

VCH-PC
DOC-B
C421
C.L

**DEGRADACIÓN DE COMPUESTOS CLOROAROMÁTICOS POR
BACTERIAS NATURALES Y MODIFICADAS MEDIANTE
TRANSFERENCIA DE GENES CATABÓLICOS.**

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

Facultad de Ciencias

por

Ricardo Andrés Céspedes Araneda

Noviembre, 1997

1-293672



Director de Tesis: Dr. Bernardo González O.

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO

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

RICARDO ANDRES CESPEDAS ARANEDA

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 2 de Octubre de 1997.


Director de Tesis:

Dr. Bernardo González


.....

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. Rosalba Lagos


.....

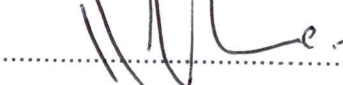
Dr. David Holmes

David S. Holmes
.....

Dr. Luis Burzio


.....

Dr. Romilio Espejo


.....



“La verdad está en el deseo del alma”...

Igmar Bergman

Für Marius und ihre Erwartung.

"Pues la belleza, Fedón, nóvalo bien, sólo la belleza, es al mismo tiempo divina y perceptible, y por eso es el camino de lo sensible, el camino del artista al espíritu. ¿Pero crees tú, amado mío, que podrá alcanzar nunca sabiduría y verdadera dignidad humana aquel para el cual el camino que lleva al espíritu pasa por los sentidos?. ¿O crees más bien (la decisión la abandono a tu criterio) que éste es un camino peligroso, un camino de pecado y perdición, que necesariamente lleva al extravío?. Pues has de saber que nosotros los poetas no podemos andar el camino de la belleza sin que Eros nos acompañe y nos sirva de guía; y que si, a nuestro modo, podemos ser héroes y disciplinados guerreros, somos sin embargo, como mujeres, pues nuestro ensalzamiento es la pasión, y nuestras ansias han de ser amor; ésta es nuestra gloria y nuestra vergüenza. ¿Comprendes ahora cómo nosotros los poetas no podemos ser ni sabios ni dignos?. ¿Que necesariamente hemos de extraviarnos, que hemos de ser necesariamente concupiscentes y aventureros de los sentidos?. La maestría de nuestro estilo es falsa y mentida e insensata; nuestra gloria y estimación, pura farsa; altamente ridícula, la confianza que el pueblo nos otorga; empresa desatinada y condenable querer educar por el arte al pueblo y a la juventud. ¿Pues cómo habrá de servir para educar a nadie aquel en quien alienta de un modo innato una tendencia natural e incorregible hacia el abismo?. Ciertamente que quisiéramos negarlo y adquirir una actitud de dignidad; pero como quiera que procedamos, nos atrae.

Así, verbigracia, renegamos del conocimiento libertador, pues el conocimiento, Fedón carece de severidad y disciplina; es sabio, comprensivo, perdona, no tiene forma ni decoro, simpatiza con el abismo, es ya el abismo. Lo rechazamos, pues, con decisión, y en adelante nuestros esfuerzos se aplican tan sólo a la belleza; es decir, a la sencillez, grandeza y nueva disciplina, a la nueva inocencia y a la forma; pero inocencia y forma, Fedón, conducen a la embriaguez y al deseo, llevan quizá al espíritu noble al espanto del delito de sentimiento que condena como infame su propia severidad estética, le lleva al abismo, ellos también le llevan al abismo. A nosotros los poetas nos llevan al abismo, pues nosotros no podemos emprender el vuelo hacia arriba rectamente, sólo podemos extraviarnos. Y ahora me voy, Fedón; quédate tú aquí, y sólo cuando ya hayas dejado de verme, vete también tú"

Muerte en Venecia, Thomas Mann, 1912.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer sinceramente al Dr. Bernardo González O. por su guía durante el desarrollo de esta tesis, estoy consciente que esta tesis ha sido una experiencia nueva para ambos, con momentos agradables pero también sus sinsabores. Durante estos años ambos hemos sufrido el paso del tiempo que temple los ánimos y los espíritus, pero aun así, aunque en este camino nuestras rutas se hayan hecho divergentes, tu has estado allí, consiente de tus responsabilidades como formador, pero también como quién escucha y da consejo aun mas allá de tus intereses personales, espero que esto nunca cambie, pues te transforman Bernardo en alguien con quién si es posible interaccionar y por quién uno es capaz de recordar que existen metas que lograr, aun cuando el futuro mediato se torne borroso, tu estas ahí para indicarnos siempre un camino ha seguir, gracias Bernardo, muchas gracias por eso.

A mis compañeros de laboratorio: Valeria (mi señora), Pascale (nuestra hija adoptiva), Javier (el conchito que ahora se encuentra lejos) y Andrea (mi amante =:-) que constituyeron en un principio mi familia, los cuales junto a Cristián (el Lapa), Leandro y Roberto han tenido la paciencia para tolerarme durante estos más de cuatro años, brindándome momentos de real camaradería que sin duda es muy difícil de encontrar en un grupo de trabajo.

A mi familia consanguínea: Mamá, Nana y Tito, porque aunque nunca han entendido qué es lo importante en la vida para mi (y no los culpo), siempre me han apoyado, aun cuando en ello fuera necesario sacrificar las expectativas personales que cada cual desea para el otro.

A mi familia adoptiva: Rosemarie, frau Keune, Marius y Spike por brindarme un punto de llegada en una tierra tan distante como Alemania y hacerme sentir un

calor de hogar, relación en la cual todos hemos aprendido y que sigue significando para mi una puerta por donde, una vez mas, poder comenzar.

A mis amigos Andrés, Eric, Tonino, Jan, Jaime Doc y Marius (de nuevo), quienes han demostrado que ni el tiempo ni la distancia son importantes, sino la vida, con sus distintos matices y de cuya interacción siguen surgiendo los marcos de significación que delinear y definen mi vida.

A Fundación Andes, organización de la cual he tenido el honor de ser becario, quisiera agradecer su apoyo incondicional al desarrollo de este programa de doctorado, sin cuyo financiamiento no habría sido posible realizar esta tesis en el tiempo ni en los objetivos en que fue concebida.

A Celulosa Arauco y Constitución, en especial a Elisa Oyarzun y Miguel Osses, por su valiosa colaboración en el suministro de efluentes industriales, materia prima en el desarrollo de esta tesis, así como en el suministro de información respecto a la operación de dicha planta.

A los restantes miembros del laboratorio de Microbiología, en especial a Orlando, por su ayuda continua en todos los detalles que se requieren a diario para poder realizar nuestro trabajo.

Finalmente a Lisa Gerrard y Brendan Perry, por su música que me ha acompañado en cada minuto, brindándome siempre un entorno de armonía, en el cual mi pensamiento se puede concentrar a resolver los problemas que la ciencia y el existir nos plantean, gracias por seguir siendo *Dead Can Dance*.

Esta tesis ha sido financiada por los proyectos FONDECYT 0558/93, FONDECYT 2950075 y FONDEF FI-17

INDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	iv
INDICE DE CONTENIDOS	vi
INDICE DE FIGURAS	xi
INDICE DE TABLAS	xiv
ABREVIATURAS.....	xvi
RESUMEN	xviii
ABSTRACT	xxi
INTRODUCCIÓN	1
MATERIALES Y MÉTODOS	20
1. Medios de cultivo.	20
1.1 Medio Luria-Bertani.....	20
1.2 Medio salino.....	20
2. Efluente de blanqueo de celulosa.....	22
3. Cultivo de microorganismos.....	26
3.1 Mantenimiento de microorganismos.	26
3.2 Diseño y construcción de microcosmos.	26
3.3 Cultivos por lotes.	31

*

3.4 Cultivos en aireación forzada.....	32
3.5 Sedimentos.	32
3.6 Obtención de biomásas a partir de los modelos de laguna.	33
3.7 Preparación de células competentes.....	33
3.8 Preparación de células para electroporación.	34
4. Análisis microbiológico.....	35
4.1 Determinación del número de células viables.	35
4.2 Microscopía de epifluorescencia.....	36
4.3 Recuento de protozoos.....	36
4.4 Identificación preliminar de microorganismos por API 20NE.....	37
5. Análisis bioquímico.	37
5.1 Preparación de extractos crudos.	37
5.2 Descloración por suspensiones celulares.....	38
6. Análisis químico.	39
6.1 Barrido espectrofotométrico.....	39
6.2 Cromatografía gaseosa.....	40
6.3 Determinación de la demanda química de oxígeno (DQO)	41
6.4 Determinación de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO ₅).....	41

6.5 Mineralización de clorofenoles marcados con ^{14}C .	42
6.6 Ensayos de actividad enzimática.	44
7. Cuantificación de proteínas.	48
8. Cuantificación de cloruro liberado.	50
9. Técnicas de biología molecular.	50
9.1 Extracción de DNA plasmidial.	50
9.2 Detección y aislamiento de plásmidos de gran tamaño.	52
9.3 Restricción, desfosforilación y ligación del DNA.	54
9.4 Extracción con fenol y precipitación de DNA.	55
9.5 Electroelución de DNA.	56
9.6 Amplificación de DNA por PCR.	57
9.6.1 Diseño de partidores.	57
9.6.2 Mezcla de reacción.	57
9.6.3 PCR de colonias.	58
9.6.4 Programa de amplificación por PCR.	59
9.7 Transformación celular.	59
9.7.1 Electroporación:	59
9.7.2 Conjugación triparental.	60

9.8 Transformación por shock térmico.....	61
RESULTADOS.....	63
1. Degradación de (cloro)aromáticos en lagunas para el tratamiento aerobio de efluentes provenientes del blanqueo de pulpa de celulosa: Un modelo de estudio.....	63
1.1 Montaje de microcosmos.....	63
1.2 Presencia de compuestos organoclorados propios de los efluentes de blanqueo.....	69
1.3 Caracterización global de los microorganismos presentes en los modelos.....	72
1.4 Metabolización de compuestos organoclorados por los microorganismos presentes en los modelos de laguna de aireación.....	76
1.4.1 Capacidad para remover organoclorados presentes en el efluente.....	76
1.4.2 Capacidad de los microorganismos para utilizar compuestos (cloro)aromáticos como única fuente de carbono y energía.....	81
1.4.3 Capacidad de los microorganismos para degradar (cloro)aromáticos en presencia de un efluente conteniendo altos niveles de materia orgánica degradable.....	83
1.4.4 Capacidad de la biomasa presente en los modelos de laguna de aireación para remover o modificar compuestos organoclorados específicos.....	85

1.4.5 Aislamiento y caracterización de microorganismos de los modelos de lagunas de aireación.	89
1.5 Capacidad de <i>Ralstonia eutropha</i> JMP134 (pJP4) para degradar cloroaromáticos en presencia de efluente de blanqueo de celulosa.....	92
2. Clonamiento y expresión de los genes <i>ffdCDEF</i> para la degradación de clorocatecoles: una ruta catabólica convergente.	96
2.1 Clonamiento del operón <i>ffdCDEF</i>	97
2.2 Clonamiento de los genes <i>ffdCDEF</i> bajo el control de un promotor heterólogo.....	100
2.3 Evaluación de la expresión de las construcciones obtenidas en <i>E. coli</i> , <i>R. eutropha</i> y <i>P. putida</i>	102
2.4 Estudios de expresión de las construcciones derivadas de pJRC42.....	106
2.4.1 Estudio de expresión de la construcción pCNB5-JRC42.....	109
DISCUSIÓN	121
PROYECCIONES	134
CONCLUSIONES.....	136
REFERENCIAS.....	138

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismos de descloración biológica de compuestos cloroaromáticos.....	4
Figura 2: Enzimas y estructura de operones de los genes de la vía de ruptura orto modificada.....	8
Figura 3: Versatilidad metabólica hacia compuestos cloroaromáticos de <i>Ralstonia eutropha</i> JMP134.	12
Figura 4: Vía de degradación de 2,4-D y 3CB en <i>R. eutropha</i> JMP134.	13
Figura 5: Esquema del proceso de producción de pulpa de celulosa blanqueada.	23
Figura 6: Diagrama de la disposición de dos microcosmos conectados en serie y sus elementos accesorios.	28
Figura 7: Fotografía de los modelos de laguna de aireación y sus elementos accesorios.	30
Figura 8: Espectros de 3,5-DCC; 2,4-DCM y CMA generados en un mismo ensayo enzimático por un extracto crudo de <i>R. eutropha</i> JMP134..	46
Figura 9: Perfil de elución de dicromato de potasio como marcador para la determinación del tipo de flujo existente en un microcosmo que representa una laguna de aireación.	65

Figura 10: Remoción de materia orgánica degradable, (DBO ₅) en un microcosmos.	67
Figura 11: Perfiles de cromatografía gaseosa para compuestos estándares (A) y muestras representativas (B y C) del efluente de blanqueo de pulpa empleado para alimentar los microcosmos montados en el laboratorio.	70
Figura 12: Perfiles de cromatografía gaseosa de la salida del modelo I, modelo II y sedimentos de la laguna de Arauco.	71
Figura 13: Microfotografías ópticas de epifluorescencia de muestras de los modelos I y II.	75
Figura 14: Microfotografías ópticas de protozoos observados en muestras del modelo I.	77
Figura 15: Perfiles de cromatografía gaseosa de cultivos en aireación forzada.	79
Figura 16: Espectros UV obtenidos de cultivos conteniendo (cloro)aromáticos a una concentración de 0,5 mM.	87
Figura 17: Esquema de subclonamientos de los genes <i>tfdCDEF</i>	98
Figura 18: Esquema representando la construcción denominada pCNB4-JRC42.	103
Figura 19: Esquema representando la construcción denominada pCNB5-JRC42.	104

Figura 20: Cinética de descloración de 4-CC por clon 8-1, JMP222-21 y JMP222-25.....	110
Figura 21: Cinética de transformación de 3,5-DCC (A) y 4-CC (B) (0,1 mM), por un extracto crudo de <i>R. eutropha</i> JMP134 crecida en 2,4-D.	111
Figura 22: Cinética de transformación de 3,5-DCC y 4-CC (0,1 mM), por un extracto crudo de <i>R. eutropha</i> JMP222-25 crecido en LB.	112
Figura 23: Cinética de transformación de 3,5-DCC (0,1 mM) por un extracto crudo de <i>R. eutropha</i> JMP222 crecido en LB.	113
Figura 24: Cinética de descloración de 4CC (0,5 mM) por clones derivados de pCNB4-JRC42.....	117
Figura 25: Cinética de descloración de 4-CC (0,5 mM) para clones derivados de <i>P. putida</i> KT2442.....	119

INDICE DE TABLAS

Tabla I: Composición del medio salino mínimo (Adriaens y col., 1989).....	21
Tabla II: Variación observada en el efluente traído de Arauco.....	25
Tabla III: Cepas y plásmidos usados en esta tesis.....	27
Tabla IV: Coeficientes de extinción molar empleados para el cálculo de actividades específicas.....	49
Tabla V. Parámetros de operación de los microcosmos.....	68
Tabla VI: Balance de masas para 0.5 mM ¹⁴ C-2,4-DCF en cultivos de efluente en aireación forzada.....	73
Tabla VII: Cambios observados en el efluente por efecto del crecimiento de microorganismos en aireación forzada.....	80
Tabla VIII: Crecimiento de microorganismos de los efluentes en compuestos (cloro)aromáticos como única fuente de carbono.....	82
Tabla IX: Consumo de substratos (cloro)aromáticos por efecto del crecimiento de microorganismos en efluente.....	84
Tabla X: Consumo de substratos (cloro)aromáticos por efecto de ser incubados con la biomasa obtenida de los modelos.....	86
Tabla XI: Propiedades bioquímicas de las cepas aisladas de muestras de efluentes.....	90

Tabla XII: Capacidades metabólicas de las cepas aisladas.....	91
Tabla XIII: Degradación de 2,4-D en cultivos de aireación forzada alimentados con efluente inoculados con <i>R. eutropha</i> JMP134.....	94
Tabla XIV: Degradación de 2,4,6-TCF en cultivos de aireación forzada alimentados con efluente e inoculados con <i>R. eutropha</i> JMP134. ..	95
Tabla XV: Resumen de clones de <i>E. coli</i> conteniendo las distintas construcciones realizadas en esta tesis.....	105
Tabla XVI: Ensayos de descloración de 3-CC por suspensiones celulares de clones en <i>E. coli</i> cc118 λ pir.....	108
Tabla XVII: Actividades específicas determinadas para las enzimas en estudio, presentes en un extracto crudo.....	115
Tabla XVIII: Descloración de 3-CB por clones obtenidos en <i>R. eutropha</i> JMP222 y <i>P. putida</i> KT2442.....	120

ABREVIATURAS

DQO:	Demanda química de oxígeno. Este parámetro expresado en mg de O ₂ /l da cuenta del contenido total de materia orgánica presente en un efluente.
DBO ₅ :	Demanda bioquímica de oxígeno, medida a los 5 días. Este parámetro expresado en mg de O ₂ /l da cuenta de la materia orgánica degradable por los microorganismos presente en un efluente.
3-CB:	3-clorobenzoato
4-CS:	4-clorosalicilato
2,4-D:	ácido 2,4-diclorofenoxiacético
3,5-DCC:	3,5-diclorocatecol
3-CC:	3-clorocatecol
3,5-DCC:	3,5-diclorocatecol
4-CC:	4-clorocatecol
2,4-DCF:	2,4-diclorofenol
2,4,5-TCF:	2,4,5-triclorofenol
2,4,6-TCF:	2,4,6-triclorofenol
UFC:	Unidades formadoras de colonias
DO ₆₆₀ :	Densidad óptica medida a 660 nm

LB: Medio Luria Bertani

DI: Diámetro interno

AOX: Halógeno unido a materia orgánica

HRT: tiempo de retención hidráulica

GC-MS modo SIM: cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en modo SIM, esto es monitoreo selectivo de iones.

RESUMEN

Los compuestos organoclorados existen en la naturaleza principalmente como consecuencia de la actividad agrícola e industrial. Estos compuestos se caracterizan por ser tóxicos y bioacumulables. A pesar de lo anterior, tanto bacterias como hongos han mostrado capacidad de degradar algunos de estos compuestos, aunque sus capacidades están sujetas a limitaciones bioquímicas, genéticas y ambientales.

Este trabajo de tesis estuvo enfocado a estudiar la degradación microbiana de contaminantes clorofenólicos por bacterias especializadas en cultivos puros y en sistemas complejos.

La primera parte de esta tesis se inició con el modelamiento a escala de laboratorio de un sistema que representara el tratamiento industrial de efluentes de producción de pulpa de celulosa mediante el blanqueo con cloro. Los resultados obtenidos mostraron que en los modelos se desarrolló una población estable de microorganismos que disminuyó en un 85% el contenido de materia orgánica degradable (DBO_5) presente en el efluente, a niveles comparables a los detectados en las lagunas aerobias. La población establecida en el sistema estuvo constituida principalmente por bacilos cortos Gram negativo. Estos microorganismos fueron estudiados, como conjunto y en

forma aislada, en cuanto a su capacidad metabólica para emplear diversos compuestos cloroaromáticos como fuente de carbono y energía. Los resultados indicaron que los microorganismos adaptados a crecer en los modelos de laguna de aireación fueron capaces de degradar niveles menores a 200 ppb de clorofenoles presentes en los efluentes de blanqueo de celulosa. En contraste a lo anterior, la introducción de un microorganismo especializado en degradación de organoclorados, como *R. eutropha* JMP134, mostró que éste era capaz de expresar sus capacidades para degradar organoclorados a una concentración de 100 ppm.

La segunda parte de esta tesis estuvo orientada a clonar la ruta metabólica para la degradación de clorocatecoles presente en el plásmido (pJP4) de la cepa *Ralstonia eutropha* JMP134. El clonamiento de estos genes *tfdCDEF* se hizo en sistemas de inserción cromosomal derivados del transposón Tn5, los cuales permitieron poner a estos genes bajo el control de los promotores heterólogos Ptrc o Psal, inducibles por IPTG y salicilato, respectivamente. Las construcciones obtenidas fueron evaluadas en cuanto a su expresión en *E. coli* cc118 λ pir, así como en *R. eutropha* JMP222 y *P. putida* KT2442. Los resultados mostraron que las cuatro enzimas codificadas en los genes *tfdCDEF* (1,2-clorocatecol dioxigenasa, cloromuconato cicloisomerasa, dienolactona hidrolasa y maleilacetato reductasa) se expresan en forma coordinada bajo el control de los promotores heterólogos. Las construcciones

bajo control de Ptrc mostraron una expresión basal, mientras que las controladas por Psal dependieron de la presencia de salicilato para la expresión de los genes. La expresión de las cuatro actividades enzimáticas, permitió la descloración eficiente de 4-clorocatecol, 3- clorocatecol, 3-clorobenzoato y 3,5-diclorocatecol, capacidades no presentes en las cepas parentales a las que fueron introducidos estos genes catabólicos.

ABSTRACT

Chloroorganic compounds are present in the environment mainly due to agricultural and industrial activity. These compounds are generally toxic and often bioaccumulate. Despite that, a variety of bacteria and fungi are able to degrade some of these compounds, although these abilities are limited by biochemical, genetic, as well as, environmental factors.

This thesis focuses on the study of microbial degradation of chlorophenolic pollutants by specialized bacteria in pure cultures as well as in complex systems.

The first part of this thesis started with the establishment, at a laboratory scale, of a model for the treatment of an industrial effluent from the chlorine bleaching of pulp. It was found that a stable population of microorganisms could be established that were able to decrease up to 85% the organic matter (BOD_5) present in effluent, in agreement with levels reported for mill aerated lagoons. Short, Gram negative bacilla were the main proportion of this microbial population. These microorganisms were studied, both as a population and as purified strains, for their ability to use chloroaromatic compounds as energy and carbon sources. Results showed that microorganisms, adapted to grow in the aerated lagoon models, were able to remove chlorophenols present in this effluent to levels below 200 ppb of. In contrast, introduction of the specialized

chloroorganic degrading bacterium, *Ralstonia eutropha* JMP134, allowed the degradation of chloroorganic compounds to a concentration of 100 ppm.

The second part of this work was focused on the cloning of the chlorocatechols *tfdCDEF* pathway from the pJP4 plasmid present in *R. eutropha* JMP134. This was accomplished using a chromosomal insertion system derived from the Tn5 transposon. The *tfdCDEF* genes were placed under the control of the *P_{trc}* or *P_{sal}* promoters, which are inducible by IPTG or salicylate, respectively. The expression of these constructions was assessed in *E. coli* cc118 λ pir, as well as in *R. eutropha* JMP222 and *P. putida* KT2442. Results showed that the four enzymes encoded in genes *tfdCDEF* (1,2-chlorocatechol dioxygenase, chloromuconate cycloisomerase, dienolactone hydrolase and maleylacetate reductase) were coordinately expressed under the control of these heterologous promoters. Constructions regulated by *P_{trc}* showed a basal level of expression whereas *P_{sal}* constructions required salicylate as an inducer. The expression of the four enzymatic activities allowed the efficient dechlorination of 4-chlorocatechol, 3-chlorocatechol, 3-chlorobenzoate and 3,5-dichlorocatechol. This ability was not present in the parental strains of the unmodified microorganisms.

INTRODUCCIÓN

“El mundo microbiano, a diferencia del de los organismos superiores, se caracteriza por una mayor versatilidad metabólica que le permite la colonización de un increíble rango de ambientes exóticos y hostiles. Dicha versatilidad, es por un lado, consecuencia de la riqueza de funciones metabólicas y fisiológicas que se encuentran en los microorganismos y, por otra parte, una consecuencia de su promiscuidad genética.”.. ...“Los mecanismos de transferencia de genes permiten a los miembros de comunidades microbiológicas adquirir nuevos fenotipos que les proveen de una ventaja cuando las condiciones ambientales cambian, y de aquí que sean considerados mecanismos de fundamental importancia para la adaptación a dichos cambios.” (Díaz y col., 1994).

Durante las últimas décadas, el uso masivo de compuestos químicos sintéticos (refrigerantes, desengrasantes, pinturas, solventes, herbicidas, pesticidas, preservantes, etc.), ha contribuido a la distribución global de compuestos tóxicos en la naturaleza. En prácticamente todos los sectores de nuestro ambiente (suelos, aire, agua superficial o subterránea, biota, etc.) es posible detectar a lo menos trazas de compuestos orgánicos sintéticos. Dentro de estos compuestos tóxicos los compuestos cloroorgánicos constituyen un grupo de relevancia. Si bien es cierto que el enlace carbono-cloro no es nuevo

en la naturaleza, como hasta hace poco se afirmaba, el mayor porcentaje de compuestos clorados existentes en la naturaleza lo siguen constituyendo aquellos que el hombre ha ido introduciendo durante los últimos 50 años. Estos compuestos, en especial los cloroaromáticos, son resistentes a la degradación natural, son tóxicos y bioacumulables (Chaudhry & Chapalamadugu, 1991; den Besten y col., 1994; Reineke & Knackmuss, 1988). Debido al rol fundamental que cumplen los microorganismos en la degradación de la materia orgánica en ambientes naturales, se ha centrado la atención en ellos para degradar este tipo de compuestos y lograr así la biorremediación de sitios fuertemente contaminados (Chaudhry y Chapalamadugu, 1991; Mohn & Tiedje, 1992; Timmis y col., 1994).

Se han realizado algunos estudios con hongos, especialmente con cepas ligninolíticas, para evaluar su capacidad de degradar compuestos cloroaromáticos. Estos hongos secretan H_2O_2 y una familia de peroxidasas que catalizan la oxidación y depolimerización de la lignina mediante radicales libres (Tien & Kirk, 1983). Estos estudios mostraron que dichas enzimas ligninolíticas eran capaces de oxidar algunos xenobióticos recalcitrantes, como hidrocarburos aromáticos policíclicos (Sanglard y col., 1986), fenoles policlorados (Hammel & Tardone, 1988; Roy-Arcand & Archibald, 1991) y bifenilos policlorados (Eaton, 1985). Esta capacidad degradativa parece estar en directa relación con la similitud estructural entre estos contaminantes y los

monómeros de lignina, además de la baja especificidad de las ligninasas (Brodkorb & Legge, 1992; Tien y Kirk, 1983).

Respecto a las estrategias para la degradación de compuestos cloroaromáticos por bacterias, es necesario tener presente que la metabolización completa de estos compuestos a menudo involucra su transformación hasta intermediarios que puedan ser asimilados por las rutas metabólicas del microorganismo, por ejemplo, el ciclo de los ácidos tricarbóxicos y por lo tanto, servir de fuentes de carbono. En términos generales esta transformación está ligada a la forma en la cual se eliminan los átomos de cloro, distinguiéndose aquí dos estrategias: i) la remoción temprana del átomo de cloro, para generar intermediarios que puedan ser degradados por vías comunes (este es el caso de la deshalogenación por hidroxilación, oxigenación o eliminación reductiva (Chaudhry y Chapalamadugu, 1991; Häggblom, 1992)), ii) la formación un derivado clorado, generalmente un clorocatecol, en cuya degradación el cloro es liberado luego de la ruptura del anillo (Figura 1).

Aunque la mayor parte de las reacciones de deshalogenación ocurren aeróbicamente existe una, la eliminación reductiva (Figura 1c), que se realiza en anaerobiosis. En estos casos si bien no se conoce en todo detalle el mecanismo de degradación, se ha concluido que son reacciones específicas, pues no todos los sustituyentes de un anillo pueden ser degradados (Mohn y

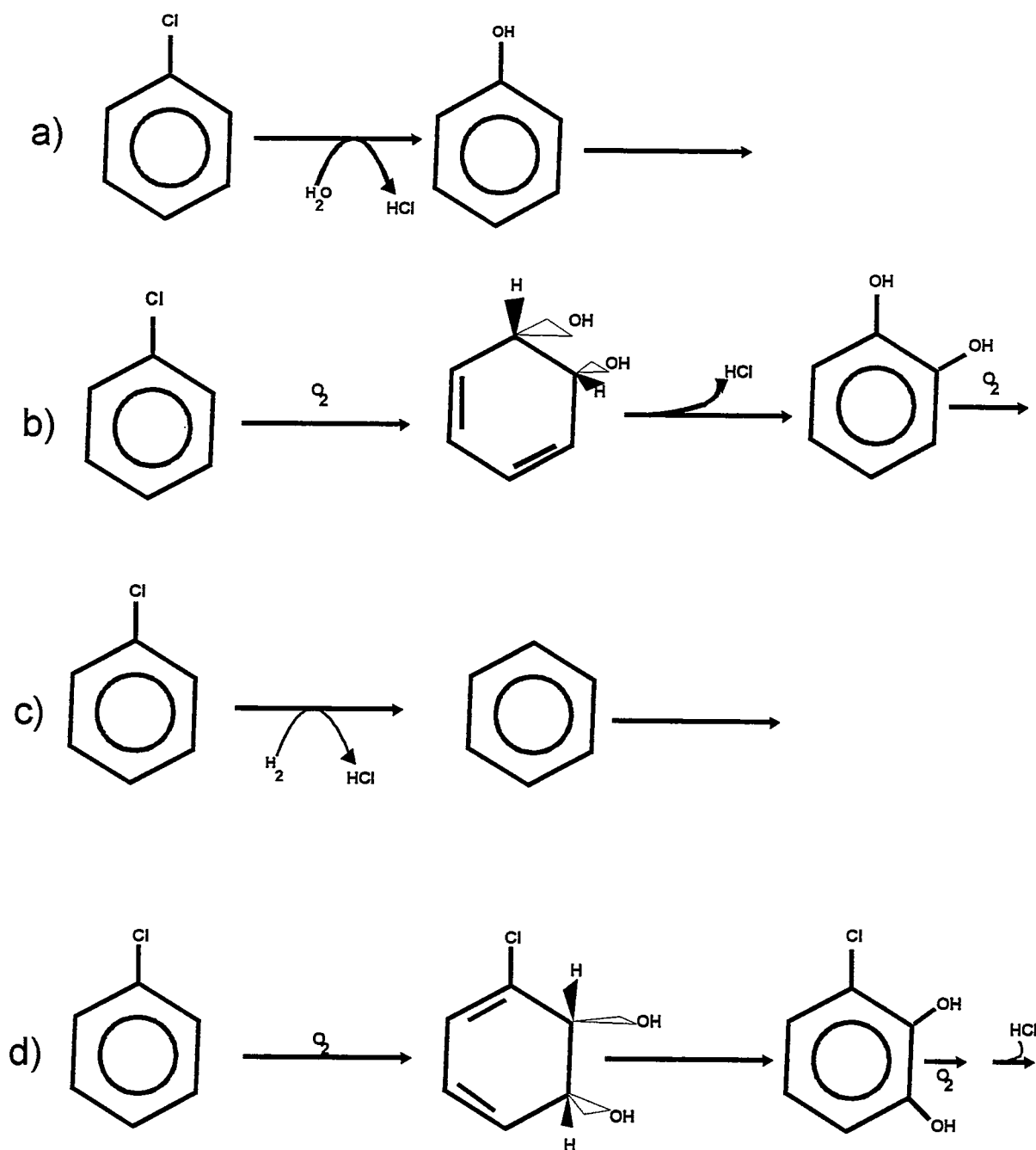


Figura 1: Mecanismos de descloración biológica de compuestos cloroaromáticos.

a) Descloración hidrolítica. b) Descloración oxigenolítica. c) Descloración reductiva. d) Descloración después de ruptura del anillo (vía *orto* modificada) adaptado de Reineke y Knackmuss, 1988.

Tiedje, 1992). Se sabe además que en general, en anaerobiosis, la degradación de los policlorados ocurre primero generando monoclorados y sólo cuando los primeros se han terminado comienza la degradación de los últimos (Reineke, 1994). Este es el caso de la degradación anaeróbica de clorobenzenos (Bosma y col., 1988; Fathepure y col., 1988); clorobenzoatos (Kuhn & Suflita, 1989; Kuhn y col., 1990; Struijs & Rogers, 1989) y clorobifenilos (Brown Jr. y col., 1987; Nies & Vogel, 1990; Quensen III. y col., 1990). Respecto a la eliminación mediante hidroxilación (Figura 1a), esta ha sido descrita sólo para clorobenzoatos en cepas de *Micrococcus* spp, *Nocardia* spp, *Ralstonia* spp. y *Arthrobacter* spp. (Klages & Lingens, 1979; Klages & Lingens, 1980; Rajasekharan y col., 1990; Shimao y col., 1989; van den Tweel y col., 1987), y para policlorofenoles (Apajalahti & Salkinoja-Salonen, 1987; Danganan y col., 1994; Kilbane y col., 1982; Li y col., 1991). En el caso de la liberación del cloro como consecuencia de un ataque oxigenolítico, por enzimas denominadas dioxigenasas (Figura 1b), este ha sido descrito para la degradación de 2-clorobenzoato y 4-clorofenilacetato, los que tras la formación del *cis*-dihidrodiol son convertidos a catecol y dihidroxifenilacetato, respectivamente (Engesser & Schultze, 1989; Fetzner y col., 1989; Fetzner y col., 1989).

Cuando el cloro no es completamente liberado antes de la ruptura del anillo, se ha descrito que se requieren dos etapas claves (Chaudhry y Chapalamadugu, 1991; Häggblom, 1992; Reineke y Knackmuss, 1988). La

primera etapa culmina, mediante transformaciones en el anillo y en las cadenas laterales de compuestos más disímiles (Figura 1d), con la formación del correspondiente clorocatecol (cloroortodihidroxibenceno). En la segunda etapa, el clorocatecol sufre una serie de reacciones que lo llevan a la formación de β -cetoadipato. Esta última secuencia ha recibido el nombre de vía de ruptura *orto* modificada o ruta de los clorocatecoles, para distinguirla de la vía de ruptura *orto* de los compuestos aromáticos no halogenados. La vía *orto* modificada se encuentra generalmente codificada en plásmidos catabólicos que varían en tamaños, grupos de incompatibilidad y mapas de restricción. Entre estos plásmidos, los más estudiados son pJP4 (el que contiene el operón *tfdCDEF*), presente en *Ralstonia eutropha* JMP134 (ex *Alcaligenes eutrophus* JMP134 (Yabuuchi y col., 1995)), que codifica para la degradación de 2,4-diclorofenoxiacetato y 3-clorobenzoato (Don & Pemberton, 1981); pAC27 (que contiene el operón *clcABDE*), presente en *Pseudomonas putida* AC866 (Chatterjee y col., 1981), que codifica para la degradación de 3-clorobenzoato y pP51 (que contiene el operón *tcbCDEF*), presente en *Pseudomonas* sp. P51 (van der Meer y col., 1991), que confiere a la cepa la capacidad de degradar di- y triclorobencenos. Sin embargo, todas estas vías guardan semejanzas estructurales y funcionales que recuerdan la vía cromosomal *cat* para la degradación de catecoles (Kukor y col., 1988) y sugieren una evolución

divergente a partir del operón cromosomal *catBC* (Chakrabarty, 1996). En la Figura 2 se esquematiza la similitud existente entre estos tres operones.

La primera de las transformaciones comunes experimentadas por los clorocatecoles es la ruptura del anillo (Figura 2) realizada por la enzima clorocatecol 1,2-dioxigenasa (TfdC, ClcA y TcbC). El producto de la ruptura (cloromuconato) es sometido a lactonización por la cloromuconato cicloisomerasa (TfdD, ClcB, TcbD), formando 4-carboximetilbut-2-en-4-olidos (Figura 2). En este proceso de ciclación un átomo de cloro es eliminado espontáneamente como cloruro y el producto es hidrolizado por una dienolactona hidrolasa (TfdE, ClcD, TcbE), generando cloromaleilacetato o maleilacetato, según si el sustrato inicial es di o monoclorado, respectivamente. Estos productos, mediante la maleilacetato reductasa (TfdF, TcbF o bien una enzima codificada cromosomalmente), son transformados a 3-oxoadipato (β -cetoadipato). En el caso del cloromaleilacetato, la misma enzima realiza dos ciclos sobre el mismo sustrato para formar el β -cetoadipato. El β -cetoadipato es llevado finalmente hacia la formación de intermediarios más sencillos que empalman en el ciclo de Krebs, permitiendo, de paso, que las bacterias usen estos compuestos como fuente de carbono y energía. Esta vía de ruptura *orto* modificada tolera hasta tres átomos de cloro como sustituyentes en el anillo aromático, siendo la diferencia entre los distintos operones la distinta afinidad que las enzimas presentan por el número y

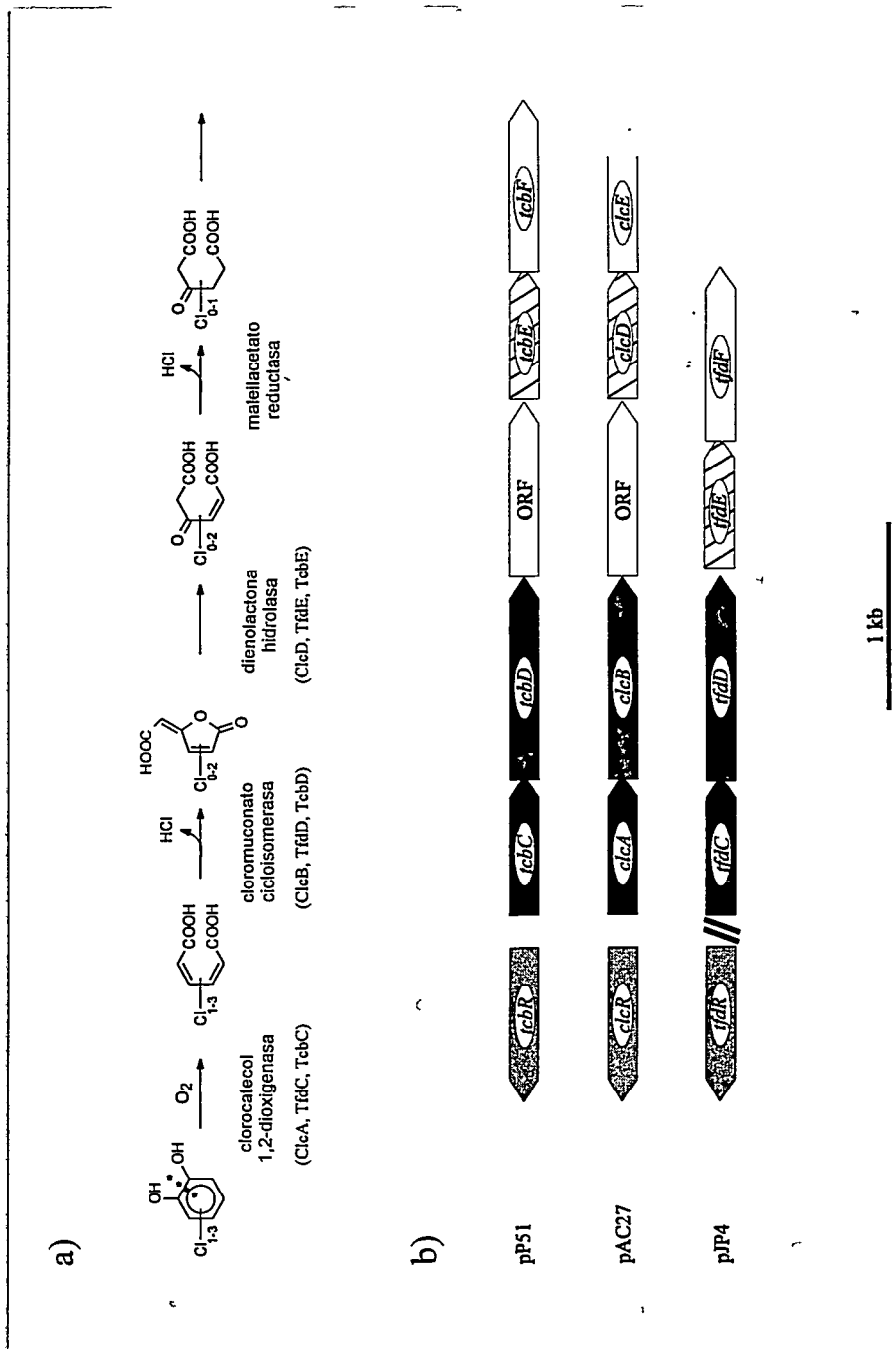


Figura 2: Enzimas y estructura de operones de los genes de la vía de ruptura orto modificada.
 En a) se indican las secuencias de reacciones de reacciones, enzimas y genes involucrados, en b) se destaca la estructura de los operones. Reproducida de Kasberg y col., 1995.

posición del sustituyente en el compuesto (Hägglom, 1992; van der Meer y col., 1992).

Pero además de la similitud de los genes estructurales, dichos operones contienen un gen regulador (normalmente un activador), el cual se ubica río arriba y en dirección opuesta a los genes estructurales, tal es el caso de los genes *catR* (en la vía cromosomal de degradación de catecoles), *tcbR* y del *ffdT*. Si tal es la similitud existente entre los distintos grupos de genes, entonces ¿dónde radica la diferencia?. Es posible pensar que, en este caso, la diversidad metabólica es producto sólo de la distinta afinidad que una enzima muestra por su sustrato. Si bien todos estos operones pueden degradar catecol (como lo realiza el operón *catBC*) estos últimos presentan una clara especialización por los clorocatecoles. Se ha descrito para las cicloisomerasas una clara especificidad de sustrato (Schlömman y col., 1990), así mientras la ClcD resulta altamente activa con monosustituidos (Ngai & Ornston, 1988), TfdD emplea mejor los muconatos disustituidos (Schmidt & Knackmuss, 1980), al evaluar la actividad de los genes del operón *ffdCDEF* frente a 3-clorocatecol y 3,5-diclorocatecol. Es por ello que a las vías de degradación de clorocatecoles se les denomina colectivamente vías de ruptura *orto* modificada. Un punto que permite analizar claramente la relación de evolución divergente que existe entre los operones para degradación de clorocatecoles y el operón *catBC* está en la secuencia de reconocimiento del producto del gen regulador. Aunque todos los genes reguladores involucrados (*clcR*, *tcbR*, *ffdR*, *ffdS* y *ffdT*)

son miembros de la familia de reguladores LysR, a la cual pertenece *catR*, el motivo LysR al cual se une CatR es del tipo G-N₁₁-A, el que no es un motivo LysR "perfecto" (T-N₁₁-A) (Parsek y col., 1994; Parsek y col., 1994). Esto se traduce en que mientras los operones *clc* y *tcb* presentan este motivo perfecto, sus genes reguladores que reconocen esta secuencia, no pueden reconocer la secuencia de su predecesor (el operón *cat*), pero CatR si puede reconocer y unirse a las regiones promotoras-reguladoras de a lo menos *clc* (Chakrabarty, 1996; Parsek, y col., 1994; Parsek, y col., 1994). La diferencia que hace importante la existencia de reguladores adicionales a CatR está una vez mas, en el substrato; es así que mientras CatR es inducido por muconato, ClcR (y se presume que los restantes reguladores) no responden a muconato, sino a cloromuconato (Chakrabarty, 1996).

Junto a cepas de *Pseudomonas*, las cepas del género *Ralstonia* (conocidas anteriormente como *Alcaligenes*) presentan la mayor capacidad para degradar una gran variedad de compuestos cloroaromáticos, entre estos, el 2,4-diclorofenoxiacetato (2,4-D) (Don y Pemberton, 1981), 3-clorobenzoato (3-CB) (Don y Pemberton, 1981; Fulthorpe & Campbell Wyndham, 1989), monoclorofenoles (Schwien & Schmidt., 1982), 4-fluorobenzoato (Schlömman, y col., 1990), diclorobenzoatos (Miguez y col., 1990), clorobifenilos (Bedard y col., 1987; Springael y col., 1993) y DDT (Nadeau y col., 1994). La cepa *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4) es una de las mejor estudiadas, debido a su capacidad para metabolizar y crecer en 3-CB, 2,4-D y otros fenoxiacetatos

(Pieper y col., 1988), fenol, 4-CF y 2,4-diclorofenol (2,4-DCF) (Pieper y col., 1989), 4-fluorobenzoato (Schlömman, y col., 1990) y, recientemente, 2,4,6-tribromofenol y 2,4,6-triclorofenol (2,4,6-TCF) (Clément y col., 1995). Posee además capacidad para deshalogenar 4-cloroguaiacol y 5-cloroguaiacol (Clément, y col., 1995; González y col., 1996) (Figura 3).

Parte de los genes necesarios para el catabolismo de estos compuestos están codificados en su plásmido natural pJP4. Este plásmido de 88 kb, conjugativo, de amplio rango de hospedero y perteneciente al grupo de incompatibilidad IncP β , posee genes esenciales para la degradación de 2,4-D y 3-CB, además de expresar resistencia a mercurio. El estudio de los genes catabólicos y su caracterización física son detallados (Don & Pemberton, 1985; Don y col., 1985; Perkins y col., 1990; Streber y col., 1987). Las vías catabólicas para el 2,4-D y 3-CB comparten enzimas comunes (Figura 4), codificadas por los genes *tfdCDEF* ya mencionados. Ambas vías incluyen entre sus primeras etapas la conversión a los respectivos clorocatecoles (3,5-DCC y 3-CC). Los productos génicos de *tfdA* y *tfdB* convierten el 2,4-D a 3,5-diclorocatecol y son únicos para la vía degradativa de este compuesto. La secuencia *tfdCDEF* está organizada en un sólo operón y codifica para las enzimas involucradas en la conversión de clorocatecol a β -cetoadipato

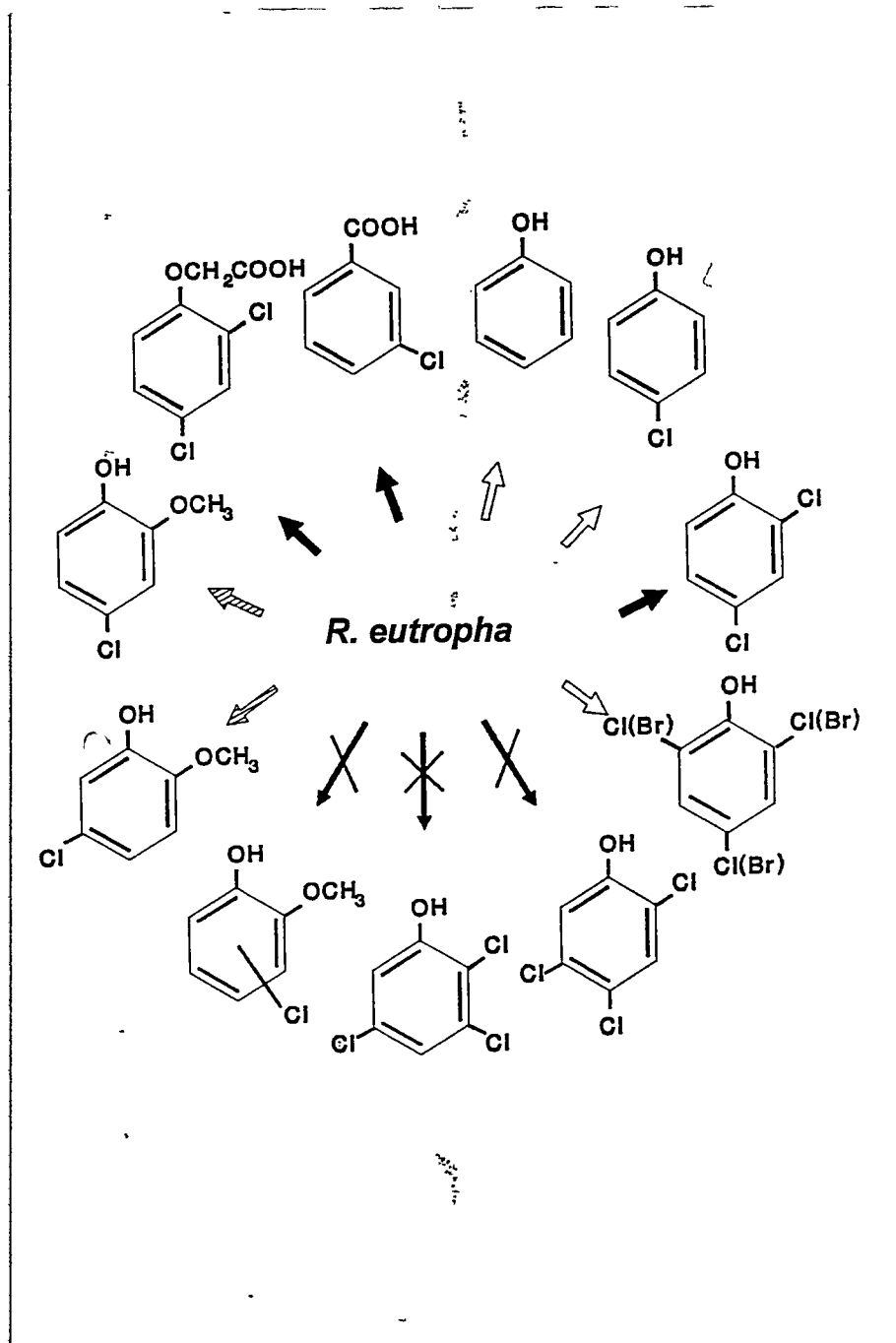


Figura 3: Versatilidad metabólica hacia compuestos cloroaromáticos de *Ralstonia eutropha* JMP134.

Las flechas sólidas representan degradación por enzimas plasmidiales (pJP4), las flechas achuradas representan degradación parcial, las flechas sin relleno representan vías cromosomales y las flechas cruzadas representan compuestos no degradados.

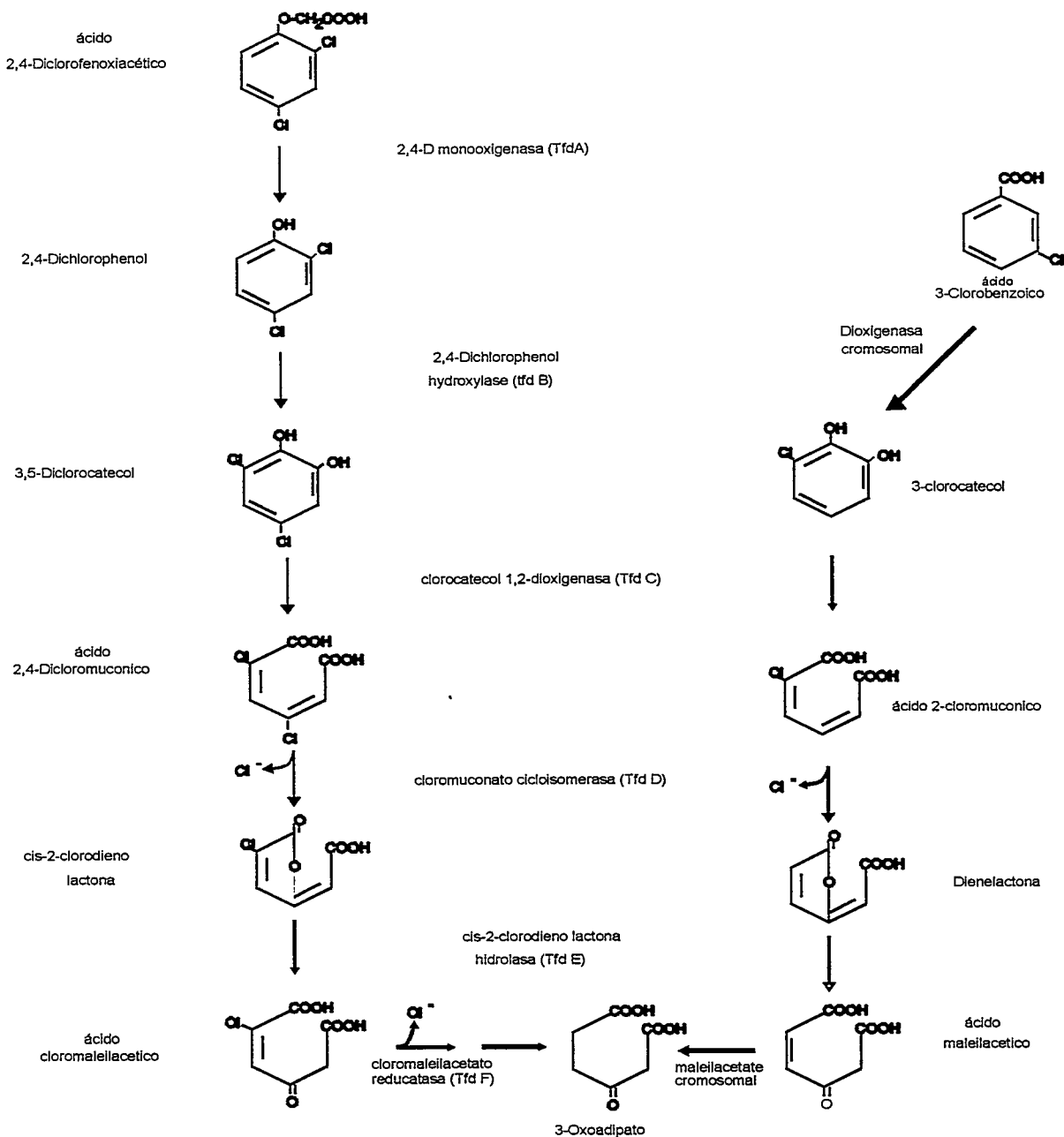


Figura 4: Vía de degradación de 2,4-D y 3CB en *R. eutropha* JMP134.

(Adaptado de Don, y col., 1985).

(Kasberg, y col., 1995; Pieper y col., 1992; Schlömann, 1994; Seibert y col., 1993). La conversión de 3-CB a 3-CC es efectuada por un par de enzimas cromosomales de baja especificidad, la benzoato dioxigenasa y la 1,2-dihidrodiol benceno dehidrogenasa (Reineke & Knackmuss, 1978).

La mayoría de los resultados ya señalados se han obtenido estudiando las cepas puras bajo condiciones de laboratorio. Sin embargo, la degradación normal de estos compuestos ocurre en sistemas mucho más complejos que lo indicado. Al respecto es posible detectar la degradación de compuestos cloroaromáticos, si bien con algunas limitaciones, en sistemas complejos donde participan una serie de parámetros ambientales (Greer y col., 1990; Kim & Maier, 1986; Parker & Doxtader, 1982; Topp y col., 1988). Así, por ejemplo, se ha demostrado que en escurridos de sitios donde se usan biocidas para evitar la descomposición de la madera, el pentaclorofenol es biodegradado sólo si la concentración no es mayor a 20 ppm. La degradación de formulaciones técnicas de pentaclorofenol, las cuales contienen otros clorofenoles, es más lenta e ineficiente (Davis y col., 1994). Se ha descrito también que es posible degradar eficientemente tri-, tetra- y pentaclorofenoles en aguas subterráneas a bajas temperaturas, siempre que la concentración de clorofenol no sea superior a 35-40 ppm (Järvinen y col., 1994).

Una situación similar se observa en la degradación de compuestos cloroaromáticos por la microbiota de suelos, ya que derivados clorados de guaiacol, catecol, veratrol y fenol son removidos después de 30 días, aunque la

velocidad de remoción y su extensión dependen de cada compuesto en particular (Brezny y col., 1992; Namkoong y col., 1989). Además, se ha visto que la exposición previa del suelo a organoclorados también tiene importancia, si bien esta correlaciona mejor con la velocidad que con el porcentaje de remoción (Joyce y col., 1992). Por otra parte, se ha demostrado recientemente que el 2,4,5-TCF es degradado por un suelo agrícola no expuesto previamente a organoclorados, y que esta capacidad es influida por la concentración del triclorofenol y por la presencia simultánea de cloroguaiacoles (Matus y col., 1996).

Se puede mejorar la degradación microbiológica de compuestos cloroaromáticos en sistemas complejos, proveyendo condiciones ambientales adecuadas. Un muy buen ejemplo es el caso de las lagunas de aireación diseñadas para la remoción de la materia orgánica degradable (DBO_5), presente en efluentes de las industrias de producción de celulosa blanqueada. Estos efluentes contienen cantidades significativas de derivados de lignina clorados, de bajo peso molecular, tales como cloroguaiacoles, clorofenoles, clorocatecoles y algunos cloroalifáticos. Se ha descrito que durante el tratamiento aeróbico de estos efluentes un 48-65% de halógeno unido a materia orgánica (AOX) es removido, y que la remoción de clorofenoles varía entre un 75-95% (Gergov y col., 1988). Sin embargo, no existen antecedentes claros sobre qué parte de esta remoción corresponde a una degradación verdadera o es solamente adsorción de los cloroaromáticos a la materia

orgánica, para terminar depositándose como sedimentos al interior de estas lagunas. Sólo recientemente se ha iniciado el estudio del rol de los microorganismos propios del tratamiento aeróbico de estos efluentes. Si bien se han identificado 193 cepas provenientes de diferentes partes del proceso (Fulthorpe & Allen, 1995; Fulthorpe y col., 1993), no es clara su participación en el proceso de remoción de cloroaromáticos.

Un enfoque más reciente en la degradación de compuestos cloroorgánicos en suelos u otros sistemas contaminados, en los cuales la capacidad degradativa está limitada, es la introducción de microorganismos de mayor potencial degradativo (Comeau y col., 1993; Fulthorpe y Campbell Wyndham, 1989; Jacobsen & Pedersen, 1992a; Jacobsen & Pedersen, 1992b). Esto requiere, por una parte, obtener cepas en el laboratorio eficientes en remover organoclorados y, por otra, evaluar si dicha capacidad se expresa en los ambientes naturales, determinando los factores que regulan y controlan dicha actividad. Estos factores tienen relación con el grado de sobrevivencia, tanto de los microorganismos agregados, como de la microbiota natural presente en el sistema, la concentración del contaminante y de otros compuestos orgánicos, la capacidad para colonizar, la transferencia de genes catabólicos, la expresión de capacidades degradativas de microorganismos endógenos, etc. En este contexto, ya se ha reportado la degradación de compuestos cloroaromáticos por *R. eutropha* JMP134 (pJP4) y otras cepas de *Ralstonia* y *Pseudomonas*, portadoras del plásmido pJP4 o plásmidos

derivados de éste, en microcosmos de suelos (Jacobsen y Pedersen, 1992a; Jacobsen y Pedersen, 1992b; Short y col., 1990). Otro buen ejemplo lo constituye la *Pseudomonas* sp. B13, aislada por su capacidad para degradar 3-clorobenzoato (Dorn y col., 1974). Cepas derivadas de B13, como la FR120 (Rojo y col., 1987), capaces de combinar la degradación de cloro y metilfenoles, gracias a la introducción del plásmido TOL, han sido evaluadas en diversos microcosmos que simulan sistemas de tratamientos por lodos activados, ríos y sedimentos de lagos (Leser, 1995; Pfarl y col., 1990; van der Meer y col., 1987).

El diseño de microorganismos mediante la combinación de rutas metabólicas distintas no está libre de inconvenientes, los que provienen en su mayoría de la incompatibilidad que en un microorganismo se pueden producir entre dos vías metabólicas dadas. Así, por ejemplo, la ruptura de un clorocatecol puede ser realizada mediante una ruptura *orto* (intradiol) o una ruptura *meta* (extradiol), pero los productos de ambas rupturas no son equivalentes y sólo los de ruptura *orto* pueden ser metabolizados, mientras que los de ruptura *meta* (normalmente asociada a metabolización de metilcatecoles) generan intermediarios que no pueden ser posteriormente metabolizados o bien son transformados en compuestos tóxicos como la protoanemonina, transformándose así en una forma suicida de metabolizar un compuesto (Pieper y col., 1996). Un caso concreto es el que resultó de ampliar las capacidades degradativas de la *Pseudomonas* sp. cepa B13 desde 3-clorobenzoato a 4- y

3,5- diclorobenzoato mediante la transferencia del plásmido TOL pWWO de *P. putida* mt-2 (Jeenes y col., 1982). Esta transferencia permitió la expresión de la enzima XylXYZ toluato dioxigenasa del plásmido TOL, enzima con un rango más amplio de sustrato que la clorobenzoato dioxigenasa de la cepa B13. Sin embargo, la presencia simultánea de las vías *orto* y *meta* en la misma cepa significó que sólo tras la inactivación de la enzima 2,3-dioxigenasa fuera posible obtener cepas capaces de crecer en compuestos cloroaromáticos como fuente de carbono (Bartels y col., 1984; Reineke y col., 1982; Rojo, y col., 1987). El otro problema asociado con esta forma (*in vivo*) de construir cepas degradadoras de compuestos organoclorados, lo constituye los problemas de regulación que conducen a la aparición de etapas limitantes, generadas por la baja expresión de una enzima dentro de la vía estructurada (inductores no del todo adecuados o diferencia de dosaje génico entre las enzimas codificadas en plásmidos y las cromosomales que están estructurando una nueva vía) o por su poca afinidad al sustrato (no es el sustrato original). La última desventaja que estas construcciones *in vivo* presentan se refiere a la inestabilidad de los plásmidos asociada a la ausencia de una presión de selección continua y a la demanda energética extra que representa la mantención del replicón, lo cual no asegura la mantención estable de las capacidades metabólicas adquiridas.

El objetivo general de este trabajo de tesis fue estudiar la degradación microbiana de contaminantes clorofenólicos por bacterias especializadas en cultivos puros y en sistemas complejos. El trabajo se enmarcó en la hipótesis

general que la complementación de capacidades degradativas, ya sea naturales o adquiridas permite el desarrollo de nuevas vías metabólicas en microorganismos, las cuales permitirán la degradación de contaminantes específicos.

Los objetivos específicos planteados fueron:

- ◆ Estudiar la microbiota presente en modelos de lagunas de tratamiento de efluentes de blanqueo de celulosa.
- ◆ Determinar las capacidades que presentan estos microorganismos para degradar o transformar cloroguaiacoles y clorofenoles, propios de estos efluentes.
- ◆ Evaluar la sobrevivencia y actividad degradativa de *R. eutropha* JMP134 cuando es expuesta al efluente de blanqueo de celulosa.
- ◆ Clonar y expresar los genes *tfdCDEF* de la vía degradación de clorocatecoles de *R. eutropha* JMP134.
- ◆ Construir cepas con nuevas capacidades metabólicas mediante transferencia de los genes *tfdCDEF*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Medios de cultivo.

1.1 Medio Luria-Bertani.

La composición de este medio fue 1 g de triptona, 0,5 g de extracto de levadura y 0,5 g de NaCl por cada 100 ml de medio. Este fue esterilizado por autoclave y almacenado a temperatura ambiente hasta su empleo. Cuando fue necesario se agregaron los siguientes antibióticos: kanamicina (Km) 50 µg/ml, tetraciclina (Tc) 20 µg/ml, cloramfenicol (Cm) 20 µg/ml, ampicilina (Ap) 100 µg/ml, estreptomicina (Sm) 25 µg/ml, rifampicina (Rf) 50 µg/ml. Las soluciones stock fueron 1000x en todos los casos.

1.2 Medio salino.

Se preparó un medio líquido conteniendo sales de fosfato y amonio, además de minerales en concentraciones trazas, el que fue empleado como medio de cultivo en aquellos experimentos en que se deseaba evaluar el uso de un compuesto específico como fuente de carbono. La composición del medio salino se encuentra descrita en la Tabla I.

Tabla I: Composición del medio salino mínimo (Adriaens y col., 1989).

Solución	Compuesto	Concentración final	Cantidad a pesar para 200 ml
K 100x	$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	7 mM	32g
	KH_2PO_4	3 mM	8g
	$(NH_4)_2SO_4$	3,8 mM	10g
M 400x	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,8 mM	16g
F 1000x	$FeSO_4$	0,2 ppm	0,4g
T 1000x	$CaSO_4 \cdot 2H_2O$	2 ppm	0,4g
	$MnSO_4 \cdot H_2O$	0,2 ppm	0,04g
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,2 ppm	0,04g
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 ppm	0,04g
	$CoNO_3 \cdot 6H_2O$	0,1 ppm	0,02g
	$NaMo_4 \cdot 2H_2O$	0,1 ppm	0,02g
	H_3BO_3	0,05 ppm	0,01g

La solución de medio salino 1x, denominada "Ksal", se prepara diluyendo las soluciones anteriores en agua bidestilada.

2. Efluente de blanqueo de celulosa.

El efluente se obtuvo de la planta Arauco (Celulosa Arauco y Constitución S. A., Chile). Esta planta produce 1.100 toneladas de pulpa diariamente. En el proceso de pulpaje y blanqueo de la celulosa, primero se saca la corteza y se producen los "chips" (madera triturada). Después se hierve toda la masa en un digestor con un pH alto, para separar lignina y hemicelulosa de la celulosa. La fracción enriquecida en celulosa entra a la etapa del blanqueo con el fin de eliminar más lignina. Una secuencia típica para el blanqueamiento con cloro es C₁E₁HD₁E₂D₂ (C-cloro, E-álcalis, D- dióxido de cloro, H-hipoclorito de sodio), (Kringstad & Lindström, 1984). En el proceso Kraft más de un 55% del peso total de la madera pasa a licor negro. A partir del licor negro se procede a la recuperación de los compuestos químicos usados. Al concentrar el licor negro la lignina y la hemicelulosa se queman para recuperar energía (ver Figura 5). El efluente producido es tratado en una laguna para tratamiento aerobio de 600.000 m³, provista de 18 plataformas de aireación, con un tiempo de retención de aproximadamente 5 días. Alrededor del 55% del efluente que es tratado en estas lagunas proviene del proceso de blanqueamiento. Los otros componentes del efluente son líquidos provenientes de otras etapas de la operación de la planta, como son el agua del lavado de troncos, de las calderas, del rebalse del sistema sanitario, etc.

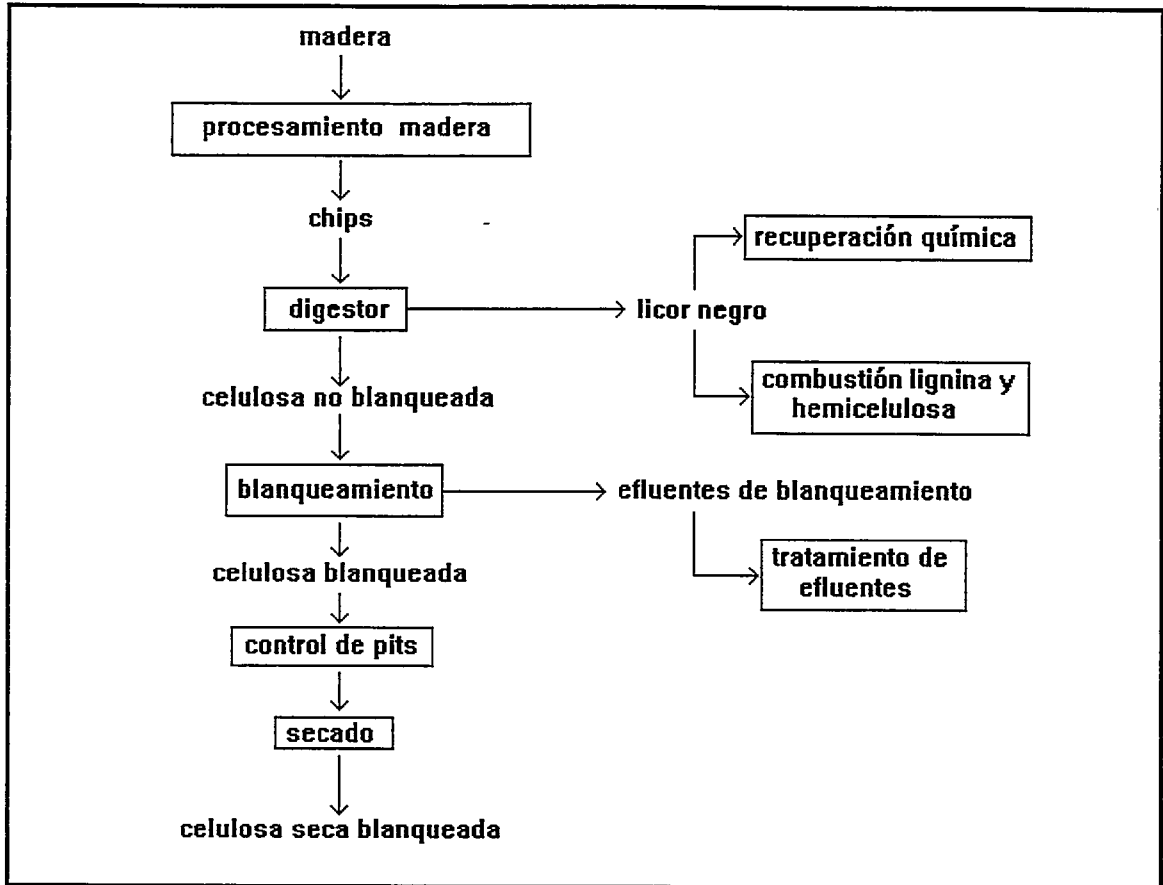


Figura 5: Esquema del proceso de producción de pulpa de celulosa blanqueada.

Los recuadros representan los distintos procesos a los que la madera es sometida para obtener pulpa, las flechas laterales indican la salida de efluentes del sistema.

El efluente total empleado en este estudio se obtuvo después de la salida del clarificador y de la cámara de mezcla, pero antes que el efluente ingrese a la lagunas de aireación, de este modo tiene un bajo contenido de sólidos en suspensión. Muestras de 80 l, colectadas en bidones plásticos cada 6 semanas, fueron enviadas al laboratorio y mantenidas a 4°C. El efluente presentó fluctuaciones de pH, DQO, DBO₅ y color entre las distintas muestras enviadas, como se resume en la Tabla II. Previo a su empleo, alícuotas de 10 l fueron ajustadas a pH 6.0 y compensadas en nitrógeno y fosfato con 60 mg de (NH₄)₂SO₄ y 11 mg de KH₂PO₄ por litro de efluente, para obtener una razón de DBO₅:N:P=100:5:1 (Mc Lean y col., 1972). El efluente compensado y mantenido a 4 °C en continua agitación, se empleó para la alimentación de los modelos de laguna de aireación montados en el laboratorio.

Para los experimentos en que se evaluaron las capacidades metabólicas de los microorganismos presentes en los modelos de laguna, se debió esterilizar por filtración el efluente de alimentación. Para ello el efluente fue ajustado a pH 7,0 y compensado en fosfato, amonio y metales trazas en la misma proporción del medio salino descrito en la sección 1.2. A continuación fue filtrado secuencialmente a través de filtros Whatman N°1, filtros de lana de vidrio (Schleicher & Schuell, Alemania), filtros de nitrocelulosa (MFS, USA) de 0,45 mm y de 0,22 mm de tamaño de poro. Esta última etapa se repitió empleando filtros estériles. Para aquellos experimentos en los que el efluente

Tabla II: Variación observada en el efluente traído de Arauco.

Fecha	rango pH	BOD ₅ (mgO ₂ /l)	DQO (mgO ₂ /l)	color
05-07-93	6.9-7.4	290±10	670±20	café claro
13-09-93	7.0-7.5	430±15	851±40	café oscuro
03-11-93	11.0-11.8	128±30	545±100	casi negro
06-01-94	8.0-9.5	252±3	990±34	café oscuro

fue usado como medio de cultivo pero en los que se evaluó la degradación de compuestos adicionados exógenamente, el efluente fue esterilizado en un autoclave.

3. Cultivo de microorganismos

3.1 Mantención de microorganismos.

Los microorganismos empleados en este estudio, que se listan en la Tabla III, fueron mantenidos en placas conteniendo agar al 1% en medio LB suplementados con antibióticos, en aquellos casos en que fue necesario, o bien placas de agar al 1% en medio salino, conteniendo un compuesto aromático como única fuente de carbono y energía. El traspaso de los microorganismos en stock se realizó cada 15 a 30 días. Todos los microorganismos empleados fueron crecidos a 30 °C, con excepción de las cepas de *E. coli* (37°C).

3.2 Diseño y construcción de microcosmos.

Cada uno de los dos microcosmos montados en el laboratorio (ver Figura 6) consistió en un estanque de fibra de vidrio de 40x30x12 cm, con un volumen efectivo de trabajo de 9,6 l. Dos placas del mismo material, ubicadas en cada tercio del largo de los estanques, los atraviesan hasta dos tercios del

Tabla III: Cepas y plásmidos usados en esta tesis.

Cepas/plásmidos	Fenotipo/genotipo relevante	Fuente
<i>R. eutropha</i> JMP134 (pJP4)	2,4-D, 3CB, Hg ^r , pJP4	DSM
<i>R. eutropha</i> JMP222	Sm, fenol	H. Knackmuss
<i>E. coli</i> cc118λpir	Δ(<i>ara-leu</i>) <i>araD</i> Δ <i>lacX74</i> <i>galE galK phoA20 thi-1 rpsE rpoB argE</i> (Am) <i>recA1</i> ; λ pir lisogen, Rif ^r	(Herrero y col., 1990)
<i>E. coli</i> DH5α	FΔ(<i>lacZYA-argF</i>) U ¹⁶⁹ (φ80 <i>lacZ</i> ΔM15) <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17</i> (r _K ⁻ ,m _K ⁺) <i>supE44</i> ; pKT230	Cepas de laboratorio (GBF-Braunschweig, Alemania)
<i>P. putida</i> KT2442	Rf, mt-2 (<i>hsdR</i>)	Cepas de laboratorio (GBF-Braunschweig, Alemania)
pCNB4	Km, Ap, NahR/P _{sal}	(de Lorenzo y col., 1993)
pCNB5	Km, Ap, LacI ^q /P _{trc}	(de Lorenzo y col., 1993)
pCNB4-JRC42	Km, Ap, NahR/P _{sal}	esta tesis
pCNB4-JRC48	Km, Ap, NahR/P _{sal}	esta tesis
pCNB5-JRC42	Km, Ap, LacI ^q /P _{trc}	esta tesis
pCNB5-JRC48	Km, Ap, LacI ^q /P _{trc}	esta tesis
pRK600	Cm, IncP, tra ⁺	(de Lorenzo, y col., 1993)
pVJE22	Tc, <i>ttfB</i> , <i>ttfCDEF</i> de pJP4	(Streber, 1987)
pUC18Not	Ap	(Herrero, y col., 1990)
pBluescript SK II	Ap	stock de laboratorio (GBF-Braunschweig, Alemania)

tra: funciones de transferencia. NahR/P_{sal}: promotor inducible por salicilato y su gen regulador (Schell & Wender, 1986). LacI^q/P_{trc}: promotor híbrido lac/trp y su gen represor (Morales y col., 1991).

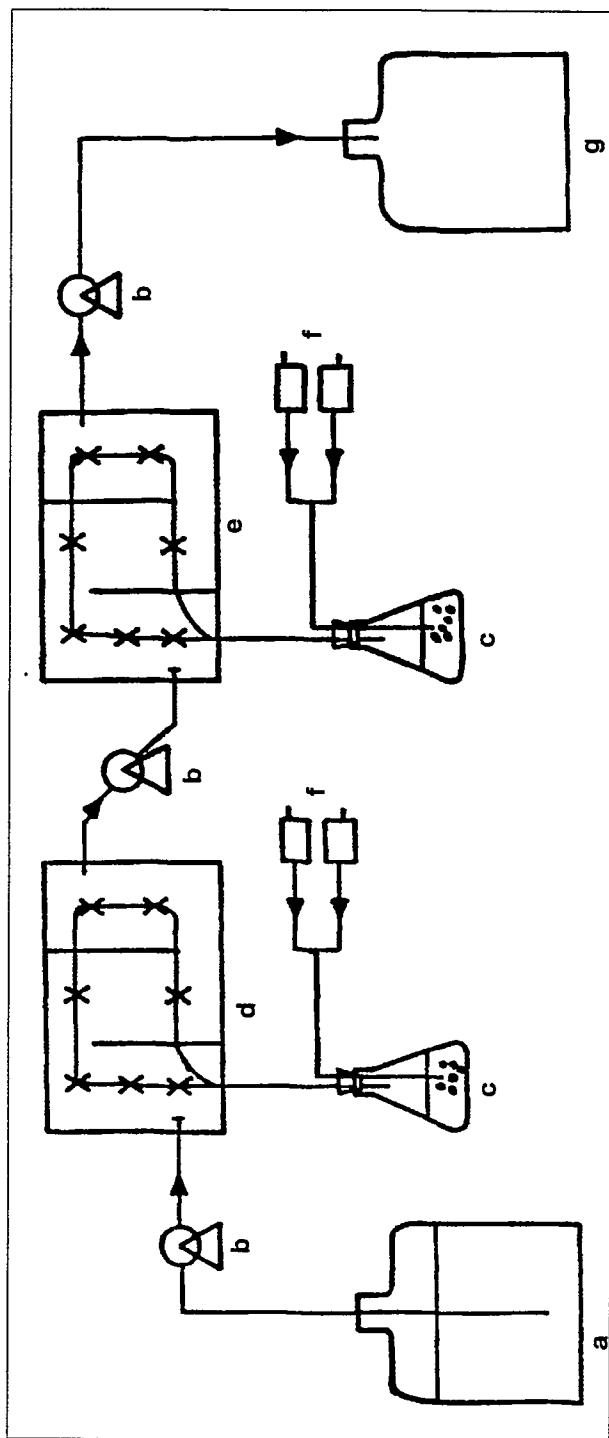


Figura 6: Diagrama de la disposición de dos microcosmos conectados en serie y sus elementos accesorios.
a) Efluente de alimentación, b) bomba peristáltica, c) sistema de humidificación del aire insuflado a los estanques, d), modelo I, e) modelo II, f) bombas de acuario para aireación de los sistemas y g) salida del efluente.

ancho total. Se aseguró así que el efluente empleara la superficie total de los microcosmos desde la entrada a la salida, ubicadas en extremos opuestos de cada estanque. La aireación fue provista por aire humedecido impulsado mediante bombas de acuario, a través de difusores. Estos difusores fueron sumergidos 5 cm en el líquido, para lo que fueron montados junto a sus respectivas mangueras de silicona (D.I.= 0,4 cm), sobre una reja puesta a 4 cm de altura (ver Figura 7). La distribución de los difusores (siete por cada microcosmos) fue definida de manera de obtener una mayor aireación en la entrada del microcosmos. El flujo total de aire para cada microcosmos fue de 3.200 cc/min. El efluente de alimentación, compensado como se indica en la sección 2, fue almacenado en una cámara a 4°C, desde donde fue hecho llegar y retirado de los microcosmos mediante una bomba peristáltica Masterflex modelo 7521-35, provista de tres cabezales. El flujo de alimentación de los modelos conectados en serie fue fijado en 1,8 ml/min para el modelo I y 1,6 ml/min para el modelo II, lo que determina un tiempo de retención hidráulica (HRT) de 3,7 y 4 días para cada modelo, respectivamente. La variación del flujo de alimentación no fue superior al 10%. Para regular las variaciones estacionales de temperatura, ambos microcosmos fueron montados al interior de un estanque de fibra de vidrio conteniendo agua termorregulada entre 20 y 25 °C.

El pH fue determinado cada 2 días durante los dos primeros meses y luego cada 15 días, utilizando un electrodo Orion 9617BN.

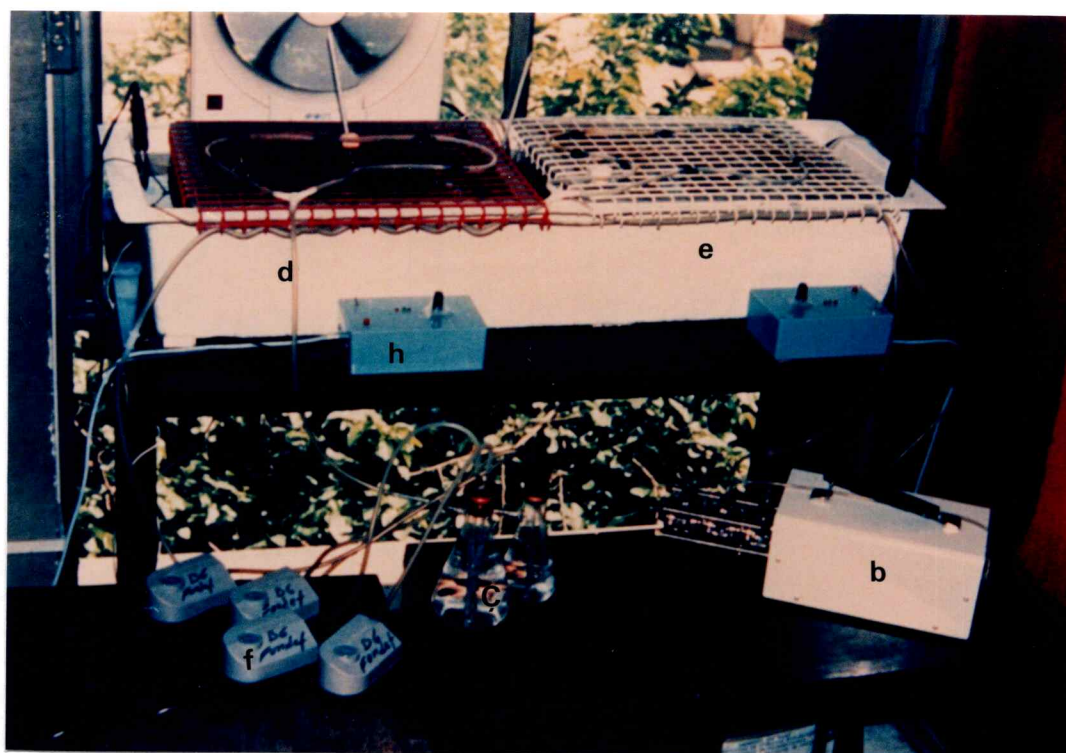


Figura 7: Fotografía de los modelos de laguna de aireación y sus elementos accesorios.

Las letras corresponden a lo descrito en la Figura 6, más h) sistema de calefacción dispuesto para los modelos. No aparecen a) y g) efluente de entrada y salida, respectivamente.

Las mediciones fueron efectuadas en cuatro posiciones en cada microcosmos, ajustándose su valor a $7,0 \pm 0,2$.

3.3 Cultivos por lotes.

Para analizar la capacidad de los microorganismos presentes en los modelos de laguna de aireación para degradar o modificar compuestos organoclorados se escogieron los siguientes compuestos: 4-clorofenol (4-CF), 2,4-diclorofenol (2,4-DCF), 2,4,6-triclorofenol (2,4,6-TCF), 2,4,5-triclorofenol (2,4,5-TCF), 2,4-diclorofenoxiacetato (2,4-D), guaiacol y fenol (pureza mayor a un 99%), los cuales fueron comprados a Sigma Chem. Co. (St.Louis, MO, USA); así como 4,5-dicloroguaiacol (4,5-DCG), 4,5,6-tricloroguaiacol (4,5,6-TCG), tetracloroguaiacol (TeCG), comprados a Helix Biotech (B.C, Vancouver, Canadá). A tubos de cultivo conteniendo 3 ml de medio salino o bien efluente estéril, se adicionaron los compuestos enumerados más arriba a una concentración final de 0,5 mM y 1,0 mM, para el medio mínimo salino o bien 0,1 mM y 0,5 mM para el efluente estéril. Estos cultivos fueron inoculados (10% del volumen de cultivo) con muestras provenientes de las salidas de ambos modelos de laguna de aireación e incubados, junto a los controles sin inocular, por 15 días en un agitador orbital a 180 rpm y 25°C. Esta misma metodología fue usada para estudiar la capacidad de clones de *R. eutropha* JMP222 y *P.*

putida KT2442 para crecer empleando 3CB 1mM como fuente de carbono y energía.

3.4 Cultivos en aireación forzada.

Matraces Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 100 ml de efluente estéril fueron cubiertos con tapones de gasa y algodón hidrófobo atravezados por una manguera de silicona (DI:0,5 cm), a través de la cual se hizo burbujear aire estéril humedecido. Estos sistemas fueron inoculados (10% del volumen) con muestras provenientes de las salidas de los modelos e incubados por 7 días a 25 °C.

En aquellos casos en que se evaluó el efecto de adicionar *R. eutropha* JMP134 o JMP222 a los efluentes, se empleó un inóculo de 10^8 ufc/ml crecido en 2,4-D (2,2 mM) o fenol (1 mM), respectivamente. Estos fueron adicionados al cuarto día de incubación de cultivos inoculados previamente con muestras de las salidas de los modelos y prolongada su incubación hasta completar siete días desde la primera inoculación. Como control se inoculó estos microorganismos sobre efluente estéril y se incubó durante siete días.

3.5 Sedimentos.

Desde la laguna de aireación existente en la planta de Arauco fueron tomadas muestras de sedimentos de la entrada y salida, aerobias y

anaerobias. Muestras tomadas entre 0.5 y 1.0 m de profundidad fueron consideradas aerobias, mientras que las muestras tomadas a 5 m de profundidad fueron consideradas anaerobias. Estas muestras fueron transportadas a Santiago en bidones plásticos y mantenidas a 4°C. Para efectos comparativos también fueron tomadas muestras del sedimento formado en los modelos montados en el laboratorio.

3.6 Obtención de biomasas a partir de los modelos de laguna.

Se colectaron 4 litros de efluente en cada una de las salidas de los modelos y fueron centrifugados a 10.000xg por 20 min. La pella de células obtenida fue resuspendida en efluente estéril y ajustada a una $DO_{660}=0.2$, empleando como blanco efluente filtrado. A la suspensión de células así obtenida se adicionó los substratos a ensayar tal como se describe en la sección 3.3.

3.7 Preparación de células competentes.

Este protocolo, descrito por Nishimura y cols. (Nishimura y col., 1990) fue empleado para preparar células de *E. coli* DH5 α y *E. coli* cc118 λ pir. Las cuales fueron las receptoras de las construcciones realizadas en pUC18Not y Bluescript SK, en el primer caso y los derivados de pUT-km para el segundo.

Para ello, un cultivo en 50 ml en LB (DH5 α) o LB más rifampicina (50 mg/ml), conteniendo 10 mM de MgSO $_4$ ·7H $_2$ O y 0,2% de glucosa (la solución de LB conteniendo MgSO $_4$ y glucosa fue designada como solución A), fue inoculado al 1% con un cultivo en LB (más antibiótico) crecido por una noche e incubado hasta fase logarítmica (DO $_{600}$ no mayor a 0,9). Una vez crecidos, los cultivos fueron enfriados en hielo por a lo menos 10 min, luego de lo cual fueron centrifugados a 1.500xg por 10 min a 4°C. La pella obtenida fue resuspendida cuidadosamente en 0,5 ml de solución A, pre-enfriado en hielo y luego se adicionó 2,5 ml de solución B (glicerol al 36%, 12% PEG (PM 7500), 12 mM MgSO $_4$ ·7H $_2$ O en LB (pH 7,0) y esterilizado por filtración). La suspensión así obtenida fue alicuotada en tubos Eppendorf (100 μ l en c/u). Las alícuotas fueron almacenadas a -70 °C sin necesidad de un rápido congelamiento en N $_2$ líquido.

3.8 Preparación de células para electroporación.

Un volumen de 500 ml de medio LB fue inoculado al 1% e incubado hasta una DO $_{600}$ aproximada a 0.9 (8 h). El cultivo obtenido fue enfriado en hielo por al menos una hora y luego centrifugado a 10.000xg por 8 min. La pella obtenida fue lavada tres veces con igual volumen de agua estéril, centrifugando como en el paso anterior. Finalmente, la pella fue resuspendida suavemente, en 1 ml de una solución 30% de polietilenglicol (PM 1000) en

agua 3x estéril y alicuotada en tubos Eppendorf (100 µl en c/u), previamente enfriados. Los tubos fueron congelados rápidamente en N₂ líquido y luego almacenados a -70 °C.

4. Análisis microbiológico.

4.1 Determinación del número de células viables.

La determinación de células viables fue efectuada en placas conteniendo agar nutriente, agar sangre, agar sólo y agar más efluente de blanqueo al 50 o 100%. Para este último medio, el efluente fue previamente esterilizado como se señala en la sección 2. 100 µl de diluciones seriadas en medio salino de las muestras provenientes de los microcosmos (10^{-3} a 10^{-6}) fueron sembradas en los medios arriba descritos e incubadas a 20 ó 30 °C. Adicionalmente, se emplearon placas de agar Saboreaud para analizar la presencia de hongos al interior de los microcosmos, así como agar McConkey, con incubación a 37 °C, para el recuento de coliformes fecales. Algunas de estas determinaciones para muestras provenientes tanto de los modelos (columna de agua y sedimentos), como de la laguna de tratamiento de la planta Arauco (entrada, salida y sedimentos) se complementaron con tinción de Gram.

4.2 Microscopía de epifluorescencia.

Estos análisis fueron realizados con la dirección del Dr. Miguel Martínez, en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción. Se empleó esta metodología para analizar la población microbiana total y viable presente en los microcosmos (Gerhardt, 1994). Para ello, se empleó naranja de acridina, sólo (para recuento total) o en presencia de ácido nalidíxico (para recuento de viables). Estas determinaciones permitieron efectuar una estimación de la población microbiana más cercana a la realidad que la determinada como unidades formadoras de colonias en placas de agar LB o medio selectivo.

4.3 Recuento de protozoos.

El recuento de protozoos se realizó empleando una cámara de Neubauer (hemocitómetro). La muestra sin fijar fue teñida con azul de metileno, lo cual no tiñe protozoos, sino que genera un fondo de contraste sobre los sedimentos presentes en el sistema. Las muestras fueron observadas empleando un objetivo 10x. Se cuantificaron cinco campos (cuadrículas) de 1x1 mm, por triplicado. Los valores promedios fueron expresados en células/ml.

4.4 Identificación preliminar de microorganismos por API 20NE.

Este es un sistema de identificación de bacilos Gram negativos distintos de enterobacterias, distribuido por BioMerièux (Marcy l'Etoile, Francia), que combina 8 pruebas bioquímicas generales junto a 12 pruebas de asimilación de sustratos. El sistema est  diseñado como una batería que se inocula empleando una solución salina en la cual se ha resuspendido una colonia de la cepa a identificar. La batería se incuba por 24 y 48 h a 30 C, tiempo luego del cual se determina la variación en el color de un indicador para las pruebas bioquímicas o el desarrollo de turbidez para las pruebas de asimilación. Las pruebas incluídas en la batería son: reducción de nitrato, formación de indol, fermentación de glucosa, hidrólisis de arginina, presencia de ureasa, hidrólisis de esculina (β -glucosidasa), hidrólisis de gelatina (por presencia de proteasas), presencia de β -galactosidasa, presencia de citocromo oxidasa y la asimilación de los siguientes sustratos: glucosa, arginina, manosa, manitol, N-acetilglucosamina, maltosa, gluconato, caprato, adipato, malato, citrato y fenilacetato.

5. Análisis bioquímico.

5.1 Preparación de extractos crudos.

Para la preparación de los extractos crudos, un cultivo de 100 a 500 ml fue crecido en medio selectivo o LB, dependiendo de la cepa o construcción a evaluar. En aquellos casos en que fue necesaria la adición de un inductor

como salicilato, éste fue adicionado a una concentración final de 1,25 mM junto al inóculo en LB e incubado por una noche. La adición de IPTG en cambio, fue a una concentración final de 1 mM y sólo tres horas antes que las células fueran cosechadas.

Los cultivos así obtenidos fueron centrifugados a 10.000xg. La pella obtenida fue resuspendida y lavada dos veces con igual volumen en tampón 50 mM Tris-acetato pH 7,5 conteniendo 1 mM $MnCl_2$. A continuación, la pella fue resuspendida en 5 ml del mismo tampón de lavado y sometida a ruptura por sonicación (Vibracell, 90% de intensidad aplicado en 4 ciclos de 30 s, con 30 s de descanso). El producto obtenido de la sonicación fue sometido a ultracentrifugación (85.000xg en rotor Ti65) en una ultracentrífuga Beckman L-80, por 40 min y el sobrenadante obtenido empleado directamente para los ensayos de actividad enzimática descritos en la sección 6.6.

5.2 Descloración por suspensiones celulares.

Para la preparación de las suspensiones celulares, matraces de 2 l, conteniendo 750 ml de medio LB, benzoato (2 mM), 3-clorobenzoato (3 mM) o 2,4-diclorofenoxiacetato (2 mM), fueron inoculados al 1% con la cepa o construcción a evaluar. En aquellos casos en que se necesitó, se adicionó kanamicina (50 $\mu g/ml$) al cultivo, así como los inductores salicilato (1,25 mM) o IPTG (1 mM), tal como se indicó en la sección 5.1. Una vez que los cultivos

alcanzaron una DO_{660} de 0,8 a 1,3 (al cabo de un día para cultivos en medio rico, ó 2-3 días para medio mínimo), éstos fueron centrifugados a 10.000xg y lavados dos veces con tampón 50 mM Tris-acetato pH 7,5. Las células así obtenidas fueron resuspendidas a una DO_{660} equivalente a 15 - 20, para los ensayos de punto final y equivalente a 5 para los ensayos de cinética de descloración. Alícuotas de 10 ml de dichas suspensiones celulares fueron incubadas con 3CB (1 mM), 3CC (0,5 mM), 4CC (0,5 mM) y 3,5DCC (0,5 mM). A intervalos de 1, 2, 3, 4 y 5 h, para cinética y al día siguiente para ensayos de punto final, se tomaron alícuotas de 300 μ l en duplicado y fueron empleadas para cuantificar cloruro liberado por el método espectrofotométrico descrito en la sección 8. Los valores finales de descloración de 3-CB fueron calculados restando el valor obtenido para la cepa parental (*R. eutropha* JMP222 o *P. putida* KT2442), ya que la transformación de 3-CB a 3-CC por dichas cepas produjo un oscurecimiento del medio de incubación el cual generó un valor de lectura de cloruro equivalente a un 30% de descloración.

6. Análisis químico.

6.1 Barrido espectrofotométrico.

Para determinar la presencia de compuestos orgánicos, 500 μ l de los sobrenadantes de los medios de cultivo (a pH neutro) fueron extraídos con 500 μ l de acetato de etilo. A 300 μ l de la fase orgánica que se recuperó

después de centrifugar, se realizó un barrido espectral en el rango 200 a 400 nm, en un instrumento Hewlett Packard HP 8452-A, provisto de un sistema de arreglo de diodos. Los espectros UV obtenidos fueron comparados con los espectros obtenidos de las soluciones acuosas de los compuestos puros, extraídos a pH neutro con acetato de etilo. Las extracciones se realizaron a pH neutro de modo de no extraer los cromóforos presentes en el efluente que dificultan el análisis directo de los sobrenadantes. La línea base fue ajustada empleando acetato de etilo.

6.2 Cromatografía gaseosa.

Alícuotas de 50 ml de efluente proveniente de los cultivos en aireación forzada (ver sección 3.4), fueron derivatizadas *in situ* con anhídrido acético y extraídas con 20 ml de hexano. La fase orgánica así obtenida fue concentrada a 500 μ l por evaporación en corriente de nitrógeno, de los cuales 1 a 3 μ l fueron analizados en un sistema GC-MS Hewlett Packard, modo SIM, constituido por un cromatógrafo de gases HP 5890 serie II, acoplado a un detector de masa HP-5972A. Se empleó una columna capilar de 30 m (DI: 0,25 mm), HP5 - fenilmetilsilicona. La temperatura del inyector fue de 260°C. El programa de temperatura para la columna fue de 100 a 250 °C, con un incremento lineal de 4 °C/min. Estas determinaciones fueron realizadas por Leonidas Cárdenas y Leandro Padilla, en la Unidad de Bioquímica Celular y

Genética, de la Facultad de Ciencias Biológicas en la P. Universidad Católica de Chile.

6.3 Determinación de la demanda química de oxígeno (DQO)

La cuantificación de la materia orgánica total presente en una muestra fue efectuada empleando las soluciones que para tal efecto distribuye Merck Química Chilena Soc. Ltda. Esta técnica se basa en la oxidación completa de la materia orgánica con una solución concentrada de dicromato de potasio, determinando espectrofotométricamente a 585 nm la absorbancia del reactivo oxidante remanente. La lectura se compara con una curva de calibración hecha con una solución de ftalato ácido de potasio como estándar. Para ello se procedió a incubar diluciones del efluente en agua, junto a los reactivos de oxidación, en tubos de 15 ml con tapa rosca, a 120 °C por 2 h. Al cabo de este tiempo la absorbancia de las soluciones fue determinada en un instrumento Spectronic 20, cuyas cubetas fueron mantenidas a baño maría (60°C) para evitar la precipitación de las reacciones, lo que sucede al enfriarse éstas por bajo 50°C.

6.4 Determinación de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO₅).

El efecto de los microorganismos sobre la materia orgánica fácilmente degradable presente en el efluente (principalmente residuos de carbohidratos)

fue evaluado por la disminución de la DBO_5 . Esta fue estimada cada 7 ó 15 días usando procedimientos establecidos (Anónimo, 1985). Las botellas de 300 ml (V_{total}) para DBO fueron incubadas a 23 ± 2 °C, en oscuridad, conteniendo 4 ml ($V_{muestra}$) de efluente diluido en medio salino no estéril, sin inóculo adicional. El oxígeno disuelto fue medido en mg O_2/l a 0 y 5 días ($[O_2]_0$ y $[O_2]_5$) con un electrodo para oxígeno (Orion 97-08-99 o Jenway 9010), conectado a un medidor Orion 420A. Con los valores obtenidos se determinó el consumo de O_2 necesario para la degradación de la materia orgánica presente en un litro de efluente. Se empleó como control abiótico (blanco) una botella para DBO conteniendo sólo medio salino, cuya disminución de O_2 disuelto después de 5 días no sobrepasó el 10%.

Para el cálculo de la DBO_5 se empleó la siguiente fórmula:

$$DBO_5 = \{([O_2]_0 - [O_2]_5 - ([O_2]_{blanco,0} - [O_2]_{blanco,5}))\} * \frac{V_{total}}{V_{muestra}}$$

6.5 Mineralización de clorofenoles marcados con ^{14}C .

Para determinar la capacidad microbiana de mineralizar (transformar a CO_2) clorofenoles se emplearon dos compuestos marcados con ^{14}C : ^{14}C -UL-2,4-TCF (8.42 mCi mmol⁻¹), y ^{14}C -UL-2,4,5-TCF (4.4 mCi mmol⁻¹), los cuales fueron

comprados a Sigma Chem. Co. (St.Louis, MO, USA). Estos compuestos también fueron usados para efectuar un balance de masas en los sistemas complejos. Para ello, 50 ml de los cultivos obtenidos por aireación forzada al cabo de siete días fueron transferidos a matraces Erlenmeyer de 150 ml, a los que se adicionó 2,4-DCF en concentración final de 0,5 mM o 2,4,5-TCF (0,1 mM) más 10.000 cpm de compuesto marcado. Estos matraces fueron cerrados con tapones provistos de una entrada y una salida para insuflar aire, e incubados en un agitador orbital a 180 rpm y 25°C. Al cabo de 3 h, 1, 3, 6 y 10 días se insufló aire a los cultivos, haciendo pasar el aire expelido de los matraces por viales conteniendo líquido de centelleo con etanolamina, lo cual permitió fijar el $^{14}\text{CO}_2$. La aireación se realizó durante 10 min. Los viales fueron contados durante 2 min en un contador de centelleo líquido Beckman modelo LS 5000 TD de la Unidad de Bioquímica Celular y Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas. La mineralización se expresó como porcentaje respecto a las cuentas agregadas inicialmente. El líquido de centelleo fue preparado de la siguiente manera: 2 g de PPO y 0.05 g de POPOP se disolvieron en 500 ml de tolueno, luego sobre esta solución se agregaron 400 ml de metanol y 100 ml de etanolamina. Para el balance de masas al término de la incubación se tomaron 10 ml del cultivo, se filtraron por filtros MFS de 0.2 μm , el filtro se secó y luego se sumergió en un vial con líquido de centelleo. También se tomó 1 ml del filtrado y se adicionó a un vial con líquido de centelleo. Para disolver la fase acuosa fue necesario agregar 1 ml de Arkopal.

Por otro lado, se cargaron aproximadamente 1.000 cpm de 2,4,5-TCF radioactivo directamente en un filtro para determinar si éste producía algún tipo de interferencia en la medición al ser sumergido en el mismo vial (quenching), no detectándose interferencia con el conteo. De esta manera fue posible realizar un balance de masa expresado como porcentaje de la marca total que se encontraba asociada a compuestos solubles, asociada a las células y como CO₂. En estos experimentos se incluyó a modo de control positivo un cultivo de *R. eutropha* JMP134 crecido en 2,4-D 2,2 mM con aireación forzada, el cual mineralizó 2,4-DCF.

6.6 Ensayos de actividad enzimática.

El siguiente ensayo, concebido como una cinética de transformación completa de un clorocatecol (3CC, 4CC o 3,5DCC), registrado mediante barrido espectrofotométrico, fue montado en el laboratorio con la ayuda del Dr. Dietmar Pieper (GBF, Braunschweig-Alemania). Se basa en que en presencia de un extracto crudo conteniendo las cuatro actividades enzimáticas a determinar, esto es, clorocatecol-1,2-dioxigenasa (TfdC), cloromuconato isomerasa (TfdD), dienolactona hidrolasa (TfdE) y maleilacetato reductasa (TfdF), el producto generado por una enzima funciona como sustrato *in situ* para la siguiente enzima, siempre que en la cubeta se encuentren presentes iones Mn⁺²,

requeridos por la segunda enzima (TfdD) y NADH, cofactor de la última enzima (TfdF). Los espectros del clorocatecol, el cloromuconato y el maleilacetato son claramente diferenciables, como se muestra en la Figura 8. La variación de absorbancia para el máximo de absorbancia del cloromuconato (A1, Figura 8) dividido por el tiempo necesario para lograr dicha transformación a partir del clorocatecol (T1-T, Figura 8) fue la base para el cálculo de la actividad específica de clorocatecol-1,2-dioxigenasa. La absorbancia obtenida al máximo del espectro del maleilacetato o del cloromaleilacetato (A2, Figura 8) dividida por el tiempo transcurrido entre el espectro que generó el máximo de absorbancia para el cloromuconato (T1) y el (cloro)maleilacetato (T2) permitieron calcular la actividad conjunta de la cloromuconato cicloisomerasa y dienolactona hidrolasa. Finalmente, al suministrar NADH como cofactor y extracto crudo fresco a la mezcla ya incubada, fue posible determinar la actividad de la maleilacetato reductasa (MAR) por disminución de absorbancia

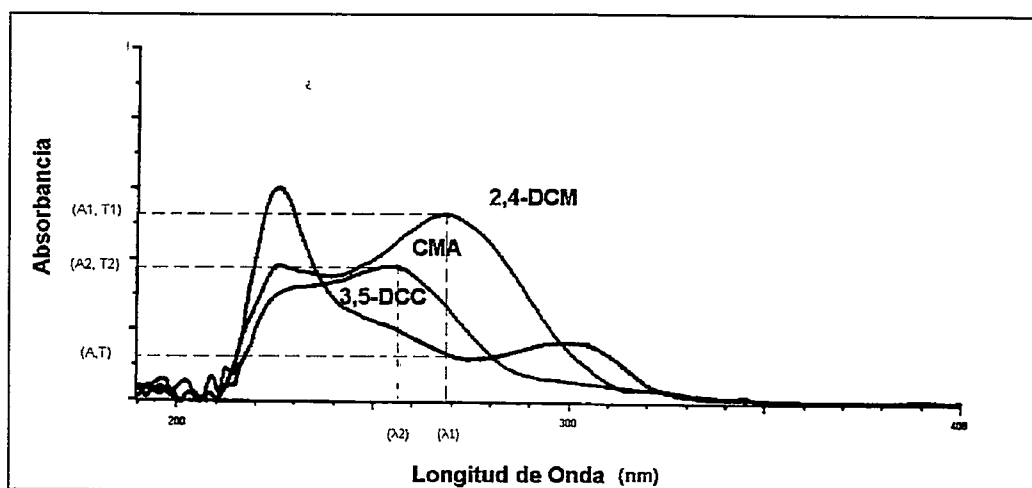


Figura 8: Espectros de 3,5-DCC; 2,4-DCM y CMA generados en un mismo ensayo enzimático por un extracto crudo de *R. eutropha* JMP134.

a 340 nm, como consecuencia de la oxidación del NADH. Las expresiones matemáticas fueron:

$$\text{Actividad de TfdC} = \frac{A1}{T1 - T}$$

$$\text{Actividad de TfdDE} = \frac{A2}{T2 - T1}$$

$$\text{Actividad de MAR} = \frac{A340nm}{T}$$

Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que transforma un micromol de sustrato por minuto. Experimentalmente se procedió con el siguiente protocolo: en una cubeta de cuarzo (paso de luz 1 cm), conteniendo tampón 50 mM Tris-acetato pH 7,5 y 1 mM MnSO₄, para generar 1 ml de volumen final, se adicionó 3 a 10 µl del extracto crudo, y con esta mezcla se ajustó el cero al espectrofotómetro (en modo combinado cinético y barrido espectrofotométrico). Para iniciar la reacción se adicionó 3CC, 4CC ó 3,5DCC (pureza mayor a un 95%, Helix Biotech. Corp., Vancouver, B.C. Canadá), a una concentración final de 50 µM (2,5 µl de una solución stock 20 mM preparado fresco), a esta mezcla se realizó un barrido espectrofotométrico cada 30 s, durante 15 a 60 min. Las gráficas obtenidas fueron usadas para calcular las actividades específicas

como se describe más arriba, usando los coeficientes de extinción molar incluidos en la Tabla IV.

Para determinar la actividad enzimática de maleilacetato reductasa, el sustrato (maleilacetato y cloromaleilacetato) fue generado *in situ* a partir de 10 ml de tampón 50 mM Tris-acetato pH 7,5 y 1 mM MnSO_4 , conteniendo 50 μM final de 4-CC (para generar el maleilacetato) o 50 μM de 3,5DCC (para generar el cloromaleilacetato) y 100 μl de extracto crudo de *R. eutropha* JMP134, crecida en 2,4-D. Después de una hora de incubación a temperatura ambiente el extracto adicionado estaba inactivo, lo que se comprobó cuando a 1 ml de la mezcla de reacción se le adicionó 200 μM NADH final (10 μl de una solución 20 mM stock) y se registró a 340 nm la disminución de absorbancia. Una vez comprobado que el extracto crudo presente estaba inactivo, la mezcla de reacción fue empleada para determinar en presencia de NADH la actividad de extracto fresco adicionado a la cubeta.

7. Cuantificación de proteínas.

La concentración de proteínas presentes en los extractos fue determinada por el método de Bradford (Bradford, 1976), empleando el kit que distribuye BioRad. Brevemente, 1 a 5 μl de extracto crudo fueron adicionados a un volumen final de 1 ml a los cuales se adicionó 200 μl del reactivo incluido en el kit. Después de incubar por 10 min, las muestras fueron leídas a 595 nm

Tabla IV: Coeficientes de extinción molar empleados para el cálculo de actividades específicas.

Substrato	Longitud de onda (nm)	ϵ ($\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	Referencia
cis,cis-muconato	260	16.800	(Dom y Knackmuss, 1978)
2-cloro-cis,cis-muconato	260	17.100	(Dom y Knackmuss, 1978)
3-cloro-cis,cis-muconato	260	12.400	(Dom y Knackmuss, 1978)
2,4-dicloro-cis,cis-muconato	260	5.800	(Vollmer y Schlömann, 1995)
maleilacetato	240	6.000	este trabajo
2-cloromaleilacetato	240	6800	este trabajo

en un espectrofotómetro y la concentración calculada al interpolar en una curva realizada entre 0 µg/ml y 10 µg/ml con BSA.

8. Cuantificación de cloruro liberado.

El método espectrofotométrico empleado en la cuantificación de cloruro liberado está basado en el método de tiocianato de mercurio (Florence & Farrar, 1971; Hammel y Tardone, 1988). Para ello, alícuotas de 400 µl de la solución a cuantificar fueron mezclados con 300 µl de una solución 5,25 M de ácido perclórico preparada en 0,375 M de nitrato férrico, a lo cual se adicionó 300 µl de una solución de etanol saturada en tiocianato de mercurio II. Después de incubar por 5 min, la mezcla resultante fue medida a 460 nm y el valor de absorbancia obtenido interpolado en una curva de calibración realizada entre 0 mM y 1 mM de NaCl.

9. Técnicas de biología molecular.

9.1 Extracción de DNA plasmidial.

Fue realizada empleando el kit QIAprep Spin Plasmid (QIAGEN Inc., Chatsworth, CA, USA). Este kit se basa en el método de lisis alcalina descrito por Birnboim y Doly (Birnboim & Doly, 1979) y en la unión específica del DNA a sílica cuando existe una elevada concentración salina. El protocolo consta de tres etapas: obtención de un sobrenadante de lisis claro, adsorción del DNA a una columna y el lavado, con posterior elución del DNA de esta columna. Tres

a cinco ml de un cultivo en medio LB más antibiótico inoculados con una colonia, fueron crecidos por una noche en agitación (180 rpm y 37°C). Después de centrifugar (14.000 rpm por 2 min) la pella fue resuspendida en 250 µl tampón P1 (conteniendo 35 U/ml de RNasa A); a los cuales se adicionaron 250 µl de tampón P2 conteniendo NaOH y SDS, para producir la lisis alcalina. Tras incubar a temperatura ambiente por 5 min, se adicionó 350 µl de tampón N3, el cual produce la neutralización de la solución de lisis permitiendo la renaturación del DNA plasmidial mientras que el DNA cromosomal y las proteínas continúan denaturados debido al contenido de SDS presente en el medio de reacción. Después de agitar los tubos, estos fueron incubados en hielo otros 5 min. Concluida la incubación, los tubos fueron centrifugados en una microcentrífuga Eppendorf por 10 min. El sobrenadante de lisis que se obtuvo (fin de la primera etapa) fue transferido a las columnas suministradas en el kit (QIAprep Spin columns), las cuales contienen partículas de sílica a las cuales se une específicamente el DNA, en presencia de una elevada concentración salina (suministrada por los tampones anteriores). Las columnas fueron centrifugadas por 30 s, al cabo de lo cual, tras remover el filtrado, fueron lavadas con 500 µl de tampón PB y después de una nueva centrifugación, lavadas con 750 µl de tampón PE. Este último contiene etanol, lo que tras una nueva etapa de centrifugación permitió el secado del DNA para su posterior elución con 100 µl de tampón TE 1x (10 mM Tris-HCl; 1mM EDTA; pH 8,0). La

composición exacta de los tampones P1, P2 y N3 no es revelada por QIAGEN. El método resultó simple con un elevado rendimiento para replicones ColE1, como pUC18 y pBluescript SK II, y proporcionó una preparación limpia lista para cualquier uso.

El protocolo anterior también fue usado como base para recuperar DNA después de ser digerido por enzimas de digestión, en aquellos casos en los cuales el empleo de una segunda enzima de digestión requiere un tampón completamente distinto al primero, o bien para concentrar preparaciones digeridas de pJP4, previo a emplearlas para ligación. Para ello el protocolo fue modificado de la siguiente manera: se adicionaron por cada volumen de DNA a concentrar, cinco volúmenes de tampón PB, tras homogeneizar la solución fue cargada en una columna, centrifugando por 30 s para la remoción de la fase acuosa y dejando el DNA unido a la columna. Desde este punto se continuó de acuerdo a lo descrito en el protocolo anterior. Tras el secado del DNA éste, aun unido a la columna, fue resuspendido en un volumen de tampón TE 1x no inferior a 50 μ l para permitir así su recuperación por centrifugación desde la columna.

9.2 Detección y aislamiento de plásmidos de gran tamaño.

Este protocolo está basado en el método descrito por Kado y Liu (Kado & Liu, 1981). El protocolo fue adaptado para detectar la presencia del plásmido

pJP4 en *R. eutropha* JMP134. Este protocolo no permite la purificación del plásmido en cuestión puesto que en todo momento co-purifica con el DNA cromosomal. Para ello, la pella obtenida después de microcentrifugar (5 min a 14.000 rpm) 1 ml de cultivo en medio mínimo conteniendo 3CB (5 mM) o 2,4-D (2 mM), fue resuspendida en 100 µl de tampón E (40 mM Tris-acetato, pH 7,9 y 2 mM EDTA). A la suspensión anterior, se adicionó 200 µl de solución de lisis (3% SDS, 50 mM Tris, pH 12,6). Tras mezclar, los tubos fueron incubados a 65°C por 1 h. Posteriormente la solución obtenida fue extraída con dos volúmenes (600 µl) de fenol-cloroformo (1:1). Tras agitar para emulsionar, los tubos fueron centrifugados por 10 min a 14.000 rpm. El sobrenadante que se obtuvo fue nuevamente extraído con 500 µl de cloroformo y luego de una nueva etapa de centrifugación, la fase acuosa fue analizada directamente en un gel de agarosa al 0,7 % en TAE1x y sometido a un campo electroforético de 100 V (50 a 80 mA) por 45 min. Una vez corrido el gel, éste fue teñido en una solución de bromuro de etidio por 10 min y fotografiado empleando una cámara DS34 Polaroid (Sao Paulo, SP, Brasil), acoplada a un cono 0,85x, empleando películas Polaroid 667 (ISO 3000/36°).

Este protocolo también fue empleado para obtener una preparación enriquecida en pJP4 y libre de DNA cromosomal. Dado que no dió buen resultado realizar un escalamiento del protocolo, se optó por incrementar el número de minipreparaciones realizadas. En este caso, la solución acuosa obtenida al final del protocolo (alrededor de 10 ml), fue concentrada mediante

extracción con iguales volúmenes de dietil éter (2 a 4 veces). La solución acuosa obtenida (alrededor de 1,5 ml) fue dializada en bolsas de diálisis contra 1 l de tampón TE 1x durante 1 h. Al cabo de ello, el dializado fue cargado en un gel preparativo (1% agarosa en TAE 1x) que contenía también un bolsillo analítico. Después de realizada la electroforesis (100 V por 45 min), la parte del gel conteniendo el bolsillo analítico fue cortado y teñido con una solución de bromuro de etidio. Realizado ésto y por comparación con la migración en el gel analítico, el gel preparativo fue cortado para obtener el fragmento conteniendo sólo el plásmido libre del DNA cromosomal (éste por su tamaño migra por sobre el DNA cromosomal). El fragmento de agarosa así obtenido fue electroeluido (ver sección 9.5).

9.3 Restricción, desfosforilación y ligación del DNA.

Las reacciones de restricción, desfosforilación y ligación del DNA fueron realizadas siguiendo protocolos estándar (Ausubel y col., 1992). Las enzimas empleadas en esta tesis fueron: *Eco* RI, *Sfi* I, *Sst* I, *Sal* I, *Hind* III, *Bam* HI, *Kpn* I, *Xba* I, *Hinc* II, *Hpa* I, *Pvu* II, *Pst* I, *Not* I, *Sma* I, T4 DNA ligasa y fosfatasa alcalina (CIAP) compradas a Gibco-BRL (Gaithersburg, MD, USA); *Pml* I y *Dra* I compradas a New England Biolabs (Beverly, Ma, USA). Como estándar de DNA se emplearon: DNA "Ladder" (500 pb a 12 kb), λ DNA digerido con *Bst* EII

(117 pb a 23,13 kb) y λ DNA digerido con *Hind* III (125 pb a 23,13 kb) comprados a Gibco-BRL y New England Biolabs.

9.4 Extracción con fenol y precipitación de DNA

Este procedimiento fue empleado para remover enzimas de restricción que no pueden ser inactivadas por calor (*Bam*HI, *Eco* RI, *Hpa* I, *Pvu* II). Para volúmenes menores a 30 μ l, se obtuvo una buena recuperación cuando la extracción fue realizada en tubos Eppendorf de 500 μ l. Brevemente, se adicionó un volumen de fenol por volumen a extraer. Tras emulsionar se centrifugó por 4 min a 14.000 rpm y la fase acuosa fue recuperada y extraída con un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (20:1) y medio volumen de fenol. Tras centrifugar nuevamente y recuperar la fase acuosa, ésta fue extraída con un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (20:1). Luego de centrifugar y recuperar la fase acuosa se adicionó un décimo de volumen de acetato de sodio 3M (pH 5.2 a 5.6) y 2 volúmenes de etanol frío (mantenido a -20°C) incubando los tubos por 20 min a -20°C, o por 10 min a -70°C. Finalmente los tubos fueron centrifugados por 10 min a 14.000 rpm ($T^{\circ} \leq 4^{\circ}C$) y la pella, tras ser lavada con 750 μ l de etanol 70% (mantenido a -20°C) fue secada en un equipo SpeedVac por 2 min y resuspendida en 10 μ l de TE1x.

9.5 Electroelución de DNA.

Esta metodología fue empleada para obtener fragmentos de DNA contenido en geles de agarosa. Para ello, el fragmento de agarosa fue introducido con la ayuda de una pinza al interior de una bolsa de diálisis, tratando de remover todo el aire contenido entre la bolsa de diálisis y el fragmento de agarosa. Se adicionó TAE 1x en cantidad suficiente para tener una delgada película en torno al fragmento de agarosa (100 a 300 μ l). La bolsa de diálisis fue cerrada con pinzas, introducida en una cámara de electroforesis (Gibco-BRL Horizon 58) y mantenida sumergida en TAE 1x, en posición paralela al campo eléctrico aplicado por medio de la misma navecilla para geles de la cámara. En estas condiciones se aplicó un campo eléctrico (100 V por 30 min), al cabo del cual se invirtió la polaridad del campo por sólo 30 s, para liberar el DNA de la bolsa de diálisis. Finalmente se recuperó la solución de TAE 1x al interior de la bolsa de diálisis conteniendo el DNA. Previo a usar bolsas de diálisis para dializar o electroeluir DNA éstas fueron rehidratadas en tampón TE 1x por 15 min y posteriormente hervidas en la misma solución por 30 min. Tras esto fueron enfriadas y lavadas exhaustivamente con nuevo tampón TE 1x. En estas condiciones, las bolsas de diálisis también fueron almacenadas a 4 °C por un tiempo no superior a una semana.

9.6 Amplificación de DNA por PCR.

9.6.1 Diseño de partidores.

Conocida la secuencia del operón *tfdCDEF* (Don y Pemberton, 1985), se construyeron partidores para cubrir el operón completo, designados BDO₁ (extremo 5' del operón) y VAL₁ (extremo 3' del operón). Al centro del operón y definiendo dos fragmentos de 1.8 kb y 1.9 kb se diseñaron dos nuevos partidores denominados BDO₂ (extremo 5' interno) y VAL₂ (extremo 3' interno). Los partidores fueron diseñados de una longitud de 30 bases y su secuencia fue la siguiente:

BDO₁: 5'-TCTAGAATTCATGACGGAGGCAAAGTGAAC-3'

VAL₁: 5'-CCCGGGATCCATTATTTGAAATCCGGTCTT-3'

BDO₂: 5'-ACTCGGGATCCGGGATTACGAACTGCAGGT-3'

VAL₂: 5'-GCCGTGGAATTCGCCAGTGGGAACCTGCAG-3'.

9.6.2 Mezcla de reacción.

Se prepararon soluciones stock de partidores (30 a 50 pmoles/ μ l) y dNTPmix (2,5 mM).

Para fines analíticos, la mezcla de reacción fue dividida en alícuotas de 10 μ l, a los cuales se adicionó 2 μ l de tampón conteniendo el DNA. Para fines

preparativos la mezcla de reacción fue dividida en alícuotas de 100 μl , descontados 10 μl de H_2O , los que fueron reemplazados por el tampón conteniendo el DNA. A la mezcla preparada previamente se adicionó 0,5 U de Taq polimerasa por cada 10 μl de volumen de reacción. Todos los reactivos empleados para PCR fueron comprados a Gibco-BRL, incluidos la síntesis de los partidores arriba descritos.

La mezcla de reacción final para 200 μl fue:

Reactivo	volumen	Concentración final
Tampón para Taq polimerasa 10x	20 μl	1x
dNTPmix	15 μl	0,19 mM (c/u)
Partidor "sense" (BDO ₁ o BDO ₂)	2 μl	0,3 a 0,5 μM
Partidor "antisense" (VAL ₂ o VAL ₁)	2 μl	0,3 a 0,5 μM
H ₂ O (3x)	161 μl	

9.6.3 PCR de colonias.

Se utilizó PCR analítico como herramienta para realizar un análisis de las colonias obtenidas después de transformar cultivos de *E. coli* con las mezclas de ligación, como una manera de seleccionar clones conteniendo el inserto completo del operón *tfdCDEF*. Para ello, cada colonia a analizar fue resuspendida en un volumen de 10 μl de H_2O 3x estéril, después de lo cual la suspensión celular fue incubada a 95 °C por 4 min para permitir la liberación del DNA. A continuación los microtubos fueron centrifugados por 4 min a

14.000 rpm y enfriados en hielo. Del sobrenadante así obtenido se emplearon 2 μ l en la mezcla para PCR analítico, descrita anteriormente.

9.6.4 Programa de amplificación por PCR.

El programa para el termociclador (Pharmacia Landgraf LKB-UV-M-II de 5 canales, con capacidad de 9 muestras por canal y MJ-Research de un canal para 16 muestras), fue el siguiente: Un ciclo de denaturación (95 °C por 120 s), seguido de 35 ciclos de amplificación (95 °C por 45 s, 55°C por 30 s, 72 °C por 180 s), finalizando con un ciclo de extensión (72 °C por 600 s), manteniéndose posteriormente a 4°C por tiempo indefinido. Después de realizado el PCR, 4 μ l de cada una de las preparaciones fueron cargados en un gel de agarosa al 0,7% (en TAE1x) y sometidos a un campo electroforético de 100 V (50 a 80 mA) por 45 min.

9.7 Transformación celular.

9.7.1 Electroporación:

La electroporación fue realizada en un sistema Bio Rad, (Gene Pulser, modelo 1652077 y Gene Pulser II plus). Las condiciones de electroporación, para cubetas de 0,2 cm de paso fueron: 800 W, 25 μ F y 1,25 KV. Las células preparadas en la sección 3.8 fueron descongeladas lentamente en hielo y electroporadas tras la adición del DNA con valores de intensidad de campo (I) entre 14,5 y 13,3.

9.7.2 Conjugación triparental.

El siguiente protocolo fue empleado para introducir los cassette de DNA contenidos en los vectores derivados de pUT-Km, pCNB4 y pCNB5 (de Lorenzo y col., 1990; Herrero, y col., 1990).

Células de dador (*E. coli* cc118 λ pir, conteniendo la construcción a transferir), de "Helper" (*E. coli* HB101, pRK600) y de receptora fueron crecidas en 2 ml de medio LB conteniendo un antibiótico adecuado (Km 50 μ g/ml para el dador y Cm 20 μ g/ml para el "helper"). En tubos Eppendorf de 1,5 ml estériles se centrifugaron 1 ml de dador y de "helper" y 2 ml de receptor a 6.000 rpm por 30 s. Cada una de las pellas obtenidas fueron resuspendidas en 1 ml de 50 mM MgSO₄ y centrifugadas de nuevo como en el paso anterior. Las células de dador fueron resuspendidas en 100 μ l de MgSO₄ y transferidas sobre la pella de células "helper", resuspendidas de nuevo y transferidas sobre las células receptoras. Finalmente, la pasta de células obtenidas fue depositada sobre un filtro estéril (Millipore 0,2 mM de diámetro de poro), puesto sobre una placa de agar LB sin antibiótico. Tras dejar secar el filtro en la campana de flujo laminar, éste fue incubado por una noche a 30 °C. A la mañana siguiente el filtro fue introducido con la ayuda de una pinza plana estéril en un tubo cónico estéril de 15 ml, en el cual las células fueron resuspendidas en 1 ml de solución 50 mM MgSO₄ mediante Vortex. La suspensión celular así obtenida fue sembrada en

alícuotas de 100 μ l, 200 μ l y 700 μ l en placas de agar salino, conteniendo 50 μ g/ml Km y un substrato adecuado para selección de transconjugantes.

9.8 Transformación por shock térmico.

Este protocolo fue empleado para construir cada uno de los clones conteniendo los distintos fragmentos de DNA en los cuales se encuentra el operón *ffdCDEF*. Las células preparadas previamente (sección 3.7) y almacenadas a -70°C fueron lentamente descongeladas en hielo. Por cada 100 μ l de células descongeladas se adicionó 10 μ l de mezcla de ligación y se mezcló suavemente con la misma pipeta. A continuación, las células fueron incubadas en hielo sin agitación entre 20 y 30 min, para luego aplicar un shock térmico de 60 s a 42°C . Luego las células fueron incubadas en hielo por otros 2 min, tras lo cual las células fueron rápidamente transferidas a 1 ml de medio LB e incubadas a 37°C por una hora. Finalizada la incubación, las células fueron centrifugadas (6.000 rpm por 30 s) para remover el medio de incubación, el cual fue reemplazado por 100 μ l de LB. Tras una suave resuspensión, alícuotas de 20 y 80 μ l de las células fueron sembradas con rastrillo, en placas LB conteniendo el antibiótico adecuado de selección (Ap para pBluescript II SK y pUC18Not y Km para los derivados de pUT). En aquellos casos en que se quiso descartar los clones que contenían sólo el vector se usaron placas a las que se había agregado, con rastrillo sobre la

superficie de la placa, 50 μ l de una solución 20 mg/ml de X-gal y 5 μ l de IPTG 200 mg/ml y dejada secar en campana de flujo laminar una hora previo a ser sembradas. El procedimiento anterior no funcionó para pUC18Not.

RESULTADOS

1. Degradación de (cloro)aromáticos en lagunas para el tratamiento aerobio de efluentes provenientes del blanqueo de pulpa de celulosa: Un modelo de estudio.

1.1 Montaje de microcosmos.

En el laboratorio se montaron dos modelos de lagunas de aireación (microcosmos), alimentados en forma secuencial con efluente proveniente de una planta de producción de celulosa. Al mantener constante parámetros como el tiempo de residencia (5-6 días), el pH de ingreso del efluente (6,0) y la compensación en nitrógeno y fosfato en función de los valores de DBO_5 , se buscó el establecimiento de una población microbiana, a partir de los microorganismos presentes en el efluente de alimentación, la cual fue evaluada tanto en su capacidad para remover los organoclorados presentes en el efluente, como en su influencia en la sobrevivencia de un microorganismo especializado en la degradación de clorofenoles como es *R. eutropha* JMP134.

El diseño de los microcosmos buscó representar, lo más cercanamente posible, las características de las lagunas de tratamiento aerobio, esto es disminución de DBO_5 , rango de pH y razón N:P: DBO_5 (M. y M. sección 3.2). Estas operan con un tiempo de retención de 5 días, basado en que el flujo del

líquido es de tipo mezcla completa. Para verificar lo anterior, se efectuó una estimación del tipo de flujo en uno de los modelos montados, usando dicromato de potasio como marcador (M. y M. sección 3.2). El resultado de esta determinación (Figura 9), mostró una disminución a la mitad de la concentración del marcador cada 5,5 días, es decir, el tiempo de retención definido para el microcosmos. Debido a que los resultados obtenidos con el trazador fueron consistentes con lo esperado, descartándose un flujo tipo pistón, en el cual la concentración del trazador habría disminuido a cero en un tiempo de retención, no fue necesario efectuar una determinación más precisa del tipo de flujo para sólidos en suspensión, lo que habría requerido el uso de células u otros macromoléculas como marcadores.

Durante los dos primeros meses de operación el pH debió ajustarse cada 1-2 días, ya que subía hasta 8,5. Posteriormente se estabilizó en 7,0, observándose un gradiente de pH de 0,3 unidades entre la entrada y la salida del modelo. El pH se estabilizó conjuntamente con el alcance de niveles parejos de remoción de DBO_5 equivalentes a un 80% de materia orgánica degradable presente en el efluente (ver más adelante). En el microcosmos también se estableció una gradiente de oxígeno. Hasta los 4 cm de profundidad (profundidad de los difusores) los valores de oxígeno disuelto se mantuvieron alrededor de $6,0 \pm 0,5$ ppm, mientras que próximo al fondo del sistema (7 cm), los valores de oxígeno disuelto fueron de $0,5 \pm 0,1$ ppm.

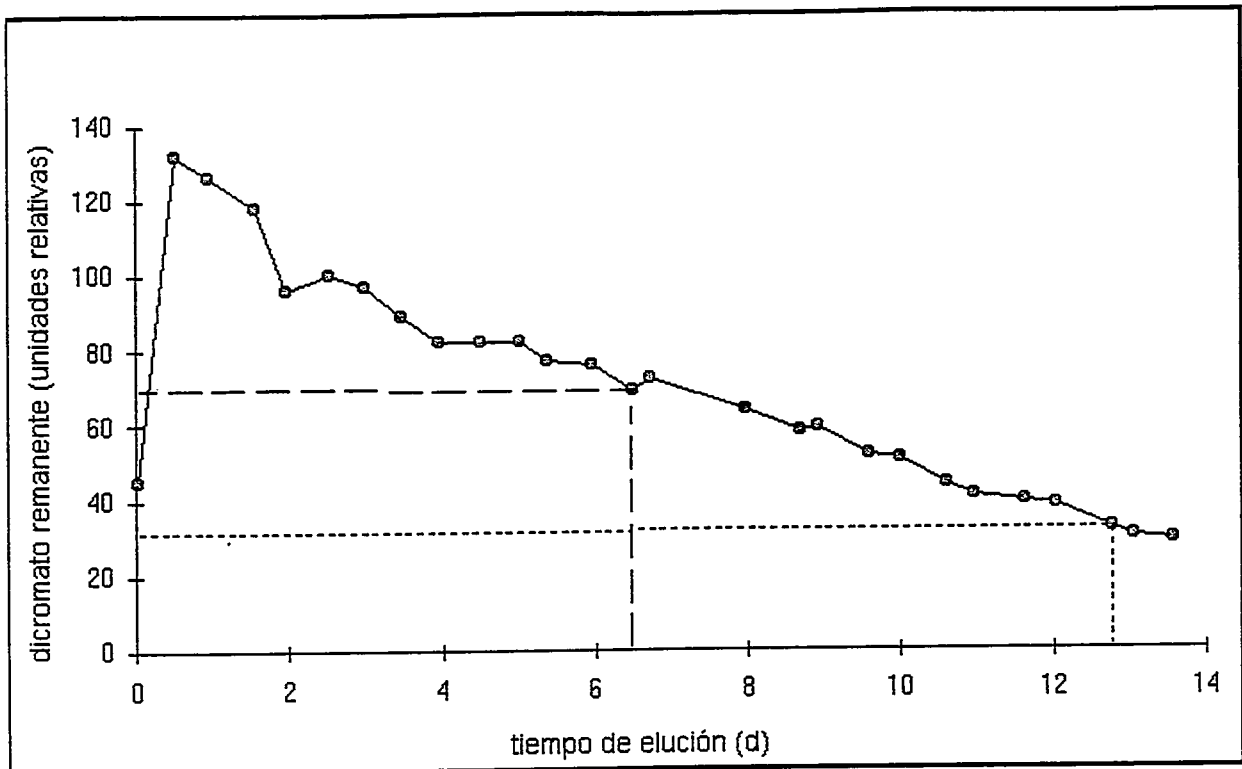


Figura 9: Perfil de elución de dicromato de potasio como marcador para la determinación del tipo de flujo existente en un microcosmo que representa una laguna de aireación.

Las líneas segmentadas (- - -) y punteada (...) indican el tiempo necesario para que la concentración del marcador presente en el sistema disminuya a la mitad y a la cuarta parte, respectivamente. El flujo del sistema fue de 1,1 ml/min. Los resultados son el promedio de dos determinaciones (DS < 10%).

En la Figura 10 se muestra que, al cabo de dos semanas de operación, se detectaron niveles apreciables (40%) de disminución de la DBO_5 (M. y M. sección 6.4). Estos continuaron subiendo progresivamente hasta el día noventa, en el que se alcanzó el 85% de remoción. Este nivel se mantuvo, salvo las excepciones que se indican en la Discusión. En el modelo también se produjo una remoción en DQO de un 30%, valor que concuerda con lo esperado.

Una vez que se obtuvieron valores de remoción de DBO_5 constantes para un modelo ya mencionado, se inició la operación de un segundo modelo, conectado en serie con el primero. La conexión en serie debió hacerse aumentando el flujo total del sistema, de manera de dejar al modelo I con un flujo de $1,8 \pm 0,1$ ml/min (tiempo de retención de 3,7 días) y al modelo II con un flujo de $1,6 \pm 0,1$ ml/min (tiempo de retención de 4 días). Si bien este cambio en el tiempo de retención hidráulica varió las condiciones de régimen alcanzadas para un sólo modelo, el modelo I continuó removiendo sobre un 80% del contenido de materia orgánica degradable medido como DBO_5 . De esta manera se consiguió evitar problemas de concentración del efluente en el segundo modelo, producto de la evaporación. En la Tabla V se muestran los valores promedio para los parámetros del primer modelo (de ahora en adelante modelo I), así como los obtenidos para el modelo II.

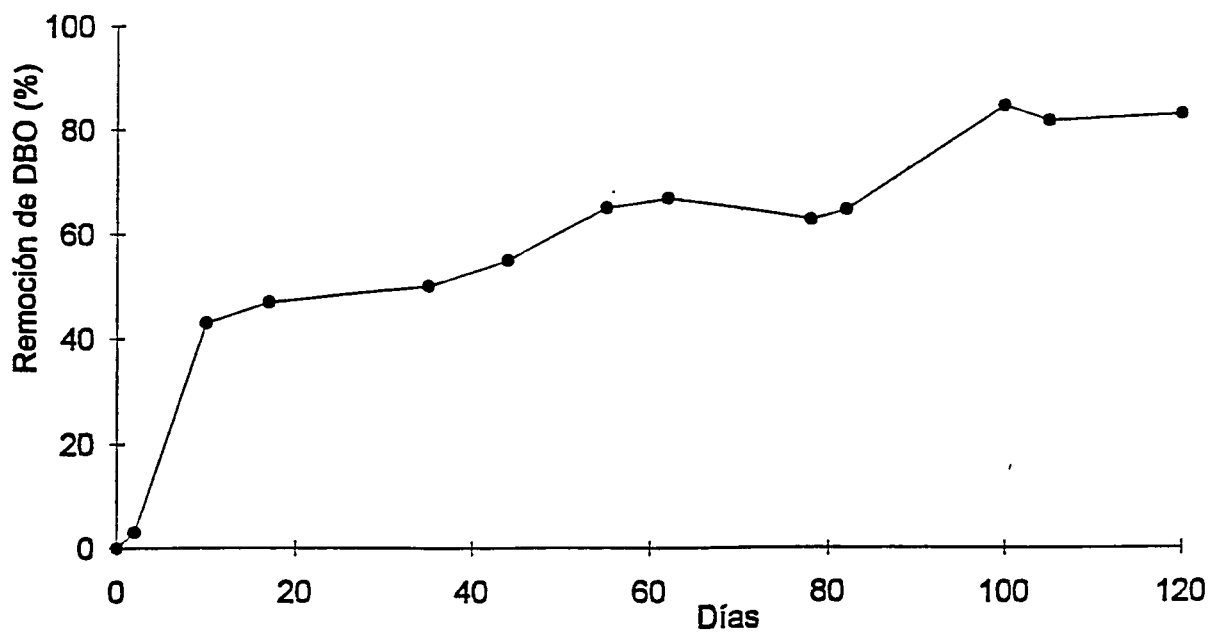


Figura 10: Remoción de materia orgánica degradable, (DBO_5) en un microcosmos.

Los valores provienen de determinaciones de DBO_5 , a los tiempos señalados.

Los valores corresponden a un promedio de tres determinaciones ($DS < 10\%$).

Tabla V. Parámetros de operación de los microcosmos.

Parámetro	Efluente de entrada	Efluente de salida	
		modelo I	modelo II
DBO ₅ (mg O ₂ /L)	360 ± 33	76 ± 1	68 ± 1
DQO (mg O ₂ /L)	615 ± 60	473 ± 25	565 ± 68
pH	6,0	6,5 - 7,5	7,0 - 7,5
Cuentas cultivables (log ufc/ml) ^a	7,1	7,3	5,4
Cuentas viables ^b (log células/ml)	8,3	8,5	7,1
AOX (ppm) ^c	17	11	11
Clorofenoles totales (ppb) ^d	4-200	bld	bld

Estos valores corresponden a un promedio de 2 años de operación de los sistemas en forma continua. a: determinadas en placas de agar LB. b: determinadas por epifluorescencia con naranja de acridina en presencia de ácido nalidíxico. c: información obtenida de los laboratorios de la planta Arauco S.A. d: bld: bajo el límite de detección (4 ppb).

1.2 Presencia de compuestos organoclorados propios de los efluentes de blanqueo.

La presencia de compuestos organoclorados, derivados del proceso de blanqueamiento de la pulpa de celulosa fue estudiada mediante cromatografía gaseosa (M. y M. sección 6.2). Por este medio fue posible distinguir 11 compuestos estándares, los cuales se muestran en la Figura 11a. En la Figura 11 también se incluyen cromatogramas representativos de los análisis realizados sobre muestras de efluentes provenientes de la planta Arauco. En ellos destacan las señales presentes en 14,99-15,01 min., 12,15 min., 10,27 min. y 8,68 min. por corresponder a los compuestos 4,5-DCG, 4,6-DCG, 2,4,6-TCF y 2,4-DCF, respectivamente. La abundancia relativa estimada para estos compuestos, en comparación con el estándar interno de 2,4,6-tribromofenol (no mostrado), fue del orden de 4 a 200 ppb.

Cuando se analizó la salida de los modelos no se detectó la presencia de estos compuestos organoclorados (Figura 12). Por otra parte, el análisis de los sedimentos tanto de los modelos como de los traídos desde la planta Arauco indicó que sólo una pequeña fracción de los organoclorados presentes en la columna de efluente estaba presente en los sedimentos (señales cuyo tiempo de retención concordó con el 4,6-DCG y el 2,4,6-TCF, Figura 12b).

Como otra forma de evaluar el destino de los compuestos organoclorados presentes en los efluentes, se realizó un estudio de distribución de organoclorados marcados con ^{14}C (M. y M. sección 6.5). En

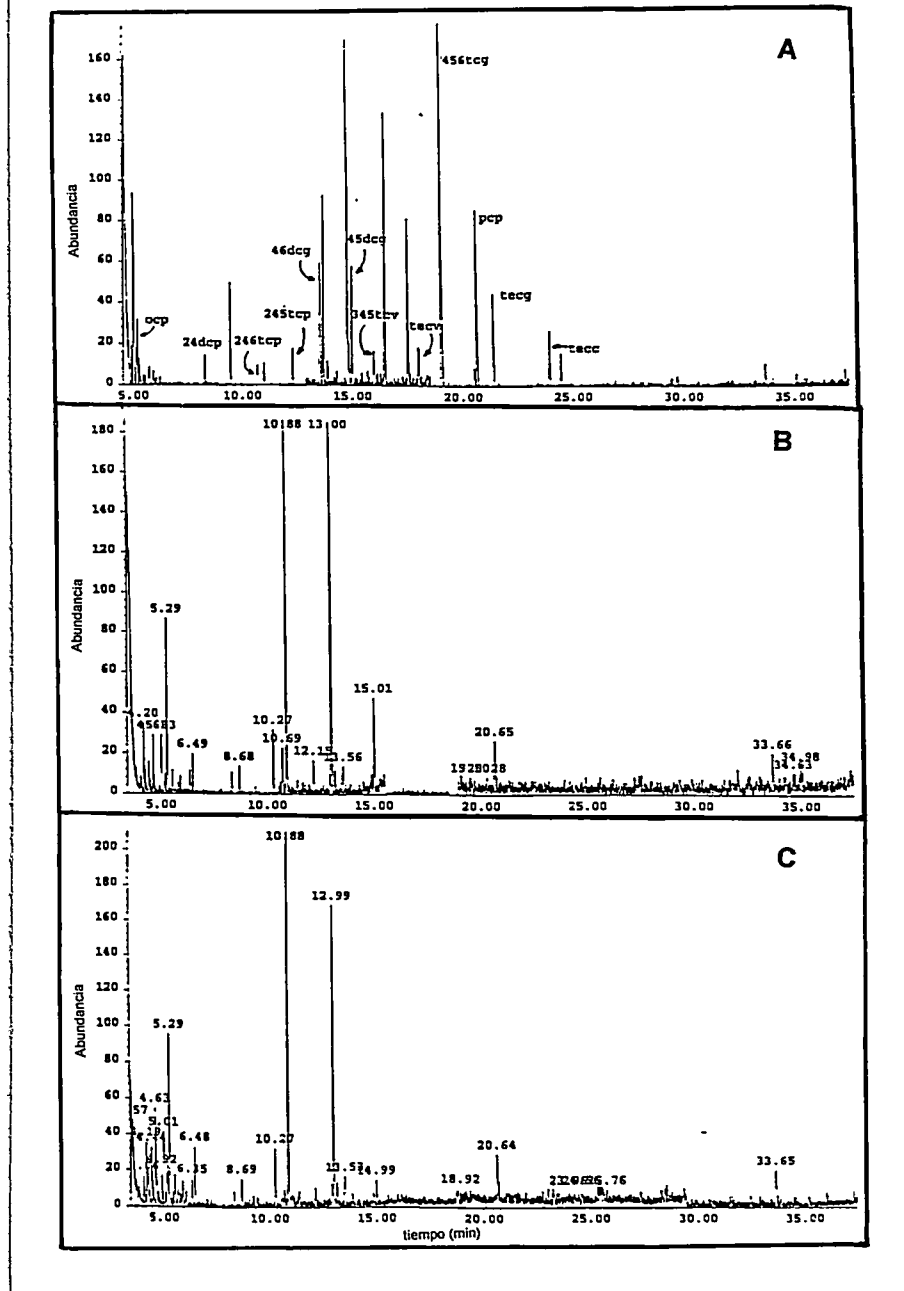


Figura 11: Perfiles de cromatografía gaseosa para compuestos estándares (A) y muestras representativas (B y C) del efluente de blanqueo de pulpa empleado para alimentar los microcosmos montados en el laboratorio.

Las muestras fueron derivatizadas empleando anhídrido acético, se empleó una columna capilar de 30 m (DI:0,25 mm) HP5-fenilmetilsilicona y un programa de gradiente lineal entre 100 y 250 °C, de acuerdo a lo descrito en M. y M. 6.2. Las abreviaturas en A) corresponden de izquierda a derecha a: ortoclorofenol, 2,4-di-, 2,4,6-tri-, 2,4,5-triclorofenol, 4,6-di-, 4,5-dicloroguaiacol, 3,4,5-tri-, tetracloroveratrol, 4,5,6-tricloroguaiacol, pentaclorofenol, tetracloroguaiacol y tetracolocatecol. Las señales en B) y C) presentes en 14,99-15,01, 12,15 y C) presentes en 10,27 min y 8,68 min, corresponden a 4,5-DCG, 4,6-DCG, 2,4,6-TCF y 2,4-DCF, respectivamente. La abundancia fluctuó entre 4 y 200 ppb.

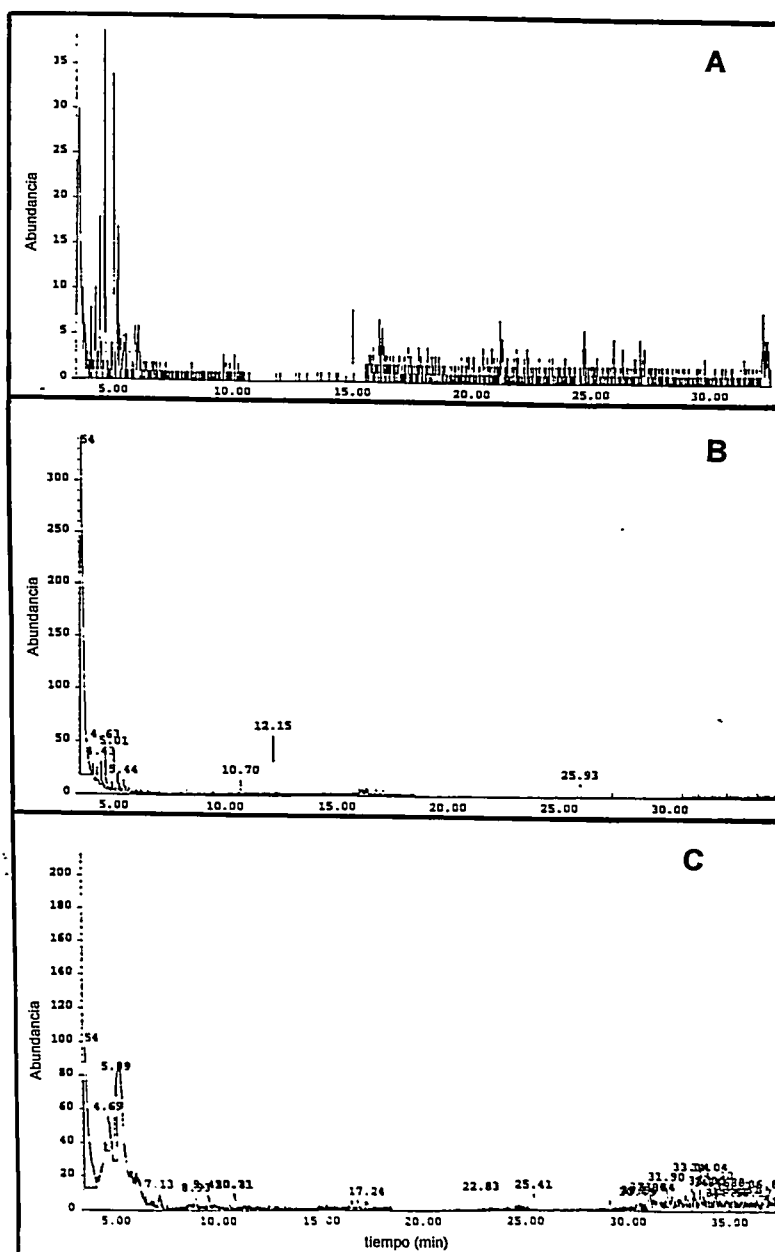


Figura 12: Perfiles de cromatografía gaseosa de la salida del modelo I, modelo II y sedimentos de la laguna de Arauco.

Muestras tomadas a la salida de los modelos I (A), II (B) y de los sedimentos de la laguna de Arauco (C). El procesamiento de las muestras se realizó como se indica en la Figura 11.

este caso, como se muestra en la Tabla VI se pudo observar que después de 7 días de incubación de matraces en aireación forzada (M. y M sección 3.4) el grueso de la marca adicionada como 2,4-DCF permaneció en la columna de efluente, mientras que sólo una pequeña fracción se localizó en los sedimentos. Los resultados para 2,4,5-TCF fueron esencialmente los mismos.

1.3 Caracterización global de los microorganismos presentes en los modelos.

La presencia de microorganismos en estos modelos fue determinada mediante conteo de células. En la Tabla V se muestran los valores de células cultivables. Se dan sólo los valores obtenidos usando placas de agar con medio LB, en el que se efectuó la mayoría de las determinaciones. Los otros medios utilizados inicialmente (M. y M. sección 4.1) dieron cuentas cultivables iguales o menores a las determinadas con el medio ya indicado. Los tipos de colonias no difirieron significativamente entre los distintos medios de cultivo. Por otra parte, en las muestras de salida del modelo I se observaron 5-8 tipos de colonias predominantes, en los diversos medios de cultivo ensayados. La tinción Gram de colonias representativas indicó que se trataba, en su gran mayoría, de bacilos cortos Gram negativos. Se observaron también formas filamentosas que se teñían Gram negativo.

Tabla VI: Balance de masas para 0.5 mM ¹⁴C-2,4-DCF en cultivos de efluente en aireación forzada.

Muestras*	fase gaseosa (%)	sedimentos (%)	sobrenadante (%)	total recuperado (%)
L1	1.26	2.8	85.5	89.53
L1prec.	1.27	4.3	90.62	96.3
ent.aer	1.19	4.25	92.96	98.4

*L1: modelo I; L1prec. modelo I precrecido 2 días en aireación forzada; ent.aer: entrada aerobia de Arauco

Los microorganismos detectados en el modelo que crecieron en placas de agar LB no difirieron, en tinción Gram, de los detectados en el efluente de entrada ni de los presentes en muestras de la salida de la laguna aerobia de la planta. Sin embargo, se observó en el efluente de entrada al microcosmos una menor diversidad en morfologías de colonias que la encontrada en las salidas de los modelos, además de una población de coliformes, la que estaba ausente en los modelos (ver M. y M. sección 4.1).

Aunque el recuento de bacterias viables del modelo II fue dos órdenes de magnitud menor al presente en el modelo I (Tabla V) el aspecto y diversidad de las colonias presentes en dicho modelo fue semejante al de las provenientes del modelo I. Dicha disminución se debe a la menor cantidad de materia orgánica degradable (DBO_5) disponible en el efluente que alimenta el modelo II.

Las determinaciones efectuadas por microscopía de epifluorescencia sobre muestras provenientes de ambos modelos concordaron con lo observado en las tinciones Gram en lo que se refiere a la morfología indicando, además de las formas bacilares anteriormente descritas, la presencia de agregados celulares. Se observaron diferencias en los estados metabólicos de los microorganismos presentes en los modelos, cuando se adicionó ácido nalidíxico a la preparación, de acuerdo a lo indicado en M. y M. sección 4.2, como se puede observar en la Figura 13. La observación por microscopía de

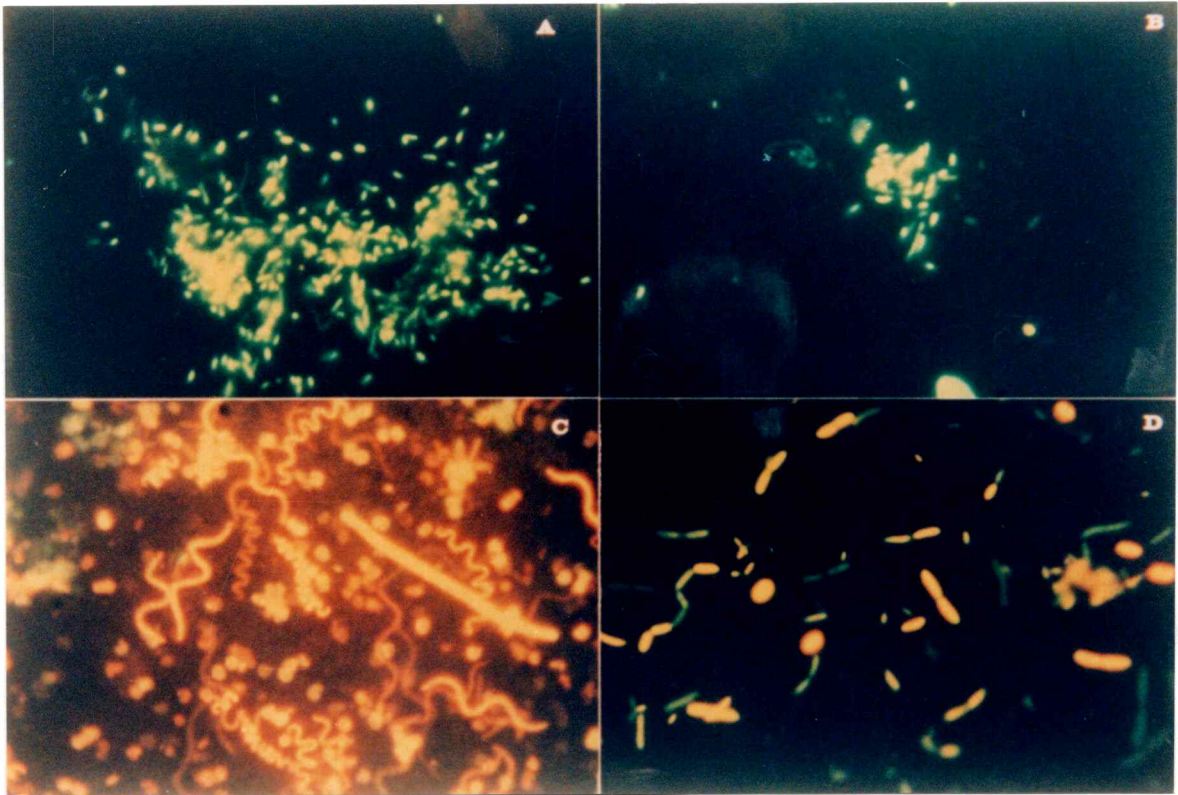


Figura 13: Microfotografías ópticas de epifluorescencia de muestras de los modelos I y II.

Las muestras fueron tomadas desde el modelo I (A y C) y II (B y D) y teñidas con naranja de acridina, sin incubar (A y B) y tras incubar con ácido nalidíxico (C y D), de acuerdo a lo descrito en M. y M. 4.2. Aumento 1000x. Un total de 15 campos por muestra fueron analizados.

epifluorescencia permitió además determinar que los recuentos realizados en placas de agar LB correspondían al 10% de la población registrada mediante recuento de campos por microscopía (Tabla V).

Finalmente, en estos microcosmos se desarrolló una población significativa de protozoos, del orden de 10^3 células/ml (M. y M. sección 4.3), principalmente de ciliados como los que se observan en la Figura 14. Dicha población de protozoos juega un rol importante como depredadora (bacteríovora) en los sistemas de lagunas de aireación en estudio.

1.4 Metabolización de compuestos organoclorados por los microorganismos presentes en los modelos de laguna de aireación.

1.4.1 Capacidad para remover organoclorados presentes en el efluente.

Para averiguar si los microorganismos desarrollados en los modelos de laguna de aireación eran los responsables de la remoción observada de compuestos organoclorados presentes en los efluentes, inóculos de las dos salidas (S1 y S2) de los modelos fueron incubados en aireación forzada con efluente con alto contenido de materia orgánica degradable, compensado y esterilizado por filtración (M. y M. sección 2). Se adicionó un control de efluente estéril no inoculado para ver el efecto de remoción abiótica (por volatilización). La incubación se realizó como fue descrito en M. y M. sección 3.4.

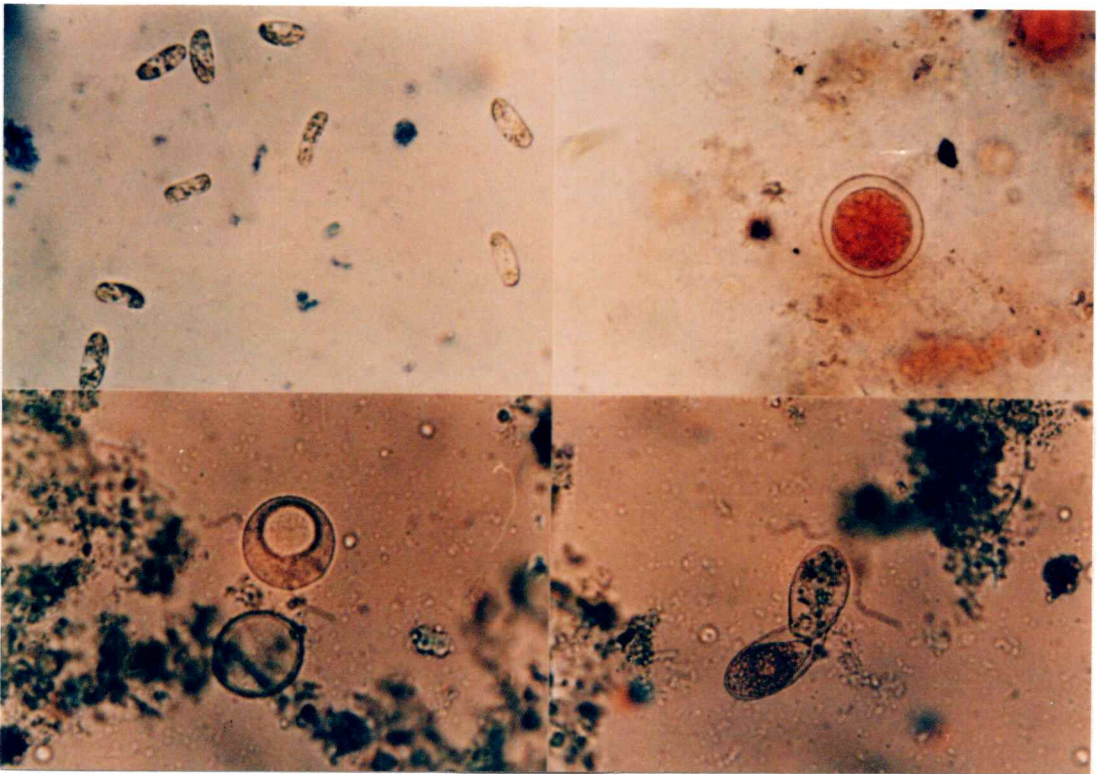


Figura 14: Microfotografías ópticas de protozoos observados en muestras del modelo I.

Las preparaciones fueron teñidas con azul de bromofenol como medio de contraste de acuerdo a lo indicado en M. y M. 4.3. Aumento 80x.

En la Tabla VII se resumen los valores obtenidos de DBO_5 , DQO y viabilidad en placas de agar LB.

Como se observa, el efecto de remoción de materia orgánica total (DQO) y biodegradable (DBO_5) concuerda con lo obtenido en la operación de los modelos (Tabla V). Un comportamiento similar se observó respecto al crecimiento y variedad de microorganismos determinado por recuento en placa y tinción Gram.

Para analizar el efecto que la incubación de microorganismos en aireación forzada tuvo sobre los compuestos organoclorados presentes en el efluente, alícuotas de las incubaciones conteniendo inóculos de las dos salidas más el control de incubación abiótica, fueron analizadas por cromatografía gaseosa, según se indica en M. y M. sección 6.2. La Figura 15 muestra los perfiles obtenidos. En el control abiótico (recuadro A) se destacan las señales presentes en 14,94 min., 12,22 min., 10,64 min. y 8,23 min. por corresponder a los compuestos 4,5-DCG, 4,6-DCG, 2,4,6-TCF y 2,4-DCF, respectivamente. Estas señales están también presentes en el efluente llegado de Arauco (Figura 11). Los recuadros B y C de la Figura 15 permiten, comparando el eje de abundancia relativa, observar que tanto en el inóculo proveniente de la salida 1 como el proveniente de la salida 2 se observó la capacidad de remover totalmente los compuestos presentes en el efluente, detectables por esta metodología.

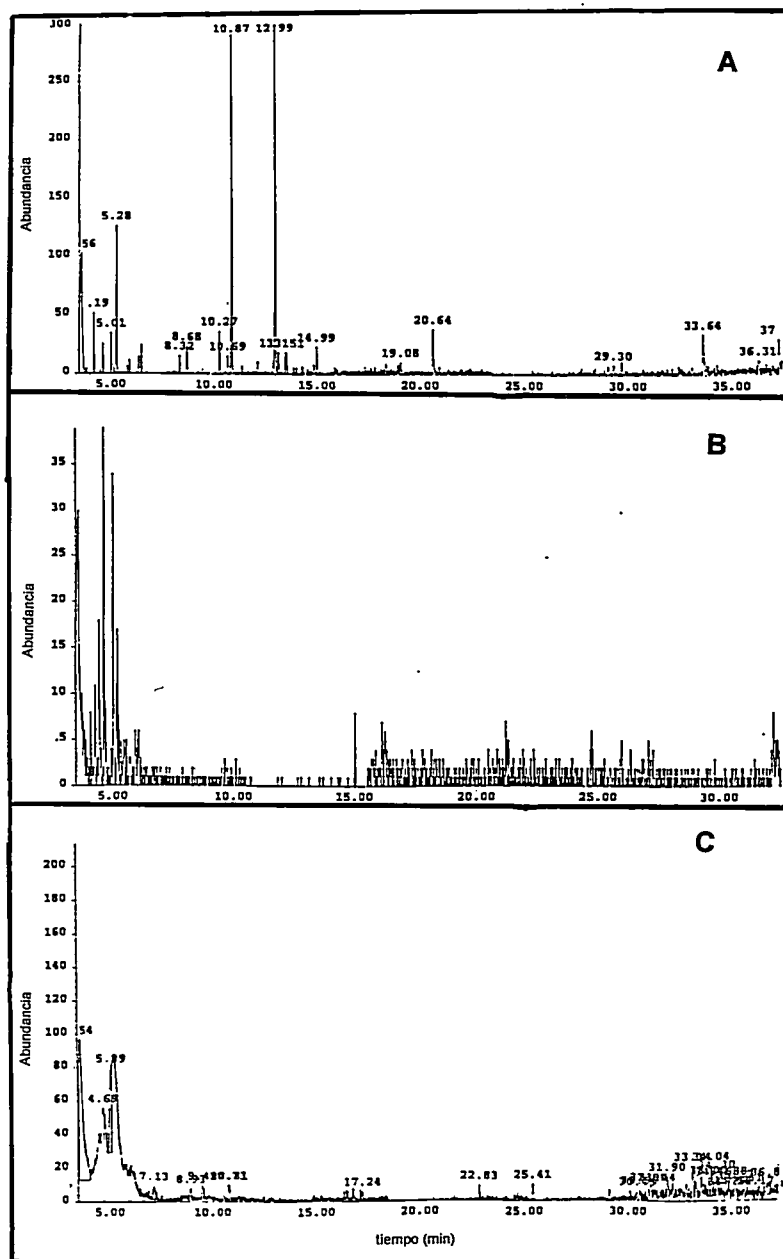


Figura 15: Perfiles de cromatografía gaseosa de cultivos en aireación forzada.

Muestras provenientes del control abiótico (a), y del experimento efectuado con inóculos del modelo I (b) y II (c). Las señales presentes en 14,99 min, 12,99 min, 10,27 min y 8,68 min, corresponden a 4,5-DCG, 4,6-DCG, 2,4,6-TCF y 2,4-DCF, respectivamente. Las muestras fueron procesadas como se indica en la Figura 11.

Tabla VII: Cambios observados en el efluente por efecto del crecimiento de microorganismos en aireación forzada.

Condición	DBO ₅ *	DQO*	Viabilidad**
Control abiótico	401±7	676±83	0
S1	109±4	520±79	1,3×10 ⁸
S2	71±11	486±80	5,3×10 ⁷

*: valores promedios de 6 determinaciones expresados en mg de O₂/l. **: ufc/ml determinadas en agar LB. La determinación de DBO₅ para el control abiótico fue realizada empleando el efluente traído desde Arauco previo a su esterilización por autoclave.

1.4.2 Capacidad de los microorganismos para utilizar compuestos (cloro)aromáticos como única fuente de carbono y energía.

Los resultados de la sección anterior sugieren que los microorganismos son los responsables de la remoción de compuestos organoclorados, presentes en los efluentes en niveles de ppm. Por ello resultó interesante evaluar la capacidad de los microorganismos para degradar, modificar o crecer en un total de diez compuestos individuales. Estos fueron: guaiacol y sus derivados clorados 4,5-DCG, 4,5,6-TCG y TeCG; fenol y sus derivados clorados 4-CF, 2,4-DCF, 2,4,6-TCF, 2,4,5-TCF, además de 2,4-D. Para ello se efectuaron cultivos inoculados en un medio mínimo salino conteniendo cada uno de los substratos a ensayar por separado y se incubaron en agitación por 15 días, al cabo de los cuales se efectuaron dos traspasos a medio fresco, los que fueron incubados por igual periodo (M. y M. sección 3.3). Los resultados obtenidos para cada etapa se resumen en la Tabla VIII. Como se muestra, sólo se observó crecimiento con los compuestos no clorados.

Tabla VIII: Crecimiento de microorganismos de los efluentes en compuestos (cloro)aromáticos como única fuente de carbono.

Substrato	Primer modelo						Segundo modelo					
	0,5 mM			1,0 mM			0,5 mM			1,0 mM		
	1º i	1º t	2º t	1º i	1º t	2º t	1º i	1º t	2º t	1º i	1º t	2º t
guaiacol	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
4,5-DCG	++	(+)	-	+	(+)	-	+	(+)	-	-	-	-
4,5,6-TCG	++	+		+	+		+	+		-	-	-
TeCG	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
fenol	++	+	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+
4-CF	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
2,4-DCF	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
2,4,6-TCF	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,4,5-TCF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,4-D	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Las cruces representan el mayor o menor grado de crecimiento evidenciado como turbidez por inspección visual contra el control sin inocular. 1º: Inóculo, 1º t: primer traspaso, 2º t: segundo traspaso.

1.4.3 Capacidad de los microorganismos para degradar (cloro)aromáticos en presencia de un efluente conteniendo altos niveles de materia orgánica degradable.

Para esto se prepararon tubos de cultivo conteniendo efluente estéril, en lugar de medio salino, a los cuales se adicionó por separado cada uno de los compuestos mencionados previamente (0,1 mM y 0,5 mM) y se inocularon al 10% con muestras provenientes de los modelos (M. y M. sección 3.4). Al cabo de 15 días de incubación, todos los cultivos mostraron un crecimiento evidenciado por la turbidez, en relación a los controles no inoculados. A estos cultivos se les realizó un barrido espectrofotométrico de acuerdo a lo descrito en M. y M. sección 6.1. Al comparar dichos espectros con los obtenidos para los controles de incubación abiótica se determinó que algunos compuestos fueron removidos, otros fueron modificados (lo que se evidencia en un cambio espectral) y otros permanecieron inalterados. Esta información se resume en la Tabla IX.

Tabla IX: Consumo de sustratos (cloro)aromáticos por efecto del crecimiento de microorganismos en efluente.

Substrato	modelo I		modelo II	
	0,1 mM	0,5 mM	0,1 mM	0,5 mM
Guaiacol	remoción total	remoción total	remoción total	remoción total
4,5-DCG	inalterado	inalterado	inalterado	inalterado
4,5,6-TCG	inalterado	inalterado	inalterado	inalterado
TeCG	inalterado	inalterado	inalterado	inalterado
Fenol	remoción total	inalterado	remoción total	remoción parcial
4-CF	inalterado	inalterado	inalterado	inalterado
2,4-DCF	remoción parcial	remoción parcial	remoción parcial	remoción parcial
2,4,6-TCF	inalterado	inalterado	inalterado	inalterado
2,4,5-TCF	inalterado	inalterado	inalterado	inalterado
2,4-D	remoción parcial	remoción parcial	remoción parcial	remoción parcial

Las incubaciones fueron realizadas por 15 días y los experimentos en triplicado. Cada sustrato fue ensayado en forma independiente. Una remoción parcial corresponde a una disminución entre un 20 y un 80% del espectro UV (en la región 250 a 300 nm) comparado a la absorbancia del control preparado a igual concentración.

1.4.4 Capacidad de la biomasa presente en los modelos de laguna de aireación para remover o modificar compuestos organoclorados específicos.

Para ver si la escasa capacidad degradativa era debido a un bajo número de células, se hizo el estudio incrementando la cantidad de células presentes. En este caso se colectó la salida de cada uno de los modelos, concentrándose catorce veces la biomasa presente en ellos, como se indica en M. y M. sección 3.6. Se incubó esta biomasa en tubos de cultivo conteniendo los diez compuestos a ensayar, por 15 días, al cabo de los cuales los cultivos fueron extraídos con acetato de etilo y analizados por barrido espectrofotométrico. Nuevamente, al comparar los espectros UV con los controles se encontró que algunos compuestos fueron removidos del medio de cultivo, otros fueron modificados parcialmente y otros permanecieron inalterados. Estos resultados se resumen en la Tabla X.

En la Figura 16 se muestran los espectros obtenidos para los diez compuestos ensayados cuando fueron incubados a una concentración de 0,5 mM. En ella se puede observar como el fenol y guaiacol fueron removidos por inóculos procedentes de ambos modelos, mientras que más del 85% de 4-CF, 2,4-DCF y 2,4-D fue removido en los sistemas inoculados con muestras del modelo II, y sólo parcialmente (14-44%) por los sistemas inoculados con el modelo I.

Tabla X: Consumo de sustratos (cloro)aromáticos por efecto de ser incubados con la biomasa obtenida de los modelos.

Substrato	modelo I		modelo II	
	0,5 mM	1,0 mM	0,5 mM	1,0 mM
Guaiacol	remoción total	remoción total	remoción total	remoción total
4,5-DCG	inalterado	inalterado	inalterado	inalterado
4,5,6-TCG	inalterado	inalterado	inalterado	inalterado
TeCG	inalterado	inalterado	inalterado	inalterado
Fenol	remoción total	remoción total	remoción total	remoción total
4-CF	remoción parcial	inalterado	remoción total	remoción total
2,4-DCF	inalterado	inalterado	remoción total	inalterado
2,4,6-TCF	inalterado	inalterado	inalterado	inalterado
2,4,5-TCF	inalterado	inalterado	inalterado	inalterado
2,4-D	remoción parcial	remoción parcial	remoción total	remoción total

Las incubaciones fueron realizadas por 15 días y los experimentos en triplicado. Cada sustrato fue ensayado en forma independiente. Una remoción parcial corresponde a una disminución entre un 20 y un 80% del espectro UV (en la región 250 a 300 nm) comparado a la absorbancia del control preparado a igual concentración.

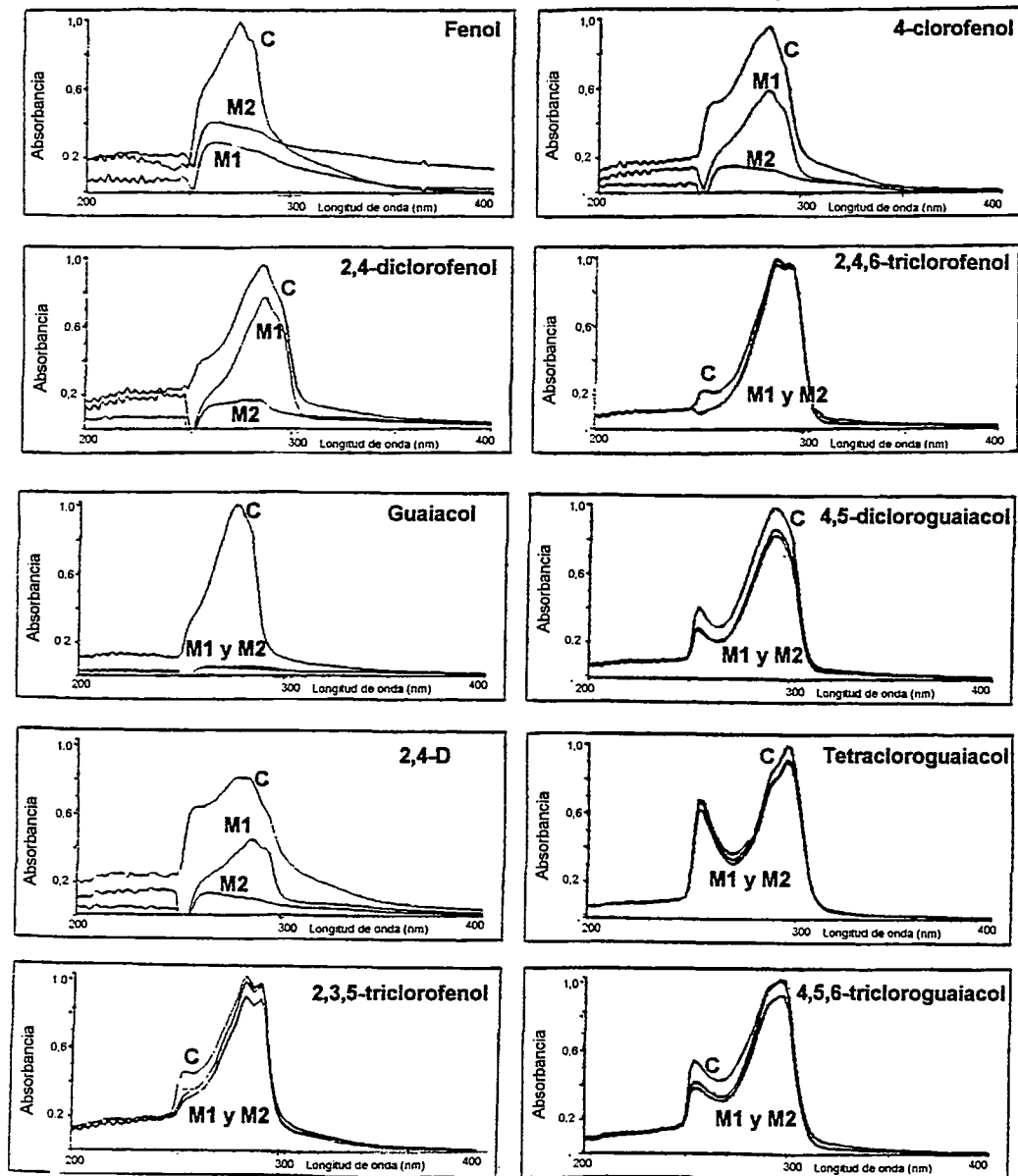


Figura 16: Espectros UV obtenidos de cultivos conteniendo (cloro)aromáticos a una concentración de 0,5 mM.

Se indica el control (C), el efecto del inóculo proveniente del modelo I (M1) y el respectivo del modelo II (M2). La línea base fue ajustada con acetato de etilo, los barridos realizados entre 200 y 400 nm. El tiempo de incubación de los cultivos fue de 15 días, los experimentos se realizaron por triplicado.

No se observó remoción de ninguno de los cloroguaiacoles empleados, así como de los dos triclorofenoles, en inóculos de ninguno de los dos modelos.

Por otra parte, se evaluó la capacidad de mineralizar 2,4-DCF y 2,4,5-TCF marcados con ^{14}C , según lo descrito en M. y M. sección 6.5. Al cabo de 9 días de incubación no se observó mineralización alguna para los cultivos provenientes de efluente inoculado tanto con la salida del modelo I como la del modelo II, mientras que el control positivo, constituido por un cultivo de la cepa JMP134 en 2,4-D, alcanzó un 34% de mineralización de 2,4-DCF.

Esta parte del estudio se completó cuando un inóculo (al 10%) del modelo I sobre efluente compensado y esterilizado por autoclave fue incubado en aireación forzada por ocho traspasos sucesivos cada 5 días en presencia de 0.1 mM de 2,4,6-TCF. En estos cultivos en "acostumbramiento" se analizó la remoción por espectrofotometría del organoclorado adicionado y la diversidad de microorganismos, mediante la morfología de colonias obtenidas en agar LB. Los resultados indicaron una remoción parcial (30%) de los substratos proporcionados. Además se observó una disminución en la diversidad de los microorganismos, medido como morfologías diferentes de colonias en placas de agar LB, durante los traspasos sucesivos (no mostrado), lo cual si bien indicó un enriquecimiento de los cultivos en algunos microorganismos, éstos más que desarrollar capacidades importantes para

degradar los compuestos cloroaromáticos proporcionados, desarrollaron una mayor tolerancia a crecer en su presencia.

1.4.5 Aislamiento y caracterización de microorganismos de los modelos de lagunas de aireación.

Para estudiar si las capacidades catabólicas mostradas por el conjunto de microorganismos estaban también presentes en cepas individuales, se efectuó un estudio con cepas aisladas de este sistema. Para ello se emplearon inóculos de los sedimentos, modelos y efluente de la planta y se aislaron, a partir de siembras en placas de agar LB, un total de 15 cepas, basado principalmente en el criterio de morfología distinta de las colonias. Estas cepas fueron identificadas preliminarmente mediante el Kit de tipificación API 20-NE, de acuerdo a lo descrito en M. y M. sección 4.4. En la Tabla XI se resumen las propiedades generales de estas cepas, todas Gram negativo. Las capacidades metabólicas de estas cepas sobre los siguientes organoclorados (0.5 mM): 4,5-DCG, 2,4-DCF, 2,4-D, 2,4,6-TCF, 4-CF fueron estudiadas en cultivos en aireación forzada por 5 días. El medio utilizado fue efluente compensado esterilizado por autoclave. Los resultados indican que sólo 6 de las 15 cepas fueron capaces de remover más de un 75% de algunos de los substratos ensayados. Estos resultados se confirmaron después de un segundo traspaso. La Tabla XII resume la información obtenida sobre las capacidades de estas

Tabla XI: Propiedades bioquímicas de las cepas aisladas de muestras de efluentes.

Propiedades		Cepas aisladas															
	reducción de NO ₃	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	
	triptofano (form. de indol)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	glucosa (fermentación)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	ADH	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
	urea	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
	esculina (hidrólisis)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
	gelatina (hidrólisis)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	PNPG (hidrólisis)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
	glucosa (asimilación)	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	
	arabinosa (asimilación)	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	manosa (asimilación)	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
	manitol (asimilación)	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	N-acetilglucosamina	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
	maltosa (asimilación)	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
	gluconato (asimilación)	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	
	caprato (asimilación)	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	
	adipato (asimilación)	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	
	malato (asimilación)	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	
	citrato (asimilación)	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	
	fenilacetato (asimilación)	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	
	citocromo oxidasa	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	motilidad	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Cepas aisladas	Identificación según Api 20 NE																
C1	<i>Ralstonia xylooxidans</i>																
C2	<i>Pseudomonas</i> spp.																
S1/1	<i>Pseudomonas putida</i>																
S1/2	<i>Pseudomonas fluorescens</i>																
S1/4	<i>Acinetobacter junii</i>																
S2/1	<i>Acinetobacter lwoffii</i>																
S2/2	<i>Acinetobacter junii</i>																
S2/3	<i>Comamonas</i> spp.																
M1/4	<i>Pseudomonas</i> spp.																
M2/1	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>																
M2/2	no identificada																
M3/1	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>																
M3/2	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>																
M4/2	<i>Ralstonia xylooxidans</i>																
M5/1	<i>Pseudomonas putida</i>																

Tabla XII: Capacidades metabólicas de las cepas aisladas.

Identificación preliminar (API 20NE)	Primer traspaso					Segundo traspaso				
	2,4D	2,4DCF	4CF	2,4,6TCF	4,5DCG	2,4D	2,4DCF	4CF	2,4,6TCF	4,5DCG
<i>Ralstonia xylooxidans</i> C1	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
<i>Pseudomonas</i> spp. C2	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-
<i>Acinetobacter lwoffii</i> S2-1	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-
<i>Comamonas</i> spp. S2-3	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-
<i>Pseudomonas alcaligenes</i> M3-2	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-
<i>Ralstonia xylooxidans</i> M4-2	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-

Las cruces indican crecimiento en los substratos ensayados, los cultivos fueron incubados por 7 días y los experimentos realizados en triplicado.

cepas, en ella se observa que si bien dichos microorganismos presentan capacidades iniciales de crecer en estos compuestos, algunas de dichas capacidades, como la de degradar 4,5-DCG no se mantiene en forma estable.

1.5 Capacidad de *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4) para degradar cloroaromáticos en presencia de efluente de blanqueo de celulosa.

Los resultados obtenidos al analizar la microbiota adaptada a crecer en los modelos de lagunas de aireación indicaron que dichos microorganismos mostraban capacidades para crecer en compuestos organoclorados, pero que estas eran más bien escasas. Esta pobre expresión de capacidades metabólicas hacia compuestos cloroaromáticos en un sistema en el cual están presentes en forma natural dichos compuestos puede deberse a que efectivamente no existen microorganismos con mejores capacidades para su degradación. También es posible que el sistema limite en alguna forma la expresión de estas capacidades, como pudiera ser por la existencia de fuentes alternativas de carbono (materia orgánica fácilmente degradable medida como DBO5), la presencia de una comunidad de protozoos bacterívoros, o una mayor abundancia y/o facilidad para crecer de bacterias que no degradan organoclorados y que ocultan a las bacterias que realmente degradan organoclorados. Para abordar algunos de estos aspectos se analizó el rol de un microorganismo especializado en la degradación de clorofenoles como es

R. eutropha JMP134. Esta cepa, aislada de muestras de suelo, fue inicialmente descrita por su capacidad para crecer en 2,4-D (Don y Pemberton, 1981). Para probar si tal propiedad es expresada en un efluente industrial que contiene compuestos cloroaromáticos, se incubaron por 6 días en aireación forzada, diferentes cantidades de esta cepa (10^1 a 10^7 ufc/ml) en presencia de efluente de blanqueo no estéril y 400 ppm de 2,4-D. Se observó que, en ausencia de la cepa JMP134, no hubo degradación significativa de 2,4-D, a diferencia del alto nivel (56-69%) de degradación observado en presencia de esta cepa (Tabla XIII). Si bien el nivel de degradación fue levemente superior con mayores inóculos de JMP134, la sobrevivencia y/o crecimiento de esta bacteria luego de seis días de incubación alcanzó niveles comparables (10^8 ufc/ml) en todas las condiciones, independiente del inóculo inicial (Tabla XIII) y de la adición de 2,4-D (no mostrado).

La sobrevivencia de distintos inóculos de *R. eutropha* JMP134 y su efecto en la degradación de 2,4,6-TCF fue también estudiado. Para estos experimentos se usó una concentración de 2,4,6-TCF en 100 ppm. Los resultados (Tabla XIV) muestran que, al igual que en el caso de la degradación de 2,4-D, no hubo remoción significativa de 2,4,6-TCF en ausencia de la cepa JMP134. El nivel de degradación fue menor a medida que disminuyó el inóculo inicial. En efluente no tratado aeróbicamente se obtuvo un

Tabla XIII: Degradación de 2,4-D en cultivos de aireación forzada alimentados con efluente inoculados con *R. eutropha* JMP134.

<i>R. eutropha</i> JMP134 (log ufc/ml) ^a		% degradación ^b
día 0	día 6	
7,8	8,4	68,6
6,7	8,5	64,8
5,9	8,5	61,5
5,0	8,7	52,4
3,5	8,6	53,3
2,3	8,6	55,9
0	0	1,5

a: las ufc de *R. eutropha* JMP134 fueron determinadas en placas con 2,4-D (2 mM) como única fuente de carbono. b: remoción de material absorbente a 284 nm, después de 6 días de incubación con 400 ppm de 2,4-D. Los valores son promedios entre duplicados (DS<10%).

Tabla XIV: Degradación de 2,4,6-TCF en cultivos de aireación forzada alimentados con efluente e inoculados con *R. eutropha* JMP134.

<i>R. eutropha</i> JMP134 (log ufc/ml) ^b		% degradación ^a
día 0	día 6	
8,1 (8,3)	7,0 (7,8)	92,7 (90,4)
6,1 (6,1)	7,0 (8,1)	93,3 (100)
5,7 (4,0)	5,3 (8,3)	92,8 (100)
3,9 (3,8)	5,0 (8,9)	52,5 (93,3)
2,9 (2,1)	3,4 (7,1)	66,7 (70,3)
0 (0)	0 (0)	6,4 (6,7)

a: remoción de material absorbente a 294 nm, después de 6 días de incubación con 100 ppm de 2,4,6-TCF. Los valores son promedios entre duplicados (DS<10%). b: Las cuentas de *R. eutropha* JMP134 fueron determinadas en placas con 2,4-D (2mM) como única fuente de carbono. Los valores en paréntesis corresponden a experimentos efectuados en presencia de efluente estéril, es decir, sin microorganismos endógenos.

90% de remoción con un inóculo inicial de 10^8 células y un 66% de degradación con sólo 10^2 células/ml.

La presencia de microorganismos endógenos inhibió la degradación de este clorofenol en casi todas las condiciones probadas. *R. eutropha* JMP134 alcanzó cuentas de 10^7 - 10^8 ufc/ml en ausencia de microorganismos endógenos (efluente estéril), independientemente del inóculo original. En cambio, en presencia de estos microorganismos las cuentas viables de la cepa JMP134 no siempre alcanzaron los niveles para efluente estéril y fueron dependientes del inóculo inicial (Tabla XIV).

2. Clonamiento y expresión de los genes *tfd*CDEF para la degradación de clorocatecoles: una ruta catabólica convergente.

Los resultados de la sección anterior señalan que la capacidad de los microorganismos endógenos para degradar organoclorados en un sistema industrial es limitado. Por otra parte, una cepa capaz de degradar diversos cloroaromáticos, como *R. eutropha* JMP134, es capaz de expresar dicha capacidad en este sistema complejo. Por ello resulta atractivo evaluar si los genes catabólicos claves de esta cepa confieren a cepas endógenas la capacidad para degradar este tipo de compuestos. Una primera etapa en la evaluación de esta pregunta es clonar y expresar los genes del metabolismo de clorocatecoles de *R. eutropha* JMP134.

Los genes catabólicos escogidos son los que están contenidos en el operón *tfdCDEF* del plasmidio pJP4 y permiten la degradación de clorocatecoles a β -cetoadipato.

2.1 Clonamiento del operón *tfdCDEF*.

Si bien se intentó el clonamiento del operón *tfdCDEF* a partir de pJP4, sólo fue posible tener éxito al realizar el subclonamiento a partir del plasmidio pVJE22, el cual contiene el fragmento de 15 kb *EcoRI* "B" de pJP4 (ver Figura 17). A partir de una minipreparación de DNA de pVJE22 (M. y M. sección 9.1), se procedió a clonar el fragmento *EcoRI-Bam* HI de 10,5 kb en el vector pUC18Not (corresponde a pUC18 que presenta en los extremos del "polilinker" dos sitios Not I) linearizado con las mismas enzimas, los clones fueron analizados por PCR (M. y M. sección 9.6.3) y aquel que resultó dar amplificación del tamaño esperado (1,8 kb para el fragmento *tfdCD* o 1,9 kb para el fragmento *tfdEF*), fue denominado clon b-62. Una minipreparación de éste mostró contener un sólo plásmido de 13,2 kb, que por digestión con *Not* I mostró contener un inserto de 10,5 kb. Este plásmido fue designado pJRC105 (Figura 17).

A partir de una minipreparación de DNA de pJRC105, se clonó el fragmento *Hpa* I-*Bam*HI de 6,7 kb en pBluescript SK, digerido previamente con

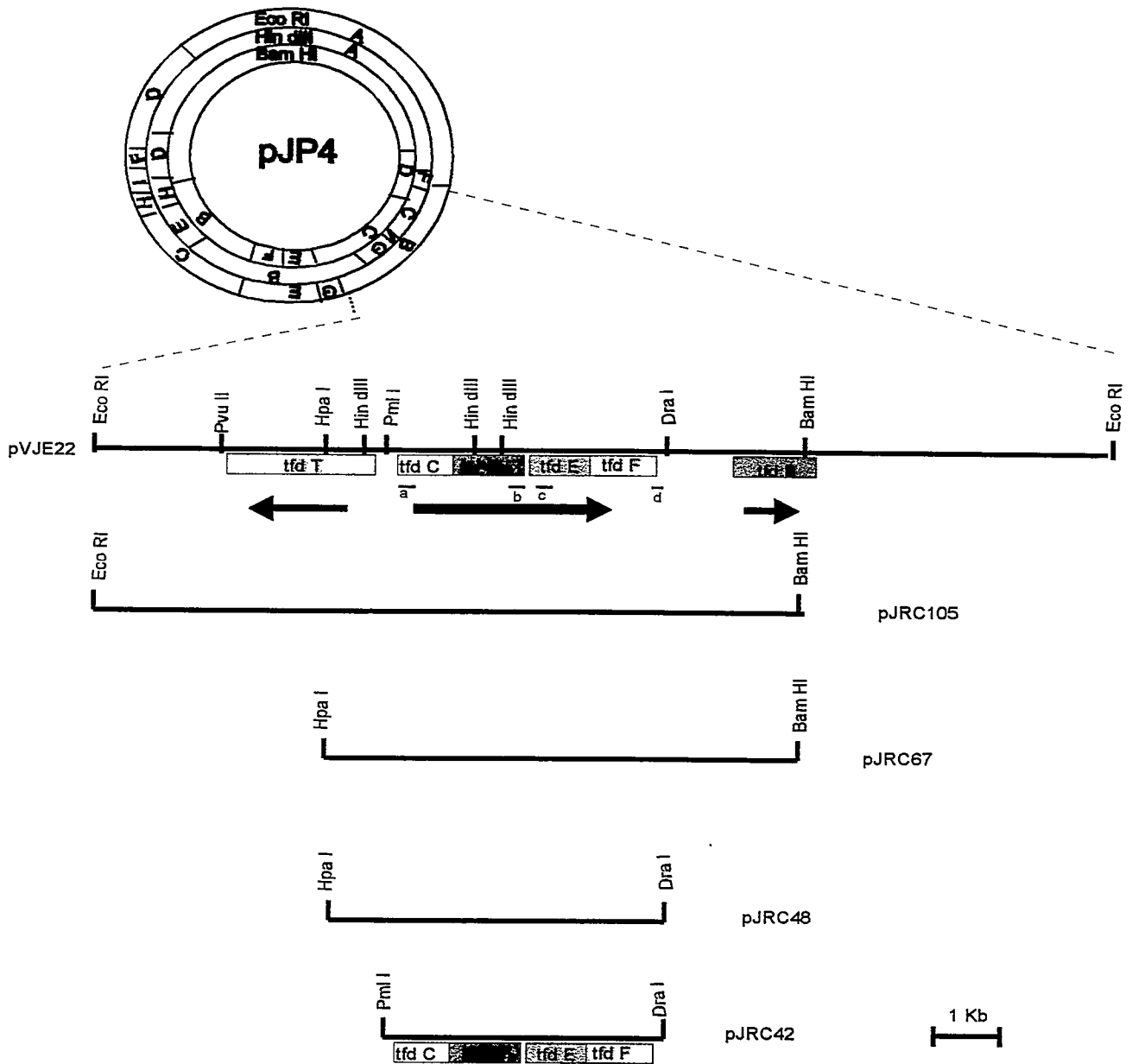


Figura 17: Esquema de subclonamientos de los genes *tfdCDEF*.

Mapa físico de pJP4 tomado de Perkins, y col., 1990. Las flechas indican la posición y dirección de transcripción de *tfdCDEF*, *tfdB* y *tfdT*. Los plásmidos pJRC105, pJRC48 y pJRC42 son derivados de pUC18Not, mientras que pJRC67 es derivado de pBluescript SK. a, b, c y d corresponden a la posición de los partidores para PCR VAL-1, Val-2, BDO-1 y BDO-2, respectivamente.

Sma I y *Bam* HI. Las colonias blancas obtenidas fueron analizadas por PCR, aquella colonia que dio señal positiva fue denominada clon 34, el cual mostró contener un plásmido de 9,7 kb, que por digestiones con *Eco* RI, *Xba* I y *Dra* I confirmo la identidad del fragmento de 6,7 kb clonado. A este plásmido se le denominó pJRC67 (Figura 17).

A partir de una minipreparación de DNA de pJRC67, se clonó el fragmento de 4,8 kb resultante de digerir el plásmido con las enzimas *Eco* RI (sitio del polilinker del vector río arriba del sitio *Sma* I/*Hpa* I de pJRC67) y *Dra* I, el cual fue insertado en el vector pUC18Not, digerido con *Eco* RI y *Hinc* II. Las colonias obtenidas fueron analizadas por PCR y dos de los clones con amplificación positiva fueron denominados clon 20 y clon 23. Estos clones mostraron contener un mismo plásmido de 7,5 kb, el cual por digestiones con *Not* I mostró contener el fragmento de 4,8 kb clonado. A este plásmido se le denominó pJRC48 (Figura 17).

Finalmente, a partir de una minipreparación de DNA de pJRC48, se clonó el fragmento de 4,2 kb resultante de digerir este plásmido con las enzimas *Pml* I y *Sph* I, en pUC18Not digerido con *Sma* I y *Sph* I. Los clones obtenidos como positivos por PCR fueron designados clon 17, clon 23n, clon 28, clon 38, clon 47 y clon 53, todos ellos mostraron contener sólo un plásmido de 6,9 kb, el cual por digestión con *Not* I mostró ser el mismo, a este plásmido se le denominó pJRC42.

2.2 Clonamiento de los genes *ffdCDEF* bajo el control de un promotor heterólogo.

Debido a la información contradictoria de la literatura respecto a la regulación del operón *ffdCDEF*, se consideró conveniente el clonamiento de los genes bajo el control de un promotor heterólogo que pudiera ser regulable. Para ello se escogieron los promotores *Psal* y su regulador Nah R, así como *P_{trc}* (un híbrido entre el promotor *P_{tac}* y el promotor *P_{trp}*) y su regulador *LacI^q*, presentes en los vectores de clonamiento derivados de pUT(Km) (pCNB4 y pCNB5), basados en el transposón Tn5. pUT (Km) es un vector suicida que presenta un origen de replicación derivado del plásmido R6K dependiente de la proteína II (pi), por lo tanto puede ser mantenido replicativamente sólo en cepas que expresan dicha proteína, como en las cepas lisógenas λ pir de *E. coli* K12: cc118 λ pir y SM10 λ pir. El vector también contiene un origen de transferencia (*oriT*), correspondiente al plásmido RP4, lo cual permite su transferencia eficiente, con la ayuda de un plásmido "helper" como pRK600. Los derivados de pUT (pCNB4 y pCNB5) presentan además la ventaja de contar con un gen de transposasa (*tnp**), el cual es un gen mutado que carece de un sitio *Not* I, y que se encuentra clonado fuera de la región de transposición delimitada por las secuencias de inserción de 19 pb (I/O) derivadas del IR_L de Tn5 (de Lorenzo, y col., 1990). Los vectores pCNB4 y

pCNB5 contienen, respectivamente, los promotores heterólogos *Psal* y *P_{trc}*, dejando a continuación del promotor sólo un sitio *Not* I disponible para el clonamiento de los genes que deban ser regulados (de Lorenzo, y col., 1993; de Lorenzo, y col., 1993). Para ello, los genes a ser regulados deben ser subclonados en un vector pUC18Not.

Para continuar el trabajo se seleccionó el plasmido pJRC42, en el cual sólo existen 18 pb río arriba del sitio de unión a ribosoma. El DNA obtenido de una minipreparación fue digerido con *Not* I, con el fin de separar el inserto de 4,2 kb conteniendo los genes *ffdCDEF* del vector pUC18Not. El fragmento así obtenido fue ligado con DNA obtenido de pCNB4 y pCNB5, linealizados con *Not* I y desfosforilados (M. y M. sección 9.3). De las colonias obtenidas luego de transformar *E. coli* cc118 λ pir, se determinó por PCR aquellas que contenían el operón *ffdCDEF*. Se descartaron las inserciones múltiples al digerir con *Not* I y se analizó la orientación del fragmento de 4,2 kb conteniendo el operón *ffdCDEF*, respecto a los promotores heterólogos. Para ello se realizaron digestiones con las enzimas *Sst* I, *Xba* I, *Hpa* I y *Eco* RI, el resultado fue sólo un clon derivado de pCNB5 correcto y este fue denominado clon 8-1, conteniendo un plásmido de 13 kb que fue denominado pCNB5-JRC42. Una nueva ligación del fragmento de 4,2 Kb con los vectores pCNB4 y pCNB5 y análisis por PCR de 105 colonias arrojó 21 colonias positivas por PCR, las cuales tras digestiones con enzimas de restricción, arrojaron sólo cuatro clones con inserto único y en orientación correcta, estos fueron denominados clon 3-

17, clon 3-19 y clon 3-35, a los derivados de pCNB4 que contenían un plásmido denominado pCNB4-JRC42 y clon 4-28 al derivado de pCNB5 que junto al clon 8-1 obtenido anteriormente, contenían un plásmido denominado pCNB5-JRC42. La Figura 18 y la Figura 19 esquematizan las dos cassettes derivadas de pJRC42 construidas bajo control de los promotores heterólogos P_{sal} y P_{trc} respectivamente. Por último, la Tabla XV resume los clones obtenidos para las diferentes construcciones.

2.3 Evaluación de la expresión de las construcciones obtenidas en *E. coli*, *R. eutropha* y *P. putida*.

Como fuera descrito en la Introducción, los clorocatecoles son compuestos tóxicos generados por la metabolización parcial de otros compuestos clorofenólicos; de aquí la importancia del contexto genético en el cual las construcciones puedan ser evaluadas. Aunque en ensayos *in vitro*, es posible utilizar clorocatecoles éstos, por su inestabilidad química (se oxidan fácilmente y las quinonas resultantes tienden a polimerizar y formar productos coloreados), no pueden usarse como fuente de carbono por sí solos, si no que deben ser generados *in situ* como consecuencia de reacciones de transformación de un sustrato primario. Por esta razón se escogió

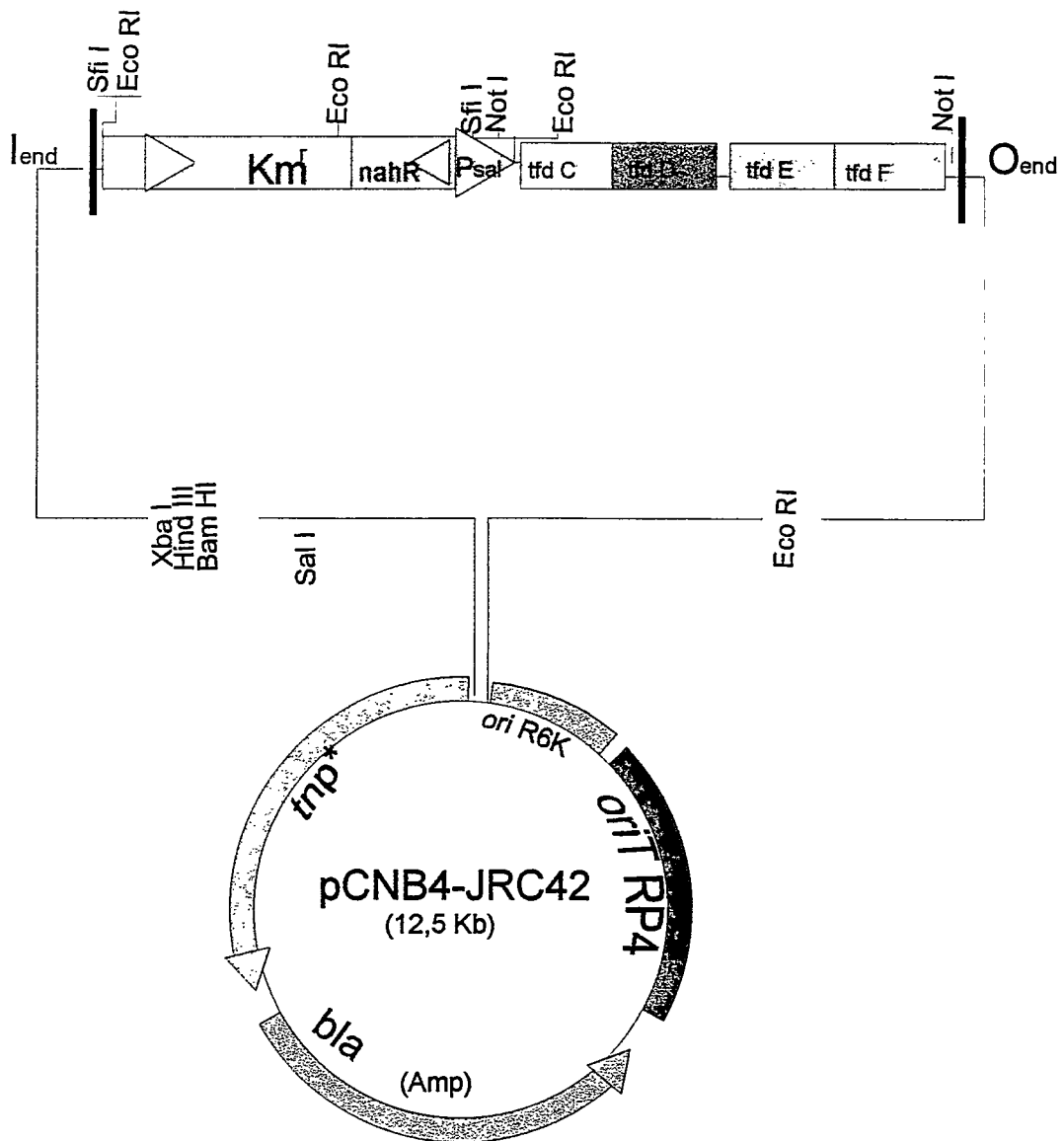


Figura 18: Esquema representando la construcción denominada pCNB4-JRC42.

Km: gen de resistencia a kanamicina, *nahR*: gen regulador del promotor PsaI, *tfdC*, *tfdD*, *tfdE*, *tfdF*: genes estructurales del operón *tfdCDEF* clonados, *trp**: gen de transposasa, *bla*: gen de resistencia a ampicilina, oriT: origen de transferencia derivado de pRP4, ori: origen de replicación derivado de pR6K, I-end, O-end: señales de inserción transposicional derivadas de Tn5. Los triángulos indican el sentido de transcripción de los genes en cuestión.

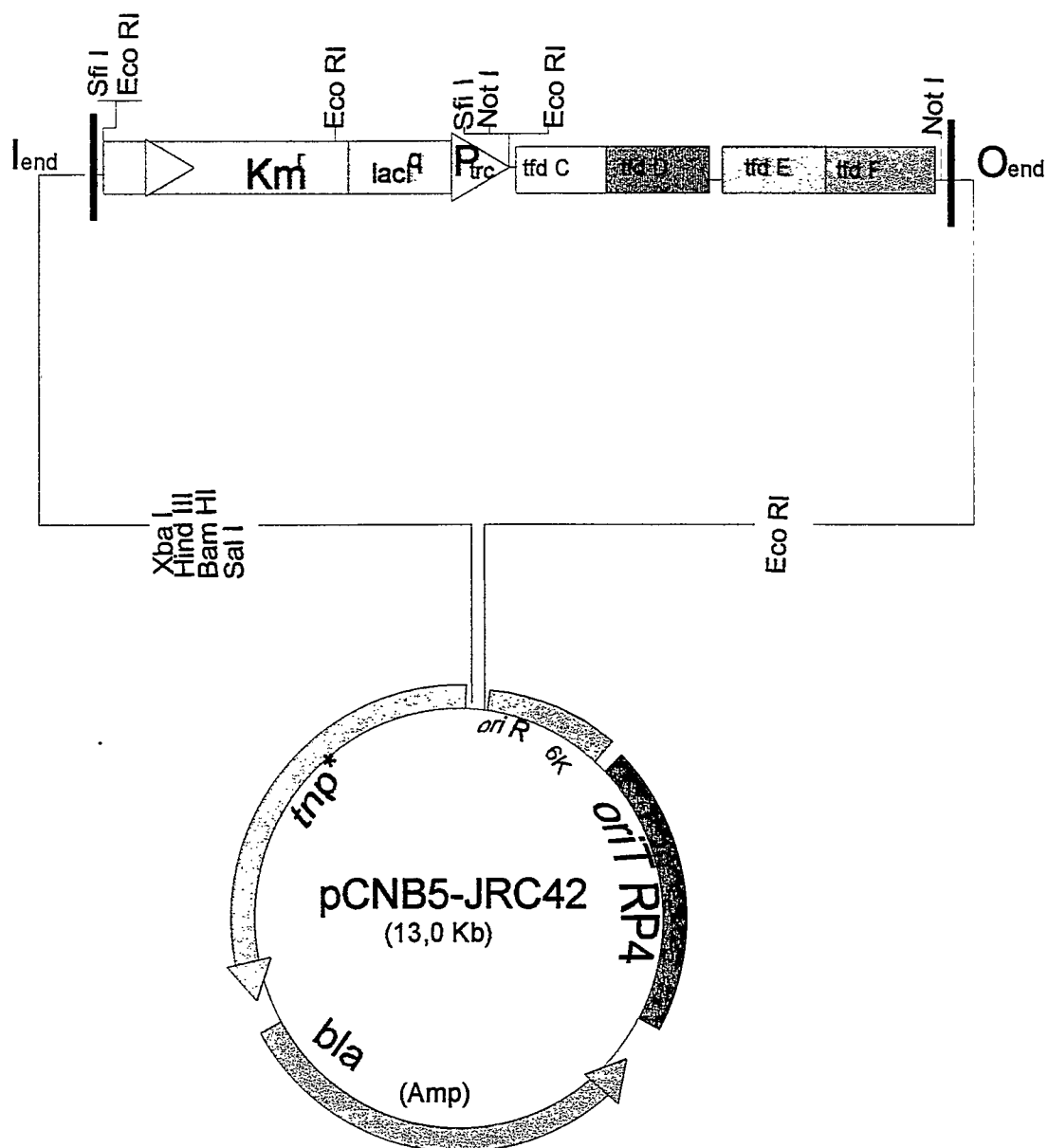


Figura 19: Esquema representando la construcción denominada pCNB5-JRC42.

Km: gen de resistencia a kanamicina, *lacI^q*: gen regulador del promotor P_{trc}, *tfdC*, *tfdD*, *tfdE*, *tfdF*: genes estructurales del operón *tfdCDEF* clonados, *tnp**: gen de transposasa, *bla*: gen de resistencia a ampicilina, *oriT*: origen de transferencia derivado de pRP4, *ori*: origen de replicación derivado de pR6K, I_{end}, O_{end}: señales de inserción transposicional derivadas de Tn5. Los triángulos indican el sentido de transcripción de los genes en cuestión.

Tabla XV: Resumen de clones de *E. coli* conteniendo las distintas construcciones realizadas en esta tesis.

Clones	Hospedero/replicón del que deriva	construcción
clon b-62	<i>E. coli</i> DH5 α /pUC18Not	pJRC105
clon 34	<i>E. coli</i> DH5 α /pBluescript SK	pJRC67
clon 20 y clon 22	<i>E. coli</i> DH5 α /pUC18Not	pJRC48
clon 17, clon 23n, clon 28, clon 38, clon 47 y clon 53,	<i>E. coli</i> DH5 α /pUC18Not	pJRC42
clon 3-17, clon 3-19 y clon 3-35	<i>E. coli</i> cc118 λ pir/pCNB4	pCNB4-JRC42
clon 8-1 y clon 4-28	<i>E. coli</i> cc118 λ pir/pCNB5	pCNB5-JRC42

3-clorobenzoato como substrato de análisis de la expresión *in vivo*. Se buscaron los contextos genéticos adecuados para estudiar la transformación de este substrato.

El principio de selección requiere que un microorganismo incorpore el compuesto suministrado (3CB) y lo transforme generando 3-clorocatecol (3-CC), pero que a continuación no modifique este compuesto. De ser así, este compuesto se acumularía en el medio y debido a su inestabilidad química se oxidaría generando el oscurecimiento del medio, debido al color de las quinonas y productos de polimerización. El ensayo realizado en el laboratorio consistió en exponer biomasa de distintos microorganismos a una placa de agar en medio salino conteniendo 3CB e incubarla a 30 o 37°C por 24 h, al término del cual, la biomasa se oscureció si es que se produjo acumulación de 3CC. Mediante este ensayo se confirmaron como entornos genéticos posibles a las cepas de *Pseudomonas putida* KT2442 y *Ralstonia eutropha* JMP222 y se comprobó como negativo para dicha transformación a *E. coli* cc118 λ pir y *Acinetobacter junii* 5ga (González y col., 1993).

2.4 Estudios de expresión de las construcciones derivadas de pJRC42.

Como primer parámetro para evaluar la expresión de estas construcciones se estudió la capacidad de suspensiones celulares de los clones en *E. coli* cc118 λ pir para desclorar 3-clorocatecol evaluando en primer lugar su expresión a nivel enzimático en *E. coli* cc118 λ pir. Los resultados que

se muestran en la Tabla XVI indican, en primer lugar, que las cassettes se expresan, y que éstas fueron capaces de producir una descloración entre un 90 y 100% (referido al control de *R. eutropha* JMP134), después de una incubación por una noche con 3-CC. También se desprende de la Tabla XVI que no parece haber una diferencia importante entre los clones construidos en pCNB5 (clones 8-1y 4-28) entre si, o los clones construidos en pCNB4 (clones 3-19, 3-17 y 3-35). Pero sí se muestra claramente que mientras los clones derivados de pCNB4 fueron claramente dependientes de la presencia de salicilato (como inductor) en el medio de cultivo, los clones derivados de pCNB5 mostraron capacidad de desclorar 3-CC, independiente de la presencia del inductor IPTG. Adicionalmente se comprobó que en el contexto genético de *E. coli* no es posible desclorar 3-CB (resultados no mostrados), por carecer ésta de las enzimas necesarias (benzoato dioxigenasa y 1,2-dihidrodiol benceno dehidrogenasa) para empalmar 3-CB en la ruta de degradación del 3-CC.

Para los ensayos siguientes se utilizó un clon representativo de cada tipo de construcción: el clon 8-1 (pCNB5-JRC42) y el clon 3-19 (pCNB4-JRC42). Estos clones fueron empleados en conjugaciones triparentales (M. y M. sección 9.7.2) para transferir las construcciones al cromosoma de *R. eutropha* JMP222.

Tabla XVI: Ensayos de descloración de 3-CC por suspensiones celulares de clones en *E. coli* cc118 λ pir.

Cepa	medio/inductor	3-CC (1 mM) %
<i>R. eutropha</i> JMP134	Benzoato/3CB	100*
<i>E. coli</i> cc118 λ pir (pCNB5)	LB/IPTG	15
<i>E. coli</i> cc118 λ pir (pCNB4)	LB/salicilato	9
<i>E. coli</i> cc118 λ pir clon 8-1 (pCNB5-JRC42)	LB/IPTG	100
<i>E. coli</i> cc118 λ pir clon 8-1 (pCNB5-JRC42)	LB	100
<i>E. coli</i> cc118 λ pir clon 4-28 (pCNB5-JRC42)	LB/IPTG	90
<i>E. coli</i> cc118 λ pir clon 4-28 (pCNB5-JRC42)	LB	100
<i>E. coli</i> cc118 λ pir clon 3-19 (pCNB4-JRC42)	LB/salicilato	100
<i>E. coli</i> cc118 λ pir clon 3-19 (pCNB4-JRC42)	LB	0
<i>E. coli</i> cc118 λ pir clon 3-17 (pCNB4-JRC42)	LB/salicilato	100
<i>E. coli</i> cc118 λ pir clon 3-17 (pCNB4-JRC42)	LB	0
<i>E. coli</i> cc118 λ pir clon 3-35 (pCNB4-JRC42)	LB/salicilato	100
<i>E. coli</i> cc118 λ pir clon 3-35 (pCNB4-JRC42)	LB	0

*: Porcentajes corresponden al cloruro liberado, referido a JMP134 (0,85 mM).
nd: no determinado. Valores promedios de tres ensayos.

2.4.1 Estudio de expresión de la construcción pCNB5-JRC42.

De las conjugaciones triparentales realizadas entre JMP222 y el clon 8-1 se obtuvieron los clones *R. eutropha* JMP222-21 y JMP222-25, las cassette insertadas cromosomalmente.

Al igual que para evaluar la expresión de las construcciones en *E. coli*, para estudiar la expresión de las construcciones en este nuevo contexto genético se realizó una cinética de descloración, comparando los clones JMP222-21 y JMP222-25, crecidos en medio rico (LB, con o sin presencia de IPTG) y se los comparó con el clon de *E. coli* cc118 λ pir 8-1. Los resultados graficados en la Figura 20, indican que cuando las cepas fueron crecidas en medio rico, las construcciones reguladas por el promotor Ptrc, presentaron una expresión basal en *R. eutropha* JMP222, en ausencia del inductor IPTG.

Los resultados obtenidos en la cinética de descloración indicaron que las enzimas tfdCDEF se expresaban. Ello se comprobó determinando la actividad específica.

Para determinar la actividad específica de las enzimas presentes en las construcciones se realizaron extractos crudos de los clones JMP222-25, JMP222-21, clon 8-1, así como de las cepas parentales JMP134, JMP222 y *E. coli* cc118 λ pir, conteniendo el vector pCNB5. En las Figura 21 a la Figura 23 se

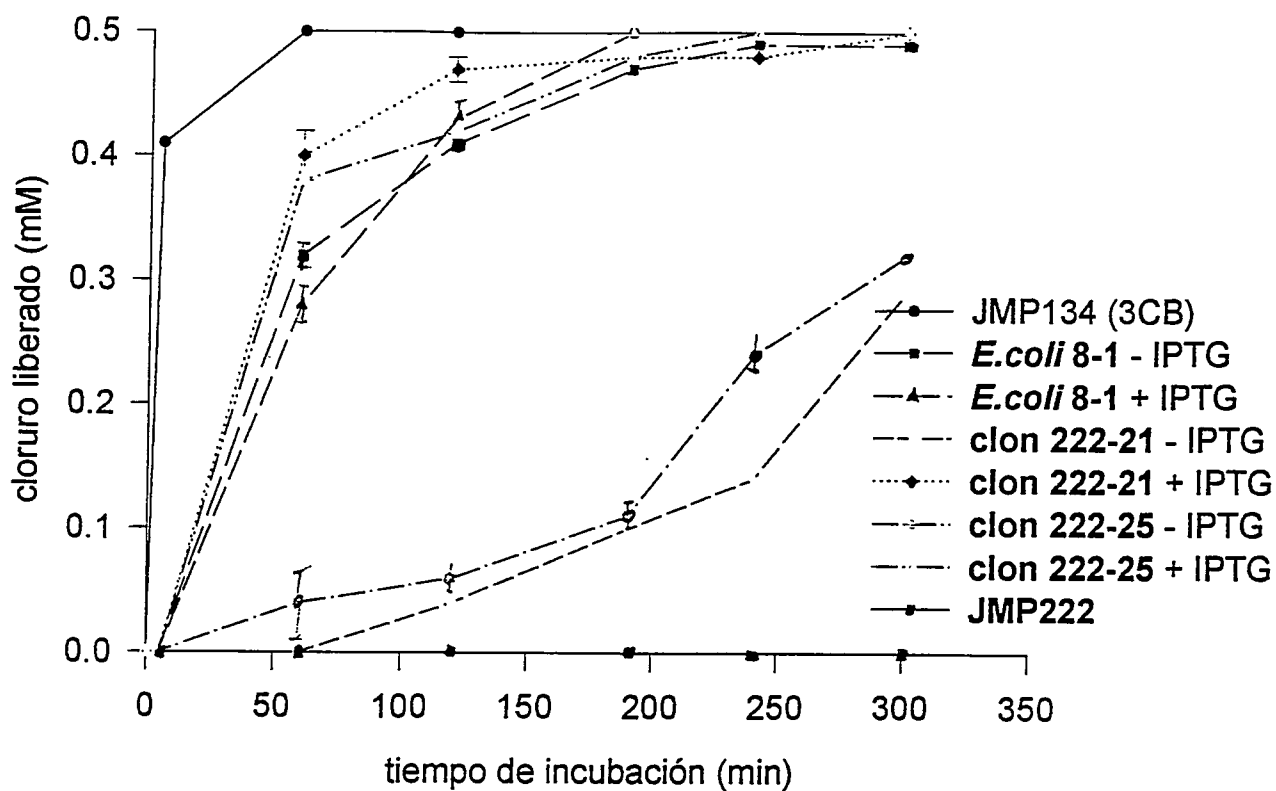


Figura 20: Cinética de descloración de 4-CC por clon 8-1, JMP222-21 y JMP222-25.

La concentración de 4-CC en el ensayo fue de 0,5 mM. Las células crecidas en medio LB, en presencia o ausencia del inductor, fueron lavadas y resuspendidas a una $DO_{660}=5,0$ de acuerdo a lo que se describe en M. y M. 5.2. Resultados promedios de 6 determinaciones.

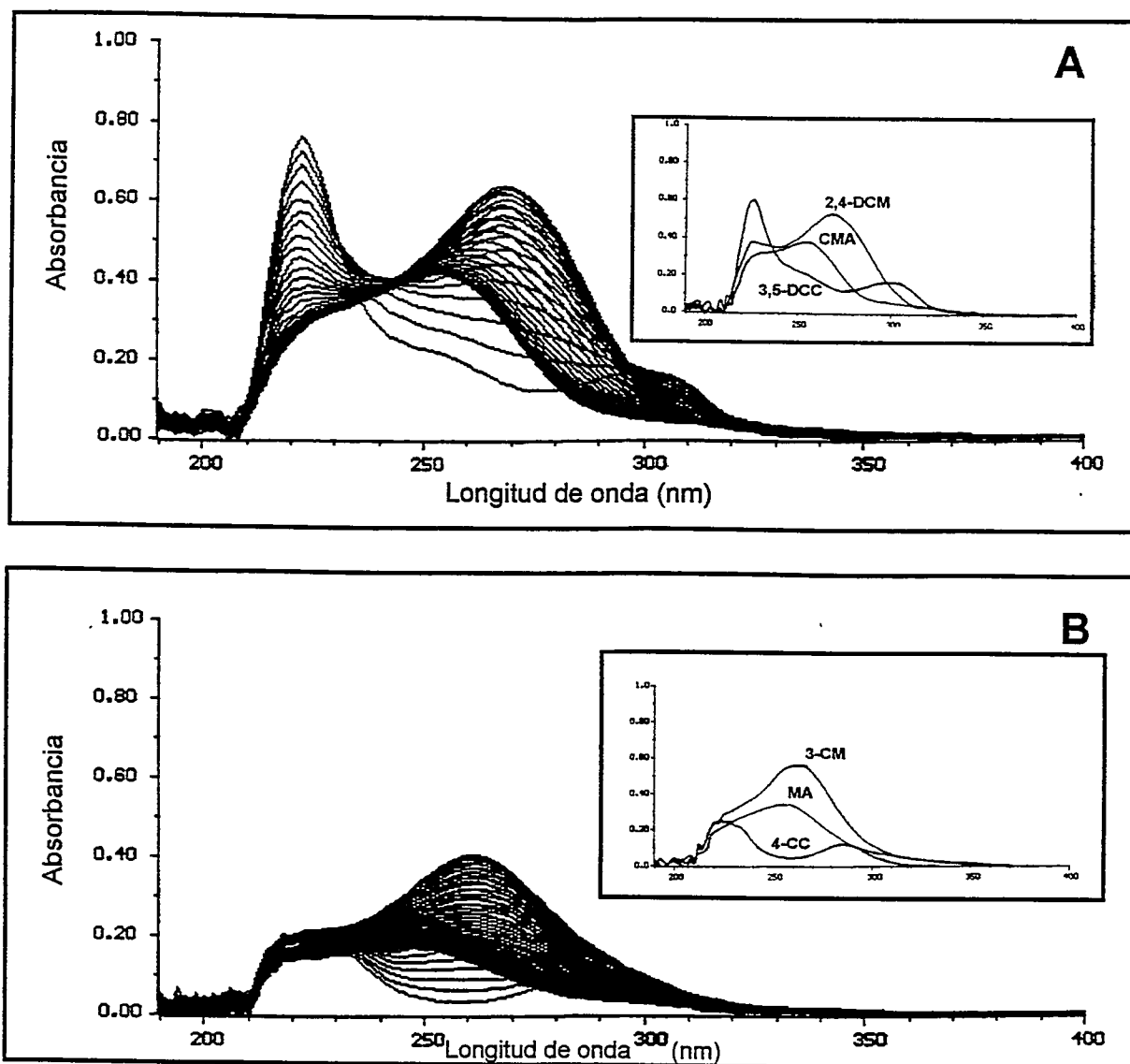


Figura 21: Cinética de transformación de 3,5-DCC (A) y 4-CC (B) (0,1 mM), por un extracto crudo de *R. eutropha* JMP134 crecida en 2,4-D.

Las reacciones fueron iniciadas con la adición del extracto crudo, cada barrido espectral fue realizado con un intervalo de 10 s. En los insertos se muestran los espectros tipos para catecoles (3,5-DCC y 4-CC), muconatos (3-CM y 2,4-DCM) y maleilacetatos (MA y CMA). El blanco fue ajustado previo a la adición del substrato respectivo de acuerdo a lo descrito en M. y M. 6.6.

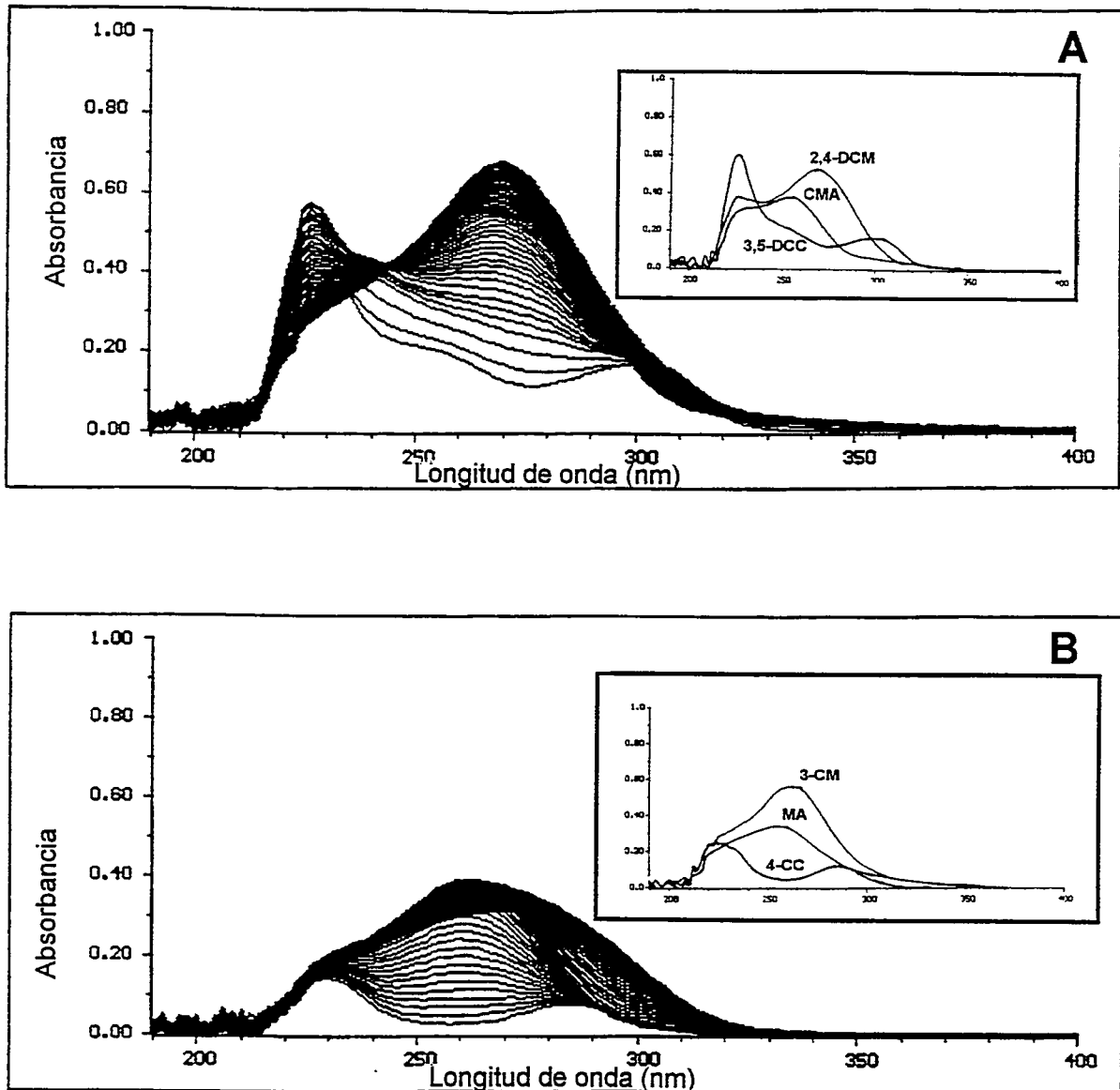


Figura 22: Cinética de transformación de 3,5-DCC y 4-CC (0,1 mM), por un extracto crudo de *R. eutropha* JMP222-25 crecido en LB.

Cada barrido espectral fue realizado con un intervalo de 10 s. En los insertos se muestran los espectros tipos para catecoles (3,5-DCC y 4-CC), muconatos (3-CM y 2,4-DCM) y maleilacetatos (MA y CMA). El blanco fue ajustado previo a la adición del substrato respectivo.

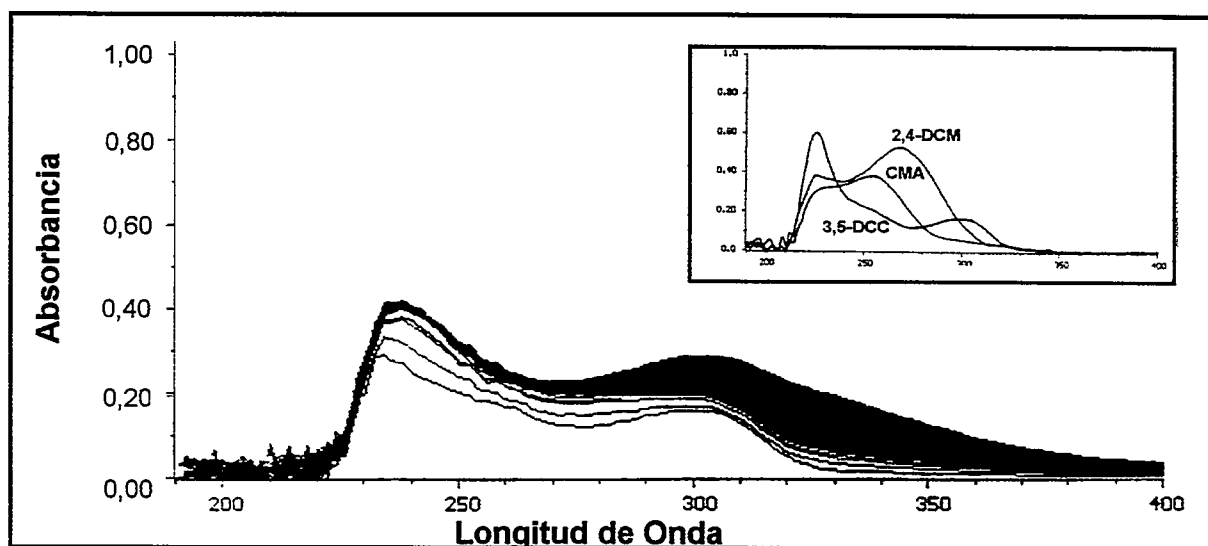


Figura 23: Cinética de transformación de 3,5-DCC (0,1 mM) por un extracto crudo de *R. eutropha* JMP222 crecido en LB.

Cada barrido espectral fue realizado con un intervalo de 10 s. En el inserto se muestran los espectros tipos para 3,5-DCC, 2,4-DCM y CMA. El blanco fue ajustado previo a la adición del sustrato.

muestra la transformación de un clorocatecol por extractos crudos, de acuerdo a los descrito en M. y M., sección 6.6. En estas gráficas se observa como el espectro original del clorocatecol, que tiene un máximo de absorbancia alrededor de 225 nm (para 3,5-DCC), se desplazó a un máximo cercano a 270 nm (consecuencia de la formación del cloromuconato), éste a su vez sufre un cambio espectral generando un máximo próximo a 255, cuando el substrato remanente en la cubeta ha sido transformado en cloromuconato. Si se comparan la Figura 21 y la Figura 22 se observa que si bien la cinética de transformación de substratos por extractos crudos de *R. eutropha* JMP134 es mayor que la observada para el clon JMP222-25, este último clon igual transforma completamente el substrato cuando se le compara con el espectro obtenido de la cepa parental JMP222 crecida el LB (Figura 23). En la Tabla XVII se muestran los valores calculados de actividades específicas de las enzimas presentes en las construcciones.

Los resultados mostrados en la Tabla XVII confirmaron la expresión basal de las construcciones bajo control del promotor Ptrc observado en los ensayos de descloración por células descritos anteriormente. En presencia de IPTG la actividad específica para catecol dioxigenasa y la actividad combinada de cloromuconato cicloisomerasa y clorodienolactona hidrolasa fue tres veces mayor que la actividad observada en extractos crudos no inducidos.

Tabla XVII: Actividades enzimáticas presentes en un extracto crudo.

Cepa substrato de crecimiento	Catecol 1,2-dioxigenasa (U/mg)			CMCI / DLH (U/mg)			MAR (U/mg)	
	3,5-DCC	4-CC	3-CC	2,4-DCM	3-CM	2-CMA	MA	
<i>R. eutropha</i> JMP134 2,4-D	0,972	0,222	0,235	0,282	0,090	0,295	0,429	
<i>R. eutropha</i> JMP134 3-CB	1,862	0,484	0,438	0,326	0,130	-	-	
<i>R. eutropha</i> JMP134 LB	0	0	0	0	0	0,467	0,457	
<i>E. coli</i> cc118λpir pCNR5.LB/IPTG	0	0	0	0	0	0,090	0,141	
<i>E. coli</i> cc118λpir clon.8-1.LB	0,103	0,024	0,028	0,011	0,010	0,138	0,219	
<i>E. coli</i> cc118λpir clon.8-1.LB/IPTG	0,124	0,034	0,046	0,047	0,020	0,143	0,190	
<i>E. coli</i> cc118λpir clon.3-19.LB	0	0	0	0	0	-	-	
<i>E. coli</i> cc118λpir clon.3-19.LB/salicilato	0,050	0,015	-	0,014	0,008	-	-	
<i>R. eutropha</i> JMP222 LB	0	-	-	0	-	0,400	0,638	
<i>R. eutropha</i> JMP222-21 LB	0,021	0,005	0,004	0,007	0,001	0,524	0,538	
<i>R. eutropha</i> JMP222-21 LB/IPTG	0,072	0,019	0,018	0,018	0,005	0,550	0,581	
<i>R. eutropha</i> JMP222-25 LB	0,031	0,005	0,004	0,009	0,009	-	-	
<i>R. eutropha</i> JMP222-25 LB/IPTG	0,083	0,024	0,028	0,053	0,020	-	-	

-: No determinado. Resultados promedios de seis ensayos (DS<10%). CMCI:cloromuconato cicloisomerasa, DLH:dienolona hidrolasa, MAR:maleilacetato reductasa.

Nota: En los ensayos de determinación de MAR, la actividad de consumo de NADH para *E. coli* en ausencia de substrato fue menor al 10% y para *R. eutropha* fue menor al 1%.

Respecto a maleilacetato reductasa no fue posible definir un incremento de actividad debido a la presencia de la actividad equivalente de origen cromosomal.

Una vez concluidos los análisis de los clones obtenidos a partir del clon 8-1, se procedió a analizar clones derivados de la cassette clonada en pCNB4, como se indicara, en este caso el clon tipo en *E. coli* cc118 λ pir escogido para los análisis fue el clon 3-19. Al transferir la construcción pCNB4-JRC42 residente en dicho clon por conjugación triparental a JMP222 fue difícil seleccionar clones que crecieran en 3CB, esto por que la cepa parental (JMP222) crece en salicilato 1,25 mM, empleado como inductor del promotor Psal. Puesto que no era necesario repetir todo el análisis realizado con los clones JMP222-21 y JMP222-25, se realizaron curvas de cinética de descloración, las cuales fueron un buen índice de expresión de actividad de los clones. En la Figura 24, se muestran los resultados obtenidos al comparar biomásas crecidas en LB, del clon 3-19 en *E. coli* cc118 λ pir, con los clones JMP222-sal1 y JMP222-sal2, en presencia y ausencia de salicilato como inductor. Los resultados indicaron que la expresión de esta cassette bajo control del promotor Psal, en el entorno genético de *R. eutropha* JMP222, fue totalmente dependiente de la presencia de salicilato.

Para evaluar la expresión de las dos cassettes derivadas de pJRC42, bajo el control ya sea del promotor Ptrc o Psal en otro entorno genético, se

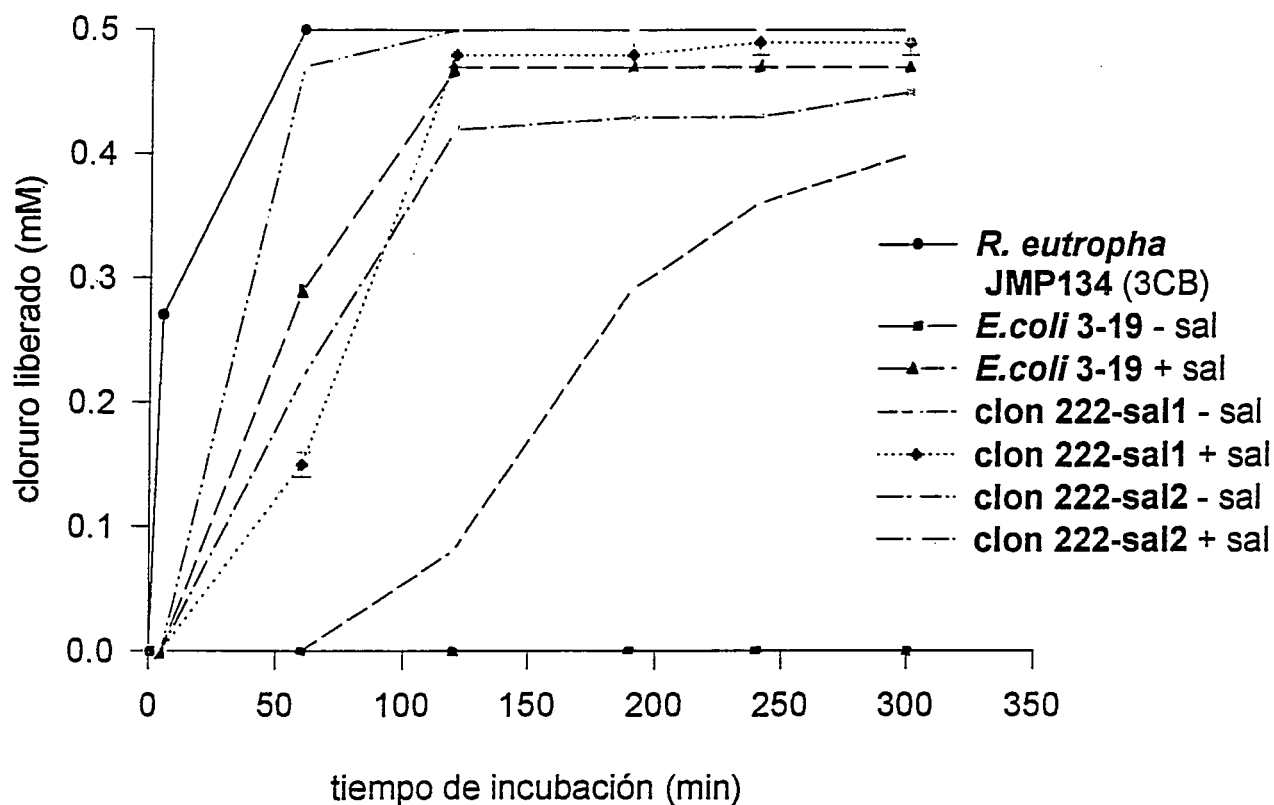


Figura 24: Cinética de descloración de 4CC (0,5 mM) por clones derivados de pCNB4-JRC42.

La concentración de 4-CC en el ensayo fue de 0,5 mM. Las células fueron resuspendidas en un DO_{660} equivalente a 5,0. Resultados promedios de 6 determinaciones. Ver Figura 20.

hicieron conjugaciones triparentales entre los clones 8-1 y 3-19 de *E. coli* cc118 λ pir y la cepa *P. putida* KT2442. Dos clones fueron seleccionados en cada caso por su capacidad de crecer en placas de 3CB conteniendo IPTG o salicilato como inductor (esta cepa no es capaz, a diferencia de la cepa de *R. eutropha* JMP222, de metabolizar el salicilato). Las cinéticas de descloración obtenidas para ellos se muestran en la Figura 25. En éstas se puede observar un comportamiento análogo a lo descrito para *R. eutropha* JMP222, esto es, un comportamiento semi-constitutivo de las construcciones reguladas por Ptrc, en ausencia del inductor IPTG, mientras que una expresión dependiente de la presencia de salicilato para las construcciones reguladas por Psal.

Finalmente los clones obtenidos en *R. eutropha* JMP222 y *P. putida* KT2442 fueron estudiados por su capacidad para desclorar 3-CB (M. y M. sección 5.2), en la Tabla XVIII se resumen los resultados obtenidos, los cuales muestran que a diferencia de las cepas parentales, los clones han adquirido la capacidad para desclorar en forma significativa 3-CB.

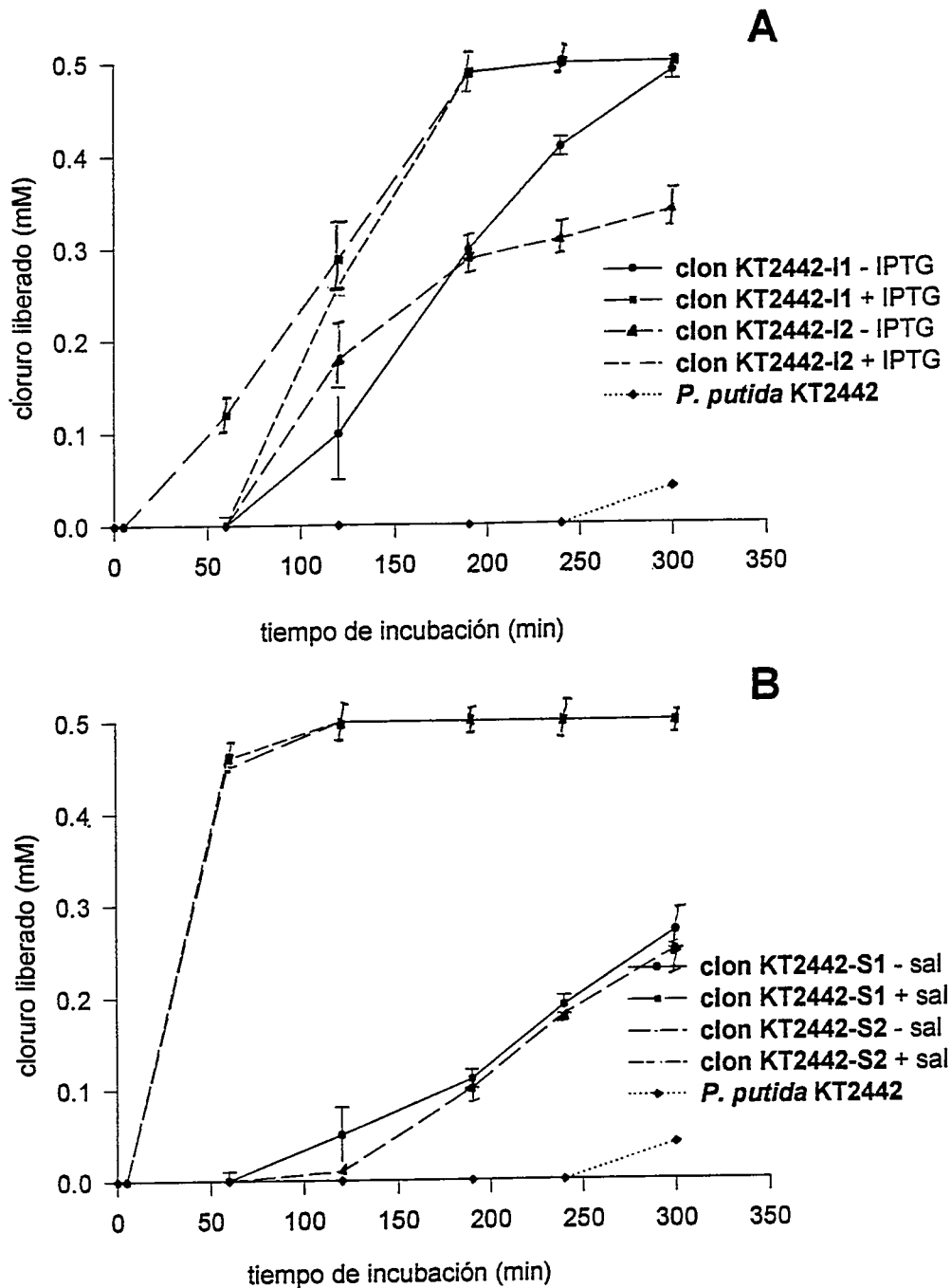


Figura 25: Cinética de descloración de 4-CC (0,5 mM) para clones derivados de *P. putida* KT2442.

A) Clones inducidos con IPTG (1 mM). B) Clones inducidos con salicilato (1,25 mM). Las células fueron resuspendidas a una DO_{660} equivalente a 5,0. Resultados promedios de tres determinaciones. Ver Figura 20.

Tabla XVIII: Descloración de 3-CB por clones obtenidos en *R. eutropha* JMP222 y *P. putida* KT2442.

Cepa/Clon	Inductor ¹	Descloración (%) ²
<i>R. eutropha</i> JMP222	-	0
<i>R. eutropha</i> JMP222-21	-	16
<i>R. eutropha</i> JMP222-21	IPTG	56
<i>R. eutropha</i> JMP222-25	-	18
<i>R. eutropha</i> JMP222-25	IPTG	56
<i>R. eutropha</i> JMP222-sal1	-	10
<i>R. eutropha</i> JMP222-sal1	salicilato	56
<i>R. eutropha</i> JMP222-sal2	-	16
<i>R. eutropha</i> JMP222-sal2	salicilato	56
<i>P. putida</i> KT2442	-	0
<i>P. putida</i> KT2442-I1	-	10
<i>P. putida</i> KT2442-I1	IPTG	22
<i>P. putida</i> KT2442-I2	-	10
<i>P. putida</i> KT2442-I2	IPTG	24
<i>P. putida</i> KT2442-S1	-	16
<i>P. putida</i> KT2442-S1	salicilato	56
<i>P. putida</i> KT2442-S2	-	16
<i>P. putida</i> KT2442-S2	salicilato	56

Todos los cultivos fueron realizados en LB. Las incubaciones fueron realizadas por una noche con una biomasa ajustada a una DO_{600} equivalente a 5,0. Los valores son promedios de tres experimentos ($DS < 3\%$). ¹salicilato (1,25 mM), IPTG (1 mM). ²Los porcentajes corresponden a un 100% teórico de 0,5 mM, mientras que *R. eutropha* JMP134, crecida en 2,4-D puede desclorar en igual tiempo de incubación sólo un 85%.

DISCUSIÓN

En esta tesis se planteó el estudio de la microbiota presente en lagunas para el tratamiento de efluentes de blanqueo de celulosa, así como de microorganismos especializados, en cuanto a sus capacidades para degradar compuestos cloroaromáticos presentes en los efluentes. Se planteó también como objetivo la obtención de nuevos microorganismos especializados mediante el clonamiento y expresión de los genes *ffdCDEF*, de la vía de degradación de clorocatecoles presente en *R. eutropha* JMP134.

Como se indicó previamente, las lagunas de tratamiento aerobio de efluentes de blanqueo están definidas principalmente para eliminar la materia orgánica. Bajo las condiciones de operación en el laboratorio la eficiencia de remoción de DBO_5 prevista (aprox. un 85%) se alcanzó al cabo de 3 meses de operación de los modelos montados en el laboratorio. Tiempos similares se observan durante la operación inicial de lagunas de tratamiento aerobio de efluentes de la industria de celulosa (Mc Lean, y col., 1972).

Que la operación del modelo I se acercó razonablemente bien a lo que se observa en una laguna aerobia se apoya también en los valores de remoción de la DQO y en la mantención de niveles significativos y estables de microorganismos. Al respecto cabe indicar que no fue necesario inocular el sistema, lo que concuerda con estudios que indican que la inoculación con microorganismos especializados o no, es un factor de poca importancia (Mc

Lean, y col., 1972). La población de microorganismos desarrollada en el modelo tuvo su origen, probablemente, en el mismo efluente ya que éste contenía microorganismos (ver Tabla V). De todas maneras, no se puede descartar la llegada al modelo de microorganismos provenientes del laboratorio, especialmente por vía aérea, ya que no se mantuvieron condiciones de esterilidad en el montaje y operación de los microcosmos.

Las cuentas viables determinadas mediante crecimiento en Agar LB, dieron un valor constante y reproducible durante los dos años de funcionamiento de los sistemas montados en el laboratorio. La utilización de este medio de cultivo por sobre otros que parecían más apropiados, se debió a que se obtuvieron valores semejantes en todos los medios probados. Al respecto cabe hacer notar que un grupo de investigadores canadienses tampoco encontró diferencias significativas en el conteo de células viables de una laguna de tratamiento de efluentes de blanqueo, al usar medios ricos o medios conteniendo efluente de dicha laguna (Fulthorpe, y col., 1993). Los valores observados en los modelos (ver Tabla V) fueron un orden de magnitud menores que los descritos en otros sistemas (Fulthorpe, y col., 1993; Mc Lean, y col., 1972). Una posible explicación sería la formación de elementos inhibidores que esté afectando la viabilidad de los microorganismos en los modelos. Un segundo factor puede ser la presencia de una activa población bacteriívora en los modelos, lo que concuerda con la presencia de una población estable de protozoos (10^3 cels/ml) en los dos modelos.

La eficiencia de remoción de DBO_5 y por ello, la operación general del biorreactor se vió fuertemente afectada por cambios gruesos en la composición del efluente. En efecto, partidas de efluente que poseían niveles de DBO_5 de 128-150 mg O_2/L , un pH elevado (11-12) y un color café intenso, provocaron una disminución en la remoción de DBO (hasta un 18%). Sólo luego del recambio completo del efluente en los modelos se recuperó el valor normal de remoción. Cuando los modelos fueron sometidos a estos efluentes anormales, junto con la disminución de la DBO_5 , se observó que el recuento de viabilidad disminuyó en un orden de magnitud (6×10^6 ufc/ml), conjuntamente con un rápido incremento en el pH del microcosmos (hasta pH 8,5 en 5 días). Estos cambios de composición, producto de derrames en el proceso ocurren con cierta frecuencia en la operación normal de la planta y no consiguen afectar la operación de la laguna debido a su conexión directa y permanente con los efluentes generados. Sin embargo, dado el carácter puntual de la toma de la muestra del efluente de alimentación de los modelos, estos experimentan por un tiempo prolongado el efecto de un efluente anormal.

Se montó un segundo modelo, de iguales características al primero, con el objeto de tener un sistema de evaluación de la actividad de los microorganismos en efluentes con menor carga orgánica. Sin embargo, los análisis realizados muestran que el grueso de la remoción tanto de la materia orgánica degradable, como de los organoclorados asociados es realizada en el

primer modelo, mientras que el segundo modelo contribuye muy poco a estos cambios.

Los perfiles de cromatografía gaseosa, correspondientes a las salidas de los modelos, así como los de incubaciones en aireación forzada, mostraron que la capacidad para remover compuestos organoclorados presentes en el efluente de alimentación existe tanto en los microorganismos provenientes del modelo I como del modelo II. Sin embargo, la evaluación de las capacidades metabólicas en los microorganismos presentes en los modelos de laguna de aireación mostró que era posible aislar sólo microorganismos con capacidades metabólicas limitadas a mono y diclorofenoles.

El que en los experimentos de aireación forzada se observe remoción incluso de compuestos que se mantuvieron inalterados en todos los ensayos anteriores, como es el caso del 2,4,6-triclorofenol, puede ser explicado por un efecto de concentración, puesto que su concentración en los efluentes no supera las 200 ppb, mientras que en los ensayos de degradación la concentración de estos compuestos fue fijada, con propósito de hacer posible la detección, entre 100 y 200 ppm. Así la remoción de este tipo de compuestos en los efluentes se encuentra limitada a su presencia en bajas concentraciones.

Los microorganismos presentes en los sedimentos tanto de los modelos como de la laguna de Arauco no se diferenciaron mayormente entre sí y sus capacidades degradativas hacia organoclorados se movieron dentro de los

mismos rangos que las de los microorganismos que crecen en la columna de efluente de los modelos.

Previo a esta tesis resultaba incierto suponer que las capacidades metabólicas de un microorganismo especializado en la degradación de compuestos clorofenólicos, como *R. eutropha* JMP134, se expresaran en efluentes industriales de blanqueo de pulpa de celulosa. Esto por la presencia de fuentes alternativas de carbono (DBO5) tanto como la presencia de una población bacteriívora de protozoos. Los resultados obtenidos en los modelos indicaron que en incubaciones de corto tiempo en presencia de 2,4-D ó 2,4,6-TCF esta cepa fue capaz de proliferar y degradar dichos compuestos (ver Tabla XIII y Tabla XIV). Sin embargo, no fue capaz de dominar el nicho ecológico presente en estos sistemas puesto que cuando las incubaciones se realizaron por períodos prolongados, superiores a 180 días, la capacidad para degradar 2,4,6-TCF se mantuvo, mientras que la presencia de la cepa JMP134 (medida por degradación en placa de 2,4-D, codificada plasmidialmente) disminuyó totalmente (Valenzuela y col., 1997). Incubaciones prolongadas de la microbiota presente en los sistemas de lagunas de aireación, en presencia de 2,4,6-TCF, mostraron que en estos sistemas aparecía la capacidad de remover 2,4,6-TCF, por lo que la desaparición en el tiempo de la cepa JMP134 se puede explicar como consecuencia de la competencia metabólica de los otros microorganismos presentes en el efluente, así como por la presencia de una población bacteriívora al interior del mismo sistema.

El análisis planteado anteriormente, que busca una respuesta adaptativa de algún microorganismo presente en un inóculo proveniente de un sistema complejo, al crecimiento en un compuesto organoclorado, si bien considera que en dicha respuesta adaptativa pueden estar involucrados diferentes procesos moleculares y bioquímicos (Reineke, 1994), se concentra principalmente en evaluar procesos en los cuales pueden estar presentes uno o más de las siguientes alternativas: i.- La inducción de enzimas específicas en miembros de la comunidad, lo que resulta en un incremento de las capacidades degradativas de la comunidad, como un todo. ii.- El crecimiento de una población presente en bajo porcentaje en la comunidad microbiana, que sea capaz de metabolizar dicho compuesto. iii.- La adaptación que puede involucrar la selección de mutantes que han adquirido nuevas especificidades enzimáticas o nuevas actividades metabólicas que no estaban presentes en la comunidad antes de la exposición al compuesto organoclorado en particular. Esta última alternativa puede involucrar a su vez uno o más de los mecanismos genéticos que operan en los microorganismos, esto es transferencia de genes, mutaciones, recombinaciones y transposición, lo cual contribuye finalmente a la adaptación metabólica a un nuevo substrato (van der Meer, y col., 1992).

Respecto a la transferencia de genes por conjugación, ésta puede dar origen a una nueva cepa degradadora de compuestos cloroaromáticos si la cepa receptora es capaz de complementar secuencias degradativas periféricas (que conducen a la transformación parcial de un compuesto cloroaromático en

un intermediario que puede ser más o menos tóxico al microorganismo), con vías centrales de degradación presentes en plásmidos catabólicos. Esta estrategia de construcción *in vivo* de microorganismos degradadores de compuestos clorofenólicos requiere que las reacciones periféricas realizadas por enzimas de la cepa receptora sean suficientemente inespecíficas, como para transformar diversos compuestos cloroaromáticos a un tipo de intermediario central común. Además, que ellas puedan ser inducibles por dichos compuestos cloroaromáticos (Pieper, y col., 1996; Timmis, y col., 1994). Esta estrategia se ha empleado con éxito para la construcción de cepas degradadoras de derivados clorados de anilinas, bencenos, benzoatos, bifenilos, fenoles, salicilatos y toluenos (Brinkmann & Reineke, 1992; Hartmann y col., 1989; Schwien y Schmidt., 1982). Estas se basan fundamentalmente en combinar actividades presentes en un contexto genético determinado con aquellas presentes en plásmidos metabólicos como TOL y plásmidos del catabolismo de clorocatecoles.

Se propuso dentro de los objetivos de la presente tesis, el construir una "cassette metabólica" que debía contener la vía central de degradación de clorocatecoles. Se optó por esta vía en virtud de que ella resulta ser clave en la degradación de múltiples compuestos cloroaromáticos tales como clorobencenos, clorobenzoatos, clorofenoles, clorofenoacetatos y bifenilos, entre otros (Chakrabarty, 1996; Reineke, 1994; van der Meer, y col., 1992).

También se ha postulado su participación en la degradación de cloroguaiacoles (González, y col., 1993; González y col., 1995).

Se clonaron y expresaron en conjunto los genes para degradación de clorocatecoles *tfdCDEF* de *R. eutropha* JMP134 (pJP4). La actividad de las cuatro enzimas pudo ser evaluada en extractos crudos gracias al ensayo espectrofotométrico en el cual a partir de un clorocatecol (substrato de la primera enzima), se logra la formación *in situ* de los substratos específicos para las siguientes tres enzimas.

Hasta nuestro trabajo no se tenía evidencia directa de que el gen *tfdF* fuera capaz de expresar activamente la enzima maleilacetato reductasa (MAR), sino que ello se infería por estudios de comparación de secuencias con el gen *tcdF* (Kasberg, y col., 1995). Sin embargo, los resultados obtenidos en *E. coli* cc118 λ pir, cepa que presenta una actividad baja de MAR (Tabla XVII) indican que las cuatro enzimas presentes en el operón son coordinadamente expresadas.

Esta tesis también muestra que los promotores heterólogos *P_{trc}* y *P_{sal}* son capaces de activar la transcripción de los genes *tfdCDEF*. Mientras la expresión controlada por *P_{trc}* mostró un comportamiento semiconstitutivo, las construcciones reguladas por *P_{sal}* no presentaron actividad en ausencia de su inductor salicilato. Esta expresión basal (o semiconstitutiva) para el caso de *P_{trc}*, no puede ser atribuida a un efecto de un promotor presente río arriba de los genes *tfdCDEF*, esto pues río arriba de los promotores (*P_{trc}* o *P_{sal}*) está el

gen de resistencia a kanamicina, derivado del interposón Ω , el cual mantiene la señal de término de transcripción propia del interposón (de Lorenzo, y col., 1993; Fellay y col., 1987).

Existe evidencia publicada que muestra que el promotor *P_{trc}*, presente en *pCNB5* presenta una actividad basal, la cual es incrementada, en ensayos de expresión de β -galactosidasa ante la presencia de IPTG como inductor (de Lorenzo, y col., 1993), así como puede actuar constitutivamente, tanto en *E. coli* como en *P. putida*. Un ejemplo de ello es la expresión del gen *immE3* (proteína que confiere inmunidad contra colicina E3) (Díaz, y col., 1994), donde la máxima expresión constitutiva del gen en cuestión se logra tras poner en tandem los promotores *P_{i3}/P_{bla}/P_{trc}*. La expresión del promotor *P_{sal}*, contenido en los sistemas suicidas derivados de *pCNB4*, muestra en cambio ser altamente regulada tanto en *E. coli* y *P. putida* (de Lorenzo, y col., 1993), como en *Bordetella bronchiseptica* (Suárez y col., 1997).

Una herramienta clave en el diseño de rutas metabólicas *in vitro* la constituye el sistema empleado para la inserción de los genes en el cromosoma de la cepa que aportará el entorno genético inicial. Estos sistemas deben asegurar una inserción estable, para evitar los riesgos de pérdida de dichos genes cuando no existe una presión de selección en el medio, así como deben minimizar el riesgo de una transferencia horizontal de dichos genes a otros microorganismos. Este fue el motivo por el cual las construcciones realizadas conteniendo los genes *tfdCDEF* fueron desarrolladas en vectores de

inserción cromosomal derivados del minitransposon Tn5 (de Lorenzo, y col., 1990).

Esta es la primera vez que los genes para las enzimas *tfdCDEF* son insertadas cromosomalmente y se evalúa su expresión. Una vez que los genes para degradación de clorocatecoles fueron clonados bajo control de los promotores heterólogos y evaluadas las cassettes resultantes en cuanto a su expresión en *E. coli* cc118 λ pir, no resultó simple obtener su expresión en otro entorno genético como el de *R. eutropha* JMP222. Ello por que, a diferencia de lo que se esperaba, no fue posible seleccionar mutantes de inserción cromosomal directamente en un medio mínimo que exigiera la expresión de las enzimas presentes en el cassette, cual era el crecimiento en 3CB, sino que se requirió de una primera selección en medio rico LB-kanamicina.

Existen varias razones que pueden explicar lo observado. Entre éstas el operón *tfdCDEF* codifica enzimas que son más activas con catecoles diclorosustituidos que con monoclorocatecoles (Pieper, y col., 1988). Esto se observa claramente al comparar las curvas de transformación espectral para 4-CC y 3,5-DCC (Figura 21 y Figura 22), o al comparar los valores de las actividades combinadas de cloromuconato cicloisomerasa y dienolactona hidrolasa (Tabla XVII), donde tanto para *R. eutropha* (crecida en 2,4-D o 3-CB) como para los clones JMP 222-21 y JMP 222-25 (inducidos con IPTG), la actividad para 2,4-DCM resultó ser entre 250 y 300% superior en el caso de substratos disustituidos que monosustituidos. También está el hecho que la

degradación de 3CB requiere de la participación de las enzimas cromosomales benzoato dioxigenasa y 1,2-dihidrodiol benceno deshidrogenasa y, por ende, se requiere una expresión coordinada entre estas enzimas y las presentes en el operón *tfdCDEF*.

No ha sido posible hasta el momento la obtención de clones capaces de crecer eficientemente en 3-CB como única fuente de carbono y energía. Sin embargo biomazas de todos los clones obtenidos por inserción cromosomal en *R. eutropha* y *P. putida* son capaces de desclorar en forma significativa 3-CB (Tabla XVIII). Dado que es más probable que en la naturaleza las vías nuevas para la degradación de contaminantes no evolucionan *de novo*, sino por modificación de las ya existentes para la degradación de compuestos naturales, estructuralmente relacionados (van der Meer, y col., 1992), es comprensible que las vías de metabolización de compuestos xenobióticos no sean óptimas, sino que se encuentran sometidas a limitaciones respecto a la concentración del substrato a degradar, al rango de substrato que pueden tolerar (esto es número y posición de sustituyentes (clorados) en un anillo), como a la rapidez con la cual puedan transformarlos. En el caso de *R. eutropha* JMP134 (y del operón *tfdCDEF*) se conoce bien su limitación para la degradación de 2-cloromuconato (Pieper y col., 1993), la cual se transforma en la etapa limitante para la metabolización de 3-CB, lo cual podría explicar adicionalmente la incapacidad de obtener cepas creciendo eficientemente en base a este substrato como fuente de carbono. Tanto *R. eutropha* JMP222

como *P. putida* KT2442 no presentan capacidad para transformar 2-CB, 4-CB, 4-CS, 2,4-DCB y 3,5-DCB a sus respectivos clorocatecoles, razón por la cual si bien los tres últimos pudieran generar intermediarios (clorocatecoles) más adecuados para ser posteriormente metabolizados por las enzimas presentes en los genes *tfdCDEF*, estos clorobenzoatos no pueden ser empleados como fuente de carbono.

Entre los resultados de esta tesis se han descrito el clonamiento y expresión de los genes para degradación de clorocatecoles *tfdCDEF*. La regulación normal de estos genes como operón no es del todo conocida. Se asigna un rol regulador al producto del gen *tfdR*, el cual actuaría no sólo sobre el operón *tfdCDEF* sino también sobre *tfdA* (Kaphammer y col., 1990; Kaphammer & Olsen, 1990). Recientemente, se mostró que *tfdR* tiene la misma secuencia que otro gen regulador involucrado en el metabolismo de los clorocatecoles en pJP4, *tfdS* (Matrubutham & Harker, 1994). Sin embargo, aun cuando ambos genes fueron eliminados en *R. eutropha* JMP134, esta cepa mantiene su capacidad de crecer en 3CB (You & Ghosal, 1995), sugiriendo que otro sistema regulador debería estar involucrado. Este era el estado del conocimiento al momento de iniciar el clonamiento de estos genes, por ello fue que se estimó conveniente dejar la regulación del operón bajo el control de un promotor heterólogo (*P_{trc}* y *P_{sal}*) en lugar de explorar cual pudiera ser su regulación original. Sólo muy recientemente, al término de este trabajo, se ha presentado evidencia que rescata la idea original que *tfdR* puede ser el gen

activador de *tfdC* (el primer gen presente en el operón *tfdCDEF*) (Leveau & van der Meer, 1996). Este trabajo también sugiere que *tfdR* puede reemplazar a *tfdT* (conocido también como *tfdX*), un marco de lectura abierto que se localiza río arriba del operón *tfdCDEF*, y que presenta homología con los otros activadores transcripcionales presentes en pJP4, pero que se encuentra inactivado por una secuencia de inserción (ISJP4) (Leveau y van der Meer, 1996).

Los resultados globales obtenidos en el curso de esta tesis refuerzan el conocimiento que se tiene respecto al importante rol de las comunidades microbianas en procesos de descontaminación, así como contribuyen a destacar la plasticidad metabólica y genética que las mismas poseen. Lo anterior, unido a un uso racional, puede permitirnos en un futuro próximo contar con una herramienta realmente eficiente para la remoción de contaminantes organoclorados que el mismo ser humano ha introducido en nuestro ecosistema.

PROYECCIONES

El trabajo realizado en esta tesis ha abierto la posibilidad de explorar varios aspectos relativos al estudio de la degradación de cloroaromáticos, algunos de los cuales ya se encuentran en desarrollo en el laboratorio. Dentro de estos se mencionan:

- El empleo de microcosmos de lagunas de aireación permitirá evaluar el comportamiento de microorganismos con nuevas capacidades metabólicas, obtenidas mediante inserción cromosomal de genes catabólicos, ello incluye:
 - ◆ estudiar la expresión de estos genes en un sistema donde existen fuentes de carbono alternativas;
 - ◆ estudiar la estabilidad de la inserción, midiendo la transferencia horizontal de dicha información al interior de un sistema complejo que posee una población bacteriana estable;
 - ◆ evaluar el efecto de las nuevas capacidades metabólicas sobre el asentamiento en un nicho ecológico que ya se encuentra ocupado por otras especies y si estas capacidades metabólicas significarán una ventaja ante una descarga accidental de efluentes con un mayor contenido de organoclorados, que los tolerados por la población previamente establecida.

- El clonamiento de los genes *tfdCDEF* permitirá además:
 - ◆ estudiar la expresión de estos genes metabólicos en otros contextos genéticos, en especial cepas degradadoras de guaiacol y triclorofenol aisladas en el laboratorio;
 - ◆ estudiar la región promotora/reguladora del operón *tfdCDEF*, con miras a lograr una mejor modulación de la expresión del cassette, lo que incluye el estudio del gen regulador *tfdR*, así como el posible efecto en *trans* del producto del gen regulador *tcbR* sobre el operón *tfdCDEF*;
 - ◆ estudiar la regulación de estos genes por promotores activados por metales pesados u otros que respondan a una condición de hambruna, con miras a su introducción en sistemas complejos, en los cuales la presencia de organoclorados puede no ser constante en el tiempo, mientras que la escasez de fuentes de carbono si lo es;
 - ◆ estudiar las etapas limitantes que se producen consecuencia de la poca afinidad/actividad de alguna de las enzimas presentes en el operón por un sustrato determinado, como es el caso del 3-CC, con miras a obtener mutantes que puedan crecer en 4-clorobenzoato y 3,5-diclorobenzoato.

CONCLUSIONES

- Las poblaciones microbianas existentes al interior de microcosmos de una laguna de aireación para el tratamiento industrial de efluentes de blanqueo de pulpa de celulosa son capaces de remover el contenido de organoclorados presentes en el proceso, en concentraciones de ppb (Céspedes y col., 1994, Céspedes y col., 1996).
- Aunque fue posible aislar microorganismos con capacidades metabólicas relacionadas a la degradación parcial de 2,4-diclorofenol, 4-clorofenol y 2,4,6-triclorofenol, éstos no dan cuenta del fenómeno global de remoción de compuestos organoclorados observado en el sistema (Céspedes, y col., 1996).
- *R. eutropha* JMP134 expresa sus capacidades metabólicas para degradar 2,4-D y 2,4,6-TCF en un sistema de tratamiento de efluentes de blanqueo de pulpa de celulosa (González, y col., 1996; Valenzuela, y col., 1997).
- Se clonaron los genes *tfdCDEF* para la degradación de clorocatecoles de *R. eutropha* JMP134 (pJP4), lográndose la expresión de las cuatro actividades enzimáticas bajo el control de dos promotores heterólogos: *Psal* y *P_{trc}* (Céspedes y col., 1997).
- La inserción cromosomal de los genes *tfdCDEF* en las cepas de *R. eutropha* JMP222 y *P. putida* KT2442 permitió complementar vías cromosomales de

modo tal de degradar nuevos substratos como 3-clorobenzoato, 3-CC, 4-CC, y 3,5-DCC (Céspedes, y col., 1997).

REFERENCIAS

Adriaens, P., Kohler, H.-P. E., Kohler-Staub, D. y Focht, D. D. (1989). Bacterial dehalogenation of chlorobenzoates y coculture biodegradation of 4,4'-dichlorobiphenyl. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 887-892.

Anónimo (1985). Simplified laboratory procedures for wastewater examination. Special publications for water pollution control. Washington DC.: Water Pollution Control Federation.

Apajalahti, J. H. A. y Salkinoja-Salonen, M. S. (1987). Dechlorination and *para*-hydroxylation of polychlorinated phenols by *Rhodococcus chlorophenicus*. *J. Bacteriol.* **169**, 675-681.

Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J. y Struhl, K. (1992). *Short protocols in molecular biology.*, 2° edn. New York: Greene Publishing.

Bartels, I., Knackmuss, H.-J. y Reineke, W. (1984). Suicide inactivation of catechol 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas putida* mt-2 by 3-halocatechols. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**, 500-505.

Bedard, D. L., Haberl, M. L., May, R. J. y Brennan, M. J. (1987). Evidence for novel mechanisms of polychlorinated biphenyl metabolism in *Alcaligenes eutrophus* H850. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 1103-1112.

Birnboim, H. C. y Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acid. Res.* **7**, 1513-1522.

Bosma, T. N. P., van der Meer, J. R., Schraa, G., Tros, M. E. y Zehnder, A. J. B. (1988). Reductive dechlorination of all trichloro- and dichlorobenzene isomers. *FEMS Microbiol. Lett.* **53**, 223-229.

Bradford, M. 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**, 248-254.

Brezny, R., Joyce, T. y González, B. (1992). Biotransformation in soil of chloroaromatic compounds related to bleach plant effluents. *Water & Science Technol.* **26**, 397-406.

Brinkmann, U. y Reineke, W. (1992). Degradation of chlorotoluenes by *in vivo* constructed hybrid strains: problems of enzyme specificity, induction and prevention of *meta*-pathway. *FEMS Microbiol. Lett.* **96**, 81-88.

Brodkorb, T. S. y Legge, R. L. (1992). Enhanced biodegradation of phenanthrene in oil tar-contaminated soils supplemented with *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 3117-3121.

Brown Jr., J. F., Bedard, D. L., Brennan, M. J., Carnahan, J. C., Feng, H. y Wagner, R. E. (1987). Polychlorinated biphenyl dechlorination in aquatic sediments. *Science* **236**, 709-712.

Céspedes, R., Acevedo, C., Muñoz, S., Cárdenas, L. y González, B. (1994). Montaje y evaluación preliminar de microcosmos de lagunas para el tratamiento aerobio de efluentes de blanqueo de celulosa. *Anal. Microbiol.* **2**, 28-30.

Céspedes, R., Maturana, A., Bumman, U., Bronfman, M. y González, B. (1996). Microbial removal of chlorinated phenols during aerobic treatment of effluents from radiata pine kraft pulps bleached with chlorine-based chemicals, with or without hemicellulases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **46**, 631-637.

Céspedes, R., Varela, C., Jakobs, B., Pieper, D. y González, B. (1997). Cloning of the *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4) *tfdCDEF* gene cluster for chlorocatechol metabolism and expression after chromosomal insertion in the cured *Ralstonia eutropha* JMP222. *Enviado a J. Bacteriol.*, Oct. 1997.

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

Comeau, Y., Greer, C. W. y Samson, R. (1993). Role of inoculum preparation and density on the bioremediation of 2,4-D-contaminated soil by bioaugmentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 681-687.

Chakrabarty, A. M. (1996). Microbial degradation of toxic chemicals: evolutionary insights and practical considerations. *ASM News* **62**, 130-137.

Chatterjee, D. K., Kellogg, S. T., Hamada, S. y Chakrabarty, A. M. (1981). Plasmid specifying total degradation of 3-chlorobenzoate by a modified *ortho* pathway. *J. Bacteriol.* **146**, 639-646.

Chaudhry, G. R. y Chapalamadugu, S. (1991). Biodegradation of halogenated organic compounds. *Microbiol. Rev.* **55**, 59-79.

Danganan, C. E., Ye, R. W., Daubaras, D. L., Xun, L. y Chakrabarty, A. M. (1994). Nucleotide sequence and functional analysis of the genes encoding 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid oxygenase in *Pseudomonas cepacia* AC1100. *Appl. Environ. Microbio.* **60**, 4100-4106.

Davis, A., Campbell, J., Gilbert, G., Ruby, M. V., Bennett, M. y Tobin, S. (1994). Attenuation and biodegradation of chlorophenols in ground water at a former wood treating facility. *Ground Water* **32**, 248-257.

de Lorenzo, V., Eltis, L., Kessler, B. y Timmis, K. (1993). Analysis of *Pseudomonas* gene products using lacIq/P_{trp}-lac plasmids and transposons that confer conditional phenotypes. *Gene* **123**, 17-24.

de Lorenzo, V., Fernández, S., Herrero, M., Jakubzik, U. y Timmis, K. (1993). Engineering of alkyl- and haloaromatic-responsive gene expression with mini-transposons containing regulated promoters of biodegradative pathways of *Pseudomonas*. *Gene* **130**, 41-46.

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

den Besten, C., Brouwer, A., Rietjens, I. y van Bladeren, P. (1994). Biotransformation and toxicity of halogenated benzenes. *Hum. Experiment. Toxicol.* **13**, 866-875.

Díaz, E., Munthali, M., de Lorenzo, V. y Timmis, K. (1994). Universal barrier to lateral spread of specific genes among microorganisms. *Molec. Microbiol.* **13**, 855-861.

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

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

Don, R. H., Weightman, A. J., Knackmuss, H.-J. y Timmis, K. N. (1985). Transposon mutagenesis and cloning analysis of the pathways for degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 3-chlorobenzoate in *Alcaligenes eutrophus* JMP 134(pJP4). *J. Bacteriol.* **161**, 85-90.

Dorn, E., Hellwig, M., Reineke, W. y Knackmuss, H.-J. (1974). Isolation and characterization of a 3-chlorobenzoate degrading pseudomonad. *Arch. Microbiol.* **99**, 61-70.

Dorn, E. y Knackmuss, H. J. (1978). Chemical structure and biodegradability of halogenated aromatic compounds. Two catechol 1,2-dioxygenases from a 3-chlorobenzoate-grown pseudomonad. *Biochem. J.* **174**, 73-84.

Eaton, D. C. (1985). Mineralization of chlorinated biphenyls by *Phanerochaete chrysosporium*: a ligninolytic fungus. *Enz. Microbial. Technol.* **7**, 194-196.

- Engesser, K. H. y Schultze, P. (1989). Degradation of 2-bromo-, 2-chloro- and 2-fluorobenzoate by *Pseudomonas putida* CLB 250. *FEMS Microbiol. Lett.* **60**, 143-148.
- Fathepure, B. Z., Tiedje, J. M. y Boyd, S. A. (1988). Reductive dechlorination of hexachlorobenzene to tri- and dichlorobenzenes in anaerobic sewage sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 327-330.
- Fellay, R., Frey, J. y Krisch, H. (1987). Interposon mutagenesis of soil and water bacteria: a family of DNA fragments designed for *in vitro* insertional mutagenesis of gram-negative bacteria. *Gene* **52**, 147-154.
- Fetzner, S., Müller, R. y Lingens, F. (1989). Degradation of 2-chlorobenzoate by *Pseudomonas cepacia* 2CBS. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **370**, 1173-1182.
- Fetzner, S., Müller, R. y Lingens, F. (1989). A novel metabolite in the microbial degradation of 2-chlorobenzoate. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **161**, 700-705.
- Florence, T. y Farrar, Y. (1971). Spectrophotometric determination of chloride at the parts-per-billion level by mercury (II) thiocyanate method. *Anal. Chim. Acta* **54**, 373-377.
- Fulthorpe, R. y Allen, G. (1995). A comparison of organochlorine removal from bleached Kraft pulp and paper-mill effluents by dehalogenating *Pseudomonas*, *Ancylobacter* and *Methylobacterium* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **42**, 782-789.

Fulthorpe, R., Liss, S. y Allen, G. (1993). Characterization of bacteria isolated from a bleached Kraft mill wastewater treatment system. *Can. J. Microbiol.* **39**, 13-24.

Fulthorpe, R. R. y Campbell Wyndham, R. (1989). Survival and activity of a 3-chlorobenzoate-catabolic genotype in a natural system. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 1584-1590.

Gergov, M., Priha, M., Talka, E., Valtilla, O., Kangas, A. y Kulkonnen, K. (1988). Chlorinated organic compounds in effluent treatments at kraft mill. *TAPPI J.* **71**, 175-184.

Gerhardt, P. (1994). *Method for general and molecular bacteriology*. Washington, DC.: American Society for Microbiology.

González, B., Acevedo, C., Brezny, R. y Joyce, T. W. (1993). Metabolism of chlorinated guaiacols by a guaiacol-degrading *Acinetobacter junii* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 3424-3429.

González, B., Brezny, R., Herrera, M. y Joyce, T. W. (1995). Degradation of 4,5-dichloroguaiacol by soil microorganisms. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **11**, 536-540.

González, B., Clément, P., Céspedes, R., Valenzuela, J., Matus, J., Maturana, A. y Ehrenfeld, N. (1996). Degradation of environmental pollutants by *Alcaligenes eutrophus* JMP134 (pJP4). *Env. Toxicol. Water Quality* **11**, 205-211.

Greer, C. W., Hawari, J. y Samson, R. (1990). Influence of environmental factors on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation by *Pseudomonas cepacia* isolated from peat. *Arch. Microbiol.* **154**, 317-322.

Hägglom, M. M. (1992). Microbial breakdown of halogenated aromatic pesticides and related compounds. *FEMS Microbiol. Rev.* **103**, 29-72.

Hammel, K. y Tardone, P. (1988). The oxidative 4-dechlorination of polychlorinated phenols is catalyzed by extracellular fungal lignin peroxidases. *Biochem.* **27**, 6563-6568.

Hartmann, J., Engelbert, K., Nordhaus, B., Schmidt, E. y Reineke, W. (1989). Degradation of 2-chlorobenzoate by *in vivo* constructed hybrid pseudomonads. *FEMS Microbiol. Lett.* **61**, 17-22.

Herrero, M., de Lorenzo, V. y Timmis, K. (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.

Jacobsen, C. S. and Pedersen, J. C. (1992a). Growth and survival of *Pseudomonas cepacia* DBO1 (pRO101) in soil amended with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Biodegradation* **2**, 245-252.

Jacobsen, C. S. and Pedersen, J. C. (1992b). Mineralization of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in soil inoculated with *Pseudomonas cepacia* DBO1(pRO101), *Alcaligenes eutrophus* AEO106(pRO101) and *Alcaligenes eutrophus* JMP134(pJP4): effects of inoculation level and substrate concentration. *Biodegradation* **2**, 253-263.

Järvinen, K. T., Melin, E. S. y Puhakka, J. A. (1994). High-rate bioremediation of chlorophenol-contaminated groundwater at low temperatures. *Environ. Sci. Technol.* **28**, 2387-2392.

Jeenes, D. J., Reineke, W., Knackmuss, H.-J. y Williams, P. A. (1982). TOL plasmid pWWO in constructed halobenzoate-degrading *Pseudomonas* strains: enzyme regulation and DNA structure. *J. Bacteriol.* **150**, 180-187.

Joyce, T. W., Brezny, R., González, B. y Palo, N. (1992). Degradation in soil of chlorolignin substances from chlorine bleaching of pulp. *Papir a celuloza* **47**, 125-132.

Kado, C. y Liu, S. (1981). Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* **145**, 1365-1373.

Kaphammer, B., Kukor, J. J. y Olsen, R. H. (1990). Regulation of *tfdCDEF* by *tfdR* of the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation plasmid pJP4. *J. Bacteriol.* **172**, 2280-2286.

Kaphammer, B. y Olsen, R. H. (1990). Cloning and characterization of *tfdS*, the repressor-activator gene of *tfdB*, from the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid catabolic plasmid pJP4. *J. Bacteriol.* **172**, 5856-5862.

Kasberg, T., Daubaras, D., Chakrabarty, A., Kinzelt, D. y Reineke, W. (1995). Evidence that operons *tcb*, *tfd*, and *clc* encode maleylacetate reductase, the fourth enzyme of the modified *ortho* pathway. *J. Bacteriol.* **177**, 3885-3889.

Kilbane, J. J., Chatterje, D. K., Karns, J. S., Kellogg, S. T. y Chakrabarty, A. M. (1982). Biodegradation of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid by a pure culture of *Pseudomonas cepacia*. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**, 72-78.

Kim, C. J. y Maier, W. J. (1986). Acclimation and biodegradation of chlorinated organic compounds in the presence of alternate substrates. *J. Water. Pollut. Control Fed.* **58**, 157-164.

Klages, U. y Lingens, F. (1979). Degradation of 4-chlorobenzoic acid by a *Nocardia* species. *FEMS Microbiol. Lett.* **6**, 201-203.

Klages, U. y Lingens, F. (1980). Degradation of 4-chlorobenzoic acid by a *Pseudomonas* sp. *Zentralbl. Bakteriol. Parasit. Infektio. Hyg. C1*, 215-223.

Kringstad, K. P. y Lindström, K. (1984). Spent liquors from pulp bleaching. *Environ Sci Technol* **18**, 236A-248A.

Kuhn, E. P. y Suflita, J. M. (1989). Sequential reductive dehalogenation of chloroanilines by microorganisms from a methanogenic aquifer. *Environ. Sci. Technol.* **23**, 848-852.

Kuhn, E. P., Townsend, G. T. y Suflita, J. M. (1990). Effect of sulfate and organic carbon supplements on reductive dehalogenation of chloroanilines in anaerobic aquifer slurries. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 2630-2637.

Kukor, J. J., Olsen, R. H. y Ballou, D. P. (1988). Cloning and expression of the *catA* and *catBC* gene clusters from *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *J. Bacteriol.* **170**, 4458-4465.

Leser, T. D. (1995). Validation of microbial community structure and ecological functional parameters in an aquatic microcosm designed for testing genetically engineered microorganisms. *Microb. Ecol.* **29**, 183-201.

Leveau, J. y van der Meer, J. R. (1996). The *ffdR* gene product can successfully take over the role of the insertion element-inactivated TfdT protein as a transcriptional activator of the *ffdCDEF* gene cluster, which encodes chlorocatechol degradation in *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4). *J. Bacteriol.* **178**, 6824-6832.

Li, D.-Y., Eberspächer, J., Wagner, B., Kuntzer, J. y Lingens, F. (1991). Degradation of 2,4,6-trichlorophenol by *Azotobacter* sp. strain GP1. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 1920-1928.

Matrubutham, U. y Harker, A. R. (1994). Analysis of duplicated gene sequences associated with *ffdR* and *ffdS* in *Alcaligenes eutrophus* JMP134. *J. Bacteriol.* **176**, 2348-2353.

Matus, V., Vásquez, M., Vicente, M. y González, B. (1996). Microbial mineralization of 2,4,5-trichlorophenol in soil. *Environ. Sci. Technol.* **30**, 1472-1476.

Mc Lean, H., Harris, L. y Murphy, L. (1972). Start-up of biological treatment facilities for pulp and paper mill wastes. *Pulp Paper Mag. Can.* **73**, 89-92.

Miguez, C. B., Greer, C. W. y Ingram, J. M. (1990). Degradation of mono- and dichlorobenzoic acid isomers by two natural isolates of *Alcaligenes denitrificans*. *Arch. Microbiol.* **154**, 139-143.

- Mohn, W. W. y Tiedje, J. (1992). Microbial reductive dehalogenation. *Microbiol. Rev.* **56**, 482-507.
- Morales, V., Bäckman, A. y Bagdasarian, M. (1991). A series of wide-host-range low-copy-number vectors that allow direct screening for recombinants. *Gene* **97**, 39-47.
- Nadeau, L., Menn, F. M., Breen, A. y Sayler, G. S. (1994). Aerobic degradation of 1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethane (DDT) by *Alcaligenes eutrophus* A5. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 51-55.
- Namkoong, W., Loer, R. y Malina, J. (1989). Effects of mixtures and acclimation on removal of phenolic compounds in soil. *J. Water Pollut. Control. Fed.* **61**, 242-246.
- Ngai, K. L. y Ornston, L. N. (1988). Abundant expression of *Pseudomonas* genes for chlorocatechol metabolism. *J. Bacteriol.* **170**, 2412-2413.
- Nies, L. y Vogel, T. M. (1990). Effects of organic substrates on dechlorination of Aroclor 1242 in anaerobic sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 2612-2617.
- Nishimura, A., Morita, M., Nishimura, Y. y Sugino, Y. (1990). A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucleic Acid Research* **18**, 6169.
- Parker, L. W. y Doxtader, K. G. (1982). Kinetics of microbial decomposition of 2,4-D in soil: effects of herbicide concentration. *J. Environ. Qual.* **11**, 679-684.

Parsek, M. R., McFall, S. M., Shinabarger, D. L. y Chakrabarty, A. M. (1994). Interactions of two LysR-type regulatory proteins CatR and ClcR with heterologous promoters. Functional and evolutionary implications. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **91**, 12393-12397.

Parsek, M. R., Ye, R. W., Pun, P. y Chakrabarty, A. M. (1994). Critical nucleotides in the interaction of a LysR-type regulator with its target promoter region *catBC* promoter activation by CatR. *J. Biol. Chem.* **269**, 11279-11284.

Perkins, E. J., Gordon, M. P., Cáceres, O. y Lurquin, P. F. (1990). Organization and sequence analysis of the 2,4-dichlorophenol hydroxylase and dichlorocatechol oxidative operons of plasmid pJP4. *J. Bacteriol.* **172**, 2351-2359.

Pfarl, C., Ditzelmüller, G., Loidi, M. y Streichsbier, F. (1990). Microbial degradation of xenobiotic compounds in soil columns. *FEMS Microbiol. Ecol.* **73**, 255-262.

Pieper, D., Engesser, K. y Knackmuss, H. (1989). Regulation of catabolic pathways of phenoxyacetic acids and phenols in *Alcaligenes eutrophus* JMP 134. *Arch. Microbiol* **151**, 365-371.

Pieper, D., Knackmuss, H. y Timmis, K. (1993). Accumulation of 2-chloromuconate during metabolism of 3-chlorobenzoate by *Alcaligenes eutrophus* JMP 134. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **39**, 563-567.

Pieper, D., Reinecke, W., Engesser, K. y Knackmuss, H. (1988). Metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid and 2-

methylphenoxyacetic acid by *Alcaligenes eutrophus* JMP 134. *Arch. Microbiol.* **150**, 95-102.

Pieper, D. H., Stadler-Fritzsche, K., Schlömann, M. y Knackmuss, H. J. (1992). Metabolism of 2-chloro-4-methylphenoxyacetate by *Alcaligenes eutrophus* JMP134: implications for the degradation of chloro- and methylaromatics via *ortho* clavage. En *Pseudomonas: Molecular Biology and Biotechnology*, pp. 277-291. Edited by E. Galli, S. Silver & B. Witholt. Washington, DC: American Society for Microbiology.

Pieper, D. H., Timmis, K. N. y Ramos, J., L. (1996). Designing bacteria for the degradation of nitro- and chloroaromatic pollutants. *Naturwissenschaften* **83**, 201-213.

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

Rajasekharan, S., Rajasekharan, R. y Vaidyanathan, C. S. (1990). Substrate-mediated purification and characterization of a 3-hydroxybenzoic acid-6-hydroxylase from *Micrococcus*. *Arch. Biochem. Biophys.* **278**, 21-25.

Reineke, W. (1994). Degradation of chlorinated aromatic compounds by bacteria: strain development. En *Biological degradation and bioremediation of toxic chemical.*, pp. 416-454. Edited by G. R. Chaudry. London: Chapman & Hall.

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

Reineke, W. y Knackmuss, H. (1978). Chemical structure and biodegradability of halogenated aromatic compounds. Substituent effects on 1,2-dioxygenation of benzoic acid. *Biochim. Biophys. Acta* **542**, 412-433.

Reineke, W. y Knackmuss, H. (1988). Microbial degradation of haloaromatics. *Ann. 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.

Roy-Arcand, L. y Archibald, F. S. (1991). Direct dechlorination of chlorophenolic compounds by laccases from *Trametes (Coriolus) versicolor*. *Enzyme Microbial Technol.* **13**, 194-203.

Sanglard, D., Leisola, M. S. A. y Fiechter, A. (1986). Role of extracellular ligninases in biodegradation of benzopyrene by *Phanerochaete chrysosporium*. *Enzyme and Microbial Technol.* **8**, 209-212.

Schell, M. y Wender, P. (1986). Identification of the *nahR* gene product and nucleotide sequences required for its activation of the *sal* operon. *J. Bacteriol.* **166**, 9-14.

Schlömann, M. (1994). Evolution of chlorocatechol catabolic pathways. *Biodegradation* **5**, 301-321.

Schlömann, M., Pieper, D. y Knackmuss, H. (1990). Enzymes of haloaromatics degradation: variations of *Alcaligenes* on a theme by *Pseudomonas*. En *Pseudomonas: biotransformations, pathogenesis and evolving biotechnology*, pp. 185-196. Editado por S. Silver., A. M. Chakrabarty., B. Iglewski. & S. Kaplan. Washington, D.C: American Society for Microbiology.

Schmidt, E. y Knackmuss, H.-J. (1980). Chemical structure and biodegradability of halogenated aromatic compounds. Conversion of chlorinated muconic acids into maleylacetic acid. *Biochem. J.* **192**, 339-347.

Schwien, U. y Schmidt., E. (1982). Improved degradation of monochlorophenols by a constructed strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**, 33-39.

Seibert, V., Stadler-Fritzsche, K. y Schlömann, M. (1993). Purification and characterization of maleylacetate reductase from *Alcaligenes eutrophus* JMP 134 (pJP4). *J. Bacteriol.* **175**, 6745-6754.

Shimao, M., Onishi, S., Mizumori, S., Kato, N. y Sakazawa, C. (1989). Degradation of 4-chlorobenzoate by facultatively alkalophilic *Arthrobacter* sp. strain SB8. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 478-482.

Short, K. A., Seidler, R. J. y Olsen, R. H. (1990). Survival and degradative capacity of *Pseudomonas putida* induced or constitutively expressing plasmid-mediated degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetate (TFD) in soil. *Can. J. Microbiol.* **36**, 821-826.

Springael, D., Kreps, S. y Mergeay, M. (1993). Identification of a catabolic transposon, Tn4371, carrying biphenyl and 4-chlorobiphenyl degradation genes in *Alcaligenes eutrophus* A5. *J. Bacteriol.* **175**, 1674-1681.

Streber, W. (1987). Der bakterielle metabolismus des herbizids 2,4-D: struktur und expression des gens *tfdA* aus *Alcaligenes eutrophus* JMP134. . München, Deutschland: Ludwig-Maximilians-Universität.

Streber, W. R., Timmis, K. N. y Zenk, M. H. (1987). Analysis, cloning, and high-level expression of 2,4-dichlorophenoxyacetate monooxygenase gene *tfdA* of *Alcaligenes eutrophus* JMP134. *J. Bacteriol.* **169**, 2950-2955.

Struijs, J. y Rogers, J. E. (1989). Reductive dehalogenation of dichloroanilines by anaerobic microorganisms in fresh and dichlorophenol-acclimated pond sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 2527-2531.

Suárez, A., Staendner, L., Rohde, M., Piatti, G., Timmis, K. y Guzmán, C. (1997). Stable expression of Pertussis toxin in *Bordetella bronchiseptica* under the control of a tightly regulated promoter. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 122-127.

Tien, M. y Kirk, T. K. (1983). Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Burds Science* **221**, 661-663.

Timmis, K., Steffan, R. y Enterman, R. (1994). Designing microorganisms for the treatment of toxic wastes. *Microbiology* **48**, 525-557.

Topp, E., Crawford, R. L. y Hanson, R. S. (1988). Influence of readily metabolizable carbon on pentachlorophenol metabolism by a

pentachlorophenol-degrading *Flavobacterium* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 2452-2459.

Valenzuela, J., Bumman, U., Céspedes, R., Padilla, L. y González, B. (1997). Degradation of chlorophenols by *Alcaligenes eutrophus* JMP134 (pJP4) in Bleached kraft mill effluent. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 227-232.

van den Tweel, W. J. J., Kok, J. B. y de Bont, J. A. M. (1987). Reductive dechlorination of 2,4-dichlorobenzoate to 4-chlorobenzoate and hydrolytic dehalogenation of 4-chloro-,4-bromo-, and 4-iodobenzoate by *Alcaligenes denitrificans* NTB1. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 810-815.

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 der Meer, J. R., Eggen, R. I. L., Zehnder, A. J. B. y de Vos, W. M. (1991). Sequence analysis of the *Pseudomonas* sp. strain P51 *tcb* gene cluster, which encodes metabolism of chlorinated catechols: evidence for specialization of catechol 1,2-dioxygenases for chlorinated substrates. *J. Bacteriol.* **173**, 2425-2434.

van der Meer, J. R., Roelofsen, W., Schra, G. y Zehnder, A. J. B. (1987). Degradation of low concentrations of dichlorobenzenes and 1,2,4-trichlorobenzene by *Pseudomonas* sp. strain P51 in nonsterile soil columns. *FEMS Microbiol. Ecol.* **45**, 333-341.

Vollmer, M. D. y Schlömann, M. (1995). Conversion of 2-chloro-*cis,cis*-muconate and its metabolites 2-chloro- and 5-chloromuconolactone by

chloromuconate cycloisomerase of pJP4 and pAC27. *J. Bacteriol.* **177**, 2938-2941.

Yabuuchi, E., Kosako, Y., Yano, I., Hotta, H. y Nishiuchi, Y. (1995). Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) com. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) com. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. *Microbiol. Immunol.* **39**, 897-904.

You, I.-S. y Ghosal, D. (1995). Genetic and molecular analysis of a regulatory region of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetate catabolic plasmid pJP4. *Molec. Microbiol.* **16**, 321-331.