

Tesis de Licenciatura

Biodegradación microbiana de bifenilos policlorados

Casasco, Paula Valeria

Tesis presentada para obtener el grado de Licenciado en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis de licenciatura de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Six-Year Bachelor's Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Casasco, Paula Valeria. (). Biodegradación microbiana de bifenilos policlorados. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000658_Casasco

Cita tipo Chicago:

Casasco, Paula Valeria. "Biodegradación microbiana de bifenilos policlorados". Tesis de Licenciado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. .
http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000658_Casasco

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Tesis de Licenciatura

FCE y N BIBLIOTECA

***Biodegradación microbiana de
bifenilos policlorados***

por Paula Valeria Casasco

***Director: Dr. Alberto A Viale
Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA***

Nº 065 8

AGRADECIMIENTOS

A mi jefe, el Dr. Alberto A. Viale por todo el apoyo que me brindó y por todo lo que me enseñó durante todos estos años.

A mis compañeras del laboratorio de Microbiología del Departamento de Química Biológica, por todo lo que me ayudaron siempre:

- Cecilia Vidal
- Maria Gabriela López
- Laura Guardia

Al Dr. Arturo A. Vitale del Dpto. de Química Orgánica por facilitar el uso del equipo de CGL-masa.

Este trabajo ha sido financiado con subsidios de la Universidad de Buenos Aires (UBACyT ex 175, programación 1994-1997 y TW50, programación 1998-2000) y del CONICET.

RESUMEN

Las excelentes propiedades físicas y químicas de los bifenilos policlorados-PCBs- (baja presión de vapor, baja solubilidad en agua, muy alta constante dieléctrica, estabilidad a la oxidación) condujo a un uso muy extendido de ellos, a consecuencia de lo cual en los últimos 50 años se liberaron al ambiente unas 700.000 toneladas.

Los PCBs se manufacturan y se venden como mezclas complejas que difieren en su nivel promedio de cloración.

Debido a su naturaleza lipofílica se acumulan en depósitos grasos, transmitiéndose así a través de la cadena alimentaria.

Un riesgo asociado con los PCBs es su posible rol en carcinogénesis humana.

De aguas del Río Reconquista se aislaron 10 cepas bacterianas capaces de crecer en medio mineral con PCBs como única fuente de carbono y energía.

Para valorar la capacidad de consumir los PCBs, las cepas se enfrentaron contra una mezcla comercial de estos compuestos (10 g/l de células -peso seco- contra 0,5 g/l del xenobiótico).

Las incubaciones se detuvieron llevando el pH a 1 y los PCBs remanentes se extrajeron con *n*-hexano o acetato de etilo. Los extractos fueron analizados por HPLC y en algunos casos por CGL-masa .

Dos de las 10 cepas se estudiaron con más detalle por su alto rendimiento en el consumo de PCBs a los 7 días de incubación, estas fueron: *K. oxytoca* F2 y *O. antrophi* K .

En todas las cepas aisladas, el proceso de degradación no es abiótico.

En el caso de la cepa F2 se han encontrado metabolitos hidroxilados persistentes como intermediarios del proceso. La velocidad de consumo de los intermediarios hidroxilados sería mucho mayor que la del proceso de hidroxilación.

Para la cepa K, sin embargo, no se han podido aislar metabolitos hidroxilados, no obstante se propone un mecanismo de dehalogenación reductiva como modelo del proceso de degradación.

Las características de las cepas aisladas les confieren la capacidad de ser utilizadas en biorremediación de áreas contaminadas o bien en la eliminación de compuestos xenobióticos en biorreactores.

INTRODUCCIÓN

Los bifenilos policlorados (PCBs), también conocidos por su nombre genérico como ascareles, son una familia de compuestos producidos comercialmente por cloración directa del bifenilo usando cloruro férrico o yodo como catalizadores. Los átomos de cloro pueden ubicarse en cualquiera de los diez sitios disponibles en los dos anillos bencénicos originándose así 209 compuestos teóricamente posibles. La posición de los cloros está mostrada en el esquema de la Figura 1. Se muestra también uno de los posibles compuestos originados en la reacción de cloración.

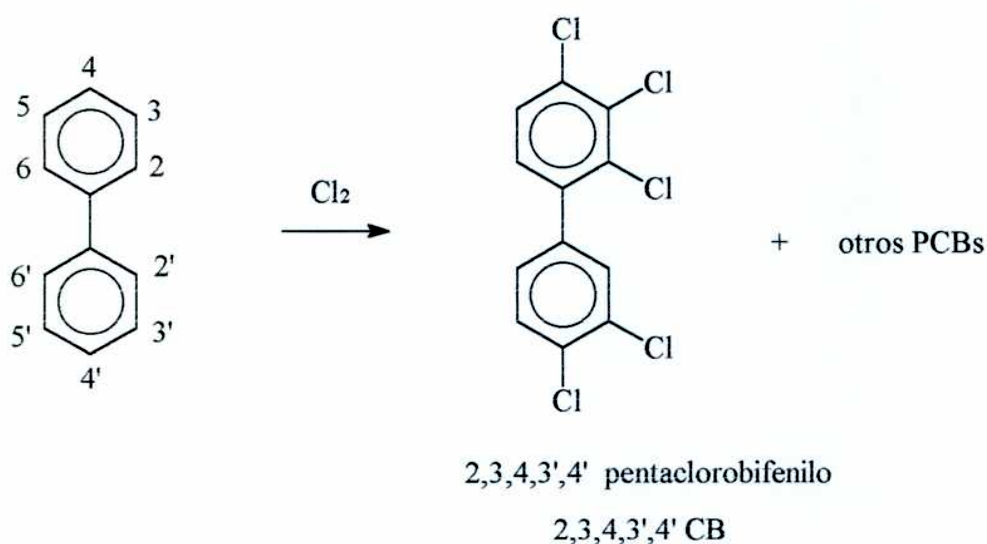


Figura 1: Síntesis de PCBs vía cloración directa de bifenilo. Por este procedimiento se originan alrededor de 100 compuestos diferentes.

Los PCBs son manufacturados y vendidos como mezclas complejas con diferentes grados de cloración. Las mezclas crudas obtenidas, se separan por destilación obteniéndose los distintos productos. Los productos van desde fluidos ligeramente oleosos (di-, tri- y tetra-clorobifenilos), aceites pesados (penta-clorobifenilos), hasta grasas y ceras (los más altamente clorados).

Varios son los nombres comerciales utilizados por los fabricantes de PCBs. Por ejemplo: “Aroclor” de Monsanto USA, “Clophen” de Farbenfabriken Bayer AG Alemania, “Kanechlor” de Kanegafuchi Chemical Industrial Co. Ltd. de Japón, etc.

Las excelentes propiedades físicas y químicas de estos compuestos han permitido su aplicación en una gran variedad de usos industriales, incluyendo fluidos hidráulicos, fluidos para la transferencia de calor, solventes, retardadores de llama y fluidos dieléctricos.

Entre las propiedades de estos productos podemos mencionar:

a) Propiedades físicas

- ❑ Baja presión de vapor (debido a sus altos puntos de ebullición).
- ❑ Baja solubilidad en agua.
- ❑ Densidades superiores a las del agua
- ❑ Altas constantes dieléctricas.
- ❑ Solubles en la mayoría de los solventes orgánicos y compatibilidad con muchos tipos de polímeros.

b) Propiedades químicas

- ❑ Gran estabilidad química, lo que les confiere estabilidad a las altas temperaturas y a la agresión química.
- ❑ No son inflamables.

La utilización de los PCBs en equipos eléctricos, comenzó hace poco más de 35 años. A fines de los 60 y principios de los 70, varios sucesos desconcertantes enfocaron la atención mundial sobre los aspectos toxicológicos y ambientales de estos compuestos.

- ❑ En 1966 se encontró una amplia dispersión de PCBs en el medio ambiente cuando científicos buscaban DDT.
- ❑ En 1968 tuvo lugar el primer envenenamiento en masa de PCBs en Japón, causado por la consumición de aceite de arroz contaminado.
- ❑ A principios del 70 ocurrieron varios incidentes en los EE.UU, a través de la contaminación en gran escala de alimento de aves de corral.
- ❑ En 1979 tuvo lugar un gran envenenamiento en masa (2500 personas) en

Yu- Lemeng, Taiwan.

Desde esa época, la mayoría de los países del mundo occidental dejaron de fabricar PCBs. Sin embargo, a pesar de las restricciones, permanecen en uso limitado, por lo menos dos décadas más, particularmente en transformadores, donde la expectativa de vida de los PCBs es de alrededor de 30 años. Aplicaciones de PCBs en operaciones de circuito abierto han sido gradualmente descartadas en países de la OECD (Organización de Cooperación y Desarrollo Económico) desde 1973: por ejemplo, aceite de corte, plásticos, adhesivos, industrias de la imprenta y pintura, etc.

A fines del 60 ya a principios del 70, se descubrió que si los PCBs se exponen a temperaturas de 300 a 400°C pueden transformarse en Dibenzofuranos policlorados (PCDF's) y estas sustancias son estables hasta los 800°C. Este descubrimiento acarrió mayores preocupaciones acerca de la seguridad de los PCBs.

Los productos de degradación térmica de los PCBs, son además de los ya nombrados PCDF's, las dibenzodioxinas policloradas (PCDD's) y que se forman por la pirólisis de ciertos aditivos químicos (triclorobencenos) que se agregan en un 10-30% para bajar la viscosidad de los ascareles en los transformadores.

El origen más importante de productos de pirólisis de estos compuestos, son los incendios en transformadores y capacitores llenos de PCBs, a causa por ejemplo de un mal funcionamiento eléctrico o un cortocircuito. Estos productos originados en la descomposición química por el calor, son llevadas luego al medio ambiente por el humo y el hollín del fuego.

Pruebas con animales han demostrado que los PCDD's y PCDF's son compuestos muy tóxicos, en particular, una cierta configuración de tetracloro-p-debencidoxiona, conocida como 2-3-7-8 TCDD es extremadamente letal. Sólo una 0,6 millonésima parte de gramo por kilogramo de peso fue suficiente para matar a la mitad de una cantidad de cobayos que recibieron esa dosis. Además, las pruebas en animales han demostrado que los PCDD's Y PCDF's son potenciales cancerígenos y posiblemente mutantes genéticos.

La gran estabilidad química constituye uno de sus más graves

inconvenientes, puesto que pueden permanecer sin alteración en la naturaleza por largos períodos de tiempo, llegando a acumularse en aguas o en tierra. Los PCBs con mayor grado de cloración tienden a ser los congéneres más persistentes.

Los PCBs son productos que pueden ingresar en los organismos vivos y de acuerdo al tipo y tiempo de exposición, la toxicidad puede ser:

- ❑ crónica, de baja dosis y largo plazo
- ❑ aguda, de alta dosis y corto plazo

La exposición crónica ocurre, en la mayoría de los casos, a través de contacto con la piel e inhalación; mientras que la exposición aguda ocurre a través de las tres vías de penetración (vía respiratoria, piel o ingestión) . Las personas expuestas a los PCBs por su ocupación generalmente tienen un nivel del mismo en plasma de 10 ppb a varios miles de ppb. Los síntomas de personas expuestas son los siguientes:

- ❑ General: dolor de cabeza, pérdida de peso, dolor abdominal, impotencia, sensación de debilidad, náuseas, vómitos, dolor de músculos y coyunturas, vértigo.
- ❑ Piel: acné (cusado por el cloro), irritación (dermatitis).
- ❑ Hígado: aumento de lesiones del hígado, funcionamiento anormal, afecciones de las vías biliares.
- ❑ Respiración: bronquitis crónica, funciones de los pulmones reducida, capacidad vital reducida.

Por su naturaleza lipofílica estos compuestos se acumulan en depósitos grasos y se transmiten a través de la cadena alimentaria, por este motivo gran parte de las alteraciones orgánicas provienen de la presencia de estos compuestos en estos tejidos. Por otra parte, es muy discutida aún hoy, su posible incidencia en carcinogénesis.

Se ha documentado (1) que la toxicidad se encuentra asociada al grado de cloración de los congéneres presentes en la mezcla, siendo los más clorados los que resultan más riesgosos. Todo ello ha motivado que en la actualidad esté totalmente prohibido en la mayoría de los países su uso a escala industrial (2,3).

En un período de 50 años se han producido unas 700.000 toneladas de

PCBs. Su amplia aplicación y estabildades química y térmica, contribuyeron al origen de una contaminación masiva. Se estima que 50.000 toneladas de estos compuestos han sido liberadas al medio ambiente (1). Resulta necesario controlar la presencia de esta clase de compuestos en la naturaleza, y de verse afectada alguna zona por derrames es imperioso tratar de remediar la situación.

Se han aislado bacterias aeróbicas y anaeróbicas facultativas capaces de degradar a los PCBs, así como también se han encontrado hongos con la misma actividad. Estos resultados indican que existen en la naturaleza microorganismos capaces de utilizar estos compuestos como fuente de carbono. Bedard et al. (4) y Sylvestre (5) han desarrollado métodos de screening para aislar y caracterizar microorganismos que degradan bifenilos clorados.

En la Tabla 1 se muestran algunas de las cepas más conocidas que degradan a algunos derivados clorados de bifenilos.

Utilizando el método de screening antes mencionado, se realizaron enriquecimientos de muestras de suelos contaminados, y posteriormente se ensayó la capacidad de los microorganismos aislados de degradar mezclas definidas de PCBs. El uso de este tipo de mezclas ha posibilitado la investigación de la especificidad enzimática presente en los cultivos observados.

La mayor parte de las cepas aisladas, puede degradar con facilidad los congéneres menos clorados de las mezclas comerciales, mientras que sólo unas pocas logran utilizar como fuente de carbono y energía a los congéneres con más de cuatro cloros en la molécula. De las cepas reportadas hasta el momento con actividades degradadoras, la mayor parte corresponde a bacterias aeróbicas gram negativas, aproximadamente un tercio corresponden al género *Pseudomonas* (6,4), en el resto, se incluyen especies de *Achromobacter*, *Alcaligenes* y *Moraxella*. También se han reportado algunas especies de bacterias gram positivas como *Arthrobacter* y *Corynebacterium*.

Tabla 1: Biodegradación de bifenilos clorados

Compuesto	Microorganismo	Plásmido	Referencia
4-clorobifenilo	<i>Acinetobacter</i> sp.	pKF1	7
	<i>Achromobacter</i> sp.	16 y 17 kb	8
	<i>Bacillus brevis</i>	-	
	<i>Alcaligenes</i> sp.	+	9
	<i>Pseudomonas</i> sp.	-	10
	<i>Acinetobacter</i> sp.	pSS50 (35 kb)	11
	<i>Alcaligenes</i> sp	pSS50 (35 kb)	11
	<i>A. eutrophus</i> H850	-	4
	<i>Pseudomonas</i> sp	-	13
	<i>P. cruciviae</i>	-	14
1,4-diclorobifenilo	<i>K. pneumoniae</i>	pAC21	15
3-cloro-4hidroxi-bifenilo	<i>P. cruciviae</i>	-	14
PCB	<i>Aspergillus niger</i>	-	16
	<i>P. cruviviae</i>	-	14

Un caso interesante es la biodegradación del pentaclorofenol (PCP), para el cual se ha encontrado una vía en la que tienen un rol importante dehalogenaciones reductivas con participación de glutatión reducido (17,18,19,20,21). Es de destacar que estas reacciones se presentan en una vía degradativa aeróbica. En la Figura 2 se muestra un ejemplo de ellas.

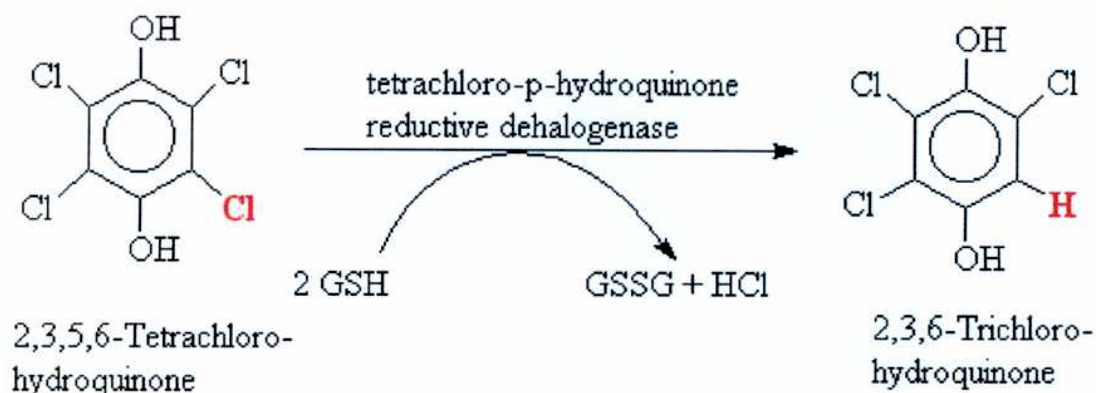


Figura 2: Dehalogenación reductiva de TCHQ

El análisis de los metabolitos intermedios, mostró que un gran número de los PCBs son convertidos a los correspondientes ácidos clorobenzoicos, vía una ruta oxidativa (7). Por este motivo, un resultado importante ha sido la caracterización del ácido 4-clorobenzoico (4-CBA) como el principal metabolito en la degradación del 4-clorobifenilo en *Bacillus brevis* y *Achromobacter* sp. (8). En las Figuras 3 y 4 se muestran las vías degradativas de estos compuestos. El 4-clorobifenilo ha sido usado como un sustrato modelo para investigar la degradación aeróbica de los PCBs. Este compuesto modelo es transformado por la serie de reacciones mostradas en la Figura 3, resultando varios compuestos que pueden ser utilizados en el metabolismo general. Existirían según lo propuesto en esta vía metabólica, cuatro enzimas responsables de la degradación oxidativa de los PCBs a ácidos clorobenzoicos. Hay organismos que sólo pueden iniciar esta ruta de reacciones, mientras que otros contribuyen a los últimos pasos de la degradación; no obstante ninguno de ellos puede degradar a los clorobenzoatos, y por tal motivo, estos se acumulan durante el catabolismo de los PCBs. El mapa de reacciones propuesto en la Figura 3 corresponde a dos cepas de *Pseudomonas* estudiadas en la Universidad de Minnesota en colaboración con la Universidad de Illinois, U.S.A (22,23).

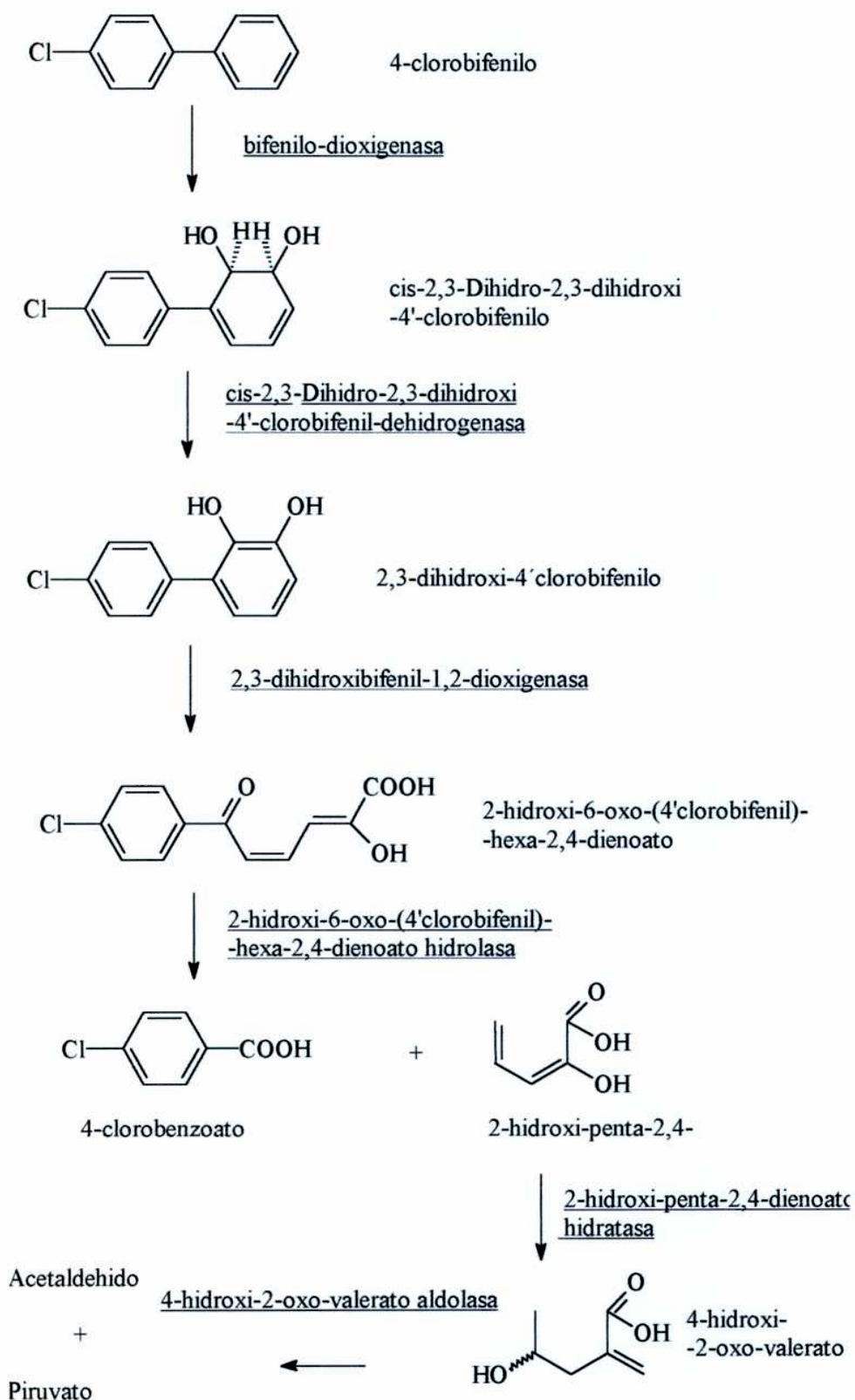


Figura 3: Vía degradativa del 4-clorobifenilo.

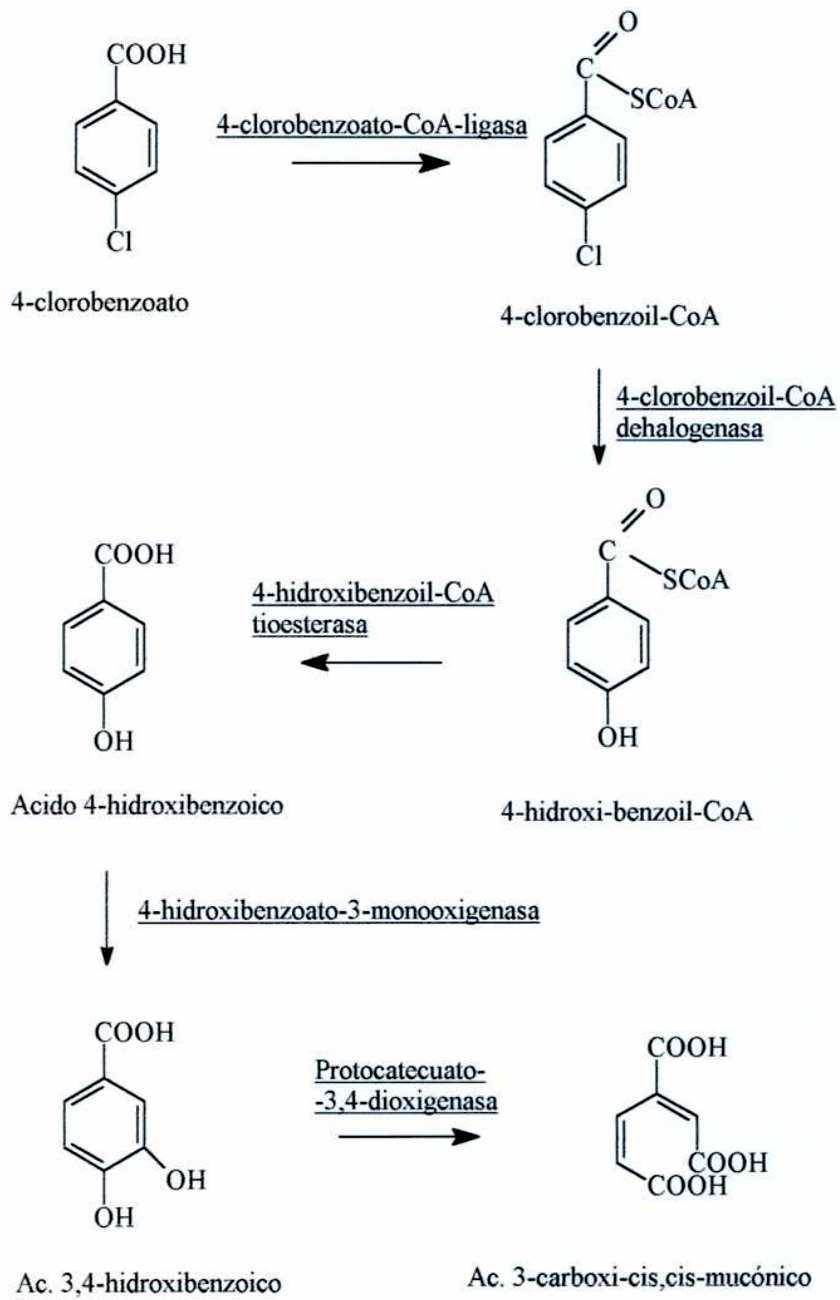


Figura 4: Degradación del 4-CBA

La degradación de congéneres con mayor número de átomos de cloro en la molécula sigue en general una vía similar a la mostrada, produciéndose variaciones en los compuestos formados según sea la disposición de los átomos de cloro. Son fundamentales en esta degradación la acción de las dioxigenasas en las posiciones 2,3 y de las dehalogenasas para producir compuestos metabolizables vía el ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

Como ya se mencionó en párrafos anteriores, las cepas aisladas en general no pueden degradar a los PCBs con alto grado de cloración (tetra-, penta- y hexaclorados); es posible que los altos niveles de cloración resulten en un impedimento estérico para la acción de las dioxigenasas en las posiciones 2,3. No obstante se han podido aislar microorganismos capaces de degradar más del 90% de los PCBs presentes en una mezcla comercial como Aroclor 1242 (24).

Se considera como posibilidad la existencia de otras rutas en la vía metabólica de los PCBs, tales son por ejemplo una actividad 3,4 dioxigenasa, confirmado por Gibson (25). No obstante se propone, que ambas actividades, la 2,3 y 3,4 dioxigenasa podrían ser originadas por la misma enzima (datos aún no confirmados).

Ha sido demostrado, que para una óptima utilización de los PCBs como fuente de carbono, es necesario que no existan otras fuentes de carbono disponibles en el medio, lo cual resulta un inconveniente para la aplicación en biorremediación. Si bien los PCBs son degradados en estos medios también, el rendimiento es mucho menor en estos sistemas comparado con los ensayos de laboratorio. Una explicación a este hecho, es pensar que se requiere la utilización de los PCBs como única fuente de carbono para producir la máxima inducción de las enzimas degradativas de estos compuestos.

En la Figura 5 se muestran los caminos metabólicos propuestos para la degradación microbiana de estos compuestos, ejemplificada con la degradación de un penta-clorobifenilo (26).

La volatilidad, hidrofobicidad, e insolubilidad, son dificultades que presentan los PCBs para ensayos acuosos de biodegradación. Para minimizar estos problemas, se han probado diversas formas para mejorar la dispersión de

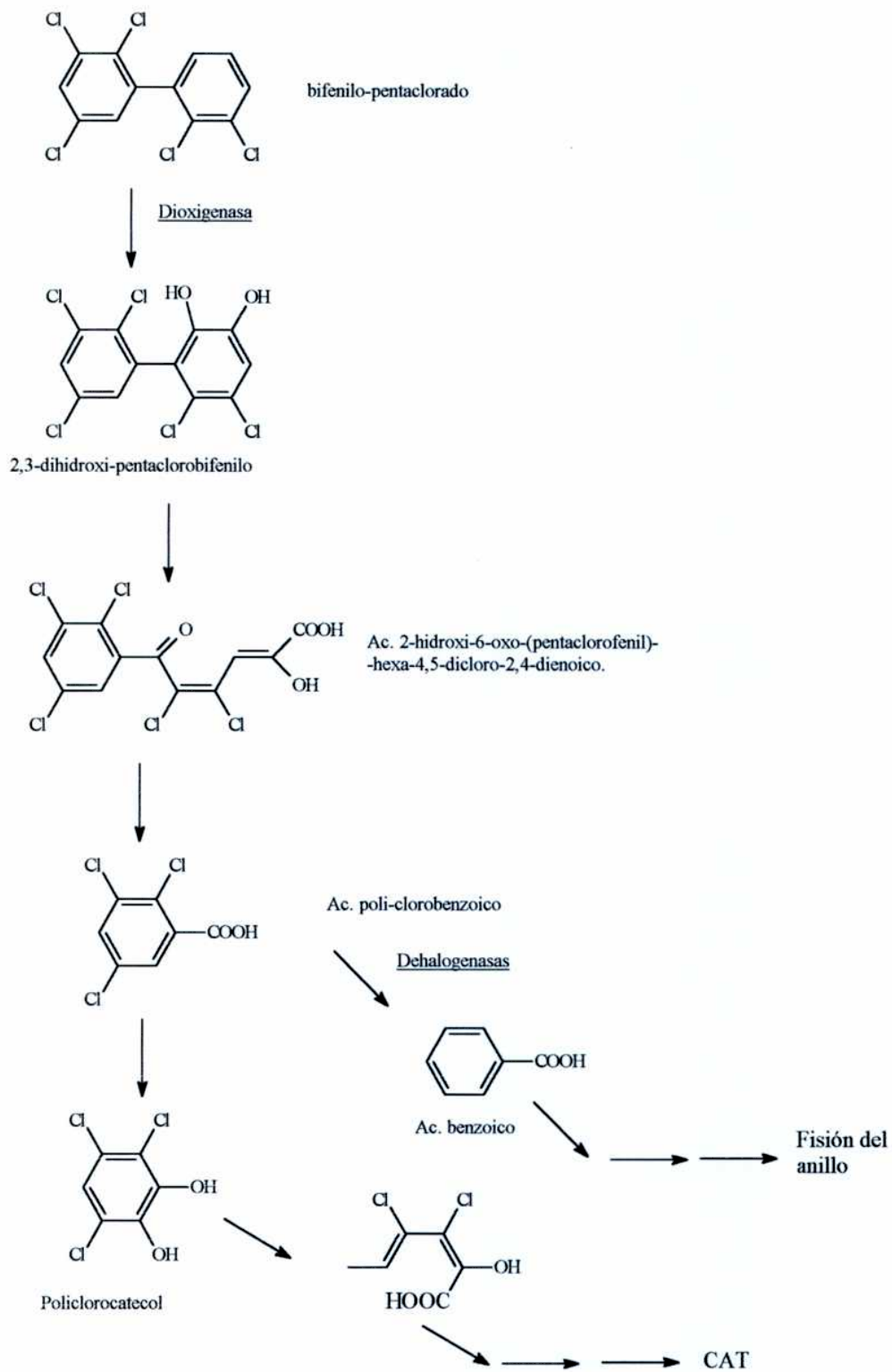


Figura 5: Caminos propuestos para la degradación microbiana de PCBs.

suba en la tasa de degradación.

Los estudios fisiológicos y genéticos realizados han demostrado que los genes para la degradación de los PCBs pueden ser codificados por plásmidos (7,11) o estar presentes en el cromosoma (29, 30, 31, 33). Muchos estudios de hoy en día están enfocados a la organización, clonado y caracterización de los genes que codifican la degradación de PCBs (12, 33).

Los genes que codifican el metabolismo de PCBs están agrupados en un operón, *bphABCD* (Figura 6). Los productos de cada uno de los genes del cluster son: del gen *bphA*, la enzima bifenilo oxigenasa; del gen *bphB*, la enzima dihidrodiol dehidrogenasa; del gen *bphC*, la enzima 2,3-dihidroxibifenil dioxigenasa; y del gen *bphD*, la enzima 2-hidroxi-6-oxo-(4'-clorofenil)-hexa-2,4-dienoato hidrolasa. En la Figura 3 se muestran las reacciones de las mencionadas enzimas. En el caso de los genes cromosomales de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 entre el gen *bphC* y el gen *bphD* hay una región llamada X de 3.3 kb de función desconocida (34, 12). La organización de los genes así como la homología entre los productos de dichos genes, incluyendo el tamaño molecular, esta sorprendentemente conservada entre los operones *bph* y *tol*; estos resultados sugerirían un ancestro común compartido entre bacterias degradadoras de tolueno y aquellas que degradan PCBs (34).

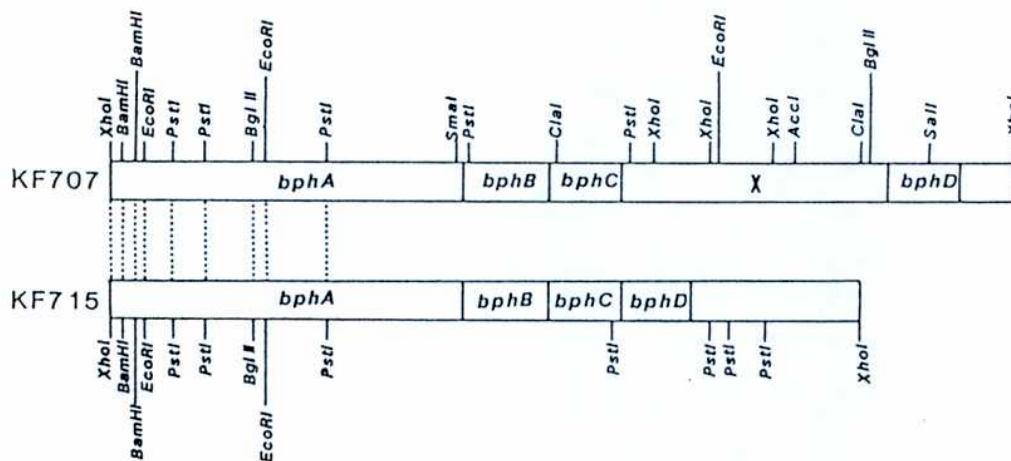


Figura 6: Estructura del operón *bph* para dos cepas de *Pseudomonas*: *Ps. pseudoalcaligenes* KF707 y *Ps. putida* KF715

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Drogas, reactivos y medios usados

Todos las sales inorgánicas usadas (fosfatos de sodio ó potasio, nitrato de amonio, cloruro de sodio, sales de metales pesados, etc) fueron de grado analítico. Los solventes orgánicos fueron también de grado analítico, o bien se redestilaron antes de su uso. La mezcla comercial de bifenilos policlorados se usó tal cual.

Las incubaciones con PCBs se realizaron en medio mineral de Mills y col.(35) modificado, según lo siguiente:

Medio mineral de Mills y col. modificado para bacterias de agua dulce:

NaCl.....	5 g
KCl.....	.0,7 g
Na ₂ HPO ₄	3 g
MgSO ₄ 7 H ₂ O.....	1,3 g
KH ₂ PO ₄	2 g
NH ₄ NO ₃	1 g
EDTA disódico 2 H ₂ O.....	0,256 g
Molibdato de NH ₄	0,186 mg
CaCl 2 H ₂ O.....	0,073 g
FeSO ₄ 7 H ₂ O.....	1,98 mg
Acido nicotínico.....	1 mg
Clorhidrato de tiamina.....	0,50 mg
Biotina.....	0,2 mg
Acido p-amino benzoico.....	0,2 mg
Vitamina B12.....	0,01 mg
Metal 44.....	1 ml

Composición del Metal 44 por litro:

EDTA disódico 2 H ₂ O.....	2,9 g
ZnSO ₄ 7 H ₂ O.....	10,45 g.
FeSO ₄ 7 H ₂ O.....	5 g

MnSO ₄ 7 H ₂ O.....	1,54 g
CuSO ₄ 5 H ₂ O.....	0,392 g
CaCl ₂ 6 H ₂ O	0,248 g
Na ₂ B ₄ O ₇ 10 H ₂ O.....	0,177 g

Los medios de cultivo comerciales usados, tales como caldo "Veal Broth", agar triptona de soya, agar hierro tres azúcares, medio Antibióticos 2, fueron de DIFCO, y su composición es la que sigue:

Caldo "Veal Broth" (por litro de medio)

NaCl.....	5 g
Peptona.....	10 g
Infusión de corazón.....	500 g

Agar triptona de soya (por litro de medio)

Triptona.....	15 g
Soya.....	5 g
NaCl.....	5 g
Agar.....	15 g

Agar hierro tre azúcares (por litro de medio)

Peptona de caseína.....	15 g
Peptona de carne.....	5 g
Estracto de carne.....	3 g
Estracto de levadura.....	3 g
NaCl.....	5 g
Lactosa.....	10 g
Sacarosa.....	10 g
D(+) glucosa.....	1 g
Aminio y hierro citrato.....	0,5 g
Tiosulfato de sodio.....	0,3 g
Rojo fenol.....	0,024 g
Agar.....	12 g
Ajustado a pH 7,4	

Se usó para hemólisis sangre ovina (Britasheep) y para los antibiogramas discos de antibióticos obtenidos de Laboratorios Britania.

2- Enriquecimiento y aislamiento

Con el objeto de lograr cultivos de microorganismos consumidores de PCBs, muestras de agua del Río Reconquista y de tierras contaminadas con dichos compuestos se sometieron al tratamiento descrito por Chou y Bohonos. (36)

El mismo se realizó aereando dos a tre litros de las muestras de tierra suspendidas 1/10 pv, o bien de aguas (en este caso no se efectuaban diluciones). En todos los casos se les agregaba nutrientes para tener las siguientes concentraciones finales: buffer fosfato 5×10^{-3} M pH 7,0 y sulfato de amonio $0,1 \text{ g l}^{-1}$, y se las sometía a un flujo de aire de 1 litro por minuto y litro de suspensión. Se efectuaba un agregado de 10 mg l^{-1} de PCBs, el cual se reponía semanalmente. Todos los pasos se hacían en oscuridad.

El sustrato utilizado fue una mezcla comercial de PCBs, tipo Aroclor 1242, esterilizada por tindallización (calentamiento a 80°C por 30 minutos durante 3 días consecutivos), y suspendido en agua destilada estéril por sonicación para facilitar la dispersión. Esta forma de dispersión fue la elegida luego de probar la disolución previa en otros solventes, por ejemplo acetona, hexano, dimetilsulfóxido, tal como proponen algunos autores (4, 5).

Luego de tratar a las muestras, tanto a las de tierras como a las provenientes del Río Reconquista, durante uno a dos meses en fermentador, a 30°C , reponiendo los PCBs (10 mg l^{-1}) semanalmente, se pasaron alícuotas a erlenmeyers con medio mineral de Mills y col. (35), modificado para el crecimiento de microorganismos de aguas dulces, según se ha descrito (37), y con una concentración de PCBs de $0,5 \text{ g l}^{-1}$, incubándose con agitación (200 rpm) a 30°C en oscuridad.

Se procedió al aislamiento de las cepas degradadoras de PCBs mediante sucesivos repiques en medio mineral con el xenobiótico como única fuente de carbono y energía.

La pureza de los cultivo se controló por crecimiento sobre agar triptona de soya.

3- Caracterización de las cepas

Para efectuar caracterizaciones de las cepas bacterianas aisladas, las mismas se cultivaron previamente en medio "Veal Broth" de DIFCO.

Las cepas aisladas y que mantenían la actividad degradadora de PCBs luego de tres o más subcultivos en medio mineral, se caracterizaron mediante los esquemas clásicos de tinción y pruebas bioquímicas, así como también utilizando sistemas multipruebas API de bioMérieux.

La determinación de actividades enzimáticas se efectuó mediante el kit API-ZYM de bioMérieux, que brinda datos de producción enzimática de: lipasas, fosfatasas y glicosidasas, entre otras.

Se determinó la sensibilidad a distintos antibióticos tales como tetraciclina y cloranfenicol, mediante discos por el método de Bauer et al.(38) Por otra parte se ensayó la resistencia a cationes de metales pesados: plomo (como Pb[II], sal usada acetato de plomo), cromo (como Cr[III], sal usada cloruro de cromo), cadmio (como Cd[II], sal usada acetato de cadmio) y mercurio (como mercurio[II], sal usada cloruro mercurico), determinando la concentración inhibitoria mínima para cada uno de ellos. En ambos casos se utilizó agar triptona de soya para el crecimiento bacteriano.

La tolerancia a altas concentraciones de solventes orgánicos se verificó incubando las cepas de la forma habitual en el medio mineral, en presencia de cantidades crecientes (entre 1% hasta 20%) de clorobenceno y tolueno, tanto en presencia como en ausencia de PCBs.

Se determinó la actividad hemolítica de las cepas, haciéndolas crecer sobre un medio agar triptona de soya-sangre e incubándolas durante 24 y 48 horas a 32°C, observándose la presencia o no de halos característicos de hemólisis.

4- Ensayos de consumo

Para valorar el consumo de PCBs por parte de las cepas, se realizó un ensayo según lo descrito anteriormente (37). Para obtener masa bacteriana, se prepararon inóculos en medio de Mills y col. modificado con PCBs comerciales como fuente de carbono, los que luego fueron transferidos a 10 volúmenes de “Veal Infusion Broth” de DIFCO diluido a la mitad, y adicionando los PCBs comerciales ($0,5 \text{ g l}^{-1}$) para mantener la presión selectiva, incubándose en todos los casos a 30°C con agitación. Esto se hizo debido a que el crecimiento en medio mineral sobre el compuesto xenobiótico no produce alto rendimiento de células.

Las células se cosecharon por centrifugación a 10.000 xg , se lavaron con medio mineral sin fuente de carbono tres veces, y se resuspendieron en el mismo medio. De las células resuspendidas, al 1% de peso seco (p/v) se les agregó PCBs $0,5 \text{ g l}^{-1}$ y se incubaron en un frasco erlenmeyer con tapón esmerilado, con agitación (200 rpm), a 30°C .

A distintos tiempos se detuvo la reacción por el agregado de ácido perclórico, concentración final 1%, y los congéneres de PCBs se extrajeron con 2 volúmenes de *n*-hexano grado analítico, agitándose vigorosamente durante toda la noche a la temperatura de incubación. En algunas experiencias se utilizó bifenilo (a una concentración de 0.2 mg l^{-1}) como standard interno para poder evaluar posibles pérdidas durante el proceso de extracción.

Como control se usaron incubaciones de células muertas por calentamiento a 80°C durante 30 minutos y de células viables detenida la reacción a tiempo cero.

En algunos casos, los extractos de *n*-hexano se lavaron con NaOH 5%, y dos veces con agua destilada. En otros casos, se omitió el lavado con el NaOH. Los extractos se mantuvieron en todos los casos sobre Na_2SO_4 anhidro a -27°C hasta su análisis.

5- Análisis de los extractos

El análisis de las fracciones remanentes de PCBs se realizó por cromatografía líquida de alta presión en fase reversa usando metanol como solvente, en un cromatógrafo LKB Bronna, modelo 2249, con un detector Pharmacia LKB VWM 2141 (lectura a 254 nm), rango 0-1 AUS, integrador LKB Bronna sobre una columna Spherisorb S50 DS2 de 25 cm, flujo 0,5 ml min⁻¹.

En los casos de incubaciones provenientes de *Klebsiella oxytoca* F2 y de *Ochrobactrum anthropi* K se efectuó un análisis más detallado de los extractos, usándose un cromatógrafo gas-líquido acoplado a un espectrógrafo de masa Trio 2-VG. Se utilizó una columna de metilsilicona de 25 m de longitud y diámetro interno de 0,25 mm y presión de la columna de 70 Kpa. El análisis de los espectros de masa se realizó con ayuda de la base de datos del programa MassLinx 3.0. Las identificaciones se hicieron en todos los casos con probabilidades mayores al 90%.

Se realizaron reacciones de caracterización de fenoles con cloruro férrico, según el método descrito en el libro de Vogel (39).

6- Software utilizado

- APILAB de bioMerieux
- STATISTICA versión 6.0
- STATCALC de Epiinfo versión 5.0
- MassLynx versión 3.0

RESULTADOS

1- Cepas aisladas y sus características más importantes

Se han aislado luego de los enriquecimientos un total de 10 cepas que pueden mantener la capacidad de utilizar a los PCBs luego de varios subcultivos en medio mineral con el xenobiótico. Estas cepas corresponden a las siguientes especies:

- *Pseudomonas aeruginosa* -1 cepa aislada: H-
- *Alcaligenes xylosoxidans* -2 cepas aisladas: L y A-
- *Ochrobactrum anthropi* -3 cepas aisladas: K, E y G-
- *Ralstonia piketti* -1 cepa aislada: F1-
- *Klebsiella oxytoca* -1 cepa aislada: F2-
- *Staphylococcus* sp. -2 cepas aisladas: J y B-

Debe destacarse que los microorganismos aislados pierden la capacidad de crecer sobre PCBs luego de dos o tres transferencias sucesivas por medio rico tal como “Veal Broth” o caldo triptona de soya.

Originalmente se pudieron aislar un número doble de cepas, pero las presentadas, son las únicas que mantienen la actividad degradadora a lo largo de todo el período de trabajo.

1.1- Actividades enzimáticas

Para estudiar algunas características particulares de las cepas se realizaron estudios de actividades enzimáticas que arrojaron resultados interesantes en cuanto a la diversidad de las cepas encontradas y su relación con cepas degradadoras de otros compuestos xenobióticos, aisladas en el laboratorio con anterioridad.

En la Tabla 2 se indica la caracterización de cada cepa, el compuesto que puede utilizar como fuente de carbono y energía, si es o no hemolítica y si se aprecia o no producción de surfactantes por observación del efecto del cultivo sobre la fase orgánica que sirve como sustrato.

Tabla 2: Características principales de las cepas aisladas en el laboratorio.

Cepa	Identificación	Consumo	Hemólisis	Biosurfactantes
A	<i>Alcaligenes xilosoxydans</i>	PCBs	-	No produce
E	<i>Ochrobactrum antropi</i>	PCBs	-	No produce
FC1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Alcanos	-	Produce
FC2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Alcanos	+	Produce
FC3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Alcanos	+	Produce
FC8/1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Alcanos	-	Produce
FC8/2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Alcanos	+	Produce
FC9/1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Alcanos	+	Produce
FC9/T	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Alcanos	+	No produce
F1	<i>Ralstonia piketti</i>	PCBs	+	No produce
F2	<i>Klebsiela oxytoca</i>	PCBs	-	No produce
G	<i>Ochrobactrum antropi</i>	PCBs	-	No produce
GL1	<i>Burkholderia cepacia</i>	Tolueno	+	No produce
GL3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Tolueno	+	No produce
H	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PCBs	+	No produce
K	<i>Ochrobactrum antropi</i>	PCBs	-	No produce
B	<i>Staphylococcus</i> sp.	PCBs	-	No produce
J	<i>Staphylococcus</i> sp.	PCBs	-	No produce
L	<i>Alcaligenes xilosoxydans</i>	PCBs	-	No produce
PS1	<i>Alcaligenes xilosoxydans</i>	Estireno	-	Produce
PS10	<i>Alcaligenes xilosoxydans</i>	Estireno	+	Produce
PS11	<i>Alcaligenes xilosoxydans</i>	Estireno	+	Produce
PS12	<i>Pseudomonas putida</i>	Estireno	+	Produce
PS13	<i>Pseudomonas putida</i>	Estireno	-	Produce
PS14	<i>Ralstonia piketti</i>	Estireno	+	Produce
PS5A	<i>Alcaligenes xilosoxydans</i>	Estireno	-	Produce
PS5B	<i>Pseudomonas putida</i>	Estireno	+	Produce
PS6	<i>Pseudomonas putida</i>	Estireno	+	Produce
PS8	<i>Alcaligenes xilosoxydans</i>	Estireno	-	Produce
PS9	<i>Alcaligenes xilosoxydans</i>	Estireno	-	Produce
PSC	<i>Alcaligenes xilosoxydans</i>	Estireno	-	Produce
PSEA	<i>Pseudomonas putida</i>	Etilbenceno	-	No produce
PSEB	<i>Ralstonia piketti</i>	Etilbenceno	-	No produce

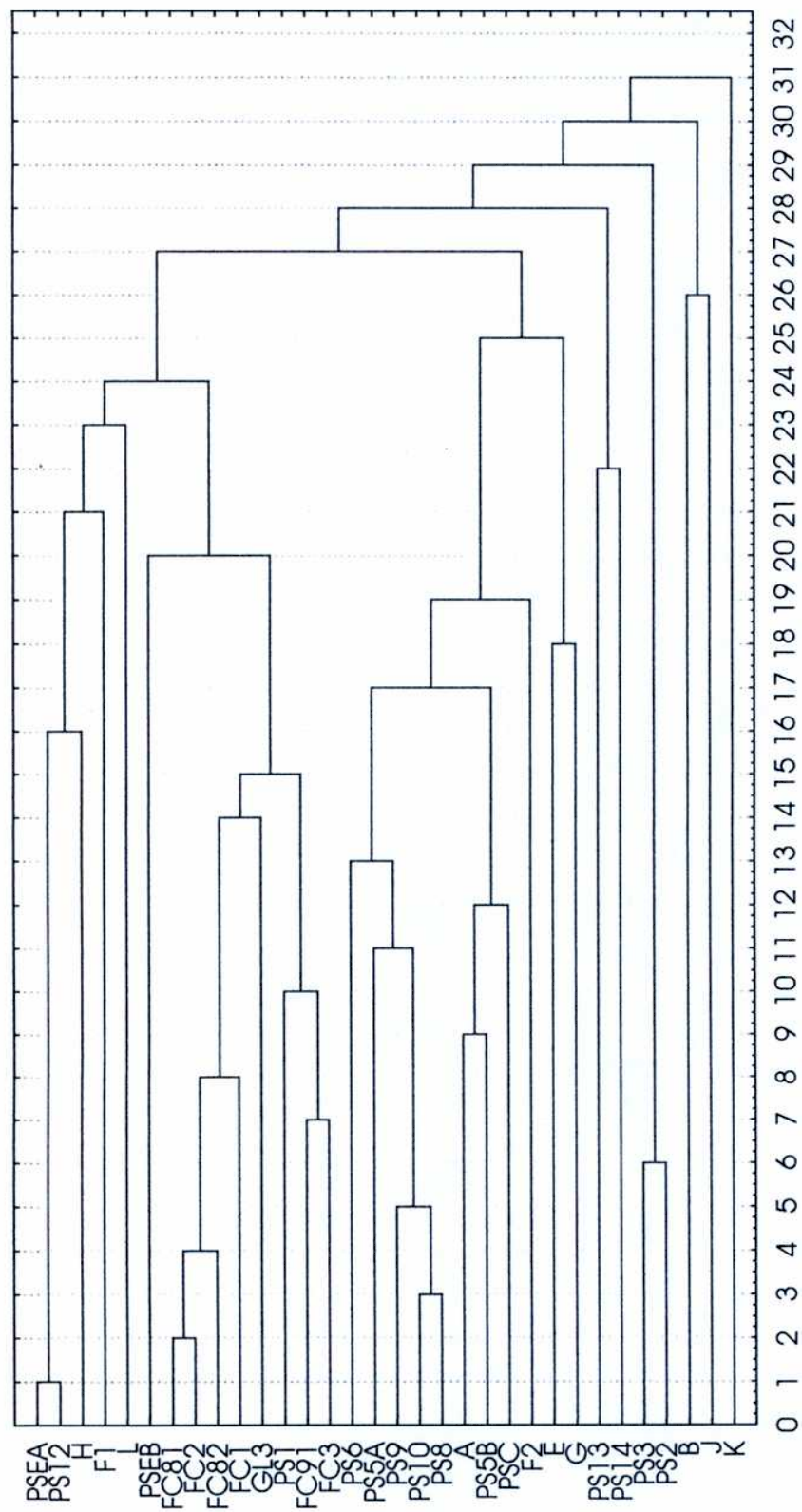


Figura 7: Diagrama en árbol para 32 cepas
Mediana para pares de grupos vs 1-Pearson r

Las abreviaturas utilizadas en la tabla corresponden a:

CFX = 5µg cefixima	FOS = 50 µg fosfomicina
TMS = 25 µg trimetoprima 1,25 µg + sulfametoxazol 23,75 µg	CEF = 30 µg cafalotina
CFP = 75 µg cefoperazona	OFX = 5 µg ofloxacina
NET = 30 µg netilmicina	CMP = 30 µg cloranfenicol
CXM = 30 µg cefuroxima	TET = 30 µg tetraciclina
AZT = 30 µg aztreonam	

1.3- Resistencia a metales pesados

Todas las cepas aisladas exhiben, en general, una moderada resistencia a cationes de metales pesados, particularmente cromo(III) y plomo(II). En la Tabla 5 se muestra un resumen de las mayores resistencias encontradas, indicándose la frecuencia en la que aparece.

Tabla 5: Niveles de resistencia a cationes de metales pesados

CATION METALICO	Resisten hasta	
	Concentración MM	Concentración ppm
Cr(III)	1,9 (8/10)	100 (8/10)
Pb(II)	0.5 (7/10)	100 (7/10)
Cd(II)	0,4 (4/10)	50 (4/10)
Hg(II)	0,12 (2/10)	25 (2/10)

1.4- Consumo y resistencia a solventes orgánicos

Las cepas aisladas no son capaces de crecer cuando hay presente tolueno en concentraciones superiores a 200 ppm, tanto en medio "Veal Broth" como en medio mineral en presencia de PCBs.

En cambio el clorobenceno es tolerado hasta concentraciones de 1000 ppm por todas las cepas, y en algunos casos llegan a consumirlo. Particularmente las cepas *Ps. aeruginosa* H, *R. piketti* F1, *K oxytocca* F2, *O. antropi* K, y *A.*

xylosoxidans L pueden utilizar al clorobenceno como fuente de carbono y energía.

2.- Evaluación del consumo de PCBs

2.1- Porcentajes de consumo en 7 días de incubación

Se evaluó el consumo de PCBs por parte de las 10 cepas aisladas, mediante el ensayo descrito en Materiales y Métodos. Es importante destacar que todas las cepas muestran porcentajes de consumo en el ensayo significativamente altos, aunque se destacan dos de ellas que exhiben un 100% de degradación en los 7 días de incubación. Por este motivo, se las eligió para los estudios posteriores más detallados.

Tabla 6: Porcentajes de PCBs consumidos en 7 días de incubación por algunas de las cepas aisladas de agua y de tierra.

CEPAS	ORIGEN	% de PCBs consumidos en 7 días de incubación
<i>Ps. aeruginosa</i> H	Aguas	80
<i>R. piketti</i> F1	Aguas	80
<i>K. oxytoca</i> F2	Tierra	100
<i>O. antropi</i> E	Aguas	80
<i>A. xylosoxidans</i> A	Aguas	75
<i>O. antropi</i> G	Aguas	80
<i>O. antropi</i> K	Tierra	100
<i>A. xylosoxidans</i> L	Tierra	90
<i>Staphylococcus</i> sp. B	Tierra	85
<i>Staphylococcus</i> sp. J	Tierra	70

2.2- Consumo de PCBs por *Klebsiella oxytoca* F2

Pudo comprobarse, por el análisis de los extractos obtenidos de las incubaciones, que esta cepa en las condiciones anteriormente descritas, consume más del 90% del xenobiótico en 3 días.

La incubación de PCBs con células muertas no provocó ningún cambio en el contenido y composición del xenobiótico, ya que se obtienen resultados similares con las células viables a tiempo cero. Esto descartaría adsorciones inespecíficas del xenobiótico a la pared celular de las bacterias, como así también la existencia de reacciones abióticas.

En la Figura 8 se puede ver el registro de los cromatogramas gaseosos de las incubaciones a tiempo cero y tres días. El análisis de los espectros de masa correspondientes, revela a tiempo cero los picos mostrados en la Tabla 7, como los más destacados.

Tabla 7: Tiempos de retención para los distintos congéneres de PCBs

Tiempo de retención	Compuestos
11,70 - 12,08 - 12,78	Bifenilos biclorados
13,38 - 14,10 - 14,25	Triclorobifenilos
Hasta 15,78	Bifenilos tetraclorados

El pico que se obtiene a T_r 18,32 minutos, corresponde al ftalato de disooctilo, que es un contaminante proveniente de los solventes. Los picos con T_r entre 4,42 y 9,00 minutos, consisten en una variedad de compuestos tales como triclorobenceno, clorooctano, diversos hidrocarburos alifáticos ramificados y aromáticos sustituidos, que son solventes e impurezas remanentes de la preparación de la mezcla comercial de bifenilos policlorados.

Comparando los cromatogramas presentados, se ve claramente la desaparición de los picos con T_r correspondientes a los congéneres bi-, tri- y tetraclorados de la mezcla comercial original, denotando un rápido consumo de los mismos por la cepa aislada. Los picos correspondientes a los remanentes de la preparación de la mezcla no varían apreciablemente durante la incubación, así como tampoco lo hace el pico que corresponde al contaminante proveniente de los solventes.

Cuando los extractos se corren en HPLC no puede obtenerse una separación tan neta en las diversas fracciones de bifenilos clorados como en

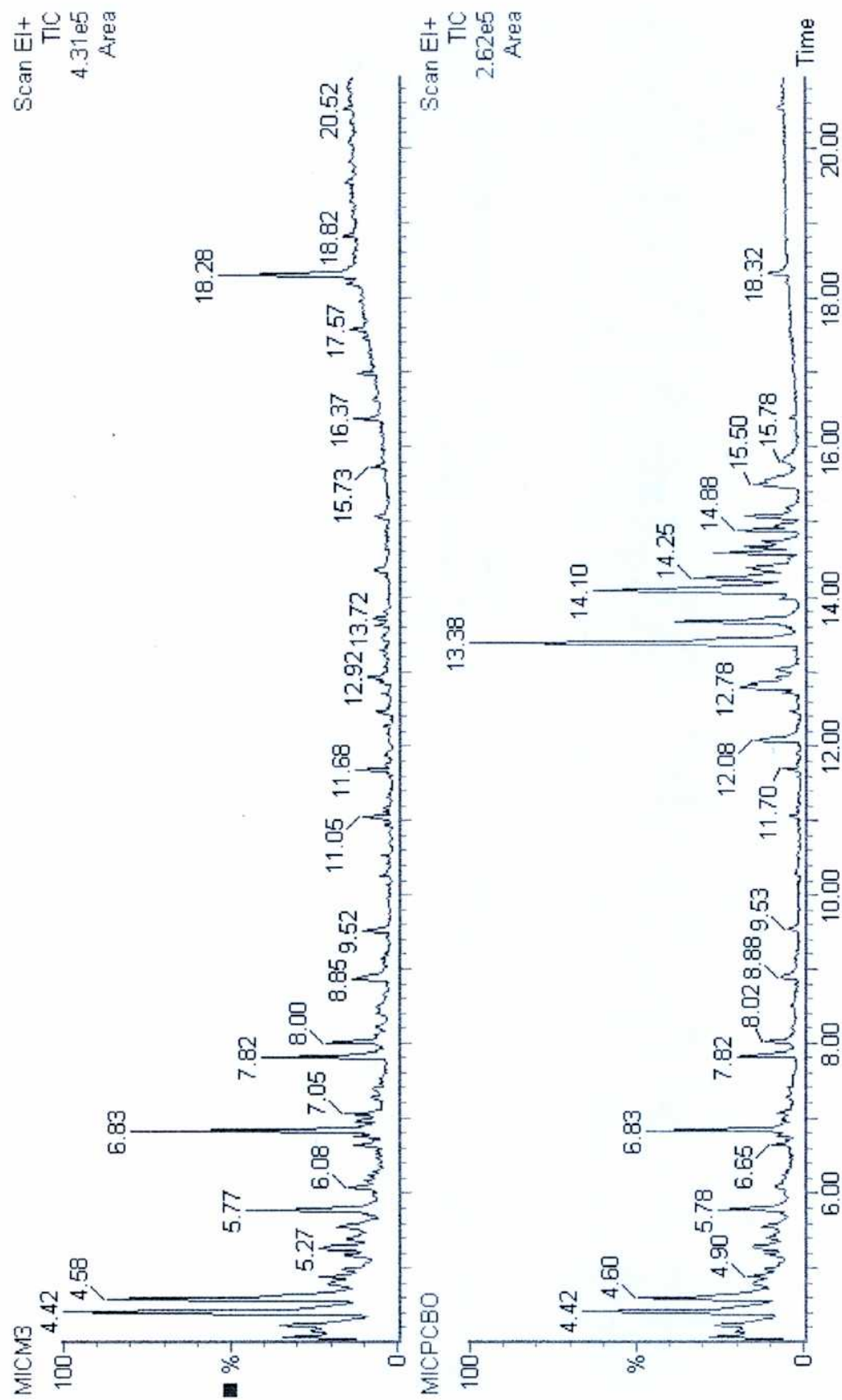


Figura 8: Registros de los cromatogramas (CGL) de los extractos en n-hexano, lavados con NaOH 5% correspondientes a tiempos 0 y 3 días para *Klebsiella oxytoca* F2

CGL, pero los extractos lavados con NaOH producen resultados cuantitativos comparables a los obtenidos por cromatografía gaseosa (10-15% de sustrato remanente en 3 días de incubación, 0-1% a los 7 días). Sin embargo, si los extractos en *n*-hexano sin lavar con NaOH se corren en HPLC, se nota una acumulación de compuestos, posiblemente fenoles y ácidos orgánicos que no han podido ser caracterizados en este caso. Esto se pone de manifiesto por un aumento en las lecturas de las áreas de los cromatogramas por la mayor absorción específica a 254 nm que tienen los fenoles sobre los hidrocarburos clorados. Debido a que no se conocen las absorbancias específicas de la mezcla resultante, no pueden valorarse en forma cuantitativa. A los siete días de incubación se comprueba un decaimiento importante de las lecturas en los extractos no lavados, lo que indica que los productos intermediarios también se consumen.

En el cuadro siguiente se muestran los resultados de los PCBs remanentes en extractos lavados y no lavados, expresados en porcentajes, para una experiencia típica con siete días de incubación.

Tabla 7: PCBs remanentes en extractos lavados y no lavados con NaOH 5%, medidos por integración de las áreas en los cromatogramas obtenidos por HPLC

Días de incubación	Extractos no lavados con NaOH	Extractos lavados con NaOH
0	100%	100%
3	60%	10%
7	20%	0%

Para los extractos de siete días de incubación, no lavados con NaOH, se llega a valores del 20% de sustratos remanentes, debido a la persistencia en el medio de las impurezas y solventes originalmente presentes en la mezcla comercial de PCBs (40).

2.3- Consumo de PCBs por *Ochrobactrum antropi* K

En la Figura 9 se muestra las curvas de crecimiento de la cepa de *O. antropi* K en medio "Veal Broth" y en medio mineral con PCBs. En este último medio hay un menor crecimiento, debido quizá a las características del sustrato.

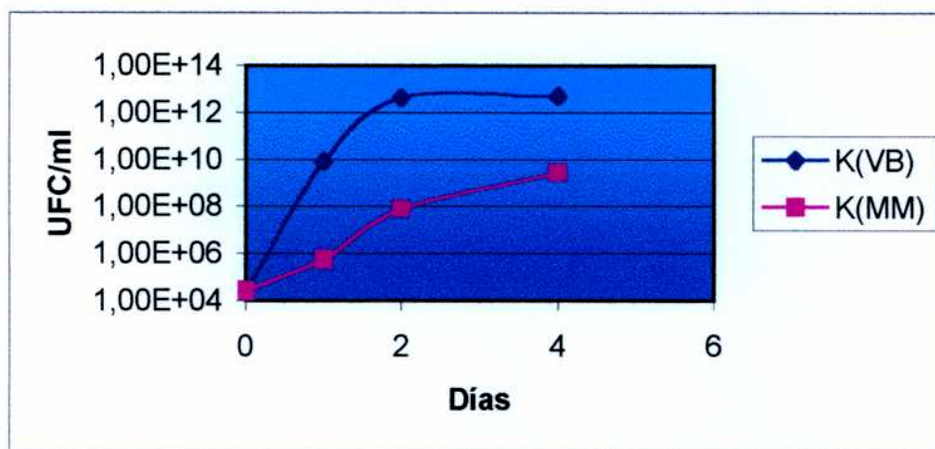


Figura 9: Curvas de crecimiento de la cepa K

La cepa K mostró un tiempo de duplicación (t_D) de alrededor de 10 minutos en el medio "Veal Broth" y de 90 minutos en el medio mineral.

En este caso no se hicieron lavados con NaOH porque se intentó caracterizar compuestos fenólicos en los extractos por espectroscopía de masa. Sin embargo, en las incubaciones no se han podido detectar, luego de realizar las reacciones características (39).

En la Figura 10 se muestran los cromatogramas obtenidos con los extractos en *n*-hexano de incubaciones de la cepa K, a tiempo cero y a las 24 horas de incubación. En las presentes incubaciones se usó bifenilo (200 ppm) como standad interno.

En la Figura 11 se muestra un detalle de los cromatogramas, para visualizar mejor la región entre 14 y 20 minutos.

La Tabla 8 muestra un resumen de los hechos más destacados, indicándose que picos cambian significativamente en las 24 horas de incubación,

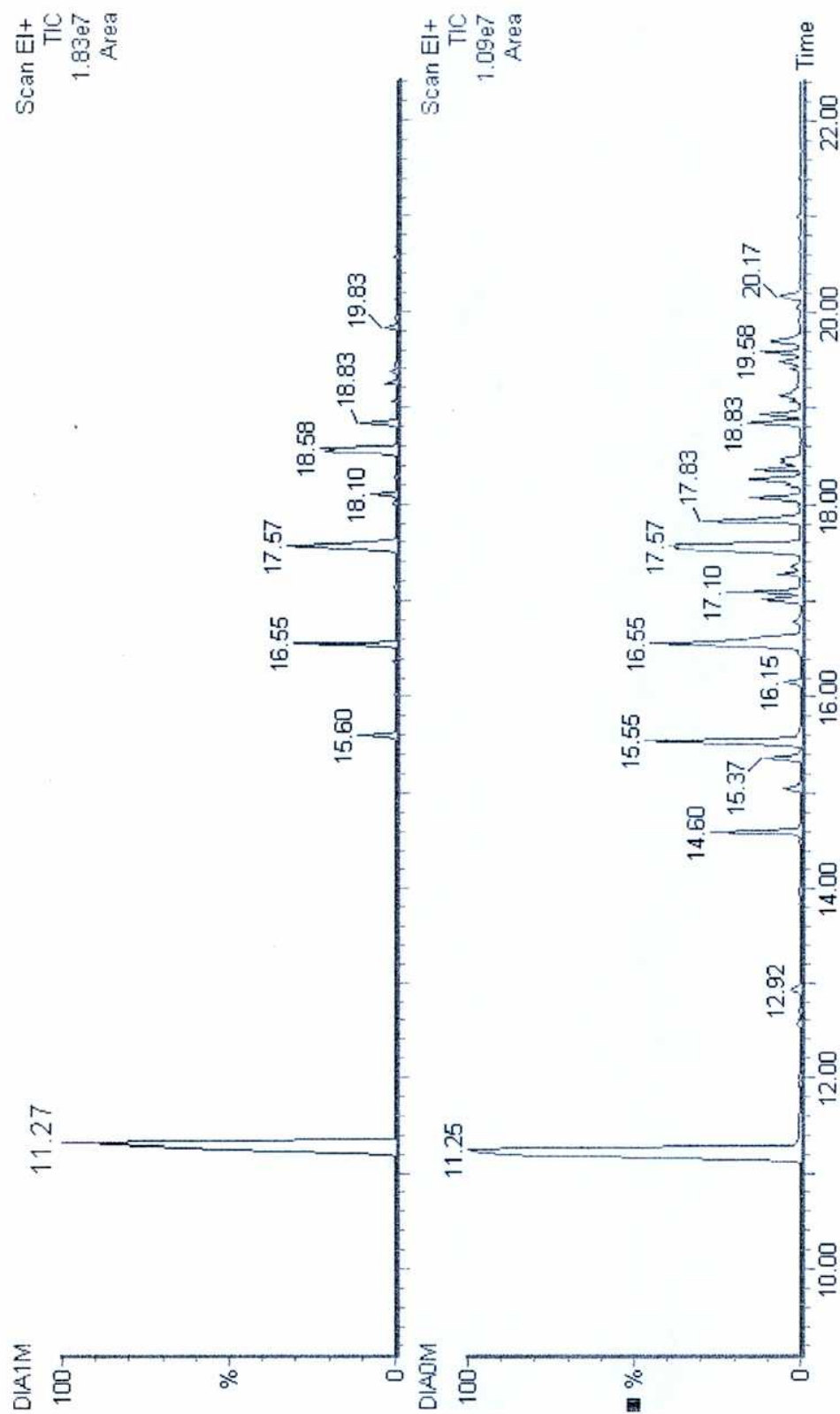


Figura 10: Registros de los cromatogramas obtenidos de las incubaciones con *Ochratoxin A* correspondientes a tiempo 0 y 1 día

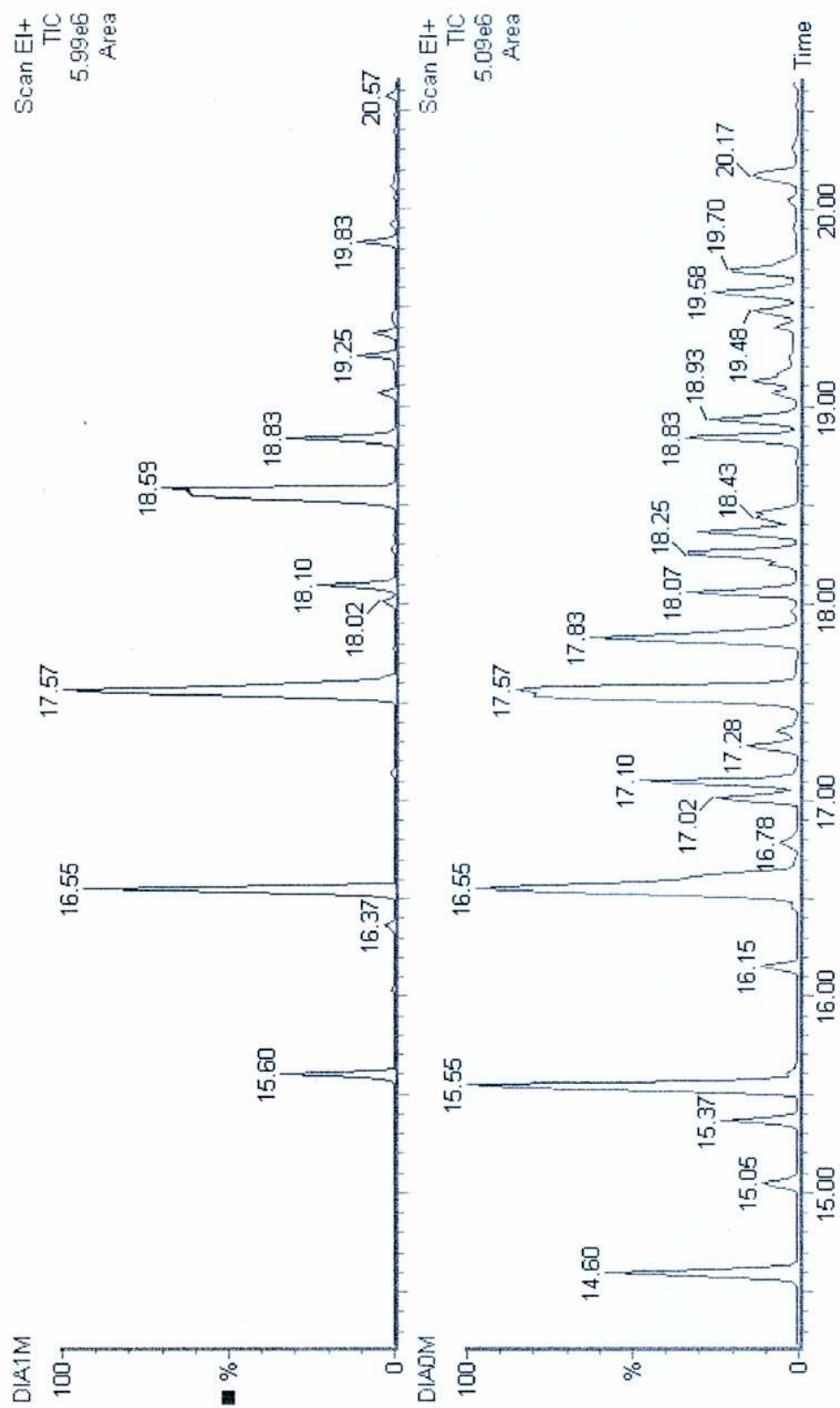


Figura 11: Detalles de los cromatogramas de la Figura 10, ampliados entre los 14 y 20 minutos

como así también su identificación. En los casos en que no ha sido posible una identificación precisa del congénere se indica con el símbolo (?). Es probable que la cromatografía no resuelva adecuadamente las sustancias, y eso conlleva a una mezcla de espectros de masa que dificultan la interpretación de los mismos.

Tabla 8: Picos obtenidos en las cromatografías que desaparecen o cambian su área en forma significativa durante las primeras 24 horas de incubación.

Día 0		Día 1	
T_r	Identificación	T_r	Identificación
12,92	3-cloro-1,1'-bifenilo		
14,60	2,2'-dicloro-1-1'-bifenilo		
15,05	3,5-dicloro-1-1'-bifenilo		
15,37	4,4'-dicloro-1-1'-bifenilo		
15,55	3,3'-dicloro-1-1'-bifenilo	15,60	3,3'-dicloro-1-1'-bifenilo
16,15	2,4,6-tricloro-1-1'-bifenilo		
16,55	2,4',5-tricloro-1-1'-bifenilo	16,56	2,4',5-tricloro-1-1'-bifenilo
16,78	Tricloro-1-1'-bifenilo (?)		
17,02	2,3',5-tricloro-1-1'-bifenilo		
17,10	2,3,4'-tricloro-1-1'-bifenilo		
17,28	3,4,4'-tricloro-1-1'-bifenilo		
17,57	2,4,5-tricloro-1-1'-bifenilo	17,57	2,4,5-tricloro-1-1'-bifenilo
17,83	2,3,4-tricloro-1,1'-bifenilo		
18,25	2,2',5,5'-tetracloro-1-1'-bifenilo	18,02	Tricloro-1-1'-bifenilo (?)
18,38	2,2',3,5-tetracloro-1-1'-bifenilo		
18,43	Tetracloro-1-1'-bifenilo (?)	18,59	2,4,4'-tricloro-1-1'-bifenilo
18,83	2,2',3,5-tetracloro-1-1'-bifenilo		
18,93	Tricloro-1-1'-bifenilo (?)		
19,13	2,3',4,6-tetracloro-1-1'-bifenilo	19,25	2,2',4,5'-tetracloro-1-1'-bifenilo
19,58	2,3',4',5-tetracloro-1-1'-bifenilo		
19,70	2,3',4,4'-tetracloro-1-1'-bifenilo	19,83	2,2',4,6-tetracloro-1-1'-bifenilo
20,17	2,2',4,4'-tetracloro-1-1'-bifenilo		
		20,57	Tetracloro-1-1'-bifenilo (?)

El bifenilo corre con un tiempo de retención (T_r) de 11 minutos. Los T_r entre 12 y 15 minutos corresponden a congéneres mono- y biclorados, entre 15 y 19 minutos a isómeros de triclorados, y mayores de 19 minutos a congéneres tetra- y pentaclorados.

En la Figura 12 se muestra el espectro de masa del bifenilo, m/z 154.

En la Figura 13 se ve el espectro de masa del 2-cloro-1,1'-bifenilo, con un T_r de 12.92 minutos, m/z 188. Esta sustancia desaparece en 24 horas de incubación.

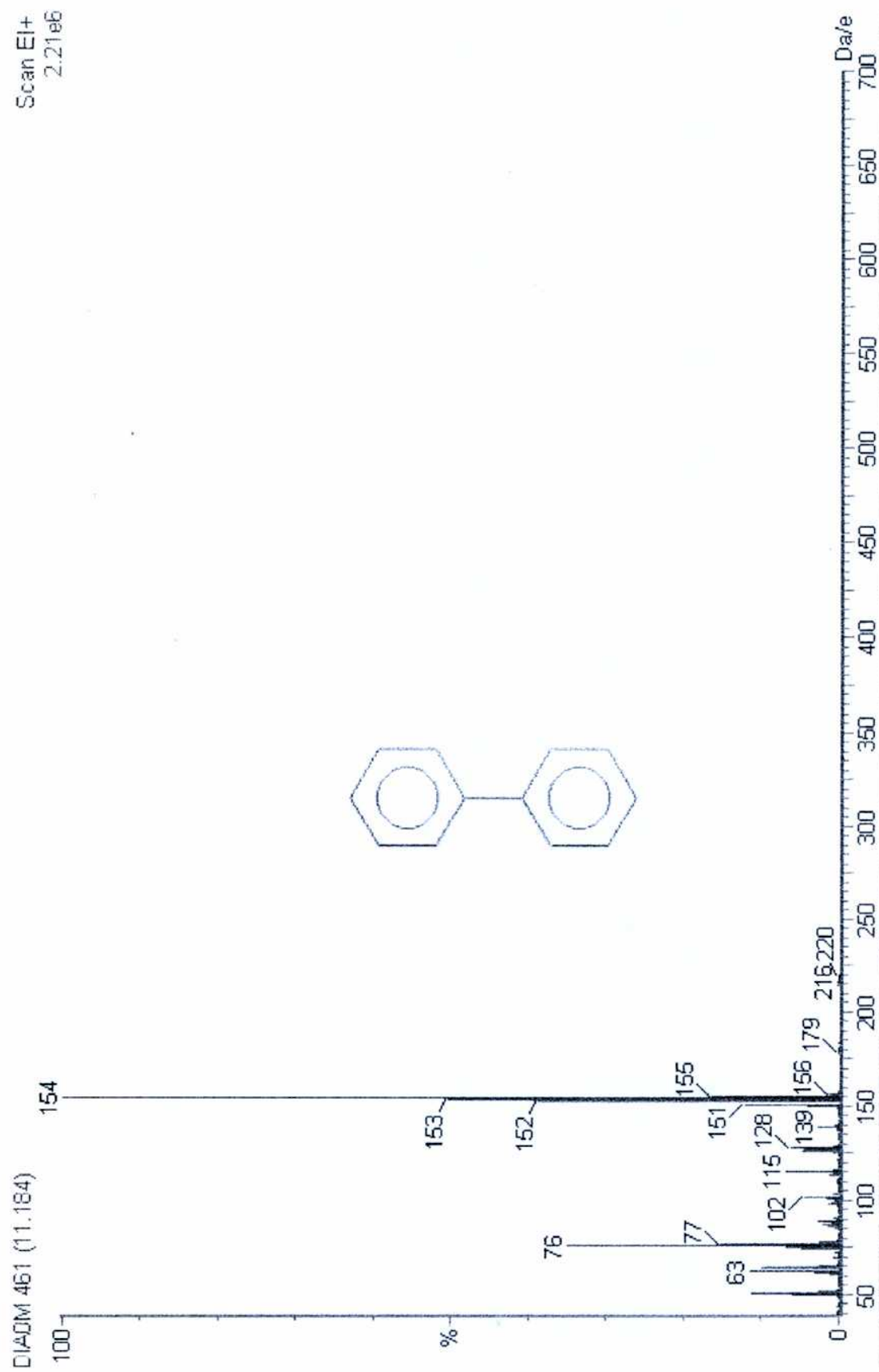


Figura 12: Espectro de masa del 1,1'-bifenilo (standard interno)

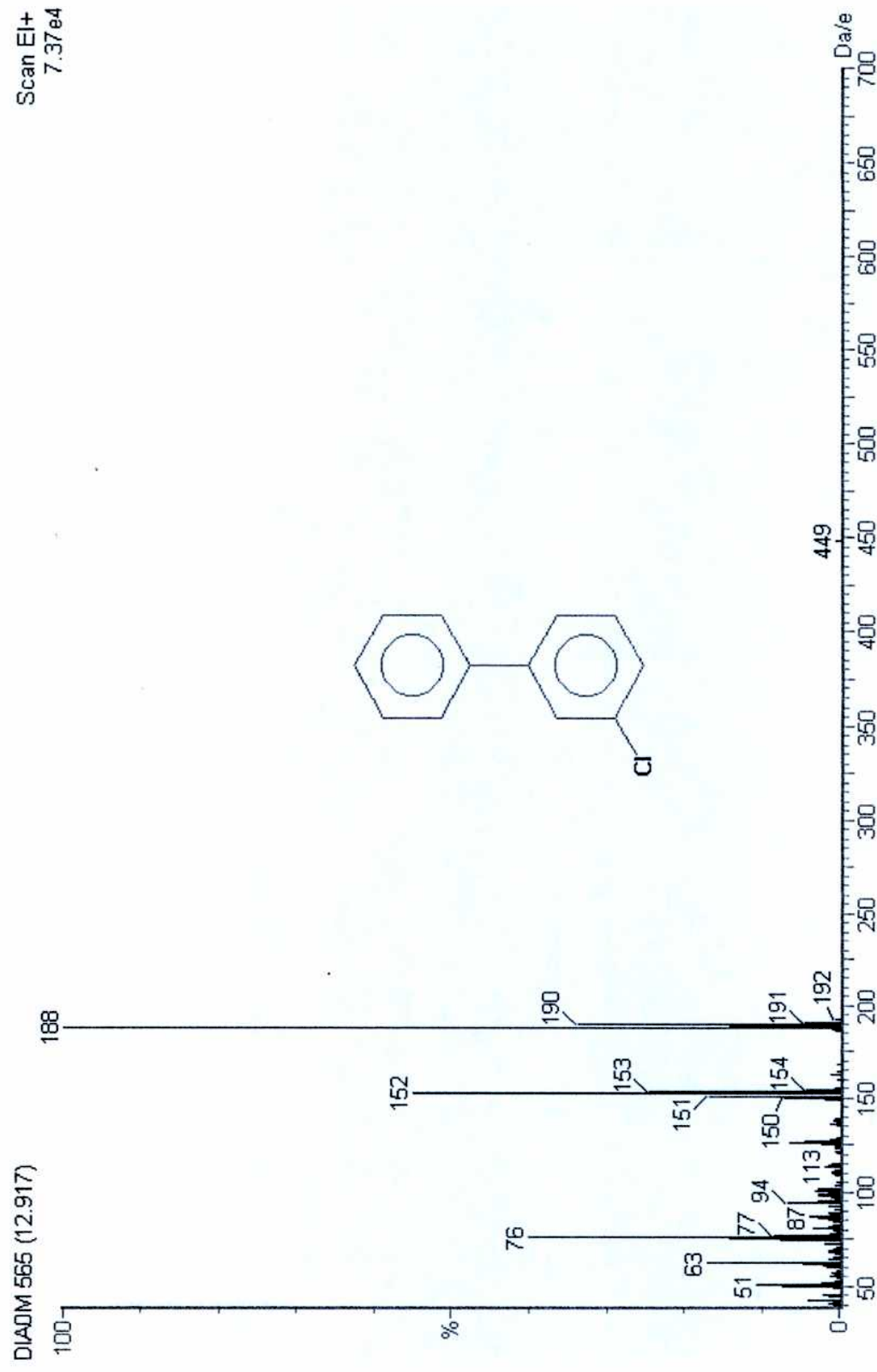


Figura 13: Espectro de masa del 3-cloro-1,1'-bifenilo

En la Figura 14 se ve el espectro de masa del 2,2'-dicloro-1,1'-bifenilo, con un T_r de 14.60 minutos, m/z 222. Este compuesto biclorado también desaparece en las primeras 24 horas de incubación.

La cepa aislada muestra un rápido consumo de los congéneres menos halogenados, tales como los mono y biclorados.

En la Figura 15 puede verse el espectro de masa del 2,3',5-tricloro-1,1'-bifenilo, con un T_r de 17.02 minutos, m/z 256. Este compuesto es un ejemplo de congénere triclorado presente en baja concentración, consumido totalmente en la incubación.

En la figura 16 se presenta el espectro de masa del 2,4',5-tricloro-1,1'-bifenilo, con un T_r de 16.55 minutos, m/z 256. Este compuesto no desaparece marcadamente en la incubación.

En la Figura 17 se muestra el espectro de masa del 2,2',5,5'-tetracloro-1,1'-bifenilo, con un T_r de 18.26 minutos, m/z 290. Este compuesto tetraclorado, presente en bajas concentraciones, es también consumido totalmente en la incubación.

En la Figura 18 se observa el espectro de masa del 2,3',4',5-tetracloro-1,1'-bifenilo, con un T_r de 19.58 minutos, m/z 290. Este compuesto es dehalogenado durante la incubación.

En la Figura 19 puede verse el espectro de masa de otro congénere tetraclorado, dehalogenado en la incubación. Se trata del 2,3',4,4'-tetracloro-1,1'-bifenilo, con un T_r de 19.70 min, m/z 290.

En la Figura 20 puede apreciarse el espectro de masa del 2,2',4,4'-tetracloro-1,1'-bifenilo, con un T_r de 20.17 min, m/z 290. Este congénere es dehalogenado en la incubación.

En la Figura 21 se muestra el espectro de masa del 2,4,4'-tricloro-1,1'-bifenilo, con un T_r de 18.58 min, m/z 256. Este compuesto aparece durante las primeras 24 horas de incubación.

En la Figura 22 se ve el espectro de masa del 2,4,5-tricloro-1,1'-bifenilo, con un T_r de 17.57 min, m/z 256. Este compuesto se forma también durante la incubación.

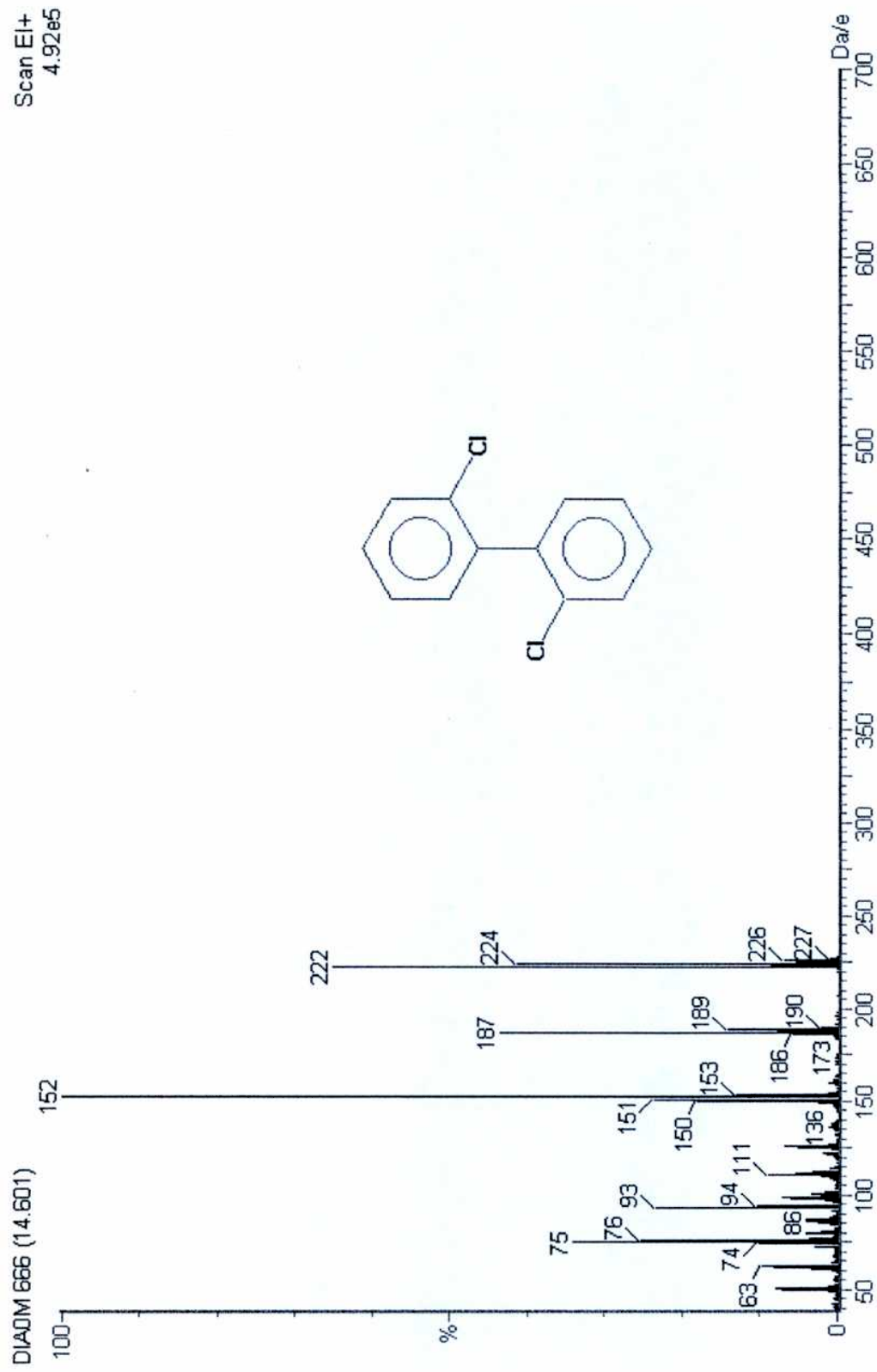


Figura 14: Espectro de masa del 2,2'-dicloro-1,1'-bifenilo

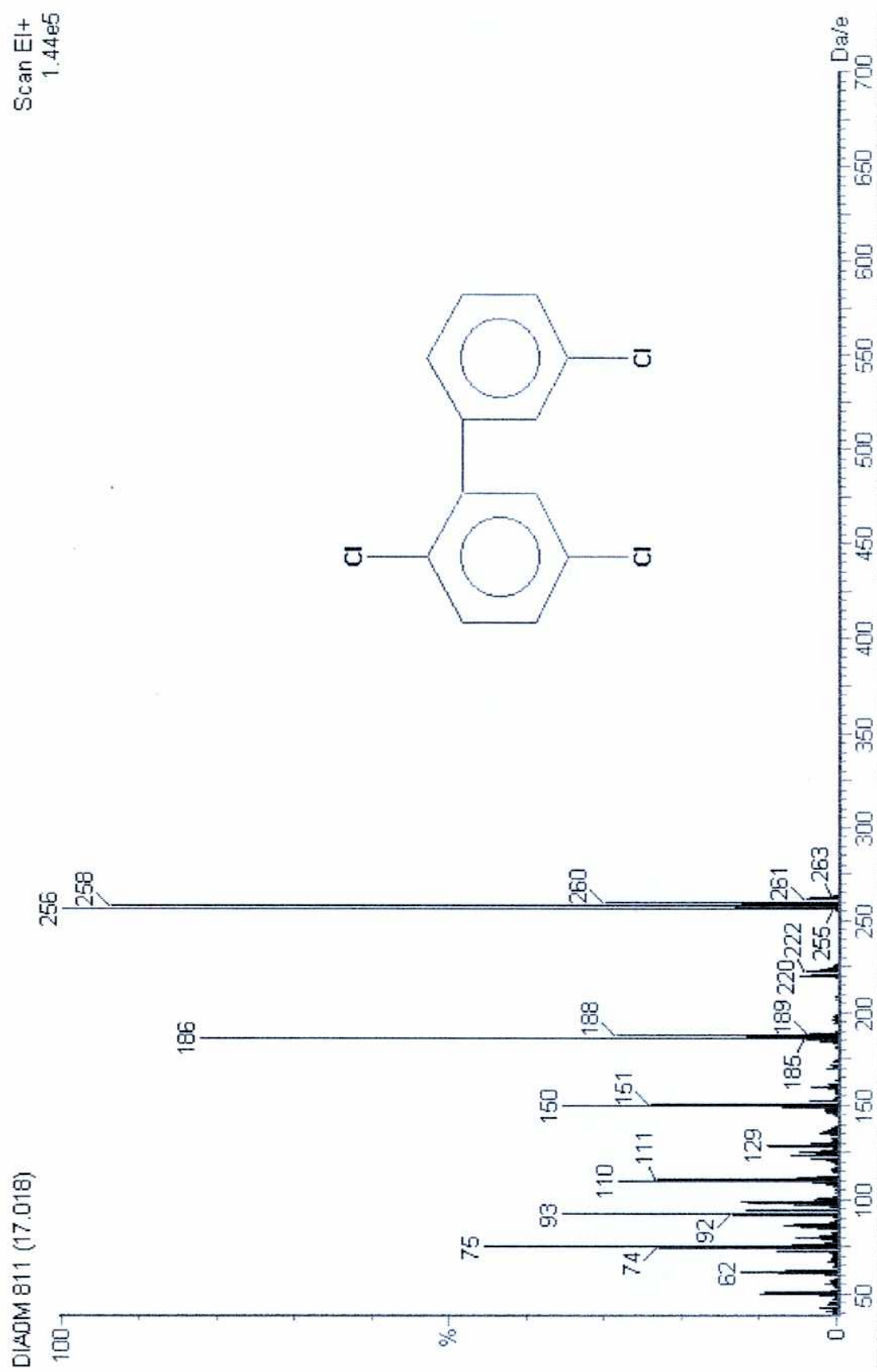


Figura 15: Espectro de masa del 2,3',5-tricloro-1,1'-bifenilo

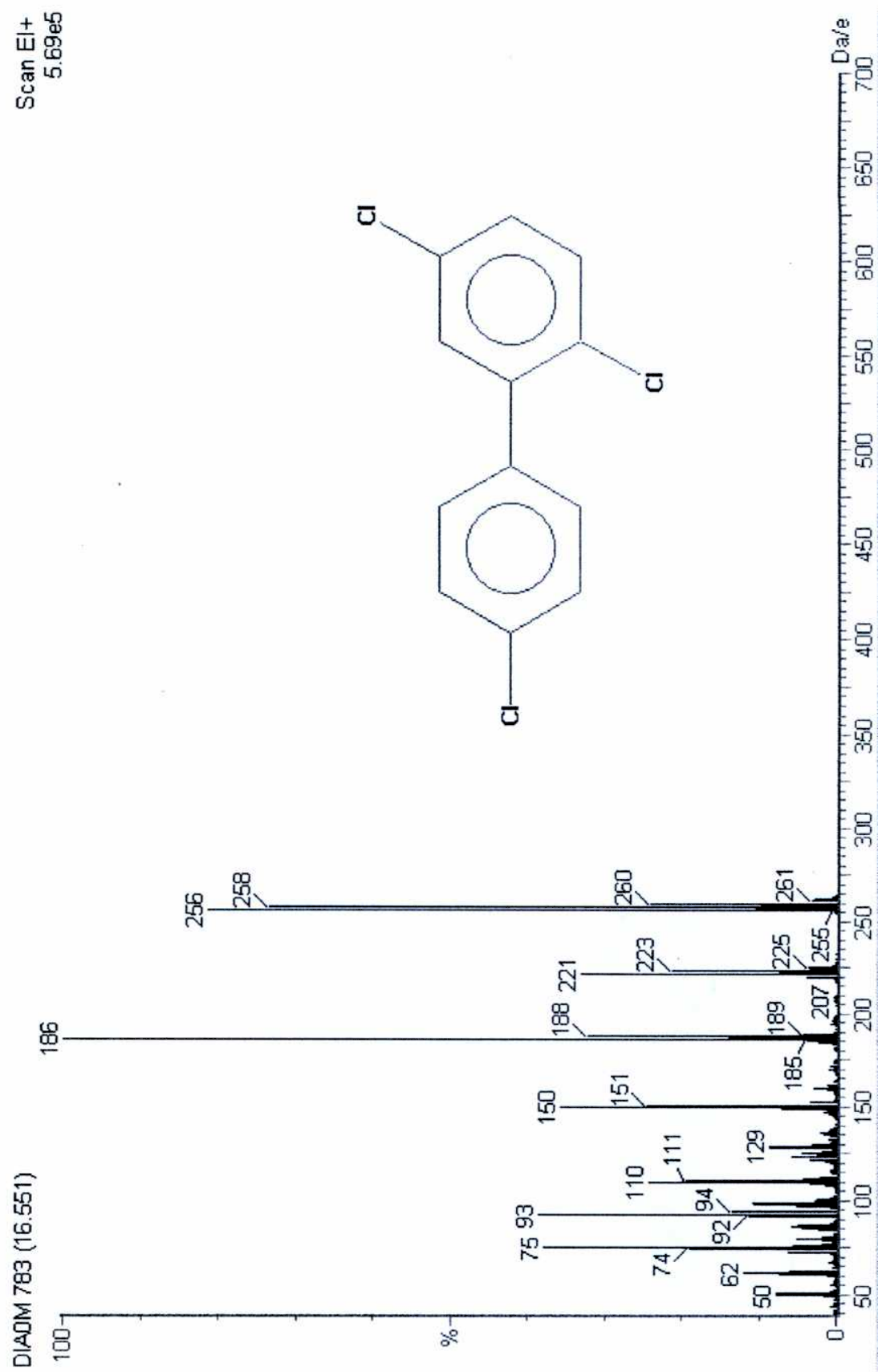


Figura 16: Espectro de masa del 2,4',5-tricloro-1,1'-bifenilo

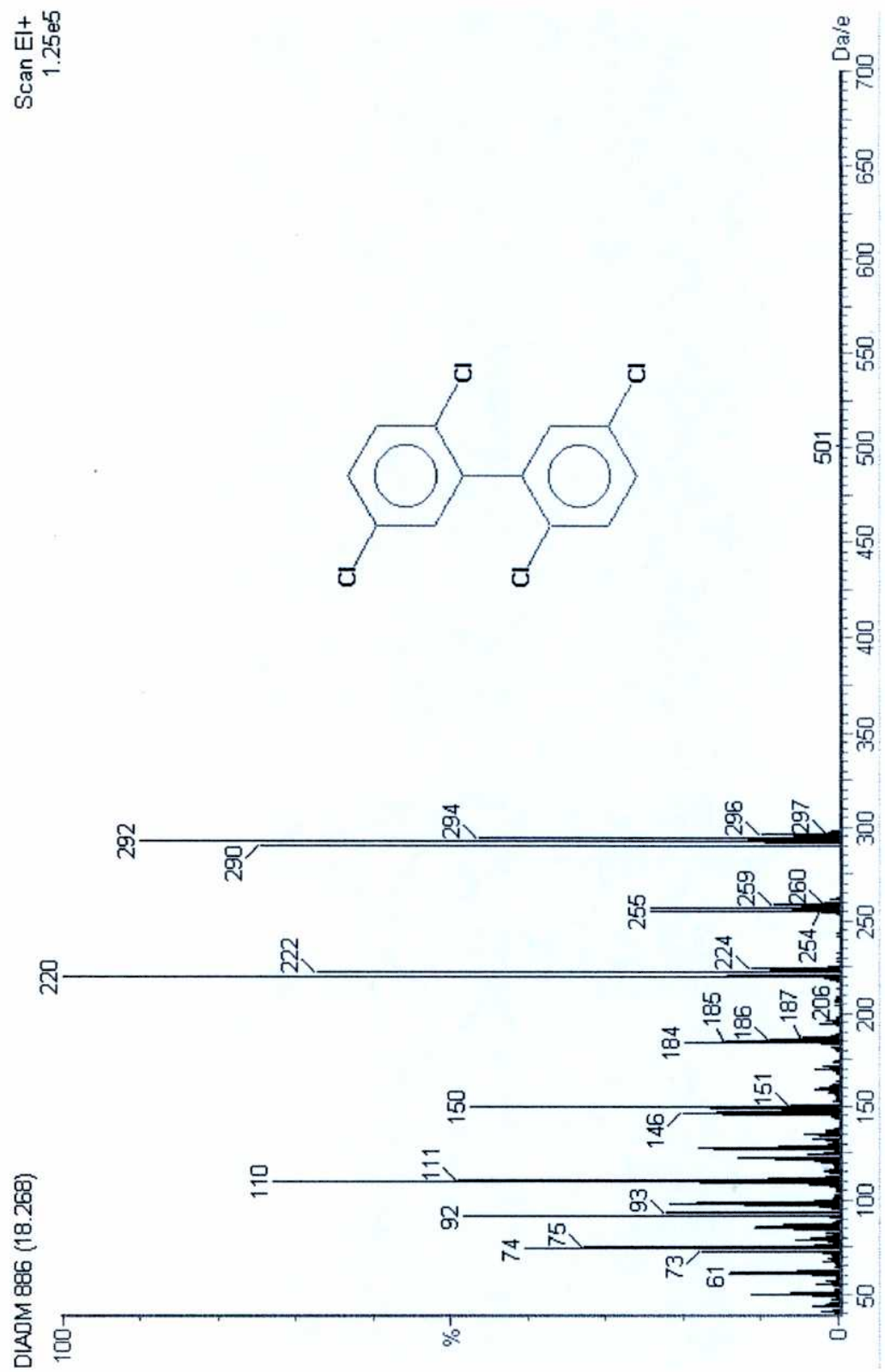


Figura 17: Espectro de masa del 2,2',5,5'-tetracloro-1,1'-bifenilo

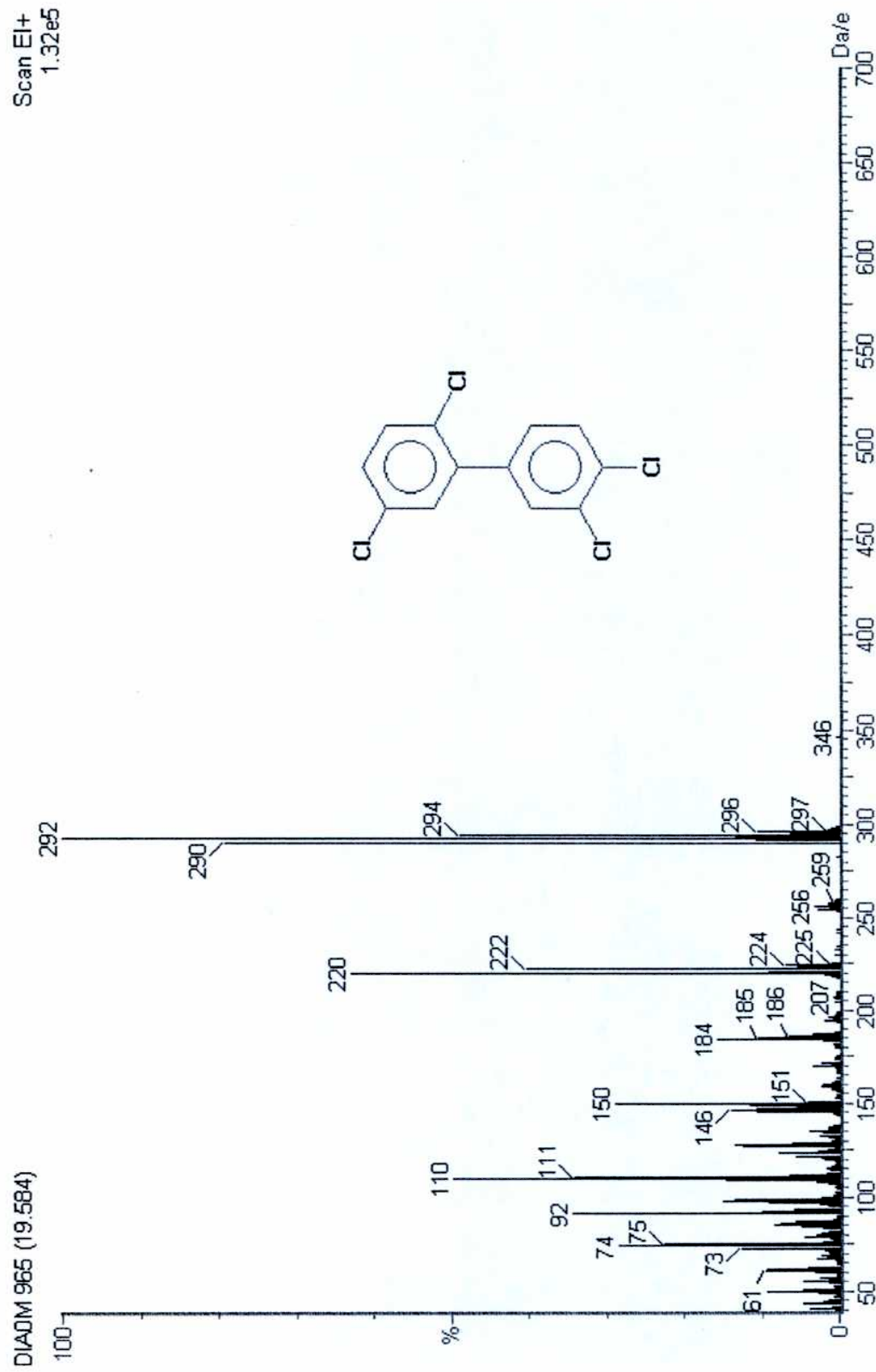


Figura 18: Espectro de masa del 2,3',4,5-tetracloro-1,1'-bifenilo

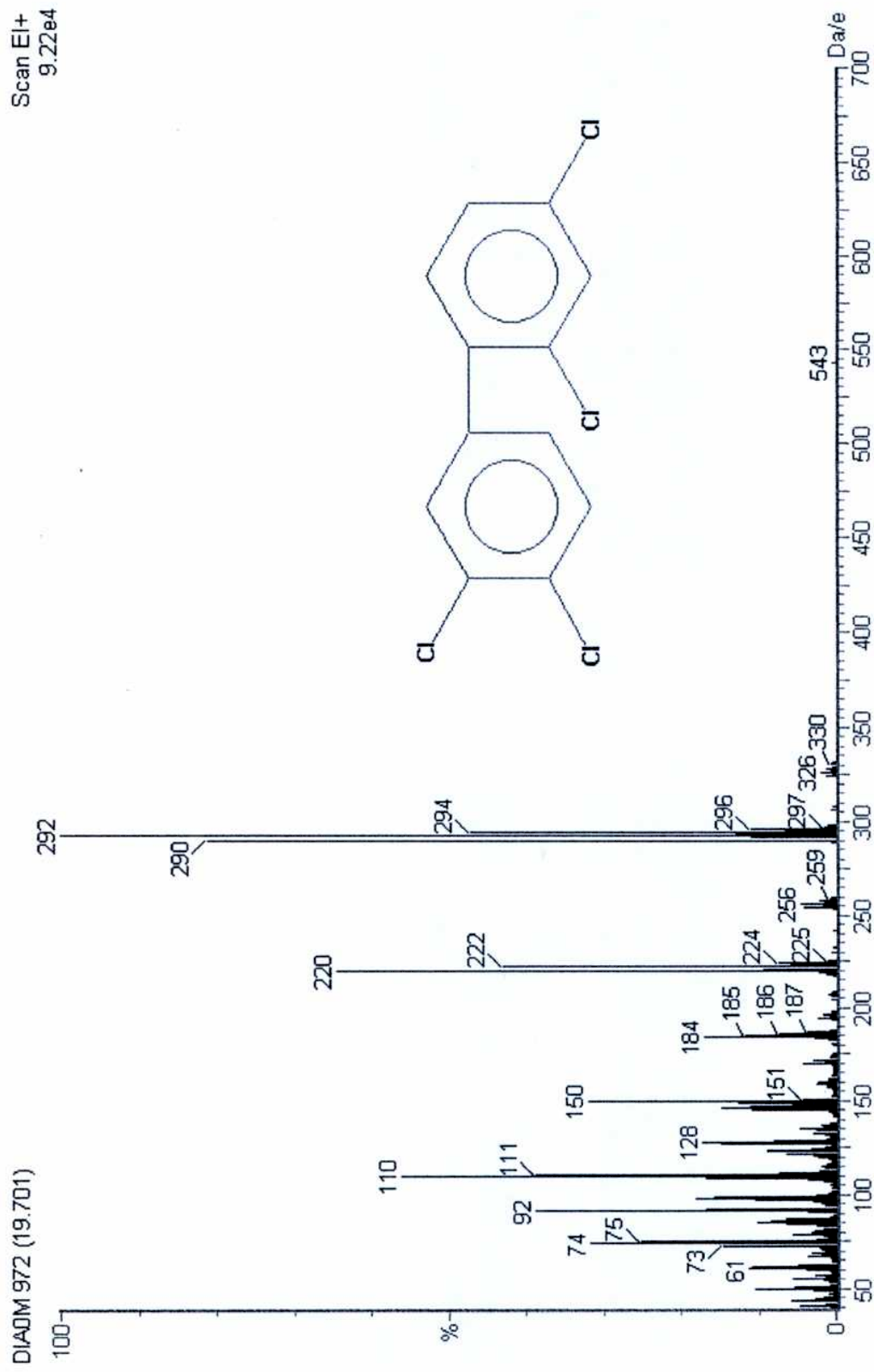


Figura 19: Espectro de masa del 2,3',4,4'-tetracloro-1,1'-bifenilo

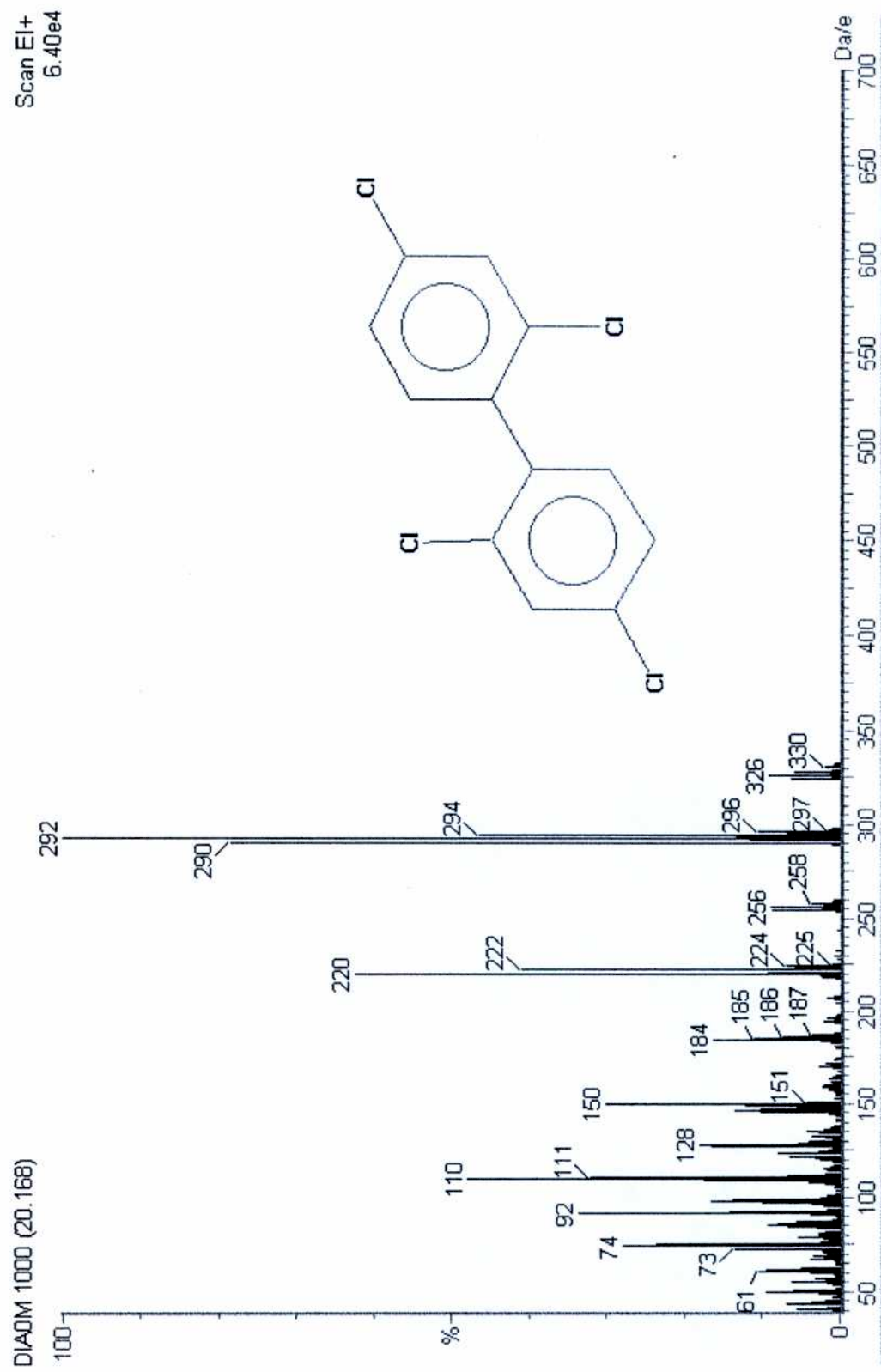


Figura 20: Espectro de masa del 2,2',4,4'-tetrachloro-1,1'-bifenilo

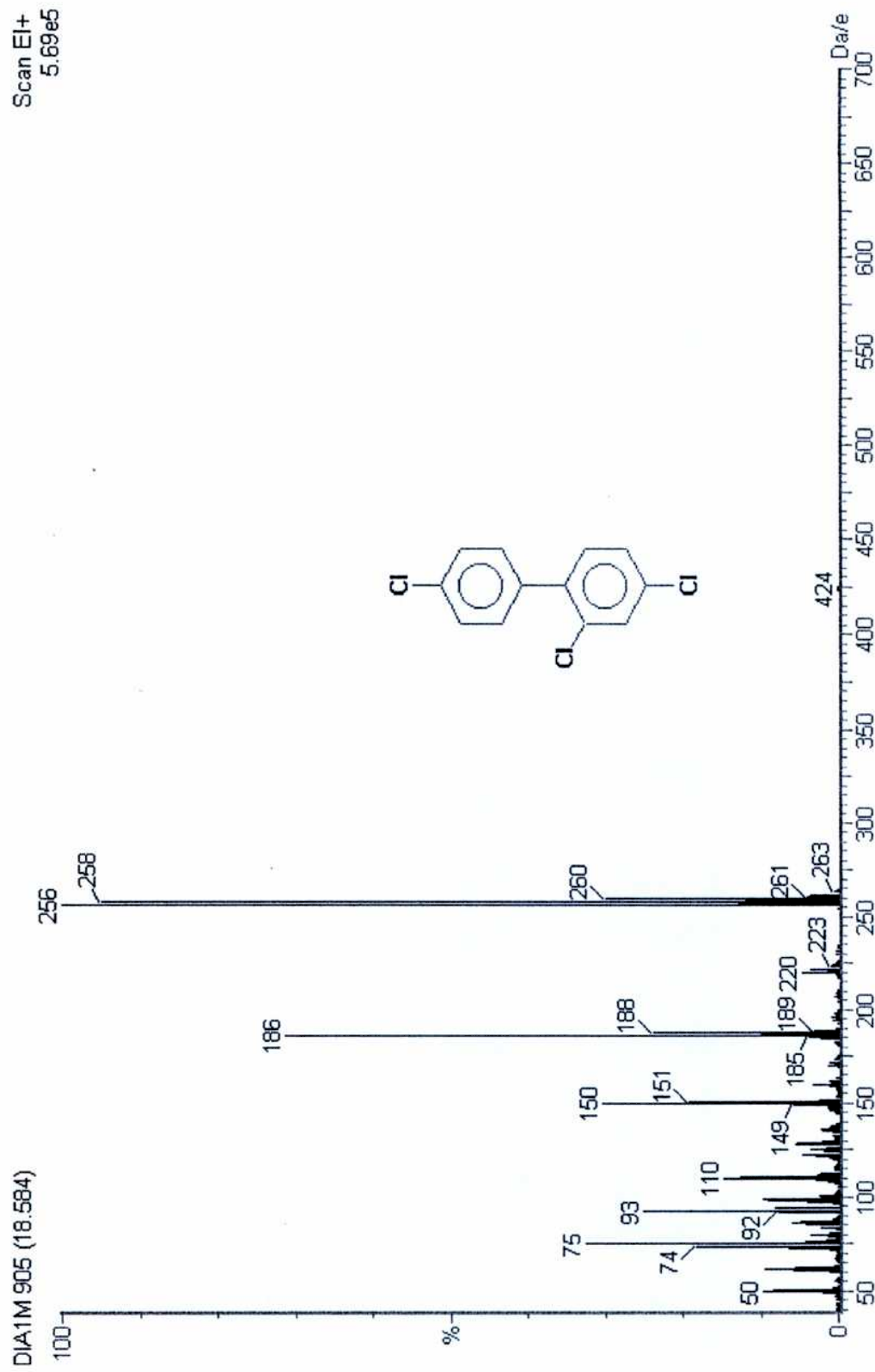


Figura 21: Espectro de masa del 2,4,4'-tricloro-1,1'-bifenilo

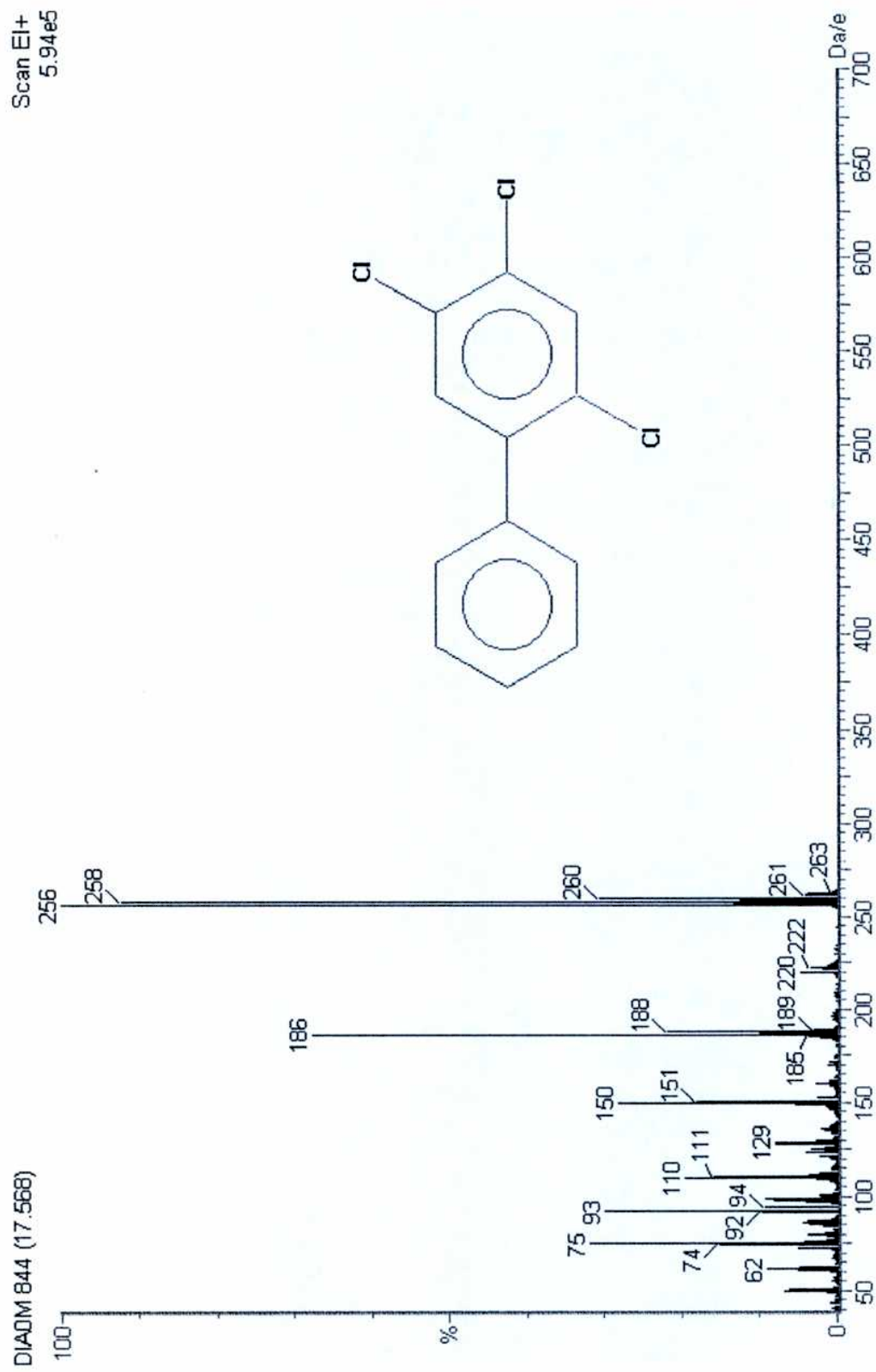


Figura 22: Espectro de masa del 2,4,5-tricloro-1,1'-bifenilo

En la Figura 23 se muestra el espectro de masa de un bifenilo pentaclorado, el 2,3',4,5',6-pentacloro-1,1'-bifenilo, con un T_r de 21.00 min, y un m/z de 324. Este compuesto si bien es un congénere presente en pequeñas cantidades en la mezcla inicial, es importante destacar que es consumido a pesar de su alto grado de cloración.

La incubación de células muertas por calentamiento de la cepa de *O. antropi* K, incubadas hasta una semana con la mezcla comercial de PCBs muestra cromatogramas similares a los obtenidos a tiempo cero, indicándose así que los procesos de dehalogenación no ocurren de manera abiótica en las condiciones actuales.

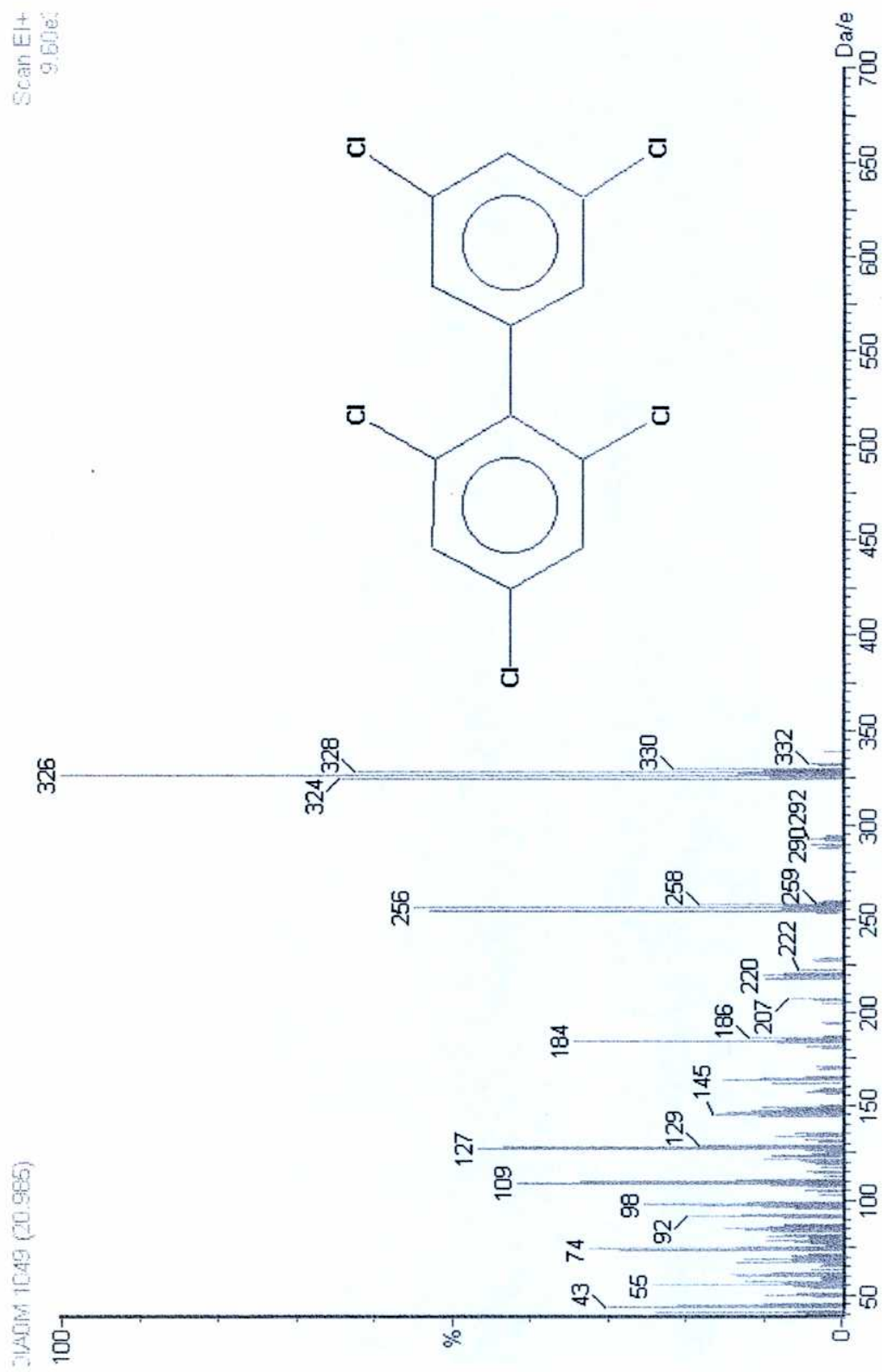


Figura 23: Espectro de masa del 2,3',4,5',6-pentacloro-1,1'-bifenilo

DISCUSIÓN

De los resultados mostrados en el presente trabajo, debe destacarse en primer lugar el hecho de haber podido aislar de suelos y aguas de las vecindades de la ciudad de Buenos Aires, microorganismos capaces de utilizar PCBs como única fuente de carbono y energía. En la mayoría de los casos se trata de microorganismos gram negativos, oxidasa positivos, lo cual responde a las generalidades de los aislamientos presentadas por otros autores (1, 26,34).

Sin embargo, también se ha podido aislar una cepa de enterobacteria oxidasa negativa similarmente a lo encontrado (15), como así también sorprendentemente se han podido aislar dos cepas de cocos gram positivos, provenientes de las tierras contaminadas. en general los reportes de cepas gram positivas son mucho menores que los de gram negativas (26).

En la Tabla 2 puede verse que entre las cepas degradadoras de PCBs, dos han resultado ser hemolíticas (*Ps. aeruginosa* H y *Ralstonia piketti* A) y las otras no; además ninguna tiene la capacidad de preproducir surfactantes.

No existe ninguna relación entre la actividad lipolítica, hemolítica, no la producción de biosurfactantes para las cepas degradadoras de PCBs. Tampoco se encontraron relaciones para cepas degradadoras de hidrocarburos en general (estos últimos datos aportados por el resto de los integrantes del laboratorio)

Habiendo encontrado diferentes cepas de microorganismos degradadores de PCBs pertenecientes a las mismas especies bacterianas, se realizó un análisis estadístico basado en la producción enzimática de estas cepas con el objeto de establecer posibles similitudes entre las mismas. En este análisis, se incluyeron también las cepas aisladas por otros integrantes del laboratorio con capacidades degradadoras de otros compuestos xenobióticos, ya que en su mayoría provienen de los mismos ambientes naturales y pudieron haber tenido alguna similitud interesante.

Se han encontrado modelos de producción de enzimas distintos para las diferentes cepas de las mismas especies y que degradan el mismo compuesto, en todos los casos de los xenobióticos estudiados en el laboratorio. Es de destacar el hecho de que *O. antrophi* K está muy alejado de todos los demás clusters, inclusive de las otras dos cepas de su misma especie que degradan PCBs.

En cuanto a la resistencia a antibióticos, sólo se ha encontrado una cepa resistente a cloranfenicol, *A. xylosoxidans* A, y una cepa resistente a tetraciclina, *K. oxytoca* F2. Esto exige buscar otros posibles marcadores de plásmidos para el análisis genético posterior. Esto se puede asociar a la baja resistencia a metales pesados que presentan las cepas aisladas.

Ninguna de las cepas aisladas es capaz de consumir tolueno, sugiriéndose así la ausencia del operón *tol* en estas bacterias.

Por otra parte algunas de las cepas aisladas pueden utilizar clorobenceno como única fuente de carbono y energía. Este es un resultado interesante, en cuanto que los reportes que existen hasta el momento sobre degradación de clorobencenos han sido exclusivamente en condiciones anaeróbicas (26). La posibilidad de degradación de estos solventes, intermediarios de síntesis de pesticidas y colorantes, abre una nueva línea de trabajo en el laboratorio, orientada a la utilización de los microorganismos encontrados en procesos de biorremediación.

No se ha encontrado una correlación del 100% entre el consumo de PCBs y el consumo de clorobenceno, lo que puede indicar que las enzimas utilizadas para la biodegradación de estos compuestos serían diferentes.

En la Tabla 6 se mostraron los resultados obtenidos para el consumo de PCBs a los 7 días de incubación para las distintas cepas aisladas. Si bien todas ellas exhiben un alto porcentaje de consumo del xenobiótico, cabe destacar que la cepa F2 y la cepa K pueden consumir en las condiciones de ensayo en frasco de laboratorio, el 100% de la mezcla comercial de PCBs en los 7 días de incubación. Esto las convierte en cepas potencialmente útiles para pensar en el desarrollo de un proceso en fermentador destinado a la eliminación de residuos que contengan estos compuestos, ya que este tipo de procesos son económicamente más

favorables que la eliminación por incineración. Por ello se decidió continuar con un estudio más detallado de los metabolitos formados por ambas cepas.

El método de extracción utilizado asegura una correcta recuperación de todos los congéneres existentes en la mezcla inicial, esto fue comprobado mediante la extracción de células muertas, de las cuales se obtuvo un perfil cromatográfico idéntico al obtenido con las incubaciones de células viables detenidas a tiempo cero.

Luego de probar el uso de detergentes como Tritón y de solventes como acetato de etilo, tal como proponen otros autores, se comprobó que la utilización de los mismos conlleva un solapamiento de los picos en las corridas cromatográficas, debido a la formación de emulsiones, que impiden una buena separación de los componentes presentes en las extracciones, por tal motivo no se utilizaron estos compuestos.

Por otra parte, la reducción a pH 1 con ácido perclórico, y el contacto durante toda la noche en agitación con el solvente de extracción, aseguró la recuperación cuantitativa de los PCBs y otros compuestos que pudieran formar parte de los extractos de incubación.

A diferencia de lo hallado por Sylvestre y col. (41), en las condiciones del ensayo, no se encuentran compuestos coloreados, aunque el medio contiene nitratos, lo que indica que no se produce nitración de los clorobifenilos.

La cepa de *Klebsiella oxytoca* F2 degrada con muy buena eficiencia los bifenilos policlorados así como también los compuestos ácidos y/o fenólicos que se forman transitoriamente durante las incubaciones.

La cepa de *Ochrobactrum anthropi* K aislada de tierras contaminadas, también consume un 100% de los PCBs en los 7 días de incubación, lo que la convierte en el otro candidato de interés para biorremediación y/o su utilización en biorreactores. Las extracciones de las incubaciones se hicieron en este caso en presencia de bifenilo como standard interno, sustancia que no está presente en la mezcla inicial, para evaluar la posibilidad de pérdidas durante las extracciones.

En la Figura 10 se ve, que en las primeras 24 horas de incubación hay un consumo aproximado del 50% de los PCBs.

En la Figura 11, en la que se muestran los cromatogramas ampliados entre los 14 y 20 minutos, se distinguen una serie de picos que desaparecen, por ejemplo, T_r : 14,60- 15,05- 15,37- 16,15- 17,10- 18,03- 18,25- 19,58- 19,70, entre los más importantes, así como también desaparece un pico a las 12,92 minutos que se apreciaba en la Figura 10.

Algunos, cambian su área significativamente, T_r : 15,55- 16,55 y 17,57.

Por último, aparecen otros que no estaban presentes en la mezcla original, tales como, T_r : 16,37 (muy pequeño)- 18,02 y fundamentalmente 18,59.

Las sustancias contenidas en estos picos fueron identificadas mediante espectroscopía de masa. En todos los casos, se pueden detectar los iones correspondientes a los derivados con los distintos números de átomos de cloro posibles. La identificación de cada uno de ellos se muestra en las figuras al lado del espectro de masa correspondiente.

En los estos cromatogramas, no se han podido detectar compuestos hidroxilados, a diferencia de los resultados obtenidos para *K. oxytoca* F2 . Tampoco se obtuvo reacción positiva para fenoles (39) en las mezclas de incubación ni en los extractos.

Se detecta un consumo rápido de congéneres mono-, bi- y hasta triclorados, desaparición de algunos tetra- y pentaclorados y aparición de algunos triclorados. Algunos de los picos de los triclorados, mantienen o bajan muy poco su área. Todo esto lleva a suponer, que en principio los congéneres más halogenados se convierten en derivados con menor número de átomos de cloro sin la participación de enzimas oxigenantes. La participación de este tipo de enzimas que llevan a la formación de compuestos hidroxilantes, hace que los compuestos hidroxilados intermedios sean eliminados rápidamente.

En la Figura 24 se muestran una serie de ejemplos con las sustancias encontrados en los extractos de las incubaciones a tiempo 0 y a las 24 horas, que ilustran la posibilidad de conversiones por dehalogenaciones reductivas de algunos congéneres tetraclorados en triclorados.

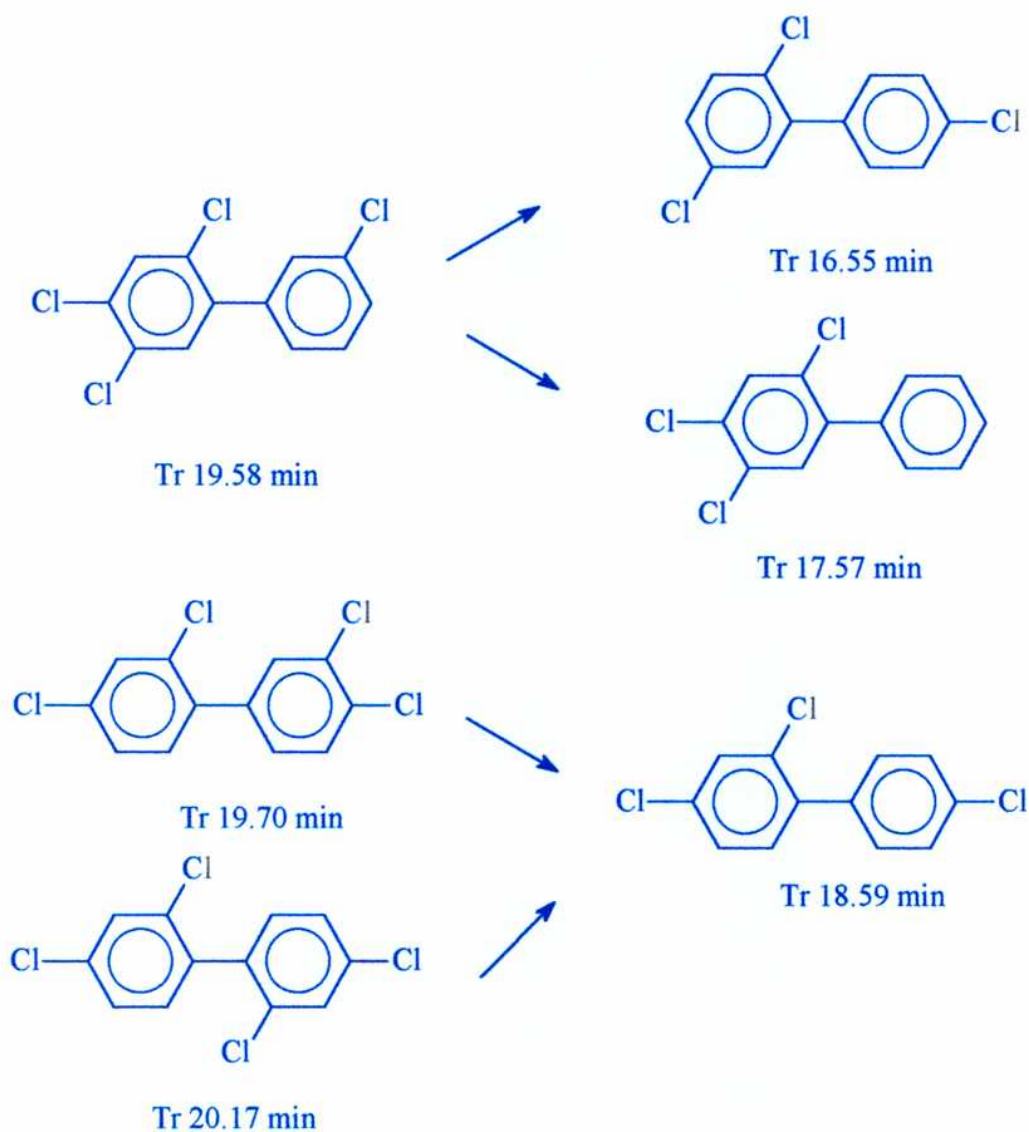


Figura 24: Ejemplos de dehalogenaciones de bifenilos policlorados por *Ochrobactrum anthropi* K

Algunas dehalogenaciones reductivas se han demostrado para la degradación aeróbica del pentaclorofenol (17,18,19,20,21), pero con la participación de glutathione y siempre sobre un derivado hidroxilado. En el presente caso no sabemos cual es el cofactor que provee los hidrógenos necesarios, pero aparentemente no es necesaria la presencia de oxhidrilos en la molécula para que se produzca la dehalogenación reductiva.

La posible diferencia de velocidades de reacción entre la dehalogenación y el catabolismo posterior de enzimas hidroxilantes, sugiere una vía metabólica como la que se sugiere en la Figura 25.

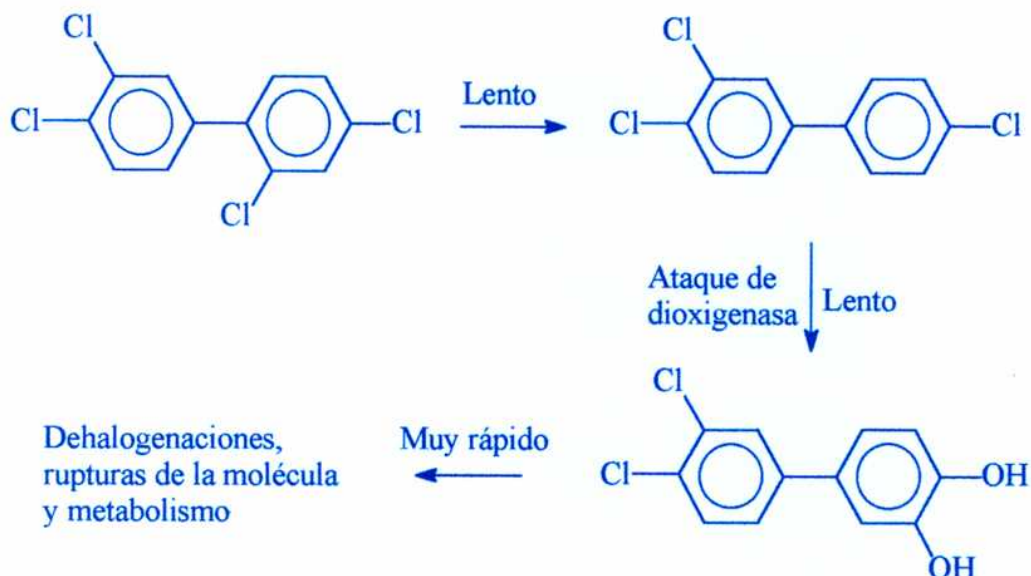


Figura 25: Mecanismo propuesto para el metabolismo de PCBs por *Ochrobactrum anthropi* K

En la mezcla de PCBs, los congéneres menos halogenados son atacados preferentemente por las enzimas oxigenantes codificadas en el operón *bph*, que los convierte en compuestos polares, hidrosolubles, y más fácilmente metabolizables.

Para los congéneres más halogenados, hay una carencia de posiciones libres para los ataques de las enzimas oxigenantes. Ellos serían atacados en primera instancia por una sistema dehalogenante, que mantiene a las moléculas en un estado poco polar y poco soluble en agua, lo que les asegura un mayor tiempo de vida media en la reacción.

Al que quedar posiciones libres favorables para el ataque de las dioxigenasas, éstos se convierten en compuestos hidroxilados, solubles en agua, los cuales son rápidamente degradados por el resto del operón *bph*.


Se prefirió profundizar en el estudio metabólico de *O. anthropi* K, por no acumular metabolitos hidroxilados durante las incubaciones, a diferencia de *K. oxytoca* F2, porque esto favorece el uso de la misma en biorreactores.

Por último, se destaca, que en ningún caso la dehalogenación es abiótica.

CONCLUSIONES GENERALES

- Se han podido aislar de tierras y aguas de la ciudad de Buenos Aires, 10 cepas que utilizan a los PCBs como única fuente de carbono y energía
- Dos de las cepas aisladas (*Ochrobactrum antropi* K y *Klebsiela oxytoca* F2) presentan una abundante crecimiento y una rápida metabolización del xenobiótico a escala de laboratorio, lo que les confiere características interesantes para intentar un estudio a escalas mayores.
- Los resultados expuestos en el presente trabajo, constituyen los primeros pasos para el abordaje de la biorremediación de este tipo de compuestos contaminantes y de otros similares, que constituyen un verdadero riesgo para la salud de todos los organismos vivos.
- El estudio metabólico del consumo de PCBs como única fuente de carbono y energía para la cepa *O. antropi* K aislada, arrojó resultados que permitieron proponer un mecanismo adecuado para el metabolismo de estos xenobióticos.
- El mecanismo propuesto es coherente con los metabolitos hallados durante la incubación.


ALBERTO A. VIALE


PAULA V. CASASEO

PROXIMOS ESTUDIOS

- Se realizan en este momento ensayos orientados a la caracterización genética de los microorganismos aislados en el laboratorio, intentando verificar si la actividad degradadora de PCBs es cromosomal o plasmídica.
- Se intenta también en este momento el uso de *O. antropicus* K en fermentador.

BIBLIOGRAFIA

1. **Abramowicz D.A.** Aerobic and anaerobic degradation of PCBs: A review. Critical reviews in Biotechnology, 10, 241-251, 1990.
2. **Jones G.R.N.** Polychlorinated biphenyls, where do we stand now?. Lancet i: 791-794, 1989.
3. **National Research Council Committee on the Assessment of PCBs in the Environment.** Polychlorinated biphenyls in the environment. National Academy of Sciences, Washington D.C., 1979.
4. **Bedard D.L., Unterman R., Boop L.H., Brennan L.J., Haberl M.L., Johnson C.** Rapid assay for screening and characterizing microorganisms for the ability to degrade polychlorinated biphenyls. Appl. Environ. Microbiol. 51, 761-768, 1986.
5. **Sylvestre M.** Isolation methods for bacterial isolates capable of growth on *p*-chlorobiphenyl. Appl. Environ. Microbiol. 39, 1223-1224, 1980.
6. **Abramowicz, D.A.,** in Hazardous Waste Treatment: Biosystems for Pollution Control, Air and Waste Management Association, Pittsburg, 301, 1989.
7. **Furukawa K., Chakrabarty A.M.** Involvement of plasmids in total degradation of PCBs. Appl. Environ. Microbiol 44, 619-626, 1982.
8. **Masse R., Messier F., Peloquin L., Ayotte C., Sylvestre M.** Microbial degradation of 4-chlorobiphenyl, a model compound of chlorinated biphenyls. Appl. Environ. Microbiol 47, 947-951, 1984.
9. **Sayler G.S., Kong H.L., Shields M.S.,** Plasmid mediated biodegradative fate of monohalogenated biphenyls in facultatively anaerobic sediments. pp 117-136. *En Omenn G.S., Hollaender A. (Eds). Genetic control of environment pollutants.* 1984. Plenum Press N.Y.
10. **Sylvestre M., Masse R., Ayotte F., Messier F., Fauteaux J.,** Total biodegradation of 4-chlorobiphenyl by a two membered bacterial culture.

Appl. Environ. Microbiol 21, 192-195, 1985.

11. **Shields M.S., Hooper S.W., Seayler G.S.** Plasmid mediated mineralization of 4-chlorobiphenyl. J. Bacteriol, 163, 882-889, 1985.
12. **Hayase N., Taira K., Furukawa K.** *Pseudomonas putida* KF175 *bph* ABCD operon encoding biphenyl and polychlorinated biodegradation: cloning, analysis and expression in soil bacteria. J. Bacteriol, 172, 1160-1664, 1990.
13. **Barton m.R., Crawford R.L.** Novel transformation of 4-chlorobiphenyl by a *Pseudomonas putida* . Appl. Environ. Microbiol 54, 594-595, 1988.
14. **Takase Y., Omori T., Minoda Y.** Microbial degradation products from biphenyl-related compounds. Agric. Biol. Chem.50, 681-686, 1986.
15. **Chatterjee D.K., Kellogs S.T., Hamada S., Chakrabarty A.M.** Plasmid specifying total degradation of 3-chlorobenzoate by a modified *ortho* pathway. J. Bacteriol.146, 639-646, 1981.
16. **Dmochewitz S., Ballschmitter K.** Microbial transformation of technical mixtures of PCBs by the fungus *Aspergillus niger* . Chemosphere 17, 111-121, 1988.
17. **Cita de internet:** http://dragon.labmed.umn.edu/~lynda/pcp/pcp_map.html
18. **Mc. Allister K.A., Lee H., Trevors J.T.** Biodegradation 7: 1-40, 1996.
19. **Orser C.S., et al.** Characterization of *Flavobacterium* glutathion S-transferase gene involved reductive dechlorination. J. Bacteriol, 175(9): 2641-2644, 1993.
20. **Orser et al.** Cloning, sequence analysis, and expression of the *Flavobacterium* pentachlorophenol-4-monooxygenase gene in *E. coli* . J. Bacteriol 175(2): 411-416, 1993.
21. **Xun L. et al.** Purification and characterization of a tetrachloro-p-hydroquinone reductive dehalogenase from *Flavobacterium* sp. J. Bacteriol. 174(24): 8003-8007, 1992.
22. **Cita de internet:** http://dragon.labmed.umn.edu/~lynda/4cbp/4cbp_map.html
23. **Cita de internet:** http://dragon.labmed.umn.edu/~lynda/4cba/4cba_map.html
24. **Mondello F.J.,** J. Bacteriol 171: 1725-1727, 1989.

25. **Nadim L.M., Schoken M.J., Higson F.K., Gison D.T.** 13th Annu. Res. Symp. on the Land Disposal. Remedial Action, Incineration and Treatment of Hazardous Waste, Cincinnati, OH., 1997.
26. **Rasoul Chaudry G., Chapalamadugu S.** Biodegradation of halogenated organic compounds. Microbiol. Rev. 55, 59-79, 1991.
27. **Portier R.,** PCB Forum: Int. Conf. for the Remediation of PCBs Contamination: 10th volume, ASTM STP 971, Adams W.J., Chapman G.A. and Landis W.G.(Eds) American Society for Testing Materials, 517, Philadelphia, 1988.
28. **Portier R.,** PCB Forum: Int. Conf. of PCB Contamination Pennwell Conference, Houston, Texas, 63, 1989.
29. **Furukawa K., Arimura N.** Purification and properties of 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase from polychlorinated biphenyl-degrading *Pseudomonas pseudoalcaligenes* genes and *Pseudomonas aeruginosa* carrying the cloned *bphC* gene. J. Bacteriol. 169, 924-927, 1987.
30. **Furukawa K., Miyazaki T.** Cloning of a gene cluster encoding biphenyl and chlorobiphenyl degradation in *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. J. Bacteriol. 166, 392-398, 1986.
31. **Khan A., Tewari R., Walia S.** Molecular cloning of 3-phenylcatechol dioxygenase involved in the catabolic pathway of chlorinated biphenyl from *Pseudomonas putida* and its expression in *E. coli*. Appl. Environ. Microbiol. 54, 2664-2671, 1988.
32. **Khan A., Walia S.** Cloning of bacterial genes specifying degradation of 4-chlorobiphenyl from *Pseudomonas putida* OU83. Appl. Environ. Microbiol. 55, 798-805, 1989.
33. **Khan A., Walia S.** Identification and localization of 3-phenylcatechol dioxygenase and 2-hydroxy-6-oxo-6-phenyl-hexa-2,4 dienoate hydrolase genes of *Pseudomonas putida* and expression in *E. coli*. Appl. Environ. Microbiol. 56, 956-962, 1990.
34. **Furukawa K., Hayashida S., Taira K.** Biochemical and genetic basis from the degradation of PCBs in soil bacteria in *Pseudomonas*. Molecular biology

and Biotechnology, 259-267, Galli E., Silver S., Witholt B. (Eds.), American Society for Microbiology, Washington D.C., 1992.

35. **Mills A.L., Brevil C., Colwell R.R.** Unnumeration of petroleum degrading marine and estuarine microorganisms by the most probable number method. *Can. J. Microbiol.* 24, 552-557, 1978.
36. **Chou T.W., Bohonos N.** Diauxie and cometabolic phenomena in biodegradation evaluation. *En Proceedings of the Workshop: Microbial Degradation of Pollutants in Marine Environment*, 76-78 , Bourquin A.W. and Pritchard P.H. (Eds) EPA, US, GulfBreeze, Florida, 1979.
37. **Vidal C.M., Vitale A.A., Viale A.A.** Microorganismos degradadores de ácido naftalen 2-sulfónico. *Rev. Arg. Microbiol.*, 25, 221-226, 1993.
38. **Bauer A.W., Kirby W.M.N., Sherris J.C., Turk m.** Antibiotic suceptibility testing by standardized single disk method. *Am. J. Clin. Patol.* 45, 493-496, 1966.
39. **Vogel A.I.** Practical Organic Chemistry. Third edition, Longmans, 1959.
40. **Casasco P.V., Vidal C.M., Vitale A.A., Viale A.A.** Biodegradación de una mezcla comercial de bifenilos policlorados. *Rev. Arg. microbiol.* 28, 39-44, 1996.
41. **Sylvestre M., Masse R., Messier F., Fauteaux j., Baisoillion J.G., Beaudet R.** Bacterial nitration of 4-chlorobiphenyl. *Appl. Environ. Microbiol* 44, 871-877, 1982.