

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAÍSO
UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA
PROGRAMA CONJUNTO DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA



**RECONSTRUCCIÓN METABÓLICA DE COMPUESTOS AROMÁTICOS Y ESTRÉS
OXIDATIVO GENERADO DURANTE LA DEGRADACIÓN DE BIFENILO EN *Burkholderia
xenovorans* LB400 Y SUS POTENCIALES APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS**

Tesis presentada para la obtención del Grado Académico
DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA

VALERIA KARINA LATORRE REYES

Director de Tesis: Dr. Michael Seeger P.

USM. BIBLIOTECA CENTRAL



3560900139363

NOVIEMBRE, 2008

**U.T.F.S.M.
BIBLIOTECAS**

COMISIÓN EVALUADORA

DR. JAMES ROBESON C. (PUCV)

James Robeson

DR. ROLANDO CHAMY M. (PUCV)

Rolando Chamy

DR. CLAUDIO VÁSQUEZ G. (USACH)

Claudio Vásquez

DR. DAVOR COTORAS T. (UCH)

Davor Cotoras

DR. MICHAEL SEEGER P. (UTFSM)

Michael Seeger Pfeiffer

A Dios y a mi familia

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se ha realizado en el Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología Ambiental de la Universidad Técnica Federico Santa María, bajo la dirección del Dr. Michael Seeger. La decisión de realizar la tesis doctoral en este grupo de investigación, ha sido una de las mejores decisiones que he tomado en mi vida como profesional. No solo por la calidad científica de sus integrantes, sino también por la calidad humana de quienes la componen. Al Dr. Michael Seeger, infinitas gracias por la dirección de la tesis, por ser crítico con el trabajo, por la paciencia, por la energía y entusiasmo que transmites en cada cosa que realizas. Siempre rescatas lo positivo de todo y agradezco muchísimo la confianza que depositaste en mi, durante este tiempo, espero no haberte defraudado. Agradezco especialmente a tu familia: Alejandra, Alexander y Sara Luna por su generosidad y cariño brindado en este tiempo.

Quiero expresar mi gratitud a todos los integrantes del laboratorio con quienes me ha unido una especial amistad, con cada uno de ellos y decirles que aunque nos separe más de 3.200 Km de distancia, siempre estarán en mi memoria. GRACIAS!! Loló (por tu constante empuje, fuerza y ayuda en cada una de mis cosas, tanto a nivel personal, como el trabajo en el laboratorio), Bernardita (compañera de LB400, dulce y buena niña, suerte con lo que viene), Carolina (por tu serenidad que transmites), Maca (su mundo, y buenos consejos), Luis Gómez (por tu ayuda incondicional con tus conocimientos), Ceci, (sus historias entretenidas), Valentina (siempre tan silenciosa), Pola (compañera de horas extras en el laboratorio), Luis R. (mantén distancia con los solventes!!! que susto!) Myriam (siempre dispuesta a enseñar y por su constante apoyo en lo que necesité en el laboratorio). Infinitas gracias a todos por la paciencia que han tenido conmigo.

A Marcela ("la diosa"), mi compañía cuando estuve sola. Amiga... junto a ti las cosas eran más entretenidas. Siempre le das a todo un toque de alegría. Sigue así siempre, no cambies en tus viajes por las "Europas".

A Verónica, Marce y Jorge compañeros y amigos del Doctorado, juntos iniciamos este camino y al final siento que no solo gané como profesional, sino que gané grandes amigos. Acompañándome siempre, en las penas y en las alegrías. Incondicionales, gracias por escuchar, por ayudarme por estar siempre conmigo. Che Vero!, como olvidar todos los momentos lindos compartidos no solo en la Universidad, sino también fuera de ella. Gracias por tu apoyo y tus comentarios y aporte en este escrito.

Al Programa de Doctorado en Biotecnología PUCV-UTFSM por la oportunidad de formarme como Doctor en Biotecnología. Al Dr. Sergio Marshall por sus palabras de apoyo y ánimo, cuando más lo necesité, para continuar en este camino que no fue fácil. Sandra Zelada siempre tan amable y dispuesta a solucionar nuestros problemas. Al Dr. Claudio Vásquez por facilitar su laboratorio para realizar algunos experimentos y a José Donoso y sus amigos por ayudarme a solucionar algunos problemas técnicos. Dra. María Eliana Hidalgo por facilitar su laboratorio para realizar algunos ensayos y Jaime Copia por tener la amabilidad y generosidad de ayudarme. Al Sr. Eduardo Couve de la Universidad de Valparaíso y al Sr. Fidel por la preparación de estas muestras para microscopía. Agradezco al Dr. Manfred

Nimtz del Centre for Infection Research HHZI, Braunschweig, Alemania, por el análisis de las muestras mediante espectrometría de masa.

Al Dr. Eduardo Díaz, por recibirme en su laboratorio perteneciente al Departamento de Microbiología Molecular, del Centro de Informaciones Biológicas (CIB, Madrid), especialmente a Juan Nogales, por su paciencia, dedicación y por compartir conmigo sus conocimientos, infinitas gracias. A todos los del laboratorio, Juan, el Niño, Isabel, Blas, Gonzalo. Fueron cuatro meses inolvidables. Gracias por compartir muy buenos momentos.

A Consuelo Sáez y Sylvia Oyarzún, quienes iniciaron mis primeros pasos en la ciencia. Siempre sentí que puedo contar con ustedes.

A mi esposo, Roberto (mi Niño) que siempre estuvo allí en todo momento, gracias por tus consejos, por escucharme, por tu paz, por enseñarme a ver la vida de otra manera.

A mi hija Martina, llegaste a mi vida y cambiaste todo de una manera Increíble! Mi colibrí... con amor, tu mamá.

A mi mamá, gracias por haberme apoyado siempre. Porque a pesar de la distancia sentí que estabas a mi lado durante este recorrido. Gracias por tus palabras de ánimo y empuje para salir adelante. De ti he aprendido a ser fuerte.

A mi papá...mientras estuvimos juntos fuiste un buen padre para mi, gracias por alegrarme la vida, por tu cariño, tu preocupación, por tu sensibilidad y tu sencillez.

A mi tía ("gordita linda") gracias por estar siempre conmigo en todo momento, por saber escuchar, por tu cariño inmenso y darme buenos consejos. Gracias por todo!

Por último, la realización de esta tesis doctoral ha sido posible gracias a la Beca doctoral del proyecto MECESUP MAG0002 de la Facultad de Ciencias, Universidad de Magallanes. A los Directivos y Docentes de la Universidad de Magallanes quienes apostaron por el perfeccionamiento de sus académicos. Al Proyecto MECESUP UCV0206 por financiar la pasantía realizada en el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), Madrid (España) Al proyecto Núcleo Milenio EMBA P04/007-F.

Resumen

Burkholderia xenovorans LB400 es una bacteria modelo para los estudios de biodegradación de los compuestos aromáticos policlorobifenilos (PCBs). En esta tesis se planteó la siguiente hipótesis: “*B. xenovorans* LB400 posee una excepcional versatilidad catabólica hacia compuestos aromáticos y dado que el catabolismo de estos compuestos genera una condición de estrés oxidativo, es que la sobreexpresión de genes que codifican proteínas de defensa a este estrés permitirá aumentar la tolerancia a esta condición”. Basado en la secuenciación del genoma de la cepa LB400 se propuso como primer objetivo general la reconstrucción del metabolismo de compuestos aromáticos para constatar su versatilidad catabólica. Como segundo objetivo se propuso estudiar la respuesta de *B. xenovorans* LB400 frente al compuesto aromático modelo bifenilo y sobreexpresar genes de defensa al estrés oxidativo, para aumentar la tolerancia de la bacteria a este tipo de estrés.

Mediante análisis bioinformático se identificaron cinco rutas metabólicas centrales y cinco rutas periféricas de degradación de compuestos aromáticos. Estos estudios junto con otros, permitió determinar la gran versatilidad metabólica de compuestos aromáticos que posee *B. xenovorans* LB400, lo que hace que esta cepa sea un buen candidato para estudios de ingeniería genética, aplicaciones biotecnológicas y biorremediación. Durante el desarrollo de este estudio y en colaboración con otros investigadores de las áreas bioinformática y biológica se generó una aplicación bioinformática denominada GeXpert. Esta aplicación permitió aumentar el rendimiento de los investigadores en dicha área.

Se evaluó el efecto del compuesto modelo bifenilo sobre la cepa LB400. La cepa LB400, mostró una menor velocidad de crecimiento en bifenilo que en glucosa. La exposición a bifenilo afectó la viabilidad celular y generó un aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en la célula. Asimismo, durante la exposición a bifenilo se observó un aumento en los productos de peroxidación, medidos como sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs), evidenciando daño en la membrana celular. Estudios proteómicos revelaron que la cepa LB400 en presencia de bifenilo esta expuesta a condiciones de estrés oxidativo. Dichos estudios junto a un riguroso análisis bioinformático permitieron identificar genes candidatos de defensa de estrés oxidativo (*ahpCF*, *sodB* y *oxyR*). Mediante técnicas de biología molecular se obtuvieron tres cepas recombinantes que sobreexpresan dichos genes: LB400pIZahpC, LB400pIZsodB, y LB400pIZoxyR. Se determinó que la cepa que sobreexpresa el gen *oxyR* (LB400pIZoxyR) alcanzó una mayor biomasa durante el cultivo en bifenilo que la cepa control y presentó una mayor sobrevivencia frente a la exposición a peróxido de hidrógeno. En la cepa recombinante que sobreexpresa el gen *sodB* se observó una disminución del superóxido intracelular generado por el paraquat. El análisis proteómico de las cepas recombinantes durante el crecimiento en bifenilo, mostró la inducción de enzimas de la vía superior e inferior de la degradación de bifenilo, de la enzima catecol -1,2-dioxigenasa (CDO) y la alquilo hidropéroxido reductasa (AhpC). Además, se observó la represión de proteínas relacionadas con el metabolismo energético, y el transporte de carbohidratos. Esta tesis constituye una primera aproximación al estudio de la respuesta de cepas recombinantes de *B. xenovorans* LB400 con capacidades mejoradas para tolerar ambientes que generen estrés oxidativo.

La reconstrucción metabólica de compuestos aromáticos en la cepa LB400 amplían las oportunidades de desarrollar aplicaciones biotecnológicas. Los estudios genómicos y proteómicos realizados en esta tesis junto con otros, conducirán al desarrollo de estrategias más eficientes para procesos de biorremediación o biotransformación.

ABSTRACT

Burkholderia xenovorans LB400 is a model bacterium for biodegradation studies of polychlorobiphenyls aromatic compounds (PCBs). In this thesis, the hypothesis is: "*B. xenovorans* LB400 has an exceptional catabolic versatility for aromatic compounds, and given that the catabolism of these compounds in LB400 generates oxidative stress, the overexpression of genes that codify proteins in defense to the stress will allow an increase in tolerance to this condition." Based on the sequenced genome of LB400 strain, the general first objective was to reconstruction the metabolism of aromatic compounds to verify its catabolic versatility. The second objective was to study the response of *B. xenovorans* LB400 to the biphenyl aromatic compound model and to overexpress the defense genes to the oxidative stress in order to increase the tolerance of the bacteria to this type of stress.

Bioinformatic analyses were used to identify five central metabolic pathways and five peripheral pathways of aromatic compound degradation. These studies and others allowed the determination that *B. xenovorans* LB400 has a great metabolic versatility for aromatic compounds and therefore this strain is a good candidate for genetic engineering studies, biotechnology applications and bioremediation. During the development of this thesis and in collaboration with other researchers in the areas of bioinformatics and biology, a bioinformatics application was developed called GeXpert. This application allows an increase in the efficiency of researchers of this area.

The effect of the biphenyl model compound was evaluated on the LB400 strain. The LB400 strain showed a slower rate of growth in biphenyl than in glucose. The exposure to biphenyl affected the cellular viability and it generated an increase in the reactive oxygen species (ROS) in the cell. Likewise, during exposure to biphenyl, the peroxidation products increased, which were measured as reactive substances to the thiobarbituric acid (TBARs), indicating damage to the cell membrane. Proteomic studies revealed that the LB400 strain in the presence of biphenyl is exposed to oxidative stress conditions. These studies and a rigorous bioinformatic analysis allowed the identification of defense genes to oxidative stress (*ahpCF*, *sodB* y *oxyR*). Molecular biology techniques were used to generate three recombinant strains that overexpress those genes: LB400pIZoxyR, LB400pIZsodB, and LB400pIZahpC. The strain that overexpresses the gene *oxyR* (LB400pIZoxyR) reached a greater biomass in the biphenyl culture than the control strain. The same strain showed a longer survival in exposure to hydrogen peroxide. In the recombinant strain that

overexpresses the gene *sodB*, a decrease of intracellular superoxide generated by paraquat was observed. The proteomic analysis of the recombinant stress during the growth in biphenyl showed induction of enzymes of the higher and lower pathways of the biphenyl degradation, catechol-1,2-dioxygenase (CDO) enzyme, and the alkyl hydroperoxide reductase (AhpC). Moreover, repression of related proteins with energetic metabolism and carbohydrate transport was observed. This thesis constitutes a first approach to the study of the recombinant strain response of *B. xenovorans* LB400 with improved capacities to tolerate environments that generate oxidative stress.

The metabolic reconstruction of aromatic compounds in the LB400 strain improves opportunities to develop biotechnology applications. The genomic and proteomic studies in this thesis, together with others, will facilitate the development of more efficient strategies for bioremediation and biotransformation processes.

INDICE GENERAL

RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
INDICE GENERAL	vi
INDICE DE TABLAS	x
INDICE DE FIGURAS	xi
ABREVIATURAS	xiii
I. INTRODUCCIÓN	
1. Problemática ambiental de los contaminantes orgánicos persistentes (COPs)	2
2. Policlorobifenilos (PCBs)	3
3. Biorremediación de COPs	4
3.1 Biodegradación de compuestos aromáticos	5
3.2 Biodegradación de PCBs	6
3.2.1 <i>Burkholderia xenovorans</i> LB400	7
4. Estrés oxidativo	10
4.1 Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)	10
4.2 ROS no radicales	12
4.3 Sistema de defensa antioxidante	12
4.3.1 Antioxidantes no enzimáticos	13
4.3.2 Antioxidantes enzimáticos	13
4.4 Regulación de las defensas antioxidantes	14
5. Estudios proteómicos microbianos	16
II. HIPÓTESIS	17
III. OBJETIVOS	17
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	
1. Reactivos	19
2. Cepas bacterianas y plásmidos	19
3. Medios y condiciones de cultivo	21
3.1 Medios de cultivos empleados para <i>Escherichia coli</i>	21
3.2 Medios de cultivos empleados para <i>Burkholderia xenovorans</i> LB400	21
3.3 Antibióticos	23

3.4	Condiciones de cultivo	23
3.5	Conservación de las cepas bacterianas	23
4.	Efecto de la exposición a bifenilo sobre la viabilidad celular	24
5.	Determinación de las especies reactivas de oxígeno (ROS)	24
6.	Ensayo de reducción de nitroazul de tetrazolium (NBT)	25
7.	Búsqueda <i>in silico</i> de genes de estrés oxidativo y de vías catabólicas para compuestos aromáticos en el genoma de <i>B. xenovorans</i> LB400	25
8.	Análisis del perfil de proteínas mediante electroforesis monodimensional en geles de poliacrilamida-SDS (PAGE-SDS)	25
8.1	Soluciones para geles mono y bidimensionales	25
8.2	Preparación de la muestra	26
8.3	Electroforesis monodimensional	26
9.	Análisis del proteoma mediante electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida	
9.1	Preparación de la muestra	27
9.2	Primera dimensión	28
9.3	Segunda dimensión	28
9.4	Determinación de los niveles relativos de proteínas	29
9.5	Secuenciación e identificación de proteínas	29
10.	Ensayos enzimáticos	
10.1	Preparación del extracto crudo	30
10.2	Ensayo de actividad enzimática catalasa (CAT)	30
11.	Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs)	31
12	Técnicas de Biología Molecular	
12.1	Aislamiento de ADN	31
12.2	Electroforesis de ADN en gel de agarosa	31
12.3	Digestión de ADN con enzimas de restricción	32
12.4	Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa (PCR)	32
12.5	Partidores	32
12.6	Ligación de ADN	34
12.7	Secuenciación de ADN	34
13	Métodos de transferencia genética	
13.1	Transformación de células de <i>E. coli</i>	34
13.2	Construcciones genéticas	34
13.3	Transferencia de plásmidos por conjugación biparental	35

14	Microscopía electrónica de transmisión	35
15	Ensayo de degradación de bifenilo	36
16	Análisis estadístico	36

IV RESULTADOS

1.	ANÁLISIS DEL POTENCIAL DE <i>B. xenovorans</i> LB400 PARA DEGRADAR COMPUESTOS AROMÁTICOS	38
1.1	Análisis de las rutas centrales de degradación de compuestos aromáticos de <i>B. xenovorans</i> LB400	41
1.1.2	Ruta central del β -cetoadipato	41
1.1.3	Ruta del catecol	41
1.1.4	Ruta del protocatecuato	43
1.1.5	Ruta del benzoil Co-A	45
1.1.6	Ruta del clorocatecol	47
1.1.7	Ruta del homoprotocatecuato	48
1.2	Ruta periférica que convergen en la ruta central de β -cetoadipato	50
1.2.1	Ruta del benzoato	50
1.2.2	Ruta del benzonitrilo/benzamida	51
1.2.3	Ruta del bifenilo	52
1.2.4	Ruta del triptófano	53
1.2.5	Ruta del salicilato	54
1.3	Análisis funcional de rutas de degradación de compuestos aromáticos de <i>B. xenovorans</i> LB400	55
1.4	Aplicaciones bioinformáticas para la búsqueda <i>in silico</i> de rutas catabólicas	56
2.	CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA DE <i>B. xenovorans</i> LB400 FRENTE AL COMPUESTO MODELO BIFENILO	
2.1	Crecimiento de <i>B. xenovorans</i> LB400 en bifenilo	57
2.2	Efecto del bifenilo y H_2O_2 sobre la viabilidad celular	58
2.3	El bifenilo genera ROS en <i>B. xenovorans</i> LB400	60
2.4	Efecto de la exposición a bifenilo sobre la membrana celular	61
2.5	Estudios proteómicos	62
2.6	Identificación de las proteínas inducidas durante el crecimiento en bifenilo	63

3. GENERACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS RECOMBINANTES QUE SOBREENPRESAN GENES QUE CODIFICAN PROTEÍNAS DE DEFENSA AL ESTRÉS OXIDATIVO	
3.1 Búsqueda <i>in silico</i> de los genes que codifican para proteínas de respuesta a estrés oxidativo en <i>B. xenovorans</i> LB400	64
3.1.2 Selección de los genes para sobreexpresión	67
3.2 Generación de cepas recombinantes de <i>B. xenovorans</i> LB400	68
4. CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS RECOMBINANTES	
4.1 Crecimiento en bifenilo	70
4.2 Efecto del inductor de estrés oxidativo H ₂ O ₂ sobre la viabilidad de las cepas recombinantes	71
4.3 Degradación de bifenilo	72
4.4 Morfología de las cepas bacterianas recombinantes	73
4.5 Medición de superóxido intracelular	74
4.6 Análisis proteómico de las cepas recombinantes: LB400pIZoxyR, LB400pIZsodB, LB400pIZahpC y LB400pIZ1016	
4.6.1 Identificación de proteínas inducidas en las bacterias recombinantes de la cepa LB400 crecidas en bifenilo	75
V DISCUSIÓN	
1. Análisis del potencial de <i>B. xenovorans</i> LB400 para degradar compuestos aromáticos	82
2. Caracterización de la respuesta de <i>B. xenovorans</i> LB400 frente al compuesto modelo bifenilo	86
3. Búsqueda <i>in silico</i> de los genes que codifican proteínas de defensa a estrés oxidativo en <i>B. xenovorans</i> LB400	89
4. Caracterización de las cepas recombinantes	90
VI. CONCLUSIONES	95
VII. PROYECCIONES	97
VIII. REFERENCIAS	99
IX. PUBLICACIONES Y PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS	115
ANEXOS	118

INDICE DE TABLAS

- Tabla 1. Genes y actividades involucradas en el estrés oxidativo en *Escherichia coli*
- Tabla 2. Cepas bacterianas utilizadas en esta Tesis
- Tabla 3. Plásmidos utilizados en esta Tesis
- Tabla 4. Preparación de gel de poliacrilamida-SDS para electroforesis monodimensional
- Tabla 5. Partidores utilizados en este trabajo
- Tabla 6. Genes *cat* y sus productos en *B. xenovorans* LB400
- Tabla 7. Genes *pca* y sus productos génicos en *B. xenovorans* LB400
- Tabla 8. Genes de la ruta benzoil Co-A y sus productos génicos en *B. xenovorans* LB400
- Tabla 9. Genes *clc* y sus productos génicos en *B. xenovorans* LB400
- Tabla 10. Genes *hpa* y sus productos génicos en *B. xenovorans* LB400
- Tabla 11. Genes *ben* y sus productos génicos en *B. xenovorans* LB400
- Tabla 12. Genes *bph* y sus productos génicos en *B. xenovorans* LB400
- Tabla 13. Genes *kyn* y sus productos génicos en *B. xenovorans* LB400
- Tabla 14. Genes *nah* y sus productos génicos en *B. xenovorans* LB400
- Tabla 15. Genes de respuesta a estrés oxidativo y sus productos de *B. xenovorans* LB400
- Tabla 16. Cepas bacterianas recombinantes que sobreexpresan genes de estrés oxidativo
- Tabla 17. Propiedades de las proteínas separadas por PAGE-2D
- Tabla 18. Niveles de expresión relativa de las proteínas identificadas en las cepas recombinantes crecidas en bifenilo
- Tabla 19. Plásmidos recombinantes construidos para la obtención de cepas mutantes de genes de estrés oxidativo

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Vías catabólicas superior (a) e inferior (b) de bifenilo codificada por el locus *bph* de *Burkholderia xenovorans* LB400
- Figura 2. Representación esquemática de todas las rutas centrales y periféricas de compuestos aromáticos presentes en *B. xenovorans* LB400
- Figura 3. Rutas del catabolismo de compuestos aromáticos de *B. xenovorans* LB400
- Figura 4. Organización de genes *cat* que codifican la ruta central catabólica del catecol en *B. xenovorans* LB400
- Figura 5. Organización de los genes *cat* y *ben* en *B. xenovorans* LB400 y la comparación con otras bacterias
- Figura 6. Organización de genes *pca* que codifican la ruta catabólica central del protocatecuato en *B. xenovorans* LB400.
- Figura 7. Organización de genes que codifican la ruta central catabólica del benzoil Co-A en *B. xenovorans* LB400.
- Figura 8. Organización de los genes de la ruta benzoil-CoA en *B. xenovorans* LB400 y la comparación con otras bacterias.
- Figura 9. Organización de genes *clc* que codifican la ruta central catabólica del clorocatecol en *B. xenovorans* LB400
- Figura 10. Organización de genes *hpc* que codifican la ruta central catabólica del homoprotocatecuato en *B. xenovorans* LB400
- Figura 11. Organización de los genes de la ruta del homoprotocatecuato en *B. xenovorans* LB400 y la comparación con otras bacterias
- Figura 12. Organización de genes *ben* que codifican la ruta central catabólica del benzoato en *B. xenovorans* LB400
- Figura 13. Organización de los genes *bph* que codifican la ruta periférica catabólica del bifenilo en *B. xenovorans* LB400
- Figura 14. Interfase gráfico del visualizador de rutas metabólicas
- Figura 15. Crecimiento de *B. xenovorans* LB400 en medio mínimo M9 utilizando glucosa y bifenilo como fuente de carbono
- Figura 16. Efecto de la exposición a bifenilo y H₂O₂ en *B. xenovorans* LB400
- Figura 17. Generación de ROS intracelular en *B. xenovorans* LB400 durante la exposición a bifenilo

- Figura 18. Generación de ROS intracelular por crecimiento de *B. xenovorans* LB400 en bifenilo
- Figura 19. Efecto de la exposición a bifenilo sobre la peroxidación de membranas
- Figura 20. Inducción de la proteína AhpC, en la cepa LB400 por H₂O₂ y bifenilo
- Figura 21. Organización genómica de genes de estrés oxidativo en *B. xenovorans* LB400
- Figura 22. Representación esquemática de la construcción del plásmido pIZahpCF
- Figura 23. Electroforesis en gel de agarosa de plásmidos recombinantes
- Figura 24. Patrón de proteínas totales de la cepa recombinante de *B. xenovorans* LB400pIZsodB
- Figura 25. Crecimiento de las cepas recombinantes de *B. xenovorans* (LB400pIZ y LB400pIZoxyR) en bifenilo y glucosa
- Figura 26. Efecto de la exposición a peróxido de hidrógeno sobre la viabilidad de las bacterias recombinantes (LB400pIZoxyR, LB400pIZahpC y LB400pIZ)
- Figura 27. Estudio de degradación de bifenilo por las cepas de *B. xenovorans* LB400 recombinantes (LB400pIZ, LB400pIZahpC, LB400pIZsodB, LB400pIZoxyR)
- Figura 28. Micrografías de cepas recombinantes de *B. xenovorans* LB400 (LB400pIZ, LB400pIZoxyR, LB400pIZsodB y LB400pIZahpC) crecidas en bifenilo y glucosa
- Figura 29. Disminución del superóxido intracelular en la bacteria recombinante LB400pIZsodB
- Figura 30. Patrón de proteínas totales de la cepa recombinante LB400pIZoxyR crecida en glucosa o en bifenilo
- Figura 31. Patrón de proteínas totales de la cepa recombinante LB400pIsodB crecida en glucosa o en bifenilo
- Figura 32. Patrón de proteínas totales de la cepa recombinante LB400pIZahpC crecida en glucosa y en bifenilo
- Figura 33. Patrón de proteínas totales de la cepa recombinante LB400pIZ crecida en glucosa o en bifenilo
- Figura 34. Estrategia para la construcción de mutantes de genes de defensa al estrés oxidativo

ABREVIATURAS

AB^r	Resistencia a antibiótico
A₅₂₅	Absorbancia medida a 525 nm
Gm^r	Resistencia a gentamicina
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
kb	1000 pares de bases
kDa	1000 Dalton
Km^r	Resistencia a kanamicina
LB	Medio Luria-Bertani
M63	Medio mínimo M63
M9	Medio mínimo M9
MCS	Sitio de clonación múltiple
NAD(P)H	Fosfato de nicotinamida-adenina-dinucleótido reducido
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ORF	Marco abierto de lectura
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PCR	Reacción de amplificación en cadena con DNA polimerasa termorresistente
pI/MW	Punto isoeléctrico / peso molecular
SDS	Dodecilsulfato sódico
X-Gal	5-Bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido

I INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1. Problemática ambiental de los contaminantes orgánicos persistentes

Los contaminantes orgánicos persistentes (COPs) son compuestos de persistencia ambiental prolongada y susceptibles de transportarse a lugares alejados de la fuente de emisión (Eisler, 2000). Por este motivo, están ampliamente distribuidos en el medio ambiente y se han detectado en regiones remotas tales como la Antártica y el Ártico (Wagrowski y Hites, 2000; MacDonald *et al.*, 2000; Negoita *et al.*, 2003). El transporte atmosférico sería la principal ruta de dispersión de estos compuestos semivolátiles. Una vez en el ambiente, estos compuestos no se degradan, representando un grave problema ambiental a nivel mundial, debido a sus efectos tóxicos (Jones y de Voogt, 1999). Los COPs incluso en bajas concentraciones son tóxicos para el hombre y para diferentes formas de vida tanto terrestre como acuática (Eisler, 2000). Estos compuestos se bioacumulan en los organismos acuáticos. Los COPs pueden ser carcinogénicos, producir desordenes neurológicos, disfunción endocrina, y efectos teratogénicos (Eisler, 2000; Shimada y Fujii-Kuriyama, 2004; Van Gijssel *et al.*, 2004; Wogan *et al.*, 2004; Argemi *et al.*, 2005).

En las costas de Chile y otros países de América, se reportó la presencia de COPs en moluscos bivalvos (Sericano *et al.*, 1995, Palma-Fleming *et al.*, 2008). En el año 2001, Chile se sumó a los 151 países en la firma del Convenio de Estocolmo. En el Convenio se definieron como contaminantes prioritarios la denominada "docena sucia", que está compuesta por: aldrin, PCBs (policlorobifenilos), clordano, DDT, dieldrin, endrin, hexaclorobenceno, heptacloro, mirex, policlorodibenzo-p-dioxinas, policlorodibenzofuranos y toxafeno. Dicho Convenio tiene por finalidad proteger la salud humana y el medio ambiente. Además, faculta a las partes firmantes adoptar las medidas jurídicas y administrativas necesarias para reducir o eliminar la producción de estos productos químicos. El año 2005, el Convenio fue ratificado por el Congreso, lo cual implica un compromiso por parte de Chile a definir medidas, preparar un Plan Nacional de Implementación (PNI) para la gestión de los COPs e impulsar el desarrollo de un diagnóstico nacional (almacenamiento y fuentes de emisión de estos compuestos al medio ambiente).

Los policlorobifenilos (PCBs) son uno de los COPs más ampliamente distribuidos en el ambiente (Eisler, 2000). En Chile, durante el año 2000, la Comisión Nacional del Medio Ambiente (CONAMA) realizó un diagnóstico nacional de los COPs y un catastro preliminar de

los PCBs. Se demostró la presencia de PCBs en uso y almacenados en diferentes regiones del país. Las regiones Metropolitana y VIII presentaron las mayores cantidades de PCBs en uso. Las regiones II, III y VIII presentaron una mayor cantidad de aceites con PCBs almacenados (CONAMA, 2001). El total nacional de PCBs en uso sería de 208.380 litros y de PCBs almacenados sería de 242.951 litros. En Chile desde 1982 está prohibido el uso de PCBs en equipos eléctricos nuevos, tales como transformadores, condensadores y los que aún quedan, son anteriores a esa fecha. De acuerdo a lo establecido en el Convenio de Estocolmo, el plan de acción para eliminar estos compuestos contempla como fecha límite el año 2028.

2. Policlorobifenilos

Los PCBs son compuestos aromáticos derivados del bifenilo. Teóricamente se pueden formar 209 congéneres de PCBs, que difieren en el grado de cloración y en la posición de los átomos de cloro en el anillo aromático. Las destacadas propiedades físicas de los PCBs y su estabilidad química fueron la razón para su aplicación industrial (Abramowicz, 1990). Estos compuestos son térmica- y químicamente estables, resistentes a la oxidación, tienen baja presión de vapor, son hidrofóbicos y tienen excelentes propiedades dieléctricas. Sin embargo, estas mismas características que hicieron a los PCBs industrialmente útiles, los hacen agentes contaminantes tóxicos, persistentes en el ambiente y bioacumulables en la cadena trófica (Quensen *et al.*, 1988). Debido a esto, en el año 1976, en Estados Unidos se prohibió la producción, manipulación, distribución y comercialización de los PCBs. Entre el año 1930 y mediados de los años 1980, cerca de 1,5 millones de toneladas de PCBs fueron producidos en todo el mundo, y una fracción substancial se ha incorporado o se incorporará al ambiente (Abraham *et al.*, 2002).

Los PCBs en el hombre alteran el sistema inmune (Smitwick *et al.*, 2003), y producen alteraciones dérmicas y hepáticas (Loomis *et al.*, 1997). Los PCBs son compuestos teratogénicos (Battershill, 1994) y carcinogénicos (Pieper *et al.*, 2000). Debido a su capacidad para unirse a receptores hormonales, los PCBs se han asociado con patologías endocrinas, entre ellas infertilidad por unión a receptores estrogénicos o androgénicos, lo que explicaría en parte, la disminución de la fertilidad en poblaciones de países industrializados (Nicolopoulou-Stamati *et al.*, 2001). Por estas razones, los PCBs en el ambiente representan un problema global, que requiere procesos de descontaminación ambiental.

3. Biorremediación de COPs

Existen más de 4 millones de compuestos químicos en la biosfera y más de 1.250 nuevos compuestos contaminantes con una estructura química poco común (xenobióticos), se incorporan anualmente a la lista de más de 850.000 moléculas sintéticas. Esto tiene como consecuencia que nos enfrentemos a un problema cada vez mayor de contaminación de suelos, sedimentos, aguas superficiales y subterráneas. Las diversas alternativas físico-químicas de remediación de los COPs del medio ambiente como la incineración, extracción con solventes, solidificación/estabilización, tratamiento térmico y venteo, son a menudo procesos costosos, de difícil logística y presentan un impacto ambiental negativo (Sarokin, 1988). La biorremediación representa una alternativa atractiva frente a los tradicionales métodos físico-químicos. Emplea el potencial catabólico de los microorganismos para la remoción de los compuestos xenobióticos. Además, su potencial y flexibilidad genética permiten la generación de nuevas rutas catabólicas para estos compuestos. Aunque, este proceso evolutivo requiere un largo periodo de tiempo (Timmis y Pieper, 1999).

A pesar que algunos casos de contaminación pueden ser fácilmente biorremediados con la tecnología existente, los relacionados con compuestos tóxicos y químicamente estables como los PCBs y las dibenzo-p-dioxinas cloradas, requieren el desarrollo de tecnologías nuevas e innovadoras (Timmis y Pieper, 1999; Navia y Seeger, 2006; Pieper y Seeger, 2008). Por ejemplo, la biorremediación *in situ*, permite la remoción selectiva de COPs sin la destrucción de la flora y fauna y puede ser utilizada para contaminantes que están presentes en una baja, pero relevante concentración para el ambiente.

En los últimos años se han aislado un gran número de microorganismos capaces de degradar COPs que antes se consideraban no degradables. Sin embargo, la capacidad microbiana para la degradación de xenobióticos recalcitrantes, podría tener un mejor rendimiento con la utilización de procesos biotecnológicos. El hecho que muchos contaminantes persisten en el medio ambiente indica la insuficiencia actual de la capacidad catabólica para hacer frente a esos contaminantes (Timmis y Pieper, 1999; Navia y Seeger, 2006; Pieper y Seeger, 2008). Se ha desarrollado una variedad de estrategias para el diseño de nuevos o mejores catalizadores para la biorremediación. La estrategia más sencilla es la utilización de un consorcio microbiano, donde un organismo "especialista" podrá llevar a cabo las primeras reacciones catabólicas y otro puede completar la secuencia. Tales

consorcios han sido desarrollados para la mineralización de compuestos aromáticos como PCBs (Blasco *et al.*, 1997) y dibenzofuranos clorados (Morris *et al.*, 1992).

3.1 Biodegradación de compuestos aromáticos

Muchos de los COPs son compuestos aromáticos como las dioxinas, dibenzofuranos policlorados y los PCBs. Los compuestos aromáticos se pueden encontrar como moléculas de bajo peso molecular como el benceno o bien como componentes de biopolímeros tales como la lignina. Se forman a partir de procesos biogeoquímicos o por la actividad industrial. Las moléculas producidas de esta forma, no se encuentran habitualmente en la naturaleza, por lo que no existen generalmente procesos de biodegradación o bien es muy baja. Esta situación puede deberse a la incapacidad de los microorganismos presentes en el ambiente para metabolizar los xenobióticos. No obstante, la comunidad microbiana expuesta a estos compuestos puede frecuentemente adaptarse (Van der Meer *et al.*, 1992). En este contexto, las bacterias han desarrollado estrategias para su biodegradación y mineralización a pesar de la gran estabilidad termodinámica de estas moléculas (Gibson y Harwood, 2000).

Por otro lado, existen compuestos aromáticos que son sintetizados por los mismos organismos, como los aminoácidos aromáticos, fenoles, o quinonas. Por lo tanto, no sorprende que muchos microorganismos posean rutas catabólicas para degradar dichos compuestos producidos por el hombre, cuando las estructuras químicas de moléculas sintéticas son similares a los compuestos naturales. La versatilidad y la adaptabilidad de las bacterias para degradar estos compuestos aromáticos están basadas en la existencia de elementos genéticos móviles como, por ejemplo, los plásmidos catabólicos (Diaz, *et al.*, 2001, Pieper y Seeger, 2008).

En la actualidad, la secuenciación y anotación de genomas de distintas bacterias ambientales importantes como *Pseudomonas putida* KT2440 (Jiménez *et al.*, 2004; Nelson *et al.*, 2002), *Rhodococcus sp.* RHA1 (McLeod *et al.*, 2006) y *Burkholderia xenovorans* LB400 (Chain *et al.*, 2006), permite conocer las bases moleculares que poseen las bacterias y el potencial metabólico para catabolizar una gran variedad de compuestos aromáticos. Esta versatilidad metabólica representa un punto atractivo para diversas aplicaciones biotecnológicas (Jiménez *et al.*, 2004).

La degradación bacteriana de compuestos aromáticos comprende dos tipos de catabolismo. Si el aceptor final de electrones es una molécula de oxígeno, se trata de una degradación aerobia. Si el aceptor es otra molécula distinta al oxígeno, la degradación es

anaerobia. La característica esencial de los microorganismos aerobios que degradan compuestos aromáticos es el proceso oxidativo, que consiste en la activación y la incorporación de oxígeno como la reacción enzimática clave, catalizada por oxigenasas y peroxidasas (Fritsche y Hofrichter, 2000). Los procesos de degradación aerobios permiten distinguir entre “rutas periféricas”, que convierten los sustratos aromáticos en intermediarios centrales, y “rutas centrales”, que catalizan la ruptura de estos intermediarios centrales (anillo aromático) al metabolismo central (Díaz, 2004; Heider y Fuchs, 1997). En cambio, en la degradación anaerobia de compuestos aromáticos, las bacterias emplean como aceptores finales de electrones moléculas inorgánicas tales como el NO_3^- (Spormann y Widdel, 2000), Fe^{3+} (Coates *et al.*, 2001), o SO_4^{2-} (Morasch *et al.*, 2004; Peters *et al.*, 2004).

La capacidad de catabolizar compuestos aromáticos está ampliamente extendida entre las bacterias (Harayama y Timmis, 1992; Pieper y Reineke, 2000; Ramos *et al.*, 1994; Navia y Seeger, 2006). *Acinetobacter sp.* KS-1, es capaz de degradar benzoato (Kim *et al.*, 2003). *Pseudomonas* ha sido el género mejor caracterizado en las rutas catabólicas de compuestos aromáticos (Van der Meer *et al.*, 1992; Jiménez *et al.*, 2004). *Alcaligenes eutrophus* H850 degrada un amplio espectro de PCBs incluyendo tetra- y pentaclorobifenilos (Bedard *et al.*, 1987). *B. xenovorans* LB400 es capaz de degradar un amplio rango de PCBs (Bedard *et al.*, 1987; Bopp, 1986; Haddock *et al.*, 1995; Seeger *et al.*, 1995a, b, 1997, 1999; Goris *et al.*, 2004; Pieper y Seeger, 2008) transformando distintos congéneres desde mono hasta hexa-clorados.

Aunque muchas bacterias son capaces de metabolizar compuestos aromáticos, una bacteria única no posee la capacidad enzimática para degradar todos los compuestos aromáticos en un suelo contaminado. La mezcla de poblaciones microbianas (consorcios microbianos) tiene un mayor potencial degradativo porque la información genética de más de un organismo, es necesaria para degradar la mezcla compleja de compuestos aromáticos presentes en áreas contaminadas. El potencial genético y ciertos factores ambientales tales como temperatura, pH, fuentes de nitrógeno y fósforo disponible, parecen determinar la tasa y la extensión de la degradación (Fritsche y Hofrichter, 2000).

3.2 Biodegradación de PCBs

La biodegradación de suelos contaminados con PCBs puede llevarse a cabo mediante bacterias anaerobias y aerobias (Timmis y Pieper, 1999; Pieper y Seeger, 2008). Ambos tipos de bacterias pueden actuar de manera individual o en consorcios microbianos

(De Giorgis *et al.*, 2003). Para la biodegradación de PCBs altamente clorados, ha sido el desarrollo de procesos anaerobios-aerobios (Timmis y Pieper, 1999; Pieper y Seeger, 2008). Por ejemplo, la transformación microbiana de PCBs en los sedimentos comprende primeramente una deshalogenación anaerobia de congéneres altamente clorados. Esto permite transformar bifenilos altamente clorados en congéneres menos clorados, que son más susceptibles para una posterior degradación aerobia (Tiedje *et al.*, 1993; Navia y Seeger, 2006).

La mayoría de los ambientes contaminados por PCBs contienen una mezcla compleja con más de 60 congéneres. Se han aislado diversas bacterias capaces de utilizar el bifenilo como única fuente de carbono y energía (predominantemente los géneros de *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Comamonas*, *Cupriavidus*, *Sphingomonas*, *Acidovorax*, *Rhodococcus* y *Bacillus*) (Pieper y Seeger, 2008). Entre ellas se encuentran bacterias Gram negativas pertenecientes a la subclase β - y γ -proteobacterias (tales como *Burkholderia*, *Pseudomonas* y *Sphingomonas*) (Nogales *et al.*, 1999) y bacterias Gram-positivas del género *Rhodococcus* (Asturias y Timmis, 1993; McKay *et al.*, 2003). La biodegradación de estos distintos congéneres requiere una amplia especificidad enzimática y bajo esta condición *B. xenovorans* LB400 ha sido una de las bacterias aerobias degradadoras de PCBs más estudiadas y efectivas (Mondello, 1989, Seeger *et al.*, 1999; 2001; Navia y Seeger, 2006). La utilización del potencial metabólico microbiano para la eliminación de los contaminantes ambientales (biorremediación) proporciona una alternativa segura y económica frente a las estrategias físico-químicas comúnmente utilizadas. Por lo tanto, para la descontaminación de grandes áreas de suelo y ambientes acuáticos contaminados con PCBs, la biorremediación es una alternativa promisoría (EPA, 1997).

3.2.1 *Burkholderia xenovorans* LB400

B. xenovorans LB400 es una bacteria Gram-negativa aerobia que degrada distintos congéneres de PCBs desde mono a hexaclorados (Bopp, 1986; Abramowicz, 1990; Seeger *et al.*, 1995a, 1995b, 1997, 1999). La cepa LB400 fue aislada desde un suelo que contenía PCBs en el estado de Nueva York (Bopp, 1986). Posee uno de los dos más grandes genomas bacterianos conocidos y es la primera cepa del género *Burkholderia* no patogénica secuenciada (Chain *et al.*, 2006). El tamaño del genoma de la cepa LB400 es de 9,73 Mbp, posee aproximadamente 9.000 secuencias codificantes distribuidos en tres replicones que han sido designados como cromosoma 1 (4,9 Mbp), cromosoma 2 (3,36 Mbp) y un

megaplásmido (1,47 Mbp). En esta cepa se han identificado las enzimas de la degradación de bifenilo, codificadas por el locus *bph* en el genoma bacteriano, el que ha sido extensamente caracterizado (Erickson y Mondello, 1992; Hofer *et al.*, 1993, 1994). El locus cromosómico *bph* posee diez genes que codifican para las enzimas que constituyen la vía superior e inferior de degradación del bifenilo. La primera enzima de esta vía oxidativa es una bifenilo-2,3-dioxigenasa (BDO), codificada por los genes *bphA1A2A3A4*, cuya función consiste en insertar una molécula de oxígeno en uno de los anillos aromáticos para formar un (cloro) bifenilo-2,3-dihidrodiol (Figura 1a). Las siguientes enzimas codificadas por los genes *bphB*, *bphC* y *bphD* (Seeger *et al.*, 1997; Seeger *et al.*, 1995b) transforman el (cloro) bifenilo-2,3-dihidrodiol hasta (cloro)benzoato y ácido 2-hidroxipenta-2,4-dienoico. Entre los genes *bphC* y *bphD* (Figura 1c), existe un conjunto de cuatro genes, tres de ellos (*bphH*, *bphI*, y *bphJ*) codifican para enzimas de la vía inferior de degradación de bifenilo, que transforma el ácido dienoico a compuestos que participan en el ciclo de los ácidos tricarbónicos (Figura 1b). Además, contiene un gen que codifica para una glutatión-S-transferasa (*bphK*), que cataliza la deshalogenación de 3-cloro-2-hidroxi-6-oxo-6-fenil-2,4-dienoato, compuesto que inhibe la hidrolasa BphD de la vía (Fortín *et al.*, 2006). Estudios recientes indican la presencia del gen *bphR*, cuyo producto ha sido descrito como un regulador del promotor *bphA1* en la cepa LB400 y el ORF1 de función desconocida (Beltrametti *et al.*, 2001). La cepa LB400 transforma PCBs mediante enzimas de la vía superior de bifenilo, en 2-hidroxipenta-2,4-dienoato que entra a la vía inferior de bifenilo y clorobenzoatos (CBAs).

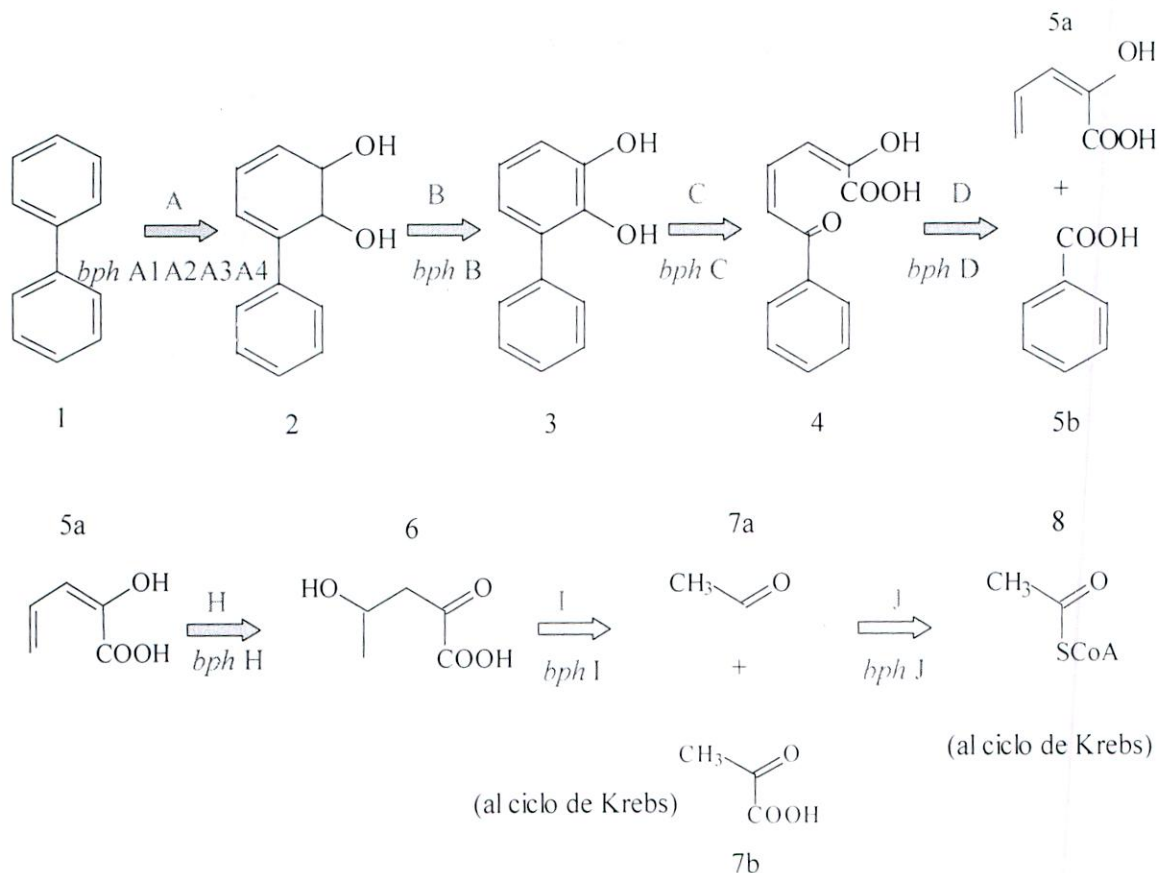


Figura 1. Vías catabólicas superior (a) e inferior (b) de bifenilo codificada por el locus *bph* de *Burkholderia xenovorans* LB400. Metabolitos: 1 bifenilo; 2 bifenilo-2,3 -dihidrodiol; 3 2,3-dihidrobifenilo; 4 ácido 2-hidroxi-6-oxo-fenilhexa-2,4-dienoico; 5 ácido 2-hidroxipenta-2,4-dienoico; 5b benzoato; 6 ácido 4-hidroxi-2-oxovalérico; 7a acetaldehído; 7b ácido pirúvico; 8 acetil Co-A. Enzimas: A bifenilo-2,3-dioxigenasa; B bifenilo-2,3-deshidrogenasa; C 2,3-dihidroxibifenil-1,2-dioxigenasa; D 2-hidroxi-6-oxo-6-fenilhexa-2,4-dienoato hidrolasa; H 2-hidroxipenta-2,4-dienoato hidratasa; I 4-hidroxi-2-oxovalerato aldolasa; J acetaldehído dehidrogenasa.

Muchos estudios asociados al catabolismo de PCBs en bacterias han proporcionado las bases para los procesos de biorremediación mediados por bacterias degradadoras. Sin embargo, se conoce muy poco acerca de la respuesta adaptativa de estas bacterias durante su crecimiento en dichos compuestos. Se debe destacar que si bien los PCBs son degradados por bacterias, estos compuestos tóxicos ejercen efectos nocivos sobre la membrana citoplasmática (bioacumulación), interrumpiendo su función y afectando directamente la viabilidad celular (Delaware *et al.*, 2003; Cámara *et al.*, 2004; Agulló *et al.*, 2007).

De acuerdo a lo expuesto anteriormente, el potencial biocatalítico está presente en los microorganismos, pero las condiciones de degradación no son las óptimas debido al

estrés químico provocado por estos compuestos. Por ejemplo, en *Pseudomonas* sp. DJ-12, varias chaperonas moleculares como DnaK y GroEL fueron inducidas en presencia de bifenilo y 4-clorobifenilo (Park *et al.*, 2001), indicando que estos compuestos se utilizan como fuente de carbono y agentes de estrés químico. Se observó la inducción de las chaperonas DnaK y GroEL en *B. xenovorans* LB400 durante la exposición a diferentes (cloro)bifenilos, lo que indicaría una condición de estrés (Agulló *et al.*, 2007). Los PCBs provocaron sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en *Pseudomonas* sp. B4, produciendo un estado de estrés oxidativo (Chávez *et al.*, 2004).

4. Estrés oxidativo

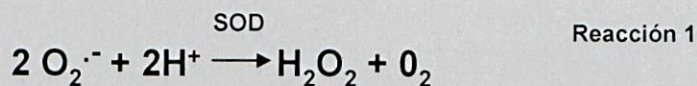
Los compuestos organoclorados incluyendo los PCBs son conocidos por provocar estrés oxidativo en diversos sistemas biológicos (Voie y Fonnum, 2000; Min *et al.*, 2003; Ruiz Leal y George, 2004).

Las especies oxidantes o radicales libres son átomos que tienen un electrón desapareado, por lo tanto son muy reactivos y tienden a capturar electrones de moléculas estables, con el objetivo de alcanzar su estabilidad electroquímica. La vida media de estos radicales es de microsegundo, pero son altamente reactivos, provocando un gran daño a moléculas y a membranas celulares. Si bien durante procesos metabólicos normales se producen grandes cantidades de radicales libres, estas especies oxidantes también se pueden producir por la exposición de las células a diferentes agentes físicos y químicos, causando lesiones oxidativas, provocando daño a nivel de membrana y rompiendo o modificando ácidos nucleicos y proteínas (Dempfle, 1991).

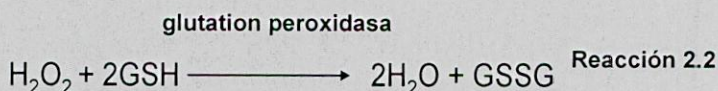
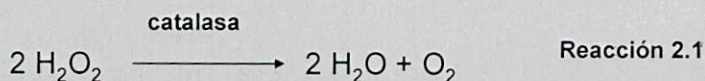
4.1 Especies reactivas del oxígeno (ROS)

Actualmente, el término que se aplica a moléculas radicales es "especies reactivas del oxígeno" (ROS, del inglés *Reactive oxygen species*). Cuando el aumento de las ROS sobrepasa los mecanismos de defensa antioxidante de la célula, se produce el estrés oxidativo (Halliwell y Gutteridge, 1986, Storz y Zheng, 2000). Las ROS están representadas tanto por un conjunto de radicales libres, como de moléculas derivadas del oxígeno altamente reactivas (Farr *et al.*, 1991; Gil del Valle *et al.*, 1999). Uno de los radicales libres es el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$). El $O_2^{\cdot-}$ suele generar las demás ROS, como el radical hidroxilo (OH^{\cdot}) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), siendo éste último una especie reactiva pero no un

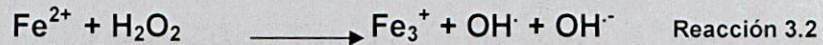
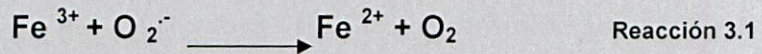
verdadero radical. El $O_2^{\cdot-}$ es un radical cargado negativamente, producto de la reducción monovalente (transferencia de un electrón) al oxígeno molecular (Farr *et al.*, 1991). El $O_2^{\cdot-}$ no causa un daño oxidativo significativo pero al reaccionar consigo mismo (dismutación), genera peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno molecular, proceso catalizado por la superóxido dismutasa (SOD) (Reacción 1).



Por otra parte, el peróxido de hidrógeno es importante para el mantenimiento de la homeostasis celular debido a su facilidad para atravesar membranas celulares y su requerimiento para el funcionamiento de muchas enzimas, pero su concentración debe ser regulada para impedir la generación de otras especies reactivas de oxígeno. De esto se encargan dos enzimas: catalasa (**Reacción 2.1**) y glutatión peroxidasa (**Reacción 2.2**), que catalizan la transformación del peróxido de hidrógeno a agua.



El radical superóxido y el peróxido de hidrógeno participan en la producción de otra especie de oxígeno reactivo mediante la conocida reacción de Haber-Weiss, el radical hidroxilo (OH^{\cdot}) (Stadtman y Berlett, 1991). En este proceso el anión superóxido actúa como un agente reductor donando un electrón a iones metálicos como el ión férrico Fe^{3+} y el Cu^{2+} (**Reacción 3.1**). El ión ferroso (Fe^{2+}) formado cataliza la ruptura hemolítica del peróxido de hidrógeno, generando un radical hidroxilo (OH^{\cdot}) y un ión hidróxido (OH^-) (**Reacción 3.2**). Adicionalmente, el OH^{\cdot} se genera mediante la reacción de Fenton, la cual también requiere de la presencia de metales como catalizadores. El radical OH^{\cdot} es considerado como el más reactivo en los sistemas biológicos.



Finalmente, el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), puede generarse cuando uno de los dos electrones libres captan energía. De esta forma, pasan su energía de excitación a uno de los electrones desapareados del O_2 los que cambian su sentido de giro, apareándose con el otro electrón. El $^1\text{O}_2$, es un potente oxidante capaz de reaccionar con diferentes moléculas (Hansberg, 2002).

4.2 ROS no radicales

En este grupo se incluye al peróxido de hidrogeno (H_2O_2), el cual se forma *in vivo* por transformación espontánea del $\text{O}_2^{\cdot-}$, o bien, por acción enzimática (superóxido dismutasa, glucosa oxidasa, diaminoácido oxidasa y otras oxidasas). A bajas concentraciones el H_2O_2 es poco reactivo, sin embargo a altas concentraciones interactúa con los sistemas generadores de energía y los inactivan. El efecto más nocivo del H_2O_2 es la formación de OH^{\cdot} catalizado por metales de transición. El H_2O_2 se elimina por la acción de la catalasa y de la peroxidasa (Gil del Valle, 1999).

4.3 Sistema de defensa antioxidante

La respuesta celular frente al estrés oxidativo incluye la activación de un sistema de defensa denominado antioxidante. Los antioxidantes son capaces de capturar los radicales libres, reducir las reacciones en cadena y estabilizar los electrones libres. Los agentes antioxidantes interactúan como una red cooperativa para disminuir el daño oxidativo. Este sistema de defensa está dado por mecanismos enzimáticos y no enzimáticos a través de los cuales la célula anula la reactividad y/o inhibe la generación de radicales libres. El rol de los antioxidantes en la célula es impedir la generación de radicales de oxígeno o interceptar cualquier radical que ha sido generado. Dentro de estos últimos, se destacan dos amplios grupos: antioxidantes no enzimáticos y antioxidantes enzimáticos.

4.3.1 Antioxidantes no enzimáticos

Los microorganismos necesitan mantener un nivel intracelular reducido de ROS. Para esto poseen varios antioxidantes no enzimáticos tales como glutatión (GSH), β -caroteno, ácido ascórbico y α -tocoferol (Sies, 1997). Se ha observado que en presencia de antioxidantes en el medio, diversas bacterias son más resistentes frente a los intermediarios reactivos de oxígeno. Por ejemplo, la bacteria Gram negativa *Haemophilus influenzae* (Vergauwen *et al.*, 2003) es incapaz de producir GSH. Sin embargo, por importación de GSH del ambiente adquiere el metabolismo funcional de GSH, ayudando a la bacteria a defenderse del estrés oxidativo. En *Lactococcus lactis* la adición de GSH al medio permitió que la bacteria presente tolerancia a la exposición a H_2O_2 (Li *et al.*, 2003).

4.3.2 Antioxidantes enzimáticos

El sistema de protección frente a ROS en bacterias más estudiado ha sido la eliminación de los radicales por enzimas antioxidantes (Bai *et al.*, 2003). Se han descrito cuatro clases principales de enzimas antioxidantes en células microbianas: superóxido dismutasa (Sod), catalasa (Kat), glutatión peroxidasa (Gpx) y alquilo hidroperóxido reductasa (AhpC).

La **superóxido dismutasa** es una metaloproteína que juega un rol importante en la protección frente al estrés oxidativo, catalizando la reacción de O_2^- a H_2O_2 (Fridovich, 1997). Este tipo de enzimas se clasifica por el tipo de metal que utilizan como cofactor en: hierro Sod (Fe-Sod), manganeso Sod (Mn-Sod) y cobre-zinc Sod (CuZn-Sod). La acción más importante de estas enzimas es la protección indirecta del radical OH^\cdot . Además protege del daño directo causado por el O_2^- (Keyer e Imlay, 1996).

La **catalasa** es una enzima ubicua que protege a los organismos aerobios de los efectos tóxicos del H_2O_2 , catalizando la conversión de H_2O_2 a O_2 molecular y H_2O (Halliwell y Gutteridge, 1986). Las catalasas se clasifican en tres grupos: la catalasa monofuncional (KatE), la catalasa bifuncional con actividades catalasa/peroxidasa (KatG) (Jung y Kim, 2003) la catalasa que está asociada al manganeso (Peacock, 2008).

La **glutatión peroxidasa** ha sido ampliamente estudiada en eucariotas y funciona como la defensa más importante frente a H_2O_2 y peróxidos orgánicos. Sin embargo, existen pocos estudios en organismos procariontes. En *Streptococcus pyogenes* la glutatión peroxidasa tendría actividad frente a un amplio rango de sustratos incluyendo H_2O_2 , peróxido orgánico y peroxinitritos (Brenot *et al.*, 2004).

La **alquilo hidroperóxido reductasa** es un sistema de dos componentes, caracterizado como un sistema protector que funciona para reducir hidroperóxidos orgánicos (Jacobson *et al.*, 1989) y peróxido de hidrógeno (Niimura *et al.*, 1995). La subunidad grande (AhpF) transfiere electrones desde NADH a la subunidad pequeña (AhpC). La subunidad AhpC en su sitio activo puede acomodar virtualmente, cualquier radical hidroperóxido y peróxido de hidrógeno. Se ha descrito que esta enzima sería más eficiente en la eliminación de H₂O₂ que la catalasa (Costa e Imlay, 2001). En estudios de sobreexpresión de esta enzima en bacterias se ha demostrado su rol protector frente a los intermediarios de nitrógeno reactivo (Loprasert *et al.*, 2003). AhpC puede actuar como una chaperona molecular en *Helicobacter pylori*. Cuando se produce un ataque intracelular por ROS en esta bacteria en un tiempo corto, AhpC reacciona inmediatamente para contrarrestar los radicales de oxígeno y peróxidos generados. Sin embargo, durante un periodo de estrés oxidativo prolongado o demasiado severo, produciendo una cantidad importante de proteínas dañadas, la AhpC podría actuar como chaperona molecular para prevenir el mal plegamiento de las proteínas (Chuang *et al.*, 2006). La inducción del gen *ahpC* es frecuentemente gatillado por estrés ambiental. Esta inducción es dependiente del factor de transcripción OxyR (Mongkolsuk *et al.*, 2000; Ochsner *et al.*, 2000; Storz *et al.*, 1989; 1990).

4.4 Regulación de las defensas antioxidantes

En los últimos años, la regulación redox (oxidación-reducción) se ha reconocido como un importante mecanismo de control de actividades celulares, donde los sensores redox son factores de transcripción que regulan y detectan los niveles de agentes oxidantes, tales como peróxido de hidrógeno, superóxido, óxido nítrico y otros (Zheng *et al.*, 1998; Ding y Demple, 2000).

Numerosas investigaciones realizadas en *E.coli* y en *Salmonella serovar enterica Typhimurium* señalan que la respuesta al daño oxidativo está regulada por OxyR. Esta proteína es un factor de transcripción que regula la expresión de los genes que integran el regulón *oxyR*, en respuesta a elevados niveles de agentes oxidantes como peróxido de hidrógeno (Zheng *et al.*, 2000). Este regulón incluye aproximadamente ocho a diez genes (Tabla 1) (Zheng *et al.*, 1999, Zheng 2000; Pomposiello, *et al.*, 2001). En *E. coli* la proteína OxyR se presenta en dos conformaciones: oxidada y reducida. La oxidación de OxyR por H₂O₂, forma enlaces disulfuro en OxyR, lo que produce su activación como factor

transcripcional. Sólo la forma oxidada de OxyR es capaz de unirse a los promotores de los genes del regulón *oxyR* activando así su trascrición (Zheng, *et al.*, 2000).

Por otro lado, el exceso de O₂^{•-} y óxido nítrico son sensores por SoxRS generando compuestos que tienen roles en la defensa frente al estrés oxidativo (Tabla 1). El regulón *soxRS* modula la expresión de más de 16 genes de respuesta a este tipo de estrés (Pomposiello *et al.*, 2001; Spek *et al.*, 2001). Además, confiere resistencia a los antibióticos, a solventes orgánicos y a metales pesados (Zheng y Storz, 2000).

Tabla 1. Genes y actividades involucrados en el estrés oxidativo en *Escherichia coli* (Adaptado de Storz y Zheng, 2000).

Gen	Actividad
Regulón <i>oxyR</i>	
<i>katG</i>	Hidroperóxido I
<i>ahpC</i>	Alquilo hidroperóxido reductasa
<i>gorA</i>	Glutación reductasa
<i>grxA</i>	Glutaredoxina I
<i>trxC</i>	Tioredoxina
<i>fur</i>	Represor de captación de ión férrico
<i>dpsA</i>	Proteína de unión al DNA inespecífica
<i>oxyS</i>	RNA regulatorio
Regulón <i>soxRS</i>	
<i>sodA</i>	Superóxido dismutasa unida a Mn
<i>nfo</i>	Endonucleasa IV
<i>zwf</i>	Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa
<i>fumC</i>	Fumarasa C
<i>acnA</i>	Aconitasa A
<i>tolC</i>	Proteína de membrana externa
<i>fur</i>	Represor del consumo férrico
Actividades de otras defensas	
<i>katE</i>	Hidroperoxidasa II
<i>xthA</i>	Exonucleasa III
<i>polA</i>	DNA polimerasa I
<i>recA</i>	RecA
<i>hslO</i>	Chaperona molecular
<i>sodB</i>	Superóxido dismutasa
<i>sodC</i>	Superóxido dismutasa cobre-zinc

5. Estudios proteómicos microbianos

Los avances en los métodos bioinformáticos, junto con las tecnologías genómicas y proteómicas han revelado que es posible abordar el estudio del complejo funcionamiento de los genes de un organismo. Sin embargo, aún se desconoce la función biológica de muchas de las proteínas codificadas por estos genes. La proteómica, surge como un complemento de la genómica constituyendo una poderosa herramienta en el análisis funcional de genes con función desconocida. El término proteómica se ha asociado tradicionalmente con la separación de un gran número de proteínas de una célula u organismo mediante la tecnología de 2D-PAGE, descrito en principio por O'Farrell (1975). La proteómica de expresión se ha definido como el estudio cuantitativo y cualitativo de la síntesis de proteínas entre muestras que difieren en alguna variable (Graves y Haystead, 2002). Este método ha sido fundamental para el estudio de la síntesis de proteínas en diversos microorganismos expuestos a diferentes estímulos o situaciones de estrés (Neidhardt y VanBogelen, 2000; Krayl *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2003; Mostertz *et al.*, 2004; Martínez *et al.*, 2007).

Los microorganismos frente a cambios favorables son capaces de acelerar el crecimiento como resultado de la represión de proteínas redundantes y el aumento de la síntesis de componentes esenciales para la célula. En cambio, en condiciones adversas (presencia de algún compuesto tóxico, estrés oxidativo, estrés térmico) desvían recursos para mantener su crecimiento y sintetizar proteínas que contrarrestan o remuevan la condición estresante, reparando cualquier daño producido (Neidhard y vanBogelen, 2000). Por lo tanto, los cambios en el patrón de síntesis de proteínas dependen de la respuesta fisiológica de las bacterias frente a estímulos del medio ambiente. Es importante considerar que el proteoma de una bacteria o de una célula es dinámico y es el reflejo de la respuesta celular al medio ambiente en el que es estudiado. Como respuesta a estímulos internos o externos, las proteínas pueden ser modificadas post-traduccionalmente, translocadas, sintetizadas o degradadas (Graves y Haystead, 2002).

El análisis proteómico de los microorganismos puede proporcionar una visión global de los mecanismos involucrados en la respuesta adaptativa a compuestos químicos. La identificación de proteínas involucradas puede ayudar a elucidar mecanismos de defensa, detoxificación y adaptación (Krayl *et al.*, 2003).

Si bien, la mayoría de los compuestos PCBs son degradados por *B. xenovorans* LB400, estos compuestos son tóxicos para la bacteria, afectando su viabilidad celular (Agulló, 2006; Agulló *et al.*, 2007). La construcción de bacterias recombinantes, para

aumentar la tolerancia al estrés, facilitaría el buen funcionamiento de los organismos degradadores bajo condiciones adversas (Timmis *et al.* 1994). En esta Tesis se propone la generación de bacterias recombinantes tolerantes al estrés oxidativo, que ayudaría a mejorar la sobrevivencia de *B. xenovorans* LB400 capaz de biodegradar compuestos tóxicos y recalcitrantes como los PCBs. En este proyecto de Tesis se planteó la siguiente hipótesis:

II. HIPÓTESIS

“*Burkholderia xenovorans* LB400 posee una excepcional versatilidad catabólica de compuestos aromáticos. El metabolismo aerobio del compuesto aromático bifenilo en la cepa LB400 genera una situación de estrés oxidativo, por lo que la sobreexpresión de genes que codifican proteínas de defensa a este estrés, permitirá aumentar la tolerancia a esta condición.

III. OBJETIVOS

Objetivos generales

- Reconstruir el metabolismo de compuestos aromáticos en *B. xenovorans* LB400 mediante análisis *in silico* de su genoma.
- Estudiar la respuesta de *B. xenovorans* LB400 frente al compuesto aromático bifenilo y sobreexpresar genes de defensa al estrés oxidativo, para aumentar la tolerancia a este tipo de estrés.

Objetivos específicos

1. Identificar rutas periféricas y centrales de degradación de compuestos aromáticos codificadas en el genoma de *B. xenovorans* LB400.
2. Caracterizar la respuesta de *B. xenovorans* LB400 frente al compuesto aromático modelo bifenilo, mediante estudios fisiológicos y proteómicos.
3. Generar cepas bacterianas recombinantes que sobreexpresan genes que codifican proteínas de defensa al estrés oxidativo.
4. Caracterizar las cepas bacterianas recombinantes mediante estudios fisiológicos, enzimáticos y de degradación y proteómicos.

II MATERIALES Y MÉTODOS

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Reactivos

Los compuestos aromáticos benzoato, 3-hidroxibenzoato, 4-hidroxibenzoato, fenilalanina, tirosina, triptofano, protocatecuato, catecol, resorcinol, gentisato, L-mandelato, citrato, succinato, cis-cis muconato, muconato, ftalato, galato, hidroxiquinol, 2-hidroxibenzoato (salicilato), 3-hidroxibenzoato, 2,3-dihidroxibenzoato, 2-aminobenzoato (antranilato), 2-hidroxifenilacetato, fenol, benceno, m-cresol, ferulato, vanilato, 3-CBA, 3,5-CBA, 3,4-CBA, 2-CBA, 4-CBA, fluoreno, estireno, anilina y bifenilo se adquirieron de Merck (Darmstadt, Alemania) y Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA).

El β -mercaptoetanol se obtuvo de J.T. Baker (Phillipsburg, USA); azul de bromofenol, acrilamida 99 %, TEMED 99 %, IGEPAL CA-630, Ribonucleasa A, DNAsa I y azul de Coomassie (Brilliant Blue R) se adquirieron de Sigma (Steinheim, Alemania); SDS, bisacrilamida, persulfato de amonio, urea, acrilamida ultra pura 99,9 %, IPTG, anfolitos Bio-Lyte de pH 5-7 y anfolitos Bio-Lyte de pH 3-10 se obtuvieron de Bio Rad (Hercules, USA).

Las enzimas de restricción y los marcadores de peso molecular (1 kb DNA ladder, 100 bp DNA ladder, Lambda DNA/*Eco911* y ϕ X174DNA/*BsuRI*) fueron suministradas por Fermentas (Madison, USA). Las enzimas T4 ADN ligasa y T4 ADN polimerasa se adquirieron en Invitrogen (Carlsbad, USA). La enzima *AmpliTaq*[®] DNA polimerasa se obtuvo de Applied Biosystems y la DNA polimerasa *Pfu* se adquirió en Biotools, B & M Labs S.A. (Madrid, España).

2. Cepas bacterianas y plásmidos

Las cepas bacterianas utilizadas en esta Tesis se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2. Cepas bacterianas utilizadas en esta Tesis

<i>Cepa</i>	<i>Genotipo/fenotipo relevante</i>	<i>Referencia</i>
<i>Burkholderia xenovorans</i> LB400	Cepa silvestre	Bopp, 1986
<i>E. coli</i> DH10B	F ⁻ , <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>dlac</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 deoR recA1</i> <i>araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK</i> λ <i>rpsL endA1 nupG</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> DH5α	(φ80 <i>lacZ</i> ΔM15) <i>endA1 recA1 hsdR17</i> (<i>r_K⁻ m_K⁻</i>) <i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i>	Sambrook y Russell, 2001
<i>E. coli</i> S17-1λ <i>pir</i>	Tp ^f Sm ^r <i>recA thi hsdRM</i> RP4::2- Tc::Mu::Km Tn7 λ <i>pir</i> lisogénico	De Lorenzo y Timmis, 1994

Los plásmidos utilizados en este trabajo se indican en la Tabla 3.

Tabla 3. Plásmidos utilizados en esta Tesis

<i>Plásmido</i>	<i>Descripción</i>	<i>Referencia</i>
pK18 <i>mob</i>	Vector de clonación suicida para la construcción de mutantes por recombinación homóloga. Km ^r , <i>oriColE1</i> , Mob ⁺ , <i>lacZα</i>	Schafer <i>et al.</i> , 1994
pKahpC	Vector pK18 <i>mob</i> que contiene un fragmento interno del gen <i>ahpC5</i> . Km ^r	Esta Tesis
pKsodB	Vector pK18 <i>mob</i> que contiene un fragmento interno del gen <i>sodB2</i> . Km ^r	Esta Tesis
pKHslU	Vector pK18 <i>mob</i> que contiene un fragmento interno del gen <i>hslU</i> 6Km ^r	Esta Tesis
pKoxyR	Vector pK18 <i>mob</i> que contiene un fragmento interno del gen <i>oxyR5</i> . Km ^r	Esta Tesis
pKcyoB	Vector pK18 <i>mob</i> que contiene un fragmento interno del gen <i>cyoB1</i> . Km ^r	Esta Tesis
pIZ1016	Vector de clonación de amplio espectro de huésped, Gm ^r <i>ori</i> pBBR1MCS Mob ⁺ , <i>lacZα</i> , <i>Ptac/lacI^f</i>	Moreno-Ruiz <i>et al.</i> , 2003
pIZsodB	Vector pIZ1016 que contiene el gen <i>sodB</i> . Gm ^r . Para sobreexpresión y complementar cepa mutante.	Esta Tesis

pIZahpCF	Vector pIZ1016 que contiene los genes <i>ahpCF</i> . Gm ^r . Para sobreexpresión y complementar cepa mutante.	Esta tesis
pIZoxyR	Vector pIZ1016 que contiene el gen <i>oxyR</i> . Gm ^r . Para sobreexpresión y complementar cepa mutante.	Esta tesis
pIZhslU	Vector pIZ1016 que contiene el gen <i>hslU</i> . Gm ^r . Para sobreexpresión y complementar cepa mutante.	Esta tesis

3. Medios y condiciones de cultivo

Para los cultivos de *Escherichia coli* y *Burkholderia xenovorans* LB400 se utilizaron diferentes medios de cultivos cuya composición se detalla a continuación. Las soluciones y los medios de cultivo se esterilizaron por calor húmedo en un autoclave o mediante filtración (filtros Millipore de 0,2 μ de diámetro).

3.1 Medios de cultivo empleado para *Escherichia coli*

El medio enriquecido empleado fue Luria-Bertani (LB) (Sambrook y Russel, 2001). Los cultivos de *E. coli* en medio sólido se realizaron en medio LB suplementado con agar al 1,5 % (p/v). Se agregó 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-Gal) (0,08 mM) a la placa, cuando fue necesario.

El medio mínimo empleado en este trabajo para *E. coli* fue el medio M63 (Miller, 1972), al que se agregó agar al 1,5 % (p/v) para los crecimientos en medio sólido. Cuando se requirió, se utilizaron los antibióticos a las concentraciones que se indican más adelante.

3.2 Medios de cultivo empleados para *B. xenovorans* LB400

El medio enriquecido empleado para *B. xenovorans* LB400 fue el medio LB (Sambrook *et al.*, 1989). Para los cultivos en medios sólido, el medio LB se suplementó con agar al 1,5 % (p/v).

El medio mínimo empleado en este trabajo para cultivar la cepa de *B. xenovorans* LB400 está basado en el medio mineral M9 (Sambrook *et al.*, 1989), cuya composición se detalla a continuación:

Na_2HPO_4	50 mM
KH_2PO_4	22 mM
NaCl	85 mM
NH_4Cl	7,5 mM

Este medio basal (pH=7.0), fue suplementado con una solución de elementos trazas, cuya composición se detalla a continuación:

Solución A (50 ml):

$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,5375 g
CaCO_3	0,1 g
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,0424 g
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,0140 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2250 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,0720 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,0125 g
H_3BO_3	0,0030 g
HCl (37%)	2,565 ml

Solución B:

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1M
---	----

Solución C:

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	36 mM
---	-------

Las soluciones A y B se autoclavaron y se guardaron a 4 °C. La solución C se esterilizó por filtración y se mantuvo congelada a -24 °C.

Para 1 l de este medio mineral se utilizaron las siguientes soluciones: 100 ml de medio mínimo M9 (10x); 2,5 ml de solución A: B: C (2:1:1). Este medio se suplementó con glucosa (5 mM) o bifenilo (5 mM) como fuente de carbono y energía. Cuando se requirió, se utilizaron los antibióticos a las concentraciones que se indican a continuación.

3.3 Antibióticos

Los antibióticos se prepararon en soluciones 1000X en agua. Estas soluciones se esterilizaron por filtración y se almacenaron a -20 °C. Los antibióticos se utilizaron en las concentraciones finales que se indican.

Kanamicina(Km)	50 µg/ml
Bacitracina	200 UI/ml
Gentamicina(Gm)	10 µg/ml
Polimixina B	200 UI/ml

3.4 Condiciones de cultivo

Las cepas de *E. coli* y *B. xenovorans* LB400 se cultivaron a 37 °C y a 30 °C, respectivamente. En cultivos líquidos se empleó una agitación orbital fuerte (250 rpm).

Para los cultivos con compuestos aromáticos como fuente de carbono, éstos fueron agregados al medio mineral M9 a una concentración de 0,5, 2, 5 y 10 mM. Se emplearon los siguientes compuestos aromáticos: benzoato, 3-hidroxibenzoato, 4-hidroxibenzoato, fenilalanina, tirosina, triptofano, protocatecuato, catecol, resorcinol, gentisato, L-mandelato, citrato, succinato, cis-cis muconato, muconato, ftalato, galato, hidroxiquinol, 2-hidroxibenzoato (salicilato), 3-hidroxibenzoato, 2,3-dihidroxibenzoato, 2-aminobenzoato (antranilato), 2-hidroxifenilacetato, fenol, benceno, m-cresol, ferulato, vanilato, 3-CBA, 3,5-CBA, 3,4-CBA, 2-CBA, 4-CBA, fluoreno, estireno y anilina. Estos análisis fueron realizados en colaboración con la bioquímica Loreine Agulló. El crecimiento de los cultivos fue determinado midiendo la turbidez a 525 nm empleando un espectrofotómetro Perkin Elmer lambda 11.

3.5 Conservación de las cepas bacterianas

Durante cortos periodos de tiempo (una semana) la cepa LB400 se conservó a 4 °C en placas de medio LB-agar. *E. coli* se conservó en el mismo medio por más tiempo (aproximadamente tres semanas). Para su conservación a largo plazo, las bacterias se congelaron en el medio de cultivo correspondiente, con glicerol al 15% (v/v) y se mantuvieron a -25 °C.

4. Efecto de la exposición a bifenilo sobre la viabilidad celular

La cepa LB400 se creció en medio LB en un agitador orbital termoregulado a 30 °C durante la noche hasta obtener un cultivo en fase estacionaria con alta biomasa. Un inóculo de este cultivo fresco (1 %) se transfirió a 30 ml de medio mineral M9 con glucosa (5 mM) como control y con bifenilo (2 mM). Como indicador de estrés oxidativo en todos los casos se utilizó un control positivo de H₂O₂ (0,2 y 0,6 mM.) Para monitorear el crecimiento de la bacteria se midió turbidez del cultivo. Adicionalmente, se tomaron alícuotas para determinar las Unidades Formadoras de Colonia (UFC). Se tomó una alícuota de 100 µl de cultivo a los 60 y 120 min. Con esta alícuota se realizaron diluciones seriadas y se plaqueó 100 µl en placas Petri con medio LB-agar. Las bacterias se incubaron en una estufa a 30 °C por 3 d, para determinar las UFC/ml.

5. Determinación de las especies reactivas de oxígeno (ROS)

Para los ensayos de medición de especies reactivas de oxígeno (ROS), *B. xenovorans* LB400 creció en medio mínimo M9 empleando glucosa (5 mM) o bifenilo (5 mM) como única fuente de carbono hasta su fase exponencial temprana (turbidez₅₂₅ de 0,2-0,3). Luego, las bacterias fueron transferidas a tubos de 5 ml que contenían bifenilo 5 mM, H₂O₂ 0,05 mM, CdCl₂ 200 µg/ml o metil viológeno 100 mg/ml. Las células se incubaron y se mantuvieron con agitación por 30 min a 30 °C. Posteriormente, las bacterias (1 ml) se lavaron con tampón fosfato 10 mM pH 7,0 e incubadas con la sonda H₂DCF-DA disuelta en dimetil sulfóxido (DMSO) a una concentración final de 5 µM por 50 min en oscuridad. Se determinó la intensidad de fluorescencia, a intervalos de 2 min durante 32 min utilizando un citofluorímetro Applied Biosystems Citofluor 4000 Florescence Multi-well Plate Reader (excitación 490 nm; emisión 519 nm).

6. Ensayo de reducción de nitroazul de tetrazolium (NBT)

Para determinar el superóxido intracelular se utilizó el ensayo de reducción de la sal nitroazul de tetrazolium. Para ello, se emplearon células crecidas en medio M9 con glucosa (5 mM) como fuente de carbono. Las células se cultivaron a 30 °C, hasta alcanzar la turbidez de 1,8. Las bacterias se concentraron (10x) y se suspendieron en 200 µl de tampón fosfato. Se incubaron con bifenilo (1 mM), paraquat (metil viológeno 0,75 mM) y tampón fosfato como

control. Se le adicionó 0,5 ml de NBT (1 mg/ml) y se incubó por 60 min a 37 °C. La reacción se detuvo con 0,1 ml de HCl (0,1 M) y los tubos se centrifugaron a 1.500 x g por 10 min para separar las células del sobrenadante. Las células se trataron con 0,4 ml de dimetilsulfóxido (DMSO), para extraer el NBT. Luego se adicionó 0,8 ml de tampón fosfato. El azul de formazán producido se determinó midiendo en el espectrofotómetro la absorbancia a 575 nm (Albesa *et al.*, 2004).

7. Búsqueda *in silico* de genes de estrés oxidativo y de vías catabólicas para compuestos aromáticos en el genoma de *B. xenovorans* LB400

La búsqueda de las secuencias aminoacídicas de proteínas de respuesta a estrés oxidativo y enzimas claves de cada vía catabólica de compuestos aromáticos se realizó a través del servidor National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>) o del Expasy (<http://us.expasy.org/sprot/>). El alineamiento de estas secuencias con el genoma completo de *B. xenovorans* LB400 (<http://genome.ornl.gov/microbial/bfun/>) se realizó empleando los algoritmos BLASTN y TBLASTN. Para la búsqueda de los posibles marcos de lectura abierta (ORF) con un mínimo de 50 codones se utilizó el software Vector NTI suite 9.0. Las secuencias de aminoácidos de los ORFs se compararon con las bases de datos existentes en el NCBI utilizando el algoritmo BLASTP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Se anotaron en el genoma los genes de las proteínas que entregaron una alta identidad con proteínas de organismos que presentan un respaldo bioquímico y se descartaron todas las proteínas hipotéticas, probables y COGs. Para algunos casos donde se dispuso de los sustratos, se realizó un ensayo de crecimiento con estos compuestos como única fuente de carbono.

8. Análisis del perfil de proteínas mediante electroforesis monodimensional en geles de poliacrilamida-SDS (PAGE-SDS)

8.1 Soluciones para geles mono y bi-dimensionales

- (A) Solución Stock de IGEPAL CA-630 al 10% p/v
- (B) Buffer de lisis: Urea 9,5 M, IGEPAL CA-630 al 2% v/v, anfolitos al 2% (1,6% de anfolitos pH 5-7, 0,4% de anfolitos pH 3-10) y β -mercaptoetanol al 5%.
- (C) Buffer de sonicación: Tris-HCl 0,01M (pH 7,4), MgCl₂ 5 mM y RNasa pancreática 50 μ g/ml

- (D) Solución madre de DNAsa I: 1 mg/ml de DNAsa I en Tris-HCl 0,01 M (pH 7,4) y MgCl₂ 1 mM
- (E) Solución de persulfato de amonio (APS) 10%: APS 0,1 g/ml
- (F) Solución de sobrecapa: Urea 9 M y anfolitos al 1% (80 µl anfolitos pH 5-7 y 20 µl anfolitos pH 3-10)
- (G) Buffer de muestra SDS: Tris-HCl 0,0625 M (pH 6,8), SDS 2%, glicerol 10%, β-mercaptoetanol 5%
- (H) Buffer de muestra: Tris-HCl 0,0625 M (pH 6,8), SDS 2%, glicerol 10%, β-mercaptoetanol 5% y azul de bromofenol 0,001%
- (I) Solución del cátodo: H₃PO₄ 0,01 M
- (J) Solución del ánodo: NaOH 0,02 M
- (K) Solución de Acrilamida 30% (NEPHGE): Acrilamida ultra pura 28,38% p/v y Bisacrilamida 1,62%
- (L) Solución de acrilamida 30% para geles con SDS: Acrilamida 29,18% y Bisacrilamida 0,82%
- (M) Buffer para gel de corrida: Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8) y SDS 0,4%
- (N) Buffer para el gel concentrador: Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8) y SDS 0,4%
- (O) Buffer de corrida: Tris-glicina 0,025 M y SDS 0,4%
- (P) Solución de teñido: Metanol 50% v/v, ácido acético 7% v/v y Azul de Coomassie 0,2% p/v
- (Q) Solución de desteñido: Metanol 20% v/v y ácido acético 7% v/v

8.2 Preparación de la muestra

Los cultivos de las cepas recombinantes de *B. xenovorans* (LB400pI_{ZoxyR} LB400pI_{ZsodB} y LB400pI_{ZahpC}) se cultivaron en medio mineral M9 con glucosa (5 mM) y bifenilo (5 mM) a 30 °C. Para la inducción de los genes de respuesta a estrés oxidativo se adicionó IPTG (0,4 mM) al cultivo crecido con una turbidez₅₂₅ de 0,2. Se incubaron durante 5 h y luego las células fueron colectadas por centrifugación (10.000 g por 10 min), lavadas con tampón fosfato de sodio 50 mM pH 7,4. Se determinó el peso húmedo de las células y se adicionó 100 µl de tampón de muestra por cada 5 mg de bacteria húmeda. Las células se hirvieron a baño maría por 5 min para romperlas y se congelaron a -20 °C hasta el momento de ser utilizadas.

8.3 Electroforesis monodimensional

La electroforesis monodimensional se realizó de acuerdo a la técnica de Laemmli con modificaciones (Seeger y Jerez, 1992). El gel concentrador se preparó al 4 % de acrilamida. El gel de corrida a 12,5% de acrilamida. La Tabla 4, muestra la preparación para un gel de poliacrilamida-SDS (volumen en ml).

Tabla 4. Preparación de gel de poliacrilamida-SDS para electroforesis monodimensional

	Gel Concentrador (4%)	Gel Corrida (12,5%)
Agua	4,89 ml	5,403 ml
Glicerol 50%	-----	1,8 ml
Tampón para el gel concentrador	1,87ml	-----
Tampón para el gel de corrida	-----	5 ml
Acrilamida/bisacrilamida 30 %	0,75 ml	9,807 ml
Persulfato de Amonio (PSA) 10 %	0,024 ml	0,074 ml
N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamina (TEMED)	0,0075 ml	0,006 ml

La electroforesis se realizó aplicando un voltaje de 400 V por 6,5 h. Los geles se equilibraron durante 1 h en tampón de muestra-SDS. Las proteínas se visualizaron por tinción de los geles con Coomassie brilliant blue R-250 y se secaron con calor.

9. Análisis del proteoma mediante electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida

9.1 Preparación de la muestra

Las cepas de *B. xenovorans* LB400 se cultivaron en medio mineral M9 con glucosa (5 mM) y con bifenilo (5 mM) como única fuente de carbono y energía a 30 °C. Cuando fue requerido, al cultivo crecido hasta una turbidez ₅₂₅ de 0,2 se agregó IPTG a una concentración de 0,4 mM y se incubó durante 5 h. Los cultivos en fase exponencial tardía (turbidez ₅₂₅ 0,6-0,8) se recolectaron por centrifugación (10.000 g por 10 min a 4 °C) y se lavaron 3 veces con tampón fosfato, NaH₂PO₄ (50 mM pH 7,4). Se determinó el peso húmedo de bacterias. 1 mg de bacteria se resuspendió en 100 µl de tampón de sonicación.

Para romper las células, se sometieron a ultrasonido (Misonix modelo XL200) 5 veces por 30 seg a una potencia de 6 W. Luego se adicionó DNAsal a una concentración final de 80 µg/ml manteniendo las muestras en hielo por 10 min. Las muestras fueron secadas al vacío (concentrador 5301, Eppendorf) durante 1 h y 30 min a 60 °C. 0,1 mg de proteínas fueron resuspendidos en 30 µl tampón de lisis, que luego fueron cargados en la primera dimensión. Para determinar la concentración total de proteínas se utilizó 10 µl de cada muestra y se midió en el equipo Qubit™ fluorometer. Se utilizó aproximadamente 0,23 mg de proteína.

9.2 Primera dimensión

La electroforesis bidimensional con geles en condiciones de no-equilibrio de pH (NEPHGE) se realizó como describe O'Farrell *et al.* con modificaciones (O'Farrell *et al.* 1977; Agulló *et al.*, 2007). Para la primera dimensión se utilizó un gradiente de pH 3-10. La mezcla para 6 geles de primera dimensión contiene 2,06 g de urea, 850 µl de H₂O, 750 µl de la solución de IGEPAL CA-630 al 10 %, 500 µl de acrilamida 30 % y 125 µl de anfolitos con un rango de pH entre 3 y 10, 10 µl de persulfato de amonio 10 % y 7,5 µl de TEMED. Se llenaron los tubos (125 mm por 2,5 mm de diámetro) hasta una altura de 11 cm. Se cargaron 30 µl de la muestra (0,2 mg de proteínas) en cada tubo, se cubrió la muestra con 10 µl de solución de sobrecapa y el resto del tubo se llenó con H₃PO₄ 0,01 M. La parte inferior de la cámara de electroforesis se llenó con solución de NaOH 0,02 M (ánodo), la parte superior con solución de H₃PO₄ 0,01M (cátodo). La electroforesis se realizó aplicando un voltaje de 400 V por 6,5 h.

9.3 Segunda dimensión

Para la segunda dimensión se utilizó geles de poliacrilamida con SDS según el protocolo descrito por O'Farrell con modificaciones (Seeger *et al.*, 1996; Agulló *et al.*, 2007).

A. Gel concentrador al 4,5 %: 3 ml agua, 1,25 ml de solución tampón para gel concentrador, 0,75 ml de solución de acrilamida al 30 % p/v, 0,015 ml persulfato de amonio al 10 % p/v y 0,01 ml TEMED 99 %.

B. Gel separador al 11 %: 7 ml agua, 0,4 ml glicerol 50 % v/v, 5 ml de la solución tampón para gel separador, 7,65 ml de solución de acrilamida al 30 % p/v, 0,074 ml persulfato de amonio al 10 % p/v y 0,006 ml de TEMED.

El gel de la primera dimensión (NEPHGE) se cargó sobre el gel de la segunda dimensión. La segunda dimensión se corrió a 50 V hasta que el frente indicador con azul de bromofenol sale del gel. Las proteínas son visualizadas por tinción de los geles con Coomassie Brilliant blue R-250. Los geles se secaron utilizando el Gel Dryer, Model 583 Bio-Rad.

9.4 Determinación de los niveles relativos de proteínas

Para determinar el volumen (Intensidad x mm²) de cada proteína se utilizó el *software* Quantity One (BioRad). Los resultados de cada proteína se normalizaron utilizando una proteína que se mantuvo invariable en todas las condiciones (crecimiento en bifenilo, crecimiento en glucosa y con todas las cepas recombinantes). Los resultados de la cuantificación de proteínas son representativos de al menos tres experimentos independientes.

9.5 Secuenciación e identificación de proteínas

Para determinar la secuencia aminoacídica del extremo N-terminal de las proteínas se utilizó la degradación de Edman con un secuenciador *Applied Biosystem model 494A Procise* HT. Las proteínas separadas mediante electroforesis 2-D fueron transferidas a membranas de polivinilideno difluoruro (PVDF) por un sistema de electrotransferencia (*Trans blot cell*, BioRad). Para el análisis de espectrometría de masa, las proteínas se separaron de los geles y se prepararon según lo descrito (Heim *et al.* 2002, Agulló *et al.*, 2006, Martínez *et al.*, 2007). La digestión de las proteínas fue realizada con tripsina (2 µg mL⁻¹). El extracto de péptidos se eluyó directamente de las microcolumnas ZipTip con ácido α-ciano-4-hidroxycinámico y se analizó con una técnica de ionización suave utilizada en espectrometría de masas denominada MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-Of-Flight*, desorción/ionización láser asistida por matriz). Estos análisis fueron realizados en Centre for Infection Research HHZI, Braunschweig, Alemania.

Las secuencias peptídicas obtenidas por microsecuenciación de Edman se utilizaron para buscar las secuencias completas de proteínas en el genoma de *B. xenovorans* LB400 en la página <http://genome.ornl.gov/microbial/bfun/>. Los datos peptídicos obtenidos por espectrometría de masa MALDI-TOF se utilizaron para buscar en la base de datos de proteínas del NCBI con la herramienta de búsqueda Matrix science MASCOT (<http://www.matrixscience.com>). Al igual que la microsecuenciación las secuencias obtenidas se utilizaron para realizar la búsqueda en el genoma de la cepa LB400. Las secuencias peptídicas completas obtenidas de cada proteína fueron ingresadas en el programa de comparación con bases de datos FASTA desarrollado por el European Bioinformatic Institute (<http://www.ebi.ac.uk>) para obtener la identificación final y los datos de similaridad. Para estimar el punto isoeléctrico y la masa molecular de las proteínas se utilizó la herramienta pI/MW disponible en ExPasy (http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html). Las proteínas fueron numeradas arbitrariamente y encerradas en un recuadro. Las proteínas Bph fueron designadas con letras mayúsculas.

10. Ensayos enzimáticos

10.1 Preparación del extracto crudo

La preparación del extracto crudo se realizó de acuerdo a lo descrito por Lefebvre y Valvano (2001). Se centrifugaron 30 ml de cultivo a 7.000 *g* por 10 min. Las células se lavaron con tampón fosfato de sodio 0,05 M refrigerado (pH 7,0) y se resuspendieron en 3 ml de tampón fosfato de sodio 0,005 M suplementado con 0.1 % de DTT. Las células se mantuvieron en hielo y se lisaron utilizando un sonicador empleando cinco pulsos de 30 seg. El lisado se centrifugó a 12.000 x *g* por 5 min. El sobrenadante se guardó a -20 °C en 50 % (p/v) de glicerol.

10.2. Ensayo de actividad enzimática catalasa (CAT)

Se determinó en base a la cinética de degradación del peróxido de hidrógeno (Hidalgo *et al.*, 2006). La cinética se siguió A_{240} . Para ello, se preparó un blanco con 3 ml de tampón fosfato pH 7,0. Para la muestra problema se tomó 5 μ l de muestra, 95 μ l de H_2O_2 0,3 M y 2,9 ml de tampón fosfato. Se midió cada 15 seg por un periodo de 2 min.

11. Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs).

La determinación del TBARs se hizo de acuerdo al método espectrofotométrico descrito por Gutteridge y Halliwell (1990). Este método está basado en la reacción del ácido tiobarbitúrico (TBA) con el grupo aldehído del compuesto malonaldehído, formando un aducto (TBA-MDA) cromóforo rosado con un máximo de absorción a 535 nm. Para ello, se mezcló 1 ml de ácido tricloroacético (30 % p/v) con 1 ml de muestra problema y se centrifugó durante 5 min a 10.000 g. Se tomó 1,5 ml del sobrenadante y se agregó a un tubo que contenía 1 ml de solución de ácido tiobarbitúrico (0,67 % p/v). Se calentó a baño maría a 100 °C durante 20 min. Luego las muestras se mantuvieron en hielo. Una vez frío, alícuotas de 1,5 ml se mezclaron con 1,5 de butanol y fueron centrifugadas a 4.000 g por 10 min. Se recuperó la fracción orgánica y se registró los valores de A_{535} . Se determinó el contenido de TBARs en las cepas recombinantes (LB400pIZoxyR, LB400pIZsodB, LB400pIZahpCF y LB400pIZ1016).

12. Técnicas de Biología Molecular

Las técnicas de biología molecular se realizaron esencialmente como ha sido descrito por Sambrook y Rusell (2001).

12.1 Aislamiento de ADN

La purificación de ADN plasmidial se realizó mediante el uso de *High Pure™ Plasmid Purification Kit* Roche (Barcelona, España) y *axyPrep™ Plasmid miniprep kit™* Axygen (California, USA).

12.2 Electroforesis de ADN en gel de agarosa

La muestra para electroforesis en gel de agarosa se preparó con 10 µl de suspensión de la muestra, una solución tampón (TE), glicerol, y azul de bromofenol. La muestra se colocó en el gel de agarosa (1-1.5 %) preparado con tampón de electroforesis (TAE 1X). En uno o más pocillos se agregó estándares de DNA de tamaño conocido (1 kb DNA ladder, 100 bp DNA ladder, Lambda DNA/Eco911y φX174DNA/BsuRI). Se aplicó un voltaje

constante (80 V). El DNA se visualizó por tinción con bromuro de etidio (100 ng/ml) y se observó en un transiluminador UV.

12.3 Digestión de ADN con enzimas de restricción

Para las digestiones de ADN se utilizaron las enzimas *EcoRI*, *HindIII*, *PstI*, *XbaI* y *Clal* empleando los tampones, temperatura y tiempos recomendados por el fabricante.

12.4 Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa (PCR)

Para la amplificación de fragmentos de ADN se empleó un termociclador *Gene ATAQ Controller* (Pharmacia-LKB) y *Mastercycler personal* (Eppendorf). Las enzimas *AmpliTaq®* DNA polimerasa (Applied Biosystem) o la DNA polimerasa *Pfu* (Biotools) se utilizaron de acuerdo con las instrucciones de los proveedores. Los productos amplificados se purificaron utilizando *Gene-Clean Turbo kit* (Q-BIOgene) o el *High Pure™ PCR Product Purification Kit* (Roche). Los partidores fueron sintetizados con un sintetizador Oligo-1000M (Beckman Instruments, Inc.) en el servicio de Química de Proteínas del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) de Madrid (España) y en Bios Chile (Santiago, Chile).

12.5 Partidores

En la Tabla 5 se indican los partidores utilizados en este trabajo para la amplificación de productos por PCR.

Tabla 5. Partidores utilizados en este trabajo

Las secuencias subrayadas corresponden a la secuencia de las enzimas de restricción utilizadas.

<i>Oligonucleótido</i>	<i>Secuencia 5'-3'</i>	<i>Descripción</i>
SodB3 int	CCCGAATT <u>CGCGTTGCTCGTCGACACGAC</u>	Empleado para amplificar un fragmento interno de <i>sodB</i> . <i>EcoRI</i>
SodB 5 int	CCCAAGCTT <u>CGCTCGAGTTTCACTACGGC</u>	Empleado para amplificar un fragmento interno de <i>sodB</i> . <i>HindIII</i>
SodB 3 ext	GGCCTGCAGAGACCGCGTTTCGCTTTGC	Empleado para amplificar un fragmento interno de <i>sodB</i> . <i>PstI</i>
SodB 5 ext	GGCAAGCTTTGACCTAAGGAGGTA AACCATGGAACATACGCTCCCA CCGC	Empleado para amplificar un fragmento interno de <i>sodB</i> . <i>HindIII</i>
AhpCF 3 int	GGGAATT <u>CCGGGTCAGCGTTTCAGCG</u>	Empleado para amplificar un fragmento interno de <i>ahpC</i> . <i>EcoRI</i>
AhpCF 5 int	GGCAAGCTT <u>CCTGAAGGCAAGTGGTCGG</u>	Empleado para amplificar un fragmento interno de <i>ahpCF</i> . <i>HindIII</i>
AhpCF 3 ext	CCG <u>TGCAG</u> CCGTCGCTTTTCCACCAC	Empleado para amplificar un fragmento interno de <i>ahpC</i> . <i>PstI</i>
AhpCF 5 ext	GGCAAGCTTTGACCTAAGGAGGTA AACCATGCCGATCATCAATAGTC AAG	Empleado para amplificar el operon <i>ahpCF</i> . <i>HindIII</i>
AhpF 3 int	CAGGTA <u>CTACTACGCTGAAGCATCGAG</u>	Empleado para amplificar la secuenciación del gen completo <i>ahpCF</i> .
OxyR 3 int	CCGAATT <u>CGCGCATCAGTCCGGACAGA</u>	Empleado para amplificar un fragmento interno de <i>oxyR</i> . <i>EcoRI</i>
OxyR 5 int	CCAAGCTTGAAGTGAGCGTACGCCGATCG	Empleado para amplificar un fragmento interno de <i>oxyR</i> . <i>Hind III</i>
OxyR 3 ext	CCTCTAGAGCGCGCGCTCAGTTGAC	Empleado para amplificar el gen <i>oxyR</i> . <i>XbaI</i>
OxyR 5 ext	CCAAGCTTGGCCTAAGGAGGTA AACCATGACCTCACCGAACTGAAA TACATC	Empleado para amplificar el gen <i>oxyR</i> . <i>Hind III</i>
HslU 3 int	CCAAGCTTGGTGTGATCGTGGTGCCTTC	Empleado para amplificar un fragmento interno de <i>hslU</i> . <i>Hind III</i>
HslU 5 int	CCTCTAGACGCGCGTTCATCAAGATC	Empleado para amplificar un fragmento interno de <i>hslU</i> . <i>Xba I</i>
HslU 3 ext	GGTCTAGACATTCTCCGCGCCGATATC	Empleado para amplificar el gen <i>hslU</i> . <i>Xba I</i>
HslU 5 ext	GGCAAGCTTTGACCTAAGGTA AACCATGAGCACCATGACCCCTGCC	Empleado para amplificar el gen <i>hslU</i> . <i>Hind III</i>
CyoB 3 int	GGTCTAGAACCATCGTCGCAATGCCG	Empleado para amplificar un fragmento interno de <i>chivo</i> . <i>XbaI</i>
CyoB 5 int	CCAAGCTTCCGCCGCTCTCCGAGTTGCA	Empleado para amplificar un fragmento interno de <i>chivo</i> . <i>Hind III</i>
CyoBCDE 3 ext	CCTCTAGAGGGGCTCCGTTATGACCGC	Empleado para amplificar el operon <i>cyoBCDE</i> . <i>Xba I</i>
CyoBCDE 5 ext	CCAAGCTTTGACCTAAGGAGGTA AACCATGTTCCGAAAACCTTACGCTC CATG	Empleado para amplificar el operon <i>cyoBCDE</i> . <i>Hind III</i>
TolA3 int	GGTCTAGACGCTCCGCATCCAGTTTCTTC	Empleado para amplificar un fragmento interno de <i>tolA</i> . <i>XbaI</i>
TolA 5 int	CCAAGCTTACGCCGCTGCTCGGGTT	Empleado para amplificar un fragmento interno de <i>tolA</i> . <i>HindIII</i>
TolARQorf1 3 ext	GGTCTAGAGGCGCCGTGTCTGCTGTCAA	Empleado para amplificar el operon <i>tolARQorf1</i> . <i>Xba I</i>
TolARQorf1 5 ext	GGATCGATTTGACCTAAGGAGGTA AACCATGCACCGCATGAATATATC GAC	Empleado para amplificar el operon <i>tolARQorf1</i> . <i>Clal</i>
BphA1 3	CCACTTCTGCATGCCGCCG	Empleado para comprobar B. xenovorans LB400
BphA1 5	CCGGGGGTTGGTCGATCAGG	Empleado para comprobar B. xenovorans LB400

12.6 Ligación del ADN

Para ligar los productos de PCR a los vectores, se utilizó una relación 3:1 (inserto: vector). Para calcular la cantidad de inserto y de vector en la reacción de ligación se empleó la siguiente fórmula: $\text{ng de inserto} = \frac{(\text{ng de vector}) (\text{tamaño en kb de inserto})}{(\text{Tamaño de vector en kb})}$

12.7 Secuenciación del ADN.

Todos los insertos clonados y los fragmentos de ADN se confirmaron mediante el secuenciamiento del ADN según el método de terminación de la polimerización por dideoxinucleótidos (Sanger *et al.*, 1977) y la ADN polimerasa *AmpliTaq FS* (Applied Biosystems) en un secuenciador automático modelo *ABI Prism 377™ automated DNA sequencer* (Applied Biosystems Inc.), en el Servicio de Secuenciación Automática de DNA del CIB.

El análisis de las secuencias nucleotídicas se realizó con el servidor Infobiogen (<http://www.infobiogen.fr/services/menuserv.html>). Las secuencias de nucleótidos y las secuencias deducidas de aminoácidos fueron comparadas con las existentes en las bases de datos mediante el uso de los algoritmos BLASTN y TBLASTN, respectivamente (Altschul *et al.*, 1990) a través del servidor NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/genom_table.cgi).

13. Métodos de transferencia genética.

13.1 Transformación de células de *E. coli*

Las células de *E. coli* DH10B y *E. coli* DH5 α y para la conjugación biparental *E. coli* S17-1 λ *pir* se transformaron utilizando los métodos descritos para la preparación de células competentes y transformación de las mismas mediante choque térmico (Sambrook y Rusell, 2001).

13.2 Construcciones genéticas

Para modificar genéticamente *B. xenovorans* LB400 con el fin de sobreexpresar genes de respuesta a estrés oxidativo se empleó la siguiente estrategia. Se amplificaron los genes (*oxyR*, *sodB* y *ahpCF*) y se clonaron en el plásmido pIZ1016, que es un vector de

clonamiento de amplio espectro de huésped (Moreno-Ruiz *et al.*, 2003). Las nuevas construcciones pIZoxyR, pIZsodB y pIZahpCF fueron transferidas de la cepa dadora (*E. coli* S17-1λ pir) a la cepa receptora (*B. xenovorans* LB400) mediante conjugación biparental. pIZoxyR, pIZsodB y pIZahpCF contenidas en *E. coli* DH10B fueron transferidas mediante conjugación biparental a la cepa *E. coli* S17-1λ pir.

Se construyó plásmidos recombinantes que podrían ser utilizados para obtener mutantes mediante recombinación homóloga de *B. xenovorans* LB400 (Anexo 1). Para ello, se amplificó fragmentos internos de cada uno de los genes (*oxyR*, *sodB*, *ahpC*, *hslU*, *cyoB*, *tolC*) y se clonaron en el sitio de múltiple clonamiento (polylinker) de pK18mob (plásmido movilizable que no replica en la bacteria huésped, Schafer *et al.*, 1994). Las construcciones pK18oxyR, pK18sodB, pK18ahpC, pK18hslU y pK18cyoB se detallan en la Tabla 16. Las construcciones fueron depositadas en el cepario del Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología Ambiental de la Universidad Técnica Federico Santa María.

13.3 Transferencia de plásmidos por conjugación biparental.

La cepa dadora *E. coli* S17-1λ pir que posee el plásmido pIZ1016 con los genes de respuesta a estrés oxidativo y la cepa receptora *B. xenovorans* LB400 se incubaron en 2 ml de medio LB con su respectivo antibiótico, durante toda la noche. Se centrifugó 1 ml de cada una de las cepas durante 1 min a 9.000 g y se suspendieron por pipeteo en 1 ml de medio LB. Se colocaron 20 µl de la cepa dadora y 80 µl de la cepa receptora sobre un filtro estéril (Millipore 0,2 µM de diámetro de poro) depositado sobre una placa de agar LB, sin antibiótico. Los filtros se secaron en la campana de flujo laminar y luego se incubaron a 30 °C toda la noche. Al día siguiente el filtro fue introducido en un tubo de cultivo de 10 ml conteniendo 1 ml de MgSO₄ (50 mM). Las células fueron suspendidas mediante pipeteo. Alícuotas de 200 µl fueron plaqueadas en placas de LB agar con sus respectivos antibióticos. Las colonias resultantes se plaquearon en un medio líquido de selección con el antibiótico apropiado.

14. Microscopía electrónica de transmisión

Las cepas *B. xenovorans* LB400 se crecieron en bifenilo (5 mM) hasta fase exponencial (turbidez₅₂₅ 0,4) en medio mineral M9. Las bacterias se centrifugaron a 10.000 g por 8 min y se fijaron con una solución de Karnowsky (glutaraldehído 2,5%, formaldehído

3,0%) (Cámara *et al*, 2004, Agulló *et al.*, 2007). Las células se observaron con el microscopio electrónico Zeiss EM900, en el Laboratorio de Microscopia Electrónica de la Universidad de Valparaíso. Las micrografías que se muestran en la sección Resultados son representativas de al menos diez campos observados.

15. Ensayo de degradación de bifenilo.

Para determinar la degradación del bifenilo se emplearon células en reposo (*resting cells*). Bacterias crecidas en medio mínimo con bifenilo (5 mM) hasta fase exponencial media (turbidez₅₂₅ 0,5), se lavaron con tampón fosfato (50 mM, pH 7), se centrifugaron a 5.000 g por 10 min y se expusieron a bifenilo a una concentración de 0,04 mM. Las muestras y los controles se incubaron en un baño termoregulado a 30 °C durante 90 min. A diferentes intervalos de tiempo, se sacaron alícuotas de 800 µl. Las alícuotas se concentraron y las lecturas se realizaron a A_{250 nm}. Como blanco, se utilizó el tampón fosfato. Cada medición se realizó por triplicado.

Para el ensayo degradación de bifenilo, primero se debió realizar una curva de calibración de absorbancia versus concentración de bifenilo. Para ello, se midió la absorbancia de diferentes concentraciones conocidas de bifenilo y se obtuvo la gráfica de absorbancia versus concentración (mM). Se realizó un ajuste lineal de los datos para obtener la ecuación de la recta, la pendiente y el intercepto. Se agradece a Bernardita Ponce por el análisis de estas muestras.

16. Análisis estadístico

Los resultados se expresan como valor promedio y se determinó la desviación estándar. El análisis estadístico de los resultados obtenidos en esta Tesis se basó en pruebas paramétricas y no paramétricas. Dentro de las pruebas paramétricas utilizadas para el ajuste de los datos a una distribución normal cuando la muestra es pequeña ($n < 30$), se realizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. Para determinar si existen diferencias significativas entre cepas se realizó la prueba T-Student. Cuando los datos no se ajustaron a los supuestos paramétricos, se realizaron análisis estadísticos no paramétricos de Kruskal Wallis y la prueba de Mann Whitney. En todos los análisis se consideró como significativa una $p < 0,05$ con un 95 % de intervalo de confianza. Los cálculos se realizaron con el software estadístico SPSS versión 15.0.

V RESULTADOS

V RESULTADOS

1. ANÁLISIS DEL POTENCIAL DE *B. xenovorans* LB400 PARA DEGRADAR COMPUESTOS AROMÁTICOS

La degradación de estos compuestos aromáticos es necesaria para mantener el ciclo global del carbono. En este contexto, las bacterias han desarrollado estrategias para la degradación de compuestos aromáticos, a pesar de la gran estabilidad termodinámica de estas moléculas (Gibson y Harwood, 2000; Van der Meer *et al.*, 1992). Una de las bacterias más relevantes aisladas de suelos contaminados con PCBs ha sido *B. xenovorans* LB400 (Bopp, *et al.*, 1986), que es capaz de degradar un amplio rango de PCBs.

La reciente secuenciación del genoma de *B. xenovorans* LB400 determinó que tiene un tamaño de 9,73 Mbp. Este genoma posee aproximadamente 9.000 secuencias codificantes (CDS) distribuidas en los tres replicones circulares que han sido designados como cromosoma 1 (4,90 Mbp), cromosoma 2 (3,36 Mbp) y un megaplásmido (1,47 Mbp). La secuenciación del genoma permitió realizar la reconstrucción *in silico* del metabolismo de compuestos aromáticos de esta interesante bacteria. Dicho trabajo fue llevado a cabo gracias a la cooperación internacional de diversos grupos de investigación que integró a 5 países, entre los cuales se destaca el laboratorio LMMBA, en Chile (Chain *et al.*, 2006).

B. xenovorans LB400 posee al menos 11 rutas metabólicas centrales de degradación de compuestos aromáticos y 22 rutas periféricas (Fig. 2, Chain, *et al.*, 2006). Como parte de este estudio internacional, en esta Tesis se identificaron cinco rutas centrales de los siguientes compuestos: catecol (genes *cat*), clorocatecol (genes *clc*), benzoil-CoA (genes *box*), protocatecuato (genes *pca*) y homoprotocatecuato (genes *hpa*). Asimismo, en este trabajo se identificaron otras cinco rutas periféricas: benzonitrilo (genes *nitA*), benzamida (genes *amiE*), triptofano (genes *kyn*), salicilato (genes *nah*) y benzoato (genes *ben*).

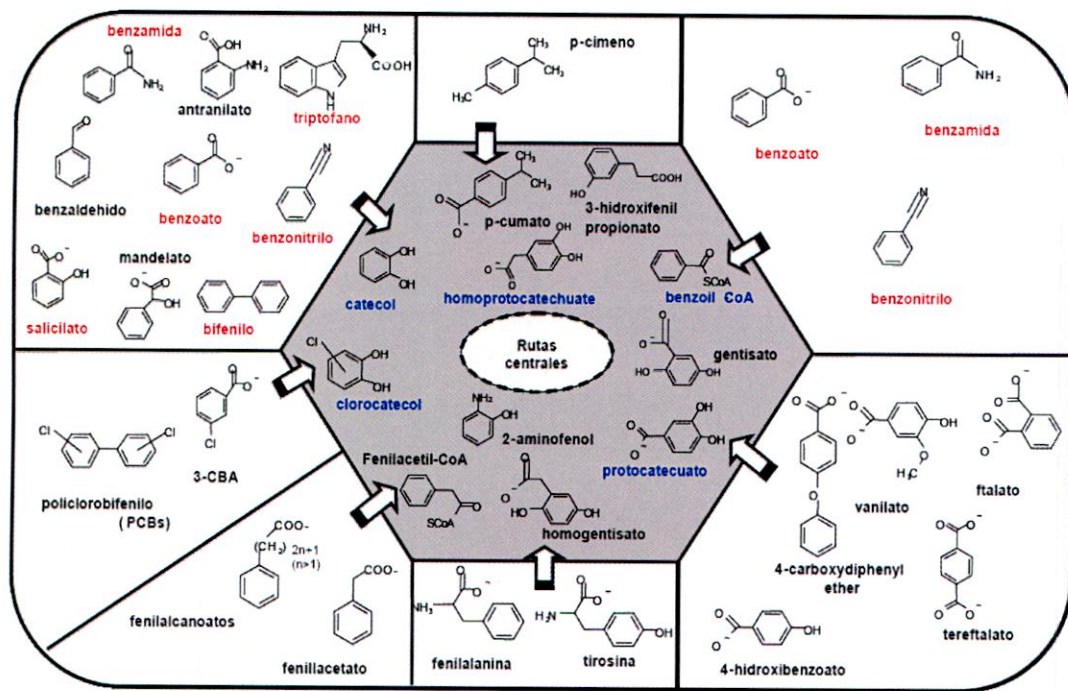


Figura 2. Representación esquemática de todas las rutas centrales y periféricas de compuestos aromáticos presentes en *B. xenovorans* LB400. Las rutas centrales se localizan en la parte central (fondo gris, en azul se indican las vías identificadas en esta tesis). Las rutas periféricas de aromáticos están indicadas en el sector externo (en rojo se indican las vías identificadas en esta Tesis).

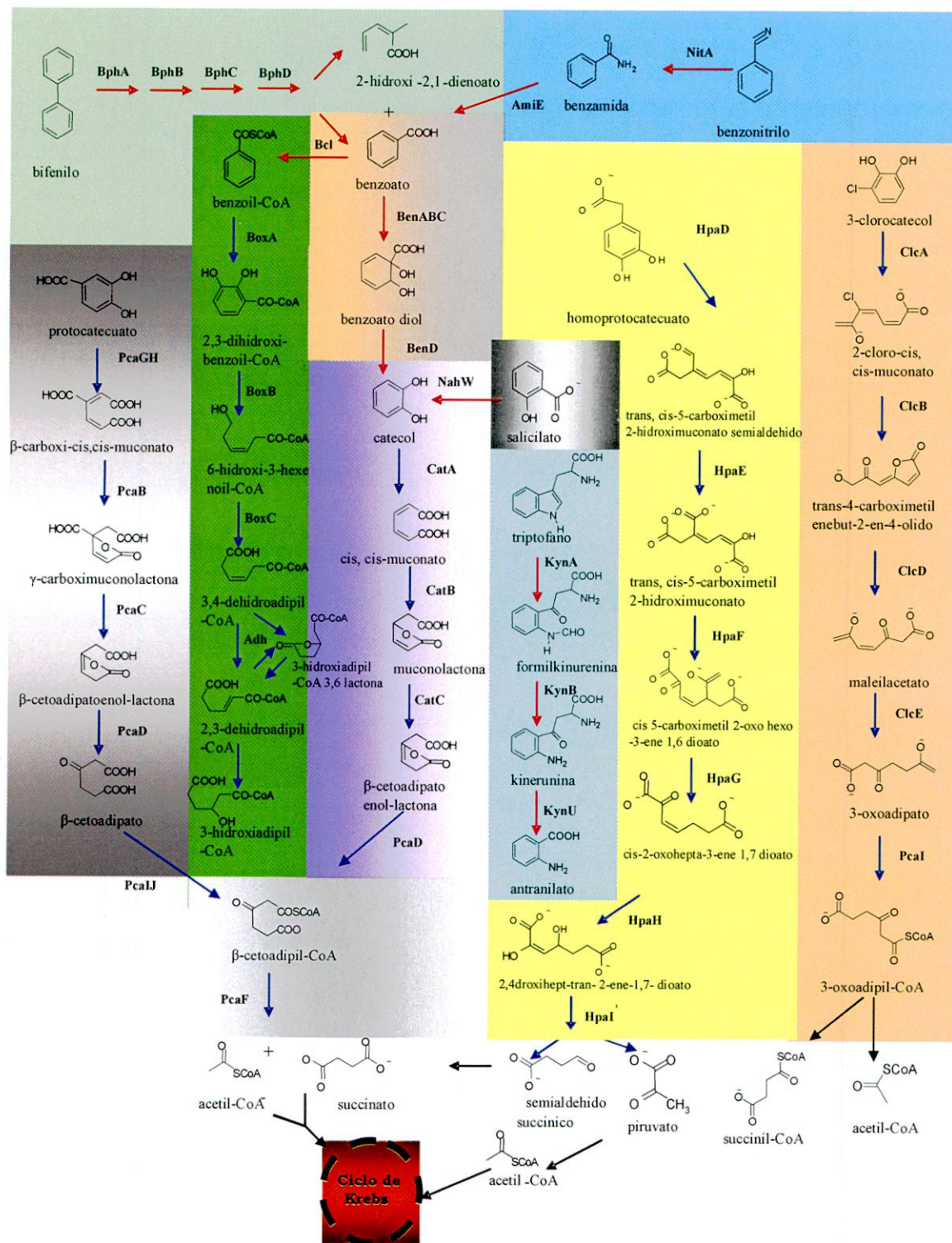


Figura 3. Rutas del catabolismo de compuestos aromáticos de *B. xenovorans* LB400. En la figura se muestran las rutas del catabolismo de compuestos aromáticos de la cepa LB400 encontradas en esta Tesis, indicando el nombre de los metabolitos y las enzimas responsables de cada reacción (detalladas en las Tablas 6-14). Las flechas en rojo indican las rutas periféricas y en azul las rutas centrales.

1.1 Análisis de las rutas centrales de degradación de compuestos aromáticos de *B. xenovorans* LB400

Los genes responsables de las cinco rutas centrales identificadas en esta Tesis en *B. xenovorans* LB400 (genes *cat*, *clc*, *pca*, *hpa* y *box*) han sido descritos en otras bacterias. Se realizó un análisis de comparación de las secuencias de aminoácidos de las proteínas de los correspondientes genes ortólogos en el genoma de *B. xenovorans* LB400. Como resultado de dicho análisis, se identificaron los genes ortólogos de los genes *cat* de las bacterias *Frateuria* y *Acinetobacter*, de los genes *pca* de *Acinetobacter*, *Azoarcus*, *Pseudomonas*, *Xantomonas*, *Burkholderia*, *Ralstonia* y *Erwinia*, de los genes *clc* de *Ralstonia* sp. JS705, *Pseudomonas putida*, *B. mallei* ATCC 23344 y *Delftia acidovorans*, de los genes *hpa* de *Burkholderia*, *E. coli*, *Photothabdus*, *Bordetella* y *Deinococcus*, de los genes *box* de *Azoarcus*, *Pseudomonas* y *Bordetella* (Tablas 6-14).

1.1.2 Ruta central del β -cetoadipato

Cuando los compuestos aromáticos catecol y protocatecuato sufren una apertura de anillo tipo *orto*, su degradación converge en el intermediario β -cetoadipato enol-lactona, constituyendo así las dos ramas de la ruta central del β -cetoadipato (Harwood y Parales, 1996). La degradación del protocatecuato y del catecol a través de esta ruta de β -cetoadipato, es catalizada por las enzimas codificadas por tres agrupamientos génicos (*cluster*). Es así como la degradación del protocatecuato es catalizada por las enzimas codificadas por los genes *pcaABC* y la degradación del catecol por las enzimas codificadas por los genes *catABC* y el intermediario β -cetoadipato enol-lactona. Este intermediario es convertido por las enzimas codificadas por los genes *pcaDEF*, en los intermediarios succinato y acetyl-CoA que convergen en el ciclo de Krebs (Harwood y Parales, 1996).

1.1.3 Ruta del catecol

Los genes *cat* están usualmente organizados en un único *cluster*. En el *cluster*, el orden de los genes difiere de especie a especie. La organización de los genes *cat* en la cepa LB400 se encuentra formando parte del *cluster catRBAC* localizado en el cromosoma 1 (Fig.4, Tabla 6). Estos genes codifican las tres enzimas de la ruta que transforma el catecol a β -cetoadipato enol lactona. Frecuentemente, estos genes incluyen un gen que codifica a un

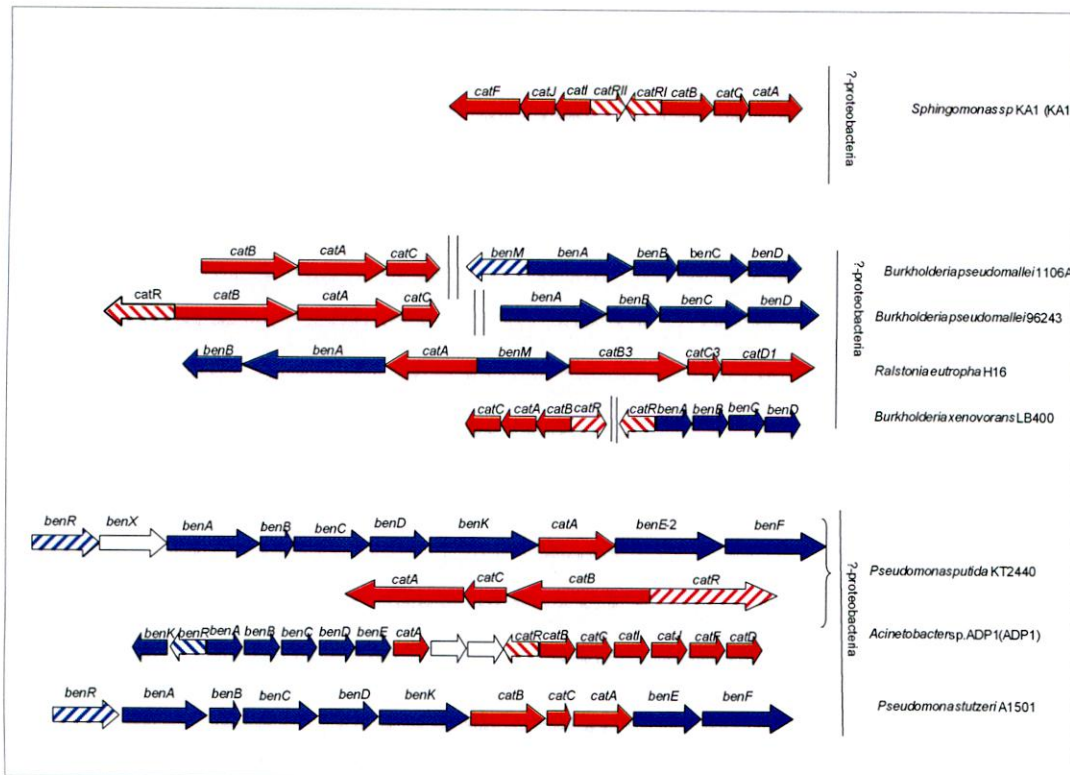


Figura 5. Organización de los genes *cat* y *ben* en *B. xenovorans* LB400 y la comparación con otras bacterias. Los genes se representan mediante flechas. Genes de la ruta catecol, en rojo; genes de la ruta del benzoato, en azul; genes reguladores, con rayas oblicuas; genes hipotéticos en blanco.

1.1.4 Ruta del protocatecuato

El protocatecuato es la otra rama de la ruta de β -cetoadipato generado a partir de varios compuestos fenólicos como el *p*-cresol, 4-hidroxibenzoato y monómeros de lignina. Los genes que codifican las enzimas involucradas en el catabolismo del protocatecuato en *B. xenovorans* LB400 están organizadas en dos agrupamientos génicos como *pcaJ**BDC* y *pcaQHG*, localizados en el cromosoma 2 (Fig. 6). Existe una segunda copia de los genes *pcaJ* localizados en el cromosoma 3. Cada *cluster* posee un gen regulador transcripcional de la familia LysR. El gen *pcaQ*, el cual codifica a un regulador tipo LysR homólogo al regulador PcaQ de *Agrobacterium tumefaciens*, requerido para el catabolismo de compuestos fenólicos (Parke, 1996). Otros genes como *pcaF* y *pcaB* se encontraron dispersos en los cromosomas 1 y 2, respectivamente. Los genes *pcaF* y *pcaJ* que codifican para β -cetoadipil CoA tiolasa y la subunidad β de la β -cetoadipato succinil-CoA transferasa, respectivamente, se encuentran en 3 copias (Tabla 7).

Los genes *pcaG*, *pcaH* y *pcaF* de *B. xenovorans* LB400 son los que presentan una alta identidad (>65 %) con genes similares descritos en otras bacterias (Tabla 7).

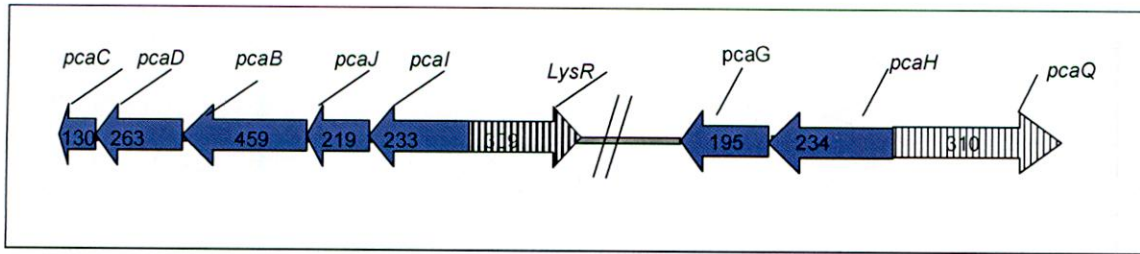


Figura 6. Organización de genes *pca* que codifican la ruta catabólica central del protocatecuato en *B. xenovorans* LB400. El agrupamiento *pca* se localiza en el cromosoma 2 (número de acceso NC 007952). Los genes que codifican proteínas con una función catabólica conocida se ilustran en morado. Los genes reguladores de la familia LysR se ilustran con rayado vertical; Dos líneas oblicuas indican que los genes no están adyacentes en el genoma. Se indica el número de los aminoácidos de cada proteína.

Tabla 7. Genes *pca* y sus productos génicos en *B. xenovorans* LB400

Gen (Bxe nº)	Producto génico (aa)	Productos génicos relacionados			
		Nombre	Función	Organismo	% identidad
<i>pcaG</i> (BxeB2776)	PcaG (195)	PcaG	Subunidad α de la protocatecuato 3,4-dioxigenasa	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	90%
<i>pcaH</i> (BxeB2775)	PcaH (234)	PcaH	Subunidad β de la protocatecuato 3,4-dioxigenasa	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	96%
<i>pcaQ</i> (BxeB2774)	PcaQ (337)	PcaQ	Regulador transcripcional	<i>Azoarcus</i> sp. EbN1	48%
<i>pcaF</i> (BxeB2167)	PcaF (400)	PcaF	β -cetoadipil CoA tiasa	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. ATCC 33913	69%
<i>pcaB</i> (BxeB1906)	PcaB (459)	PcaB	β -carboxi- <i>cis,cis</i> -muconatocicloisomerasa	<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i> SCRI1043	41%
<i>pcaC</i> (BxeB0647)	PcaC (130)	PcaC	γ -carboximuconolactona descarboxilasa	<i>Burkholderia pseudomallei</i> K96243	87%
<i>pcaD</i> (BxeB0646)	PcaD (263)	PcaD	β -cetoadipato enol-lactona hidrolasa I	<i>Ralstonia eutropha</i>	54%
<i>pcaB</i> (BxeB0645)	PcaB (459)	PcaB	β -carboxi- <i>cis,cis</i> -muconatocicloisomerasa	ATCC 23344	79%
<i>pcaJ</i> (BxeB0644)	PcaJ (219)	PcaJ	Subunidad β de la β -cetoadipato succinil-CoA transferasa	<i>Burkholderia pseudomallei</i> K96243	84%
<i>pcaI</i> (BxeB0643)	PcaI (233)	PcaI	Subunidad α de la β -cetoadipato succinil-CoA transferasa	<i>pseudomallei</i> K96243	84%
<i>LysR</i> (BxeB0642)	LysR (309)	LysR	Regulador transcripcional (Familia Lys R)	<i>Azoarcus</i> sp. EbN1	48%
<i>pcaD</i> (BxeB0595)	PcaD (265)	PcaD	β -cetoadipato enol-lactona hidrolasa I	<i>Ralstonia eutropha</i>	40%
<i>pcaJ</i> (BxeC0573)	PcaJ (211)	PcaJ	Subunidad β de la β -cetoadipato succinil-CoA transferasa	<i>Caulobacter</i>	69%

crecenscentus CB15

<i>pcaI</i> (BxeC0572)	PcaI (235)	PcaI	Subunidad α de la β -cetoacil-CoA transferasa	<i>Caulobacter crescenscentus</i> CB15	67%
<i>pcaF</i> (BxeA0469)	PcaF (400)	PcaF	β -cetoacil-CoA tiolasa	<i>Burkholderia pseudomallei</i> K96243	81%
<i>pcaJ</i> (BxeA1366)	PcaJ (234)	PcaJ	Subunidad β de la β -cetoacil-CoA transferasa	<i>Burkholderia cepacia</i> R18194	91%
<i>pcaF/phbA-2</i> (BxeA4255)	PcaF (402)	PcaF	Cetoacil-CoA tiolasa	<i>Bordetella bronchiseptica</i> RB50	69%

1.1.5 Ruta del benzoil Co-A

En la bacteria anaerobia *Thauera aromatica* los compuestos aromáticos como el fenol, indol, tolueno, ácido fenil acético y benzoato son convertidos al intermediario común benzoil-CoA (Breese *et al.*, 1998). Esta nueva ruta para la degradación anaerobia del benzoato se caracterizó en *Azoarcus evansii* y en *B. stearothermophilus* (Gescher *et al.*, 2002). El cromosoma de *A. evansii* contiene quince genes organizados en un *cluster* que codifica para la ruta del benzoil-CoA (Gescher *et al.*, 2002). Recientemente, se encontraron en dos copias los correspondientes genes ortólogos en *B. xenovorans* LB400 (Denef *et al.*, 2005; Chain *et al.*, 2006).

Los genes que codifican para la ruta central del benzoil CoA de *B. xenovorans* LB400 se organizan en dos *cluster* con alta homología (cromosoma 1 y megaplásmido) (Fig. 7, Tabla 8). Estudios de comparación de secuencias han permitido identificar un *cluster* similar en otras bacterias (Fig. 8). No se encontró en el *cluster* de *B. xenovorans* LB400, un gen que codifica un transportador para esta ruta. *A. evansii* posee un sistema transportador que podría ser responsable del ingreso del benzoato, localizado entre los genes que codifican para las enzimas lactonasa y benzoato CoA ligasa. Entre los genes *boxC* y *pnbB* de la cepa LB400 se ubica el gen XRE, que codifica un regulador transcripcional de la familia XRE con actividad quinasa.

El catabolismo del benzoato a benzoil CoA es mediado por la enzima benzoato Co-A ligasa (*badA*). El gen que codifica para esta enzima ha sido identificado en la cepa LB400 en dos copias y se localiza en el megaplásmido y en el cromosoma 1 (Fig. 7, Tabla 8).

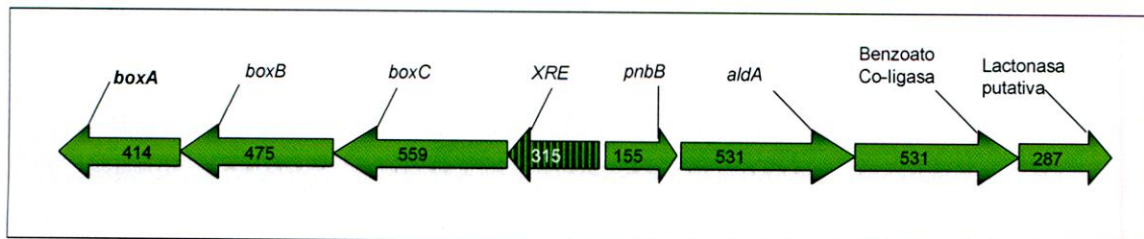


Figura 7. Organización de genes que codifican la ruta central catabólica del benzoil Co-A en *B. xenovorans* LB400. El agrupamiento se localiza en el cromosoma 1 y en el megaplásmido de la cepa LB400 (número de acceso NC007951). Los genes que codifican enzimas se muestran en verde. El gen regulador de la Familia XRE se indica con rayado vertical. Se indica el número de los aminoácidos de cada proteína.

Tabla 8. Genes de la ruta benzoil Co-A y sus productos génicos en *B. xenovorans* LB400

Gen (Bxe n°)	Producto génico (aa)	Nombre	Función	Organismo	% identidad
boxA (Bxe0890)	BoxA (414)	BoxA	Benzoil-CoA oxigenasa Componente A	Azoarcus evansii	64%
boxB (BxeC0891)	BoxB (475)	BoxB	<i>Benzoil-CoA</i> oxigenasa Componente B	Azoarcus evansii	71%
boxC (BxeC0892)	BoxC (559)	BoxC	enoil-CoA-hidratasa/isomerasa	Azoarcus sp. EbN1	70%
boxR (BxeC0893)	BoxR (315)	BoxR	regulador	Azoarcus evansii	51%
pnbB (BxeC0894)	PnbB (155)	PnbB	p-hidroxilaminobenzoato liasa	Pseudomonas putida	32%
aldA (BxeC0895)	AldA (531)	AldA	aldolasa	Azoarcus evansii	57%
Lactonasa (BxeC0897)	Lactonasa (287)	Lactonasa	lactonasa	Azoarcus sp. EbN1	56%
boxA (Bxe A1424)	BoxA (414)	BoxA	Benzoil-CoA oxigenasa Componente A	Azoarcus sp. EbN1	62%
boxB (Bxe A1423)	BoxB (475)	BoxB	<i>Benzoil-CoA</i> oxigenasa Componente B	Azoarcus evansii	72%
boxC (Bxe A1422)	BoxC (559)	BoxC	enoil-CoA-hidratasa/isomerasa	Azoarcus sp. EbN1	70%
boxR (Bxe A1421)	BoxR (315)	BoxR	regulador	Azoarcus evansii	52%
pnbB (Bxe A4554)	PnbB (155)	PnbB	p-hidroxilaminobenzoato liasa	Pseudomonas putida	32%
aldA (Bxe A1420)	AldA (531)	AldA	aldolasa	Azoarcus sp. EbN1	58%
Lactonasa (Bxe A1418)	Lactonasa (287)	Lactonasa	lactonasa	Azoarcus sp. EbN1	52%
badA (Bxe C0896)	BadA (531)	BadA	Benzoato coA-ligasa	Rhodopseudomonas palustris BisB5	60%
badA (Bxe A1419)	BadA (530)	BadA	Benzoato coA-ligasa	Rhodopseudomonas palustris BisB5	61%

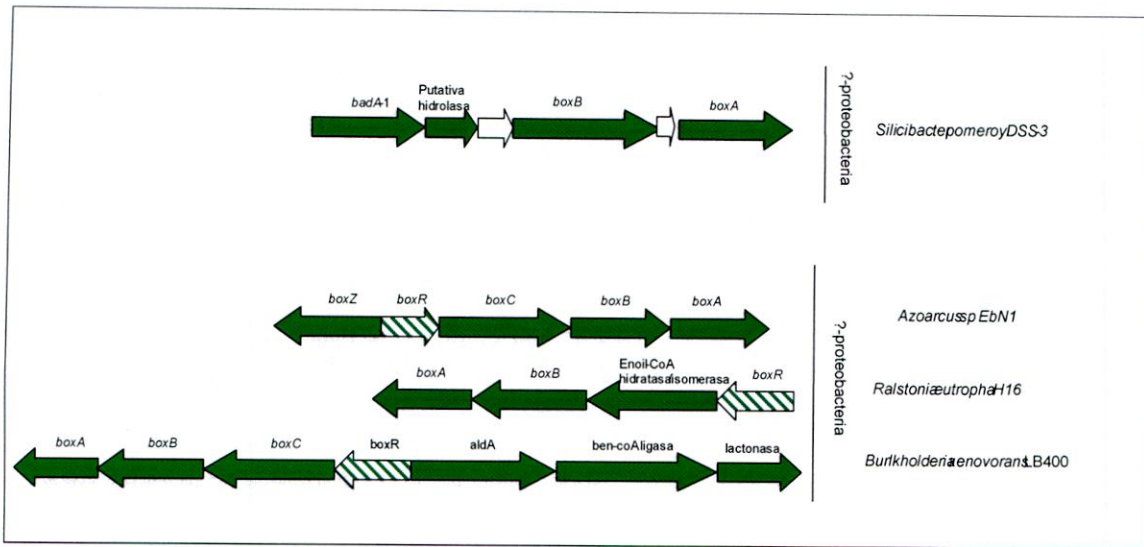


Figura 8. Organización de los genes de la ruta benzoil-CoA en *B. xenovorans* LB400 y la comparación con otras bacterias. Los genes se representan mediante flechas. Genes de la ruta benzoil-CoA, en verde; genes reguladores, con rayas oblicuas; genes hipotéticos; en blanco.

1.1.6 Ruta del clorocatecol

Los compuestos cloroaromáticos son una clase de compuestos que tienden a ser relativamente persistentes en el ambiente. Bajo condiciones aerobias diversos cloroaromáticos (2,4-diclorofenoxiacetato, clorobenzoatos) pueden ser degradados a través de la ruta central del clorocatecol. El catabolismo para la degradación del clorocatecol se ha estudiado principalmente en *Proteobacterias*. Estas bacterias utilizan la ruta *orto* modificada, que está codificada por los genes *clc*. Las enzimas de la ruta catabólica de clorocatecol corresponden a la clorocatecol 1,2 dioxigenasa (*clcA*), la cloromuconato cicloisomerasa (*clcB*), la diene lactona hidrolasa (*clcD*) y la maleilacetato reductasa (*clcE*) (Frantz y Chakrabarty, 1987).

En *B. xenovorans* LB400 los genes *clc* están agrupados en el cluster *clcABDE* localizado en el cromosoma 2 (Fig. 9, Tabla 9).

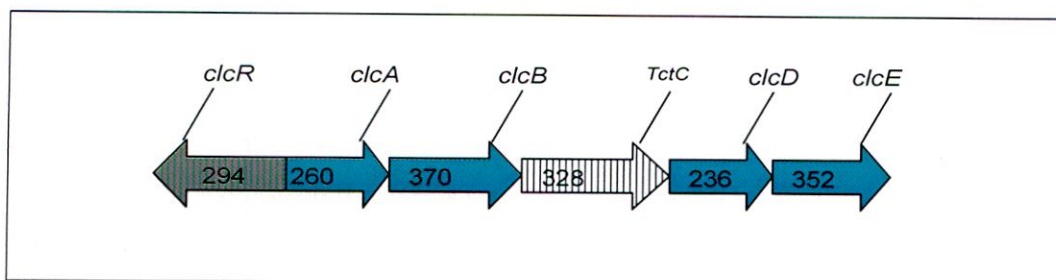


Figura 9. Organización de genes *clc* que codifican la ruta central catabólica del clorocatecol en *B. xenovorans* LB400. El agrupamiento *clc* se localiza en el cromosoma 2 (número de acceso NP 007952). Los genes que codifican enzimas se muestran en calipso. El gen regulador de la familia LysR se indica con rayado vertical; el gen putativo transportador del ácido tricarbóxico (TctC), con rayado oblicuo. Los números indican los aminoácidos de cada proteína. Se indica el número de los aminoácidos de cada proteína.

Tabla 9. Genes *clc* y sus productos génicos en *B. xenovorans* LB400.

Gen (Bxe no.)	Producto génico (aa)	Nombre	Función	Organismo	% identidad
<i>clcR</i> (Bxe A1131)	ClcR (294)	ClcR	Regulador transcripcional (Familia LysR)	<i>Ralstonia</i> sp. JS705	99%
<i>clcA</i> (Bxe A1130)	ClcA (260)	ClcA	Clorocatecol 1,2 dioxigenasa	<i>Pseudomonas putida</i>	95%
<i>clcB</i> (Bxe A1129)	ClcB (370)	ClcB	Cloromuconato cicloisomerasa	<i>Pseudomonas putida</i>	92%
<i>clcD</i> (Bxe A1127)	ClcD (236)	ClcD	Dienelactona hidrolasa	<i>Pseudomonas putida</i>	100%
<i>clcD</i> (Bxe A4330)	ClcD (236)	ClcD	Dienelactona hidrolasa	<i>Burkholderia mallei</i> ATCC 23344	76%
<i>clcE</i> (Bxe A1126)	ClcE (352)	ClcE	Cloromaleiacetato reductasa	<i>Delftia acidovorans</i>	57%

1.1.7 Ruta del homoprotocatecuato.

En la mayoría de las bacterias, el homoprotocatecuato es degradado por enzimas codificadas por los genes *hpc* o *hpa*. La ruta se inicia a través de la apertura del anillo tipo *meta* por la homoprotocatecuato 2,3-dioxigenasa. El producto resultante, 5-carboximetil-2-hidroximucónico semialdehído es convertido en intermediarios del ciclo de Krebs (Diaz *et al.*, 2001). El catabolismo del homoprotocatecuato es químicamente análogo a las reacciones oxidativas para la degradación del catecol (Tabla 10, Fig.10) (Roper *et al.*, 1995).

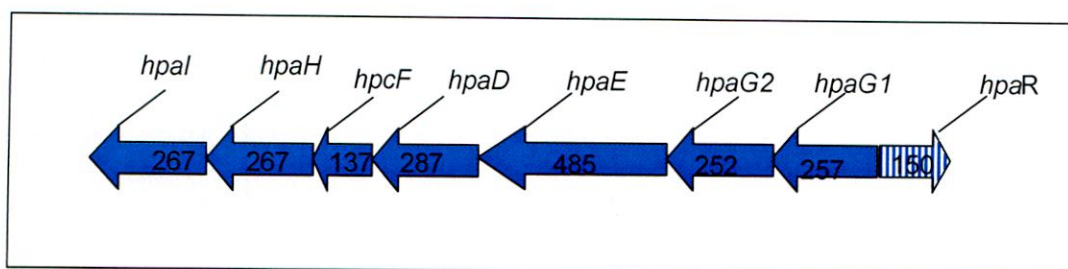


Figura 10. Organización de genes *hpc* que codifican la ruta central catabólica del homoprotocatecuato en *B. xenovorans* LB400. El agrupamiento *hpc* se localiza en el cromosoma 2 (número de acceso NP 007952). Los genes que codifican enzimas se muestran en celeste. El gen regulador de la familia MarR se indica con rayado vertical. Se indica el número de los aminoácidos de cada proteína.

El orden de estos genes en los diferentes agrupamientos no se encuentra conservado con respecto al que presenta *B. xenovorans* LB400. Sin embargo, en el genoma de *B. thailandensis* E264, la organización de los operones *hpa* es similar a la encontrada en *B. xenovorans* LB400, excepto por *hpaG1* y *hpaG2* (Fig. 11).

Tabla 10. Genes *hpa* y sus productos génicos en *B. xenovorans* LB400

Gen (Bxe n°.)	Producto génico (aa)	Productos génicos relacionados				
		Nombre	Función	Organismo	% identidad	No. acceso
<i>hpaR</i> (BxeB2027)	HpaR (150)	HpaR	Operon represor de homoprotocatecuato familia MarR	<i>Burkholderia mallei</i> ATCC 23344	47%	AAU46330
<i>hpaG1</i> (BxeB2028)	HpaG1(257)	HpaG1	5-oxo-1,2,5-tricarboxílico-3-pentaácido descarboxilasa	<i>Escherichia coli</i>	38%	CAA86040
<i>hpaG2</i> (BxeB2029)	HpaG2 (252)	HpaG2	5-oxo-1,2,5-tricarboxílico-3-pentaácido descarboxilasa	<i>Photorhabdus luminescens</i>	58%	AAO17178
<i>hpaE</i> (BxeB2030)	HpaE (485)	HpaE	5-carboxi-2-hidroxiacetato semialdehído dehidrogenasa	<i>Bordetella bronchiseptica</i> RB50]	81%	NP887286
<i>hpaD</i> (BxeB2031)	HpaD (287)	HpaD	3,4-dihidroxiacetato 2,3-dioxygenasa	<i>Bordetella bronchiseptica</i> RB50	82%	NP887287
<i>hpaF</i> (BxeB2032)	HpaF (137)	HpaF	5-carboximetil-2-hidroxiacetato isomerasa	<i>Deinococcus radiodurans</i> R1	52%	AAF12406
<i>hpaH</i> (BxeB2033)	HpaH(267)	HpaH	2-oxo-hepta-3-ene-1,7-dioato hidratasa	<i>Escherichia coli</i>	63%	CAA86043
<i>hpaI</i> (BxeB2034)	HpaI(267)	HpaI	2,4-dihidroxihepta-2-ene-1,7-ácido dioico aldolasa	<i>Deinococcus radiodurans</i> R1	66%	NP285614

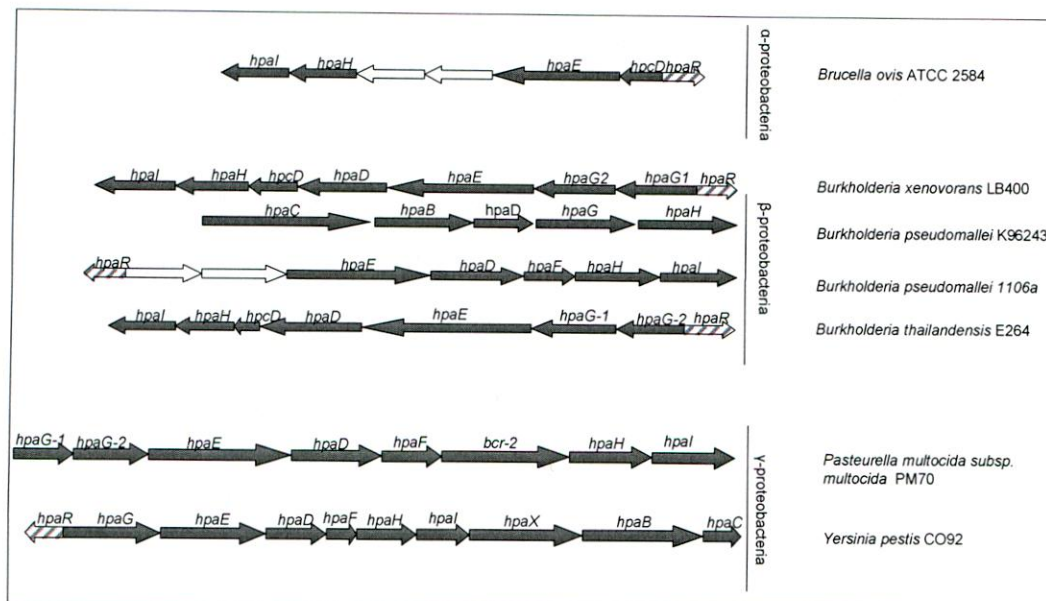


Figura 11. Organización de los genes de la ruta del homoprotocatecuato en *B. xenovorans* LB400 y la comparación con otras bacterias. Los genes se representan mediante flechas. Genes de la ruta homoprotocatecuato, en gris; genes reguladores, con rayas oblicuas; genes sin función definida, en blanco con puntos. Gen isomerasa/descarboxilasa para la degradación del 4-hidroxifenilacetato subunidad C, rayado horizontal, gen isomerasa/descarboxilasa subunidad N, blanco con puntos.

1.2 Rutas periféricas que convergen en la ruta central de β -cetoadipato.

B. xenovorans LB400 posee veintidós rutas periféricas de degradación de compuestos aromáticos, cinco de las cuales (benzonitrilo, benzamida, triptófano, salicilato y benzoato) se identificaron en esta Tesis.

1.2.1 Ruta del benzoato

El benzoato es un compuesto aromático muy frecuente en la naturaleza. El benzoato es metabolizado a catecol mediante las enzimas codificadas por los genes *ben*. Los genes *ben* han sido descritos en *P. putida* PRS2000, *Acinetobacter* sp. ADP1 (Collier *et al.* 1998; Cowles *et al.*, 2000) y en *P. putida* (Jiménez *et al.*, 2004). En *B. xenovorans* LB400 la degradación del benzoato a catecol se lleva a cabo a través de la ruta *orto*. Esta ruta comprende dos enzimas: benzoato 1,2-dioxigenasa constituido por tres componentes (*benABC*) y cis-diol dehidrogenasa (*benD*). Los correspondientes genes ortólogos en *B. xenovorans* LB400 se localizan en el cromosoma 2 (Fig. 12, Tabla 11). En la cepa LB400 no se encontró el gen *benE*, que codifica una proteína de membrana de función desconocida observado en *P. putida* KT2440 (Jiménez *et al.*, 2002) y *P. putida* PRS2000 (Cowles *et al.*, 2000) (Fig. 5). La regulación de la transcripción de los genes *ben* es mediada por el producto

del gen *benR*. El gen *benR* de la cepa LB400, es un gen ortólogo al gen del activador transcripcional del *cluster ben* en *P. putida* PRS2000 (Cowles *et al.*, 2000) y *Acinetobacter* sp. cepa ADP1 (Collier *et al.*, 1998).

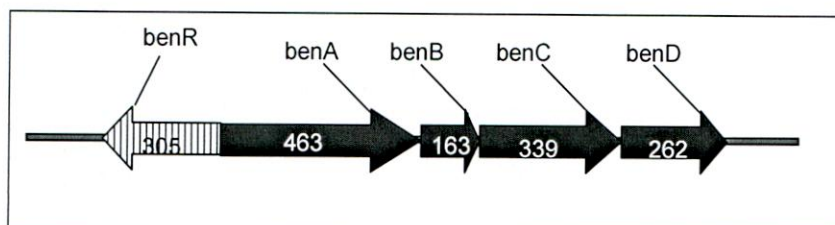


Figura 12. Organización de genes *ben* que codifican la ruta central catabólica del benzoato en *B. xenovorans* LB400. El agrupamiento *ben* se localiza en el cromosoma 2 (número de acceso NC 007952). Los genes que codifican enzimas se muestran en gris. El gen regulador de la familia LysR se indica con rayado vertical. Se indica el número de los aminoácidos de cada proteína.

Tabla 11. Genes *ben* y sus productos génicos en *B. xenovorans* LB400

Gen (Bxe no.)	Producto génico (aa)	Nombre	Función	Organismo	% identidad
<i>benR</i> (BxeB0916)	BenR (305)	BenR	Activador transcripcional (Familia LysR)	<i>Burkholderia mallei</i> ATCC 23344	78%
<i>benA</i> (BxeB0915)	BenA (463)	BenA	Benzoato dioxigenasa (subunidad grande componente oxigenasa)	<i>Burkholderia mallei</i> ATCC 23344	83%
<i>benB</i> (BxeB0914)	BenB (163)	BenB	Benzoato dioxigenasa (subunidad pequeña componente oxigenasa)	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	77%
<i>benC</i> (BxeB0913)	BenC (339)	BenC	Benzoato dioxigenasa (componente reductasa)	<i>Burkholderia pseudomallei</i> K96243	72%
<i>benD</i> (BxeB0912)	BenD (262)	BenD	2-hidro-1,2-dihidroxibenzoato deshidrogenasa	<i>Burkholderia pseudomallei</i> K96243	77%

1.2.2 Ruta del benzonitrilo/benzamida

El benzonitrilo es otro sustrato que converge en el benzoato y se metaboliza a través de la ruta β -cetoadipato. El benzonitrilo es un ingrediente activo de algunos herbicidas ampliamente utilizados tales como el diclobenil (2, 6-diclorobenzonitrilo), bromoxinil (3,5-dibromo-4-hidroxibenzonitrilo) y el ioxinil (4-hidroxi-3,5-diodobenzonitrilo) (Nawaz, *et al.*, 1992).

Pocos microorganismos metabolizan el benzonitrilo. Se requiere de solo una enzima para la conversión de benzonitrilo a benzamida, la enzima nitrilo hidratasa (*nitA*). En la cepa LB400, el gen *nitA* se localiza en el cromosoma 1. La benzamida es transformada a benzoato por la enzima amidasa alifática (*amiE*) que se encuentra en el megaplásmido. El benzoato posteriormente es degradado a catecol o a benzoil-CoA.

1.2.3 Ruta del bifenilo

La organización genética de los genes catabólicos de la ruta del bifenilo ha sido descrita en varios grupos de microorganismos (Furukawa y Miyazaki 1986; Erickson y Mondello, 1992; Hofer *et al.*, 1993, 1994). La cepa LB400 utiliza bifenilo como única fuente de carbono y energía y metaboliza el bifenilo en condiciones aerobias mediante la vía superior y la vía inferior de bifenilo. Los genes *bph* que codifican la vía superior de bifenilo se clonaron primero en *P. pseudoalcaligenes* KF707 (Furukawa y Miyazaki, 1986) y posteriormente en *B. xenovorans* LB400 (Mondello, 1989; Hofer *et al.*, 1993 y 1994). En *B.xenovorans* LB400 los genes *bph* están organizados en el *cluster bphABCKHJID* localizado en el megaplásmido (Fig. 13, Tabla 12). El locus *bph* posee diez genes que codifican para las enzimas que constituyen las dos vías de degradación del bifenilo. Además, contiene un gen que codifica para una glutatión-s-transferasa (*bphK*). Un regulador codificado por el gen *bphR* participa en la regulación de los genes *bph* (Beltrametti *et al.*, 2001). Se desconoce la función de ORF1.

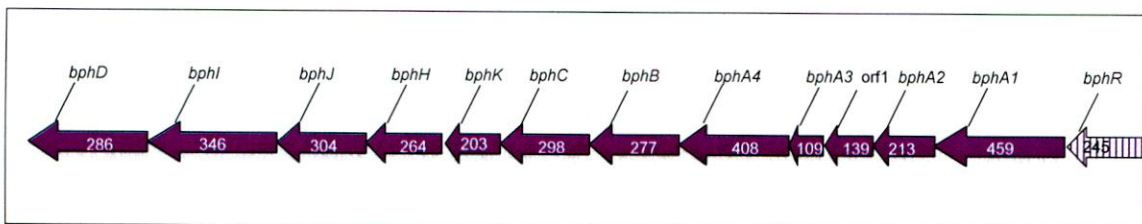


Figura 13. Organización de los genes *bph* que codifican la ruta periférica catabólica del bifenilo en *B. xenovorans* LB400. El agrupamiento *bph* se localiza en el megaplásmido (número de acceso NC 007953). Los genes que codifican enzimas se muestran en morado. El gen regulador de la familia GntR se indica con rayado vertical. Se indica el número de los aminoácidos de cada proteína.

Tabla 12. Genes *bph* y sus productos génicos en *B. xenovorans* LB400

Gen (Bxe no.)	Producto génico (aa)	Productos génicos relacionados				
		Nombre	Función	Organismo	% identidad	No acceso
<i>bphR</i> (BxeC1198)	BphR (245)	BphR	Regulador transcripcional (Familia GntR)	<i>B. xenovorans</i> LB400	95%	ABE37060
<i>bphA1</i> (BxeC1197)	BphA1 (459)	BphA1	Bifenilo 2,3-dioxigenasa subunidad alfa	<i>B. xenovorans</i> LB400	100%	ABE37059
<i>bphA2</i> (BxeC1196)	BphA2 (213)	BphA2	Bifenilo 2,3-dioxigenasa subunidad pequeña	<i>Pseudomonas</i> sp. B4	100%	ABE37058
<i>bphA3</i> (BxeC1194)	BphA3 (109)	BphA3	Bifenilo 2,3-dioxigenasa subunidad ferredoxina	<i>Comamonas testosteroni</i>	75%	ABE37056
<i>bphA4</i> (BxeC1193)	BphA4 (408)	BphA4	Bifenilo 2,3-dioxigenasa Ferredoxina reductasa	<i>Pseudomonas</i> sp. B4	95%	ABE37055
<i>bphB</i> (BxeC1192)	BphB (277)	BphB	Cis-2,3-dihidrobifenilo-2,3-diol dehidrogenasa	<i>Pseudomonas</i> sp Cam-1	99%	ABE37054
<i>bphC</i> (BxeC1191)	BphC (298)	BphC	2,3-dihidrobifenilo-1,2-dioxigenasa	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	99%	ABE37053
<i>bphK</i> (BxeC1190)	BphK (203)	BphK	Glutation-S-transferasa	<i>Pseudomonas</i> sp	100%	CAA54033
<i>bphH</i> (BxeC1189)	BphH (264)	BphH	2-hidroxi-penta-2,4-dienoato hidratasa	<i>Pseudomonas</i> sp	96%	ABE37051
<i>bphJ</i> (BxeC1188)	BphJ (304)	BphJ	Acetaldehido dehidrogenasa	<i>Pseudomonas</i> sp	90%	ABE37050
<i>bphI</i> (BxeC1187)	BphI (346)	BphI	4-hidroxi-2-oxovalerato aldolasa	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	93%	ABE37049
<i>bphD</i> (BxeC1186)	BphD (286)	BphD	2-hidroxi-6-oxo-6-fenylhexa-2,4-dienoato hidrolasa	<i>Pseudomonas</i> sp.	100%	ABE37048

1.2.4 Ruta del triptófano

La degradación aeróbica del triptófano se denomina con frecuencia como la ruta de kinurenina. La mayoría de los genes y las correspondientes enzimas involucradas han sido caracterizadas principalmente en eucariontes. La degradación aerobia de este compuesto en bacterias es poco conocida. Recientemente, Kurnasov *et al.* (2003) realizaron un análisis comparativo del genoma y la caracterización enzimática de los genes de la ruta del kinurenina. Se predijo la existencia de los tres pasos de la ruta aeróbica de la degradación del triptófano a antranilato en varias bacterias: *B. cereus*, *P. aeruginosa* y *R. metallidurans*. La ruta metabólica es codificada en tres genes organizados en un cluster *kynBAU*. Estos

genes codifican las enzimas triptófano 2,3-dioxigenasa (*kynA*), kinurenina formamidasa (*kynB*), y kinureninasa (*kynU*).

La búsqueda de los genes ortólogos en el genoma de la cepa LB400 que codifican para las dos primeras enzimas de la ruta del triptófano reveló una región que contiene un gen similar a *kynA* (100% identidad de aminoácidos con *B. thuringiensis serovar konkukian str. 97-27*) y otro gen similar a *kynB* (79% de identidad en secuencias de aminoácidos con *P. syringae pv. tomato str. DC3000*) en el cromosoma 1 y 2, respectivamente. Se observó una alta identidad (61%) del producto codificado por el *kynU*, con la enzima de *P. fluorescens* (Tabla 13).

Tabla 13. Genes *kyn* y sus productos génicos en *B. xenovorans* LB400

Gen (Bxe no.)	Producto génico (aa)	Nombre	Función	Organismo	% identidad
<i>kynA</i> (BxeA0733)	KynA (310)	KynA	Triptófano 2,3 dioxigenasa	<i>Bacillus thuringiensis serovar konkukian str. 97-27</i>	100
<i>kynU</i> (BxeA0735)	KynU (212)	KynU	Kinureninasa	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	61
<i>kynB</i> (BxeB1706)	KynB (410)	KynB	Formamidasa	<i>Pseudomonas syringae pv. tomato str. DC3000</i>	79

1.2.5 Ruta del salicilato

La degradación del salicilato (2-hidroxibenzoato) es realizada generalmente a través de la ruta del catecol por una ruptura del anillo del tipo *meta*. Se requiere de las enzimas salicilato 1-hidroxilasa (NahW) y catecol 2,3-dioxigenasa (NahH). Los genes son regulados por un regulador transcripcional del tipo LysR (NahR). En el genoma de *B. xenovorans* LB400, se encontró la enzima salicilato 1-hidroxilasa (NahW). Vecino a este gen *nahW*, se localizó un gen que codifica un regulador transcripcional de la familia TetR. Ambos genes están localizados en el megaplásmido (cromosoma 3) (Tabla 14)

Tabla 14. Gen *nah* y sus productos génicos en *B. xenovorans* LB400

Gen (Bxe no.)	Producto génico (aa)	Nombre	Función	Organismo	% identidad
<i>nahW</i> (BxeC0213)	NahW (403)	NahW	Salicilato hidroxilasa	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	36
<i>tetR</i> (BxeC0212)	TetR (242)	TetR	Regulador transcripcional (Familia TetR)	<i>Azoarcus</i> sp. EbN1	34

Las rutas periféricas de compuestos aromáticos que no están presentes en la cepa LB400 son: benceno, nitrobenzeno, naftaleno, tolueno, dibenzo-p-dioxina, 2,4 diclorobenceno, fenol y anilina.

1.3 Análisis funcional de rutas de degradación de compuestos aromáticos de *B. xenovorans* LB400.

Con el objetivo de realizar un análisis funcional del potencial de *B. xenovorans* LB400 para degradar compuestos aromáticos, se realizaron estudios de crecimiento de la cepa, en presencia de algunos compuestos.

Para esto, *B. xenovorans* LB400 se cultivó en medio mínimo M9 conteniendo diferentes compuestos aromáticos a una concentración final de 1 a 10 mM, como única fuente de carbono y energía. En estas condiciones, se comprobó que la bacteria fue capaz de crecer empleando compuestos aromáticos de rutas centrales tales como el gentisato, protocatecuato, catecol y galato. Asimismo, la cepa LB400 fue capaz de crecer empleando algunos compuestos aromáticos de rutas periféricas, entre ellos el benzoato, 3-hidroxibenzoato, 4-hidroxibenzoato, fenilalanina, tirosina, triptofano, resorcinol, L-mandelato, citrato, succinato, cis-cis muconato, muconato, ftalato e hidroxiquinol. La cepa LB400 no fue capaz de emplear para su crecimiento otros compuestos aromáticos como fuente de carbono y energía. Estos son los siguientes compuestos de rutas periféricas: 2-hidroxibenzoato (salicilato), 3-hidroxibenzoato, 2,3-dihidroxibenzoato, 2-aminobenzoato (antranilato), 2-hidroxifenilacetato, fenol, benceno, m-cresol, ferulato, vanilato, 3-CBA, 3,5 CBA, 3,4CBA, 2-CBA, 4-CBA, fluoreno, estireno y anilina.

1.4 Aplicaciones bioinformáticas para la búsqueda *in silico* de rutas catabólicas.

La bioinformática integra herramientas de software y bases de datos, aborda preguntas biológicas, y se utiliza en la genómica y la proteómica. Asimismo, la bioinformática se ha aplicado en otras áreas de la biología como la metabolómica y los estudios del transcriptoma. Cada una de estas importantes áreas pretende comprender los complejos sistemas biológicos. Una aplicación de la bioinformática es la búsqueda e identificación de genes que codifican las enzimas de rutas metabólicas de interés en genomas secuenciados. Con este fin, existe un conjunto de herramientas: bases de datos (por ejemplo, KEGG, NCBI) y aplicaciones (por ejemplo BLAST, Artemis, Vector NTI). Para utilizar estas herramientas eficientemente, la integración de estos recursos es un área de interés, dado la complejidad y la capacidad requerida en la búsqueda manual. En este contexto, el trabajo conjunto entre el LMMBA y el grupo científico del Dr. Tomás Arredondo (Departamento de Electrónica, UTFSM), abordó la problemática de cómo integrar las aplicaciones y bases de datos para una investigación más eficiente en la búsqueda de rutas metabólicas. Esto permitiría aumentar el rendimiento de los investigadores en el área bioinformática. A partir de esto, se generó un marco de integración bioinformático y una aplicación bioinformática denominada GeXpert (Arredondo *et al.*, 2006). Esta aplicación consiste en una plataforma integrada que involucra un esquema de investigación sistemática para la identificación de genes que codifican enzimas de rutas metabólicas. Una particularidad de GeXpert es incluir un evaluador de genes para estimar si una secuencia de ADN es un buen candidato que codifica para una determinada enzima de una ruta metabólica. El análisis *in silico* realizado en esta Tesis aportó los conceptos básicos como así también los requerimientos necesarios para una certera asignación de las funciones catabólicas estudiadas. Adicionalmente, durante esta Tesis se trabajó en la evaluación de los resultados obtenidos mediante la búsqueda manual de las rutas metabólicas versus la utilización de GeXpert (Fig.14). Los resultados obtenidos revelaron que GeXpert permite una búsqueda bioinformática más rápida y eficiente que el método manual y sin arrojar mayores errores de asignación de funciones (alta confiabilidad). Los errores detectados fueron realizados por los usuarios que tenían menos experiencia en la aplicación. Estos errores se reducirían a medida que adquieran una mayor experiencia con GeXpert (Arredondo, *et al.*, 2007). Actualmente, se continúa perfeccionando GeXpert en términos de mejorar su funcionalidad y utilidad.

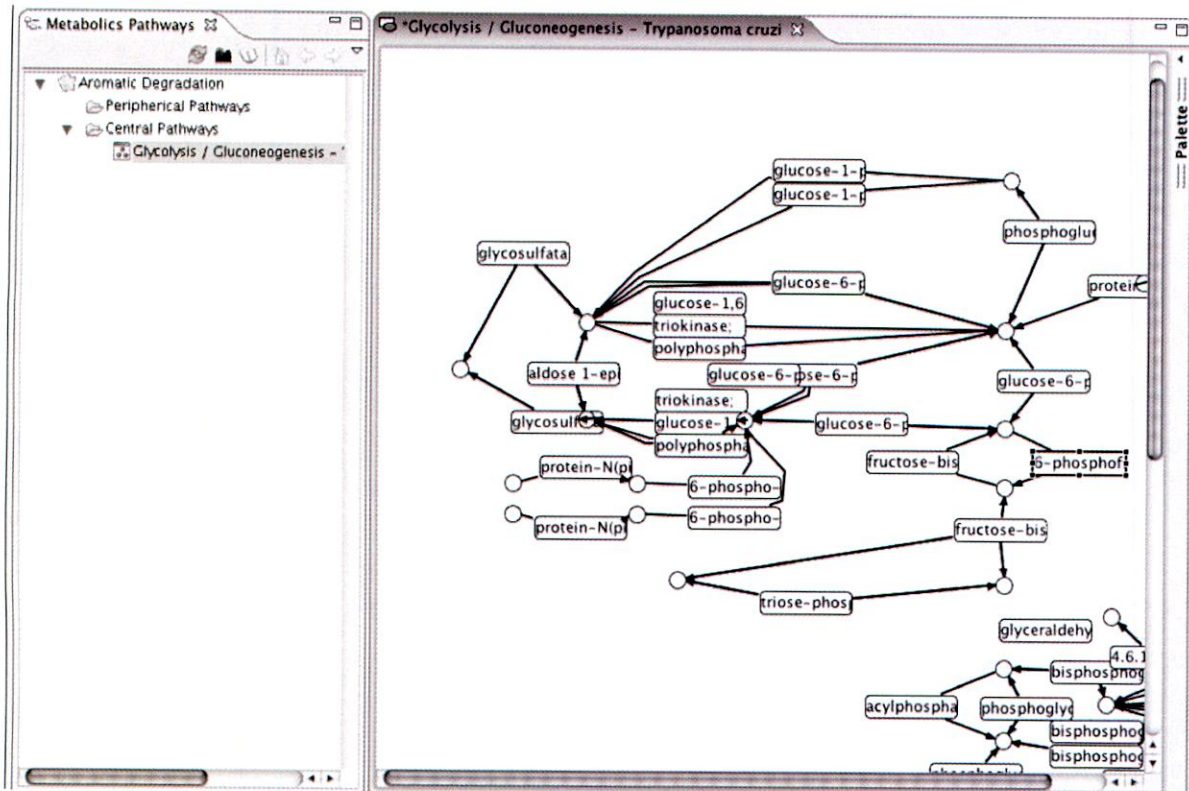


Figura 14. Interfase gráfico del visualizador de rutas metabólicas.

2. CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA DE *B. xenovorans* LB400 FRENTE AL COMPUESTO AROMÁTICO MODELO BIFENILO, MEDIANTE ESTUDIOS FISIOLÓGICOS Y PROTEÓMICOS

2.1 Crecimiento de *B. xenovorans* LB400 en bifenilo

Se estudió el crecimiento de la cepa LB400 en un medio mínimo M9, empleando glucosa y bifenilo como única fuente de carbono y energía. Se determinó la velocidad de crecimiento y el tiempo de duplicación en estas distintas fuentes de carbono. El crecimiento se realizó a 30 °C con agitación. *B. xenovorans* LB400 en glucosa (5 mM), alcanza su fase estacionaria alrededor de las 15 h y una turbidez máxima a 525 nm de 1,2 (Fig. 15 A). En tanto, el crecimiento en bifenilo (5 mM) muestra que su fase estacionaria es alcanzada a las 25 h y con una turbidez a 525 nm de 2,0 (Fig. 15 B). La fase exponencial media del crecimiento de la cepa LB400 en glucosa y bifenilo es alcanzado a las 8 y 15 h,

respectivamente. La velocidad específica de crecimiento en glucosa fue de 2.93 h^{-1} y en bifenilo fue de 0.63 h^{-1} . El tiempo de duplicación (t_d) en glucosa fue de 14 min y bifenilo de 66 min. Por lo tanto, la velocidad específica de crecimiento bacteriano es menor en bifenilo que en glucosa. Sin embargo, la cepa LB400 cultivada con bifenilo alcanzó una mayor biomasa ($1,21 \times 10^{11}$ UFC/ml) que la cepa cultivada en glucosa ($2,67 \times 10^9$ UFC/ml).

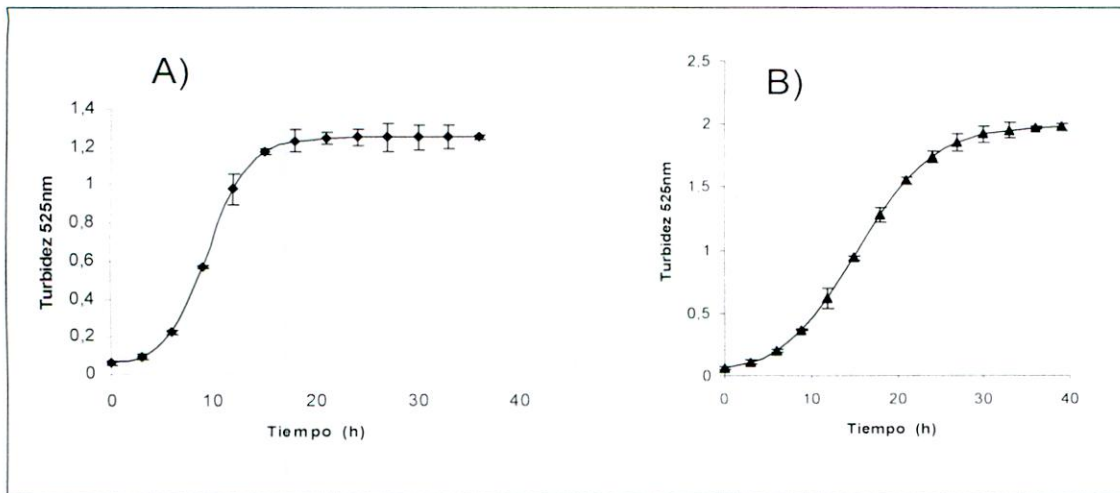


Figura 15. Crecimiento de *B. xenovorans* LB400 en medio mínimo M9 utilizando glucosa y bifenilo como fuente de carbono. (A) crecimiento de la cepa LB400 en glucosa (5 mM). Tiempo de duplicación 14 min. Velocidad específica de crecimiento $2,93 \text{ h}^{-1}$. (B) crecimiento de la cepa LB400 en bifenilo (5 mM). Tiempo de duplicación 66 min. Velocidad específica de crecimiento $0,63 \text{ h}^{-1}$. Los resultados indican el valor promedio y la desviación estándar de tres experimentos independientes.

2.2 Efecto del bifenilo y H_2O_2 sobre la viabilidad celular

Se examinó la toxicidad potencial de la exposición a bifenilo y a peróxido de hidrógeno sobre la viabilidad de *B. xenovorans* LB400. El H_2O_2 posteriormente se utilizará como inductor de estrés oxidativo. Para ello, las células crecieron en medio mineral M9 utilizando glucosa (5 mM) como fuente de carbono. Una vez que alcanzaron fase exponencial temprana (turbidez $_{525\text{nm}}$ de 0,3-0,4), se adicionó al cultivo una solución de bifenilo 2 mM o H_2O_2 (0,2 y 0,6 mM) y se mantuvo otro cultivo en glucosa como control del crecimiento. A diferentes tiempos, se determinaron las unidades formadoras de colonias (UFC/ml). La exposición a los 120 min a bifenilo 2 mM y H_2O_2 0,6 mM disminuyó la viabilidad de la cepa LB400 en un 58 % y un 70 %, respectivamente. En tanto que la mayor disminución de las UFC/ml se observó a los 60 min de exposición a H_2O_2 0,6 mM, mostrando una inhibición del crecimiento 83 % (Fig. 16 A).

Para determinar el rango de concentración de H_2O_2 que produce una inhibición del crecimiento de la cepa LB400 sin provocar una disminución importante de su viabilidad, se evaluó el efecto de H_2O_2 en un rango más amplia concentración (0-100 mM). Los cultivos crecieron hasta fase exponencial temprana (turbidez $_{525nm}$ 0,2) en medio mínimo M9 y con glucosa (5 mM) como fuente de carbono. Se observó que sólo la concentración 1 mM permite el crecimiento lento de la cepa LB400 a las 8 h. En todas las otras concentraciones de H_2O_2 probadas, se observó la inhibición total del crecimiento de la cepa LB400 en glucosa hasta las ocho h (Fig. 16 B).

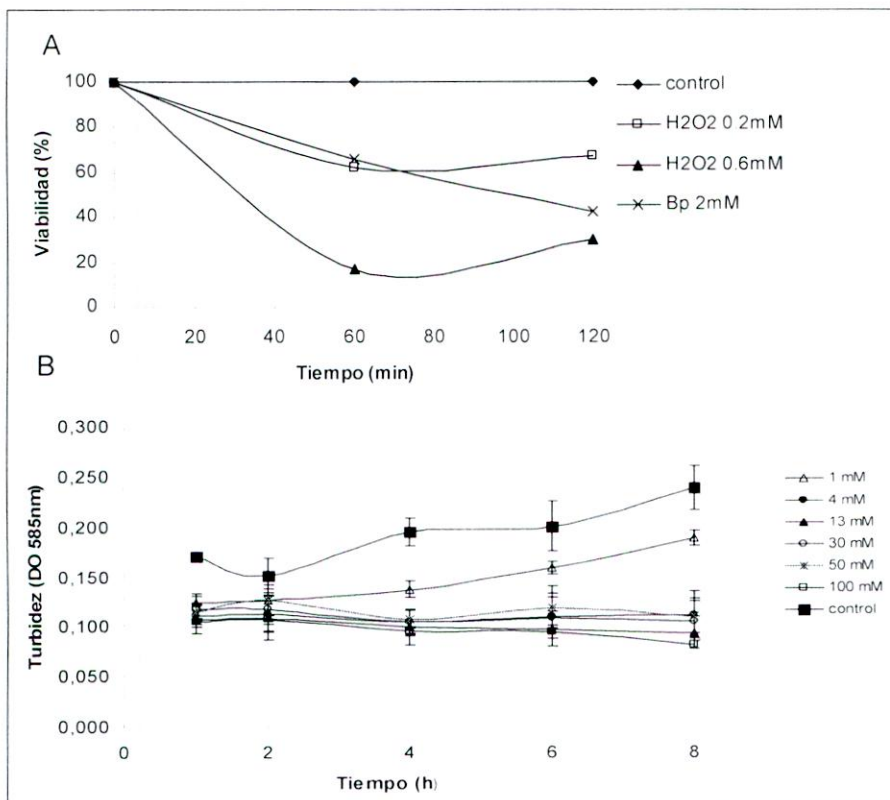


Figura 16. Efecto de la exposición a bifenilo y H_2O_2 de *B. xenovorans* LB400. La cepa LB400 crecida hasta fase exponencial temprana utilizando glucosa como fuente de carbono fue expuesta a: (A) Efecto de la exposición a bifenilo y H_2O_2 en la viabilidad de la cepa LB400. (B) Efecto de la concentración de H_2O_2 en el crecimiento de la cepa LB400. Los resultados son expresados como el valor promedio \pm error estándar de tres experimentos independientes (B). El control en todos los casos es con glucosa 5 mM. El 100 % corresponde a una concentración inicial de $9,4 \times 10^7$ cel/ml.

2.3 El bifenilo genera especies reactivas de oxígeno (ROS) en *B. xenovorans*

LB400

Se estudió si la exposición frente a bifenilo de la cepa LB400 representa una situación de estrés oxidativo. Durante este tipo de estrés se generan especies reactivas de oxígeno (ROS) como H_2O_2 , O_2^- y OH^* . Se determinó la activación de la sonda sensible a estrés oxidativo 2',7' dihidroclorofluoresceína diacetato ($\text{H}_2\text{DCF-DA}$) en células de *B. xenovorans* LB400 crecida en glucosa como control y en bifenilo (5 mM), como única fuente de carbono.

Las bacterias expuestas a bifenilo muestran un importante aumento de ROS, lo que se refleja en el aumento de la fluorescencia de la sonda al comparar con el control en glucosa (Fig. 17 A). Este resultado muestra que el bifenilo es un agente generador de especies reactivas de oxígeno al interior de la célula.

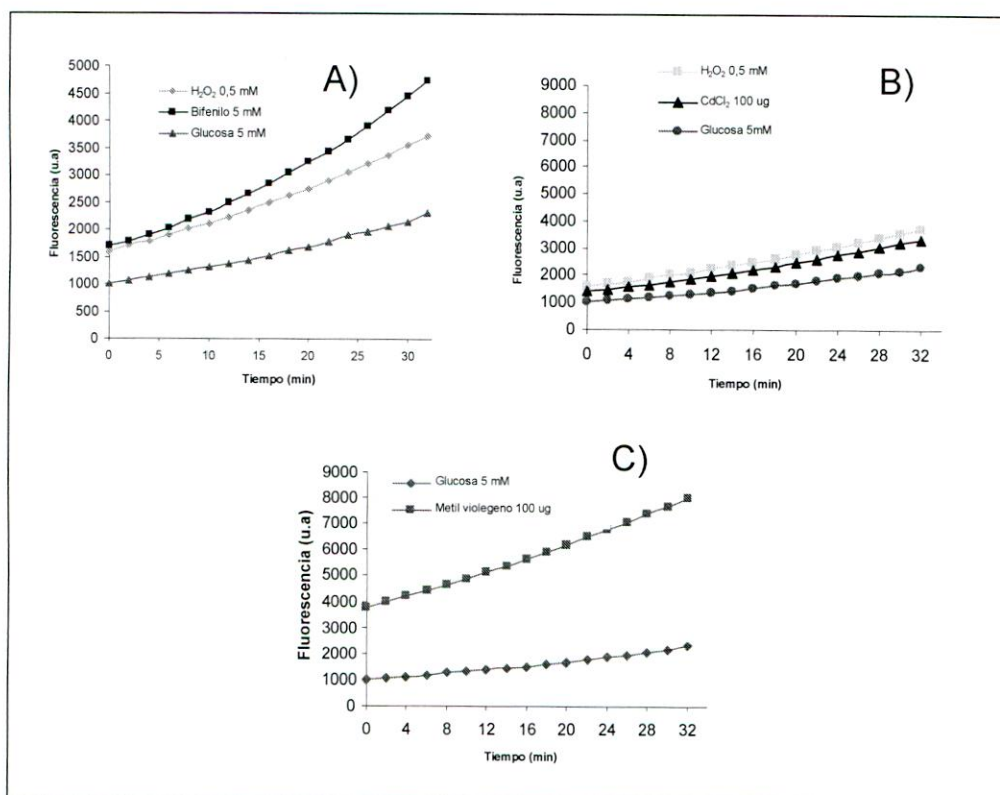


Figura 17. Generación de ROS intracelular en *B. xenovorans* LB400 durante la exposición a bifenilo. El contenido de ROS intracelular fue evaluado midiendo la activación de la sonda $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ en *B. xenovorans* LB400 tratadas con: (A) bifenilo (5 mM) y H_2O_2 (0,5 mM), (B) CdCl_2 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y H_2O_2 (0,5 mM), (C) metil viológeno (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Se determinó la emisión de fluorescencia de la sonda por exposición a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como control positivo de ROS. El H_2O_2 (0,5 mM) produjo una menor activación de la sonda que el bifenilo. Este efecto observado se debe probablemente a que

se utilizó una baja concentración de H_2O_2 . El otro inductor de estrés oxidativo utilizado fue metil viológeno, también llamado paraquat (dicloruro de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridinio). Se conoce que actúa como un generador de $O_2^{\cdot -}$ intracelular y de radicales OH secundarios (Goldstein *et al.*, 2002). Este compuesto generó una gran activación de la sonda, probablemente debido a la generación de superóxido ($O_2^{\cdot -}$) (Fig. 17 C). Además, se empleó cloruro de cadmio ($CdCl_2$), compuesto metálico que no genera ROS como control negativo (Fig. 17 B).

Se ha confirmado, mediante la activación de la sonda H_2DCF -DA que el bifenilo es generador de ROS en *B. xenovorans* LB400. El bifenilo aumenta el nivel de ROS en 237%, y el metil viológeno aumentó 331% con respecto al control con glucosa (Fig. 18). Los resultados sugieren que el bifenilo es un compuesto que es utilizado como fuente de carbono y actúa como un estresor químico asociado al estrés oxidativo.

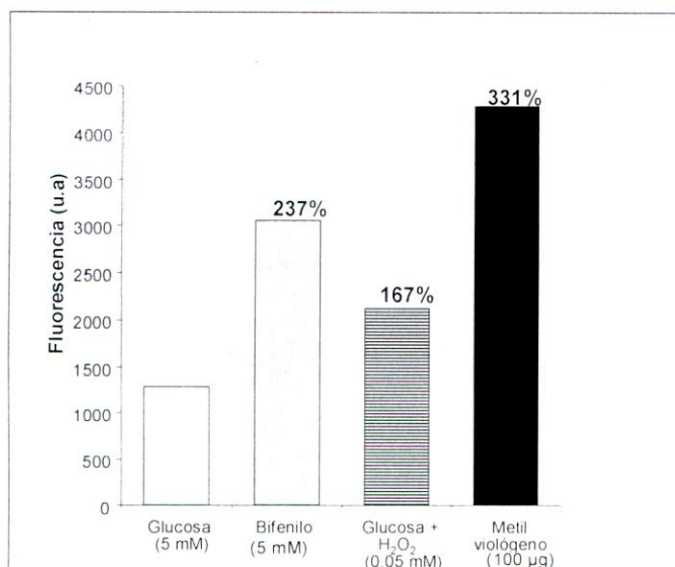


Figura 18. Generación de ROS intracelular por la exposición de *B. xenovorans* LB400 a bifenilo.

2.4 Efecto de la exposición a bifenilo sobre la membrana celular

Con la finalidad de estudiar el estrés oxidativo por bifenilo, se analizó otros parámetros indicadores de ROS en células de *B. xenovorans* LB400. La generación de productos de peroxidación de membranas es consecuencia directa de la acción de ROS al interior de la célula. Se evaluó el nivel de peroxidación de membranas mediante la cuantificación de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs), que es un reflejo de los niveles de malondialdehído, un producto final de lipoperoxidación (Schuh *et al.*, 1975).

La exposición a bifenilo generó un aumento en productos de peroxidación (medidos como TBARs) evidenciando un daño no despreciable en la membrana celular, probablemente producto de las ROS generadas (Fig. 19). Existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$).

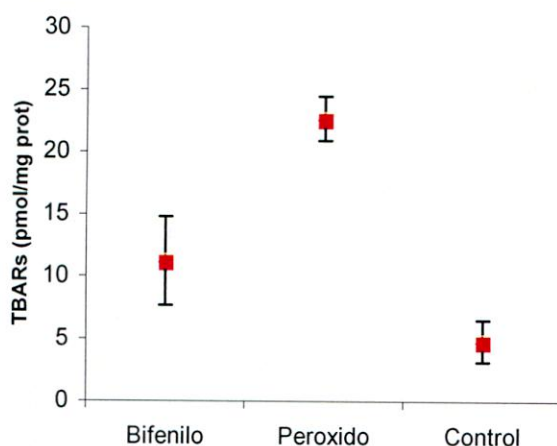


Figura 19. Efecto de la exposición a bifenilo sobre la peroxidación de membranas. Células de *B. xenovorans* LB400 se expusieron a bifenilo (5 mM) o H_2O_2 (100 μ M) por 60 min y se determinaron las TBARs. Como control las células se mantuvieron en glucosa (5 mM). Los resultados son expresados como el valor promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. Existe diferencia significativa ($p = 0,027$; $p < 0,05$).

2.5 Efecto de la exposición a bifenilo sobre enzimas antioxidantes

Se determinó si la exposición a bifenilo afecta la actividad de la enzima catalasa (CAT), enzima encargada de reducir la concentración intracelular de peróxido de hidrógeno. La exposición a bifenilo generó un aumento en la actividad CAT, sugiriendo que el efecto de bifenilo involucra la generación de peróxido de hidrogeno al interior de la célula (datos no mostrados).

2.6 Estudios proteómicos

Existen diversos estudios de la respuesta molecular global en diversas bacterias a cambios desfavorables en su medio (Blom *et al.*, 1992; Gage y Neidhardt, 1993; Giuffrida *et al.*, 2001; Leichert *et al.*, 2003). Un estudio reciente en *B. xenovorans* LB400 (Agulló *et al.*, 2007), caracteriza su respuesta molecular durante el crecimiento en bifenilo o durante la

exposición a este compuesto y a 4-CB. Bajo estas condiciones muestra que se inducen diversas enzimas asociadas a estrés general y oxidativo por la exposición a (cloro)bifenilos.

Los resultados obtenidos en células de *B. xenovorans* LB400 crecidas en bifenilo (5 mM) y con la utilización de la sonda sensible a estrés oxidativo, H₂DCF-DA, mostraron un importante aumento en la fluorescencia (Fig. 17 A, 17 C). Este resultado confirmó que el bifenilo es un agente generador de especies reactivas de oxígeno al interior de la célula. Con el objetivo de confirmar aquello, en este trabajo se analizó la expresión global de proteínas de *B. xenovorans* LB400 durante el crecimiento en bifenilo y en peróxido de hidrógeno utilizando geles 2-D.

2.7 Identificación de las proteínas inducidas durante el crecimiento en bifenilo

Se cultivaron células *B. xenovorans* LB400 en glucosa (5 mM) o bifenilo (5 mM) hasta fase exponencial (Turbidez_{525nm} 0,5-0,6) y se determinó la respuesta del proteoma. Bajo estas condiciones, no se observó en el patrón de proteínas la represión de ninguna proteína.

La identificación de cada una de las proteínas inducidas por el crecimiento en bifenilo se muestran en Agulló *et al.* (2007). Cada proteína se identificó mediante la secuenciación del extremo amino-terminal (Secuenciación de EDMAN). Si el extremo N-terminal se encontraba bloqueado, se analizaron mediante espectrometría de masas de alta resolución (MALDI-TOF). Se obtuvo la identidad de las proteínas mediante el alineamiento con proteínas descritas en otros organismos.

Una de las proteínas inducidas durante el crecimiento en bifenilo fue identificada como AhpC (Fig 20). En bacterias aerobias y facultativas esta enzima tiene una actividad antioxidante, asociada no sólo a la detoxificación de hidroperóxido orgánico. Su sitio activo puede también acomodar virtualmente cualquier radical hidroperóxido y peróxido de hidrógeno. Incluso ha sido más eficiente en la eliminación de H₂O₂ que la catalasa (Costa e Imlay, 2001). Esta enzima está codificada por el gen *ahpC* (BxeB1205) localizada en el cromosoma 2 del genoma de LB400.

Asimismo, el crecimiento de *B. xenovorans* LB400 en glucosa con H₂O₂ a 0,6 mM incubada por 2 h, también muestra la inducción de AhpC (Fig 22). Por lo tanto, las aproximaciones proteómicas obtenidas confirman que el crecimiento en bifenilo, establece una condición de estrés oxidativo para la bacteria *B. xenovorans* LB400.

La búsqueda bioinformática del gen *ahpC* en la cepa LB400 muestra que este gen está agrupado con el gen *ahpF* (BxeB1206), como se ha observado en otras bacterias

(Fukumori y Kishii, 2001; Ochsner *et al.*, 2000). Sin embargo, la proteína AhpF no se evidenció en los geles 2-D.

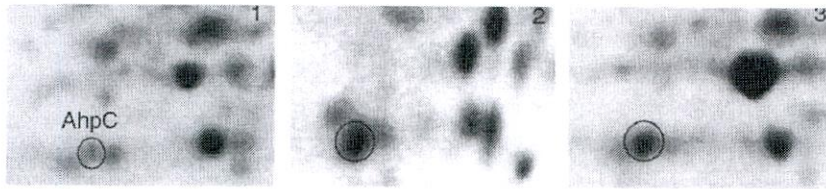


Figura 20. Inducción de la proteína AhpC, en la cepa LB400 por H₂O₂ y bifenilo. 1, células control; 2, células expuestas a H₂O₂ (0,6 mM); 3, células crecidas en bifenilo (5 mM). Las proteínas se separaron por electroforesis 2-D y se tiñeron con azul de Coomasie. Las figuras muestran un segmento de los geles 2-D.

3 GENERACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS RECOMBINANTES QUE SOBREEXPRESAN GENES QUE CODIFICAN PROTEÍNAS DE DEFENSA AL ESTRÉS OXIDATIVO

Durante la exposición de la cepa LB400 a bifenilo se determinó un aumento en los niveles de las ROS, lo que indicaría que la bacteria está sometida a estrés oxidativo en estas condiciones. Para aumentar la resistencia al estrés oxidativo de esta bacteria se propuso la construcción de bacterias recombinantes que sobreexpresan genes que codifican proteínas de defensa al estrés oxidativo.

3.1 Búsqueda *in silico* de los genes que codifican para proteínas de defensa al estrés oxidativo en *B. xenovorans* LB400

La búsqueda *in silico* de los genes que codifican para proteínas de defensa al estrés oxidativo en el genoma de la cepa LB400 se realizó mediante el análisis de comparación de secuencias de aminoácidos, que permitió la localización de los correspondientes genes ortólogos en el genoma de *B. xenovorans* LB400. Esta bacteria posee al menos 15 genes que codifican para diferentes proteínas de respuesta a estrés oxidativo (Fig. 21 y Tabla 15). Los genes ortólogos encontrados en la cepa LB400 corresponden a *ahpCF*, *katE*, *oxyR*, *sodB*, *hslUV*, *tolQRAB* y *cyoABCD*.

El gen *ahpC* se localizó en el cromosoma 2 y codifica una proteína que posee un 68 % de identidad en la secuencia de aminoácidos con AhpC de *Salmonella typhimurium* (Fig. 21, Tabla 15). La subunidad AhpF corresponde a una flavoproteína reductasa dependiente de NAD(P)H, que reduce la subunidad AhpC. En el genoma de la cepa LB400, se localizó el gen *katE*, que codifica una catalasa. Esta enzima es ubicua y protege a los organismos

aerobios de los efectos tóxicos del H_2O_2 . La mayoría de las bacterias poseen múltiples isoenzimas de catalasa, que están codificadas por distintos genes (Lowen *et al.*, 1985). El gen *katE* de la cepa LB400 codifica una catalasa monofuncional y se localiza en el cromosoma 1. El producto génico codificado por *katE* en la cepa LB400 posee una identidad de 68% en secuencias de aminoácidos KatE de *Vibrio salmonicida*. Esta enzima participa en la conversión de H_2O_2 a O_2 molecular y H_2O (Halliwell y Gutteridge, 1986). El gen de la enzima catalasa se encuentra ligada al gen *oxyR*, que codifica un regulador transcripcional de la familia de proteínas LysR (Fig. 21).

OxyR es un factor de transcripción que controla la expresión del regulón OxyR, que incluye aproximadamente diez genes (Dempfle, 1999) (Tabla 1). Esta familia tiene la característica de regular positivamente sus genes blancos (Kim *et al.*, 2002).

La búsqueda *in silico* en el genoma de *B. xenovorans* LB400 reveló la existencia de un gen *sodB* (Fig 21), que codifica una superóxido dismutasa. Esta enzima tiene un 72 % de identidad con SodB de *P. putida*. La superóxido dismutasa cataliza la reacción de $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 (Fridovich, 1997). La función más importante de esta enzima es la protección indirecta del radical OH^{\cdot} . Esta enzima también protege del daño directo causado por $O_2^{\cdot-}$ (Keyer e Imlay, 1996). El gen *sodB* se localiza en el cromosoma 1 de la cepa LB400. En el vecindario de este gen se localiza un gen que codifica una exodeoxirribonucleasa (subunidad larga VII) (Fig 21).

La búsqueda de genes ortólogos que participan en la respuesta a estrés oxidativo en el genoma de *B. xenovorans* LB400 permitió localizar otros dos agrupamientos génicos (*cluster*). Los genes *tol* están agrupados como *tolQRAB* (Fig 21). Este cluster se localizó en el cromosoma 1 de la cepa LB400. Las proteínas Tol se requieren para mantener la estabilidad de la membrana externa (Bernadac *et al.*, 1998). Los genes *cyo* están agrupados como *cyoABCD* (Fig 21) en el cromosoma 2. Estos genes codifican proteínas que protegen a las células del estrés oxidativo causado por el H_2O_2 y paraquat (Lindqvist *et al.*, 2000).

En *B. xenovorans* LB400 los genes que codifican el complejo HslVU se localizan en el cromosoma 1. El gen *hslU* de LB400 codifica una proteína que posee 67 % de identidad con HslU de *P. fluorescens*. El complejo HslVU es una proteasa bacteriana dependiente de ATP, que comprende la chaperona HslU y la peptidasa HslV y que es análogo al proteosoma 26S de eucariontes. Este complejo forma un cilindro proteolítico y juega un rol esencial en regular los niveles de proteínas regulatorias claves y la eliminación de polipéptidos anormales (Azim y Noor, 2007) (Fig 21).

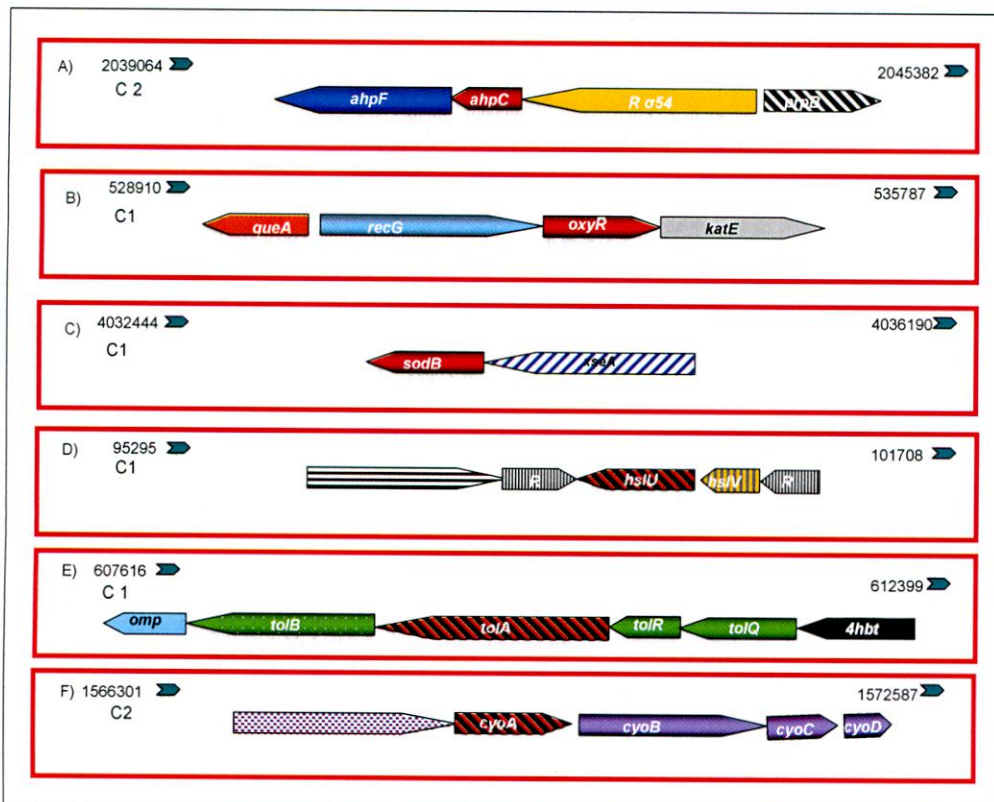


Figura 21. Organización genómica de genes de estrés oxidativo en *B. xenovorans* LB400.

Representando en rojo los genes elegidos para trabajar en esta Tesis para sobreexpresión (*ahpC*, *oxyR*, *sodB*) y para en rojo a rayas oblicuas para construcción de plásmidos recombianantes (*hslU*, *tolA*, *cyoA*): en blanco a rayas verticales negras, gen regulador. a) en azul, el gen *ahpF* que codifica para la alquil hidroperóxido reductasa subunidad F; en rojo, el gen *ahpC* que codifica para la alquil hidroperóxido reductasa; en amarillo, el gen sigma 54 que codifica a un regulador transcripcional específico; en negro a rayas grises el gen *prpB* que codifica a una putativa carboxivinilo-carboxifosfonato fosforilmutasa b) en naranja el gen *queA* que codifica para ribosiltransferasa-isomerasa; en celeste, el gen *recG* que codifica para DNA helicasa dependiente de ATP; en rojo, el gen *oxyR* que codifica un regulador transcripcional de la familia LysR; en gris, el gen *katE* que codifica para la catalasa; c) en rojo, el gen *sodB* que codifica para la superóxido dismutasa; en rayas diagonales azules, el gen *xseA* que codifica para la exodeoxiribonucleasa subunidad larga VII; d) en rayas horizontales negras, gen que codifica para la histidina quinasa; en blanco a rayas verticales negras, regulador transcripcional de dos componentes; en rojo, el gen *hslU* que codifica para la proteasa dependiente de ATP; en amarillo con rayas grises, gen *hslV* que codifica para proteína proteasa peptidasa; en blanco con rayas negras verticales, gen *dksA* que codifica para el regulador transcripcional de la familia TraR/DksA; e) en turquesa claro, gen *omp* que codifica a una proteína de membrana externa; en verde, gen *tolB* que codifica a una proteína periplásmica del complejo TolQRAB de la membrana interna; en color negro, gen que codifica para 4 hidroxibenzoil CoA tioesterasa; f) en blanco con puntos negros, gen que codifica para una quinona oxidoreductasa; en rojo, gen *cyoA* que codifica para la ubiquinol oxidasa subunidad II, en morado el cluster *cyoBCD* que codifican para las oxidasa subunidad I, III y IV. C1 indica cromosoma 1 y C2 cromosoma 2 de la cepa LB400.

Tabla 15. Genes de respuesta a estrés oxidativo y sus productos de *B. xenovorans* LB400.

Gen (Bxe no.)	Producto génico (aa)	Productos génicos relacionados			
		Nombre	Función	Organismo	% identidad
<i>ahpC</i> (BxeB1205)	AhpC (187)	AhpC	Alquilo hidroperoxido reductasa	<i>Salmonella typhimurium</i>	68%
<i>ahpF</i> (BxeB1206)	AhpF (530)	AhpF	Alquilo hidroperoxido reductasa subunidad F	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	71%
<i>katE</i> (BxeA3986)	KatE (484)	KatE	Catalasa	<i>Vibrio salmonicida</i>	68%
<i>oxyR</i> (BxeA3987)	OxyR (319)	OxyR	Regulador transcripcional (Familia LysR)	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	52%
<i>sodB</i> (BxeA0769)	SodB (192)	SodB	Superoxido dismutasa Fe/Mn	<i>Pseudomonas putida</i>	72%
<i>hslU</i> (BxeA4381)	HslU (448)	HslU	Proteína choque térmico	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	67%

3.1.2 Selección de los genes para sobreexpresión

La selección de los genes candidatos para la sobreexpresión en la cepa LB400 (*ahpCF*, *sodB* y *oxyR*, Tabla 12) estuvo basada en los estudios proteómicos que indicaron la inducción de AhpC durante el crecimiento de la cepa LB400 en bifenilo y en la función relevante que cumplen estos tres genes de defensa al estrés oxidativo.

OxyR es un factor de transcripción que controla la expresión de aproximadamente diez genes (Dempfle, 1999): catalasa-hidroperoxidasa I (*katG*), alquilo hidroperóxido reductasa (*ahpCF*), glutatión reductasa (*gorA*), glutaredoxina (*grxA*), una proteína de unión al DNA (Dps), y varios otros genes (Tabla 1, Gonzalez-Flecha y Dempfle, 2000). Estudios realizados por Storz *et al.* (1990) indicaron que la sobreexpresión de OxyR aumentó la expresión del *cluster ahpCF*. La proteína OxyR pertenece a la familia conocida del tipo LysR, proteínas de unión al DNA que activan la expresión de sus genes blancos (Kim *et al.*, 2002).

Alquil hidroperóxido reductasa subunidad C (AhpC) es una proteína que aumentó su síntesis cuando la cepa LB400 creció en bifenilo (Agulló *et al.*, 2007). En *E.coli* K12 la sobreproducción de la enzima alquil hidroperoxido reductasa subunidad C (AhpC) aumentó la resistencia al compuesto indol que es tóxico para la bacteria (Garbe *et al.*, 2000). En *B. pseudomallei*, cuando sobreexpresó el gen *ahpC* protegió a las células del estrés causado por intermediarios reactivos de nitrógeno (Loprasert *et al.*, 2003).

La proteína SodB es una proteína que protege del daño directo causado por $O_2^{\cdot -}$ (Keyer e Imlay, 1996) y también de la protección indirecta del radical OH^{\cdot} . Recientemente, se ha demostrado que en *Pseudomonas sp.* cepa As1, la sobreexpresión de enzimas antioxidantes (ferredoxina reductasa y superóxido dismutasa), ayudan a la tolerancia oxidativa durante la biodegradación del naftaleno (Kang *et al.*, 2007).

Estos antecedentes sugieren que la sobreexpresión en la cepa LB400 de los genes *oxyR*, *sodB* y *ahpC* podría contrarrestar el estrés oxidativo generado por los bifenilos.

3.2 Generación de cepas recombinantes de *B. xenovorans* LB400

De acuerdo a los antecedentes descritos anteriormente, se seleccionaron los genes que codifican el regulador transcripcional (*oxyR*) y las enzimas alquilo hidropéroxido reductasa (*ahpCF*) y superóxido dismutasa (*sodB*) de la cepa LB400.

Los genes *oxyR*, *ahpCF*, *sodB* de la cepa LB400 fueron amplificados por PCR y clonados en el vector de amplio espectro de huésped pIZ1016 (Fig. 22, Tabla 3). El clonamiento de un gen en este vector permite una regulación de su expresión debido a que la transcripción desde el promotor P_{lac} es inducida por IPTG. La Figura 22 muestra la construcción del plásmido recombinante pIZ*ahpCF*. La misma estrategia se empleó para la generación de los plásmidos recombinantes pIZ*sodB* y pIZ*oxyR*. El vector pIZ sin inserto (pIZ1016) se empleó como control negativo. Estos plásmidos se incorporaron en *E. coli* s17 λ pir por transformación mediante el método de choque térmico. Los genes *oxyR*, *sodB* y *ahpC*, se transfirieron de *E. coli* s17 λ pir a la cepa LB400 mediante conjugación biparental. Mediante electroforesis en gel de agarosa se confirmó el tamaño de cada uno de los plásmidos recombinantes (pIZ*ahpCF* y pIZ*oxyR*) en la cepa LB400 (Fig. 23).

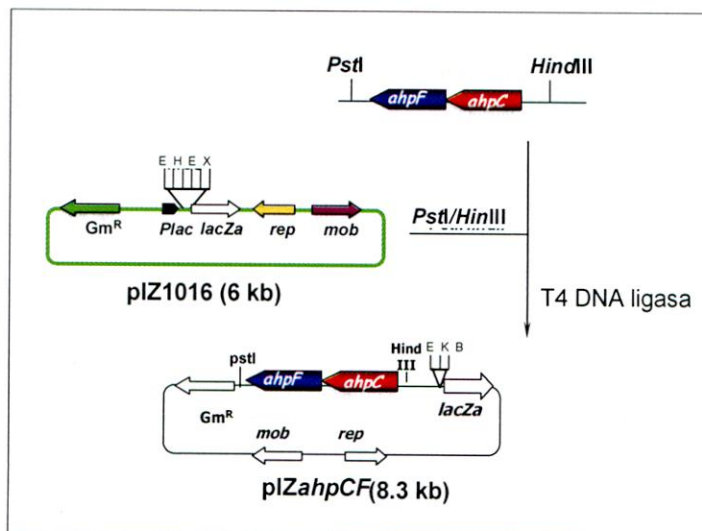


Figura 22. Representación esquemática de la construcción del plásmido pIZahpCF. El plásmido pIZ fue digerido con las enzimas de restricción *PstI* y *HindIII*. Los genes *ahpCF* amplificados por PCR se ligaron al plásmido pIZ. Se generó un plásmido de 8,3 kb. Las abreviaturas utilizadas son: *lacZα*, fragmento que codifica la subunidad α de la β -galactosidasa; *Gm^R*, gen que confiere resistencia a gentamicina; *rep* y *mob*, genes de replicación y movilización del plásmido pIZ1016, respectivamente; *P_{lac}*, promotor lac. Las enzimas de restricción señaladas son: B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; K, *Kpn*I; X, *Xba*I. Los genes *ahpC* y *ahpF* se ilustran en rojo y azul, respectivamente.

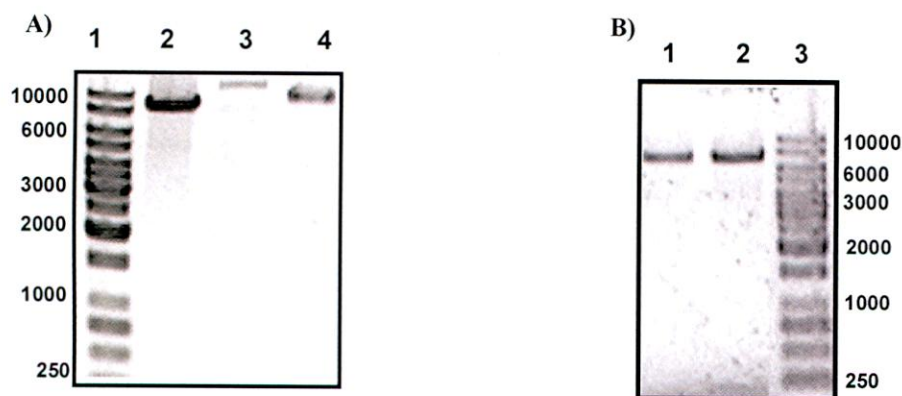


Figura 23. Electroforesis en gel de agarosa (0,7%) de plásmidos recombinantes. A) 1, estándares de masa molecular (1 kb DNA ladder); 2, LB400 pIZahpCF (clon 8) 8.332pb; 3, LB400 silvestre; 4, S17 λ pir pIZahpCF. B) 1, S17 λ pir pIZoxyR; 2, LB400 pIZoxyR (clon 11) 7.011pb; 3, estándares de masa molecular (1 kb DNA ladder).

Las cepas recombinantes sobreexpresaron los genes *oxyR*, *sodB* y *ahpC* presentes en el plásmido recombinante. Se ilustra el aumento de la síntesis de SodB por la cepa recombinante LB400pIZsodB (Fig. 24). En la Tabla 16 se incluyen las cepas obtenidas en esta Tesis y depositadas en el cepario del LMMBA de la Universidad Técnica Santa María.

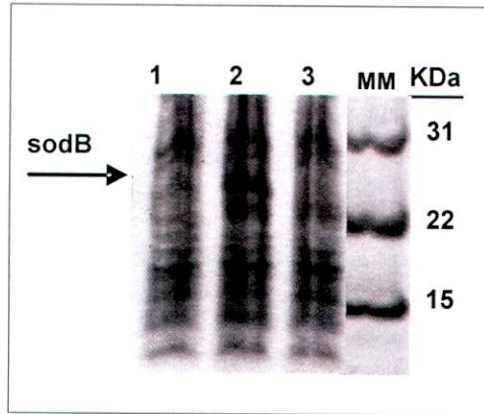


Figura 24. Patrón de proteínas totales de la cepa recombinante de *B. xenovorans* LB400pIZsodB. Las proteínas totales se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 12,5%. Se muestra la superproducción de la proteína SodB (señalada con una flecha). Carril 1, LB400 silvestre; carril 2, LB400pIZsodB inducido con IPTG 0,2 mM; carril 3, LB400 pIZvacío (control negativo). MM, estándares de masa molecular.

Tabla 16. Cepas bacterianas recombinantes que sobreexpresan genes de estrés oxidativo

Cepas	Construcción	AB ^R
LB400pIZahpC	LB400 que posee el vector pIZ1016 que contiene el gen <i>ahpC</i> .	Gm ₁₀
LB400pIZsodB	LB400 que posee el vector pIZ1016 que contiene el gen <i>sodB</i> .	Gm ₁₀
LB400pIZoxyR	LB400 que posee el vector pIZ1016 que contiene el gen <i>oxyR</i> .	Gm ₁₀

4. CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS RECOMBINANTES

Las cepas de *B. xenovorans* LB400 que sobreexpresan los genes *oxyR*, *sodB* y *ahpC* se caracterizaron mediante estudios de crecimiento en bifenilo, degradación de bifenilo, morfología y estudios proteómicos. Los resultados obtenidos se detallan a continuación:

4.1 Crecimiento en bifenilo

Se analizó el crecimiento de las distintas cepas recombinantes LB400pIZoxyR, LB400pIZsodB y LB400pIZahpC empleando medio mineral M9 y bifenilo a distintas concentraciones (5 mM, 25 mM, 50 mM) como única fuente de carbono y energía. El crecimiento se determinó por medición de turbidez a 525 nm. Las cepas recombinantes crecieron a las distintas concentraciones de bifenilo en forma similar a la cepa control ($p > 0.05$, a un nivel de significancia del 95 %) (datos no mostrados). Sin embargo, al estudiar el crecimiento en medio mínimo con bifenilo como fuente de carbono y determinando UFC/ml

la cepa recombinante LB400pIZoxyR alcanzó una mayor biomasa (1.45×10^9 UFC/ml) que la cepa control LB400pIZ1016 (4.18×10^8 UFC/ml) (Fig. 25).

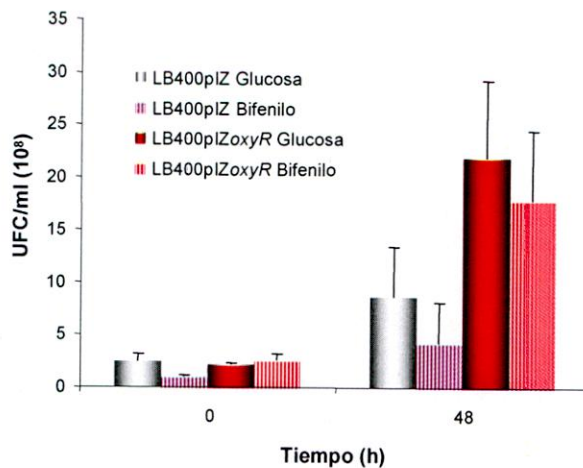


Figura 25. Crecimiento de las cepas recombinantes de *B. xenovorans* (LB400pIZ y LB400pIZoxyR) en bifenilo y glucosa. Las cepas se crecieron durante 48 h, utilizando bifenilo o glucosa (5 mM) como única fuente de carbono y energía.

4.2 Efecto del inductor de estrés oxidativo H_2O_2 sobre la viabilidad de las cepas recombinantes.

Se estudió si la sobreexpresión de los genes *oxyR* y *ahpC* en las cepas LB400pIZoxyR, LB400pIZahpC y LB400pIZ1016 aumenta la resistencia frente a H_2O_2 . Cada una de las cepas crecida en medio enriquecido LB hasta fase exponencial (turbidez de 0.4) se expuso a H_2O_2 . La cepa que sobreexpresa el gen *oxyR* mostró una mayor sobrevivencia que la cepa control (LB400pIZ) y que la cepa LB400pIZahpC (Figura 26). El análisis estadístico indicó que las diferencias observadas entre estas cepas son significativas ($p < 0,05$). En base a estos resultados se puede sugerir que la cepa recombinante LB400pIZoxyR es una cepa más tolerante al estrés oxidativo generado por el peróxido de hidrógeno.

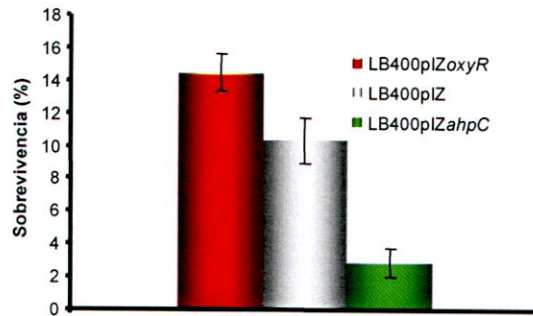


Figura 26. Efecto de la exposición a peróxido de hidrógeno sobre la viabilidad de las bacterias recombinantes (LB400pIZoxyR, LB400pIZahpC y LB400pIZ). Cultivos crecidos en medio LB hasta fase exponencial (T_{525nm} de 0,4) se expusieron a H_2O_2 (2,5 mM) por 30 min. Los resultados son expresados como el valor promedio \pm desviación estándar de más de tres experimentos independientes. El análisis estadístico indicó que existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las cepas recombinantes.

4.3 Degradación de bifenilo

Se estudió la degradación de bifenilo en las cepas recombinantes LB400pIZoxyR, LB400pIZahpC, LB400pIZsodB y LB400pIZ1016. Para ello, se realizó un ensayo simple de degradación con células en reposo. Las bacterias se crecieron en medio mineral M9 y bifenilo (5 mM) como fuente de carbono hasta fase exponencial media (turbidez $_{525nm}$ 0,5), se centrifugaron y se expusieron nuevamente a bifenilo a una concentración de 0,04 mM. En estas condiciones, las cepas recombinantes no mostraron una mayor degradación de bifenilo que la cepa control (LB400pIZ1016) (Fig. 27). Todas las cepas alcanzaron una degradación de aproximadamente 80 % de bifenilo a los 120 min.

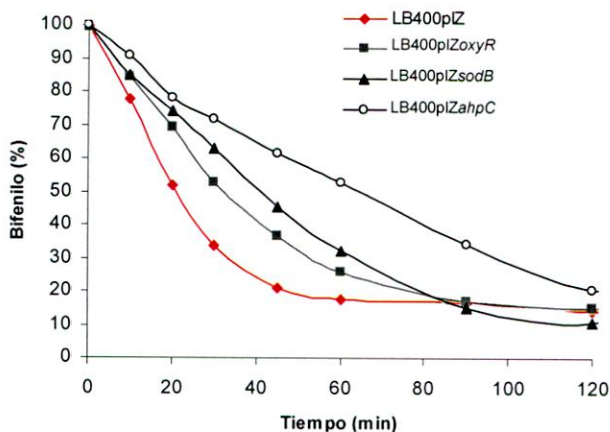


Figura 27. Estudio de degradación de bifenilo por las cepas de *B. xenovorans* LB400 recombinantes (LB400pIZ, LB400pIZahpC, LB400pIZsodB, LB400pIZoxyR). Para el ensayo de degradación las cepas recombinantes se expusieron a una concentración de 0,04 mM de bifenilo.

4.4 Morfología de las cepas bacterianas recombinantes

Para estudiar el efecto del bifenilo sobre la morfología celular de las bacterias recombinantes se empleó microscopía electrónica de transmisión. Las células crecieron hasta fase exponencial tardía en bifenilo o glucosa (5 mM) como fuente de carbono. Se observaron cambios en la morfología celular por el crecimiento en bifenilo (Figura 28, A-D). En esta condición la cepa recombinante LB400pIZ1016 presenta una membrana citoplasmática de aspecto difuso e irregular y ausencia de gránulos en su citoplasma (Fig. 28 A). La bacteria LB400pIZoxyR muestra una membrana externa bien definida, un espacio periplásmico más ancho y estructuras como gránulos de color blanco en el citoplasma (Fig. 28 B). La cepa LB400pIZsodB muestra una membrana citoplasmática de superficie irregular y difusa hacia los polos y ausencia de gránulos (Fig. 28 C). La cepa LB400pIZahpC muestra la membrana externa difusa y la presencia de algunos gránulos de color blanco (Fig. 28 D). La figura 28 E-H muestra las morfologías de las cepas recombinantes crecidas en glucosa. En esta condición todas las cepas muestran membranas externas bien definidas y gránulos blancos en su citoplasma. Algunas células de las cepas recombinante presentan adicionalmente gránulos densos de color negro, que corresponderían a polifosfatos. La cepa LB400pIZoxyR presenta una membrana interna más definida y un mayor espacio periplásmico que las células recombinantes LB400pIZ1016 (Fig. 28 E y F). La cepa LB400pIZsodB presenta un gran número de gránulos blancos en el citoplasma. Finalmente, la cepa recombinante LB400pIZahpC no mostró diferencias respecto al control (Fig. 28 E y H).

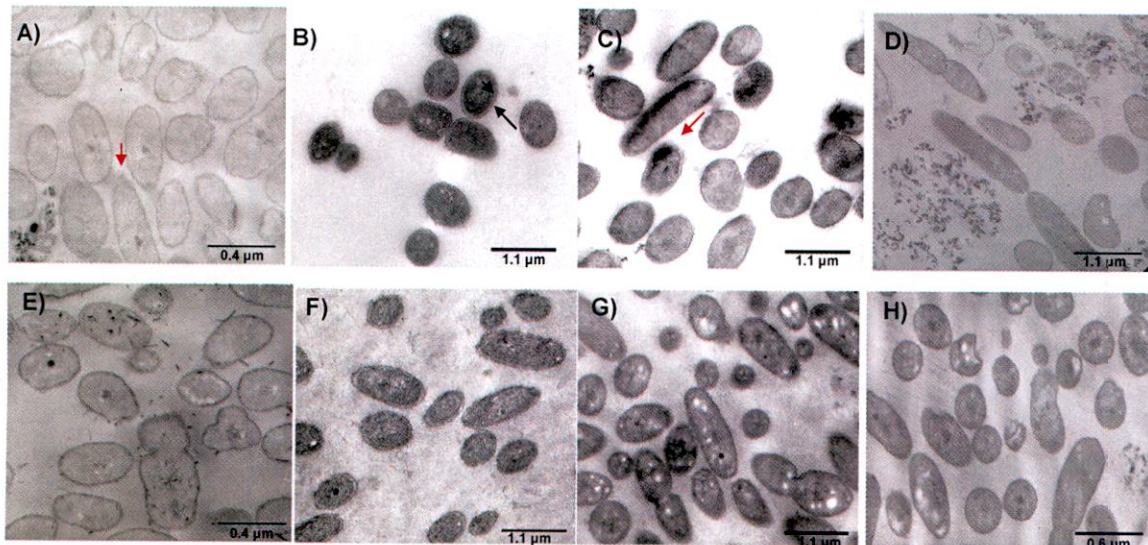


Figura 28. Micrografías de cepas recombinantes de *B. xenovorans* LB400 (LB400pIZ, LB400pIZoxyR, LB400pIZsodB y LB400pIZahpC) crecidas en bifenílo y glucosa. Las células crecieron en medio mínimo M9 con glucosa o bifenílo (5mM) como fuente de carbono, hasta fase exponencial tardía (T_{525nm} 0,9). Los genes con actividad antioxidante se indujeron con IPTG. A) LB400pIZ bifenílo B) LB400pIZoxyR bifenílo C) LB400pIZsodB bifenílo D) LB400pIZahpC bifenílo E) LB400pIZ glucosa F) LB400pIZoxyR glucosa G) LB400pIZsodB glucosa, H) LB400pIZahpC glucosa. Las flechas y las puntas de flechas indican la membrana externa y membrana interna, respectivamente. Las flechas de color rojo, indican membrana laxa. Las imágenes son representativas de al menos 10 campos observados.

4.5 Medición de superóxido intracelular

Para evaluar si la sobreexpresión del gen *sodB* en la cepa recombinante LB400pIZsodB protege a esta bacteria del superóxido generado por el paraquat (metil viológeno) o posiblemente por el bifenílo, se realizó el ensayo NBT. Se incubaron las cepas con bifenílo (1 mM), metil viológeno (0.75 mM) y glucosa como control. En las diferentes condiciones probadas se observó una leve disminución del superóxido intracelular en las condiciones probadas (Fig 29).

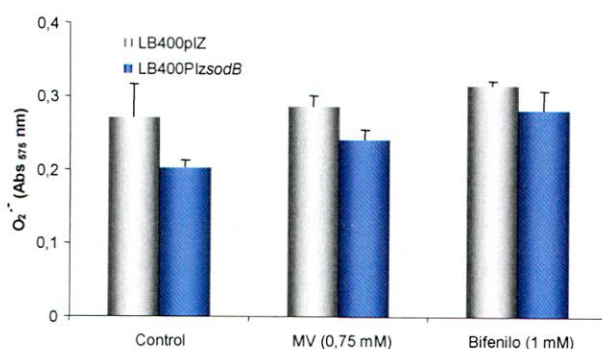


Figura 29. Disminución del superóxido intracelular en la bacteria recombinante LB400pIZsodB. MV: metil viológeno.

4.6 Análisis proteómico de las cepas recombinantes: LB400pIZoxyR, LB400pIZsodB, LB400pIZahpC y LB400pIZ1016

4.6.1 Identificación de proteínas inducidas en las bacterias recombinantes de la cepa LB400 crecidas en bifenilo

Con el objeto de conocer los cambios en el proteoma de las cepas bacterianas recombinantes durante la exposición a bifenilo, se analizó el patrón de proteínas mediante electroforesis 2-D. Para ello, las células fueron cultivadas en medio mínimo con bifenilo o glucosa (5 mM) como fuente de carbono hasta alcanzar la fase exponencial media (turbidez_{525nm} 0.5 a 0.7). Se comparó el patrón de proteínas totales solubles de las cepas LB400pIZoxyR, LB400pIZsodB, LB400pIZahpC y LB400pIZ1016. De acuerdo a los patrones de proteínas analizados de las cepas recombinantes, al menos en 20 proteínas se observaron cambios en sus niveles durante el crecimiento en bifenilo, con respecto a la condición control (glucosa). Estas fueron identificadas por secuenciación N- terminal o MALDI-TOF (Tabla 17).

En la cepa recombinante LB400pIZoxyR se observó la inducción de siete proteínas durante el crecimiento en bifenilo (Fig. 30 B y C). Se determinó la mayor inducción de la proteína 8, identificada como catecol 1,2-dioxigenasa (C1, 2O), estando inducida más de seis veces. Esta enzima corresponde a la primera enzima de la vía degradativa tipo *orto* del catecol, subsiguiente a la ruta degradativa del benzoato. Es codificada por el gen *catA* y se localiza en el cromosoma 1 de la cepa LB400. Asimismo, se observó que tanto la proteína A2 como D presentan una inducción más de 4 veces con respecto al control en glucosa (Figura 30 C). Ambas enzimas pertenecen a la ruta degradativa del bifenilo. La proteína A2 fue identificada como la subunidad menor (BphA2) de la enzima bifenilo 2,3-dioxigenasa

(Erickson y Mondello, 1992; Hofer *et al.*, 1993; Seeger *et al.*, 1997) y la D como 2-hidroxi-6-oxo-6-fenilhexa-2,4-dienoato hidrolasa (BphD). Las proteínas A1 y B, corresponden a la subunidad mayor (BphA1) de la enzima bifenilo 2,3-dioxigenasa y bifenilo-2,3-dihidrodiol-2,3-deshidrogenasa (BphB), respectivamente. Ambas enzimas, presentaron una inducción más de 2 veces con respecto al control.

La proteína 14, identificada como alquilo hidroperóxido reductasa (AhpC) se induce más de 2 veces con respecto al control (Figura 30 B y C). Esta enzima de respuesta a estrés oxidativo tiene por función la detoxificación de peróxido de hidrógeno y de hidroperóxidos.

La inducción de la proteína 1 se analiza como un caso particular ya que no es posible asociar el cambio de expresión a una única proteína. El análisis por MALDI-TOF reveló una mezcla de 3 proteínas que presentan idéntico punto isoeléctrico y la masa molecular semejante (Tabla 13, 1a, b, c). Una de las proteínas fue identificada como la enzima catalasa (*KatE*), asociada a la defensa del estrés oxidativo, localizada en el cromosoma1.

En la cepa LB400p*ZoxyR* en bifenilo se observó la fuerte represión de dos proteínas, identificada como la proteína 6-fosfogluconato deshidratasa (proteína 12) y la proteína periplásmica transportadora de maltosa (proteína 7,) reprimida 15 veces y 11 veces, respectivamente (Figura 30 C). Adicionalmente, se observó la represión (> 1,5 veces) de otras 9 proteínas (2, 3, 4, 5, 9, 10, 11, 13 y 15).

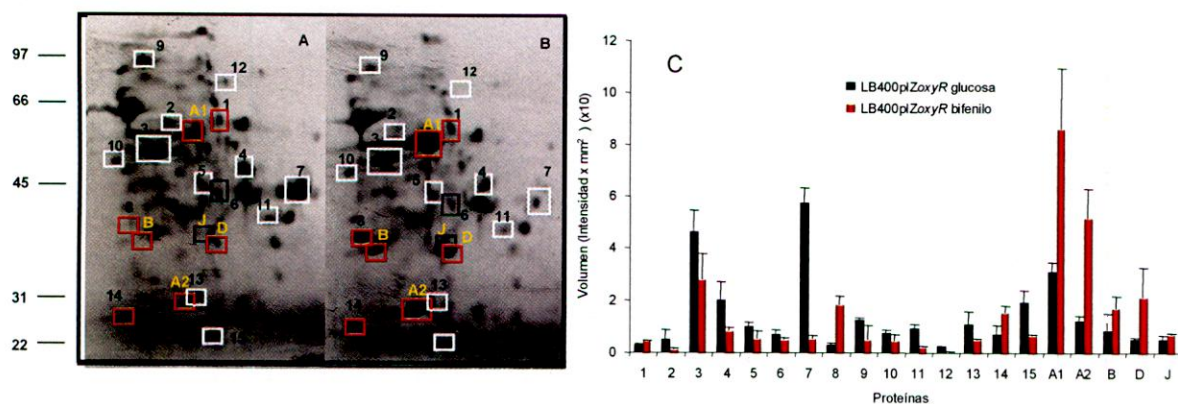


Figura 30. Patrón de proteínas totales de la cepa recombinante LB400p*ZoxyR* crecida en glucosa o en bifenilo. A, células control; B, crecimiento en bifenilo. Las proteínas se separaron por electroforesis 2-D y se tiñeron con azul de Coomassie. Las figuras muestran un segmento de los gels 2-D. Las proteínas inducidas (cuadro color rojo), reprimidas (cuadro color negro), no inducidas (cuadro color blanco), por bifenilo. Consideradas de al menos tres experimentos independientes. A la izquierda de los gels se muestra los estándares de masa molecular. C. Gráficas con los niveles de expresión de las proteínas crecidas en bifenilo o glucosa.

Tabla 17. Propiedades de las proteínas separadas por PAGE-2D

Proteína	Método	Nº Bxe	aa	Identificación	MM	pI
1 a	MALDI-TOF	BxeA1420	531	Aldehído deshidrogenasa	56	6,2
1 b	MALDI-TOF	BxeA0366	489	Glutamato sintasa	54	6,3
1 c	MALDI-TOF	BxeA3986	484	Catalasa	54	6,4
2	MALDI-TOF	BxeA0038	513	ATP sintasa F1, subunidad α	56	5,7
3	MALDI-TOF	BxeA0312	396	Factor de elongación Tu	43	5,4
4	MALDI-TOF	BxeA3448	371	Transportador de azúcar ABC, subunidad ATPasa	41	7,0
5	MALDI-TOF	BxeA0691	354	Fructosa bifosfato aldolasa, clase II	39	5,9
6	MALDI-TOF	BxeA3229	338	Ácido acetohidroxireductasa	36	6,2
7	MALDI-TOF	BxeA3451	415	Transportador de azúcar ABC (maltosa)	44	8,8
8	N-terminal	BxeA2109	302	Catecol 1,2 dioxigenasa	33	5,1
9		BxeA0793	701	Factor de elongación G	77	5,2
10	MALDI-TOF	BxeA1573	427	Enolasa	46	4,8
11	MALDI-TOF	BxeA0597	297	Transportador ABC (glutamato-aspartato)	33	9,0
12	MALDI-TOF	BxeA0589	634	6-fosfogluconato deshidratasa	67	6,4
13 a	MALDI-TOF	BxeA4134	207	Proteína ribosomal L25RpiY	22	5,9
13 b	MALDI-TOF	-----	201	Proteína ribosomal 5S	22	6,1
14	MALDI-TOF	BxeA1205	187	Alquilo hidropéroxido reductasa AhpC	21	5,1
15	MALDI-TOF	BxeA1544	190	Fasina	20	6,2
A1	N-terminal	BxeC1197	459	Subunidad mayor de bifenilo 2,3-dioxigenasa (BphA1)	51	6,0
A2	N-terminal	BxeC1196	213	Subunidad menor de bifenilo 2,3-dioxigenasa (BphA2)	22	5,5
B	MALDI-TOF	BxeC1192	277	Bifenilo cis-2,3-dihidroxi-2,3-dihidrodiol deshidrogenasa (BphB)	29	5,3
D	N-terminal	BxeC1186	286	2-hidroxi-6-oxo-6-fenilhexa-2,4-dienoato hidrolasa (BphD)	32	6,0
J	MALDI-TOF	BxeC1188	304	Acetaldehído deshidrogenasa (BphJ)	32	6,1

En la cepa recombinante LB400pI*ZsodB* se observó la inducción de once proteínas durante el crecimiento en bifenilo (Fig. 32 b). Se determinó la mayor inducción (> 10 veces) de las proteínas catecol 1,2-dioxigenasa (C1, 2O) (proteína 8), la enzima de la ruta de degradación del bifenilo BphA1 y la 6-fosfogluconato deshidratasa (proteína 12). Esta última proteína participa en el metabolismo del gluconato. Otras siete proteínas (5, 6, 11, 13, A2, D y J) fueron inducidas (>1,5 veces). Se observó la represión (> 2 veces) de cuatro proteínas (2, 7, 9 y 15).

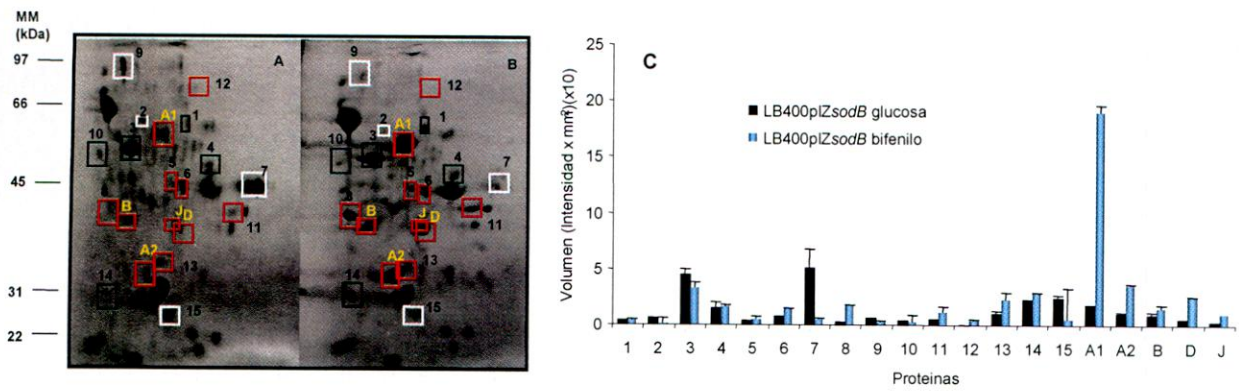


Figura 31. Patrón de proteínas totales de la cepa recombinante LB400pIZsodB crecida en glucosa o en biphenilo. A, células control; B, crecimiento en biphenilo. Las proteínas se separaron por electroforesis 2-D y fueron teñidos con azul de Coomassie. Las figuras muestran un segmento de los geles 2-D. Las proteínas inducidas (cuadro color rojo), reprimidas (cuadro color blanco), no inducidas (cuadro color negro), por biphenilo. Consideradas de al menos tres experimentos independientes. A la izquierda de los geles se muestra los estándares de masa molecular. C. Gráficas con los niveles de expresión de las proteínas crecidas en biphenilo o glucosa.

Se realizó el análisis de la expresión global de los niveles de proteínas en la cepa recombinante con sobreexpresión del gen *ahpC* crecida en biphenilo y crecida en glucosa (Fig. 32 A y B). Como resultado de dicho análisis, se observó la inducción de ocho proteínas, observándose la mayor inducción de la proteínas catecol 1,2-dioxigenasa (> 8 veces) (proteína 8), las enzimas de la ruta de degradación del biphenilo BphD y BphJ. Otras cinco proteínas (1, 13, 14, A1, A2) fueron inducidas a un nivel menor (>1,5 veces). Adicionalmente, se observó una fuerte represión (15 veces) en la condición de crecimiento en biphenilo de la proteína 7, que corresponde al transportador de maltosa. También se observó la represión (>1.5 veces) de otras cinco proteínas (3, 4, 5, 11 y 15) (Fig. 32 C).

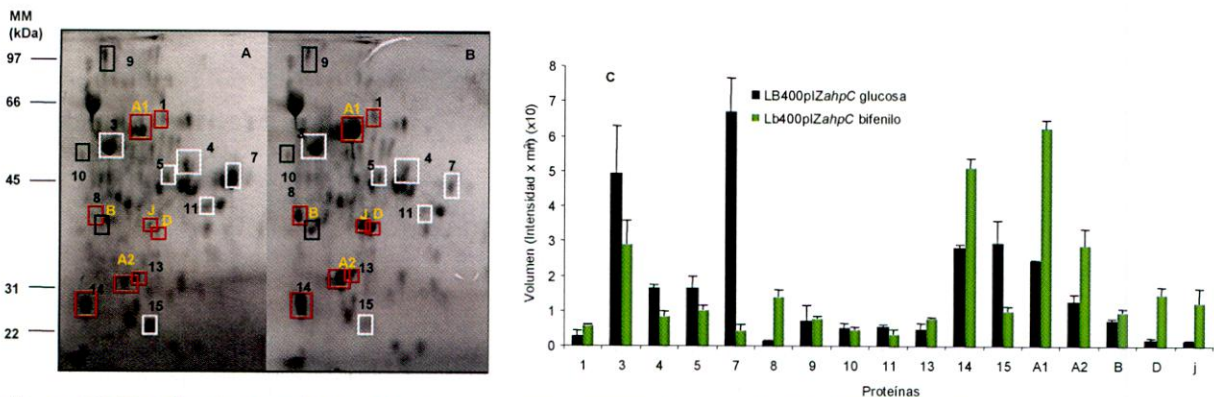


Figura 32. Patrón de proteínas totales de la cepa recombinante LB400pIZahpC crecida en glucosa y en biphenilo. A, células control; B, crecimiento en biphenilo. Las proteínas se separaron por electroforesis 2-D y fueron teñidos con azul de Coomassie. Las figuras muestran un segmento de los geles 2-D. Las proteínas inducidas (cuadro color rojo), reprimidas (cuadro color blanco), no inducidas (cuadro color negro), por biphenilo. Consideradas de al menos tres experimentos independientes. A la izquierda de los geles se muestra los estándares de masa molecular. C. Gráficas con los niveles de expresión de las proteínas crecidas en biphenilo o glucosa.

De las proteínas inducidas identificadas en la cepa LB400pIZ1016 (cepa control) crecida en bifenilo, se observó la inducción de siete proteínas (Fig. 33 B y C). Nuevamente se observó la fuerte inducción ($> 3,5$ veces) de la proteínas catecol 1,2-dioxigenasa (C1, 2O) (proteína 8) y de la proteína de defensa al estrés oxidativo identificada como alquilo hidroperóxido reductasa (AhpC). Las otras cinco proteínas pertenecen a la ruta degradativa del bifenilo (BphA1, BphA2, BphB, BphD y BphJ). Además se observó reprimido (13 veces) el transportador de maltosa (proteína 7). Asimismo, se observó la represión (> 2 veces) de otras tres proteínas (4,12 y 15).

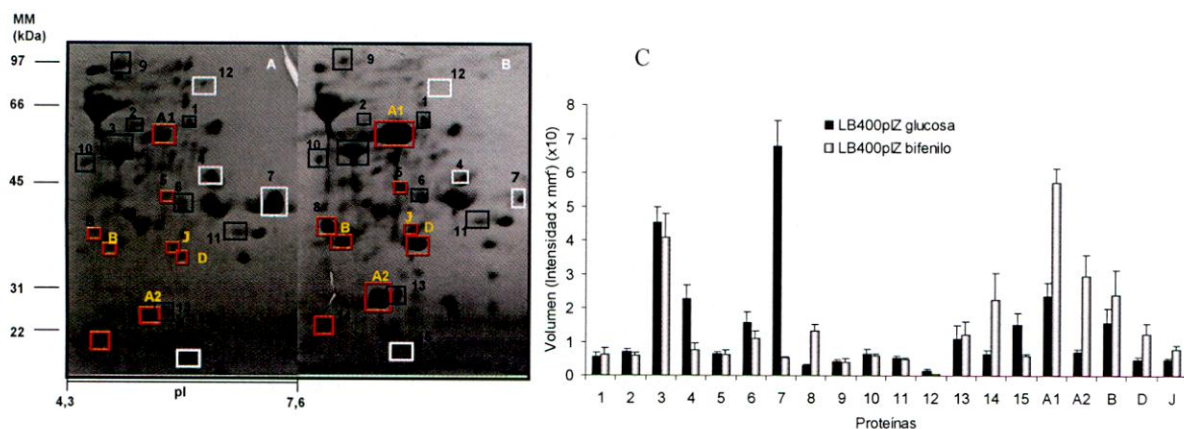


Figura 33. Patrón de proteínas totales de la cepa recombinante LB400pIZ crecida en glucosa o en bifenilo. A, células control; B, crecimiento en bifenilo. Las proteínas se separaron por electroforesis 2-D y fueron teñidos con azul de Coomasie. Las figuras muestran un segmento de los geles 2-D. Las proteínas inducidas (cuadro color rojo), reprimidas (cuadro color blanco), no inducidas (cuadro color negro), por bifenilo. Consideradas de al menos tres experimentos independientes. A la izquierda de los geles se muestra los estándares de masa molecular. C. Gráficas con los niveles de expresión de las proteínas crecidas en bifenilo o glucosa.

Finalmente, se compararon los patrones de proteínas totales de bacterias crecidas en bifenilo de las cepas recombinantes con la cepa LB400pIZ1016. Al comparar los patrones de proteínas totales de la cepa recombinante LB400pIZoxyR con la cepa control, se determinó que el bifenilo induce la expresión de las enzimas de la ruta de degradación del bifenilo BphA1, BphA2 y BphD ($>1,5$ veces). En la cepa LB400pIZsodB se observó una fuerte inducción (>7 veces) de la enzima 6-fosfogluconato deshidratasa y la inducción de la subunidad mayor bifenilo 2,3-dioxigenasa (BphA1) y el transportador ABC (glutamato-aspartato) ($>2,5$ veces). En la cepa LB400pIZahpC se observó la mayor inducción (2 veces) de el factor de elongación G y de la alquil hidroperoxido reductasa (AhpC) (Tabla 18).

Tabla 18. Niveles de expresión relativa de las proteínas identificadas en las cepas recombinantes crecidas en bifenilo.

Proteínas	Proteína identificada	LB400pIZ <i>oxyR</i>	LB400pIZ <i>sodB</i>	LB400pIZ <i>ahpC</i>
1	Aldehído deshidrogenasa Glutamato sintasa Catalasa	-	-	-
2	ATP sintasa F1, subunidad α	-	-	ND
3	Factor de elongación Tu	-	-	-
4	Transportador de azúcar ABC, subunidad ATP asa	-	+	-
5	Fructosa bifosfato aldolasa, clase II	-	-	+
6	Ácido acetohidroxireductasa	-	-	ND
7	Transportador de azúcar ABC (maltosa)	-	-	-
8	Catecol 1,2 dioxigenasa	-	-	-
9	Factor de elongación G	-	-	++
10	Enolasa	-	-	-
11	Transportador ABC (glutamato-aspartato)	-	++	-
12	6-fosfogluconato deshidratasa	-	+++	ND
13	Proteína ribosomal L25Rp1Y Proteína ribosomal 5S	-	+	-
14	Alquilo hidroperóxido reductasa <i>ahpC</i>	-	-	++
15	Fasina	-	-	+
A1	Subunidad mayor de bifenilo 2,3-dioxigenasa (BphA1)	+	++	-
A2	Subunidad menor de bifenilo 2,3-dioxigenasa (BphA2)	+	-	-
B	Bifenilo cis-2,3-dihidroxi- 2,3-dihidrodiol deshidrogenasa (BphB)	-	-	-
D	2-hidroxi-6-oxo-6- fenilhexa-2,4-dienoato hidrolasa (BphD)	+	+	-
J	Acetaldehído deshidrogenasa (BphJ)	-	-	+

(-) no inducida; (+) inducida > 1.5 veces; ++ inducida > 2 a 5 veces; +++ inducida > 5 veces.

ND: no detectada.

V DISCUSIÓN

V Discusión

1. Análisis del potencial de *B. xenovorans* LB400 para degradar compuestos aromáticos.

B. xenovorans LB400 es una bacteria modelo para la degradación de PCBs. Posee uno de los genomas bacterianos más grandes (9,73 Mbp) y es la primera *Burkholderia* no patogénica secuenciada (Chain *et al.*, 2006). La secuenciación y anotación de genomas completos de distintas especies del género *Burkholderia* ha sido fundamental para conocer la plasticidad del genoma y la versatilidad metabólica de estos microorganismos (Holden *et al.*, 2004; Nierman *et al.*, 2004). En ese sentido, el primer objetivo de esta Tesis fue reconstruir el metabolismo de compuestos aromáticos en *B. xenovorans* LB400 mediante análisis *in silico* de su genoma. Esta bacteria tiene el potencial de metabolizar una gran variedad de compuestos aromáticos.

B. xenovorans LB400 posee al menos once rutas metabólicas centrales de degradación de compuestos aromáticos y veintidós rutas periféricas (Fig. 2, Chain, *et al.*, 2006). En esta Tesis se identificaron mediante análisis bioinformático, cinco rutas centrales: la ruta del catecol (genes *cat*), clorocatecol (genes *clc*), benzoil-CoA (genes *box*), protocatecuato (genes *pca*) y la del homoprotocatecuato (genes *hpa*) y se identificaron cinco rutas periféricas: benzonitrilo (genes *nitA*), benzamida (genes *amiE*), triptófano (genes *kyn*), salicilato (genes *nah*) y benzoato (genes *ben*). En comparación, a otras cuatro especies degradadoras de compuestos aromáticos del género *Pseudomonas* (*P. fluorescens*, *P. syringae*, *P. putida* y *P. aeruginosa*) que poseen en conjunto, solamente nueve rutas centrales (Jiménez *et al.*, 2004), lo que indicaría que por sí sola, la cepa LB400 posee más rutas centrales que estas cuatro especies del género *Pseudomonas*.

Los estudios realizados en esta Tesis han revelado la existencia de cinco *clusters* génicos implicados en las rutas centrales de degradación de compuestos aromáticos: *cat* (degradación del catecol), *pca* (degradación del protocatecuato), *clc* (degradación del clorocatecol), *hpa* (degradación del homoprotocatecuato) y genes *box* (degradación del benzoil Co-A). Estos *clusters* génicos han sido previamente descritos en otros microorganismos (Harwood y Parales, 1996; Jiménez *et al.*, 2004; Pérez-Pantoja *et al.*, 2008): A estas cinco rutas centrales convergen, a su vez, diferentes rutas periféricas implicadas en la degradación de diferentes compuestos aromáticos (Fig. 2). Por ejemplo, se describe la vía del benzoato/ benzonitrilo/ benzamida que convergen a catecol o benzoil Co-A (rutas centrales). Durante la degradación del bifenilo se obtiene como producto el benzoato

y este converge a su vez a catecol. Las rutas periféricas del triptófano confluyen en el antranilato/ benzoato. Por último, el salicilato probablemente converge a la ruta del benzoato (Fig. 2 y 3).

En *B. xenovorans* LB400 se ha observado la presencia de un agrupamiento o *cluster* supraoperónico que consiste en que los genes catabólicos que codifican las enzimas para una ruta de degradación se encuentran asociados con otros genes que codifican para otra ruta. Es decir, genes catabólicos que canalicen la mineralización de distintos compuestos aromáticos a través de una ruta central común. Por ejemplo, los genes *cmt* de la ruta metabólica periférica de p-cumato se encuentran asociados a los genes *cym* de la ruta central de p-cimeno, se encuentran como agrupamiento supraoperónico (Chain *et al.*, 2006). *Acinetobacter* sp. ADP1, posee un agrupamiento supraoperónico conformado por los genes *pca-qui-pob-ppa*, que codifica las rutas de degradación de protocatecuato, quinato, 4-hidroxibenzoato y cafeato (Parke *et al.*, 2001).

La degradación de numerosos compuestos aromáticos naturales genera protocatecuato o catecol como intermediarios centrales. Los genes *pca* (ruta del protocatecuato) y los genes *cat* (ruta del catecol), codifican enzimas de vías que constituyen la ruta del β -cetoadipato, ampliamente distribuida entre las bacterias (Harwood y Parales, 1996). Los genes *pca* en *B. xenovorans* al igual que en *P. putida* KT2440 se encuentran organizados en diferentes agrupamientos (Jiménez *et al.*, 2002), mientras que los de *Acinetobacter* sp. ADP1 (Harwood y Parales, 1996) o *P. fluorescens* se encuentran localizados en la misma región del genoma (Jiménez *et al.*, 2002). En *B. xenovorans* LB400 el gen *pcaF* no se encuentra ligado a los genes *pcaJBD*C, como se ha observado en la mayoría de los agrupamientos *pca* de otras bacterias (Fig. 6). En la cepa LB400 el gen *pcaD* se encuentra ligado al gen *pcaC*, al igual que en otras bacterias como *P. fluorescens* (Jiménez *et al.*, 2002). Sin embargo, difiere de lo que se observa en *Rodococcus opacus* (Eulberg *et al.*, 1998) y *Cupriavidus necator* JMP134 (anteriormente *Ralstonia eutropha*), cuyos genes (*pcaC* y *pcaD*) se encuentran fusionados formando el gen *pcaL* (Pérez-Pantoja *et al.*, 2008).

La organización del cluster *catRBAC* (ruta del catecol) de *B. xenovorans* LB400 es similar la organización que en *B. pseudomallei* 96243. En la cepa LB400, al igual que en *P. putida* y *B. pseudomallei*, los genes *ben* no están ligados a los genes *cat* de la ruta central (Fig. 5). A diferencia de lo que ocurre en *Acinetobacter* sp. ADP1, *P. stutzeri* y *Ralstonia eutropha* H16 que poseen un conjunto de genes *cat* asociados a los genes *benABCD*, que

codifican las enzimas responsables de la ruta periférica de degradación del benzoato (Fig. 5).

Otra ruta central conocida recientemente para bacterias aerobias es la ruta del benzoil-CoA, intermediario común para los compuestos aromáticos fenol, tolueno, ácido fenilacético y benzoato (Breese *et al.*, 1998). Los resultados obtenidos en esta Tesis reafirman que en *B. xenovorans* LB400 existen dos copias de los correspondientes genes ortólogos de la ruta del benzoil-CoA (Tabla 8) (Chain *et al.*, 2006; Deneff *et al.*, 2005). Es importante mencionar que en la cepa LB400 existe redundancia de genes para esta ruta. En la bacteria *Cupriavidus necator* también se determinó esta redundancia de genes para las rutas del catecol, protocatecuato, salicilato y fenilacetil-CoA (Pérez-Pantoja *et al.*, 2008). Generalmente, esto se ha observado en bacterias que poseen grandes genomas. Mediante la evaluación de la historia de cada familia de genes, la adquisición de genes es un importante factor que contribuye a la diversidad del genoma de las bacterias. Sin embargo, la duplicación parece haber desempeñado un papel secundario en la evolución de los genes y una fracción importante de la redundancia genética observada en los genomas se explica mejor por la incorporación de genes completamente nuevos, más que por la duplicación intragenómica (Lerat *et al.*, 2005).

Bajo condiciones aerobias diversos cloroaromáticos (2,4-diclorofenoxiacetato, clorobenzoatos) pueden ser degradados a través de la ruta central del clorocatecol (genes *clc*). El cluster *clcABDE* se encuentra conservado en diversas bacterias como *P.* cepa B13 (Frantz y Chakrabarty, 1987), *P. putida* (Mc Fall, 1997). Sin embargo, la cepa LB400 posee un gen *tctC*, que se localiza entre el gen *clcB* y el gen *clcD* y que no está presente en otras bacterias (Fig. 9). Este gen *tctC* codificaría a un putativo transportador de ácidos tricarbónicos. Los genes de la ruta clorocatecol han sido bien caracterizados en *P. putida* cepa AC866 (Frantz y Chakrabarty, 1987), *Pseudomonas. sp.* cepa B13 (Kasberg, *et al.*, 1997; Ravatn *et al.*, 1998) y *Pseudomonas. sp.* cepa P51 (Van der Meer *et al.*, 1991a). Como en la cepa LB400 este agrupamiento tiene un gen regulador de la familia LysR, el cual está localizado río arriba del cluster y es transcrito de un modo divergente.

El análisis de los agrupamientos génicos responsables de la degradación del homoprotocatecuato (genes *hpa*), también constituyen otra ruta central. Estos genes se localizan en el cromosoma 2 del genoma de *B. xenovorans* LB400 (Fig. 10, Tabla 10). La organización de los genes en la cepa LB400 es similar a la encontrada en la cepa *B. thailandensis* E264. Sin embargo, en la cepa LB400 el gen *hpaG1* se encuentra entre el gen *hpaE* y el gen *hpaG2*. El ordenamiento del cluster *hpa* de *B. xenovorans* LB400 difiere de lo

observado en *P. aeruginosa* y *P. fluorescens* (Jiménez, *et al.*, 2004) (Fig. 10). En la cepa LB400 el gen regulatorio *hpaR*, que codifica un represor transcripcional de la familia MarR, está localizado río arriba del gen *hpaG1* (Fig.10). Los genes ortólogos en *P. aeruginosa* y *P. fluorescens* se encuentran fuera del *cluster hpa* (Jiménez, *et al.*, 2004). La cepa LB400 no posee los genes *hpaC* y *hpaX*, que codifican para la 4-hidroxifenilacetato 3-monooxigenasa y la 4-hidroxifenilacetato permeasa, respectivamente.

Una ruta periférica que converge en la ruta central de β -cetoacido es la del benzoato, un compuesto aromático muy frecuente en la naturaleza. El benzoato es metabolizado a catecol mediante las enzimas codificadas por los genes *ben*. En *B. xenovorans* LB400, la degradación del benzoato a catecol se lleva a cabo a través de la ruta *orto*. En la cepa LB400, los genes del *cluster ben* y del *cat* están localizados en diferentes cromosomas, al igual que en *P. putida* KT2440 (Jiménez *et al.*, 2002). Sin embargo, estos genes están contiguos en las cepas *P. fluorescens*, *R. metallidurans* y *Acinetobacter* sp. cepa ADP1 (Collier *et al.*, 1998). Los genes *ben* han sido descritos en *P. putida* PRS2000, *Acinetobacter* sp. ADP1 (Collier *et al.* 1998; Cowles *et al.*, 2000) y en *P. putida* KT2440 (Jimenez *et al.*, 2004). La regulación de la transcripción de los genes *ben* está mediada por el producto del gen *benR*. Mientras que el *cluster ben*, en la cepa LB400 está regulado por el producto del gen *benR*, la expresión de los genes *ben* en *B. pseudomallei* 1106 A está controlado por BenM, miembro de la familia de las proteínas regulatorias LysR (Collier *et al.*, 1998). El orden del *cluster benABCD* se mantiene en otras cepas (Fig. 5).

Los mecanismos de regulación que controlan la expresión de los genes responsables para el catabolismo de los compuestos aromáticos muestran una gran diversidad en *B. xenovorans* LB400. El análisis del genoma de esta cepa realizado en esta Tesis permite predecir la existencia de activadores transcripcionales de las familias LysR (*catR/pcaR/clcR/benR*), XRE (*boxR*), así como los represores transcripcionales de la familia GntR (*bphR*) y MarR (*hpaR*) y lo comunicado por Chain *et al.* (2006). La existencia de una amplia gama de reguladores transcripcionales diferentes controlando el catabolismo global frente a compuestos aromáticos manifiesta la diversidad funcional de la maquinaria catabólica en *B. xenovorans* LB400. Esta es una característica que también se ha observado en otras bacterias capaces de degradar este tipo de compuestos (Díaz *et al.*, 2001; Chain *et al.*, 2006; Perez-Pantoja *et al.*, 2008).

Por último, cabe destacar que el análisis del potencial de *B. xenovorans* LB400 para degradar compuestos aromáticos ha permitido trabajar en estrecha colaboración con investigadores del área informática. La integración con investigadores del área bioinformática

y del área biológica, han permitido complementar conocimientos para una investigación más eficiente. Es así que durante el desarrollo de esta Tesis, permitió generar una aplicación bioinformática denominada GeXpert (Arredondo *et al.*, 2006; Arredondo *et al.*, 2007). Los resultados obtenidos revelaron que GeXpert permite una búsqueda bioinformática de genes relacionados con rutas metabólicas más rápida, eficiente y de alta confiabilidad que el método manual. Esta aplicación bioinformática permite aumentar el rendimiento de los investigadores en dicha área.

La versatilidad metabólica, el potencial degradativo, y la capacidad para colonizar el suelo y la rizósfera (Chain *et al.*, 2006) hacen que *B. xenovorans* LB400 sea un buen candidato para estudios de ingeniería genética, aplicaciones biotecnológicas y biorremediación. La gran diversidad de enzimas encontradas en este trabajo en la cepa LB400, excede considerablemente el espectro metabólico hasta el momento descrito en esta cepa y en otras bacterias. Una forma de aumentar el potencial catabólico de *B. xenovorans* LB400 es mediante la incorporación y expresión en esta bacteria de nuevas rutas de degradación procedentes de otros microorganismos. Esta estrategia se ha utilizado con éxito para diseñar biocatalizadores con interés biotecnológico tanto en el campo de la biorremediación (Pieper y Reineke, 2000; Saavedra, 2005) como en la biotransformación para la generación de compuestos de interés industrial (Wackett, 2003; Seeger *et al.*, 2003; Schmid *et al.*, 2001). Dada la capacidad de *B. xenovorans* LB400 para degradar compuestos aromáticos, esta bacteria es un huésped interesante para expandir el rango de sustratos que esta podría degradar o biotransformar en productos con valor agregado, a través del reclutamiento de genes desde otros microorganismos como lo realizado en *P. putida* KT2440 (Pieper y Reineke, 2000; Wackett, 2003). Por lo tanto, el análisis presentado en esta tesis y en la publicación (Chain *et al.*, 2006) amplían las oportunidades de desarrollar aplicaciones biotecnológicas.

2. Caracterización de la respuesta de *B. xenovorans* LB400 frente al compuesto modelo bifenilo.

En *B. xenovorans* LB400 se han realizado varios estudios genéticos y bioquímicos de las rutas degradativas de PCBs. No obstante, existen pocos estudios acerca de la respuesta adaptativa de las bacterias frente a los (cloro)bifenilos y otros compuestos aromáticos (Cámara *et al.*, 2004; Agulló *et al.*, 2007; Martínez *et al.*, 2007; Chávez *et al.*, 2004). En este sentido, la primera etapa de este objetivo ha consistido en evaluar el efecto del compuesto

aromático modelo bifenilo, sobre el crecimiento, la viabilidad celular y la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS).

La velocidad específica de crecimiento bacteriano es menor en bifenilo que en glucosa. Sin embargo, la cepa LB400 cultivada en bifenilo alcanzó una mayor biomasa (Fig. 15). La baja solubilidad acuosa del bifenilo ($6,99 \times 10^{-3}$ g/l) podría afectar la velocidad específica de crecimiento (Denef *et al.*, 2006). La solubilidad de la glucosa en el agua es de 1.250 g/l. Por otro lado, se ha observado que el bifenilo afecta la organización de la membrana citoplasmática (Fig. 28 A) (Sikkema *et al.*, 1994; Agulló *et al.*, 2007).

Durante la exposición de la cepa LB400 a bifenilo, su viabilidad disminuyó un 58 % a los 120 min (Fig. 16 A) El efecto del bifenilo sobre esta bacteria se ha observado en otras bacteria degradadoras de PCBs como *Pseudomonas B4* (Chávez *et al.*, 2004) y *P. sp.* DJ-12 (Park *et al.*, 2001). Esto indica que el bifenilo y los PCBs no sólo actúan como una fuente de carbono y energía sino también podrían ejercer un efecto tóxico en la bacteria (Agulló *et al.*, 2007). Los microorganismos responsables de la degradación de compuestos hidrofóbicos tales como bifenilo o los PCBs están sujetos a los efectos de estos compuestos sobre las membranas, tales como perturbación en la fluidez e interferencia con la función de las proteínas (Sikkema *et al.*, 1995; Cámara *et al.*, 2004; Agulló *et al.*, 2007, Martínez *et al.*, 2007). Por otro lado, las ROS también podrían ejercer un efecto en el crecimiento de la cepa LB400. En algunas cepas bacterianas se ha observado un aumento en ROS acompañado con una reducción en la viabilidad celular. Por consiguiente, la acumulación de ROS termina inhibiendo el crecimiento de las bacterias (Barnes *et al.*, 2005). Las especies reactivas de oxígeno se producen por consecuencia del metabolismo celular y también por la exposición de las células a diferentes agentes físicos y químicos, causando lesiones oxidativas, provocando daño a nivel de membrana, rompiendo o modificando el DNA y las proteínas (Dempfle, 1991). En *B. xenovorans* LB400, se determinó mediante dihidroclorofluoresceína, que el bifenilo genera un aumento de las ROS en la célula (Fig. 17 y 18). Por lo tanto, parte de su toxicidad se debería a la generación de ROS. La dihidroclorofluoresceína reacciona con una serie de moléculas reactivas, preferentemente peróxido de hidrógeno (Jakubowshi *et al.*, 2000). Debido a esto y para validar los resultados de activación con bifenilo, se realizó una serie de estudios (Fig. 17). Se evaluó la activación de H₂DCF-DA en células tratadas con diferentes concentraciones de los compuestos generadores de ROS: H₂O₂ y paraquat, obteniéndose un nivel de activación proporcional a la concentración de estos compuestos tóxicos. En los ensayos con CdCl₂ (control negativo) no se observó la activación de la sonda a ninguna de las concentraciones probadas. Por lo tanto, *B. xenovorans* LB400 ajusta su

fisiología con una respuesta de defensa al estrés oxidativo frente a bifenilo, un sustrato utilizado como fuente de carbono y energía, y al mismo tiempo un agente causal de estrés oxidativo.

La generación de productos de peroxidación de membranas biológicas es consecuencia directa de la acción de ROS al interior de la célula. La oxidación de los ácidos grasos polinsaturados por radicales libres conduce a la formación de lipoperóxidos (Halliwell y Gutteridge, 1999). La degradación de estos lipoperóxidos puede ser enzimática o no enzimática formando aldehídos tóxicos. La toxicidad de estos aldehídos reactivos está basada en su habilidad para formar aductos con los tioles y con grupos amino (Junichi *et al.*, 2002). La acumulación de estos aldehídos reactivos determinados por su reacción con el ácido tiobarbitúrico (TBARs) se pueden utilizar como indicadores de la modificación oxidativa de los lípidos. En esta Tesis demostramos que el bifenilo es un compuesto aromático que generó un importante aumento en la producción de estos aldehídos reactivos en *B. xenovorans* LB400 (Fig. 19), evidenciando un daño en la membrana celular probablemente producto de las ROS generadas (Fig. 28 A). La acumulación de estos aldehídos reactivos se ha evidenciado en otras bacterias sometidas a varios tipos de estrés, incluyendo H₂O₂ (Semchyshyn *et al.*, 2005), TiO₂ (Gogniat *et al.*, 2006) y K₂TeO₃ (Pérez, 2007).

La tecnología de la proteómica es una poderosa herramienta para el estudio de la respuesta fisiológica de la bacteria frente a condiciones de estrés. Permite comprender la relación entre la expresión de los genes y los problemas biológicos, mediante métodos bioquímicos, con el fin de obtener una visión global e integrada de los procesos celulares (Graves y Haystead, 2002). Como se demostró anteriormente, el bifenilo, es un agente generador de ROS al interior de la célula. Esto permitió pensar *a priori* que podríamos encontrar enzimas relacionadas con el estrés oxidativo en los estudios proteómicos. En este trabajo se analizó la expresión global de proteínas de *B. xenovorans* LB400. La cepa creciendo en bifenilo o durante la exposición a bifenilo y otros clorobifenilos inducen diversas enzimas asociadas a estrés (Agulló *et al.*, 2007). Entre las proteínas inducidas durante el crecimiento en bifenilo se encuentra la alquil hidroperóxido reductasa, AhpC. Esta enzima también se indujo durante la exposición a H₂O₂ (Fig. 20). En bacterias aerobias y facultativas esta enzima tiene una actividad antioxidante, asociada no sólo con la destoxificación de hidroperóxido orgánico, sino también, su sitio activo puede acomodar virtualmente cualquier radical hidroperóxido y peróxido de hidrógeno. Incluso ha sido más eficiente en la eliminación de H₂O₂ que la catalasa (Costa e Imlay, 2001). Por lo tanto, los resultados proteómicos confirman que la cepa LB400 crecida en bifenilo está sometida a un estrés oxidativo.

3. Búsqueda *in silico* de los genes que codifican para proteínas de defensa a estrés oxidativo en *B. xenovorans* LB400.

Es esencial para la sobrevivencia de las bacterias su capacidad para responder a diferentes tipos de estrés. Existen mecanismos de defensa para contrarrestar esta situación, los cuales permiten resistir las condiciones adversas y los cambios ambientales repentinos. Bajo condiciones de cultivo limitantes (disminución de nutrientes, cambios en el pH o variaciones drásticas de temperatura) la bacteria activa una "respuesta de estrés" que mejora significativamente sus posibilidades de una adaptación satisfactoria a los desafíos planteados por tales ambientes desfavorables (Renzone *et al.*, 2005). La respuesta bacteriana a estrés oxidativo ha sido extensamente estudiada en *E. coli* y en *S. typhimurium* (Farr y Kogoma, 1991). Se han identificado factores de transcripción que detectan los niveles elevados de ROS y regulan la expresión de genes antioxidantes, que permiten mantener las concentraciones de ROS a niveles de tolerancia apropiados (Storz e Imlay, 1999).

Con el fin de conocer que tipo de genes de defensa al estrés oxidativo están presentes en *B. xenovorans* LB400, se realizó el análisis *in silico* del genoma de esta bacteria. Esto permitió posteriormente definir los genes a sobreexpresar en esta bacteria para aumentar la tolerancia al estrés oxidativo producido por el bifenilo. La cepa LB400 posee al menos 15 genes que codifican para diferentes proteínas de defensa al estrés oxidativo (Fig. 21 y Tabla 15). Los genes ortólogos encontrados corresponden a *ahpCF*, *katE*, *oxyR*, *sodB*, *hslUV*, *tolQRAB* y *cyoABCD*. El análisis realizado en esta Tesis ha revelado la existencia de al menos cuatro *clusters* génicos implicados en la defensa al estrés oxidativo. Estos *clusters* génicos *ahpCF*, *hslUV*, *tolQRAB* y *cyoABCD*, han sido previamente descritos en otros microorganismos como *S. typhimurium* (Storz *et al.*, 1989), *E. coli* (Lee *et al.*, 2003), *Haemophilus influenzae* (Sen *et al.*, 1996) y *P. aeruginosa* (Salunkhe *et al.*, 2005), respectivamente. Los genes *ahpCF* codifican para la alquil hidropoxidasa, que comprende las dos subunidades AhpC y AhpF. La subunidad AhpC o alquil hidropéroxido reductasa subunidad C, corresponde a la enzima que participa en la destoxicación de peróxido de hidrógeno y de hidropéroxidos. AhpF (alquil hidropéroxido reductasa subunidad F) reduce el grupo hidropéroxido a alcohol. La mayoría de los hidropéroxidos celulares son hidropéroxidos lipídicos, los cuales potencian su toxicidad oxidante iniciando reacciones en cadena con los lípidos de las membranas (Fukumori y Kishi, 2001).

La proteína SodB es una proteína que protege del daño directo causado por $O_2^{\cdot -}$ (Keyer e Imlay, 1996) y también de la protección indirecta del radical OH^{\cdot} . Recientemente, se ha demostrado que en *Pseudomonas sp.* cepa As1 la sobreexpresión de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa ayudan a la tolerancia oxidativa durante la biodegradación del naftaleno (Kang *et al.*, 2007).

Por último, estudios realizados por Storz *et al.* (1990) indicaron que la sobreexpresión de OxyR aumentó la expresión del operón *ahpCF*. La proteína OxyR es un regulador de la familia del tipo LysR, proteínas de unión al DNA que activan la expresión de sus genes blanco (Kim *et al.*, 2002).

Estos antecedentes sugieren que la sobreexpresión en la cepa LB400 de los genes *oxyR*, *ahpC*, y *sodB* podría contrarrestar el estrés oxidativo generado por los bifenilos.

4. Caracterización de las cepas recombinantes

Bajo la hipótesis que el metabolismo aerobio del compuesto modelo bifenilo genera en la cepa LB400 una situación de estrés oxidativo, se planteó como un objetivo la construcción de una bacteria recombinante que sobreexpresen los genes de defensa al estrés oxidativo como las enzimas alquil hidroperóxido reductasa (*ahpCF*) y superóxido dismutasa (*sodB*) y de un regulador transcripcional (*oxyR*).

La cepa recombinante LB400pI Z_{oxyR} es una cepa más tolerante a la toxicidad del bifenilo y al inductor de ROS, peróxido de hidrógeno. El cultivo de la bacteria recombinante LB400pI Z_{oxyR} en bifenilo alcanzó una mayor biomasa que la cepa control LB400pI Z_{1016} (Fig. 25). Por lo tanto, la cepa que sobreexpresa el gen *oxyR* permite producir una mayor masa celular, lo que podría ser útil para procesos biotecnológicos, como la biorremediación. Además, la cepa recombinante LB400pI Z_{oxyR} expuesta al compuesto peróxido de hidrógeno mostró una mayor sobrevivencia que la cepa control (Fig. 26). La toxicidad del H_2O_2 , está asociado a su reducción por el Fe (II) y formación de radicales hidroxilo que dañan el DNA (Imlay, 2003) y a la oxidación de residuos de cisteína y metionina en diversas proteínas, lo cual podría conducir a su inactivación. El único trabajo que describe la sobreexpresión de *oxyR* en una bacteria señala que la sobreexpresión de este gen determinó la inducción de los genes *ahpCF* (Storz *et al.*, 1990). Por otro lado, mutantes de *oxyR* son incapaces de inducir los genes del regulón OxyR y son sensibles al peróxido de hidrógeno (Christman *et al.*, 1985). Sin embargo, una mutación en *oxyR* en una cepa de *S. typhimurium* originó una sobreproducción de las proteínas controladas por este regulador (Christman *et al.*, 1985).

En esta Tesis se determinó que la sobreexpresión del gen *sodB* en la cepa recombinante LB400pI*ZsodB* protege a esta bacteria del superóxido generado por el paraquat (Fig. 29). Esto se relaciona a lo descrito en una cepa de *E. coli* que sobreexpresa la enzima superóxido dismutasa (*sod*) de *Drosophila sechellia*, en la cual se observó un aumento en la resistencia al estrés oxidativo generado por paraquat (Goulielmos *et al.*, 2003).

La cepa LB400pI*ZahpC* no mostró una mayor tolerancia al estrés oxidativo causado por el bifénilo. Existen divergencias en los resultados obtenidos de otros estudios con la sobreexpresión de *ahpC*. En *E. coli* K12 la sobreproducción de la enzima alquil hidroperóxido reductasa (AhpC) aumenta la resistencia a un compuesto aromático (indol), cuyo compuesto es tóxico para la bacteria (Garbe *et al.*, 2000). La sobreexpresión del gen *ahpC* en *B. pseudomallei* protegió a las células del estrés causado por intermediarios reactivos de nitrógeno (Loprasert *et al.*, 2003). Estudios en *Mycobacterium tuberculosis* revelaron que la sobreexpresión del gen *ahpC* protege a la bacteria de efectos tóxicos de peróxidos orgánicos (Sherman *et al.*, 1996). Sin embargo, otros estudios señalan que AhpC es menos efectiva en detoxificar H₂O₂ que KatA, actuando sólo AhpC como una vía alternativa (Cosgrove *et al.*, 2007). También se señala que AhpC es responsable de eliminar bajo niveles de H₂O₂, mientras que la catalasa (KatA) sería responsable para la detoxificación de altos niveles de H₂O₂ (Server e Imlay 2001).

En ensayos de degradación, las cepas recombinantes alcanzaron una degradación de aproximadamente un 80 % de bifénilo (Fig. 27). Sin embargo, no se observó una mayor degradación por las cepas recombinantes con respecto a la cepa control.

En la cepa recombinante LB400pI*ZoxyR* (Fig. 28 B) crecidas en bifénilo se observó una membrana externa bien definida. No se observó gránulos de polifosfatos como indicador de estrés, lo que estaría indicando que no existe mayor daño a nivel de membrana. Por lo tanto, la sobreexpresión de genes de defensa al estrés oxidativo es necesaria para proteger a la cepa del daño causado por la exposición o crecimiento a estos compuestos. Adicionalmente, podría explicar la mayor cantidad de biomasa alcanzada de LB400pI*ZoxyR* crecida en bifénilo.

Durante el crecimiento en glucosa de la cepa LB400pI*ZsodB*, se observó la presencia de gránulos de color blanco en el citoplasma que corresponderían a polihidroxialcanoatos (PHAs) (Fig. 28 G). Los PHAs son polímeros de reserva bacteriana que se acumulan en el citoplasma si una fuente de carbono es proporcionada en exceso y, si un nutriente esencial está limitado (Anderson y Dawes, 1990). Los polihidroxialcanoatos poseen propiedades

termoplásticas y además son biodegradables, por lo que tienen importancia biotecnológica (Sudesh *et al.*, 2007; Ojumu *et al.*, 2004). Esta disponibilidad de carbono y energía como los polihidroxicanoatos, confiere a las bacterias una ventaja adaptativa, dado que incrementan su sobrevivencia.

Recientemente se concluyó el proyecto de secuenciación del genoma de *B. xenovorans* LB400 (Chain *et al.*, 2006), lo que ha facilitado el análisis comparativo de la expresión global de genes en respuesta al compuesto aromático modelo bifénilo. El análisis de la proteómica cuantitativa llevado a cabo en esta Tesis ha sido importante para revelar los genes/proteínas que pueden desempeñar un rol en la adaptación de las células a las nuevas condiciones ambientales. En general, en todas las cepas recombinantes (LB400pI*ZoxyR*, LB400pI*ZsodB*, LB400pI*ZahpC* y LB400pI*Z1016*) crecidas en bifénilo (Fig. 30-33 B y C) se inducen las proteínas de la vía superior (BphA1, BphA2, BphB, BphD) y una de la vía inferior (BphJ) de degradación del bifénilo. Otra de las enzimas catabólicas inducidas durante el crecimiento en bifénilo en todas las cepas recombinantes corresponde a catecol -1,2-dioxigenasa (CDO). Esta proteína es la primera enzima de la vía β -cetoacilato para la degradación de catecoles. La inducción de esta enzima sugiere que el benzoato generado desde el bifénilo es catabolizado vía la apertura del anillo tipo *orto*.

En la cepa recombinante LB400pI*ZahpC* crecida en bifénilo se observó una mayor inducción de alquil hidroperóxido reductasa (AhpC) en comparación a las demás cepas recombinantes.

En todas las cepas recombinantes la proteína 1, consiste en una mezcla de tres proteínas que presentan punto isoeléctrico y masa molecular semejante (Tabla 13). Una de estas tres proteínas fue identificada como la enzima catalasa (KatE), asociada a la defensa del estrés oxidativo. La catalasa es una enzima ubicua, que protege a los organismos aerobios de los efectos tóxicos del H₂O₂. Aunque la inducción de esta proteína se evidenció en la cepa recombinante LB400pI*ZoxyR*, se desconoce si OxyR esté involucrado en la regulación de la catalasa (KatE) en la cepa LB400.

En estas cepas recombinantes se observó represión de varias proteínas. En la cepa recombinante LB400pI*ZoxyR*, la represión de genes que codifican proteínas del metabolismo energético tales como la 6-fosfogluconato deshidratasa, cuya función está relacionada con el metabolismo del gluconato. La represión de proteínas asociadas con el transporte de carbohidratos, como el transportador de maltosa. En la cepa LB400pI*ZsodB*, igualmente se observó la represión de la proteína transportadora de azúcar ABC, la proteína EF-G, la subunidad α de la ATP sintasa F1. La represión de estas dos últimas proteínas podría ser un

paso crucial para detener el crecimiento y consecuentemente minimizar el daño celular (Cabisco *et al.*, 2000). Además, como se mencionó anteriormente, los microorganismos frente a cambios favorables pueden acelerar el crecimiento y reprimir proteínas redundantes (Neidhard y vanBogelen, 2000). En la cepa recombinante LB400pI Z_{sodB} , se observó la represión de la faseína (PhaP), una clase única de proteína que recubre la superficie de ciertas inclusiones citoplasmáticas conocidas como polihidroxicanoatos. Esta proteína juega un importante rol en la formación y estructura de aquellas inclusiones. En procariontes, los polihidroxicanoatos (PHAs) son el tipo más común de compuestos de almacenaje de carbono y/o energía (Steinbüchel y Valentin, 1995), sugiriendo que las células no necesitan requerimientos energéticos extras, para sobrevivir y adaptarse al estrés producido por el bifenilo. Probablemente la represión de estos genes, en general, neutraliza los efectos producidos por el aumento de sobreexpresión de los genes de defensa al estrés.

Los estudios relacionados con la genómica y la proteómica ayudarán a elucidar los procesos celulares relevantes para la degradación de los PCBs y facilitará la construcción de microorganismos con características mejoradas para la degradación de compuestos aromáticos.

VI CONCLUSIONES

VI CONCLUSIONES

1. *Burkholderia xenovorans* LB400 posee en su genoma los genes que codifican las enzimas de las rutas catabólicas centrales de catecol, clorocatecol, benzoil-CoA, protocatecuato y homoprotocatecuato y de las rutas periféricas de benzonitrilo, benzamida, triptófano, salicilato y benzoato. Este trabajo en conjunto con otros estudios del laboratorio, indican que la cepa LB400 posee una gran versatilidad metabólica para la degradación de compuestos aromáticos.
2. *B. xenovorans* LB400 posee en su genoma los genes que codifican proteínas de defensa al estrés oxidativo *katE*, *oxyR*, *sodB*, *hsIUV*, *tolQRAB* localizados en el cromosoma 1 y *ahpC*, *cyoABCD* en el cromosoma 2.
3. La degradación del compuesto aromático bifenilo produce en *B. xenovorans* LB400 estrés oxidativo, que se evidencia por el aumento de las ROS, la producción de lipoperoxidación de membranas y el aumento de los niveles de la proteína de estrés oxidativo alquil hidroperóxido reductasa (AhpC).
4. En esta Tesis se generaron tres cepas recombinantes de *B. xenovorans* LB400 que sobreexpresan los genes de defensa al estrés oxidativo *oxyR*, *sodB* y *ahpC*.
5. La sobreexpresión del gen *oxyR* en la cepa LB400pI*ZoxyR* permite que el cultivo de esta cepa genere una mayor biomasa durante el crecimiento en bifenilo y le confiere una mayor sobrevivencia de esta cepa recombinante frente al peróxido de hidrógeno. Se ha demostrado por primera vez que la sobreexpresión de los genes de defensa al estrés oxidativo en *B. xenovorans* LB400 permite ser mas tolerante a esta condición.
6. Durante el crecimiento de las cepas recombinantes (LB400pI*ZoxyR*, LB400pI*ZsodB*, LB400pI*ZahpC*) en bifenilo se observaron cambios en el proteoma con respecto al crecimiento en glucosa. Se observó la inducción de enzimas de la ruta catabólica de bifenilo, lo que se correlaciona con la metabolización del compuesto. LB400pI*ZahpC* y LB400pI*ZsodB* posee una mayor inducción de la enzima AhpC y SodB, respectivamente.

VII PROYECCIONES

VII PROYECCIONES

- La gran diversidad de vías metabólicas de compuestos aromáticos encontradas en la cepa LB400 excede considerablemente el espectro metabólico hasta el momento descrito en esta cepa y en otras bacterias. La incorporación y expresión de nuevas rutas de degradación procedentes de otros microorganismos permitirá diseñar biocatalizadores con interés biotecnológico, tanto en el campo de la biorremediación, como en el de la biotransformación. De esta manera, la reconstrucción metabólica de compuestos aromáticos en la cepa LB400 presentado en esta Tesis amplían las oportunidades de desarrollar aplicaciones biotecnológicas.
- La respuesta celular al compuesto aromático modelo bifenilo revelada durante esta Tesis, proporciona información sobre el modo de acción de estos compuestos. El análisis proteómico realizado en esta Tesis contribuye al entendimiento de los mecanismos globales de adaptación de *B. xenovorans* LB400 al compuesto bifenilo. Esto permite el diseño de nuevas estrategias para una biorremediación mejorada de ambientes contaminados con PCBs.
- Esta Tesis constituye una primera aproximación para la construcción de cepas recombinantes de *B. xenovorans* LB400 con capacidades mejoradas para tolerar ambientes que generen estrés oxidativo. En general, se ha trabajado en el diseño de bacterias recombinantes con propiedades catalíticas mejoradas. La cepa recombinante LB400pIZoxyR resultó ser más tolerante al estrés oxidativo que la cepa silvestre. Para la optimización de procesos de biorremediación, esta cepa podría emplearse en ensayos de biorremediación en microcosmos de suelo.
- La construcción de plásmidos recombinantes para la obtención de mutantes de genes de defensa al estrés oxidativo (*ahpC*, *sodB*, *oxyR*, *hslU*, *cyoB*, *tolA*) de *B. xenovorans* LB400, servirá como base para investigar a futuro los roles de estos genes mediante evaluación fenotípica de las mutantes y su respuesta al estrés oxidativo.

VIII REFERENCIAS

VIII REFERENCIAS

- Abraham, W., Nogales B., Golyshin, P.N., Pieper D.H. y Timmis, K.N.** (2002) Polychlorinated biphenyl-degrading microbial communities in soils and sediments. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**: 246-253.
- Abramowicz, D.A.** (1990) Aerobic and anaerobic biodegradation of PCBs: review. *Crit. Rev. Biotechnol.* **10**: 241-251.
- Agulló, L.** (2006) Respuesta adaptativa de *Burkholderia xenovorans* LB400 frente a (cloro)bifenilos y búsqueda *in silico* de sus rutas metabólicas de compuestos aromáticos. Trabajo de titulación para obtener el título profesional de Bioquímico, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.
- Agulló, L., Cámara, B., Martínez, P., Latorre-Reyes, V. y Seeger, M.** (2007) Response to (chloro)biphenyls of the PCB-degrader *Burkholderia xenovorans* LB400 involves stress proteins induced also by heat shock and oxidative stress. *FEMS Microbiol. Lett.* **267**: 167-175.
- Albesa, I., Becerra, M.C., Battán, P.C. y Páez, P.L.** (2004) Oxidative stress involved in the antibacterial action of different antibiotics. *Biochem. Biophys. Res.* **317**: 605-609.
- Altschul, S. F. y Lipman, D.J.** (1990) Protein database searches for multiple alignments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 5509-5513.
- Anderson, A.J. y Dawes, E.A.** (1990) Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.* **54**: 450-472.
- Argemi, F., Cianni N. y Porta A.** (2005) Disrupción Endocrina: Perspectivas Ambientales y Salud Pública. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana.* **39**: 291-300.
- Arredondo, T., Vásquez, F., Candel, D., Dombrowskaia, L., Agulló, L., Cordova, M., Latorre, V., Calderón, F. y Seeger, M.** (2007) Dynamic penalty based GA for inducing fuzzy inference systems. *LNCS* **4756**: 957-966.
- Arredondo, T., Seeger, M., Dombrowskaia, L., Avarias, J., Calderón, F., Candel, D., Muñoz, F., Latorre, V., Agulló, L., Cordova, M. y Gómez, L.** (2006) Bioinformatics Integration Framework for Metabolic Pathway Data-Mining. *LNCS* **4031**: 917-926.
- Asturias, J.A. y Timmis, K.N.** (1993) Three different 2,3-dihydroxybiphenyl-1,2-dioxygenase genes in the Gram-positive polychlorobiphenyl-degrading bacterium *Rhodococcus globerulus* P6. *J. Bacteriol.* **175**: 4631-4640.
- Azim, M.K. y Noor, S.** (2007) Characterization of protomer interfaces in HsIV protease; the bacterial homologue of 20S proteasome. *Protein J.* **26**: 213-219.
- Bai, Z., Harvey, L.M. y McNeil, B.** (2003) Oxidative Stress in submerged cultures of fungi. *Crit. Rev. Biotechnol.* **23**: 267-302.
- Barnes, A.I. Herrero, I.L. y Albesa, I.** (2005) New aspect of the synergistic antibacterial action of ampicillin and gentamicin. *Int. J. Antimicrob. Agents* **26**: 146-151.

- Battershill, J.M.** (1994) Review of the safety assessment of polychlorinated biphenyls (PCBs) with particular reference to reproductive toxicity. *Hum. Exp. Toxicol.* **13**: 581-597.
- Bedard, D.L., Wagner R.E, Brennan M.J., Haberl M.L. y Brown J.F.** (1987) Extensive degradation of aroclors and environmentally transformed polychlorinated biphenyls by *Alcaligenes eutrophus* H850. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 1094-1102.
- Beltrametti, F., Reniero, D., Backhaus, S. y Hofer, B.** (2001). Analysis of transcription of the *bph* locus of *Burkholderia sp.* strain LB400 and evidence that the ORF0 gene product acts as a regulator of the *bphA1* promoter. *Microbiology* **147**: 2169-2182.
- Bernadac, A., Gavioli, M., Lazzaroni, J.C., Raina, S. y Lloubès, R.** (1998) *E. coli tol-pal* mutants form outer membrane vesicles. *J. Bacteriol.* **180**: 4872-4878.
- Blasco, R., Mallavarapu M., Wittich R., Timmis, KN. y Pieper, D.H.** (1997) Evidence that formation of protoanemonin from metabolites of 4-chlorobiphenyl degradation negatively affects the survival of 4-chlorobiphenyl-cometabolizing microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 427-434.
- Blom, A., Harder, W. y Martin, A.** (1992) Unique and overlapping pollutant stress proteins of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 331-334.
- Bopp, L.H.** (1986) Degradation of highly chlorinated PCBs by *Pseudomonas* strain LB400. *J. Ind. Microbiol.* **1**: 23-29.
- Brenot, A., King, K.Y., Janowiak, B., Griffith, O. y Caparon, M.G.** (2004) Contribution of glutathione peroxidase to the virulence of *Streptococcus pyogenes*. *Infect. Immun.* **72**: 408-413.
- Breese, K., Boll, M., Alt-Morbe, J., Schagger, H. y Fuchs, G.** (1998) Genes coding for the benzoyl-CoA pathway of anaerobic aromatic metabolism in the bacterium *Thauera aromatica*. *Eur. J. Biochem.* **256**: 148-154.
- Cabiscol, E., Tamarit, J. y Ros, J.** (2000) Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Intern. Microbiol.* **3**:3-8.
- Cámara, B., Herrera, C., González, M., Couve, E., Hofer, B. y Seeger, M.** (2004) From PCBs to highly toxic metabolites by the biphenyl pathway. *Environ. Microbiol.* **6**: 842-850.
- Coates, J., Bhupathiraju, V., Achenbach, L., McInerney, M. y Lovley, D.** (2001) *Geobacter hydrogenophilus*, *Geobacter chapellei* and *Geobacter grbiciae*, three new, strictly anaerobic, dissimilatory Fe(III)-reducers. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**: 581-588.
- Collier, L.S., Gaines, G.L. y Neidle, E.L.** (1998) Regulation of benzoate degradation in *Acinetobacter sp.* strain ADP1 by BenM, a LysR-type transcriptional activator. *J. Bacteriol.* **180**: 2493-2501.
- Costa, L. y Imlay, J.** (2001) Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183**: 7173-7181.

- Cowles, C.E., Nichols, N.N. y Harwood, C.S. (2000) BenR, a XylS homologue, regulates three different pathways of aromatic acid degradation in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **182**: 6339-6346.
- Chain, P.S., Deneff, V.J., Konstantinidis, K.T., Vergez, L.M., Agulló, L., Reyes-Latorre, V.K., Hauser, L., Córdova, M., Gómez, L., Gonzalez, M., Land, M., Lao, V., Larimer, F., LiPuma, J.J., Mahenthalingam, E., Malfatti, S.A., Marx, C.J., Parnell, J.J., Ramette, A., Richardson, P., Seeger, M., Smith, D., Spilker, T., Sul, W.J., Tsoi, T.V., Ulrich, L.E., Zhulin, I.B. y Tiedje, J.M. (2006) *Burkholderia xenovorans* LB400 harbors a multi-replicon, 9.73-Mbp genome shaped for versatility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**: 15280-15287.
- Chávez, F.P., Lünsdorf, H. y Jerez, C.A. (2004) Growth of polychlorinated-biphenyl-degrading bacteria in the presence of biphenyl and chlorobiphenyls generates oxidative stress and massive accumulation of inorganic phosphate. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 3064-3072.
- Christman, M.F., Morgan, R.W., Jacobson, F.S., y Ames, B.N. (1985) Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimurium*. *Cell* **41**:753-762.
- Chuang, M.-H., Wu, M.-S., Lo W.-L., Lin, J.-T., Wong, C-H y S.-H. (2006) The antioxidant protein alkylhydroperoxide reductase of *Helicobacter pylori* switches from a peroxide reductase to a molecular chaperone function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**: 2552-2557.
- Delawary, M., Ohsubo, Y. y Ohta, A. (2003) The dual functions of biphenyl-degrading ability of *Pseudomonas* sp KKS102: energy acquisition and substrate detoxification. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**: 1970-1975.
- de Giorgis, F., Schwarz, I., Chamy R. y Schiappacasse, C. (2003) Alternativas de tratamientos biológicos para la remediación de suelos contaminados con PCBs en Chile. XV Congreso de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. AIDIS-Chile.
- de Lorenzo, V. y Timmis, K.N. (1994) Analysis and construction of stable phenotypes in Gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. *Methods Enzymol.* **235**: 386-405.
- Demple, B. (1991) Regulation of bacterial oxidative stress genes. *Annu. Rev. Genet.* **25**: 315-337.
- Demple, B. (1999) Radical ideas: genetic responses to oxidative stress. *Clin. Exp. Pharmacol Physiol.* **26**:64-68.
- Deneff, V.J., Patrauchan, M.A., Florizone, C., Park, J., Tsoi, T.V. y Verstraete, W. (2005) Growth substrate-and phase-specific expression of biphenyl, benzoate, and C1 metabolic pathways in *Burkholderia xenovorans* LB400. *J. Bacteriol.* **187**: 7996-8005.

- Denef, V.J., Klappenbach, J.A., Patrauchan, M.A., Florizone, C., Rodriguez, J.L.M., Tsoi, T.V., Verstraete, W., Eltis, L.D. y Tiedje, J.M.** (2006) Genetic and genomic insights into the role of benzoate-catabolic pathway redundancy in *Burkholderia xenovorans* LB400. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 585-595.
- Díaz, E., Ferrández, A., Prieto, M.A. y García, J.L.** (2001) Biodegradation of aromatic compounds by *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**: 523-569.
- Díaz, E.** (2004) Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. *Int. Microbiol.* **7**: 173-180.
- Ding, H. y Demple, B.** (2000) Direct nitric oxide signal transduction via nitrosylation of iron-sulfur centers in the SoxR transcription factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**: 5146-5150.
- Eisler, R.** (2000) Polycyclic aromatic hydrocarbons. In Handbook of Chemical Risk Assessment. Health Hazards to Humans, Plants and Animals. Organics Lewis Publishers **2**: 1500 pp.
- Erickson, B. D. y Mondello, F. J.** (1992). Nucleotide sequencing and transcriptional mapping of the genes encoding biphenyl dioxygenase, a multicomponent polychlorinated-biphenyl-degrading enzyme in *Pseudomonas* strain LB400. *J. Bacteriol.* **174**: 2903- 2912.
- Eulberg, D., Lakner, S., Golovleva, L.A. y Schlomann, M.** (1998) Characterization of a protocatechuate catabolic gene cluster from *Rhodococcus opacus* 1CP: Evidence for a merged enzyme with 4-carboxymuconolactone-decarboxylating and 3-oxoadipate enol-lactone-hydrolyzing activity. *J. Bacteriol.* **180**: 1072-1081.
- Farr, S.B. y Kogoma, T.** (1991) Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol. Rev.* **55**: 561-585.
- Fortin, P.D., Horsman G.P., Yang, H.M. y Eltis, L.D.** (2006) A glutathione S-transferase catalyzes the dehalogenation of inhibitory metabolites of polychlorinated biphenyls. *J Bacteriol.* **188**: 4424-30.
- Frantz, B. y Chakrabarty, M.** (1987) Organization and nucleotide sequence determination of a gene cluster involved in 3-chlorocatechol degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 4460-4464.
- Fridovich, I.** (1995) Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* **64**: 97-112.
- Fridovich, I.** (1997) Superoxide anion radical ($O_2^{\cdot -}$), superoxide dismutases, and related matters. *J. Biol. Chem.* **272**: 18515-18517.
- Fritsche, W. y Hofrichter, M.** (2000) Aerobic degradation by microorganisms. *Bio/Technology* **11b**:145-167.
- Fukumori, F. y Kishii, M.** (2001) Molecular cloning and transcriptional analysis of the alkyl hydroperoxide reductase genes from *Pseudomonas putida* KT2440. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **47**: 269-277.

- Furukawa, K. y Miyazaki, T. (1986) Cloning of a gene cluster encoding biphenyl and chlorobiphenyl degradation in *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *J. Bacteriol.* **166**: 392-398.
- Gage, D.J. y Neidhardt, F.C. (1993) Adaptation of *Escherichia coli* to the uncoupler of oxidative phosphorylation 2,4- dinitrophenol. *J. Bacteriol.* **175**: 7105-7108.
- Garbe, T.R., Kobayashi, M. y Yukawa, H. (2000) Indole-inducible proteins in bacteria suggest membrane and oxidant toxicity. *Arch. Microbiol.* **173**: 78-82.
- Gescher, J., Zaar, A., Mohamed, M., Schâgger, H. y Fuchs, G. (2002) Genes coding for a new pathways of aerobic benzoate metabolism in *Azoarcus evansii*. *J. Bacteriol.* **184**: 6301-6315.
- Gibson, J. y Harwood, C.S. (2002). Metabolic diversity in aromatic compound utilization by anaerobic microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**: 345-369.
- Gil del Valle, L., Martínez-Sánchez, G., González-Blanco, I. y Pérez Avila L. (1999) Estrés oxidativo: Mecanismos generales involucrados y su relación con el virus de inmunodeficiencia humana. *Bioquímica* **24**: 85-97.
- Giuffrida, M.G., Pessione, E., Mazzoli, R., Dellavalle, G., Barullo, C., Conti, A. y Giunta, C. (2001) Media containing aromatic compounds induce peculiar proteins in *Acinetobacter radioresistens*, as revealed by proteome analysis. *Electrophoresis* **22**: 1705-1711.
- Gogniat, G., Thyssen, M., Denis, M., Pulgarin, C. y Dukan, S. (2006) The bacterial effect of TiO₂ photocatalysis involves adsorption onto catalyst and the loss of membrane integrity. *FEMS Microbiol. Lett.* **1**: 18-24.
- González-Flecha, B. y Demple B. (2000) Genetic responses to free radicals: homeostasis and gene control. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **899**: 69 - 87.
- Goris, J., De Vos, P., Caballero-Mellado, J. Park, J., Falsen, E. y Quensen, III J.F., *et al.* (2004) Classification of the biphenyl- and polychlorinated biphenyl-degrading strain LB400T and relatives as *Burkholderia xenovorans* sp nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 1677-1681.
- Goulielmos, G.N., Arhontaki, K., Eliopoulos, E., Tserpistali, K., Tsakas, S. y Lukas, M. (2003). *Drosophila* Cu, Zn superoxide dismutase gene confers resistance to paraquat in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **308**: 433- 438.
- Graves, P.R. y Hystead, T.A. (2002) Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* **66**: 39-63.
- Gutteridge, J.M. y Halliwell, B. (1990) The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem. Sci.* **15**: 129-35.

- Haddock, J.D., Horton J.R. y Gibson, D.T. (1995) Dihydroxylation and dechlorination of chlorinated biphenyls by purified biphenyl-2,3-dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain LB400. *J. Bacteriol.* **177**: 20–26.
- Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.C. (1986) Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press.
- Hansberg, W. (2002) Biología de las especies de oxígeno reactivos. Universidad Nacional Autónoma de México. <http://laguna/fmedic.unam.mx>.
- Harayama, S. y Timmis, K.N. (1992) Aerobic biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria. En: Metal Ions in Biological Systems. Sigel, H. y Sigel, A. (eds.). New York: Marcell Dekker, Inc.: 99-156.
- Harwood, C.S. y Parales, R.E. (1996) The b-ketoadipate pathway and the biology of self-identity. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**: 553-590.
- Heider, J. y Fuchs, G. (1997) Anaerobic metabolism of aromatic compounds. *Eur. J. Biochem.* **243**: 577-96.
- Heim, S., Lleo, M., Bonato, B., Guzmán, C.A. y Canepari, P. (2002) The viable but nonculturable state and starvation are different stress responses of *Enterococcus faecalis*, as determined by proteome analysis. *J. Bacteriol.* **184**: 6739-6745.
- Hidalgo, M.E., Fernández, E., Cabello, A., Rivas, C., Fontecilla, F., Morales, L., Aguirre, A. y Cabrera, E. (2006) Evaluación de la respuesta antioxidante en *Chiton granosus* Frembly 1928 (Mollusca: Polyplacophora) a contaminantes oxidativos. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* **41**: 155-165.
- Hofer, B., Eltis, L.D., Dowling, D.N. y Timmis K.N. (1993) Genetic analysis of a *Pseudomonas* locus encoding a pathway for biphenyl/polychlorinated biphenyl degradation. *Gene* **130**: 47-55.
- Hofer, B., Backhaus, S. y Timmis, K.N. (1994) The biphenyl/polychlorinated biphenyl degradation locus (bph) of *Pseudomonas* sp. LB400 encodes four additional metabolic enzymes. *Gene* **144**: 9-16.
- Holden, M.T.G., Titball, R.W., Peacock, S.J., Cerdano-Tarraga, A.M., Atkins, T., Crossman, L.C., Pitt, T., Churcher, C., Mungall, K., Bentley, S.D., et al., (2004). Genomic plasticity of the causative agent of melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 14240-14245.
- Imlay, J.A. (2003) Pathways of oxidative damage. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**: 395-418.
- Jacobson, F.S., Morgan, R. W., Christman, M.F. y Ames, B.N. (1989). An alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium* involved in the defense of DNA against oxidative damage. *J. Biol. Chem.* **264**: 1488-1496.
- Jakubowshy, W., Bilinski, T. y Bartosz, G. (2000) Oxidative stress during aging of stationary cultures of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Free Radic. Biol. Med.* **5**: 659-664.

- Jiménez, J.I., Miñambres, B., García, J.L. y Díaz, E.** (2002) Genomic analysis of the aromatic catabolic pathways from *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* **4**: 824-841.
- Jiménez, J.I., Miñambres, B., García, J.L. y Díaz, E.** (2004) Genomic insights in the catabolism of aromatic compounds in *Pseudomonas*. In *Pseudomonas*. Vol. 3. Ramos, J.L. (ed). New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers: 425-462.
- Jones, K.C. y Vogt, P.De.** (1999) Persistent organic pollutants (POPs): states of the science. *Environ. Pollut.* **100**: 209-221.
- Jung, L.II y Kim, G.** (2003) Transcription of *ahpC*, *katG*, y *katE* genes in *Escherichia coli* is regulated by polyamines: polyamine-deficient mutant sensitive to H₂O₂-induced oxidative damage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **301**: 915-922.
- Junichi, M., Torii, Y., Hayashi, S., Takimoto, K., Matsui, K., Nakamura, K., Inze, D., Babiychuk, E., Kushnir, S. y Asada, K.** (2002) The NADPH:quinone oxydoreductase P1-crystallin in *Arabidopsis* catalyzes the α , β -hydrogenation of 2-alkenals; detoxication of the lipid peroxide-derived reactive aldehydes. *Plant. Cell. Physiol.* **43**: 1445-1455.
- Kang, Y., Lee, Y., Jung, H., Jeon C., Madsen, E.L. y Park, W.** (2007) Overexpressing antioxidant enzymes enhances naphthalene biodegradation in *Pseudomonas* sp. strain As1. *Microbiology* **153**: 3246-3254.
- Kasberg, T., Seibert, V., Schlömann, M., y Reineke, W.** (1997) Cloning, characterization, and sequence analysis of the *clcE* gene encoding the maleylacetate reductase of *Pseudomonas* sp. Strain B13. *J. Bacteriol.* **179**: 3801-3803.
- Keyer, K., e Imlay, J.A.** (1996) Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 13635-13640.
- Kim, S.I., Song, S.Y., Kim, K.W., Ho, E.M. y Oh, K.H.** (2003) Proteomic analysis of the benzoate degradation pathway in *Acinetobacter* sp. KS-1. *Res Microbiol.* **154**: 697-703.
- Kim, S.O., Merchant, K., Nudelman, R., Wayne, F., Beyer, J., Keng T., DeAngelo J., Hausladen A. y Stamler J.S.** (2002) OxyR: A Molecular code for redox-related signaling. *Cell* **109**: 383-396.
- Kim, K.S., Choi, S.Y., Kwon, H.Y., Won, M.H., Kang, T.C. y Kang, J.H.** (2002) Aggregation of α -synuclein induced by the Cu, Zn-superoxide dismutase and hydrogen peroxide system. *Free Radic. Biol. Med.* **32**: 544-550.
- Krayl, M., Benndorf, D., Loffhagen, N. y Babel, W.** (2003) Use of proteomics and physiological characteristics to elucidate ecotoxic effects of methyl tert-butyl ether in *Pseudomonas putida* KT2440. *Proteomics* **3**: 1544-1552.
- Kurnasov, O., Goral V., Colabroy K., Gerdes S., Anantha S., Osterman, A. y Begley, T. P.** (2003). NAD biosynthesis: identification of the tryptophan to quinolinate pathway in bacteria. *Chem. Biol.* **10**:1195-1204.

- Lee, M.C., Shoji, H., Miyazaki, H., Yoshino, F., Hori, N., Miyake, S., Ikeda, Y., Anzai, K. y Ozawa, T. (2003). Measurement of oxidative stress in the rodent brain using computerized electron spin resonance tomography. *Magn. Reson. Med. Sci.* **2**: 79-84.
- Lee, Y.Y., Chang C. F., Kuo, C.L., Chen, M.C., Yu, C.H., Lin, P.I. y Wu, W.F. (2003) Subunit oligomerization and substrate recognition of the *Escherichia coli* ClpYQ (HslUV) protease implicated by in vivo protein-protein interactions in the yeast two-hybrid system. *J. Bacteriol.* **185**: 2393–2401.
- Lefebvre, M.D. y Valvano, M.A. (2001) *In Vitro* resistance of *Burkholderia cepacia* complex isolates to reactive oxygen species in relation to catalase and superoxide dismutase production. *Microbiology* **147**: 97-109.
- Leichert, L.I., Scharf, C. y Hecker, M. (2003) Global characterization of disulfide stress in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **185**: 1967-1975.
- Lerat E, Daubin V, Ochman H. y Moran NA. (2005) Evolutionary origins of genomic repertoires in bacteria. *PLoS Biol.* **5**:e130.
- Li, Y., Hugenholtz, J., Abee, T. y Molenaar, D. (2003) Glutathione protects *Lactococcus lactis* against oxidative stress. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 5739-5745.
- Lindqvist, A., Membrillo-Hernandez, J., Poole, R.K. y Cook, G.M. (2000) Roles of respiratory oxidases in protecting *Escherichia coli* K12 from oxidative stress. *Antonie van Leeuwenhoek* **78**: 23–31.
- Loewen, P.C., Switala, J. y Trigós-Raine, L. (1985) Catalases HPI and HPII in *Escherichia coli* are induced independently. *Arch. Biochem. Biophys.* **243**: 144-149.
- Loomis, D., Browning, S.R., Schenck, A.P., Gregory, E. y Savitz, D.A. (1997) Cancer mortality among electric utility workers exposed to polychlorinated biphenyls. *Occup. Environ. Med.* **54**: 720-728.
- Loprasert, S., Whangsuk, W., Sallabhan R. y Mongkolsuk, S. (2003) Regulation of the katG-dpsA operon and the importance of KatG in survival of *Burkholderia pseudomallei* exposed to oxidative stress. *FEBS Letters* **542**: 17-21.
- Loprasert, S., Sallabhan, R., Whangsuk, W. y Mongkolsuk, S. (2003) Compensatory increase in *ahpC* gene expression and its role in protecting *Burkholderia pseudomallei* against reactive nitrogen intermediates. *Arch. Microbiol.* **180**: 498-502.
- MacDonald, R.W., L.A. Barrie, T.F. Bidleman, M.L. Diamond, D.J. Gregor, R.G. Semkin, W.M. Strachan, J. Li, Y.F. Wania, F. Alae, M. *et al.* (2000) Contaminants in the Canadian arctic: 5 years of progress in understanding sources, occurrence and pathways. *Sci. Total Environ.* **254**: 93-234.
- MacKay, D.B., Prucha, M., Reineke, W., Timmis, K.N. y Pieper, D.H. (2003) Substrate specificity and expression of three 2,3-dihydroxybiphenyl-1,2-dioxygenase from *Rhodococcus globerulus* strain P6. *J. Bacteriol.* **185**: 2944-2951.

- Martinez, P., Agulló, L., Hernandez, M. y Seeger, M.** (2007) Chlorobenzoate inhibits growth and induces stress proteins in the PCB-degrading strain *Burkholderia xenovorans* LB400. Submitted to Archives in Microbiology.
- McFall, S.M., Abraham B., Narsolis C. G. y Chakrabarty, A.M.** (1997) A tricarboxylic acid cycle intermediate regulating transcription of a chloroaromatic biodegradative pathway: fumarate-mediated repression of the *clcABD* operon. *J. Bacteriol.* **179**:6729-6735.
- McLeod, M.P., Warren, R.L., Hsiao, W.W.L., Araki, N., Myhre, M., Fernandes, C., Miyazawa, D., Wong, W., Lillquist, A.L., Wang, D., Dosanjh, M., Hara, H., Petrescu, A., Morin, R.D., Yang, G., Stott, J.M., Schein, J.E., Shin, H., Smailus, D., Siddiqui, Marra A.S., Jones, M.A., S. J. M., Holt, R., Brinkman, F. S. L., Miyauchi, K., Fukuda, M., Davies, J.E., Mohn, W.W. y Eltis, L.D.** (2006) The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**: 15582-15587.
- Miller, J.H.** (1972) Experiments in molecular genetics. New York: Cold Spring Harbor Press.
- Min, J., Chang, Y.S. y Gu, M.B.** (2003) Bacterial detection of the toxicity of dioxins, polychlorinated diphenyls, and polybrominated diphenyl ethers. *Environ. Toxicol. Chem.* **22**: 2238-2242.
- Mondello, F.J.** (1989) Cloning and expression in *Escherichia coli* of *Pseudomonas* strain LB400 genes encoding polychlorinated biphenyl degradation. *J. Bacteriol.* **171**: 1725-1732.
- Morasch, B., Schink, B., Tebbe, C. y Meckenstock, R.** (2004) Degradation of o-xylene and m-xylene by a novel sulfate-reducer belonging to the genus *Desulfotomaculum*. *Arch. Microbiol.* **181**: 407-417.
- Moreno-Ruiz, E., Hernández, M.J., Martínez-Perez, O. y Santero, E.** (2003) Identification and functional characterization of *Sphingomonas macrogolita* strain TFA genes involved in the first two steps of the tetralin catabolic pathway. *J. Bacteriol.* **185**: 2026-2030.
- Mongkolsuk, S., Whangusk, W., Vattanaviboon, P., Loprasert, S. y Fuangthong, M.** (2000) A *Xanthomas* alkyl hydroperoxide reductase subunit C (*ahpC*) mutant showed an altered peroxide stress response and complex regulation of the compensatory response of the compensatory response of peroxide detoxification enzymes. *J. Bacteriol.* **182**: 6845-6849.
- Morgan, R.W., Christman, M.F., Jacobson, F.S., Storz, G. y Ames, B.N.** (1986) Hydrogen peroxide-inducible proteins in *Salmonella typhimurium* overlap with heat shock and other stress proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 8059-8063.
- Morris, P.J., Mohn W.W., Quensen, J.F., Tiedje, J.M. y Boyd, S.A.** (1992) Establishment of a polychlorinated biphenyl-degrading enrichment culture with predominantly meta dechlorination. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3088-3094.

- Mostertz, J., Scharf, C., Hecker, M. y Homuth, G.** (2004) Transcriptome and proteome analysis of *Bacillus subtilis* gene expression in response to superoxide and peroxide stress. *Microbiology*. **150**: 497-512.
- Navia, R. y Seeger, M.** (2006) Biorremediación de suelos contaminados con compuestos orgánicos persistentes (COPs), Vol. 1, 225 pp., Editorial Universidad de La Frontera, Temuco.
- Nawaz, M. S., Heinze, T. M. y Cerniglia, C. E.** (1992) Metabolism of benzonitrile and butyronitrile by *Klebsiella pneumoniae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 27-31.
- Negoita, T.G., Covaci, A., Gheorghe, A. y Schepens, P.** (2003) Distribution of polychlorinated biphenyls (PCBs) and organochlorine pesticides in soils from the East Antarctic coast. *J. Environ. Monit.* **5**: 281-286.
- Neidhardt, F.C. y VanBogelen, R.A.** (2000) Proteomic analysis of bacterial stress responses. En *Bacterial stress response*, ed. Storz, G. y Hengge-Aronis, R. 445-452.
- Nelson, K.E., Weinel, C., Paulsen, I.T., Dodson, R.J., Hilbert, H., Martins dos Santos, V.A.P., Fouts, D.E., Gill, S.R., Pop, M., Holmes, M., Brinkac, L., Beanan, M., DeBoy, R.T., Daugherty, S., Kolonay, J., Madupu, R., Nelson, W., White, O., Peterson, J., Khouri, H., Hance, I., Lee, P.C., Holtzapple, E., Scanlan, D., Tran, K., Moazzez, A., Utterback, T., Rizzo, M., Lee, K., Kosack, D., Moestl, D., Wedler, H., Lauber, J., Stjepandic, D., Hoheisel, J., Straetz, M., Heim, S., Kiewitz, C., Eisen, J. y Timmis, K.N.** (2002) Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* **4**: 799-808.
- Nicolopoulou-Stamati, P. y Pitsos, M.A.** (2001) The impact of endocrine disrupters on the female reproductive system. *Human reproduction update*. **7**: 323-330.
- Nierman, W.C., DeShazer, D., Kim, H.S., Tettelin, H., Nelson, K.E., Feldblyum, T., Ulrich, R.L., Ronning, C.M., Brinkac, L.M., Daugherty, S.C., Davidsen, T.D., Deboy, R.T., Dimitrov, G., Dodson, R.J., Durkin, A.S., Gwinn, M.L., Haft, D.H., Khouri, H., Kolonay, J.F., Madupu, R., Mohammoud, Y., Nelson, W.C., Radune, D., Romero, C.M., Sarria, S., Selengut, J., Shamblin, C., Sullivan, S.A., White, O., Yu, Y., Zafar, N., Zhou, L. y Fraser, C.M.** (2004) Structural flexibility in the *Burkholderia mallei* genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 14246-51.
- Niimura, Y., Poole, L.B. y Massey, V.** (1995) *Amphibacillus xylanus* NADH oxidase and *Salmonella typhimurium* alkyl-hydroperoxide reductase flavoprotein components show extremely high scavenging activity for both alkyl hydroperoxide and hydrogen peroxide in the presence of *S. typhimurium* alkyl-hydroperoxide reductase 22-kDa protein component. *J. Biol. Chem.* **270**: 25645-25650.
- Nogales, B., Moore E.R., Abraham W. y Timmis K.N.** (1999) Identification of the metabolically active members of a bacterial community in a polychlorinated biphenyl-polluted moorland soil. *Environ. Microbiol.* **1**: 199-212.

- Ochsner, U.A., Vasil, M.L., Alsabbagh, E., Parvatiyar, K. y Hassett, D.J. (2000) Role of the *Pseudomonas aeruginosa oxyR-recG* operon in oxidative stress defense and DNA repair: OxyR-dependent regulation of *katB-ankB*, *ahpB*, y *ahpC-ahpF*. *J. Bacteriol.* **182**: 4533-4544.
- O'Farrell., P.H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **25**: 4007-4021.
- O'Farrell, P. Z., Goodman, H. M. y O'Farrell, P.H. (1977) High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell* **12**: 1133-1142.
- Ojumu, T.V., Yu, J. y Solomon, B.O. (2004) Production of polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. *Afri. J. Biotech.* **3**: 18-24.
- Palma-Fleming, H., Cornejo, C., González, M., Pérez, V., González, M., Gutierrez, E., Sericano, J.L. y Seeger, M. (2008) Polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in coastal environments of Valdivia and Valparaíso, Chile. *J. Chil. Chem. Soc.* **53**: 1533-1538.
- Parke, D. (1996) Characterization of PcaQ, a LysR-type transcriptional activator required for catabolism of phenolic compounds, from *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **178**: 266-272.
- Parke, D., García, M.A. y Ornston, L.N. (2001) Cloning and genetic characterization of *dca* genes required for b-oxidation of straight-chain dicarboxylic acids in *Acinetobacter sp.* strain ADP1. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 4817-4827.
- Park, S.H., Oh, K.H. y Kim, C.K. (2001) Adaptive and cross-protective responses of *Pseudomonas sp.* DJ-12 to several aromatics and other stress shocks. *Curr. Microbiol.* **43**: 176-181.
- Peacock, T.J. (2008) Biological Role of Mn-catalase in Select Lactobacilli. Tesis para el grado de Doctor of Philosophy, North Carolina State University.
- Pérez, J.M. (2007) Rol de la proteína Yqhd de *Escherichia coli* en la resistencia a telurito de potasio (K₂TeO₃). Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Chile. Facultad de Química y Biología.
- Pérez-Pantoja, D., De la Iglesia, R., Pieper, D.H. y González, B. (2008) Metabolic reconstruction of aromatic compounds degradation from the genome of the amazing pollutant-degrading bacterium *Cupriavidus necator* JMP134. *FEMS Microbiol Rev.* (DOI:10.1111/j.1574-6976.2008).
- Peters, F., Rother, M. y Boll, M. (2004) Selenocysteine-containing proteins in anaerobic benzoate metabolism of *Desulfococcus multivorans*. *J. Bacteriol.* **186**: 2156-2163.
- Pieper, D. y Reinecke W. (2000) Engineering bacteria for biorremediation. *Curr. Opin. Biotech.* **11**: 262-270.
- Pieper, D. y Seeger, M. (2008) Bacterial metabolism of polychlorinated biphenyl. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **15**: 121-138.

- Pomposiello, P. y Demple, B.** (2001) Redox- operated genetic switches: the SoxR and OxyR transcription factors. *Trends Biotechnol.* **19**: 109-114.
- Quensen, J.F.III., Tiedje, J.M. y Boyd, S.A.** (1988) Reductive dechlorination of polychlorinated biphenyls by anaerobic microorganisms from sediments. *Science* **242**: 752–754.
- Ramos, J.L., Díaz, E., Dowling, D., de Lorenzo, V., Molin, S., O'Gara, F., Ramos, C. y Timmis, K.N.** (1994) The behavior of bacteria designed for biodegradation. *Biotechnology* **12**: 1349-1356.
- Ravatn, R., Studer S., Springael D., Zehnder A. J. B. y Van der Meer J.R.** (1998a) Chromosomal integration, tandem amplification, and deamplification in *Pseudomonas putida* F1 of a 105-kilobase genetic element containing the chlorocatechol degradative genes from *Pseudomonas* sp. strain B13 *J. Bacteriol.* **180** : 4360–4369.
- Renzone, G., D'Ambrosio, C., Arena, S., Rullo, R., Ledda, L., Ferrara, L. y Scaloni, A.** (2005) Differential proteomic analysis in the study of prokaryotes stress resistance. *Ann. Ist. Super. Sanita.* **41**: 459-68.
- Roper, D.I., Stringfellow, J.M. y Cooper, R.A.** (1995) Sequence of the *hpcC* and *hpcG* genes of the meta-fission homoprotocatechuic acid pathway of *Escherichia coli* C: nearly 40% amino-acid identity with the analogous enzymes of the catechol pathway. *Gene* **156**: 47-51.
- Ruiz-Leal, M. y Georges, S.** (2004) An in vitro procedure for evaluation of early stage oxidative stress in an established fish cell line applied to investigation of PHAH and pesticide toxicity. *Mar. Environ. Res.* **58**: 781.
- Saavedra, M.** (2005) Construcción y caracterización de bacterias recombinantes degradadoras de policlorobifenilos. Trabajo de titulación para obtener el título profesional de Ingeniero en Biotecnología Molecular, Universidad de Chile.
- Salunkhe, P., Töpfer, T., Buer, J. y Tümmler, B.** (2005) Genome-wide transcriptional profiling of the steady-state response of *Pseudomonas aeruginosa* to hydrogen peroxide. *J. Bacteriol.* **187**: 2565-2572.
- Sambrook, J. y Russell, D.W.** (2001) Molecular Cloning: A laboratory manual. Volume 1-3. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sambrook, J., Fritch, E. F. y Maniatis, T.** (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A.R.** (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.
- Sarokin, D.** (1988) The toxics release inventory. *Environ. Sci. Technol.* **22**: 616-618.

- Schafer, A., Tauch, A., Jager, W., Kalinowski, J., Thierbach, G. y Puhler, A. (1994) Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**: 69-73.
- Schimada, T., y Kuriyama, F., 2004. Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1. *Cancer Sci.* **95**: 1-6.
- Schmid, A., Dordick J. S., Hauer B., Kiener A., Wubbolts M., y Witholt B. (2001) Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* **409**: 258-268.
- Schuh J, Faitclough C.F. y Haschemeyer R.H. (1975) Oxygen mediated heterogeneity of apoprotein low density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 3173-3177.
- Seaver, L.C. e Imlay, J.A. (2001) Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183**: 7173-7181.
- Seeger, M. y Jerez, C.A.(1992) The lack of phosphate affects global gene expression in *Thiobacillus ferrooxidans*. *Geomicrobiol. J* **10** : 227-237.
- Seeger, M., Timmis, K.N. y Hofer, B. (1995a) Conversion of chlorobiphenyls into phenylhexadienoates and benzoates by the enzymes of the upper pathway for polychlorobiphenyl degradation encoded by the bph locus of *Pseudomonas sp.* Strain LB400. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2654-2658.
- Seeger, M., Osorio, G., y Jerez, C. (1996) Phosphorylation of GroEL, DnaK and other proteins from *Thiobacillus ferrooxidans* grown under different conditions. *FEMS Microbiol. Lett.* **138**: 129-134.
- Seeger, M., Timmis K.N. y Hofer, B. (1997) Bacterial pathways for the degradation of polychlorinated biphenyls. *Marine Chem.* **58**: 327-333.
- Seeger, M., Zielinski, M. Timmis, K.N. y Hofer, B. (1999) Regiospecificity of dioxygenation of di-to pentachlorobiphenyls and their degradation to chlorobenzoates by the bph-encoded catabolic pathway of *Burkholderia sp.* LB400. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 3614-3621.
- Seeger, M., Cámara, B. y Hofer, B. (2001) Dehalogenation, denitration, dehydroxylation, and angular attack on substituted biphenyls and related compounds by a biphenyl dioxygenase. *J. Bacteriol.* **183**: 3548-3555.
- Seeger, M., González, M., Cámara, B., Muñoz, L., Ponce, E., Mejías, L., Mascayano, C., Vásquez, Y. y Sepúlveda-Boza, S. (2003) Biotransformation of natural and synthetic isoflavonoids by two recombinant microbial enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 5045-5050.
- Semchyshyn, H., Bagnyukova, T., Storey, K. y Lushchak, V. (2005) Hydrogen peroxide increases the activities of soxRS regulon enzymes and the levels of oxidized proteins and lipids in *Escherichia coli*. *Cell. Bio. Intern.* **29**: 898-902.

- Sen, K., Sikkema, D.J. y Murphy, T.F. (1996) Isolation and characterization of the *Haemophilus influenzae* *tolQ*, *tolR*, *tolA* and *tolB* genes. *Gene* **178**: 75-81.
- Sericano, J.L., Wade, T.L., Jackson T.J., Brooks, J. M., Tripp, B.M., et al. (1995) Trace organic contamination in the Americas: an overview of the US national status & trends and the international "Musel Watch" programmes. *Marine Pollut. Bull.* **31**: 214-225.
- Sherman, D.R., Mdluli, K., Hickey, M.J., Arain, T.M., Morris, S.L., Barry, C.E. y Stover, C.K. (1996) Compensatory *ahpC* gene expression in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **272**: 1641-1643.
- Sies, H. (1997) Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. *Exper. Physi.* **82**: 291-295.
- Sikkema, J., de Bont, J.A.M. y Poolman, B. (1994) Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J. Biol. Chem.* **269**: 8022-8028.
- Sikkema, J., de Bont, J.A.M. y Poolman, B. (1995) Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.* **59**: 201-222.
- Smithwick, L.A., Smith, A., Quensen, J.F. III., Stack, A., London, L. y Morris, P.J. (2003) Inhibition of LPS-induced splenocyte proliferation by ortho-substituted polychlorinated biphenyl congeners. *Toxicology* **188**: 319-333.
- Spek, E.J., Wright, T.L., Stitt, M.S., Taghizadeh, N.R., Tannenbaum, S.R., Marinus, M.G., Engelward, B.P. (2001) Recombinational repair is critical for survival of *Escherichia coli* exposed to nitric oxide. *J. Bacteriol.* **183**: 131-138.
- Spormann, A.M. y Widdel, F. (2000) Metabolism of alkylbenzenes, alkanes, and other hydrocarbons in anaerobic bacteria. *Biodegradation* **11**: 85-105.
- Stadtman, E.R. y Berlett, B. (1991) Fenton Chemistry. Amino acid oxidation. *J. Biol. Chem.* **266**: 17201-17211.
- Steinbuchel, A. y Valentin, H.E. (1995) Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiol. Lett.* **128**: 219-228.
- Storz, G., Jacobson, F.S., Tartaglia, L.A., Morgan, R.W., Silveira, L.A., y Ames, B.N. (1989) An alkyl hydroperoxide reductase induced by oxidative stress in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*: genetic characterization and cloning of *ahp*. *J. Bacteriol.* **171**: 2049-2055.
- Storz, G., Tartaglia, L.A., y Ames, B.N. (1990) Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation. *Science* **248**: 189-194.
- Storz, G. e Imlay J.A. (1999). Oxidative stress. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**:188-194.
- Storz, G. y Zheng, M. (2000) Oxidative Stress. En Bacterial stress response, ed. Stortz, G. y Hengge-Aronis, R. 47-59. ASM press, Washington.
- Sudesh, K., Abe, H. y Doi, Y. (2000) Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: Biological polyesters. *Prog. Polym. Sci.* **25**: 1503-1555.

- Sudesh, K., Loo, C.Y., Goh, L.K., Iwata, T. y Maeda, M. (2007) The oil-absorbing property of polyhydroxyalkanoate films and its practical application: A refreshing new outlook for an old degrading material. *Macromol. Biosc.* **7**: 1199 – 1205.
- Tiedje, J.M., Quensen, J.F., 3rd, Chee-Sanford, J., Schimel, J.P. y Boyd, S.A. (1993) Microbial reductive dechlorination of PCBs. *Biodegradation* **4**: 231–240.
- Timmis, K.N., Steffan, R.J. y Unterman, R. (1994) Designing microorganisms for the treatment of toxic wastes. *Annu. Rev. Microbiol.* **48**: 525-557.
- Timmis, K.N. y Pieper, D.H. (1999) Bacteria designed for bioremediation. *Trends Biotechnol.* **17**: 201-204.
- Van der Meer, J. R., Van Nerven A. R. W., de Vries E. J., de Vos W. M. y Zehnder, A.J. B. (1991) Cloning and characterization of plasmid-encoded genes for the degradation of 1,2-dichloro-, 1,4-dichloro-, and 1,2,4-trichlorobenzene of *Pseudomonas sp. strain P51*. *J. Bacteriol.* **173**: 6-15.
- Van der Meer, J.R., de Vos, W.M., Harayama, S. y Zehnder, A.J. (1992) Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiol. Rev.* **56**: 677-694.
- Van Gijssel, H., Schild, L., Watt, G. Wang, S., Dawsey, P., Albert, Y., Qiao, P., Tailor, Z. y Poirier, M. (2004) Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts determined by semiquantitative immunohistochemistry in human esophageal biopsies taken in 1985.. *Res. Fund. Mol. Mech. Mutagen.* **547**: 55-62.
- Vergauwen, B., Pauwels, F., Vanechoutte, M. y Van Beeumen, J.J. (2003) Exogenous glutathione completes the defense against oxidative stress in *Haemophilus influenzae*. *J. Bacteriol.* **185**: 1572-1581.
- Voie, O.A. y Fonnum, F. (2000) Effect of polychlorinated biphenyls on production of reactive oxygen species (ROS) in rat synaptosomes. *Archi. Toxicol.* **73**: 588-593.
- Wackett, L.P. (2003) *Pseudomonas putida*--a versatile biocatalyst. *Nat Biotechnol.* **21**:136-8.
- Wagrowski, D.M. y Hites, R.A. (2000) Polycyclic aromatic hydrocarbons accumulation in urban, suburban, and rural vegetation. *Environ.. Sci. Technol.* **31**: 279-282.
- Wogan, G., Hecht, S., Felton, J. Conney, A. y Loeb, L. (2004) Multistep and multifactorial carcinogenesis: when does a contributing factor become a carcinogen. *Seminars Cancer Biol.* **14**: 473.
- Zheng, M., Astund, F. y Stortz, G. (1998) Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation. *Science* **279**: 1718-1721.
- Zheng, M., Doan, B., Schneider, T.D. y Store, G. (1999) OxyR and SoxRS regulation of *fur*. *J. Bacteriol.* **181**: 4639-4643.
- Zheng, M. y Stortz, G. (2000) Redox sensing by prokaryotic transcription factors. *Biochem. Pharmacol.* **59**: 1-6.

***IX PUBLICACIONES Y
PARTICIPACIÓN A CONGRESOS***

PUBLICACIONES

1. Arredondo, T., Seeger, M., Dombrowskaia, L., Avarias, J., Calderón, F., Candel, D., Muñoz, F., **Latorre, V.**, Agulló, L., Cordova, M., and Gómez, L. 2006. Bioinformatics Integration Framework for Metabolic Pathway Data-Mining. Lecture Notes in Artificial Intelligence 4031: 917-926.
2. Chain, P., Deneff, V., Konstantinidis, K., Vergez, L., Agulló, L., **Latorre Reyes, V.**, Hauser, L., Córdoba, M., Gómez, L., González, M., Land, M., Lao, V., Larimer, F., LiPuma, J., Mahenthiralingam, E., Malfatti, S., Marx, C., Parnell, J., Ramette, A., Richardson, P., Seeger, M., Smith, D., Spilker, T., Sul, W-J, Tsoi, T., Ulrico, L., Zhulin, I., Tiedje, J. 2006. *Burkholderia xenovorans* LB400 harbors a multi-replicon, 9.7 M bp genome shaped for versatility. Proceeding of the National Academy of Sciences USA 113: 15280-15287.
3. Agulló, L., Cámara, B., Martínez, P., **Latorre-Reyes, V.** and Seeger, M. 2007. Response to (chloro)biphenyls of the PCB-degrader *Burkholderia xenovorans* LB400 involves stress proteins induced also by heat shock and oxidative stress. FEMS Microbiol. Lett. 267: 167-175.
4. Arredondo, T., Vasquez, F., Candel, D., Dombrowskaia, L., Agulló, L., Cordova, M., **Latorre, V.**, Calderón, F. and Seeger, M. 2007. Dynamic penalty based GA for inducing fuzzy inference systems. Lecture Notes in Computer Science 4756: 957-966.

IX PARTICIPACIÓN A CONGRESOS

1. **Latorre-Reyes, V.**, Agulló, L., Gómez, L., Córdoba, M., González, M., Calderón, F., Avarias, J., Dombrowskaia, L. y Seeger, M. 2005. Identificación *in silico* e *in vivo* de vías metabólicas de compuestos aromáticos en *Burkholderia xenovorans* LB400. XXVII Congreso Chileno de Microbiología and XLVIII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Chile, Pucón, Chile. Biological Research, Vol. 38, p. R-154. Octubre 2005.
2. Agulló, L., **Latorre-Reyes, V.**, Córdoba, M., Gómez, L., González, M., Candel, D., Muñoz, F., Arredondo, T. y Seeger, M. 2005. Análisis *in silico* de vías centrales para el catabolismo de compuestos aromáticos en *Burkholderia xenovorans* LB400. XXVII Congreso Chileno de Microbiología and XLVIII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Chile, Pucón, Chile. Biological Research, Vol. 38, p. R-154. Octubre 2005.
3. **Latorre-Reyes, V.**, Agulló, L., Córdoba, M., Gómez, L., González, M. and Seeger, M. 2006. Reconstruction of aromatic metabolic pathways from *Burkholderia xenovorans* LB400. 2nd FEMS Congress of European Microbiologist. Madrid, España, Vol. 1, p. 102, Julio 2006.
4. Deneff, V., Chain, P., Konstantinidis, K., Vergez, L., Agulló, L., **Latorre Reyes, V.**, Hauser, L., Land, M., Larimer, F., LiPuma, J., Mahenthiralingam, E., Parnell, J., Ramette, A., Richardson, P., Seeger, M., Tsoi, T., Zhulin, I., Tiedje, J. 2006. *Burkholderia xenovorans* LB400 harbors a multi-replicon, 9.7 M bp genome shaped for versatility. XI International Symposium on Microbial Ecology. Viena, Austria; Vol. 1, p. A215. Agosto 2006.

5. **Latorre-Reyes, V.**, Agulló, L., Córdova, M., Gómez, L., González, M. and Seeger, M. 2006. Genomic analysis of *Burkholderia xenovorans* LB400 revealed a high metabolic versatility of aromatic catabolic pathways. XVIII Congreso Latinoamericano de Microbiología, Pucón, Chile. Vol. 1, p. 104. Octubre 2006.
6. Agulló, L., **Latorre-Reyes, V.** and Seeger, M. Genomic analysis of the catabolic potential of aromatic compounds of the PCB-degrader *Burkholderia xenovorans* strain LB400. 9th Symposium on Bacterial Genetics and Ecology (BAGECO 9), Wernigerode, Alemania. Vol. 1, p. 132. Junio 2007.
7. Arredondo, T., Vásquez, F. Córdova, M. **Latorre, V.** Calderón, F. Seeger, M. "Dynamic penalty based GA for inducing Fuzzy inference systems", 12th Iberoamerican Congress on Pattern CIARP 2007, Valparaíso, Chile; noviembre 2007.

ANEXOS

Construcción de plásmidos recombinantes para la obtención de mutantes.

Se realizó la construcción de plásmidos recombinantes con inserción de genes de defensa al estrés oxidativo. Estos plásmidos recombinantes podrían ser utilizados en el futuro para la obtención de mutantes de estos genes en *B. xenovorans* LB400.

Para la construcción de estos plasmidos se amplificó por PCR la región central del gen *ahpC*, *sodB*, *hslU*, *oxyR*, *cyoB* y *tolA* con los primers respectivos para cada gen (Tabla 4). El producto de amplificación obtenido fue clonado en el plásmido suicida *pK18mob*, generando los plásmidos recombinantes *pK18mobahpC*, *pK18mobsodB*, *pK18mobhslU*, *pK18moboxyR*, *pK18mobcyoB* y *pK18mobtolA*. Dichos plásmidos podrán ser transferidos desde *E. coli* S17-*Δ**pir* como cepa dadora, a la cepa receptora *B. xenovorans* LB400, mediante conjugación biparental. Un esquema del proceso de la estrategia de construcción de los plásmidos recombinantes se muestra en la Figura 34.

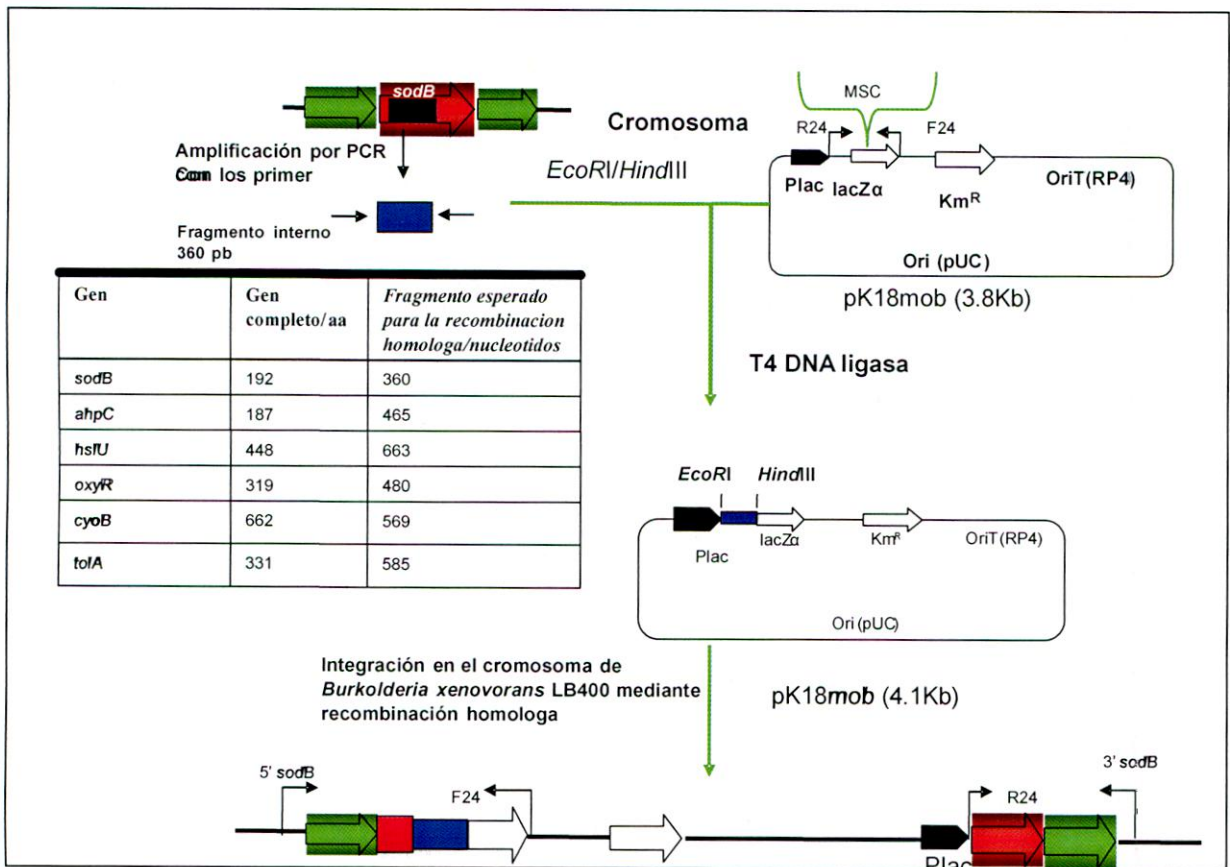


Figura 34. Estrategia para la construcción de mutantes de genes de defensa al estrés oxidativo. En la parte superior se esquematiza el extremo 5' de *sodB*, representándose en rojo el gen. Las flechas negras indican la dirección de los genes. El rectángulo azul representa el fragmento interno del gen *sodB*. Los primers universales F24 y R24 se pueden emplear para comprobar por PCR la correcta inserción de *sodB*. Se representan los orígenes de replicación ori (pUC) y de transferencia oriTRP4. Km^r representa el gen que codifica la resistencia a kanamicina. Las enzimas de restricción se indican como *EcoRI* (E), *HindIII* (H), *SmaI* (S).

En la Tabla 19 se describe las cepas que permitirán generar mutantes por recombinación homóloga de genes de respuesta a estrés oxidativo.

Tabla 19. Plásmidos recombinantes construidos para la obtención de cepas mutantes de genes de estrés oxidativo

<i>epas</i>	<i>Construcción</i>	<i>AB^R</i>
DH10Bpk18moboxyR5	<i>E.coli</i> DH10B con fragmento interno oxyR en pK18mob clon 5	Km ₅₀
DH10Bpk18mobhslU6	<i>E.coli</i> DH10B con fragmento interno hslU en pK18mob clon 6	Km ₅₀
DH10Bpk18mobsodB2	<i>E.coli</i> DH10B con fragmento interno sodB en pK18mob clon 2	Km ₅₀
DH10Bpk18mobahpC5	<i>E.coli</i> DH10B con fragmento interno ahpC en pK18mob clon 5	Km ₅₀
DH10Bpk18mobcyoB1	<i>E.coli</i> DH10B con fragmento interno cyoB en pK18mob clon 1	Km ₅₀
S17λpirpK18mobsodB1	<i>E.coli</i> S17λpir con fragmento interno sodB en pK18mob clon 1	Km ₅₀
S17λpirpK18moboxyR1	<i>E.coli</i> S17λpir con fragmento interno oxyR en pK18mob clon 1	Km ₅₀
S17λpirpK18mobhslU3	<i>E.coli</i> S17λpir con fragmento interno hslU en pK18mob clon 3	Km ₅₀
S17λpirpK18mobahpC1	<i>E.coli</i> S17λpir con fragmento interno ahpC en pK18mob clon 1	Km ₅₀
S17λpirpK18mobcyoB1	<i>E.coli</i> S17λpir con fragmento interno cyoB en pK18mob clon 1	Km ₅₀
S17λpirpK18mobcyoB2	<i>E.coli</i> S17λpir con fragmento interno sodB en pK18mob clon 2	Km ₅₀

AB^r : resistencia a antibiótico