.*, 1992). Entre ellas un factor sigma (σ^S), que juega un rol fundamental en el desarrollo de la resistencia al estrés (McCann *et al.*, 1991) y una proteína universal de estrés (Nyström y Neidhard, 1992). En contraste, son pocos los estudios realizados sobre la naturaleza de los patrones de proteínas 2D de *P. putida* (Kertesz *et al.*, 1993; Girskov *et al.*, 1994, Lupi *et al.*, 1995). Desafortunadamente, en estos estudios no se ha identificado ninguno de los polipéptidos inducidos o reprimidos frente a condiciones adversas. A diferencia de los trabajos citados, el presente estudio permitió identificar una proteína de estrés de la cepa *P. putida* C11. La identificación de la chaperona GroEL proporciona una herramienta muy importante para estudiar la respuesta de esta proteína frente a diferentes cambios en el ambiente. Para

poder establecer con claridad cuáles son las proteínas de estrés, los estudios futuros deberán abocarse a la identificación de las proteínas de *P. putida* en geles 2D.

Al igual que en los anteriores experimentos, los de esta sección de la tesis permiten también verificar la correspondiente parte de la hipótesis de trabajo. En particular, se demostró que las nuevas cepas degradadoras de CBs exhiben sólo una transitoria respuesta de estrés frente a los CBs. Luego de un proceso de adaptación estas cepas incluso crecieron en varios PCBs (véase más arriba), lo que demuestra que estas cepas son resistentes a la exposición de concentraciones altas de estos compuestos.

Este estudio, junto con otros (Blom *et al.*, 1992; Faber *et al.*, 1993; Lupi *et al.*, 1995), muestran que el análisis por electroforesis 2D de la síntesis de las proteínas es un método alternativo y muy sensible para determinar condiciones de estrés y para medir efectos tóxicos de contaminantes ambientales a niveles subletales. Los estudios futuros de la respuesta molecular de las cepas C11 y P111 frente a CBs deberán abordar la caracterización de las funciones de las proteínas inducidas en estas condiciones, lo cual permitirá identificar los sistemas regulatorios de estos procesos. Asimismo, la respuesta global de estas cepas frente a otros congéneres de PCBs y frente a diferentes metabolitos de la vía catabólica de PCBs deberá ser motivo de estudio.

5. CONCLUSIONES Y PROYECCIONES

5.1. CAPACIDADES CATABÓLICAS DE LA VÍA SUPERIOR CODIFICADA EN EL LOCUS *bph* DE *Pseudomonas* sp. LB400

- Esta vía metabólica cataboliza completa o parcialmente un amplio rango de PCBs a CBAs. El patrón de sustitución del anillo oxidado disminuye la eficiencia de degradación de los PCBs a través de la vía superior en el orden no \approx *orto*- > *meta*- > *para*-clorado.
- La identificación de los metabolitos de punto final indica que —dependiendo del congénere— diferentes reacciones de esta ruta metabólica limitan la degradación de los PCBs.
- La BDO es capaz de oxidar un amplio rango de congéneres y tiene una regioespecificidad relajada, oxidando CBs —que contienen desde uno hasta 5 cloros— en posiciones *orto/meta* y *meta/para*. Asimismo, el ataque por la BDO a un par de carbonos parcialmente clorados puede estar fuertemente favorecido respecto a dos carbonos no sustituidos.
- La reactividad de los anillos de los PCBs frente a la oxidación por la BDO disminuye en el siguiente orden: no > *orto*- > *meta*- > *para* -sustituido.
- Cuando la BDO ataca un anillo monoclorado en *orto*, la reacción principal o exclusiva puede ser una oxidación que cataliza la eliminación de ácido clorhídrico y la concomitante formación de dihidroxibifenilo. En estos casos la actividad de la BDDH se hace innecesaria para el catabolismo de estos CBs.
- Los derivados con TMS del metabolito formado desde 2,4-CB que eluyen por GC como 2 productos no representan productos de oxidación *orto/meta* y *meta/para* como había sido descrito. Se postula que ambos productos representan dos conformeros de un dihidrodiol.
- El análisis funcional de vías degradativas de PCBs complementado con el análisis estructural de las enzimas involucradas permitirá la ingeniería de enzimas específicas y el diseño de cepas bacterianas con capacidades mejoradas en la biorremediación.

5.2. CONSTRUCCIÓN DE NUEVAS CEPAS DEGRADADORAS DE PCBs

- Mediante la inserción del locus *bph* de la cepa LB400 —que codifica para una vía de degradación de bifenilo— en una cepa degradadora de CBAs se construyeron nuevas cepas degradadoras de CBs que contienen el locus *bph* en forma estable, aun en ausencia de condiciones selectivas.
- La expresión de los genes *bph* en las nuevas cepas es regulada y los resultados obtenidos sugieren que el bifenilo actúa como inductor de la expresión de estos genes.
- Las cepas C11, C12 y C13 son las primeras cepas bacterianas descritas capaces de utilizar un rango tan amplio de CBs como única fuente de carbono y energía. Estas cepas son capaces de crecer en todos los mono y en diversos diCBs, tanto clorados en un anillo como clorados en ambos anillos.
- En estudios posteriores se deberá analizar el comportamiento de estas nuevas cepas degradadoras de CBs en microcosmos modelo, de manera de evaluar su capacidad de sobrevivencia y su eficiencia en la degradación de PCBs en presencia de la microflora nativa.

5.3. RESPUESTA MOLECULAR GLOBAL DE BACTERIAS FRENTE A LOS PCBs

- Las cepas C11 y P111 sufrieron cambios en la expresión génica frente a la exposición a PCBs. Estos cambios fueron temporales y la mayoría de estas proteínas se indujeron o reprimieron transitoriamente.
- La respuesta de la cepa C11 frente a la exposición a 2-CB, 4-CB o bifenilo es una respuesta de tipo estrés, observándose una fuerte inducción de la chaperona GroEL.
- Este estudio, junto con otros (Blom *et al.*, 1992; Faber *et al.*, 1993; Lupi *et al.*, 1995), muestran que el análisis por electroforesis bidimensional de la síntesis de las proteínas es un método alternativo y muy sensible para determinar condiciones de estrés y efectos tóxicos de contaminantes ambientales a niveles subletales.

- Los estudios futuros de la respuesta molecular de las cepas C11 y P111 frente a CBs deberán abordar la caracterización de las funciones de las proteínas inducidas en estas condiciones, lo cual permitirá identificar los sistemas regulatorios de estos procesos.
- La respuesta global de estas cepas frente a otros congéneres de PCBs y frente a diferentes metabolitos de la vía catabólica de PCBs deberá ser motivo de estudio.

BIBLIOGRAFÍA

- Abramowicz, D. A.** 1990. Aerobic and anaerobic biodegradation of PCBs: a review. *Crit. Rev. Biotechnol.* **10**: 241-251.
- Adams, R. H., Huang, C.-M., Higson, F. K., Brenner, V. y Focht, D. D.** 1992. Construction of a 3-chlorobiphenyl-utilizing recombinant from a intergeneric mating. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 647-654.
- Adrians, P., Kohler, H.-P. E., Kohler-Staub, D. y Focht, D. D.** 1989. Bacterial dehalogenation of chlorobenzoates and co-culture biodegradation of 4,4'-chlorobiphenyl. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 887-892.
- Ahmad, D., Massé, R. y Sylvestre, M.** 1990. Cloning and expression of genes involved in 4-chlorobiphenyl transformations by *Pseudomonas testosteroni*: homology to polychlorobiphenyl-degrading genes in other bacteria. *Gene* **86**: 53-61.
- Ahmad, D., Sylvestre, M. y Sondossi, M.** 1991. Subcloning of *bph* genes from *Pseudomonas testosteroni* and *Escherichia coli*: evidence for dehalogenation during initial attack on chlorobiphenyls. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 2880-2887.
- Ahmed, M. y Focht, D. D.** 1973. Degradation of polychlorinated biphenyls by two species of *Achromobacter*. *Can. J. Microbiol.* **19**: 47-52.
- Alexander, M.** 1981. Biodegradation of chemicals of environmental concern. *Science* **211**: 132-138.
- Amaro, A. M., Chamorro, D., Seeger, M., Arredondo, R., Peirano, I. y Jerez, C. A.** 1991. Effect of external pH perturbations on *in vivo* protein synthesis by the acidophilic bacteria *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* **173**: 910-915.
- Aoki, Y., Satoh, K., Sato, K. y Suzuki, K.** 1992. Induction of glutathione *S*-transferase P-form in primary cultured rat liver parenchymal cells by co-planar polychlorinated biphenyl congeners. *Biochem. J.* **281**: 539-543.
- Asturias, J. A. y Timmis, K. N.** 1993. Three different 2,3-dihydroxybiphenyl-1,2-dioxygenase genes in the gram-positive polychlorobiphenyl-degrading bacterium *Rhodococcus globerulus* P6. *J. Bacteriol.* **175**: 4631-4640.
- Bailey, J. E.** 1991. Toward a science of metabolic engineering. *Science* **252**: 1668-1675.

- Bartels, I., Knackmuss, H.-J. y Reinecke, W.** 1984. Suicide inactivation of catechol 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas putida* mt-2 by halocatechols. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 500-505.
- Batie, C. J., Ballon, D. P. y Correll, C. J.** 1991. Phthalate dioxygenase reductase and related flavin-iron-sulfur containing electron transferases. En: *Chemistry and Biochemistry of flavoenzymes* (Müller, F., ed.) pp. 544-554, CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Bedard, D. L.** 1990. Bacterial transformation of polychlorinated biphenyls. En: *Biotechnology and biodegradation* (Kamely, D., Chakrabarty, A. y Omenn, G. S., eds.) pp. 369-388, Portfolio Publishing Co., The Woodlands, Texas.
- 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.
- 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.
- Berg, D. E.** 1989. Transposon Tn5. En: *Mobile DNA* (Berg, D. E. y Howe, M. M. eds.) pp. 185-210, American Society for Microbiology, Washington.
- Birnbaum, L.** 1994. Endocrine effects of prenatal exposure to PCBs, dioxins, and other xenobiotics: implications for policy and future research. *Environ. Health Perspect.* **102**: 676-679.
- Blasco, R., Wittich, R.-M., Mallavarapu, M., Timmis, K. N. y 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.
- Blom, A., Harder, W. y Matin, A.** 1992. Unique and overlapping pollutant stress proteins of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 331-334.
- Bochkareva, E. S., Lissin, N. M. y Girshovich, A. S.** 1988. Transient association of newly synthesized unfolded proteins with the heat-shock GroEL protein. *Nature* **336**: 254-257.
- Bopp, L. H.** 1986. Degradation of highly chlorinated PCBs by *Pseudomonas* strain LB400. *J. Ind. Microbiol.* **1**: 23-29.
- Boyle, A. W., Silvin, C. J., Hassett, J. P., Nakas, J. P. y Tanenbaum, S. W.** 1992. Bacterial PCB biodegradation. *Biodegradation* **3**: 285-298.
- Bradford, M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 255-260.

- Brazil, G. M., Kenefick, L., Callanan, M., Haro, A., de Lorenzo, V., Dowling, D. N. y O'Hara, F. 1995. Construction of a rhizosphere *Pseudomonas* with potential to degrade polychlorinated biphenyls and detection of *bph* gene expression in the rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1946-1952.
- Brown, J. F., Bedard, D. J., Brennan, M. J., Carnahan, J. C., Feng, H. y Wagner, R. E. 1987. Polychlorinated biphenyl dechlorination in aquatic sediments. *Science* **236**: 709-712.
- Catelani, D. y Colombi, A. 1974. Metabolism of biphenyl. Structure and physicochemical properties of 2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoic acid, the meta-cleavage product from 2,3-dihydroxybiphenyl by *Pseudomonas putida*. *Biochem. J.* **143**: 431-434.
- Catelani, D., Colombi, A., Sorlini, C. y Treccani, V. 1973. Metabolism of biphenyl. 2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoate: the meta-cleavage product from 2,3-dihydroxybiphenyl by *Pseudomonas putida*. *Biochem. J.* **134**: 1063-1066.
- Catelani, D., Sorlini, C. y Treccani, V. 1971. The metabolism of biphenyl by *Pseudomonas putida*. *Experientia* **27**: 1173-1174.
- Cerniglia, C. E., Morgan, J. C. y Gibson, D. T. 1979. Bacterial and fungal oxidation of dibenzofuran. *Biochem J.* **180**: 175-185.
- Chaundhry, G. R. y Chapalamadugu, S. 1991. Biodegradation of halogenated organic compounds. *Microbiol. Rev.* **55**: 59-79.
- Craig, E. A., Gambill, D. y Nelson, R. J. 1993. Heat shock proteins: molecular chaperones of protein biogenesis. *Microbiol. Rev.* **57**: 402-414.
- Daniel, V. 1993. Glutathione S-transferases: gene structure and regulation of expression. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **28**: 173-207.
- Davis, D. L. y Bradlow, H. L. 1995. Can environmental estrogens cause breast cancer? *Sci. Am.* **273**: 144-149.
- 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.
- de Lorenzo, V. y Timmis, K. N. 1992. Specialized host-vector systems for the engineering of *Pseudomonas* strains destined for environmental release. En: *Pseudomonas: Molecular Biology and Biotechnology* (Galli, E., Silver, S. y Witholt, B., eds.) pp. 415-428, American Society for Microbiology, Washington.
- Dower, W. J., Miller, J. F. y Ragsdale, C. W. 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16**: 6127-6145.

- Dowling, D. N., Pipke, R. y Dwyer, D. F.** 1993. A DNA module encoding *bph* genes for the degradation of polychlorinated biphenyls. *FEMS Microbiol. Lett.* **113**: 149-154.
- Dufek, P., Pacáková, V. y Zivny, K.** 1981. Gas chromatographic behaviour of mono- and dihydroxybiphenyls on various silicone phases. *J. Chromatogr.* **211**: 150-154.
- Ellis, R. J. y Hemmingsen, S. M.** 1989. Molecular chaperones: proteins essential for the biogenesis of some macromolecular structures. *Trends Biochem. Sci.* **14**: 339-342.
- Eltis, L. D., Hofmann, B., Hecht, H.-J., Lünsdorf, H. y Timmis, K. N.** 1993. Purification and crystallization of 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase. *J. Biol. Chem.* **268**: 2727-2732.
- Erickson, B. D. y Mondello, F.** 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.
- Erickson, B. D. y Mondello, F.** 1993. Enhanced biodegradation of polychlorinated biphenyls after site-directed mutagenesis of a biphenyl dioxygenase gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 3858-3862.
- Faber, F., Egli, T. y Harder, W.** 1993. Transient repression of the synthesis of OmpF and aspartate transcarbamoylase in *Escherichia coli* K12 as a response to pollutant stress. *FEMS Microbiol. Lett.* **111**: 189-196.
- Fava, F., Di Gioia, D., Cinti, S., Marchetti, L. y Quatronni, G.** 1994. Degradation and dechlorination of low-chlorinated biphenyls by a three-membered bacterial co-culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **41**: 117-123.
- Fernández-Salguero, P., Pineau, T., Hilbert, D. M., McPhail, T., Lee, S. S. T., Kimura, S., Nebert, D. W., Rudikoff, S., Ward, J. M. y Gonzalez, F. J.** 1995. Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. *Science* **268**: 722-726.
- Fetzner, S., Müller, R. y Lingens, F.** 1992. Purification and some properties of 2-halobenzoate 1,2-dioxygenase, a two component enzyme system from *Pseudomonas cepacia* 2CBS. *J. Bacteriol.* **174**: 279-290.
- Focht, D. D.** 1995. Strategies for the improvement of aerobic metabolism of polychlorinated biphenyls. *Curr. Opinion in Biotechnol.* **6**: 341-346.
- Fredrickson, J. K., Bolton, H. y Brockman, F. J.** 1993. *In situ* and on-site bioreclamation. *Environ. Sci. Technol.* **27**: 1711-1716.
- Furukawa, K.** 1982. Microbial degradation of polychlorinated biphenyls. En: *Biodegradation and detoxification of environmental pollutants* (Chakrabarty, A. M., ed.) pp. 33-57, CRC Press, Boca Raton, Florida.

Furukawa, K. 1994. Molecular genetics and evolutionary relationship of PCB-degrading bacteria. *Biodegradation* **5**: 289-300.

Furukawa, K. y Chakrabarty, A. M. 1982. Involvement of plasmids in total degradation of chlorinated biphenyls. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**: 619-626.

Furukawa, K., Hayase, N., Taira, K. y Tomizuka, N. 1989. Molecular relationship of chromosomal genes encoding biphenyl/polychlorinated biphenyl catabolism: some soil bacteria possess a highly conserved *bph* operon. *J. Bacteriol.* **171**: 5467-5472.

Furukawa, K., Matsumura, F. y Tonomura, K. 1978. *Alcaligenes* and *Acinetobacter* capable of degrading polychlorinated biphenyls. *Agric. Biol. Chem.* **42**: 543-548.

Gene Groat, R., Schultz, J. E., Zychlinsky, E., Bockman A. y Matin, A. 1986. Starvation proteins in *Escherichia coli*: kinetics of synthesis and role in starvation survival. *J. Bacteriol.* **168**: 486-493.

Gibson, D. T., Roberts, R. L., Wells, M. C. y Kobal, V. M. 1973. Oxidation of biphenyl by a *Beijerinckia* species. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **50**: 211-219.

Gibson, D. T. y Subramanian, V. 1984. Microbial degradation of aromatic hydrocarbons. En: *Microbial degradation of organic compounds* (Gibson, D. T., ed.) pp. 181-252, Marcel Dekker, New York.

Givskov, M., Eberl, L. y Molin, S. 1994. Responses to nutrient starvation in *Pseudomonas putida* KT2442: two-dimensional electrophoresis analysis of starvation-and stress-induced proteins. *J. Bacteriol.* **176**: 4816-4824.

Gottesman, S. 1984. Bacterial regulation: global regulatory networks. *Annu. Rev. Genet.* **18**: 415-441.

Grant, S. G. N., Jessee, J., Bloom, F. R. y Hanahan, D. 1990. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 4645-4649.

Guilbeault, B., Sondossi, M., Ahmad, D. y Sylvestre, M. 1994. Factors affecting the enhancement of PCB degradative ability of soil microbial populations. *Int. Biodeterior. Biodeg.* **33**: 73-91.

Haddock, J. D., Horton, J. R. y Gibson, D. T. 1995. Dihydroxylation and dechlorination of chlorinated biphenyls by purified biphenyl 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain LB400. *J. Bacteriol.* **177**: 20-26.

Haddock, J. D., Nadim, L. M. y Gibson, D. T. 1993. Oxidation of biphenyl by a multicomponent enzyme system from *Pseudomonas* sp. strain LB400. *J. Bacteriol.* **175**: 395-400.

Hames, B. D. 1983. An introduction to polyacrilamide gel electrophoresis. En: Gel Electrophoresis of Proteins (Hames, B. D. y Rickwood, D., eds.) pp. 1-86, IRL Press, Oxford.

Han, S., Eltis, L. D., Timmis, K. N., Muchmore, S. W. y Bolin, J. T. 1995. Crystal structure of a biphenyl-cleaving extradiol dioxygenase from a PCB-degrading *Pseudomonad*. *Science* **270**: 976-980.

Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.

Harayama, S., Kok, M. y Neidle, E. L. 1992. Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**: 565-601.

Hartl, F. U., Hlodan, R. y Langer, T. 1994. Molecular chaperones in protein folding: the art to avoid sticky situations. *Trends Biochem. Sci.* **19**: 20-25.

Havel, J. y Reinecke, W. 1991. Total degradation of various chlorobiphenyls by cocultures and *in vivo* constructed hybrid pseudomonads. *FEMS Microbiol. Lett.* **78**: 163-170.

Havel, J. y Reinecke, W. 1992. Degradation of Aroclor 1221 and survival of strains in soil microcosms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**: 129-134.

Hayase, N., Taira, K. y Furukawa, K. 1990. *Pseudomonas putida* KF715 *bphABCD* operon encoding biphenyl and polychlorinated biphenyl degradation: cloning, analysis and expression in soil bacteria. *J. Bacteriol.* **172**: 1160-1164.

Hernández, B. S., Higson, F. K., Kondrat, R. y Focht, D. D. 1991. Metabolism of and inhibition by chlorobenzoates in *Pseudomonas putida* P111. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 3361-3366.

Herrero, M., de Lorenzo, V. y Timmis, K. N. 1990. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **172**: 6557-6567.

Hickey, W. J., Brenner, V. y Focht, D. D. 1992. Mineralization of 2-chloro and 2,5-dichlorobiphenyl by *Pseudomonas* sp. strain UCR2. *FEMS Microbiol. Lett.* **98**: 175-180.

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. y 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., Megharaj, M., Seeger, M., McKay, D., Wittich, R.-M., Pieper, D. H. y Timmis, K. N.** 1996. Designed *Pseudomonas* for bioremediation and circumvention of undesirable routes. En: *Pseudomonas: Molecular Biology and Biotechnology* (Nakazawa, T., Furukawa, K., Haas, D. y Silver, S., eds.), American Society for Microbiology, Washington. En prensa.
- Horvat, R. J. y Senter, S. D.** 1980. A gas-liquid chromatographic method for analysis of phenolic acids in plants. *J. Agric. Food. Chem.* **28**: 1292-1295.
- Horvat, R. J. y Senter, S. D.** 1983. Cyclic ions in the mass spectra of trimethylsilyl derivatives of substituted *o*-dihydroxybenzenes. *Org. Mass Spectrom.* **18**: 413-417.
- Ish-Horowicz, D. y Burke, J. F.** 1981. Rapid and efficient cosmid vector cloning. *Gene* **70**: 191-197.
- Jakoby, W. B. y Ziegler, D. M.** 1990. The enzymes of detoxification. *J. Biol. Chem.* **34**: 20715-20718.
- Jeffrey, A. M., Yeh, H. J. C., Jerina, D. M., Patel, T. R., Davey, J. F. y Gibson D. T.** 1975. Initial reactions in the oxidation of naphthalene by *Pseudomonas putida*. *Biochemistry* **14**: 575-584.
- Jerez, C. A. y Arredondo, R.** 1991. A sensitive method to enumerate *Leptospirillum ferrooxidans* in the presence of *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Lett.* **78**: 99-102.
- Jerina, D. M., Selander, H., Yagi, H., Wells, M. C., Davey, J. F., Mahadevan, V. y Gibson, D. T.** 1976. Dihydrodiols from anthracene and phenanthrene. *J. Am. Chem. Soc.* **98**: 5988-5996.
- Jouper Jaan, A., Dahllöf, B. y Kjelleberg, S.** 1986. Changes in protein composition of three bacterial isolates from marine waters during short periods of energy and nutrient deprivation. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**: 1419-1421.
- Kertesz, M. A., Leisinger, T. y Cook, A. M.** 1993. Proteins induced by sulfate limitation in *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, or *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **175**: 1187-1190.
- Kikuchi, Y., Yasukochi, Y., Nagata, Y., Fukuda, M. y Takagi, M.** 1994. Nucleotide sequence and functional analysis of the *meta*-cleavage pathway involved in biphenyl and polychlorinated biphenyl degradation in *Pseudomonas* sp. strain KKS102. *J. Bacteriol.* **176**: 4269-4276.
- Kimbrough, R. D.** 1987. Human health effects of polychlorinated biphenyls (PCBs) and polybrominated biphenyls (PBBs). *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **27**: 87-111.
- Kirsch, N. H. y Stan, H.-J.** 1994. Gas chromatographic-mass spectrometric determination of chlorinated *cis*-1,2-dihydroxycyclohexadienes and chlorocatechols as their boronates. *J. Chromatogr. A* **684**: 277-287.

- Klecka, G. M. y Gibson, D. T.** 1980. Metabolism of dibenzo-*p*-dioxin and chlorinated dibenzo-*p*-dioxins by a *Beijerinckia* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**: 288-296.
- Korhonen, I. O. O. y Knuutinen, J.** 1983. Quartz-capillary gas chromatography of chlorinated phenols and catechols. *Chromatographia* **17**: 154-156.
- Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- LaRossa, R. A. y Van Dyk, T. K.** 1991. Physiological roles of the DnaK and GroE stress proteins: catalysts of protein folding or macromolecular sponges? *Mol. Microbiol.* **5**: 529-534.
- Lehrbach, P. R., Zeyer, J., Reinecke, W., Knackmuss, H.-J. 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.
- Lindquist, S.** 1988. The heat shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* **22**: 631-677.
- Lunt, D. y Evans, W. C.** 1970. The microbial metabolism of biphenyl. *Biochem. J.* **118**: 54P-55P.
- Lupi, C. G., Colangelo, T. y Mason, C. A.** 1995. Two-dimensional gel electrophoresis analysis of the response of *Pseudomonas putida* KT2442 to 2-chlorophenol. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2863-2872.
- Mason, J. R. y Cammack, R.** 1992. The electron-transport proteins of hydroxylating bacterial dioxygenases. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**: 277-305.
- Massé, R., Messier, F., Ayotte, C., Lévesque, M.-F. y Sylvestre, M.** 1989. A comprehensive gas chromatographic/mass spectrometric analysis of 4-chlorobiphenyl bacterial degradation products. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* **18**: 27-47.
- Matin, A., Auger, E. A., Blum, P. H. y Schultz, J. E.** 1989. Genetics basis of starvation survival in non differentiating bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **43**: 293-316.
- Matin, A.** 1991. The molecular basis of carbon-starvation-induced general resistance in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **5**: 3-10.
- McCann, M. P., Kidwell, J. P. y Matin, A.** 1991. The putative σ factor KatF has a central role in development of starvation-mediated general resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **173**: 4188-4194.

- McCullar, M. V., Brenner, V., Adams, R. H. y Focht, D. D. 1994. Construction of a novel polychlorinated biphenyl-degrading bacterium: utilization of 3,4'-dichlorobiphenyl by *Pseudomonas acidovorans* M3GY. Appl. Environ. Microbiol. 60: 3833-3839.
- McKay, D. B., Seeger, M., Zielinski, M., Timmis, K. N. y Hofer, B. 1996. Heterologous expression of biphenyl dioxygenase-encoding genes from a gram-positive broad-spectrum PCB degrader and characterization of chlorobiphenyl oxidation by the genes products. En preparación.
- Miller, V. L. y Mekalanos, J. J. 1988. A novel suicide vector and its use in the construction of insertion mutants: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR* J. Bacteriol. 170: 2575-2583.
- Mokross, H., Schmidt, E. y Reinecke, W. 1990. Degradation of 3-chlorobiphenyl by *in vivo* constructed hybrid pseudomonads. FEMS Microbiol. Lett. 71: 179-186.
- Mondello, F. 1989. Cloning and expression in *E. coli* of *Pseudomonas* strain LB400 genes encoding polychlorinated biphenyl degradation. J. Bacteriol. 171: 1725-1732.
- Nadim, L., Schocken, M. J., Higson, F. J., Gibson, D. T., Bedard, D. L., Bopp, L. H. y Mondello, F. J. 1987. Bacterial oxidation of polychlorinated biphenyls. En: Proceedings of the 13th Annual Research Symposium on Land Disposal, Remedial Action, Incineration, and Treatment of Hazardous Waste. EPA/600/9-87/015. pp. 395-402, U. S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio.
- Ollis, D. L., Cheah, F., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S. M., Harel, M., Remington, S. J., Silman, I., Schrag, J., Sussman, J. L., Verschueren, K. H. G. y Goldman, A. 1992. The α/β hydrolase fold. Protein Engineering 5: 197-211.
- O'Farrell, P. H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem. 250: 4007-4021.
- O'Farrell, P. Z., Goodman, H. M. y O'Farrell, P. H. 1977. High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. Cell 12: 1133-1142.
- Pedersen, S., Bloch, P. L., Reeh, S. y Neidhardt, F. C. 1978. Patterns of protein synthesis in *Escherichia coli*: a catalog of the amount of 140 individual proteins at different growth rates. Cell 14: 179-190.
- Persson, B., Krook, M. y Jörnvall, H. 1991. Characteristics of short-chain alcohol dehydrogenases and related enzymes. Eur. J. Biochem. 200: 537-543.

Pieper, D. H., Blasco, R., Wittich, R.-M., Megharaj, M., Fock, U., Prucha, M., Seeger, M., Hofer, B. y Timmis, K. N. 1995. Microbial degradation of halogenated aromatic pollutants. En: *Microbes, Environment, Biotechnology* (Aubert, J. P. y Martin, P. M. V., eds.) pp. 85-89, Institut Louis Malardé, Papeete, Tahiti.

Quensen III, J. F., Tiedje, J. M. y Boyd, S. A. 1988. Reductive dechlorination of polychlorinated biphenyls by anaerobic microorganisms from sediments. *Science* **242**: 752.

Quensen III, J. F., Boyd, S. A. y Tiedje, J. M. 1990. Dechlorination of four commercial polychlorinated biphenyl mixtures by anaerobic microorganisms from sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 2360-2369.

Ramos, J. L., Wasserfallen, A., Rose, K. y Timmis, K. N. 1987. Redesigning metabolic routes: manipulation of TOL plasmid pathway for catabolism of alkylbenzoates. *Science* **235**: 593-596.

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

Rojo, F., Pieper, D. H., Engesser, K.-H., Knackmuss, H.-J. y Timmis, K. N. 1987. Assemblage of *ortho*-cleavage route for simultaneous degradation of chloro- and methylaromatics. *Science* **238**: 1395-1398.

Romanov, V. y Hausinger, R. 1994. *Pseudomonas aeruginosa* 142 uses a three-component *ortho*-halobenzoate 1,2-dioxygenase for metabolism of 2,4-dichloro- and 2-chlorobenzoate. *J. Bacteriol.* **176**: 3368-3374.

Safe, S. 1992. Toxicology, structure-function relationship, and human and environmental health impacts of polychlorinated biphenyls: progress and problems. *Environ. Health Perspect.* **100**: 259-268.

Safe, S. 1994. Polychlorinated biphenyls (PCBs): environmental impact, biochemical and toxic responses, and implications for risk assessment. *Crit. Rev. Toxicol.* **24**: 87-149.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning. A Laboratory Manual* (2^a ed.), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Seeger, M. y Jerez, C. A. 1992. The lack of phosphate affects global gene expression in *Thiobacillus ferrooxidans*. *Geomicrobiol. J.* **10**: 227-237.

Seeger, M. y Jerez, C. A. 1993a. Response of *Thiobacillus ferrooxidans* to phosphate limitation. *FEMS Microbiol. Revs.* **11**: 37-42.

Seeger, M. y Jerez, C. A. 1993b. Phosphate-starvation induced changes in *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **108**: 35-41.

- Seeger, M., Osorio, G. y Jerez, C. A. 1996a. Phosphorylation of GroEL and DnaK and other proteins from *Thiobacillus ferrooxidans* grown under different conditions. FEMS Microbiol. Lett. En prensa.
- Seeger, M., Timmis, K. N. y Hofer, B. 1995a. Conversion of chlorobiphenyls into phenylhexadienoates and benzoates by the enzymes of the upper pathway for PCB-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. 1995b. Degradation of chlorobiphenyls catalyzed by 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. 1996b. Bacterial pathways for degradation of polychlorinated biphenyls. Enviado a publicar.
- Seto, M., Masai, E., Ida, M., Hatta, T., Kimbara, K., Fukuda, M. y Yano, K. 1995. Multiple polychlorinated biphenyl transformation systems in the gram-positive bacterium *Rhodococcus* sp. strain RHA1. Appl. Environ. Microbiol. 61: 4510-4513.
- Silberhorn, E. M., Glauert, H. P. y Robertson, L. W. 1990. Carcinogenicity of polyhalogenated biphenyls: PCBs and PBBs. Crit. Rev. Toxicol. 20: 439-496.
- Singleton, I. 1994. Microbial metabolism of xenobiotics: fundamental and applied research. J. Chem. Tech. Biotechnol. 59: 9-23.
- Sondossi, M., Sylvestre, M., Ahmad, D. y Massé, R. 1991. Metabolism of hydroxybiphenyl and chloro-hydroxybiphenyl by biphenyl/chlorobiphenyl degrading *Pseudomonas testosteroni*, strain B-356. J. Industr. Microbiol. 7: 77-88.
- Sondossi, M., Sylvestre, M. y Ahmad, D. 1992. Effects of chlorobenzoate transformation on the *Pseudomonas testosteroni* biphenyl and chlorobiphenyl degradation pathway. Appl. Environ. Microbiol. 58: 485-495.
- Spector, M. P., Zarrintaj, A., Gonzales, T. y Foster, F. W. 1986. Global control in *Salmonella typhimurium*: two-dimensional electrophoretic analysis of starvation-anaerobiosis- and heat shock-inducible proteins. J. Bacteriol. 168: 420-424.
- Studier, F. W. 1991. Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. J. Mol. Biol. 219: 37-44.
- Tabor, S. y Richardson, C. C. 1985. A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 1074-1078.

Tadesse, B., Donaldson, J. D. y Grimes, S. M. 1994. Contaminated and polluted land: a general review of decontamination management and control. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **60**: 227-240.

Tiedje, J. M., Quensen III, J. F., Chee-Sanford, J., Schimel, J. P. y Boyd, S. A. 1993. Microbial reductive dechlorination of PCBs. *Biodegradation* **4**: 231-240.

Timmis, K. N., Steffan, R. J. y Unterman, R. 1994. Designing microorganisms for the treatment of toxic wastes. *Annu. Rev. Microbiol.* **48**: 525-557.

Towin, H., Staehelin, T. y Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 4350-4354.

Unterman, R., Bedard, D. L., Brennan, M. J., Bopp, L. H., Mondello, F. J., Brooks, R. E., Mobley, D. P., McDermott, J. B., Schwartz, C. C. y Dietrich, D. K. 1988. Biological approaches for polychlorinated biphenyl degradation. En: *Reducing risks from chemicals through biotechnology* (Omenn, G. S., ed.) pp. 253-269, Plenum Press, New York.

VanBogelen, R. A., Sankar, P., Clark, R. L., Bogan, J. A. y Neidhardt, F. C. 1992. The gene-protein database of *Escherichia coli*, 5th ed. *Electrophoresis* **13**: 1014-1054.

Van der Meer, J., de Vos, W., Harayama, S. y Zehnder, A. 1992. Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiol. Rev.* **56**: 677-694.

Van Dyk, T. K., Majarian, W. R., Konstantinov, K. B., Young, R. M., Dhurjati, P. S. y LaRossa, R. A. 1994. Rapid and sensitive pollutant detection by induction of heat shock gene-bioluminescence gene fusions. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 1414-1420.

Varela, P. y Jerez, C. A. 1992. Identification and characterization of GroEL and DnaK homologues in *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **98**: 149-154.

Walker, M. E., Val, D. L., Rohde, M., Devenish, R. J. y Wallace, J. C. 1991. Yeast pyruvate carboxylase: identification of two genes encoding isoenzymes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **176**: 1210-1217.

World Health Organization. 1993. Resumen y evaluación, conclusiones y recomendaciones. En: *Polychlorinated biphenyls and terphenyls* (2ª ed.) pp. 657-682, World Health Organization, Ginebra.

Ye, D., Quensen III, J. F., Tiedje, J. M. y Boyd, S. A. 1995. Evidence for *para* dechlorination of polychlorinated biphenyls by methanogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2166-2171.