



COMPARACIÓN DEL LIMONENO Y BIFENILO COMO SUSTRATOS DE CRECIMIENTO PARA BACTERIAS CORINEFORMES QUE METABOLIZAN BIFENILOS POLICLORADOS

BLANCA STELLA DE HERNÁNDEZ¹, MAGALY DE CHIAL²,
FERMÍN MEJÍA^{1*}, HUMBERTO CORNEJO¹,
ALEX O. MARTÍNEZ-TORRES¹ Y DENNIS DOUGLAS FOCHT³

¹Departamento de Microbiología y Parasitología.

²Departamento de Genética y Biología Molecular. Facultad de Ciencias Naturales,
Exactas y Tecnología. Universidad de Panamá, Panamá, y

³Universidad de California, Riverside².

Apartado Postal 0824-00022, Panamá, República de Panamá.

*Correspondencia del autor: fermejia25@gmail.com.

RESUMEN

Está demostrado que los terpenos facilitan la degradación de Aroclor 1242 en suelo, mediante la acción de bacterias corineformes. El siguiente estudio se llevó cabo para determinar si el limoneno y bifenilo inducen la misma vía metabólica de la degradación del Aroclor 1242. Cinco cepas de bacterias corineformes fueron comparadas sobre la base del crecimiento en bifenilo y limoneno, oxidación de sustratos por células lavadas y homología con el gen *bphA* (Furukawa y Miyasaki, FM), que codifica la oxidación del bifenilo. El tiempo de duplicación entre las cinco cepas fue de 4.3 a 9.5 horas en limoneno, y 9.6 a 18.2 horas en bifenilo. Subcultivos continuos en un sustrato u otro resultaban en un aumento en la duración de la fase. Cuatro cepas utilizadoras de terpeno hibridizaron con el gen *bphA* (FM) cuando crecieron tanto en limoneno como en bifenilo. La hibridación con el gen *bphA* (Walia) mostró patrones diferentes en los aislados de terpenos, ya fuera que crecieran en bifenilo o limoneno. La existencia de dos grupos genéticamente diferentes de degradadores

de bifenilo ha sido bien establecida. Aunque ambos genes *bphA* fueron encontrados en estas bacterias, ellas se segregan de acuerdo al sustrato (bifenilo o limoneno) utilizado.

PALABRAS CLAVES

bifenilo, limoneno, biodegradación, cometabolismo, corinebacterias.

INTRODUCCIÓN

Los policlorobifenilos (PCBs) son unos de los contaminantes más recalcitrantes o difíciles de biodegradar en el ambiente. Estos son ampliamente usados como lubricantes en procesos industriales que requieren estabilidad a altas temperaturas y fueron producidos en los Estados Unidos de América bajo el nombre comercial de Aroclor (EPA, 2010). Aunque la producción de PCBs fue prohibida en los Estados Unidos de América en 1972, continúa siendo una problemática ambiental debido a sus características químicas, que imparten su estabilidad y hace de estos menos susceptibles a la biodegradación por microorganismos autóctonos del suelo (EPA, 2008a; 2008b).

El bifenilo ha sido el sustrato análogo convencional usado para el cometabolismo de PCBs (Adebusoye *et al*, 2008; Boop, 1986). Aunque las bacterias que metabolizan los bifenilos son nativas del suelo, el bifenilo no es un constituyente común de éste, lo cual trae la pregunta de cuál es el sustrato natural que en el suelo puede ayudar a las bacterias metabolizadoras de PCBs. Donnelly *et al*. (1994) demostró que algunos flavonoides actúan igual que los bifenilos en promover el cometabolismo de PCBs. Gilbert y Crowley (1997) demostraron que el aceite de hierbabuena (carvona) y otros monoterpenoides aumentan la degradación de PCBs en cultivos puros. Un estudio, realizado para determinar cuáles eran los compuestos naturales para las bacterias bifenil-degradadoras, demostró que el Aroclor 1242 desaparece completamente cuando el suelo era enmendado con residuos de plantas ricos en terpenos, y que cultivos aislados de estos suelos pueden cometabolizar Aroclor 1242 mientras terpenos como sustratos de crecimiento (Hernández *et al*, 1997).

En esta investigación hemos aislado bacterias corineformes de suelo. Hemos observado que estos aislamientos presentan diferentes respuestas fisiológicas cuando crecen en limoneno o bifenilo. La más evidente fue el largo periodo de adaptación (fase *Lag*) observado durante el subcultivo entre sustratos a pesar

de que el inóculo provenía de un cultivo en fase exponencial. De manera que la posibilidad de que sustratos diferentes puedan inducir vías diferentes que afectan el cometabolismo de los PCBs es objeto de estudio.

PARTE EXPERIMENTAL

Se utilizaron las siguientes cepas degradadoras de terpeno: *Rhodococcus rhodochrous* T100, *Rhodococcus rhodochrous* T101, *Rhodococcus rhodochrous* T110, *Corynebacterium* sp. T104 y *Cellulomonas* sp. T109 (Hernández *et al*, 1997). También se utilizaron las siguientes degradadoras de bifenilo: *Pseudomonas putida* OU83 (Walia *et al*, 1990) y *Alcaligenes eutrophus* H850 (Bedard *et al*, 1987). Las cepas fueron crecidas en un medio de sales minerales, utilizando bifenilo o limoneno como fuente única de carbono (Focht, 1994).

La homología genética de las cepas degradadoras de terpenos crecidas en bifenilo o limoneno fue determinada usando sondas no radiactivas del gen *bphA*, el cual codifica la enzima para la oxigenación inicial de bifenilos (Furukawa y Miyasaki, 1986). Las sondas del gen *bphA* se originan de la cepa de *Pseudomonas putida* OU83 (fragmento *Sal* I de 2.8 kb del plásmido pAW6194) y de la cepa de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 (fragmento de 5 kb *Xho* I - *Sma* I del plásmido pKTF18) (Taira *et al*, 1992). La extracción del ADN total fue realizada mediante el procedimiento de lisis alcalina (Sambrook *et al*, 1989). Las sondas no radiactivas fueron preparadas de acuerdo con los procedimientos del *Kit Genius DNA Labeling and Detection* (Boehringer Mannheim). La hibridización *slot blot* fue realizada en altas condiciones de estringencia permitiendo una homología del 70%.

La tasa de oxidación fue determinada mediante un electrodo de oxígeno acoplado a una celda de reacción. La mezcla de ensayo (2 ml) se mantuvo a temperatura constante (30°C) y consistió de una suspensión de células o extracto libre de células, en buffer de fosfato (67 mM; pH 7) y el correspondiente sustrato (0.1 mM) suspendido en N,N'-Dimetil formamida o metanol. La Figura 1 muestra la estructura de los diferentes sustratos utilizados. Las suspensiones de células lavadas y extractos libres de células fueron preparados utilizando cultivos de cepas utilizadoras de terpenos crecidas en limoneno y bifenilo, como única fuente de carbono. El contenido de proteínas de los extractos libres de células fue determinado por el método de Lowry *et al*. (1951), usando albúmina de suero bovino como patrón. Para determinar la tasa de crecimiento, los

cultivos fueron crecidos en matraces de brazo lateral y el crecimiento fue medido espectrofotométricamente a una longitud de onda de 525 nm, durante la fase de crecimiento exponencial (Focht, 1994).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

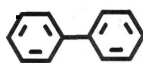
Todas las cepas de terpeno presentaron tiempos de duplicación más cortos cuando crecen en limoneno. Los mismos oscilaron entre 4.3 a 9.5 horas, mientras que cuando crecen en bifenilo, los tiempos de duplicación oscilaron entre 9.6 y 18.2 horas (Cuadro 1). Subcultivos continuos en uno de los sustratos resultaba en un aumento en la fase lag de hasta tres semanas antes de su aclimatación en el otro sustrato.

El crecimiento en bifenilo induce la propia vía metabólica para la degradación de este sustrato, incluyendo el cometabolismo de 4,4'-DCBP. Éste induce pobremente el cometabolismo de 2,2',5,5'-TCBP, el cual, con excepción de la cepa T104, cuya tasa de oxidación fue de 67.5 nmoles de O₂, no fue oxidado cuando las células crecían previamente en bifenilo (Cuadro 2). Por otro lado, aunque hay algo de metabolismo de BP por células crecidas en limoneno, éste es mucho más bajo y el metabolito central 3-PhCat no es oxidado del todo por 4 de las 5 cepas. Sin embargo, 4-PhCat sí es oxidado, lo cual indica una vía metabólica diferente, posiblemente mediante una dioxigenación en posición 3,4 (Figura 2).

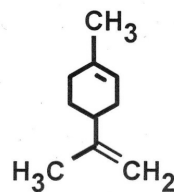
Esto explica las tasas de oxidación más altas en 2,2',5,5'-TCBP que en 4,4'-DCBP (Cuadro 3). El limoneno no induce la catecol-dioxigenasa de la vía BP. La inhabilidad de extractos libres de células de oxidar 4-PhCat, en contraste con las células, puede deberse a la inestabilidad enzimática (altamente sensible al oxígeno) o al hecho de que la enzima está particularmente enlazada.

Figura 1. Diferentes sustratos utilizados en el presente estudio.

SUSTRATOS DE CRECIMIENTO

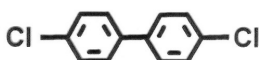


Bifenilo (BP)

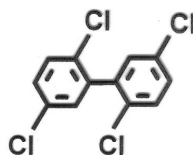


Limoneno (Limo)

CONGENEROS DE PCBs

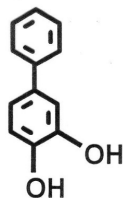


4,4'-Diclorobifenilo
(4,4'-DCBP)

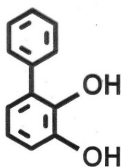


2,2',5,5'-Tetraclorobifenilo
(2,2',5,5'-TCBP)

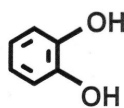
CATECOLES



4-fenilcatecol
(4-PhCat)



3-fenilcatecol
(3-PhCat)



Catecol (Cat)

Cuadro 1. Comparación del tiempo de duplicación (horas) de bacterias degradadoras de terpeno cuando crecen en bifenilo y limoneno como única fuente de carbono.

Cepa		Sustrato	
		Bifenilo	Limoneno
<i>R. rhodochrous</i>	T100	10.5 ± 1.2	4.3 ± 0.31
<i>R. rhodochrous</i>	T101	N.D	8.4 ± 2.9
<i>Corynebacterium</i> sp.	T104	13.5 ± 1.2	4.3 ± 0.5
<i>Cellulomonas</i> sp.	T109	18.2 ± 1.2	9.5 ± 0.4
<i>R. rhodochrous</i>	T110	9.6 ± 0.3	7.6 ± 0.2
<i>R. globerulos</i>	P6	10.8 ± 1.7	8.0 ± 2.9

Cuadro 2. Tasas de asimilación de oxígeno (nmol O₂ mg⁻¹ min⁻¹) de células en reposo de bacterias utilizadoras de terpenos crecidas en bifenilo como única fuente de carbono.

Cepa		Sustrato ¹						
		BP	Limo	Cat	3-PhCat	4-PhCat	DCBP	TCBP
<i>R. rhodochrous</i>	T100	132.0	66.6	329.0	208.0	114.0	75.8	0.0
<i>R. rhodochrous</i>	T101	250.0	67.6	507.0	452.0	191.0	67.3	0.0
<i>Corynebacterium</i> sp.	T104	137.0	66.9	246.0	132.0	72.1	866.0	67.5
<i>Cellulomonas</i> sp.	T109	291.0	53.2	625.0	637.0	40.3	64.6	0.0
<i>R. rhodochrous</i>	T110	285.0	110.0	360.0	260.0	135.0	70.0	0.0

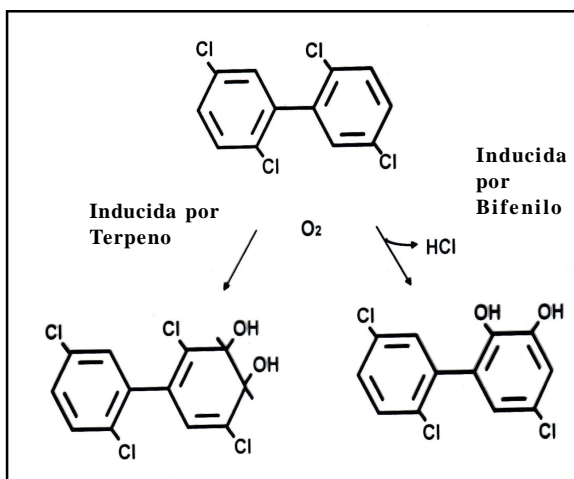
(¹) Abreviaturas: BP, bifenilo; Limo, limoneno; Cat, catecol; 3-PhCat, 3-fenil-catecol; 4-PhCat, 4-fenil-catecol; DCBP, 4,4'-dicloro-bifenilo; TCBP, 2,2',5,5'-tetracloro-bifenilo.

Cuadro 3. Tasas de asimilación de oxígeno (nmol O₂ mg⁻¹ min⁻¹) de células en reposo de bacterias utilizadoras de terpenos crecidas en limoneno como única fuente de carbono.

Cepa		Sustrato ¹						
		BP	Limo	Cat	3-PhCat	4-PhCat	DCBP	TCBP
<i>R. rhodochrous</i>	T100	125.0	425.0	0.0	0.0	87.5	35.7	100.0
<i>R. rhodochrous</i>	T101	75.0	150.0	24.0	75.0	100.0	25.0	37.5
<i>Corynebacterium</i> sp.	T104	34.5	438.0	0.0	0.0	20.0	107.0	175.0
<i>Cellulomonas</i> sp.	T109	50.0	275.0	0.0	0.0	25.0	0.0	50.0
<i>R. rhodochrous</i>	T110	79.0	138.0	0.0	0.0	56.5	25.0	100.0

(¹) Abreviaturas: BP, bifenilo; Limo, limoneno; Cat, catecol; 3-PhCat, 3-fenil-catecol; 4-PhCat, 4-fenil-catecol; DCBP, 4,4'-dicloro-bifenilo; TCBP, 2,2',5,5'-tetracloro-bifenilo.

Figura 2. Mecanismo oxigenación del 2,2',5,5'-TCBP por la vía de inducción por terpeno o por bifenilo.



Existen dos grupos genéticamente diferentes de genes *bph* (Yates y Mondello, 1990). En este estudio encontramos que dos sondas de ADN mostraron patrones de homología diferentes: la hibridación con el gen *bphA* de Walia (2.8 kb *Sal* I de pAW6194) mostró patrones diferentes en los aislados de terpenos, ya sea que crecieran en bifenilo o limoneno. Cinco cepas hibridaron con el gen *bphA* de Furukawa (fragmento de 5 kb *Xho* I - *Sma* I del pánsmido pKTF18) (Cuadro 4). Aunque ambos genes *bph* son encontrados en estas cepas corineformes, ellos son inducidos de acuerdo al sustrato donde son crecidos (bifenilo o limoneno).

Cuadro 4. Hibridación de las sondas *bphA* de Walia y Furukawa con el ADN total extraído de cepas de terpenos crecidas en bifenilo y limoneno como única fuente de carbono.

Cepa		Furukawa		Walia	
		Bifenilo	Limoneno	Bifenilo	Limoneno
<i>R. rhodochrous</i>	T100	++ ¹	++	+	++
<i>R. rhodochrous</i>	T101	-	-	-	+
<i>Corynebacterium</i> sp.	T104	-	-	++	-
<i>Cellulomonas</i> sp.	T109	++	++	+	-
<i>R. rhodochrous</i>	T110	++	++	++	-
<i>P. putida</i>	OU83	+	N.D.	+	N.D.
<i>A. eutrophus</i>	H850	++	N.D.	++	N.D.

(¹) Abreviaturas: «++», indica una reacción de hibridación fuerte; «+», indica una reacción de hibridación moderada; N.D., indica que no hubo hibridación.

Se ha asumido que la dioxigenación de PCBs ocurre solo en los sitios 2,3 no sustituidos, y es bloqueada por los sustituyentes clorados en el sitio 2 (*orto*). Sin embargo, Haddock *et al.* (1995) demostró que *Pseudomonas* sp. LB400 oxidó 2,2',5,5'-TCBP por dos rutas diferentes, ambas de las cuales desaprueban este ejemplo. La dioxigenación 2,3 elimina el átomo de cloro en posición orto espontáneamente, mientras que la dioxigenación 3,4 lleva a la formación de un *diol* terminal. Nuestros resultados muestran una tasa metabólica más alta para TCBP que para DCBP en células crecidas en limoneno. Además, solo el limoneno induce esta actividad. De manera que existe la posibilidad de que haya dos dioxigenasas diferentes envueltas en el cometabolismo de PCBs.

COMPARISSON OF LIMONENE AND BIPHENYL AS GROWTH SUBSTRATES OF PCB'S METABOLIZING CORYNEFORM BACTERIA.

SUMMARY

It is demonstrated that terpenes greatly enhanced degradation of polychlorinated biphenyls in soil, and that all of the isolates were coryneforme bacteria. The following study was undertaken to determine if limonene and biphenyl induce for the same pathway. Five coryneform strains were compared for growth, oxidation of substrates by washed cells, and homology to the *bphA* (Furukawa and Miyasaki, FM) gene, which encodes the oxidation of biphenyl. Doubling times among the five strains ranged from 4.3 to 9.5 hours when grown on limonene, and 9.6 to 18.2 hours when grown of biphenyl. Continuous subculture on one substrate resulted in long lag periods. All five strains hybridized to the *bphA* gene (FM) when grown on limonene, but showed no hybridization to it when grown on biphenyl. Hybridization to the *bphA* gene (Walia), but not to the FM gene was observed with biphenyl-grown cells. The existence of two genetically distinct groups of biphenyl-degraders has been well established. Although, both *bphA* genes are found in these coryneform strains, they appear to be segregated according to the substrate upon which they are grown.

KEY WORDS

Biphenyl, limonene, biodegradation, cometabolism, corynebacteria.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEBUSOYE, S. A., M.O. ILORI, F.W. PICARDAL, O.O. AMUND. 2008. Cometabolic degradation of polychlorinated biphenyls (PCBs) by axenic cultures of *Ralstonia* sp. strain SA-5 and *Pseudomonas* sp. strain SA-6 obtained from Nigerian contaminated soils. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 24:61–68.
- BEDARD, D.L., M.L. HABERL, R.J. MAY, M.J. BRENNAN. 1987. Evidence for novel mechanisms of polychlorinated biphenyl metabolism in *Alcaligenes eutrophus* H850. **App. Environ. Microbiol.** 53: 1103-1112.
- BOPP, L.H. 1986. Degradation of highly chlorinated PCBs by *Pseudomonas* strain LB400. **Journal of Industrial Microbiology.** 1: 23-29.
- DONNELLY, P.K., R.S. HEDGE, J.S. FLETCHER. 1994. Growth of PCB-degrading bacteria on compounds from photosynthetic plants. **Chemosphere.** 28: 981-988.
- ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. 2008(a). Polichlorinated Biphenyls (PCBs): Aroclor and Other PCB Mixtures. <http://www.epa.gov/osw/hazard/tsd/pcbs/pubs/aroclor.htm>. 2008a.
- ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. 2008(b). Polichlorinated Biphenyls (PCBs): PCB Congeners and homologs. <http://www.epa.gov/osw/hazard/tsd/pcbs/pubs/congeners.htm>. 2008b.
- ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. 2010. Polichlorinated Biphenyls (PCBs): Basic Information. <http://www.epa.gov/osw/hazard/tsd/pcbs/pubs/about.htm>. 2010.
- FOCHT, D.D. 1994. Microbiological Procedures for Biodegradation Research. In: **Methods of Soil Analysis, Part 2. Microbiological and Biochemical Properties** – SSSA Book Series, No. 5.
- FURUKAWA, K., T. MIYASAKI. 1986. Cloning of a gene cluster encoding biphenyl and chlorobiphenyl degradation in *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. **Journal of Bacteriology.** 166: 392-398.
- GILBERT, E.S., D.E. CROWLEY. 1997. Plant compounds that induce polychlorinated biphenyl biodegradation by *Arthrbacter* sp. strain B1B. **Appl. Environ. Microbiol.** 63: 1933-1938.
- HADDOCK, J.D., J.R. HORTON, D.T. GIBSON. 1995. Dihydroxylation and dechlorination of chlorinated biphenyls by purified biphenyl 2,3-dioxygenases from *Pseudomonas* sp. strain LB400. **Journal of Bacteriology.** 177: 20-26.
- HERNANDEZ, B.S., S.C. KOH, M CHIAL, D.D. FOCHT. 1997. Terpene utilizing isolates and their relevance to enhance biotransformation of polychlorinated biphenyls in soil. **Biodegradation** 8: 153-158.
- LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR, R.J. RANDALL. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193:265-275.
- SAMBROOK, J., E.F. FRISCH, T. MANIATIS. 1989. **Molecular cloning: a laboratory manual.** Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA.
- TAIRA, K., J. HIROSE, S. HAYASHIDA, K. FURUKAWA. 1992. Analysis of the *bph* operon from the polychlorinated-biphenyl-degrading strain of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707. **J Biol Chem** 267: 4844-4853.

- WALIA, S., A. KHAN, N. ROSENTHAL. 1990. Construction and applications of DNA probes for detection of polychlorinated biphenyl-degrading genotypes in toxic organic-contaminated soil environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 254-259.
- YATES, JR., F.J. MONDELLO. 1989. Sequence similarities in the genes encoding polychlorinated biphenyl degradation by *Pseudomonas* sp. strain LB400 and *Alcaligenes eutrophus* H850. *Journal of Bacteriology.* 171: 1733-1735.

Recibido: 10 de abril de 2015.

Aceptado: 15 de enero de 2017.