



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

00581
8

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE GENES
INVOLUCRADOS EN EL METABOLISMO DE ACIDO
CLORANILICO POR *Pseudomonas putida* TQ07.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

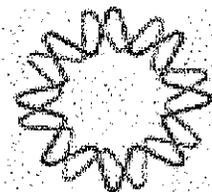
P R E S E N T A :

Q. F. B. LUIS GERARDO TREVIÑO QUINTANILLA

CUERNAVACA, MORELOS.

JUNIO 2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central

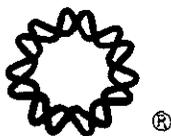


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Instituto de Biotecnología

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

Luis Gerardo Treviño Quintanilla

P r e s e n t e .

Por este conducto me permito informarle que la Comisión Académica acordó asignarle el siguiente jurado de examen para obtener el grado de Doctor en Ciencias.

Presidente:	Dra. Esperanza Martínez Romero
Secretario:	Dra. Gloria Soberón Chávez
Vocal:	Dra. Guadalupe Espín Ocampo
Vocal:	Dr. Miguel Angel Cevallos Gaos
Vocal:	Dr. Guillermo Gosset Lagarda
Suplente:	Dr. Rafael Vázquez Duhalt
Suplente:	Dr. Juan Miranda Ríos

Sin mas por el momento me es grato enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuernavaca, Mor. a 20 de marzo de 2002

Dr. Baltazar Becerril Luján
Coordinador de Docencia



TELS. (52) 56 22 76 00 TELS. (7) 329 16 00 FAX. 317 23 88
APDO. 510-3, CUERNAVACA, MORELOS 62250, MEXICO

**ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL DEPARTAMENTO
DE MICROBIOLOGÍA MOLECULAR DEL INSTITUTO DE
BIOTECNOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO, BAJO LA DIRECCIÓN DE LA
DRA. GLORIA SOBERÓN CHÁVEZ.**

DEDICATORIAS

*A MIS PADRES MARIA NOEMI Y RUBEN, POR SU APOYO, SU EJEMPLO
Y, SOBRE TODO, POR SU GRAN CARIÑO.*

*A MI ESPOSA CLARITA, POR DARLE A MI VIDA EL AMOR Y EL CARIÑO
QUE NECESITO, Y A MI PERSONA EL APOYO Y COMPRESION QUE ME
HACEN MEJOR,
GRACIAS MI AMOR POR ESTAR SIEMPRE A MI LADO.*

*A MI HIJO LUIS DAVID, POR HABER LLEGADO A DARLE LUZ A MI
VIDA Y POR BRINDARME EN CADA UNA DE TUS SONRISAS UNA
RAZON MAS PARA SEGUIR ADELANTE.*

*A MIS HERMANOS, POR SU GRAN APOYO Y POR ENSEÑARME QUE
NUESTRAS METAS SE ALCANZAN SOLAMENTE ESFORZANDONOS DIA
A DIA.*

*A TODOS MIS FAMILIARES, AMIGOS, Y MAESTROS QUE HAN
CONTRIBUIDO A LA FORMACION DE MI CARACTER Y QUE NO PODRIA
MENCIONAR INDIVIDUALMENTE.*

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Gloria Soberón Chávez por la confianza depositada en mi, por permitirme realizar este proyecto en su laboratorio, y por la ayuda que siempre me ha brindado. Gracias Gloria.

A los integrantes de mi comité tutorial: Dra. Gloria Soberón Chávez, Dr. Luis Servin González y Dr. Rafael Vázquez Duhalt, por sus valiosas sugerencias y aportaciones durante la realización del presente trabajo.

A los miembros del jurado de tesis: Dra. Esperanza Martínez Romero, Dra. Gloria Soberón Chávez, Dra. Guadalupe Espín Ocampo, Dr. Miguel Angel Cevallos Gaos, Dr. Guillermo Gosset Lagarda, Dr. Rafael Vázquez Duhalt y Dr. Juan Miranda Ríos por el tiempo y esfuerzo brindado a la adecuada presentación de esta tesis.

A todos mis compañeros del laboratorio, más que compañeros, amigos todos.

A Don Eduardo, Doña Mari y Margarita por su invaluable labor y su eterna sonrisa.

A PADEP y CONACyT por su apoyo económico para desarrollar este trabajo.

INDICE

1 RESUMEN	iii
2 ABSTRACT	v
3 INTRODUCCION	1
3.1 CONTAMINACION POR COMPUESTOS CLORADOS Y CAUSAS DE RECALCITRANCIA	1
3.2 ASPECTOS GENERALES SOBRE LA DEGRADACION DE COMPUESTOS AROMATICOS	2
3.2.1 VIA DEL β -CETOADIPATO Y VIA <i>ORTHO</i> MODIFICADA	4
3.2.2 VIA DE CORTE <i>META</i> -2,3	6
3.2.3 VIA DE CORTE 4,5 DEL PROTOCATECUATO	7
3.2.4 VIA DEL HIDROXIQUINOL	9
3.2.5 VIA DEL GENTISATO	10
3.3 REACCIONES BIOLOGICAS DE DESHALOGENACION	11
3.4 LAS QUINONAS COMO INTERMEDIARIOS DE LA DEGRADACION DE COMPUESTOS AROMATICOS	12
3.5 EL ACIDO CLORANILICO COMO CONTAMINANTE	14
3.6 LOCALIZACION DE LA ACTIVIDAD DEGRADATIVA	15
4 ANTECEDENTES	17
5 OBJETIVOS	19
6 MATERIALES Y METODOS	20
7 RESULTADOS Y DISCUSIONES	25
7.1 ARTICULO	25
7.2 CARACTERIZACION DE LOS ORF'S DEL FRAGMENTO <i>Pst</i> I DE 5kb.	
7.2.1 EL ORF1 CODIFICA PARA UN REGULADOR TRANSCRIPCIONAL DE LA FAMILIA <i>LysR</i>	26
7.2.2.EL ORF2 CODIFICA PARA UNA PIRONA HIDROLASA	28
7.2.3 EL ORF3 CODIFICA PARA UNA ALDOLASA	29
7.2.4 EL ORF4 CODIFICA PARA UNA PROTEINA DE FUNCION DESCONOCIDA	29
7.3 CARACTERIZACION DE LOS ORF'S DEL FRAGMENTO <i>Pst</i> I DE 2kb.	
7.3.1 EL ORF5 CODIFICA PARA UNA PROTEINA DE QUIMIOTAXIS ACEPTORA DE METILOS	30
7.4 CARACTERIZACION DE LOS ORF'S DEL FRAGMENTO <i>Pst</i> I DE 12kb.	
7.4.1 EL ORF6 Y EL ORF8 CODIFICAN PARA PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA "PORINAS"	31
7.4.2 EL ORF7 CODIFICA PARA UN TRASPORTADOR DE	

ACIDOS DICARBOXILICOS	31
7.4.3 EL ORF9 CODIFICA PARA UNA FAD-MONOOXIGENASA (CadA)	32
7.4.4 EL ORF10 CODIFICA PARA UNA PROTEINA HIPOTETICA	32
7.4.5 EL ORF11 CODIFICA PARA UNA ACETIL-CoA ACETIL TRANSFERASA	33
7.5 COMPLEMENTACION DE LAS MUTANTES Cad ⁻ CON EL COSMIDO pLG3020	34
7.6 LOCALIZACION DE LOS GENES DEGRADATIVOS	35
7.7 VIA HIPOTETICA DE LA DEGRADACION DE ACIDO CLORANILICO POR <i>Pseudomonas putida</i> TQ07	37
8 CONCLUSIONES	42
9 PERSPECTIVAS	44
10 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	45
11 ANEXO I	52

1 RESUMEN

Los compuestos aromáticos policlorados son moléculas recalcitrantes que causan serios problemas ambientales. En este trabajo utilizamos el ácido cloranílico (2,5-dicloro-3,6-dihidroxibenzo-1,4-quinona) como una molécula modelo para estudiar, a nivel molecular, la degradación de compuestos aromáticos. En un estudio previo, aislamos una bacteria que utiliza el ácido cloranílico como única fuente de carbono y de energía, y que identificamos como *Pseudomonas putida* (TQ07). A partir de esta cepa se aislaron y seleccionaron varias mutantes, incapaces de degradar el ácido cloranílico, mediante la inserción del transposón miniTn5lacZ2. La caracterización del sitio de inserción de seis de estas mutantes nos permitió la identificación de varios genes involucrados en la degradación de este compuesto. En particular, se caracterizó ampliamente la mutante cad26 en la cual identificamos el gen *cadA*, que codifica para una proteína que presenta una identidad significativa con FAD-monooxigenasas involucradas en la degradación de compuestos aromáticos y cloroaromáticos. El descubrimiento de que después de remplazar el alelo mutante con el silvestre, la cepa recupera totalmente el patrón de formación de halo y degradación de ácido cloranílico, asigna inequívocamente a CadA una función en la degradación de este compuesto. Sin embargo, su función específica se desconoce por el momento. Establecimos también que las seis inserciones en las mutantes incapaces de degradar ácido cloranílico están agrupadas en una región de 10-kb del genoma de *P. putida* que se encuentra codificada, al parecer, en una región inestable del ADN cromosomal. Además, caracterizamos parcialmente algunos otros genes presentes en 19-kb del cósmido pLG3020 que complementa a las 6 mutantes anteriores y que permite que *E. coli* HB101 forme halos incoloros en LB suplementado con ácido cloranílico. Algunos de estos genes son: 1) En la mutante cad82 encontramos la inserción en un gen que codifica para un regulador de la familia LysR, estas proteínas están involucradas en la regulación de varios procesos metabólicos incluyendo la degradación de compuestos aromáticos. 2) En la mutante cad50 encontramos la inserción en un gen que presenta identidad con la enzima pirona hidrolasa involucrada en la degradación del compuesto aromático protocatecuato. 3) Las mutantes cad58 y cad64 contienen sus inserciones, en un gen que presenta identidad con permeasas de membrana externa “porinas” que permiten el paso de compuestos hidrofílicos al espacio periplásmico y que en muchos organismos forman parte de operones involucrados en degradación de compuestos aromáticos. 4) La mutante cad78 presenta una inserción en un gen que tiene identidad con proteínas transportadoras de ácidos

dicarboxílicos. Por último, también se secuenciaron parcialmente otros cuatro genes en estas 19-kb que posiblemente están involucrados en la degradación de ácido cloranílico.

2 ABSTRACT

In this work, we used chloranilic acid (2,5-dichloro-3,6-dihydroxybenzo-1,4-quinone) as a model molecule to study at molecular level the degradation of aromatic compounds. In a previous work, we isolated a bacterium that uses chloranilic acid as the sole source of carbon and energy, and was later identified as *Pseudomonas putida* (TQ07). We isolated and selected several miniTn5lacZ2 transposon insertion mutants unable to degrade chloranilic acid. The insertion site characterization of six of these mutants led us to the identification of several genes involved in the degradation of this compound. In particular, we characterized cad26 mutant extensively, where we identified the *cadA* gene, it encoded for a protein that showed a low, but significant homology over the whole sequence with FAD-monoxygenases involved in the degradation of aromatic and chlorinated aromatic compounds. The finding that, after replacing the mutant allele with the wild-type one, the strain recovered the wild type pattern of halo formation and degradation of chloranilic acid unequivocally assigned at CadA a function in mineralization of this compound. However, in this moment we do not know its specific role in this catabolic pathway. We also found that the six insertions in the cad mutants unable to degrade chloranilic acid are clustered in a 10-kb region of *Pseudomonas putida* TQ07 genome that seems to be encoded in an unstable region of chromosomal DNA. Furthermore, we partially characterized others genes presented in 19-kb of the DNA fragment contained in pLG3020 cosmid that totally complement the six previous mutants and this cosmid permitted at *E. coli* HB101 to form colorless halos on LB plus chloranilic acid. These genes are: 1) in the cad82 mutant we found the insertion in a regulator protein of LysR family, these regulators are involved in the regulation of several metabolic processes, including the aromatic compounds degradation; 2) in the cad50 mutant we found the insertion in a gene that presented homology with the enzyme pyrone hydrolase involved in the protocatechuate degradation. 3) The cad58 and cad64 mutants have their insertions in a gene that presented identity with “permeases” of the outer membrane and in several bacteria formed part of operons involved in the aromatic compounds degradation. 4) The cad78 mutant has its insertion in a gene that presented homology with transporting proteins of C4-dicarboxylic acids. Finally, we also partially sequenced others four genes in this 19-kb fragment that possibly are involved in chloranilic acid degradation.

3 INTRODUCCION

3.1 CONTAMINACION POR COMPUESTOS AROMATICOS CLORADOS Y CAUSAS DE RECALCITRANCIA.

La contaminación de la biosfera con compuestos aromáticos clorados es global. Este tipo de contaminación se genera principalmente por tres fuentes: 1) por el uso de compuestos cloroaromáticos como herbicidas, plaguicidas, solventes, lubricantes y plastificantes; 2) como subproducto del blanqueado de pulpa de papel con hipoclorito; y 3) a través de la incineración de productos químicos (Hägglom 1990). Estos compuestos no son fácilmente biodegradados y se acumulan en el ambiente, provocando finalmente problemas de toxicidad en el ser humano, por la biomagnificación de estos compuestos recalcitranes a través de la cadena alimenticia (Atlas y Bartha 1993).

Existen muchas razones para que un compuesto orgánico clorado presente resistencia a la degradación (Alexander 1981). Algunas de las causas estructurales asociadas a la recalcitranca son: la estabilidad del enlace carbono-halógeno, efectos alostéricos, grado de halogenación y posición de los átomos de halógeno sobre el compuesto. Otros factores, más relacionados con la interacción de los microorganismos con el xenobiótico son: la incapacidad del microorganismo para introducir el compuesto a la célula por falta de permeasas adecuadas, la incapacidad para metabolizar el compuesto debido a su insolubilidad o fenómenos de adsorción con componentes del suelo y toxicidad del compuesto original o sus productos metabólicos (Atlas y Bartha 1993). Además, ciertos compuestos que son fácilmente degradados en un ambiente son persistentes en otro, debido a factores ambientales tales como tipo y número de microorganismos presentes, disponibilidad de oxígeno, concentración del xenobiótico, nutrientes, luz, pH y temperatura.

A pesar de todo lo anterior se han aislado muchos microorganismos que utilizan eficientemente compuestos aromáticos clorados como su única fuente de carbono y de energía, entre estos se encuentran: *Sphingomonas (Pseudomonas) paucimobilis* UT26 (Senoo y Wada 1989) que utiliza hexaclorocicloexano, *Xanthobacter flavus* 14p1 (Spiess et al. 1995) que utiliza 1,4-diclorobenzeno, *Azotobacter* sp. GP1 (Li et al. 1991) que utiliza

ácido 2,4-diclorofenoxiacético, *Streptomyces rochei* 303 (Golovleva et al. 1992) que utiliza 2,6-diclorofenol, *Alcaligenes eutrophus* JMP134 (Don y Pemberton 1981) que utiliza 3-clorobenzoato, *Sphingomonas (Flavobacterium) chlorophenolica* ATCC 39722 (Saber y Crawford 1985) que utiliza pentaclorofenol y *Acromobacter* sp. (Ahmed y Focht 1973) que utiliza policlorobifenilos.

Usualmente, estas bacterias catalizan la degradación aeróbica de compuestos aromáticos clorados mediante un número limitado de vías metabólicas, se dividen en dos clases: cepas que degradan compuestos mono y dicloro substituidos pero no utilizan productos más halogenados y cepas que exclusivamente degradan compuestos altamente halogenados (Hägglom 1990).

3.2 ASPECTOS GENERALES SOBRE LA DEGRADACION DE COMPUESTOS AROMATICOS.

En las bacterias, las vías catabólicas aeróbicas para la degradación de hidrocarburos aromáticos pueden esquematizarse en dos pasos bioquímicos mayoritarios. Primero, las reacciones tempranas, también llamadas vías superiores o rutas periféricas, que canalizan a los hidrocarburos hacia la formación de intermediarios aromáticos parcialmente oxidados. En estas vías se producen las moléculas aromáticas di y trihidroxiladas que pueden sufrir el corte del anillo aromático. Estas moléculas se procesan posteriormente por las vías o rutas inferiores para producir compuestos que puedan entrar al ciclo de los ácidos tricarbóxicos. A pesar de que existe una amplia variedad de rutas periféricas para la oxidación de diferentes hidrocarburos aromáticos, solo se conoce un número limitado de compuestos di y trihidroxilados que pueden cortarse y procesarse productivamente para entrar al ciclo de ácidos tricarbóxicos (Van der Meer 1997).

Un buen ejemplo de lo anterior está representado por la diversidad de vías catabólicas de tolueno. El tolueno se oxida mediante diferentes rutas: por la oxidación progresiva del grupo metilo (vía TOL), por dioxigenación del anillo, o por monooxigenación del anillo aromático en diferentes posiciones. Muchas de estas vías producen (metil)catecol que se procesa mediante la vía de corte *meta*. Los genes que codifican para las vías superior e

inferior pueden agruparse en uno, dos o más operones independientes coordinadamente regulados (Hardman 1991).

La degradación microbiana de compuestos aromáticos tiene un significado práctico de gran importancia. Además del problema, de contaminación ambiental por hidrocarburos aromáticos tóxicos, una gran cantidad de material aromático entra a la biosfera por fuentes naturales. El polímero aromático complejo lignina es la segunda fuente de la biomasa sobre la tierra, el reciclado de éste y otros materiales aromáticos derivados de las plantas es un componente vital del ciclo del carbono del planeta. La energía de resonancia que estabiliza los enlaces carbón-carbón de los anillos aromáticos presenta a los microorganismos un reto bioquímico significativo. Se han aislado microorganismos aeróbicos y anaeróbicos que degradan compuestos aromáticos, pero se conoce mucho más sobre las vías aeróbicas. En general, la degradación procede en dos fases. Primero, un compuesto aromático es preparado para el corte del anillo por una variedad de reacciones de modificación del anillo. De las diversas vías que han sido identificadas, todas tienen en común un paso de mono- o dioxigenación que resulta en la formación de un anillo bencénico dihidroxilado. La segunda fase de degradación incluye la fisión del anillo y las reacciones subsecuentes que conducen a la generación de intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos. La fisión del anillo se cataliza por dioxigenasas y se llama corte-*ortho* cuando ocurre entre los grupos hidroxilo (corte intradiol) y corte-*meta* cuando ocurre junto a uno de los hidroxilos (corte extradiol). Una tercera vía aeróbica de corte del anillo, la vía del gentisato, se utiliza cuando los dos grupos hidroxilo sobre el anillo aromático están en posición *para* con respecto uno al otro, y el corte ocurre entre el carbono con el sustituyente carboxilo y el carbono hidroxilado adyacente. Una cuarta vía ha sido caracterizada recientemente, la vía de los hidroxiquinoles, es similar a la de corte-*ortho* ya que la fisión del anillo es igual pero en este caso debe existir un tercer hidroxilo en el anillo aromático en posición *para* con respecto a alguno de los otros dos. De las cuatro vías, las mejor estudiadas son la vía de corte-*ortho*, la de corte-*meta* y la de los hidroxiquinoles (Reineke 1998).

El potencial de los microorganismos para degradar contaminantes ambientales, muchos de los cuales se han introducido recientemente a la naturaleza, es muy grande. Es intrigante determinar cuantas vías metabólicas diferentes se han desarrollado en las

bacterias y si nuevas capacidades están surgiendo todavía para permitir a los microorganismos utilizar compuestos que nunca antes habían encontrado.

Comprender los diferentes procesos genéticos que participan en el desarrollo de las vías de cloroaromáticos, en particular, sería de gran valor para entender la evolución de las vías metabólicas en general (Chakrabarty 1996).

3.2.1 VIA DEL β -CETOADIPATO Y VIA DE CORTE *ORTHO* MODIFICADA.

La vía del β -cetoadipato está ampliamente distribuida entre diversas eubacterias y hongos. Esta casi siempre codificada en el cromosoma y juega un papel central en el procesamiento y degradación de compuestos aromáticos naturales derivados de la lignina y otros compuestos de las plantas, así como en la degradación de algunos contaminantes ambientales. Esta vía con frecuencia coexiste en bacterias con vías-*meta* codificadas en plásmidos y está también presente en cepas bacterianas que degradan compuestos aromáticos clorados por medio de vías modificadas de corte-*ortho* codificadas en plásmidos. Esto se debe a que los pasos finales de la degradación completa de los clorocatecoles están catalizados por las dos enzimas finales de la vía del β -cetoadipato (Harwood y Parales 1996).

El análisis de la secuencia de ADN y estudios enzimáticos indican que la rama del catecol de la vía del β -cetoadipato es el precursor evolutivo de, al menos, una porción de las vías modificadas de corte *ortho* para la degradación de clorocatecoles. Esto es cierto, en el caso de los dos pasos iniciales de estas vías, catalizados por la catecol 1,2-dioxigenasa y la cicloisomerasa (Fig. 1). La cloromuconato cicloisomerasa cataliza la decloración y formación de dienolactonas. En el caso de la vía del β -cetoadipato, la correspondiente enol-lactona se genera en dos pasos enzimáticos catalizados por la muconato cicloisomerasa y la muconolactona isomerasa. Las enzimas que catalizan el paso de hidrólisis de la lactona muestran diferencias significativas, y el paso final de las vías *ortho* modificadas, catalizado por la maleilacetato reductasa, no presenta ninguna contraparte en la vía del β -cetoadipato (Harwood y Parales 1996).

Además de la estrecha relación estructural entre las catecol 1,2-dioxigenasas de tipo I (que actúan principalmente sobre catecoles no modificados) y de tipo II (que actúan sobre clorocatecoles), la muconato y cloromuconato cicloisomerasa están estrechamente relacionadas, mostrando una identidad del orden de 40% a nivel de amino ácidos. A pesar de su estrecha similitud estructural, las cicloisomerasas difieren en su especificidad al sustrato y en su habilidad de deshalogenación (Schlömman 1994).

Aunque en un principio se pensaba que la dienolactona hidrolasa de la vía *ortho* modificada y la enol-lactona hidrolasa de la vía de β -ceto adipato estaban estrechamente relacionadas, sus secuencias muestran que este no es el caso, los dos grupos de enzimas no presentan identidad obvia a nivel de amino ácidos. Sin embargo, una inspección cuidadosa de las secuencias sugiere que las enol-lactona hidrolasas tienen características indicativas de hidrolasas con plegamiento α/β , un grupo al cual pertenece la dienolactona hidrolasa (Ollis et al. 1992). Las dienolactona hidrolasas catalizan la formación de maleilacetatos, que son convertidos a β -ceto adipato por las maleilacetato reductasas (Kasberg et al. 1995). Cuando son tomados en conjunto, la comparación de secuencias y los datos enzimáticos sugieren que ambas vías están evolutivamente relacionadas.

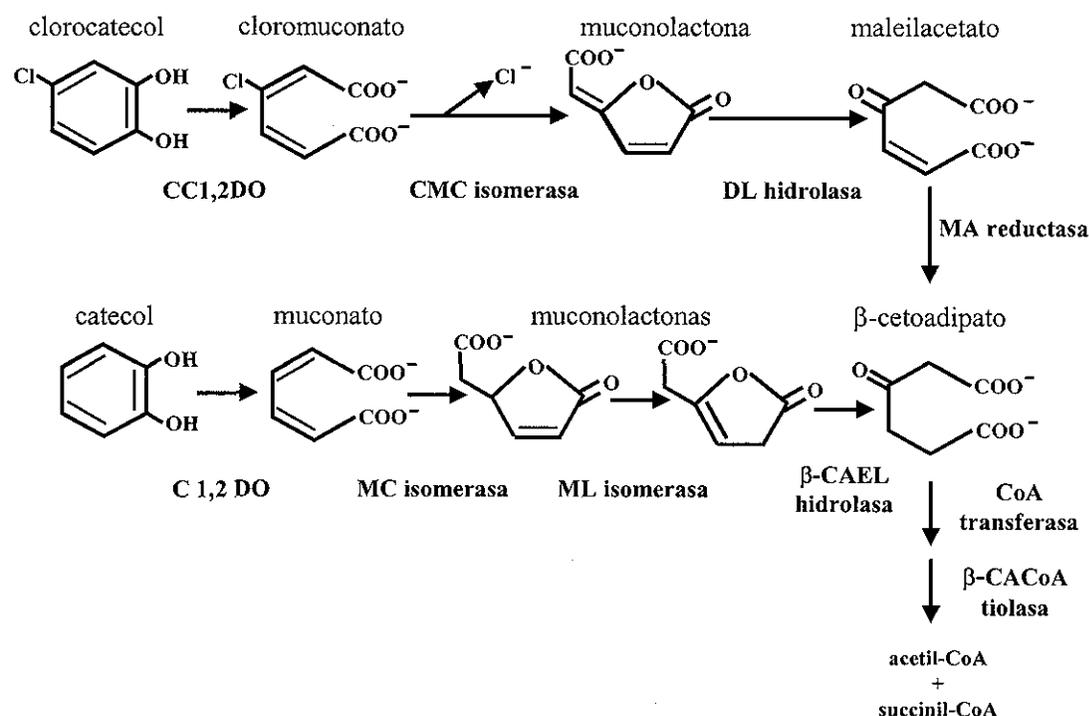


Figura 1. Vía *ortho*-modificada y vía del β -ceto adipato.

Es importante también puntualizar que el uso de clorocatecoles como fuentes de carbón y energía por las bacterias requiere la síntesis de al menos dos enzimas de la vía del β -cetoadipato, la β -cetoadipato:succinil-CoA transferasa y la β -cetoadipil-CoA tiolasa. Así las vías *ortho* modificadas, todas las cuales son codificadas en plásmidos, dependen de la presencia de la vía del β -cetoadipato en la cepa huésped para funcionar (**Fig. 1**).

3.2.2 VIA DE CORTE *META*-2,3.

En la cepa de *Pseudomonas* sp. CF600 (Shingler et al. 1992), una bacteria que degrada fenol por vía *meta*, los genes de la fenol hidroxilasa (PH) y la catecol 2,3-dioxigenasa (C23O) están acompañados por aquellos que codifican las enzimas de la vía *meta*, por ejemplo: la 2-hidroxiacetoacético semialdehído deshidrogenasa (HMSD), la 2-hidroxiacetoacético semialdehído hidrolasa (HMSH), la 2-oxopent-4-dienoato hidratasa (OEH), la acetaldehído deshidrogenasa (acilación) (ADA), la 4-hidroxi-2-oxovalerato aldolasa (HOA), la 4-oxalocrotonato descarboxilasa (4OD) y la 4-oxalocrotonato isomerasa (4OI) (**Fig. 2**). Hay dos rutas para la conversión del 2-hidroxiacetoacético semialdehído al 2-oxopent-4-dienoato; una es la rama hidrolítica catalizada por la HMSH y la otra es la rama del 4-oxalocrotonato catalizada por la HMSD, la 4OD y la 4OI. La rama hidrolítica se requiere para la degradación del 2- o 3-metilfenol y la rama del 4-oxalocrotonato se requiere para la degradación de fenol y 4-metilfenol (**Fig. 2**). Los genes para todas las enzimas de la vía *meta* de la cepa CF600 (*dmpKLMNOPQBCDEFGHI*) se transcriben como un operón extremadamente largo (Shingler 1996). La expresión de este operón se regula por un activador transcripcional sensible a fenol, DmpR, cuyo gen se transcribe divergentemente de *dmpK*.

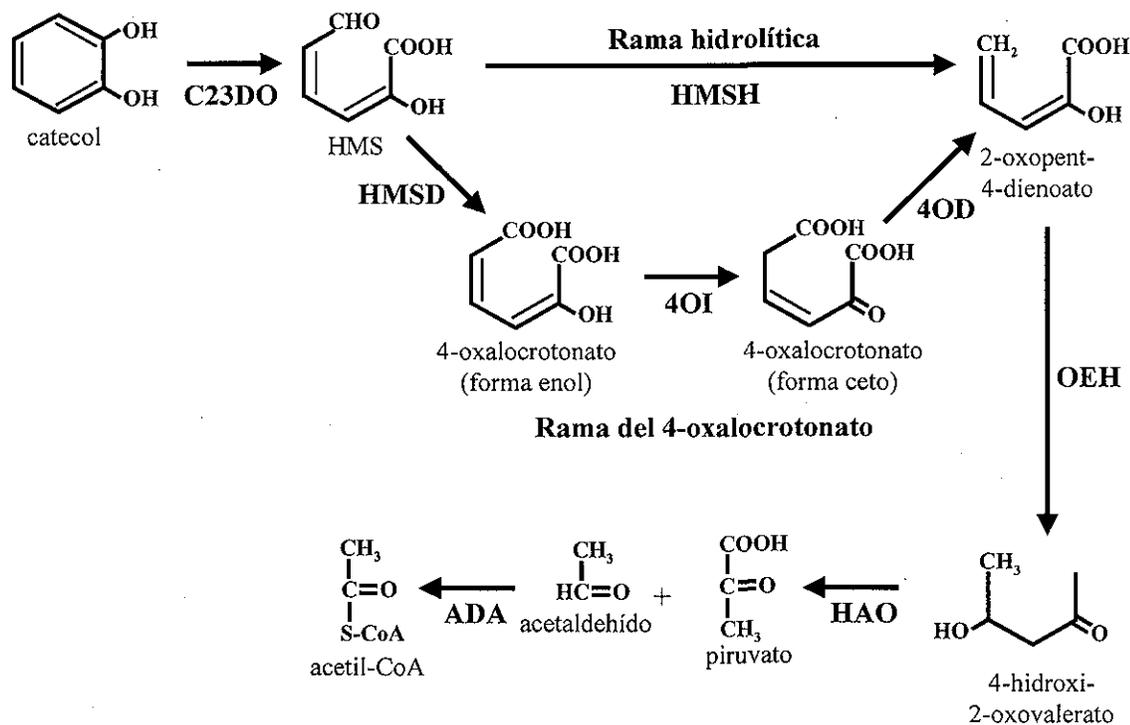


Figura 2. Vía de corte-*meta* 2,3.

3.2.3 VIA DE CORTE 4,5 DEL PROTOCATECUATO.

El protocatecuato (PCA) es uno de los metabolitos intermedarios más importante en las vías bacterianas para el catabolismo de varios compuestos fenólicos, incluyendo la lignina, que es el material aromático más abundante en la naturaleza. *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6 es capaz de degradar una amplia variedad de dímeros de lignina incluyendo β -aril eter, bifenilo, y diarilpropano (Masai et al. 1991). Se espera que las enzimas de degradación de lignina sean herramientas útiles para la utilización de lignina como biomasa. El dímero de lignina guayacil (4-hidroxi-3-metoxifenil) se convierte a PCA por la acción de varias enzimas de degradación de lignina, que incluye a la β -eterasas (LigF y LigE) (Masai et al. 1993), a las dioxigenasas que cortan anillos de los bifenilos (LigZ) (Peng et al. 1998), y a las desmetilasas para el ácido 5,5'-deshidrodivainillico (LigX) y al ácido vainillico (LigH) (Nishikawa et al. 1998). Así, el PCA es el metabolito intermedario clave en la vía de degradación de lignina en *S. paucimobilis* SYK-6 y la vía metabólica del PCA juega un papel clave en la degradación de este polímero por esta cepa. Se sabe que generalmente el anillo aromático del PCA se corta en reacciones catalizadas por tres clases

diferentes de dioxigenasas: PCA 3,4-dioxigenasa (3,4-PCD) (Frazee et al. 1993), PCA 4,5-dioxigenasa (4,5-PCD) (Noda et al. 1990), y PCA 2,3-dioxigenasa (2,3-PCD) (Wolgel et al. 1993). De estas dioxigenasas, la 3,4-PCD es la enzima más caracterizada y participa en una vía *ortho* clásica. Los genes de la vía del β -cetoadipato, incluyendo a la 3,4-PCD, se han caracterizado en detalle en *Acinetobacter calcoaceticus*, *Pseudomonas putida* y *Agrobacterium tumefaciens* (Harwood et al. 1996).

En el caso de *S. paucimobilis* SYK-6, el PCA es sujeto al corte del anillo por la 4,5-PCD y se metaboliza a través de la vía de corte 4,5 del PCA propuesta anteriormente (Kersten et al. 1982) (Fig. 3). La 4,5-PCD cataliza el corte 4,5 del PCA para formar 4-carboxi-2-hidroxi-6-semialdehído (CHMS), que se convierte mediante una reacción no enzimática en un hemiacetal intramolecular y entonces se deshidrogena por la CHMS deshidrogenasa. El intermediario resultante, el ácido 2-pirona-4,6-dicarboxílico (PDC), se hidrolisa por la PDC hidrolasa para producir el ácido 4-oxalomesaconico (OMA) o su tautomero el ácido 4-carboxi-2-hidroxi-6-semialdehído (CHM). El OMA se convierte a ácido 4-carboxi-4-hidroxi-2-oxoadipico (CHA) por la OMA hidratasa. Finalmente, el CHA se corta por la acción de la CHA aldolasa para producir piruvato y oxaloacetato (Masai et al. 1999) (Fig. 3).

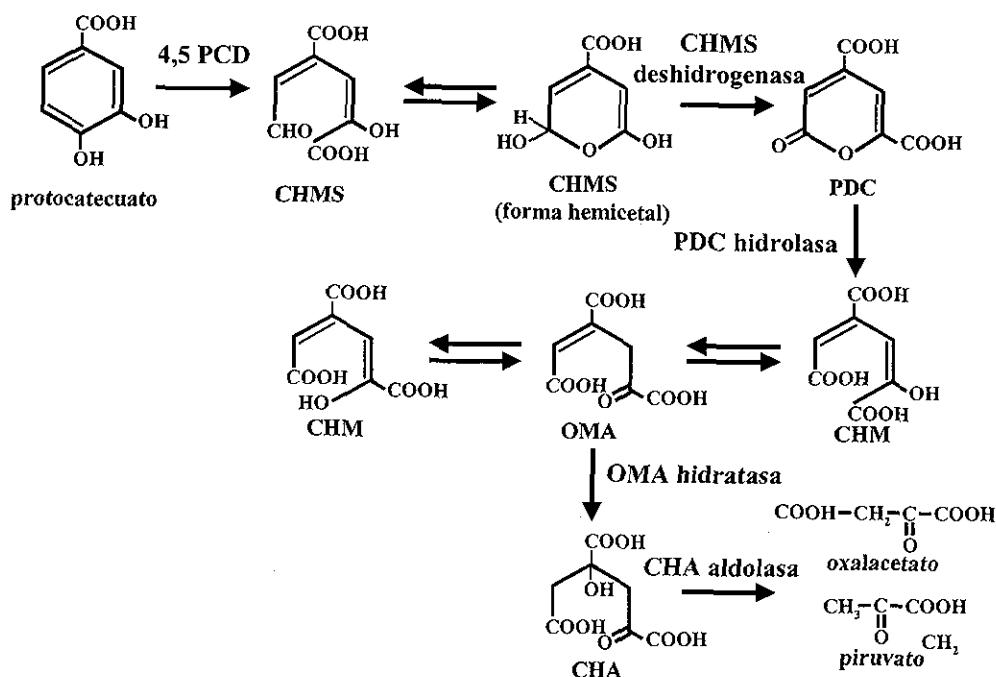


Figura 3. Vía de corte 4,5 del Protocatecuato.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.2.4 VIA DEL HIDROXIQUINOL.

La vía degradativa del hidroxiquinol se ha reportado solo en pocos microorganismos. La mejor caracterizada es la reportada en *Sphingomonas* sp. RW1 (Armengaud et al. 1999). El hidroxiquinol, es cortado por la DxnF (hidroxiquinol) dioxigenasa generando el 3-hidroxi-*cis,cis*-muconato (maleilacetato), que es entonces reducido por la DxnE (maleilacetato) reductasa a 3-oxoadipato. Este compuesto se convierte por el complejo DxnGH de las subunidades α y β de la 3-oxoadipato succinil-CoA transferasa a 3-oxoadipil-CoA, que es posteriormente cortado por DxnI una acetil-CoA acetiltransferasa (tiolasa) generando succinil-CoA y acetil-CoA (Fig. 4). Esta vía también está presente en otros microorganismos. Una vía similar se identificó en *Burkholderia cepacia* AC1100 como la vía inferior del catabolismo del ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (Daubaras et al. 1995 y 1996; Zaborina et al. 1998). En la degradación del 2,4,6-triclorofenol por *Azotobacter* sp. GP1 se han caracterizado solo a escala bioquímica sus enzimas (Latus et al. 1995), al igual que en *Streptomyces rochei* 303 en la que se ha purificado y caracterizado la enzima 6-clorohidroxiquinol 1,2-dioxigenasa que acepta como sustrato mejor al 6-clorohidroxiquinol que al hidroxiquinol (Zaborina et al. 1995). Por último, se cree que esta vía es activa en el catabolismo de pentaclorofenol (Golovleva et al. 1992; Uotila et al. 1995).

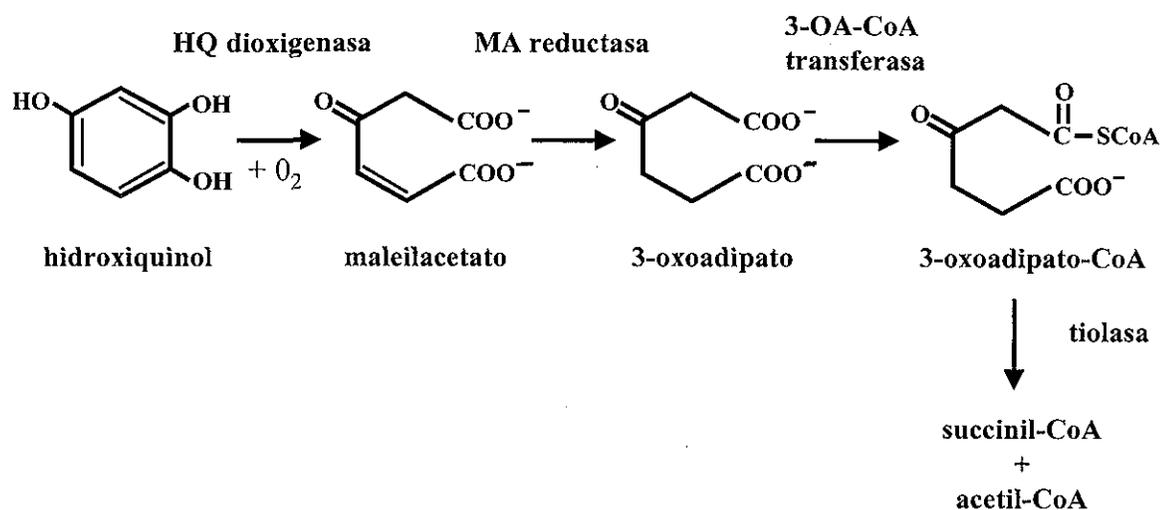


Figura 4. Vía del hidroxiquinol.

El hecho de que los genes *dxnEFGHI*, que especifican la vía del hidroxiquinol, están localizados justo río abajo del *locus* que codifica la vía de degradación superior para las dibenzo-p-dioxinas y los dibenzofuranos, probablemente no es fortuita y plantea el posible papel del hidroxiquinol como un intermediario central en la degradación de estos compuestos bicíclicos (Armengaud et al. 1999).

3.2.5 VIA DEL GENTISATO.

La vía del gentisato (2,5-dihidroxibenzoato), en la cual un anillo aromático *p*-dihidroxilado se corta oxidativamente, puede parecer una ruta muy poco común para el catabolismo de compuestos aromáticos en bacterias, en comparación con las vías más extensivamente estudiadas de catecoles (*o*-dihidroxibenzenos). Sin embargo, el gentisato y los gentisatos sustituidos sirven como intermediarios claves en las vías aeróbicas para el metabolismo de un gran número de compuestos aromáticos, incluyendo al 3-hidroxibenzoato, fenoles sustituidos, salicilato, 3,6-dicloro-2-metoxibenzoato, y naftaleno (Zhou et al. 2001). El corte del anillo del gentisato lo cataliza la gentisato 1,2-dioxigenasa (GDO; EC1.13.11.4) para formar maleilpiruvato (Lack 1959). La conversión posterior del maleilpiruvato a metabolitos centrales se lleva a cabo por dos rutas: 1) por hidrólisis directa por una maleilpiruvato hidrolasa que genera piruvato y maleato (Bayly et al. 1980) o 2) isomerización a fumarilpiruvato y subsecuente hidrólisis que genera fumarato y piruvato (Robson et al. 1996). La primera caracterización molecular de toda la vía del gentisato (Zhou et al. 2001) se reportó para la cepa de *Ralstonia* sp. U2. Río abajo de los genes que codifican para la conversión de naftaleno a gentisato existe un conjunto de genes (*nagJKLMN*) que probablemente se cotranscriben con los 12 genes anteriores como un operón largo. Tres de estos genes *nagIKL* codifican las enzimas involucradas en el catabolismo de gentisato a fumarato y piruvato. NagI es una gentisato 1,2-dioxigenasa, NagL es la maleilpiruvato isomerasa y NagK es una fumarilpiruvato hidrolasa (Fig. 5). De los otros tres genes (*nagJMN*) no se conocen sus funciones específicas.

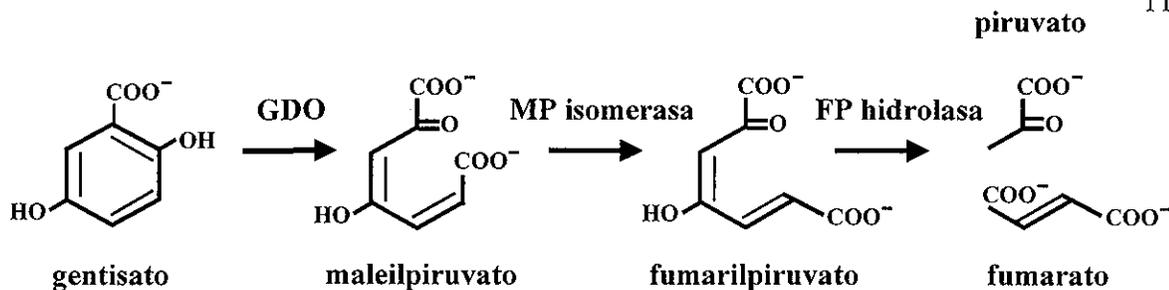


Figura 5. Vía del Gentisato.

3.3 REACCIONES BIOLÓGICAS DE DESHALOGENACIÓN.

En general, las bacterias catalizan el corte del enlace carbono-halógeno a través de cuatro mecanismos generales (Fig. 6) (Wackett 1994). El mecanismo hidrolítico produce el remplazo neto de un sustituyente halógeno por un grupo hidroxilo derivado del agua. Muchas enzimas de deshalogenación bacterianas conocidas utilizan este tipo de mecanismo.

La segunda clase de enzimas que llevan a cabo la deshalogenación son las oxigenasas y este mecanismo se denomina oxigenolítico u oxidativo. Muchas de las reacciones de deshalogenación catalizadas por oxigenasas son reacciones no específicas o gratuitas. Esto significa que la producción de las oxigenasas bacterianas no se induce por los compuestos halogenados que son oxidados finalmente. En muchos ejemplos las bacterias que producen las oxigenasas no pueden utilizar los compuestos halogenados como una fuente de carbono y de energía. Este tipo de metabolismo se conoce como cooxidación o cometabolismo y tiene gran importancia en la biodegradación de compuestos haloorgánicos.

La deshalogenación reductiva de un carbono unido a un átomo de cloro ocurre mediante la introducción neta de dos electrones y dos protones lo que genera un enlace carbono-hidrógeno y ácido clorhídrico. La deshalogenación reductiva es importante en la eliminación de compuestos altamente halogenados, debido, a que es la única reacción que ataca inicialmente a este tipo de compuestos.

El cuarto mecanismo de deshalogenación es mediado por reacciones de eliminación. Dos tipos de reacciones de eliminación se muestran en la Fig. 6. Las primeras ocurren con la eliminación de un protón y un átomo de halógeno del carbono adyacente para generar una

oleofina y un haluro de hidrógeno. Las segundas se caracterizan por la pérdida de dos átomos de halógeno vecinales para generar una oleofina y una molécula de halógeno. El primer tipo de reacción de eliminación se ha observado en el metabolismo de plaguicidas clorados tales como lindano (γ -hexaclorociclohexano) y DDT.

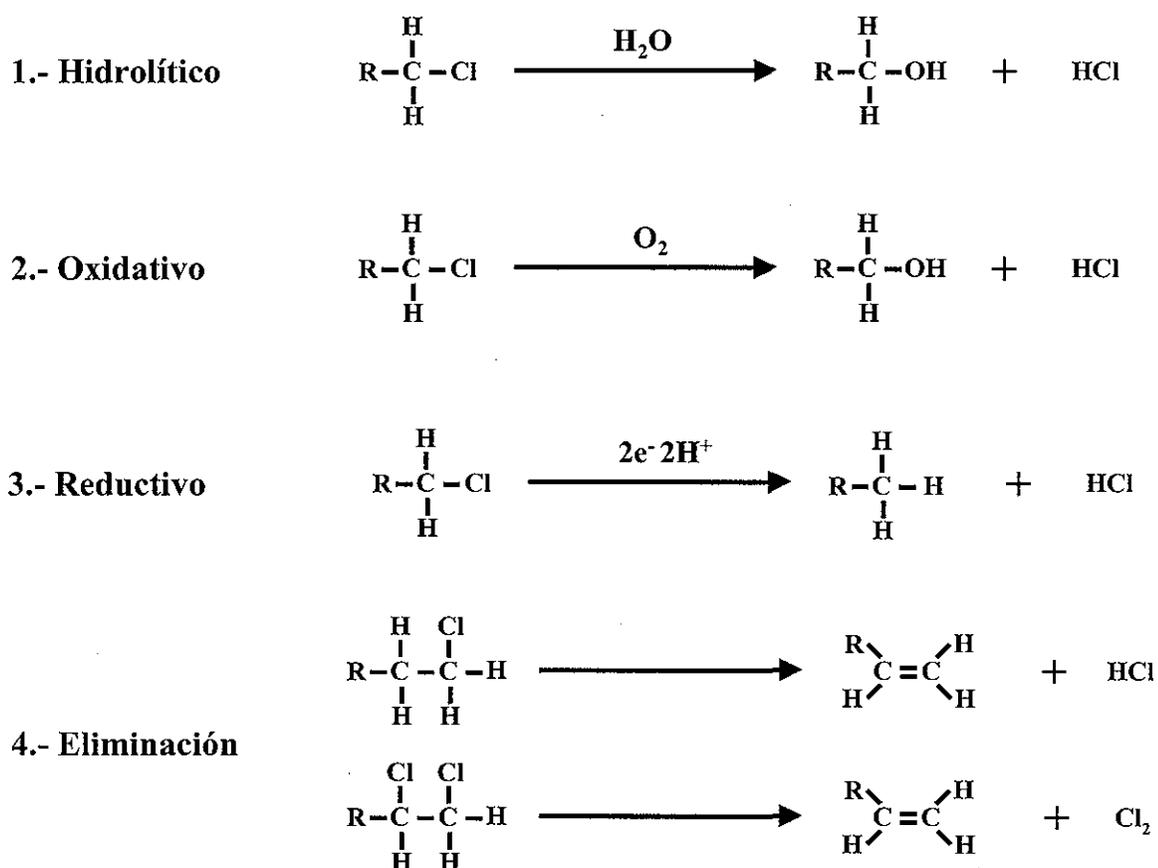


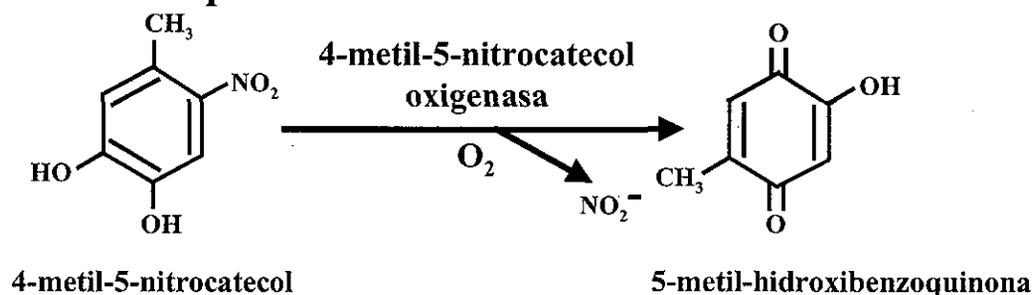
Figura 6. Mecanismos generales de las reacciones biológicas de deshalogenación.

3.4 LAS BENZOQUINONAS COMO INTERMEDIARIOS DE LA DEGRADACION DE COMPUESTOS AROMATICOS.

En este estudio elegimos como compuesto modelo al ácido cloranílico debido a dos razones: primero, en los reportes iniciales sobre la degradación de compuestos aromáticos clorados o nitrogenados se menciona, en muchos de ellos, que durante la degradación de éstos compuestos o bajo ciertas condiciones se generaba algún producto en el medio de cultivo que le proporcionaba una coloración púrpura o roja. Steiert y Crawford, en 1986,

reportaron que durante la degradación de pentaclorofenol por *Flavobacterium* sp., que crecía sobre glutamato bajo condiciones de limitación de hierro, un metabolito púrpura se acumulaba en el medio de cultivo y que la adición del agente reductor ditionito de sodio, permitió la desaparición del color púrpura, lo que les indicó la presencia de una quinona. Rakesh y colaboradores, en 1994, encuentran que durante la degradación de *p*-nitrofenol por la cepa mutante JS1490 de *Arthrobacter* sp. se acumula un compuesto de color rojo. El análisis por HPLC de éste metabolito reveló la presencia de 1,2,4-benzenetriol y de hidroxí-1,4-benzoquinona. La mutante PT88 de la cepa *Burkholderia cepacia* AC1100 acumula 5-clorohidroxiquinol que se oxida espontáneamente a 5-clorohidroxi-1,4-benzoquinone que presenta una color rojo cuando crece en presencia de glucosa y ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (Sangodkar et al. 1988; Daubaras et al. 1995). Hasta este momento los reportes parecían indicar que las benzoquinonas coloreadas aparecían solo por la oxidación espontánea de los hidroxiquinoles. Posteriormente, se estableció que en algunos casos las benzoquinonas son parte del metabolismo de compuestos aromáticos. Haigler y colaboradores, en 1996, establecieron el primer ejemplo en el que una benzoquinona la 2-hidroxi-5-metil quinona forma parte de la vía metabólica de *Burkholderia* sp. DNT en la degradación de 2,4-dinitrotolueno al purificar la enzima 4-metil-5-nitrocatecol oxigenasa que genera éste compuesto (**Fig. 7 A**). Zaborina y colaboradores, en 1998, reportaron una nueva vía para la conversión de clorohidroxiquinol a maleilacetato en *Burkholderia cepacia* AC1100. En éste reporte mencionan que la cepa convierte el 5-clorohidroxiquinol mediante una 5-clorohidroxiquinol deshalogenasa en hidroxibenzo quinona, que posteriormente se reduce mediante una hidroxibenzo quinona reductasa a hidroxiquinol “1,2,4-benzentriol” (**Fig. 7 B**). El segundo punto es que las benzoquinonas presentan una coloración rojiza en solución acuosa que facilita el aislamiento e identificación de cepas involucradas en la degradación de este tipo de compuestos, además, la formación de halos incoloros en torno a las colonias que crecen en medios sólidos suplementados con benzoquinonas (**Fig. 2, Artículo**) permiten el estudio molecular de la degradación al emplear este fenotipo.

A) *Burkholderia* sp. DNT



B) *Burkholderia cepacia* AC1100

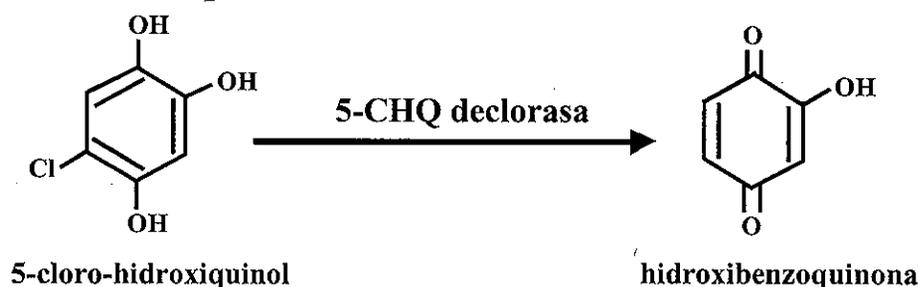


Figura 7. Formación de quinonas como intermediarios en la degradación de compuestos aromáticos.

3.4 EL ACIDO CLORANILICO COMO CONTAMINANTE AMBIENTAL.

El ácido cloranílico (2,5-dicloro-3,6-dihidroxibenzo-1,4-quinona) es una quinona que presenta en solución acuosa un color violeta-rojizo, y que cuando se reduce tiene una estructura similar a la de los intermediarios de la vía de chlorohidroxiquinoles (Steier y Crawford 1986) (Fig. 8). El ácido cloranílico se ha identificado como el producto final mayoritario de la fotólisis del pentaclorofenol en solución acuosa (Wong y Crosby 1978). Este compuesto se genera muy eficientemente por hidrólisis alcalina a partir del tetracloro-p-benzoquinol, un intermediario de la degradación de pentaclorofenol (Budavari 1996). También, se ha identificado como un subproducto en diferentes clases de efluentes del blanqueado de pulpa de papel en concentraciones comparables con aquellas de los más abundantes cloroguaiacoles y clorocatecoles (Remberger et al. 1991). La persistencia del ácido cloranílico, así como, su susceptibilidad a la degradación microbiana en ambientes

acuosos se desconoce, pero su recuperación de efluentes tratados mediante un sistema biológico convencional sugiere que no se degrada fácilmente bajo éstas condiciones (Remberger et al. 1991). Una característica química interesante del ácido cloranílico es que forma sales estables con cationes metálicos, por lo que se utiliza ampliamente para la detección espectrofotométrica de metales (Hart 1961). La coloración que presenta el ácido cloranílico en solución acuosa hace a este compuesto cloroaromático una molécula muy útil para el aislamiento de microorganismos capaces de degradarlo y facilita el estudio de su vía metabólica (Fig. 8).

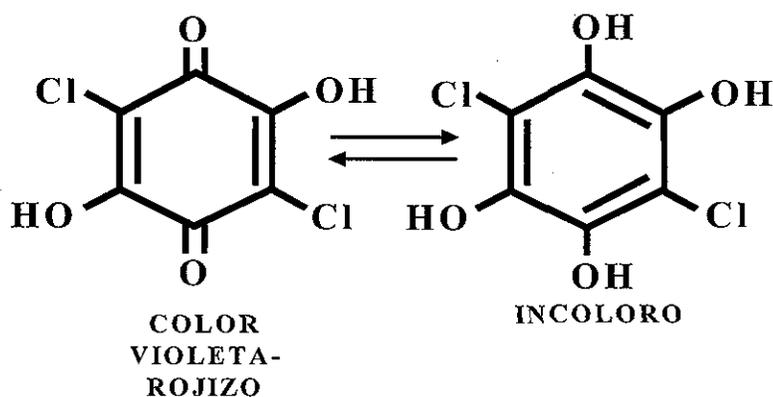


Figura 8. El equilibrio químico de las quinonas.

3.5 LOCALIZACION DE LA ACTIVIDAD DEGRADATIVA.

La localización de los genes catabólicos involucrados en la mineralización de un amplio grupo de compuestos orgánicos (hidrocarburos alifáticos o aromáticos, terpenos, alcaloides y compuestos alifáticos o aromáticos clorados) es muy diversa. Una característica común a todas estas actividades es la capacidad que presentan de ser transferidas de una cepa donadora a diferentes bacterias receptoras. Hoy se sabe que existen tres diferentes formas de movilizar estos genes. La más caracterizada es la que involucra plásmidos degradativos, como son: el plásmido pWWO (familia TOL) de *Pseudomonas putida* mt-2 de 117-kb involucrado en la degradación de xileno y tolueno a través de la vía de corte *meta* 2,3 (Franklin et al. 1981), el pJP4 de 83-kb de *Ralstonia (Alcaligenes) eutrophus* JMP134 que participa en el metabolismo del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (Perkins et al. 1990) y el pAC27 de 110-kb de *Pseudomonas putida* AC25 que contiene los

genes para la mineralización de 3-clorobenceno (Ghosal y You 1989). Otra forma de transferencia es mediante transposones catabólicos que pueden pertenecer a diferentes clases de transposones bacterianos. Por ejemplo, los de la clase I donde los genes están delimitados por un par de secuencias IS, el transposón Tn5280 contiene los genes de la clorobenceno dioxigenasa en el plásmido pP51 de *Pseudomonas* sp. P51 estos genes codifican la enzima que convierte el clorobenceno a clorocatecol (Van der Meer et al. 1991). Un buen ejemplo de los transposones clase II que pertenecen a la familia Tn3 es el transposón que codifica para la degradación de naftaleno en el plásmido NAH7 de *Pseudomonas putida* G7 (Tsuda e Iino 1990). Por último existen elementos cromosomales conjugativos que emplean integrasas similares a las de los fagos para su movilidad. Por ejemplo, el elemento *clc* de 105-kb involucrado en la degradación de clorocatecol en *Pseudomonas* sp. B13 (Ravath et al. 1998; Van der Meer et al. 2001) y el elemento de 90-kb *bph-sal* que contiene genes para el catabolismo de bifenilo y salicilato en *Pseudomonas putida* KF715 (Nishi et al. 2000). El elemento *clc* de *Pseudomonas* sp. B13 se integra en un tRNA de glicina y puede existir brevemente como un intermediario circular que originalmente fue caracterizado como el plásmido degradativo pB13 (Chatterjee y Chakrabarty 1983).

4 ANTECEDENTES

Antes de iniciar este trabajo, aislamos e identificamos parcialmente una bacteria capaz de utilizar como única fuente de carbono y de energía el ácido cloranílico (AC). Para obtener éste microorganismo utilizamos diferentes muestras ambientales y establecimos la degradación observando la desaparición del color característico violeta-rojizo del AC en un medio mineral. Las muestras utilizadas fueron: lodos activados de plantas de tratamiento convencionales, tierra de suelos contaminados con hidrocarburos y aserrín de un aserradero del noroeste de México (Durango). El aserrín fue la única muestra que presentó decoloración y actividad degradativa contra AC (**Fig. 9**). De esta muestra aislamos una bacteria en forma de bacilo Gram-negativa, catalasa y oxidasa positiva que presenta un flagelo polar único y no forma cápsula ni esporas. En medio mineral suplementado con AC, como única fuente de carbono y de energía, esta bacteria forma pequeñas colonias grises que presentan halos incoloros. Este aislado se denominó cepa TQ07. Este microorganismo además de utilizar AC crece con glucosa, fructosa, arabinosa, xilosa, succinato, acetato, citrato, lactato, piruvato, tartrato, malonato, glutamato, glicerol, etanol, n-propanol y n-butanol. No crece en sacarosa, maltosa, lactosa, almidón, trealosa, sorbitol y ramnosa. Las características morfológicas y bioquímicas anteriores nos permitieron clasificar a la cepa TQ07 como *Pseudomonas* sp.

La capacidad de esta cepa para degradar el ácido cloranílico, se estableció utilizando diferentes concentraciones de éste compuesto en el medio mineral. Encontramos que el crecimiento del microorganismo y la liberación de ión cloruro muestran una relación lineal estricta (estequiométrica). La capacidad de degradación no se afecta por la concentración de AC empleada mientras el pH del medio se mantenga neutro. El tiempo de duplicación de *Pseudomonas* sp. TQ07 en medio mineral con 400 mg/l de AC es menor a 5 hr, pero presenta una fase lag en su curva de crecimiento de 16 hr (**Fig. 1, Artículo**). Para determinar si el AC se degradó por completo, cuantificamos después de 48 hr de crecimiento en medio mineral, la liberación de ión cloruro, la demanda química de oxígeno del sobrenadante y la desaparición espectrofotométrica del AC (**Fig. 1, Artículo**). Encontramos que después de este periodo de incubación más del 95% del cloro suplementado, como parte de la molécula de AC, se liberó al medio de cultivo como cloruro, la demanda química de oxígeno del sobrenadante disminuyó un 97% y un 92% del

AC, como tal, se degradó. Estos resultados en conjunto mostraron que *Pseudomonas* sp. TQ07 es una eficiente degradadora de ácido cloranílico.

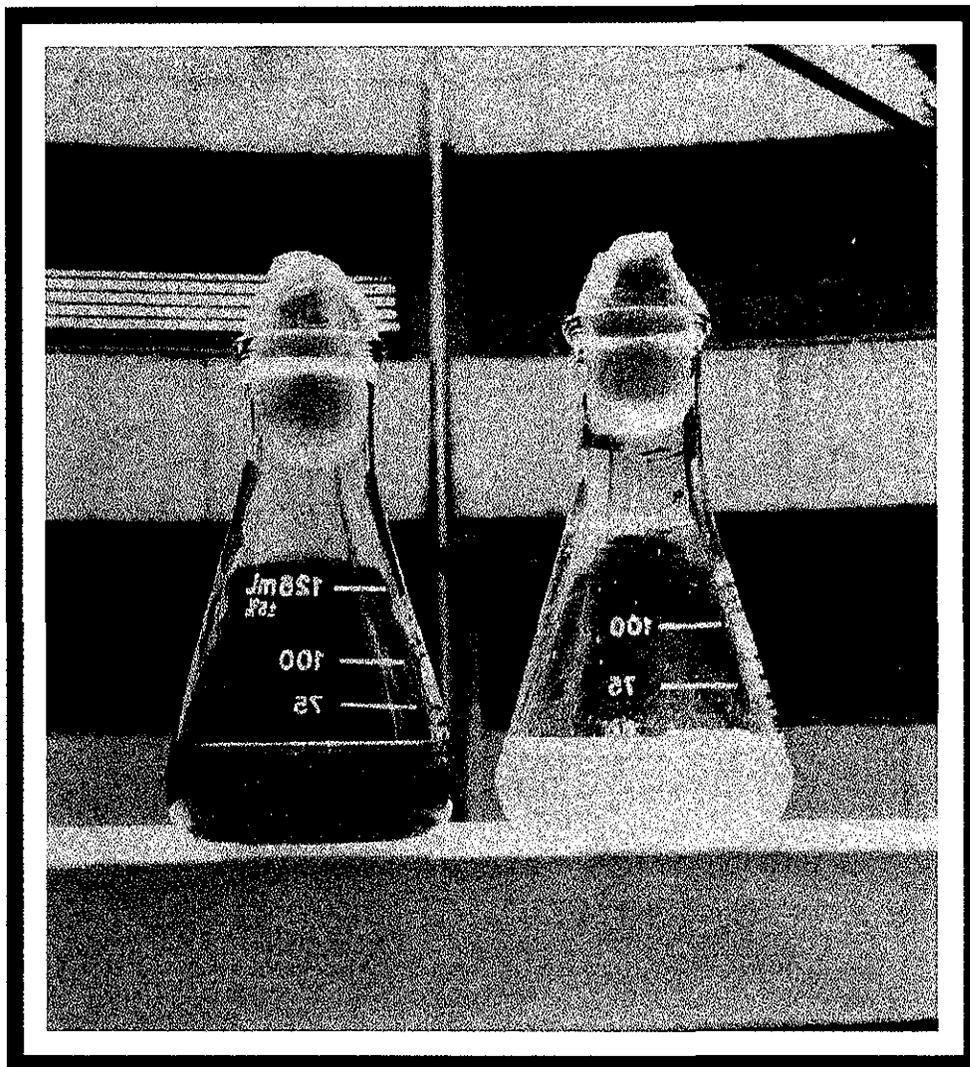


Figura 9. Cultivos de medio mineral con 800 mg/l de ácido cloranílico como única fuente de carbono y de energía, inoculados con *Pseudomonas putida* TQ07 a las 0 y 48 hr de incubación.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5 OBJETIVOS

Objetivo general

Aislar y caracterizar los genes involucrados en la degradación de ácido cloranílico de *Pseudomonas putida* TQ07.

Objetivos particulares

1. Seleccionar mutantes de *Pseudomonas putida* TQ07 incapaces de degradar el ácido cloranílico.
2. Aislar, secuenciar y caracterizar el gen o genes afectados en las mutantes de *Pseudomonas putida* TQ07.
3. Determinar si los genes aislados están agrupados en la misma región genómica
4. Investigar si los genes involucrados en el metabolismo de este compuesto están localizados en un plásmido o en el cromosoma.
5. Establecer la vía metabólica utilizada por *Pseudomonas putida* TQ07 en la mineralización del ácido cloranílico.

6 MATERIALES Y METODOS

Medios y condiciones de cultivo.

Las cepas y plásmidos utilizados en este trabajo se describen en la **Tabla 1**. Los cultivos de *Pseudomonas putida* TQ07 se realizaron en el siguiente medio mínimo (MM): agua desionizada, 1000 ml; K₂HPO₄ 1.0 g; KH₂PO₄ 0.5 g; NH₄NO₃ 1.0 g; MgSO₄·7H₂O 0.2 g; NaCl, 0.1 g; y FeCl₃ 0.02 g (El pH final se ajustó a 6.8) o en caldo nutritivo (CN). El ácido cloranílico se esterilizó por filtración y se añadió a una concentración final de 400 mg/l al medio de cultivo y en algunos casos se utilizaron concentraciones superiores de este compuesto. *Escherichia coli* se cultivó en medio LB a 37°C (Miller 1972). Los experimentos de biodegradación se realizaron en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de MM, se inocularon 2.5 ml (5%) de un cultivo de *Pseudomonas putida* TQ07 de 48 hr en MM. Los cultivos se incubaron a una temperatura de 30°C con una velocidad de agitación de 250 rpm. El crecimiento celular se determinó midiendo la densidad óptica a 600 nm o cuantificando el peso seco de las células. Los antibióticos utilizados para *E. coli* fueron: ampicilina, 200 µg/ml; kanamicina, 50 µg/ml y tetraciclina, 20 µg/ml; y para *P. putida* TQ07: cloramfenicol, 50 µg/ml; ácido nalidíxico, 50 µg/ml; kanamicina, 50 µg/ml y tetraciclina, 20 µg/ml.

Tabla 1. Cepas y plásmidos utilizados en este estudio.

Cepas y Plásmidos	Características relevantes	Referencias
<i>Pseudomonas putida</i> :		
TQ07	Cepa silvestre, CAD ⁺ , Cm ^r	Este trabajo
Cad26, Cad50, Cad58	TQ07 <i>cadA::mini-Tn5lacZ2</i> ,	Este trabajo
Cad64, Cad78 y Cad82	Cad ^r , Cm ^r Km ^r	

Escherichia coli:

DH5 α	<i>SupE44, DlacUI69, hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1, Nal^r</i>	Gibco BRL
HB101	<i>leuB6, supE44, ara-14, galK2, lacY1, rpsL20, xyl-5, mtl-1 recA13, Str^r</i>	Gibco BRL
S17.1 λ pir	S17.1 que expresa la proteína λ pir; Sm ^r	De Lorenzo et al. 1990
Plásmidos:		
pMP220	Vector para construir fusiones transcripcionales <i>lacZ</i> , Tc ^r	Spaink et al. 1987
pUT-mini-Tn5 <i>lacZ2</i>	Vector suicida para mutagénesis que lleva al mini-Tn5 <i>lacZ2</i> ; capaz de replicarse solo en cepas que expresan la proteína λ pir; Km ^r	De Lorenzo et al. 1990
pCP13	Vector "cósmido" derivado de RK2; Tc ^r Km ^r	Darzins et. al 1984
pBluescript SK+	Vector utilizado para subclonar ADN; Amp ^r	Stratagene
pRK2013	ColE1-tra (RK2); Km ^r	Figurski et al. 1979
pCA17	pBluescript SK+ con un fragmento <i>PstI</i> de 17.0-kb que contiene el sitio de la transposición de la mutante <i>cad26</i> ; Amp ^r Km ^r	Este trabajo
pLG3020	Cósmido derivado del pCP13 que contiene 25-kb de ADN de <i>P. putida</i> TQ07 incluyendo al gen <i>cadA</i> ; Tc ^r	Este trabajo
pLG12PP	pMP220 que lleva un fragmento de 12-kb <i>PstI</i> conteniendo al gen <i>cadA</i> ; Tc ^r	Este trabajo
pLG6EP	pMP220 que lleva un fragmento	Este trabajo

	de 6-kb <i>EcoRI-PstI</i> del pLG12PP; Tc ^r	
pLG3EX	pMP220 que lleva un fragmento	Este trabajo
	de 3-kb <i>EcoRI-XhoI</i> del pLG12PP; Tc ^r	
pLG7XX	pMP220 que lleva un fragmento	Este trabajo
	de 7-kb <i>XhoI</i> del pLG12PP; Tc ^r	
pLG2SX	pMP220 que lleva un fragmento	Este trabajo
	de 7-kb <i>SalI-XhoI</i> del pLG12PP; Tc ^r	
pLG3.5SX	pMP220 que lleva un fragmento	Este trabajo
	de 3.5-kb <i>SalI-XhoI</i> del pLG12PP; Tc ^r	
pLG3.2KK	pMP220 que lleva un fragmento	Este trabajo
	de 3.2-kb <i>KpnI</i> del pLG12PP; Tc ^r	

Métodos analíticos.

La degradación del ácido cloranílico se cuantificó por las siguientes técnicas. Espectrofotometría UV, se midió la reducción de absorbancia a 243 nm y se cuantificó la concentración realizando una comparación con soluciones estándar de concentración conocida de ácido cloranílico. La liberación de ión cloruro se determinó por una modificación de un método turbidimétrico (Frank y Fosch 1992). La demanda química de oxígeno se midió por el ensayo colorimétrico de reflujo cerrado (Clesceri et al. 1989).

Identificación de la cepa TQ07.

La cepa TQ07 se identificó con base en el manual de bacteriología sistemática de Bergey (Palleroni 1984). Las pruebas microbiológicas y bioquímicas se desarrollaron como se describe en el manual de Bergey (Palleroni 1984) o el manual de métodos microbiológicos (Smibert y Krieg 1981). Además, la composición de ácidos grasos celulares la analizó la compañía Microbial ID, Inc. (Newark, Del.).

Visualización de plásmidos.

Para detectar la presencia de algún plásmido catabólico en *P. putida* TQ07, se utilizaron tres métodos de electroforesis en gel (Eckardt 1978, Rosenberg et al. 1982, Kado y Liu 1981).

Mutagénesis al azar de *Pseudomonas putida* TQ07.

La mutagénesis al azar de la cepa silvestre TQ07, se realizó por medio de cruzas biparenterales, en cajas con una mezcla 6:1 de agar nutritivo y LB, entre la cepa receptora TQ07 (Cm^r) y la cepa donadora *E. coli* S17.1 (λ pir Ap^r)/pUTmini-Tn5lacZ2 (Km^r), la cual lleva el transposón miniTn5lacZ2 en un vector suicida que solamente se replica en cepas λ pir (De Lorenzo et al. 1990). La selección de las células de *P. putida* TQ07 que contenían la inserción del miniTn5lacZ2 se realizó en cajas de agar nutritivo con kanamicina y cloramfenicol. Para la identificación de las cepas incapaces de degradar el ácido cloranílico, se creció el banco de mutantes en agar nutritivo con 400 mg/l de ácido cloranílico durante 48 hr y se aislaron aquellas colonias que no forman halos incoloros en torno a ellas. Para confirmar que estas cepas mutantes no degradan ácido cloranílico por estar afectadas en la vía catabólica de este compuesto y no en algún paso del metabolismo general se sembraron en medio mínimo suplementado con ácido cloranílico o con otras fuentes de carbono (piruvato y succinato).

Cruzas para transferencia de plásmidos por conjugación.

La biblioteca genómica de *P. putida* TQ07 se movilizó de *E. coli* HB101 a las mutantes deficientes en la degradación de ácido cloranílico por cruzas triparenterales utilizando el plásmido ayudador pRK2013 (Figurski y Helinki 1979), las transconjugantes se seleccionaron en agar nutritivo con cloramfenicol y tetraciclina.

Manipulación de ADN.

Los procedimientos estándar para la purificación de ADN total y de plásmidos, de las digestiones con enzimas de restricción, de la electroforesis en geles de agarosa, de la purificación de ADN de geles de agarosa, de ligación de ADN, de la transformación de *E. coli* y de la hibridación tipo “Southern blot” se realizaron según metodologías establecidas (Sambrook et al. 1989). Las secuencias de ADN se determinaron por el método de Sanger (Sanger et al. 1977). Los ácidos nucleicos para hibridación se transfirieron a membranas de Hybond N⁺ y se fijaron con NaOH 0.4 N. Los experimentos de “nick translation” utilizados para el marcado de sondas con ³²P se realizaron con un kit de Amersham Corp. Las

exposiciones de las hibridaciones se observaron en películas Kodak de alta sensibilidad o bien en pantallas de Phosphorimager.

Enzimas y reactivos utilizados.

Las enzimas necesarias para la manipulación de ADN se adquirieron de Amersham Corp. y Boheringer Corp. Los kits para la purificación de ácidos nucleicos se adquirieron de Gibco BRL. El ácido cloranílico y los demás compuestos clorados que se utilizaron en este estudio se obtuvieron de Sigma Chemical Corp.

Construcción del banco genómico.

El ADN total de *P. putida* TQ07 se digirió parcialmente con la enzima *Sau3AI*. Los fragmentos de ADN con un tamaño entre 20 y 30 kb se ligaron al sitio *Bam*HI del cósmido pCP13 que es un vector de amplio rango de hospederos (Darzins y Chakrabarty 1984). El ADN ligado se empacó *in vitro* con el kit de fago lambda Gigapack plus de Amersham Corp. Los fagos recombinantes se transfectaron en la cepa de *E. coli* HB101. Las células transfectadas se seleccionaron en placas de LB con tetraciclina y estreptomycin.

Análisis de secuencias.

La comparación de las secuencias se realizó utilizando las bases de datos GeneBank y SWISS PROT utilizando algoritmos BLASTN y BLASTX versiones 1.4 y 2.0 (Altschul et al. 1990). Las comparaciones específicas con un gen o proteína en particular se realizaron con el programa Gene Works 2.5

Número de colección de la cepa TQ07.

La cepa TQ07, utilizada en éste trabajo, se depositó en la colección pública del IIB-UNAM WDCM48 (<http://wdcm.nig.ac.jp/>) con la clave de colección: **BM-B-381**.

Número de acceso de la secuencia de ADN.

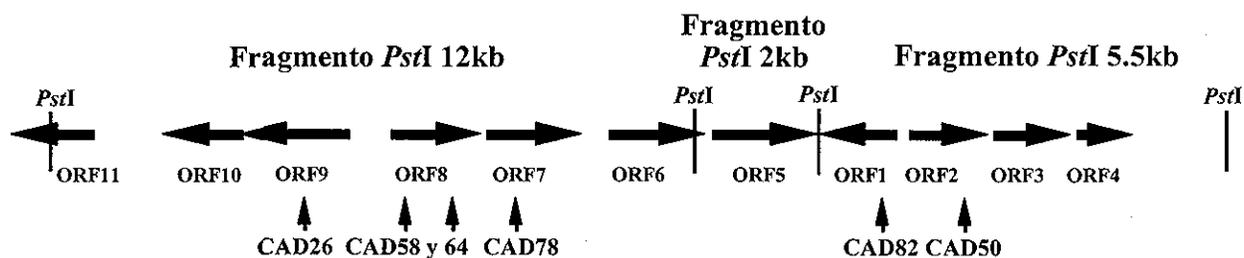
La secuencia nucleotídica del gen *cadA* de la cepa TQ07 se depositó en la base de datos GenBank bajo el número de acceso: **AF421356**.

7 RESULTADOS y DISCUSIONES

7.1 ARTICULO PUBLICADO.

Cloning and characterization of a FAD-monooxygenase gene (*cadA*) involved in degradation of chloranilic acid (2,5-dichloro-3,6-dihydroxybenzo-1,4-quinone) in *Pseudomonas putida* TQ07. Ver ANEXO 1.

7.2 CARACTERIZACION DE LOS ORF'S DEL FRAGMENTO *Pst*I DE 5.5-kb DEL COSMIDO pLG3020.



- ORF1: Regulador Familia LysR (Mutante CAD82)
- ORF2: Pirona hidrolasa (Mutante CAD50)
- ORF3: Hidratasa - Aldolasa
- ORF4: Proteína de función desconocida
- ORF5: Proteína de Quimiotaxis
- ORF6: Proteína de membrana externa "Porina"
- ORF7: Transportador de ácidos dicarboxílicos (Mutante CAD78)
- ORF8: Proteína de Membrana Externa "Porina"(Mutantes CAD58 y CAD64)
- ORF9: FAD-Monooxigenasa (*CadA*) (Mutante CAD26)
- ORF10: Proteína Hipotética
- ORF11: Acetil-CoA acetiltransferasa

Figura 10. Mapa de los ORF'S de la región secuenciada de 19-kb del cósmido pLG3020. La dirección de transcripción de cada ORF esta señalada por las flechas horizontales, la localización de las inserciones de las diferentes mutantes esta indicada por flechas verticales y la posible función de cada ORF se especifica abajo.

Con el fin de obtener completos, los genes afectados en las diferentes mutantes, construimos un banco genómico de la cepa TQ07 para lo cual utilizamos el cósmido de

amplio rango de hospedero pCP13. Realizamos una búsqueda por hibridación en colonia utilizando como sonda el inserto de 17-kb del plásmido pCA17 (pKS con un fragmento de 17-kb *Pst*I que contiene la inserción del miniTn5*kmlacZ2* en el gene *cadA* de la mutante *cad26*). Obtuvimos dos cósmidos el pLG3020 y el pLG3562 que hibridan con esta sonda. El cósmido pLG3020 presenta completo el fragmento silvestre de 12-kb *Pst*I afectado por la inserción de 5-kb del miniTn5*kmlacZ2* en el plásmido pCA17. En cambio, el cósmido pLG3562 contiene solamente 2.5-kb de este fragmento silvestre. Por ensayos de hibridación con el ADN total de todas las mutantes y complementación de las mismas encontramos que el cósmido pLG3020 contiene los genes silvestres afectados por las inserciones o perdidos de forma espontánea.

7.2.1 EL ORF1 CODIFICA PARA UN REGULADOR TRANSCRIPCIONAL DE LA FAMILIA LysR.

El ORF1 se transcribiría divergentemente con respecto al resto de los ORF'S (ORF2, 3 y 4) contenidos en el fragmento de 5.5-kb *Pst*I del cósmido pLG3020 (Fig. 10) y codifica para un polipéptido de 326 amino ácidos que presenta una identidad significativa con miembros de la familia de reguladores transcripcionales LysR (Henikoff et al. 1988). La identidad más alta la presenta contra un regulador del plásmido IncP β R751 y es del 34%, al parecer el producto de este gen está involucrado en la regulación positiva del gen que se transcribe divergentemente y que codifica para una policétido ciclasa (Thorsted et al. 1998). Con respecto a genes involucrados en degradación, la identidad más alta de este regulador es del 27% con el gen *fldY*, involucrado en la regulación positiva de la mineralización de fluoreno a través de la vía 4,5 del protocatecuato por *Sphingomonas* sp. LB126 (Wattiau et al. 2001). En común con otros miembros de esta familia, este polipéptido contiene un probable motivo de unión a ADN α hélice-vuelta- α hélice (HTH, amino ácidos 37 a 57). En la mutante *cad82*, afectada en la degradación de ácido cloranílico, es precisamente en este motivo de unión a ADN donde se encuentra la inserción del miniTn5*lacZ2* (amino ácido 55) lo que nos sugiere que el producto de este gene regula positivamente la transcripción de otros genes involucrados en la degradación de ácido cloranílico. En particular, regularía los genes que están codificados divergentemente, ya que entre el ORF1 y el ORF2 se encuentran los elementos típicos de este tipo de regulación (Schell 1993) (Fig. 11).

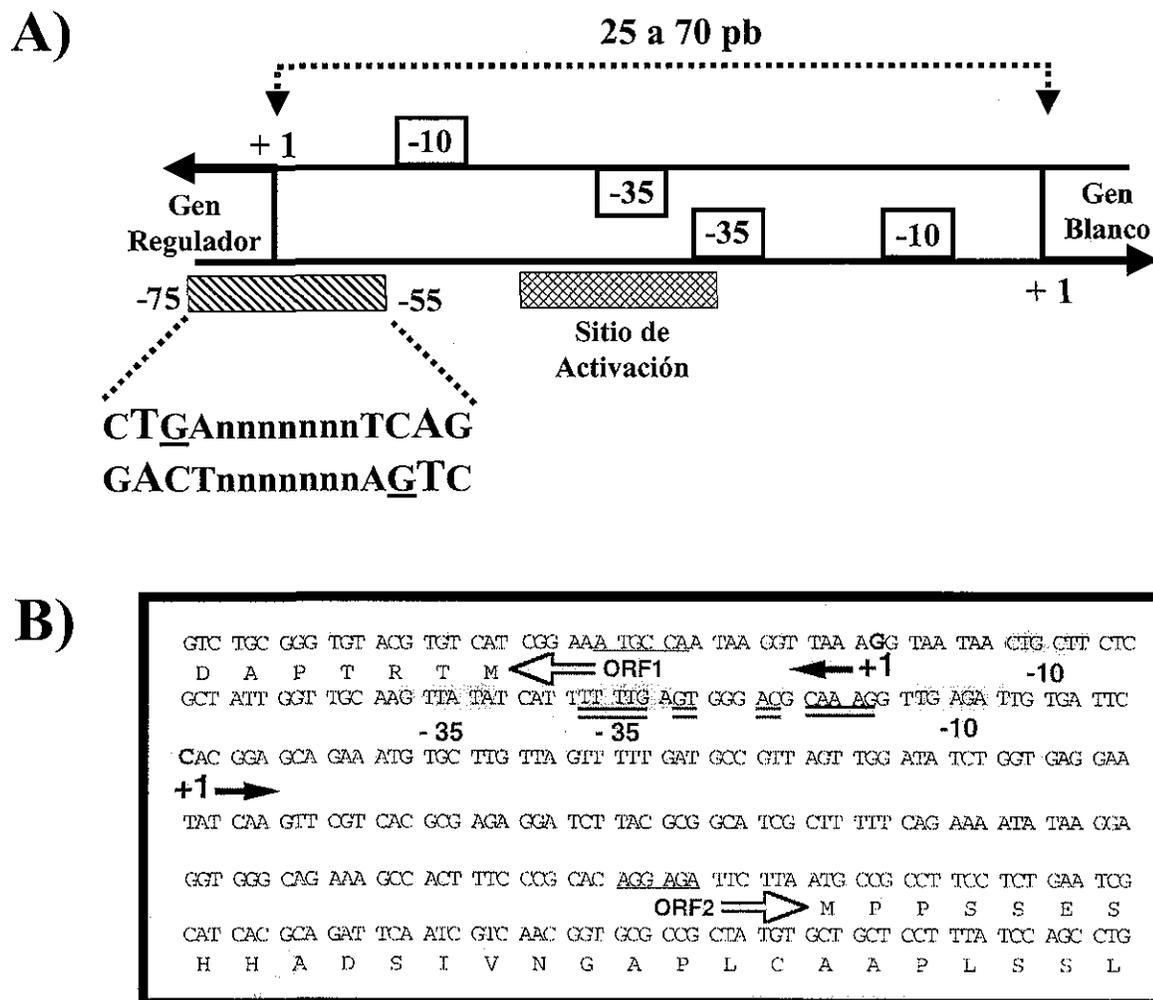


Figura 11. A) Estructura típica de un promotor divergente regulado por un LTTR (autoregulatory transcriptional reguladores). Una secuencia de reconocimiento hipotética se muestra abajo ilustrando la secuencia diádica y el motivo T-N₁₁-A; las guaninas que probablemente están involucradas en la unión están subrayadas. B) Región intergénica entre el ORF1 y el ORF2. Las secuencia deducida de amino ácidos inicial para el ORF1 (regulador LysR) y para el ORF2 (pirona hidrolasa) de *Pseudomonas putida* TQ07 se muestran debajo de la secuencia de ADN. Los posibles inicios de transcripción son designados “+1”, los promotores están indicados con “-10” y “-35”, las secuencias Shine-Dalgarno están subrayadas y el sitio de reconocimiento del regulador LysR esta doblemente subrayado.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

7.2.3 EL ORF3 CODIFICA PARA UNA ALDOLASA.

El ORF3 codifica para una proteína de 305 amino ácidos (**Fig. 10**) que presenta un 33% de identidad con el gen *dapA* de *E. coli* que codifica para la enzima dihidrodipicolinato cintaza, que es la primera enzima de la vía de biosíntesis del diaminopimelato y de la lisina. Esta vía presenta en común los primeros dos pasos con las vías de biosíntesis de la treonina y la metionina, e involucran la activación del ácido aspártico a aspartil fosfato y la reducción del amino ácido activado a aspartil semialdehído. En la rama de la lisina, el aspartil semialdehído se convierte a dihidrodipicolinato por condensación con piruvato. Esta primera reacción de “ramificación” involucra la condensación y deshidratación de un fragmento C4 con un fragmento C3 para formar el dihidrodipicolinato de 7 carbonos (Pisabarro et al. 1993).

En *Sulfolobus solfataricus* una arqueobacteria hipertermofílica la glucosa se metaboliza a través de la vía de Entner-Doudoroff no fosforilada, en la cual el corte aldol reversible C6 a C3 lo cataliza la 2-ceto-3-deoxigluconato aldolasa y genera así piruvato y gliceraldehído. Este gen exhibe una identidad significativa, a nivel de su secuencia de amino ácidos, con el producto del ORF3 (Buchanan et al. 1999).

Por último, éste ORF también presenta una buena identidad contra el gen *nanaA* de *Clostridium perfringens* que utiliza el ácido siálico como única fuente de carbono, la liasa de ácido siálico (*nanaA*) cataliza la hidrólisis de este compuesto en piruvato y N-acetilmanosamina, este último compuesto se utiliza como intermediario biosintético o como una fuente de carbohidrato (Walters et al. 1999).

7.2.4 EL ORF4 CODIFICA PARA UNA PROTEINA DE FUNCION DESCONOCIDA.

La secuencia deducida de amino ácidos del ORF4 (Fig. 10) muestra una homología significativa con ORF's que no tienen una función asignada pero que están asociados con otros genes catabólicos. El ORF4 presenta un 41% de identidad a nivel de amino ácidos con un grupo de ORF's de la vía de corte-*meta*, que incluye *cmpX* de *Sphingomonas* sp. HV3 (Yrjälä et al. 1997), *cbzX* de *Pseudomonas putida* GJ31 (Mars et al. 1999) y la traducción del ORF1126 del plásmido pNL1 de *Sphingomonas aromaticivorans* F199 (Romine et al.

1999). Quizás más sorprendente es la homología entre la secuencia de amino ácidos deducida para el ORF4 y tres ORF's de función desconocida asociados con operones de la fermentación de glicerol de *Citrobacter freundii* (33%) (Daniel et al. 1995), *Clostridium pasterianum* (30%) (Luers et al. 1997) y *Klebsiella pneumoniae* (25%) (Sprenger et al. 1989).

7.3 CARACTERIZACION DE LOS ORF'S DEL FRAGMENTO *PstI* DE 2-kb DEL COSMIDO pLG3020.

7.3.1 EL ORF5 CODIFICA PARA UNA PROTEINA DE QUIMIOTAXIS ACEPTORA DE METILOS.

En este fragmento encontramos solo un ORF completo (Fig. 10) que presenta una alta identidad (56%) a nivel de amino ácidos con la familia de proteínas de quimiotaxis aceptoras de metilo que se localizan en la membrana interna. Existen pocos reportes de quimiotaxis asociada a la degradación de compuestos aromáticos. La proteína aceptora de metilos NahY interviene en la quimiotaxis a naftaleno del plásmido NAH7 aislado de *Pseudomonas putida* G7 (Grimm et al. 1999). Los miembros de esta familia de proteínas se han estudiado mejor en *E. coli* y *S. typhimurium*. Los receptores de estas bacterias responden a amino ácidos o azúcares e inician la transducción de señales alterando la actividad de CheA, una histidin kinasa asociada a esta proteína. CheA-P fosforila a una proteína reguladora de respuesta, CheY, que interactúa con las proteínas del "switch" de rotación en el motor del flagelo. Esto causa un cambio en el comportamiento de la motilidad de la célula y entonces migra en dirección al quimioatrayente (Stock et al. 1996).

7.4 CARACTERIZACION DE LOS ORF'S DEL FRAGMENTO *Pst*I DE 12-kb DEL COSMIDO pLG3020.

7.4.1 EL ORF6 y EL ORF8 CODIFICAN PARA PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA “PORINAS”.

El ORF6 y el ORF8 codifican para proteínas que presentan una identidad a nivel de amino ácidos del 34 al 44% con proteínas de membrana externa llamadas “porinas”. Además, se encontraron dos mutantes por inserción del transposon miniTn5*lacZ*2, la cad58 y la cad64, que están afectadas en el ORF8 y que son incapaces de degradación el ácido cloranílico. En estas mutantes se restaura la actividad degradativa cuando se complementan con el cósmido pLG3020 (**Tabla 2**). Es apropiado mencionar que estas mutantes son diferentes, ya que sus inserciones están localizadas en distintos sitios de este gen (**Fig. 10**). Estas proteínas son muy importantes para las bacterias Gram-negativas debido a que forman canales de difusión por los que todos los nutrientes hidrofílicos deben atravesar la membrana externa (Benz 1988). Esto plantea la posibilidad de que los productos de estos genes estén involucrados en la introducción de compuestos polares como el ácido cloranílico. Otros genes de función desconocida que codifican para proteínas de membrana externa están a veces asociados con genes degradativos, tales como *todX*, que esta asociado con la vía de degradación de tolueno de *Pseudomonas putida* F1 (Wang et al. 1995) o *dxc*, que está asociado con la vía de degradación del 4-hidroxisalicilato de *Sphingomonas* sp. RW1 (Armengaud et al. 1999).

7.4.2 EL ORF7 CODIFICA PARA UN TRANSPORTADOR DE ACIDOS DICARBOXILICOS-C₄.

La secuencia deducida de amino ácidos del ORF7 muestra una alta identidad (53%) contra proteínas involucradas en el transporte de ácidos dicarboxílicos-C₄ (DctA) como el succinato, fumarato, malato y el amino ácido dicarboxílico aspartato. Durante el crecimiento aeróbico, estos substratos son fuentes de carbono y de energía que se oxidan a CO₂, en el ciclo del ácido cítrico. Este metabolismo requiere de un sistema de transporte para estos substratos polares. En las bacterias aeróbicas, los transportadores de

7.4.5 EL ORF11 CODIFICA PARA UNA ACETIL-CoA ACETIL TRASFERASA.

El ORF11 codifica para una tiolasa. El último ORF identificado en el fragmento de 12-kb *Pst*I codifica una proteína de aproximadamente 394 amino ácidos. La secuencia de esta proteína está estrechamente relacionada con las secuencias de las acetil-CoA acetiltransferasas, también llamadas tiolosas. Estas enzimas juegan un papel clave en el metabolismo bacteriano ya que controlan el flujo del carbón en la célula al catalizar la condensación de dos moléculas de acetil-CoA para producir acetoacetil-CoA (tiolosas anabólicas [Peoples y Sinskey 1989]) o el rompimiento del 3-oxoadipil-CoA en succinil-CoA y acetil-CoA (tiolosas catabólicas [Doten et al. 1987, Harwood et al. 1994]). Esta reacción de corte participa en el ultimo paso de la degradación de catecol (**Fig. 14**).

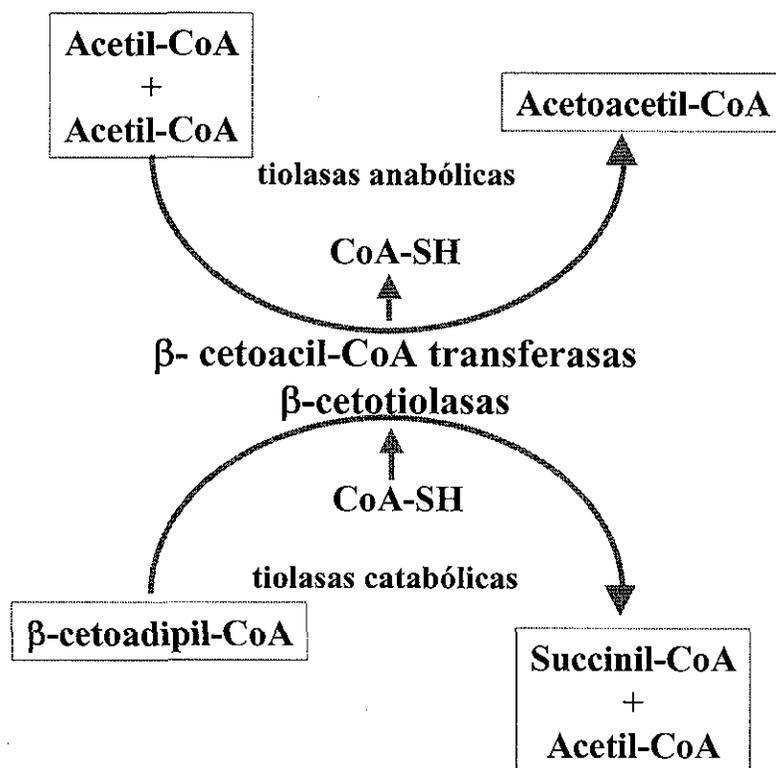


Figura 14. Reacciones catalizadas por las acetil-CoA acetiltransferasas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

7.5 COMPLEMENTACION DE LAS MUTANTES Cad^- CON EL COSMIDO pLG3020.

Las 6 mutantes (*cad26*, *cad50*, *cad58*, *cad64*, *cad78* y *cad82*) que presentan inserciones en una región de 10-kb del ADN de la cepa TQ07, contenido en el cósmido pLG3020, son complementadas totalmente por este cósmido (**Tabla 2**). Sin embargo, cuando tratamos de complementar a la mutante espontánea TQ07.C1 con este cósmido encontramos que este organismo es incapaz de utilizar como única fuente de carbono y de energía el ácido cloranílico (**Fig. 16 B**). Esto nos lleva a concluir que existen otros genes no contenidos en el cósmido pLG3020 involucrados en la degradación de ácido cloranílico y que esta cepa pierde cuando se resiembró en medios ricos (agar nutritivo).

CEPA	Genotipo	degradación * de ácido cloranílico (%)
TQ07	Wild type	92.7
CAD26	$Cad^-::miniTn5lacZ2$	1.8
CAD26/pLG3020	" " $cadA^+$	95.3
CAD50	$Cad^-::miniTn5lacZ2$	5.1
CAD50/pLG3020	" " $cadA^+$	97.2
CAD58	$Cad^-::miniTn5lacZ2$	15.7
CAD58/pLG3020	" " $cadA^+$	94.8
CAD64	$Cad^-::miniTn5lacZ2$	20.0
CAD64/pLG3020	" " $cadA^+$	95.4
CAD78	$Cad^-::miniTn5lacZ2$	3.3
CAD78/pLG3020	" " $cadA^+$	92.5
CAD82	$Cad^-::miniTn5lacZ2$	2.1
CAD82/pLG3020	" " $cadA^+$	98.6

* La degradación se determinó en cultivos líquidos a las 48 h de crecimiento en medio mineral.

Tabla 2. Degradación de ácido cloranílico por las diferentes mutantes de *Pseudomonas putida* TQ07.

7.6 LOCALIZACION DE LOS GENES DEGRADATIVOS.

Obtuvimos una mutante espontánea derivada de la cepa *Pseudomonas putida* TQ07 (TQ07.C1) incapaz de degradar el ácido cloranílico. Esta mutante perdió la región del ADN que contiene el cósmido pLG3020 (Fig. 15) y un fragmento *Pst*I adicional de aproximadamente 17-kb (Fig. 16 A). Al introducir por conjugación el cósmido pLG3020 a esta cepa no se restaura su capacidad para degradar el ácido cloranílico (Fig. 16 B). Esto nos sugiere que un gen o varios genes adicionales se requieren para la degradación del ácido cloranílico y pueden estar presentes en el ADN faltante y no representado en el cósmido PLG3020, por ejemplo, el fragmento *Pst*I de 17-kb mencionado anteriormente. Para establecer que ésta cepa mutante no es una contaminación, se obtuvo una mutante espontánea de la cepa TQ84 que tiene una inserción del miniTn5*lacZ*2 pero que no afecta la degradación de ácido cloranílico, esta cepa fue nombrada TQ84.C1. Esta mutante nos permitió verificar que aunque ambas cepas conservan la inserción del miniTn5*lacZ*2, la cepa TQ84.C1 pierde todo el ADN contenido en el cósmido pLG3020 al igual que la cepa TQ07.C1 (Fig. 15). El fragmento *Pst*I de 17-kb es un excelente marcador para reconocer mediante el patrón de restricción, en geles de agarosa, mutantes incapaces de degradar ácido cloranílico espontáneas o por inserción.

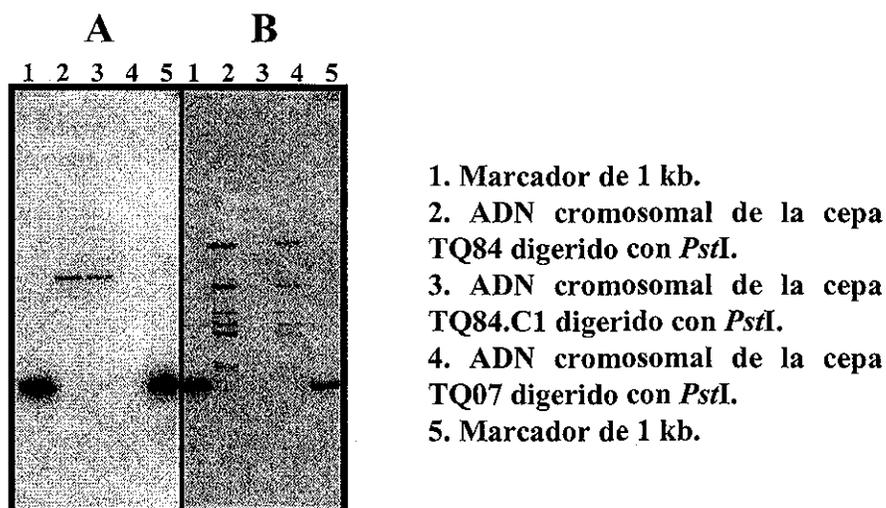


Figura 15. Panel A: Patrón de hibridación tipo “Southern blot” utilizando como sonda el transposón miniTn5*lacZ*2. Panel B: Patrón de hibridación tipo “Southern blot” utilizando como sonda el cósmido pLG3020.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El hecho de que no localizamos plásmidos en la cepa TQ07 (Fig. 17), además de que el subcultivo de esta cepa en medios ricos (AN) favorece la pérdida de la actividad degradativa, y de que al realizar la hibridación del ADN cromosomal utilizando el cósmido pLG3020 como sonda, la cepa no degradadora ha perdido todo el ADN contenido en el cósmido pLG3020, nos hace pensar, que *Pseudomonas putida* TQ07 podría contener un elemento cromosomal conjugable. Este tipo de elementos pueden escindir-se del genoma de un organismo en el cual están integrados y transferirse por conjugación a un organismo diferente e integrarse nuevamente. Recientemente se han caracterizado dos elementos catabólicos: El conjunto de genes *clc* de *Pseudomonas* sp. B13 que confiere la degradación de 3-clorobenzoato se encuentra en el cromosoma de esta cepa como un elemento genético móvil de 105-kb (Van der Meer et al. 2001). Este elemento fue primero caracterizado como un plásmido catabólico. El conjunto de genes *bph* y *sal* de *Pseudomonas putida* KF715 que permiten la degradación del salicilato y bifenilo están contenidos en un elemento móvil de 90-kb (Nishi et al. 2000). En nuestro caso no hemos probado si la capacidad degradativa presente en la cepa TQ07 de *Pseudomonas putida* puede transferirse, por conjugación, a otras cepas microbianas. Los resultados que tenemos hasta el momento indican la probable presencia de uno de estos elementos o de un megaplásmido.

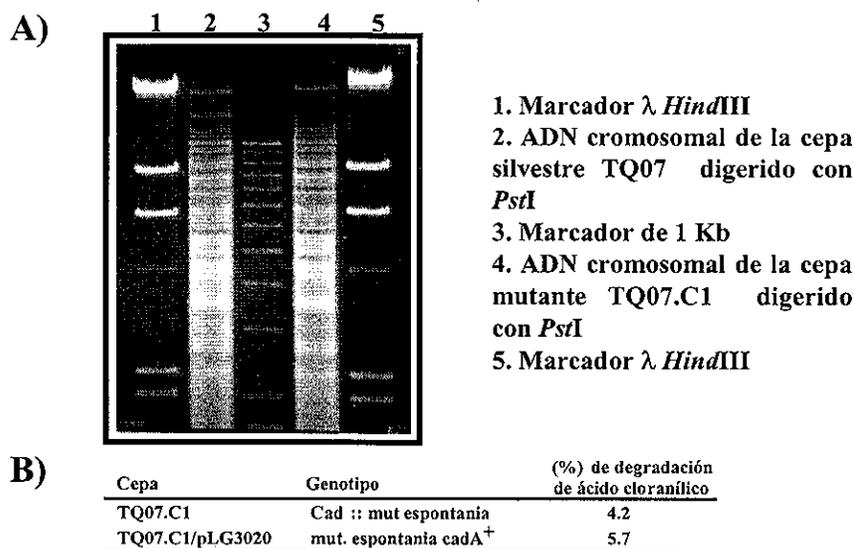


Figura 16. A) Patrón de restricción *PstI* de la cepa silvestre TQ07 y la mutante espontánea TQ07.C1. B) Complementación de la mutante espontánea con el cósmido pLG3020.

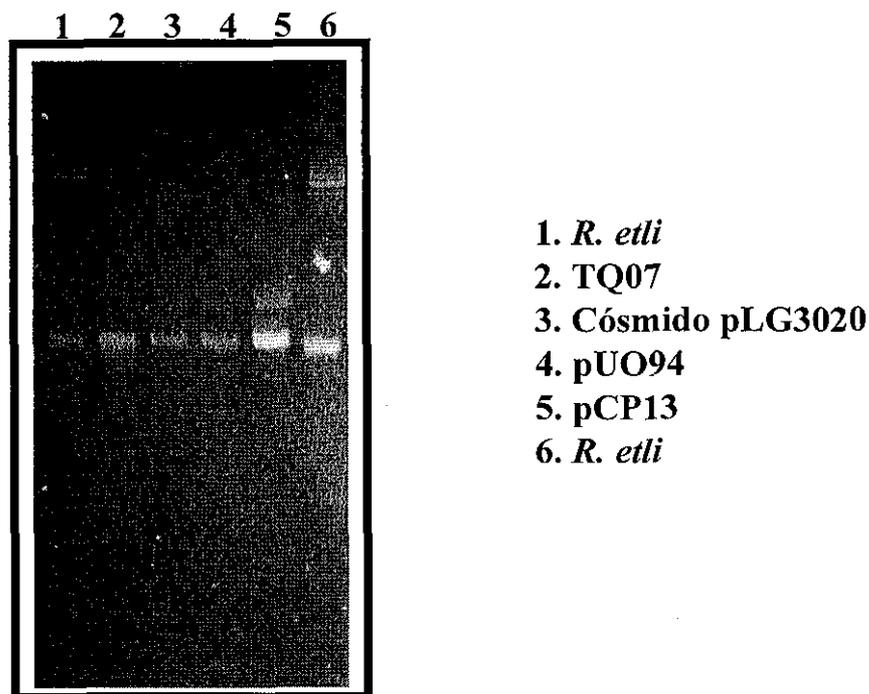


Figura 17. Aislamiento de plásmidos mediante el método de Kado y Liu.

7.7 VIA HIPOTETICA DE LA DEGRADACION DE ACIDO CLORANILICO POR *Pseudomonas putida* TQ07.

El mecanismo general de las FAD-monooxigenasas de compuestos aromáticos es la introducción de un grupo hidroxilo al anillo aromático para generar un compuesto fenólico. Durante la introducción de éste nuevo grupo se remueven otros del anillo, por ejemplo, hidrógenos, nitros, aminos, carboxilos y halogenuros (Fig. 18). La 2,4-dihidroxi benzoato monooxigenasa de *Sphingomonas* sp. RW1 (Armengaud et al. 1999) es la enzima que presenta la más alta identidad con CadA (32%) y participa en la remoción de un grupo carboxilo (proximal a un grupo hidroxilo) del 4-hidroxisalicilato para generar hidroxiquinol. Existen también monooxigenasas que remueven grupos Cl⁻ que se encuentran en posición *ortho* con respecto a un grupo hidroxilo. La clorofenol 4-monooxigenasa de *Burkholderia cepacia* AC1100 (Xun 1996, Garrec et al. 2001) y la 2,6-dicloro-p-hidroquinona clorohidrolasa de *Flavobacterium* sp. ATCC 39723 (Lee y Xun 1997) convierten la 2,5-diclorohidroquinona y la 2,6-diclorohidroquinona en 5-clorohidroxiquinona y 6-clorohidroxiquinona respectivamente. De lo anterior,

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

podemos sugerir que la función de CadA es remover (cuando menos) un grupo cloruro de la 2,5-dicloro-3,6-dihidroxi-1,4-hidroquinona. En este momento, estamos tratando de probar esta función (**Fig. 20**).

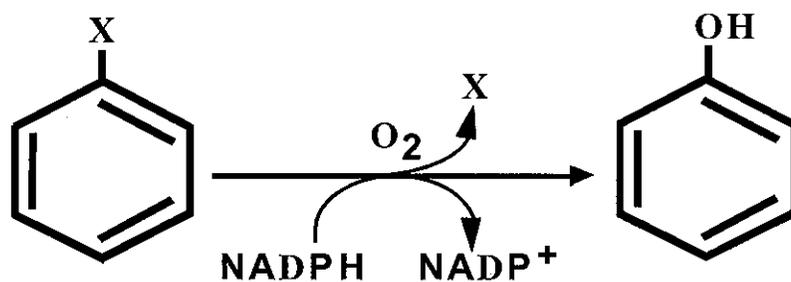


Figura 18. Reacción general de las FAD-Monooxigenasas.

En analogía al mecanismo reportado por Kersten y colaboradores, en 1985, para la degradación de protocatecuatos sustituidos, se obtendría un compuesto similar al ácido 2-pirona-6-carboxílico a partir del ácido cloranílico (reducido e hidroxilado) por la acción de una protocatecuato 4,5-dioxigenasa. Este compuesto, se forma también cuando la protocatecuato 3,4-dioxigenasa y la catecol 1,2-dioxigenasa, que son intradiol dioxigenasas, cortan el anillo aromático del 1,2,3-trihidroxibenzeno “pirogalol” (Saeki et al. 1980) (**Fig. 19**). La formación de esta lactona se ha observado también en la degradación de difenileter (Pfeifer et al. 1989 y 1993) como resultado de un corte extradiol por la 2,3-dihidroxi-bifenil 1,2-dioxigenasa sobre el 2,3-dihidroxi-difenileter. Sin embargo, el ácido 2-pirona-6-carboxílico no es degradado posteriormente. Este compuesto se ha detectado también, como el producto final de la degradación del herbicida cloridazon por *Phenylobacterium immobilis* DSM 1986 (Müller et al. 1982). Kaschabek y colaboradores, en 1998, consideran que durante la degradación del 3-clorocatecol por una catecol 2,3-dioxigenasa podría formarse el ácido 2-pirona-6-carboxílico. Sin embargo, no detectaron éste producto ni la actividad de pirona hidrolasa, para este compuesto.

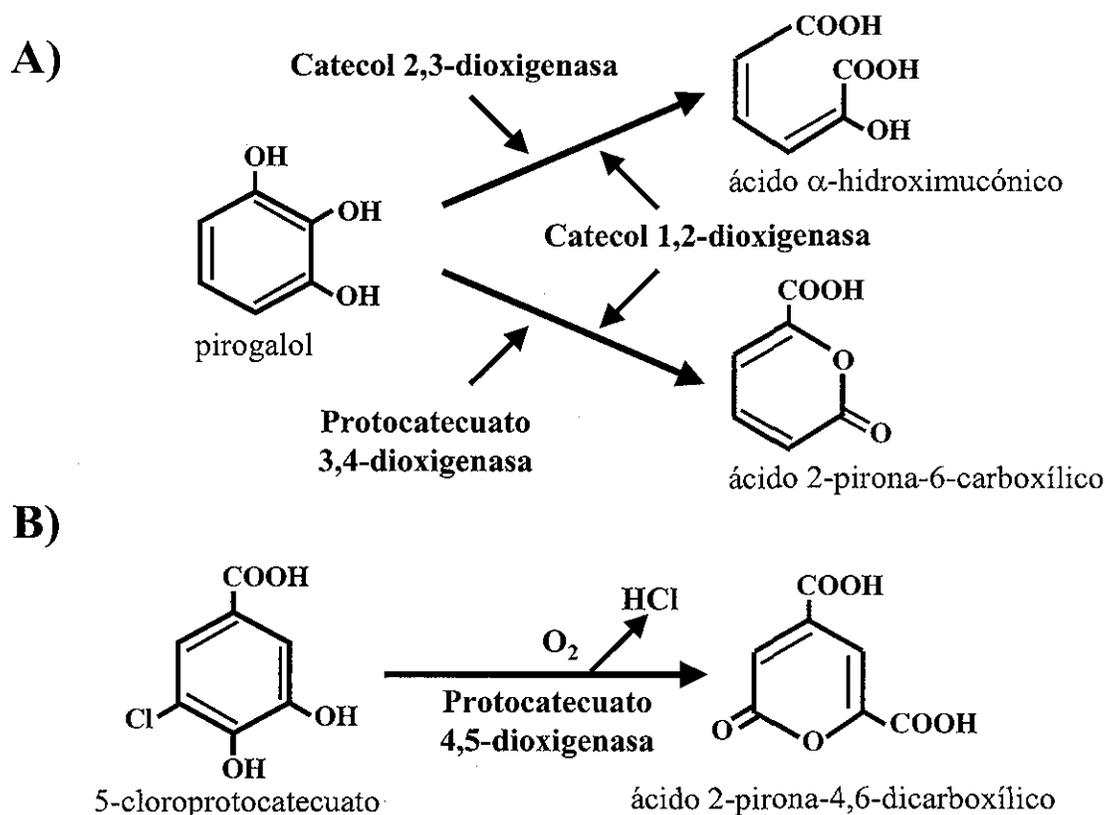


Figura 19. A) Corte oxidativo del pirogalol por tres dioxigenasas diferentes, catecol 1,2-dioxigenasa, catecol 2,3-dioxigenasa, y protocatecuato 3,4-dioxigenasa. B) Corte oxidativo del 5-cloroprotocatecuato por una protocatecuato 4,5-dioxigenasa.

Posteriormente a la remoción del grupo Cl del anillo aromático, del ácido cloranílico reducido, el siguiente paso de la degradación involucraría la participación de una dioxigenasa (que no hemos identificado) que corte este compuesto (Fig. 20). Como mencionamos anteriormente, un corte *meta* por una protocatecuato 4,5-dioxigenasa entre un grupo hidroxilo y el grupo Cl adyacente generaría una pirona. Además, el corte entre 2 grupos hidroxilo (que presenten otro grupo hidroxilo vecinal como en el pirogalol) por una catecol 1,2-dioxigenasa, una protocatecuato 2,3-dioxigenasa o probablemente una hidroxiquinol 1,2-dioxigenasa produciría también una pirona, que es el sustrato de la enzima pirona hidrolasa. La remoción de un grupo cloruro del ácido cloranílico reducido le permitiría a una variedad más amplia de dioxigenasas cortar este compuesto y generar en el proceso una pirona (Fig. 20).

La secuencia de amino ácidos deducida a partir del ORF2 del fragmento de 5.5-kb *PstI* presenta una identidad del 32 al 35% con enzimas que participan en la hidrólisis del compuesto ácido 2-pirona-4,6-dicarboxílico y que esta involucrada en la degradación del protocatecuato por la vía de corte *meta*-4,5. La mutante *cad50*, que es incapaz de utilizar el ácido cloranílico como única fuente de carbono y de energía (**Tabla 2**), contiene una inserción del transposon *miniTn5lacZ2* en éste ORF. El compuesto generado a partir del 5-cloro-2,3,6-trihidroxi-1,4-benzoquinol por cualquiera de las dioxigenasas mencionadas anteriormente produciría una pirona que probablemente sea el sustrato de la enzima codificada por el ORF2 y que generaría por hidrólisis un compuesto similar al 2-hidroximuconato.

Para generar a partir del 2,3,4,5-tetrahidroximuconato intermediarios del ciclo de ácidos tricarbónicos podrían actuar dos enzimas diferentes: 1) La acetil-CoA acetiltransferasa (tiolasa) que esta codificada por el último ORF del fragmento de 12-kb *PstI*. Sin embargo, para que esta enzima intervenga se necesitan dos pasos enzimáticos previos realizados por la maleilacetato reductasa y la 3-oxoadipato succinil-CoA transferasa (**Fig. 1**). 2) La proteína codificada por el ORF3 del fragmento de 5.5-kb *PstI* presenta una identidad promedio a nivel de amino ácidos del 35% con enzimas involucradas en la síntesis o degradación de compuestos similares al 2,3,4,5-tetrahidroximuconato generado en el paso anterior. El dihidrodipicolinato, un intermediario de la síntesis de lisina, es sintetizado por la enzima dihidrodipicolinato sintasa a partir de piruvato y aspartato-3-semialdehído (Pisabarro et al. 1993). La secuencia de amino ácidos deducida de este ORF presenta relación también con la enzima 2-ceto-3-desoxigluconato aldolasa que produce piruvato y gliceraldehído a partir del 2-ceto-3-desoxigluconato (Buchanan et al. 1999). Por último, existe relación entre éste ORF y la liasa que produce piruvato y N-acetilmanosamina a partir del ácido siálico (Walters et al. 1999). Posiblemente, éste ORF codifica una enzima que genera intermediarios del ciclo de ácidos tricarbónicos (**Fig. 20**).

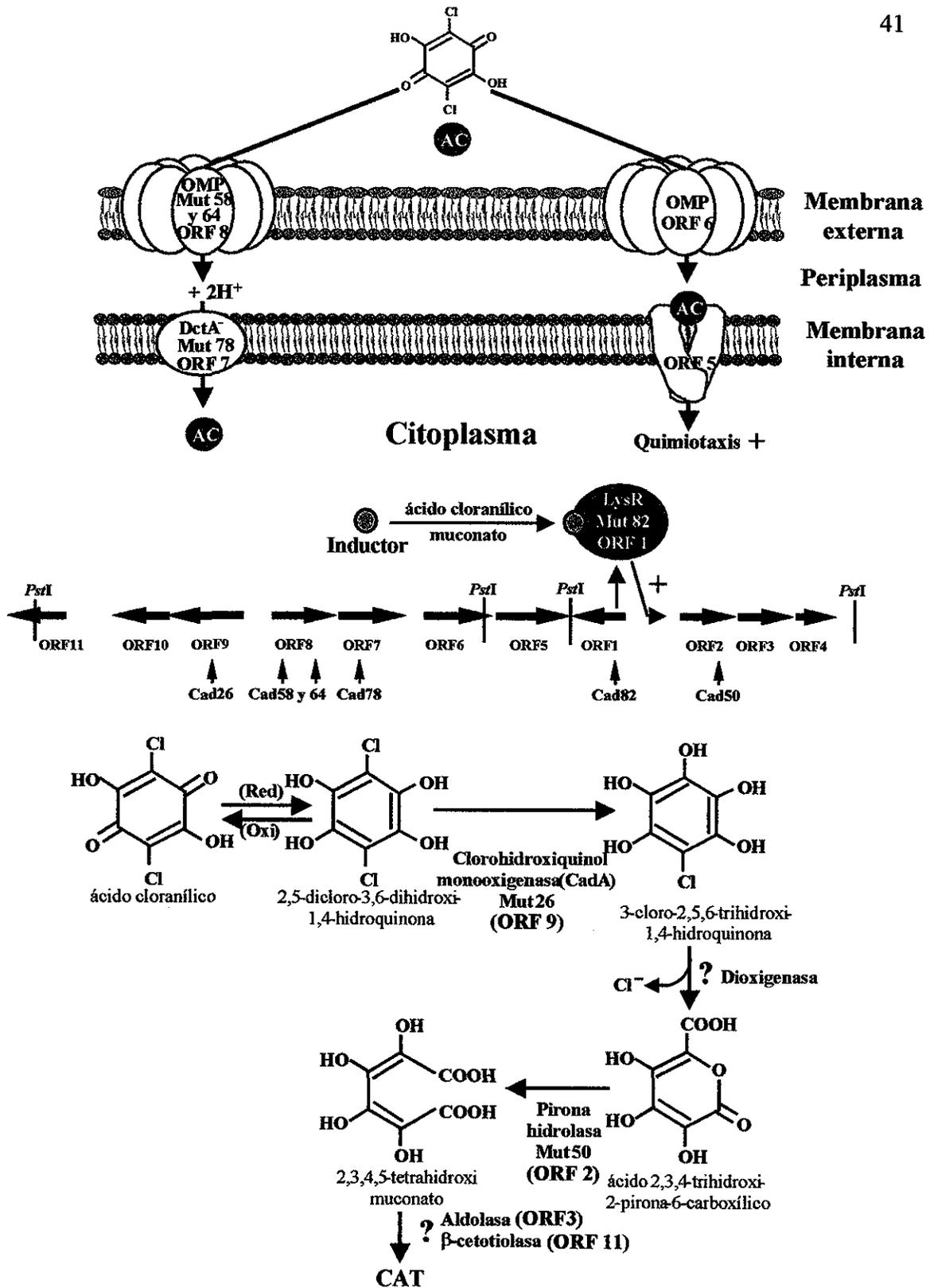


Figura 20. Ruta hipotética de la degradación de ácido cloranjilico por *Pseudomonas putida* cepa TQ07.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

8 CONCLUSIONES

En el presente trabajo reportamos un gen cuyos homólogos más cercanos no se habían relacionado con la degradación de compuestos clorados en ningún organismo. Además, realizamos el primer reporte en el que se emplea una benzoquinona clorada (ácido cloranílico) como sustrato inicial para el aislamiento y caracterización de genes involucrados en el metabolismo aeróbico de este tipo de compuestos, mediante el uso de un fenotipo muy claro y que se encuentra estrechamente ligado a la capacidad de la cepa TQ07 para degradar esta benzoquinona. En general, las aportaciones de este estudio, aunque no totalmente concluyentes, nos permitieron desarrollar un modelo de la degradación del ácido cloranílico que se resume en la **Fig. 20**. A continuación se puntualizan las conclusiones más relevantes de este trabajo.

- El fenotipo de formación de halos incoloros en torno a las colonias que crecen en un medio rico (agar nutritivo) suplementado con ácido cloranílico, presenta una estrecha relación, con la capacidad de la cepa de *Pseudomonas putida* TQ07 para degradar este compuesto.
- Varios de los genes involucrados en la degradación del ácido cloranílico están agrupados en la misma región del genoma, de la cepa TQ07, que contiene el cósmido pLG3020.
- Existen otros genes fuera del ADN contenido en el cósmido pLG3020 involucrados en la degradación del ácido cloranílico.
- Los genes involucrados en la degradación del ácido cloranílico se encuentran contenidos en un elemento “inestable” (debido a que puede perderse durante las resiembras de esta cepa en un medio rico) del genoma de la cepa TQ07.
- El gen *cadA* probablemente codifica una FAD-monooxigenasa involucrada en la degradación de ácido cloranílico. Aunque su función exacta se desconoce por el momento.

- Se caracterizaron parcialmente otras 5 mutantes afectadas en la degradación del ácido cloranílico y que son complementadas con el cósmido pLG3020. Estas mutantes tienen sus inserciones en los siguientes genes: en un regulador de la familia LysR (cad82), en una pirona hidrolasa (cad50), en una “porina” (cad58 y cad64) y en un transportador de ácidos dicarboxílicos (cad78).
- Proponemos, con base en los genes afectados en las mutantes cad⁻, a la homología que presentan estos genes con otros genes involucrados en la degradación de compuestos aromáticos y a las funciones de los productos de estos genes, una vía hipotética de la degradación del ácido cloranílico.

9 PERSPECTIVAS

- Determinar que intermediarios se generan o acumulan en la cepa silvestre y en las mutantes para definir la vía metabólica del ácido cloranílico.
- Expresar el gen *cadA* en *E. coli* y realizar ensayos de actividad enzimática para demostrar su función en esta vía.
- Encontrar la dioxigenasa que participa en el corte del anillo aromático, para establecer con más exactitud cual es la vía catabólica empleada por *Pseudomonas putida* TQ07.
- Confirmar si la regulación de los genes que participan en esta vía, se lleva a cabo por el homólogo de la familia de reguladores LysR.
- Establecer la función del homólogo de la pirona hidrolasa en esta vía metabólica.
- Determinar si los otros genes contenidos en el fragmento de 19-kb (secuenciados del cósmido pLG3020 y que no presentan inserciones) tienen alguna función en esta vía degradativa.
- Definir si el homólogo de la proteína de membrana externa “porina” y el homólogo al transportador de ácidos C4-dicarboxílicos participan en el transporte de ácido cloranílico.
- Buscar otros genes, no contenidos en el cósmido pLG3020, involucrados en la degradación.
- Establecer el tamaño del elemento involucrado en la degradación de ácido cloranílico y la forma en que puede transferirse a otros microorganismos.

10 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Ahmed, M., and D. D. Focht.** 1973. Degradation of polychlorinated biphenyls by two species of *Achromobacter*. *Can. J. Microbiol.* **19**: 47-52
- Alexander, M.** 1981. Biodegradation of chemicals of environmental concern. *Science.* **211**: 132-128.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and H. Lipman.** 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.
- Armengaud, J., K. N. Timmis, and R.-M. Wittich.** 1999. A functional 4-hydroxysalicylate/hydroxyquinol degradative pathway gene cluster is linked to the initial dibenzo-*p*-dioxin pathway genes in *Sphingomonas* sp. strain RW1. *J. Bacteriol.* **181**: 3452-3461.
- Atlas, R. M., and R. Bartha.** 1993. *Microbial Ecology. Fundamentals and applications.* 3th ed. The Benjamin/Cummings publishing company. p 386-416.
- Benz, R.** 1988. Structure and function of porins from Gram-negative bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **42**: 359-393
- Blanco, G., A. Pereda, P. Brian, C. Mendez, K. F. Chater, and J. A. Salas.** 1993. A hydroxylase-like gene product contributes to sintesis of a polyketide spore pigment in *Streptomyces halstedii*. *J. Bacteriol.* **175**: 8043-8048.
- Buchanan, C. L., H. Connaris, M. J. Danson, C. D. Reve, and D. W. Hough.** 1999. An extremely thermostable aldolase from *Sulfolobus solfararius* with specificity for non-phosphorilated substrates. *Biochem. J.* **343**: 563-570.
- Budavari, S. (ed).** 1996. *The Merck Index an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals.* Merck and Co. Inc. N. J. USA.
- Bayly, R., P. Chapman, S. Dagley, and D. Di Bernardino.** 1980. Purification and some properties of maleylpyruvate hydrolase and fumarylpyruvate hydrolase from *Pseudomonas alcaligenes*. *J. Bacteriol.* **143**: 70-77.
- Chakrabarty, A. M.** 1996. Microbial degradation of toxic chemical: evolutionary insights and practical considerations. *ASM News.* **62**: 130-137.
- Chatterjee, D. K., and A. M. Chakrabarty.** 1983. Genetic homology between independently isolated chlorobenzoate-degradative plasmids. *J. Bacteriol.* **153**: 532-534.
- Clesceri, L. S., A. E. Greenberg and R. R. Trussell (ed).** 1989. *Standard methods for the examination of water and wastewater.* Port City Press, Baltimore, Maryland.
- Daniel, R., R. Boenigk, and G. Gottschalk.** 1995. Purification of 1,3-propandiol dehydrogenas from *Citrobacter freundii*: cloning, sequencing and overexpression of the corresponding gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **177**: 2151-2156.
- Darzins, A., and A. M. Chakrabarty.** 1984. Cloning of genes controlling alginate biosynthesis from a mucoid cystic fibrosis isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **159**: 9-18.
- Daubaras, D. L., C. D. Hershberger, K. Kitano, and A. M. Chakrabarty.** 1995. Sequence analysis of a gene cluster involved in the metabolism of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid by *Burkholderia cepacia* AC1100. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1279-1289.
- Daubaras, D. L., K. Saido, and A. M. Chakrabarty.** 1996. Purification of hydroxyquinol 1,2-dioxygenase and maleylacetate reductase: the lower pathway of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid metabolism by *Burkholderia cepacia* AC1100. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 4276-4279.

- De Lorenzo, V., M. Herrero, V. Jakubzik, and K. N. Timmis.** 1990. Mini-*Tn5* transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J. Bacteriol.* **172**: 6568-6572.
- Deretic, V., W. M. Konyecsni, C. D. Mohr, D. W. Martin, and N. S. Hibler.** 1989. Common denominators of promoter control in *Pseudomonas* and other bacteria. *Bio/technology.* **7**:1249-1254.
- Don R.H. and J.M. Pemberton.** 1981. Properties of six-pesticide degradation plasmids isolation from *Alcaligenes paradoxus* and *Alcaligenes eutrophus* *J. Bacteriol.* **145**: 681-685.
- Dorn, E., M. Hellwig, W. Reineke, and H.-J. Kanackmuss.** 1974. Isolation and characterization of a 3-chlorobenzoate degrading *Pseudomonas*. *Arch. Microbiol.* **99**: 61-70.
- Doten, R. C., K. L. Ngai, D. J. Mitchell, and L. N. Ornston.** 1987. Cloning and genetic organization of the *pca* gene cluster from *Acinetobacter calcoaceticus*. *J. Bacteriol.* **169**: 3168-3174.
- Eaton, R. W.** 2001. Plasmid-encoded phtalate catabolic pathway in *Arthrobacter keyseri* 12B. *J. Bacteriol.* **183**: 3689-3703.
- Eckardt, T.** 1978. A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid.* **1**: 584-588.
- Eggink, G., H. Engel, G. Vriend, P. Terpstra, and B. Witholt.** 1990. Rubredoxin reductase of *Pseudomonas oleovorans*: structure relationship to other flavoprotein oxidoreductases based on one NAD and two FAD fingerprints. *J. Mol. Biol.* **212**: 135-142.
- Figurski, D. H., and D. R. Helinski.** 1979. Replication of an origin containing derivate of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**: 1648-1652.
- Frank, K. H., and D. D. Fosch.** 1992. Utilization of 3-chloro-2-methyl benzoic acid by *Pseudomonas cepacia* MB2 through *meta* fission pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1920-1928.
- Franklin, F. C. H., M. Bagdasarian, M. M. Bagdasarian, and K. N. Timmis.** 1981. Molecular and functional analysis of the TOL plasmid pWVO from *Pseudomonas putida* and cloning of genes for the entire regulated aromatic ring *meta* cleavage pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78**: 7458-7462.
- Frazer, R. W., D. M. Livingston, D. C. LaPorte, and J. D. Lipscomb.** 1993. Cloning, sequencing, and expression of the *Pseudomonas putida* protocatechuate 3,4-dioxygenase genes. *J. Bacteriol.* **175**: 6194-6202.
- Garrec, G. M.-L., I. Artaud, and C. Capeillere-Blandin.** 2001. Purification and catalytic properties of the chlorophenol 4-monooxygenase from *Burkholderia cepacia* strain AC1100. *Biochim. Biophys. Acta.* **1547**: 288-301.
- Ghosal, D., and I.-S. You.** 1989. Operon structure and nucleotide homology of the chlorocatechol oxidation genes of plasmids pCA27 and pJP4. *Gene.* **83**: 225-232.
- Golovleva, L. A., O. Zaborina, R. Pertsova, B. Baskunov, Y. Schurukhin, and S. Kuzmin.** 1992. Degradation of polychlorinated phenols by *Streptomyces rochei* 303. *Biodegradation.* **2**: 201-208.
- Grimm, A. C., and C. S. Harwood.** 1999. NahY, a catabolic plasmid-encoded receptor required for chemotaxis of *Pseudomonas putida* to the aromatic hydrocarbon naphthalene. *J. Bacteriol.* **181**: 3310-3316.
- Hägglom, M.** 1990. Mechanism of bacterial degradation and transformation of chlorinated monoaromatic compounds. *J. Basic Microbiol.* **30**: 115-141.
- Haigler B. E., W.-C. Suen, and J. C. Spain.** 1996. Purification and sequence analysis of 4-methyl-5-nitrocatechol oxygenase from *Burkholderia* sp. strain DNT. *J. Bacteriol.* **178**: 6019-6024.

- Hart, M. 1961. Reactions of chloranilic acid with metal cations: use in spectrophotometry. *Org. Chem. Bull.* **33**: 3-5.
- Hardman, D. J., P. C. Gowland, and J. H. Slater. 1986. Large plasmids from soil bacteria enriched on halogenated alkanolic acids. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**: 44-51.
- Hardman, D. J. 1991. Biotransformation of halogenated compounds. *Crit. Rev. Biotechnol.* **11**: 1-40.
- Harwood, C. S., N. N. Nichols, M. K. Kim, J. L. Ditty, and R. E. Parales. 1994. Identification of the *pcaRKF* gene cluster from *Pseudomonas putida*: involvement in chemotaxis, biodegradation, and transport of 4-hydroxybenzoate. *J. Bacteriol.* **176**: 6479-6488.
- Harwood, C. S., and R. E. Parales. 1996. The β -cetoacid pathway and the biology of self-identity. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**: 553-590.
- Henikoff, S., G. W. Haughn, J. M. Calvo, and J. C. Wallace. 1988. A large family of bacterial activator proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**: 6602-6606.
- Jain, R. K., J. H. Dreisbach, and J. C. Spain. 1994. Biodegradation of *p*-nitrophenol via 1,2,4-benzenetriol by an *Arthrobacter* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1279-1289.
- Janusch, I. G., E. Zientz, Q. H. Tran, A. Kröger, and G. Uden. 2002. C₄-dicarboxylate carriers and sensors in bacteria. *Biochim. Biophys. Act.* **1553**: 39-56.
- Kado, C. I., and S.-T. Liu. 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmid. *J. Bacteriol.* **145**: 1365-1373.
- Kasberg, T., D. L. Daubaras, A. M. Chakrabarty, D. Kinzelt, and W. Reineke. 1995. Evidence that operons *tcb*, *tfd* and *clc* encode maleylacetate reductase, the fourth enzyme of the modified ortho pathway. *J. Bacteriol.* **177**: 3885-3889.
- Kaschbek, S. R., T. Kasberg, D. Müller, A. E. Mars, D. B. Janssen, and W. Reineke. 1998. Degradation of chloroaromatics: purification and characterization of a novel type of chlorocatechol 2,3-dioxygenase of *Pseudomonas putida* GJ31. *J. Bacteriol.* **180**: 296-302.
- Kersten, P. J., P. J. Chapman, and S. Dagley. 1985. Enzymatic release of halogens or methanol from some substituted protocatechuic acids. *J. Bacteriol.* **162**: 693-697.
- Kersten, P. J., S. Dagley, J. W. Whittaker, D. M. Arciero, and J. D. Lipscomb. 1982. 2-Pyrone-4,6-dicarboxylic acid, a catabolite of gallic acids in *Pseudomonas* species. *J. Bacteriol.* **152**: 1154-1162.
- Kukor, J. J., and R. H. Olsen. 1992. Complete nucleotide sequence of *tbuD*, the gene encoding phenol/cresol hydroxylase from *Pseudomonas pickettii* PK01, and functional analysis of the encoded enzyme. *J. Bacteriol.* **174**: 6518-6526.
- Lack, L. 1959. The enzymic oxidation of gentisic acid. *Biochim. Biophys. Act.* **34**: 117-123.
- Latus, M., H.-J. Seitz, J. Eberspächer, and F. Lingens. 1995. Purification and characterization of hydroxyquinol 1,2-dioxygenase from *Azotobacter* sp. strain GP1. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2453-2460.
- Lee, J.-Y., and L. Xun. 1997. Purification and characterization of 2,6-dichloro-*p*-hydroquinone chlorohydrolase from *Flavobacterium* sp. strain ATCC 39723. *J. Bacteriol.* **179**: 1521-1524.
- Li, D.-Y., J. Eberspächer, B. Wagner, J. Kuntzer, and F. Lingens. 1991. Degradation of 2,4,6-trichlorophenol by *Azotobacter* sp. Strain GP1. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1920-1928.

- Luers, F., M. Seyfried, R. Daniel, G. Gottschalk. 1997. Glycerol conversion to 1,3-propanediol by *Clostridium pasteurianum*: cloning and expression of the gene encoding 1,3-propanediol dehydrogenase. FEMS Microbiol. Lett. **154**: 337-345.
- Mars, A. E., J. Kingma, S. R. Kaschabek, W. Reineke, and D. B. Janssen. 1999. Conversion of 3-chlorocatechol by various catechol 2,3-dioxygenases and sequence analysis of the chlorocatechol dioxygenase region of *Pseudomonas putida* GJ31. J. Bacteriol. **181**: 1309-1318.
- Masai, E., Y. Katayama, S. Kawai, S. Nishikawa, M. Yamasaki, and N. Morohoshi. 1991. Cloning and sequencing of the gene for a *Pseudomonas paucimobilis* enzyme that cleaves β -aryl ether. J. Bacteriol. **173**: 7950-7955.
- Masai, E., Y. Katayama, S. Kubota, S. Kawai, M. Yamasaki, and N. Morohoshi. 1993. A bacterial enzyme degrading the model lignin compound β -etherase is a member of the glutathione-S-transferase superfamily. FEBS Lett. **323**: 135-140.
- Masai, E., S. Shinohara, H. Hara, S. Nishikawa, Y. Katayama, and M. Fukuda. 1999. Genetic and biochemical characterization of a 2-pyrone-4,6-dicarboxylic acid hydrolase involved in the protocatechuate 4,5-cleavage pathway of *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. J. Bacteriol. **181**: 55-62.
- Miller, J. H. (ed). 1972. Experiment in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
- Miyauchi, K., S.-K. Suh, Y. Nagata, and M. Takagi. 1998. Cloning and sequencing of a 2,5-dichlorohydroquinone reductive dehalogenase gene whose product is involved in degradation of γ -hexachlorocyclohexane by *Sphingomonas paucimobilis*. J. Bacteriol. **180**: 1354-1359.
- Müller, R., S. Schmitt, and F. Lingens. 1982. A novel non-heme iron-containing dioxygenase. Chloridazon-catechol dioxygenase from *Phenylobacterium immobilis* DSM 1986. Eur. J. Biochem. **125**: 579-584.
- Nishikawa, S., T. Sonoki, T. Kasahara, T. Obi, S. Kubota, S. Kawai, N. Morohoshi, and Y. Katayama. 1998. Cloning and sequencing of the *Sphingomonas (Pseudomonas) paucimobilis* gene essential for the *o*-demethylation of vanillate and syringate. Appl. Environ. Microbiol. **64**: 836-842.
- Nishi, A., K. Tominaga, and K. Furukawa. 2000. A 90-kilobase conjugative chromosomal element coding for biphenyl and salicylate catabolism in *Pseudomonas putida* KF715. J. Bacteriol. **182**: 1949-1955.
- Noda, Y., S. Nishikawa, K. Shiozuka, H. Kadokura, H. Nakajima, K. Yoda, Y. Katayama, N. Morohoshi, T. Haraguchi, and M. Yamasaki. 1990. Molecular cloning of the protocatechuate 4,5-dioxygenase gene of *Pseudomonas paucimobilis*. J. Bacteriol. **172**: 2704-2709.
- Ollis, D.L., Cheah, E. Cygler, M. Dijkstra, B., and F. Frolow. 1992. The α/β hydrolase fold. Prot. Eng. **5**: 197-211.
- Palleroni, N. J. 1984. Gram-negative aerobic rods and cocci, p. 140-199. In N. R. Krieg and J. G. Holt (ed). Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. I. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Maryland.
- Parkhill, J., B. W. Wren, N. R. Thomson, R. W. Titball, M. T. G. Holden, M. B. Prentice, M. Sebaihia, K. D. James, C. Churcher, K. L. Mungall, S. Baker, D. Basham, S. D. Bentley, K. Brooks, A. M. Cerdeño-Tarraga, T. Chillingworth, A. Cronin, R. M. Davies, P. Davis, G. Dougan, T. Feltwell, N. Hamlin, S. Holroyd, K. Jagels, A. V. Karlyshev, S. Leather, S. Moule, P. C. F. Oyston, M. Quail, K. Rutherford, M. Simmonds, J. Skelton, K. Stevens, S. Whitehead, and B. G. Barrell. 2001. Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. Nature. **413**: 523-527.

- Peoples, O. P., and A. J. Sinskey.** 1989. Poly-beta-hydroxybutyrate biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. Characterization of the genes encoding β -ketothiolase and acetoacetyl-CoA reductase. *J. Biol. Chem.* **264**: 15293-15297.
- Peng, X., T. Egashira, K. Hanashiro, E. Masai, S. Nishikawa, Y. Katayama, K. Kimbara, and M. Fukuda.** 1998. Cloning of a *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6 gene encoding a novel oxygenase that cleaves lignin-related biphenyl and characterization of the enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 2520-2527.
- Perkins, E. J. U., M. P. Gordon, O. Caceres, and P. F. Lurquin.** 1990. Organization and sequence analysis of the 2,4-dichlorophenol hydroxylase and dichlorocatechol oxidative operons of plasmid pJP4. *J. Bacteriol.* **172**: 2351-2359.
- Pfeifer, F., H. G. Trüper, J. Klein, and S. Schacht.** 1993. Degradation of diphenylether by *Pseudomonas cepacia* Et4: enzymatic release of phenol from 2,3- dihydroxydiphenylether. *Arch. Microbiol.* **159**: 323-329.
- Pfeifer, F., S. Schacht, J. Klein, and H. G. Trüper.** 1989. Degradation of diphenylether by *Pseudomonas cepacia*. *Arch. Microbiol.* **152**: 515-519.
- Pisabarro, A., M. Malumbres, L. M. Mateos, J. A. Oguiza, and J. F. Martín.** 1993. A cluster of three genes (*dapA*, *orf2*, and *dapB*) of *Brevibacterium lactofermentum* encodes dihydrodipicolinate synthase, dihydrodipicolinate reductase, and a third polypeptide of unknown function. *J. Bacteriol.* **175**: 2743-2749.
- Powell, J. A. C., and J. A. C. Archer.** 1998. Molecular characterisation of a *Rhodococcus ohp* operon. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **74**: 175-188.
- Providenti, M. A., J. Mampel, S. MacSween, A. M. Cook, and C. Wyndham.** 2001. *Comamonas testosteroni* BR6020 possesses a single genetic locus for extradiol cleavage of protocatechuate. *Microbiology.* **147**: 2157-2167.
- Rakesh, K. J., J. H. Dreisbach, and J. C. Spain.** 1994. Biodegradación of *p*-nitrophenol via 1,2,4-benzenetriol by an *Arthrobacter* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 3030-3032.
- Ravath, R., S. Studer, D. Springael, A. J. B. Zehnder, and J. R. van der Meer.** 1998. 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.
- Reineke W.** 1998. Development of hybrid strains for the mineralization of chloroaromatics by patchwork assembly. *Annu. Rev. Microbiol.* **52**: 287-331.
- Remberger, M., P.-A. Hynning, and A. H. Neilson.** 1991. 2,5-Dichloro-3,6-dihydroxybenzo-1,4-quinone: identification of a new organochlorine compound in kraft bleachery effluents. *Environ. Sci. Technol.* **25**: 1903-1907.
- Robson, N.D., S. Parrott, and R.A. Cooper.** 1996. In vitro formation of a catabolic plasmid carrying *Klebsiella pneumoniae* DNA that allows growth of *Escherichia coli* K-12 in 3-hydroxybenzoate. *Microbiology.* **142**: 2115-2120.
- Romine, M. F., L. C. Stillwell, K.-K. Wong, S. J. Thurston, E. C. Sisk, C. Sensen, T. Gaasterland, J. K. Fredrickson, and J. D. Saffer.** 1999. Complete sequence of a 184-kilobase catabolic plasmid from *Sphingomonas aromaticivorans* F199. *J. Bacteriol.* **181**: 1585-1602.
- Rosenberg, C., F. Casse-Delbart, I. Dusha, M. David, and C. Boucher.** 1982. Megaplasmid in the plant-associated bacteria *Rhizobium meliloti* and *Pseudomonas saloonacearum*. *J. Bacteriol.* **150**: 402-406.
- Saber D.L. and R.L. Crawford.** 1985. Isolation and characterization of *Flavobacterium* strain that degrade pentachlorophenol. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**: 1512-1518.
- Saeki, Y., and M. Nozaki.** 1980. Cleavage of pyrogallol by non-heme iron-containing dioxigenases. *J. Biol. Chem.* **255**: 8465-8471.

Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning. A laboratory manual.* 2nd ed. Cold Spring Harbor, New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74:** 5463-5467.

Sangodkar, U. M. X., P. J. Chapman, and A. M. Chakrabarty. 1988. Cloning, physical mapping and expression of chromosomal genes specifying degradation of the herbicide 2,4,5-T by *Pseudomonas cepacia* AC1100. *Gene.* **71:** 267-277.

Schell, M. A. 1993. Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.* **47:** 597-626.

Schlöman, M. 1994. Evolution of chlorocatechol catabolic pathway. *Biodegradation.* **5:** 301-321.

Senoo, K., and H. Wada. 1989. Isolation and identification of an aerobic γ -HCH decomposing bacterium from soil. *Soil Sci. Plant. Nutr.* **35:** 79-87.

Shingler, V. 1996. Metabolic and regulatory check points in phenol degradation by *Pseudomonas* sp. CF600. In *Molecular Biology of Pseudomonas*, pp. 153-154. Edited by T. Nakazawa, K. Furukawa, D. Haas and S. Silver. Washington, DC: American Society for Microbiology.

Shingler, V., J. Powlowski, and U. Marklund. 1992. Nucleotide sequence and functional analysis of the complete phenol/3,4-dimethylphenol catabolic pathway of *Pseudomonas* sp. strain CF600. *J. Bacteriol.* **174:** 711-724.

Smibert, R. M., and N. R. Krieg. 1981. General characterization, p. 409-443. In P. Gerhardt, R. G. E. Murray, R. N. Costilow, E. W. Nester, W. A. Wood, N. R. Krieg, and G. B. Phillips (ed), *Manual of methods for general bacteriology.* American Society for Microbiology, Washington, D. C.

Spaink H. P., R. J. H. Okker, C. A. Wijffelman, E. Pees, and B. J. J. Lugtenberg. 1987. Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* *sym* plasmid pRL1JI. *Plant Molecular Biology.* **9:** 27-39.

Spiess E., C. Sommer, and H. Görisch. 1995. Degradation of 1,4 dichlorobenzene by *Xanthobacter flavus* 14pl. *Appl. Environ. Microbiol.* **61:** 3884-3888.

Sprenger, G. A., B. A. Hammer, E. A. Johnson, and E. C. C. Lin. 1989. Anaerobic growth of *Escherichia coli* on glycerol by importing genes of the *dha* regulon from *Klebsiella pneumoniae*. *J. Gen. Microbiol.* **135:** 1255-1262.

Steiert, J. G., and R. L. Crawford. 1986. Catabolism of pentachlorophenol by a *Flavobacterium* sp. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **141:** 825-830.

Stock, J. B., and M. G. Surette. 1996. Chemotaxis, p. 1103-1129. In F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed), *Escherichia coli* and *Salmonella: cellular and molecular biology*, 2nd ed., vol. 1. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Tsuda, M., and T. Iino. 1990. Naphthalene degrading genes on plasmid NAH7 are on a defective transposon. *Mol. Gen. Genet.* **223:** 33-39.

Thorsted, P. B., D. P. Macartney, P. Akhtar, A. S. Haines, N. Ali, P. Davidson, T. Stafford, M. J. Pocklington, W. Pansegrau, B. M. Wilkins, E. Lanka, and C. M. Thomas. 1998. Complete sequence of the IncP β plasmid R751: implications for evolution and organisation of the IncP backbone. *J. Mol. Biol.* **282:** 969-990.

Uotila, J. S., V. H. Kitunen, T. Coote, T. Saastamoinen, M. Salkinoja-Salonen, and J. H. Apajalahti. 1995. Metabolism of halohydroquinones in *Rhodococcus chlorophenolicus* PCP-1. *Biodegradation.* **6:** 119-126.

- Van der Meer, J. R., A. J. B. Zehnder, and W. M. de Vos. 1991. Identification of a novel composite transposable element, Tn5280, carrying chlorobenzene dioxygenase genes of *Pseudomonas* sp. strain P51. *J. Bacteriol.* **173**: 7077-7083.
- Van der Meer, J. R., W. M. de Vos, S. Harayama, and A. J. B. Zehnder. 1992. Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiol. Rev.* **56**: 677-694.
- Van der Meer, J. R. 1997. Evolution of novel metabolic pathways for the degradation of chloroaromatic compounds. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **71**: 159-178.
- Van der Meer, J. R., R. Ravatn, V. Sentchilo. 2001. The *clc* element of *Pseudomonas* sp. strain B13 and other mobile degradative elements employing phage-like integrases. *Arch. Microbiol.* **175**: 79-85.
- Wackett, L. P. 1994. Dehalogenation in environmental biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **5**: 260-265.
- Walters, D. M., V. L. Stirewalt, and S. B. Melville. 1999. Cloning, sequence, and transcriptional regulation of the operon encoding a putative N-acetylmannosamine-6-phosphate epimerase (*nanE*) and sialic acid lyase (*nanA*) in *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.* **181**: 4526-4532.
- Wang, Y., M. Rawlings, D. T. Gibson, D. Labbe, H. Bergeron, R. Brousseau, and P. C. Lau. 1995. Identification of a membrane protein and a truncated LysR-type regulator associated with the toluene degradation pathway in *Pseudomonas putida* F1. *Mol. Gen. Genet.* **246**: 570-579.
- Wattiau, P., L. Bastiaens, R. van Herwijnen, L. Daal, J. R. Parsons, M.-E. Renard, D. Springael, G. R. Cornelis. 2001. Fluorene degradation by *Sphingomonas* sp. LB126 proceeds through protocatechuic acid: a genetic analysis. *Res. Microbiol.* **152**: 861-872.
- Wierenga, R. K., P. Terpstra, and W. G. J. Hol. 1986. Prediction of the occurrence of the ADP-binding $\beta\alpha\beta$ -fold in proteins, using an amino acid sequence fingerprint. *J. Mol. Biol.* **187**: 101-107.
- Wolgel, S. A., J. E. Dege, P. E. Perkins-Olson, C. H. Juarez-Garcia, R. L. Crawford, E. Münck, and J. D. Lipscomb. 1993. Purification and characterization of protocatechuate 2,3-dioxygenase from *Bacillus macerans*: a new extradiol catecholic dioxygenase. *J. Bacteriol.* **175**: 4414-4426.
- Wong, A. S., and D. G. Crosby. 1978. Photolysis of pentachlorophenol in water, p. 19-25. In K. R. Rao (ed.). *Environmental toxicology*, New York, London. Plenum Press.
- Xun, L. 1996. Purification and characterization of chlorophenol 4-monooxygenase from *Burkholderia cepacia* AC1100. *J. Bacteriol.* **178**: 2645-2649.
- Yrjälä, K., L. Paulin, M. Romantschuk. 1997. Novel organization of catechol *meta*-pathway genes in *Sphingomonas* sp. HV3 pSKY4 plasmid. *FEMS Microbiol. Lett.* **154**: 403-408.
- Zaborina, O., M. Latus, J. Eberspacher, L. A. Golovleva, and F. Lingens. 1995. Purification and characterization of 6-chlorohydroxyquinol 1,2-dioxygenase from *Streptomyces rochei* 303: comparison with an analogous enzyme from *Azotobacter* sp. strain GP1. *J. Bacteriol.* **177**: 229-234.
- Zaborina, O., D. L. Daubaras, A. Zago, L. Xun, K. Saido, T. Klem, D. Nikolic, and A. M. Chakrabarty. 1998. Novel pathway for conversion of chlorohydroxyquinol to maleylacetate in *Burkholderia cepacia* AC1100. *J. Bacteriol.* **180**: 4667-4675.
- Zhou, N.-Y., S. L. Fuenmayor, and P. A. Williams. 2001. *nag* Genes of *Ralstonia* (formerly *Pseudomonas*) sp. strain U2 encoding enzymes for gentisate catabolism. *J. Bacteriol.* **183**: 700-708.

ANEXO I
ARTICULO PUBLICADO

Fri, 03 May 2002

Gloria Soberón-Chávez
Instituto de Biotecnología, UNAM
Apdo Postal 510-3,
Cuernavaca, Morelos, 62250
México

Dear Colleague,

I am pleased to inform you that your paper

Author(s): **LG Treviño-Quintanilla, Galán-Wong LJ, Rodríguez-Uribe B, Soberón-Chávez G.**

Title: **Cloning and characterization of a FAD-monoxygenase gene (*cadA*) involved in degradation of chloranilic acid (2,5-dichloro-3,6-dihydroxybenzo-1,4-quinone) in *Pseudomonas putida* TQ07.**

Has been accepted for **Applied Microbiology and Biotechnology** and is being sent to the publishers. As you know, each article is limited to six (6) printed pages (i.e., approximately 18 manuscript pages including figures and tables). 250 US will be charged for each page exceeding this limit. In case you have not included your e-mail (if available) and fax number on the title page of your manuscript, please send this information to:

Sabine Heine (e-mail: s.heine@springer.de)
Springer-Verlag, Journal Production Dept.
Heidelberger Platz 3
D-14197 Berlin, Germany
Fax: +49-30-34005-350

In all correspondence, please quote the following manuscript number: **10174**

Yours sincerely

A. Steinbüchel
Editor-in-Chief

Applied Microbiology and Biotechnology
Prof. Dr. A. Steinbüchel (Editorial Assistant: Dirk Baumeister)
Institut für Mikrobiologie
Correnstrasse 3, D-48149 Münster, Germany
e-mail: amb@uni-muenster.de

Cloning and characterization of a FAD-monooxygenase gene (*cadA*) involved in degradation of chloranilic acid (2,5-dichloro-3,6-dihydroxybenzo-1,4-quinone) in *Pseudomonas putida* TQ07.

LUIS GERARDO TREVIÑO-QUINTANILLA¹, LUIS JESÚS GALÁN-WONG², BLANCA RODRÍGUEZ-URIBE³ AND GLORIA SOBERÓN-CHÁVEZ^{1*}.

*Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México*¹.
*Departamento de Microbiología Industrial, Facultad de Ciencias Biológicas*²,
*Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Químicas*³, *Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México.*

*Corresponding author mailing address: Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, UNAM. Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca Morelos 62251, México. Telephone: (52) (777) 3291634. Fax: (52) (777) 3172388. E-mail: gloria@ibt.unam.mx

ABSTRACT

A bacterium culture was isolated on the basis of its ability to degrade chloranilic acid, and was later identified as *Pseudomonas putida* (TQ07). Several transposon insertion mutants unable to degrade chloranilic acid were selected. The characterization of the site of insertion of one of these mutants led to the identification of the *cadA* gene encoding an enzyme with significant homology with FAD-monooxygenases involved in the degradation of aromatic and chloroaromatic compounds. The finding that, after replacing the mutant allele with the wild-type one, the strain recovered the wild-type pattern of "halo" formation (a zone of clearing color on agar plates around TQ07 colonies that degrade chloranilic acid) and degradation of chloranilic acid unequivocally assigned *cadA* a function in the metabolism of this compound. We also found that most of the transposon insertion mutants unable to degrade chloranilic acid are clustered in a 10-kb region of the *P. putida* genome that is encoded in a megaplasmid or in an unstable chromosomal region.

INTRODUCTION

Several authors have reported that the microbial degradation of simple aromatic or chloroaromatic compounds involves catechol or chlorocatechol intermediates which are further metabolized via the *ortho* or modified *ortho* cleavage pathway (Van der Meer et al. 1992). On the other hand, some polychlorinated and

polynucleoaromatic compounds such as 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (Zaborina et al. 1998); 2,4,6-trichlorophenol (Li et al. 1991); γ -hexachlorocyclohexane (Miyachi et al. 1998); pentachlorophenol (Steiert and Crawford 1986); and dibenzo-p-dioxin (Armengaud et al. 1999) are converted to chlorohydroxyquinol intermediates. These compounds are spontaneously oxidized during degradation to their corresponding benzoquinone derivatives, which are colored compounds (Steiert and Crawford 1986). Chloranilic acid is a benzoquinone which has a violet-red color in water solutions, and that has a similar structure in its reduced form to chlorohydroxyquinol intermediates. Chloranilic acid has been identified as a by-product in different kinds of kraft mill bleachery effluents in concentrations comparable with those of the most abundant chloroguaiacols and chlorocatechols. The persistence of chloranilic acid and its susceptibility to microbial attack in the environment is unknown, but its recovery from biologically treated kraft pulp effluents suggests that it is not readily degraded under such conditions (Remberger et al. 1991). The violet-red color of chloranilic acid makes this compound a very useful molecule to isolate microorganisms able to degrade it and enables the study of its degradation pathway.

We report here the isolation and identification of a *Pseudomonas putida* strain TQ07, which is able to use chloranilic acid as sole carbon and energy source. Different *P. putida* TQ07 transposon insertion mutants unable to degrade chloranilic acid were selected. We also present the characterization of the gene disrupted in one of these mutants showing that it codes for an enzyme (CadA) whose homologs have not been reported to participate in the degradation of chloroaromatic compounds in other microorganisms. Several of the transposon insertion mutants selected are clustered in a 10-kb region of the *P. putida* TQ07 genome that is encoded in a megaplasmid or in an unstable chromosomal region.

MATERIALS AND METHODS

Microbiological methods. *Pseudomonas putida* TQ07 was grown in the following minimal salts medium (MM): deionized water, 1000 ml; K_2HPO_4 1.0 g; KH_2PO_4 0.5 g; NH_4NO_3 1.0 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g; NaCl, 0.1 g; and $FeCl_3$ 0.02 g (final pH 6.8) or in nutrient broth (NB): deionized water, 1000 ml; beef extract 3.0 g; and peptone 5.0 g. Chloranilic acid (Aldrich Chemical Company) was

dissolved in filter-sterilized water and added to the medium at a final concentration of 400 mg/l. *Escherichia coli* HB101 was cultured on LB medium at 37°C. Biodegradation experiments were conducted in 250 ml Erlenmeyer flasks, each containing 50 ml of MM and inoculated with 2.5 ml of a 48 h MM culture. The flasks were incubated at 30°C in an incubator shaker at 250 rpm. Cell growth was monitored by measuring optical density at 600 nm. Antibiotics were incorporated at the following concentrations: for *E. coli* ampicillin, 200 µg/ml; kanamycin, 50 µg/ml and tetracycline, 20 µg/ml; for *P. putida* TQ07 chloramphenicol, 50 µg/ml; nalidixic acid, 50 µg/ml; kanamycin, 50 µg/ml and tetracycline, 20 µg/ml.

Analytical methods. Chloranilic acid degradation was quantified by the following techniques: UV spectrophotometry, measuring the reduction of absorbance at 243 nm and determining the concentration by comparison with different chloranilic acid solutions of known concentration. Chloride ion release during chloranilic acid degradation was determined by a turbidimetric method (Frank and Fosch 1992). Chemical oxygen demand (COD) was measured by the closed reflux colorimetric assay (Clesceri et al. 1989).

Bacteria identification. Bacterium was identified based as described in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Palleroni 1984). Microbiological and biochemical tests were performed as described previously (Smibert and Krieg 1981). In addition, the cellular fatty acid composition was analyzed by Microbial ID, Inc. (Newark, Del.).

Plasmid visualization. For detection of any catabolic plasmid from *P. putida* TQ07, two electrophoretic methods (Eckardt 1978; Kado and Liu 1981) were employed.

Transposon mutagenesis. Random transposon mutagenesis of TQ07 was carried out with a pUT derivative containing the mini-Tn5*lacZ2* transposon (De Lorenzo et al. 1990).

Bacterial matings. The *P. putida* TQ07 library was mobilized from *E. coli* HB101 to chloranilic acid mutants in a triparental mating by using the helper plasmid pRK2013 (Figurski and Helinki 1979), transformants were selected on NB plates supplemented with chloranphenicol and tetracycline.

DNA manipulations. Standard procedures for restriction endonuclease digestion, agarose gel electrophoresis, purification of DNA from agarose, DNA ligation and

Southern blot hybridization were carried out as described previously (Sambrook et al. 1989).

Gene library construction. *P. putida* TQ07 total DNA was partially digested with *Sau*3AI. DNA fragments of 20 to 30-kb in size were ligated into *Bam*HI digested pCP13 a broad-host-range cosmid vector (Darzins and Chakrabarty, 1984). The ligated DNA was packaged *in vitro* into a lambda phage particle by using Gigapack plus (Amersham Corp., Arlington Heights, IL). Recombinant phage were transfected into *E. coli* HB101. Transfected cells were selected as tetracycline resistance on LB plates.

Collection number of strain TQ07. The strain TQ07 used in this study was deposited in the public culture collection of IIB-UNAM WDCM48 (<http://wdcm.nig.ac.jp/>) with the collection number BM-B-381.

Nucleotide sequence accession number. The nucleotide sequence of the TQ07 *cadA* gene reported here has been deposited in the GenBank database under accession number: AF421356.

RESULTS

Isolation and identification of a bacterium able to use chloranilic acid as sole carbon source. To obtain a bacterium able to efficiently degrade chloranilic acid we tested different environmental samples for chloranilic acid degradation following the disappearance of the characteristic violet-red color of this compound present in a defined culture medium (MM). The samples tested included activated sludge from different water treatment plants, oil-polluted soil and sawdust from a sawmill plant in northern Mexico. The only sample showing chloranilic acid degradation activity was the sawdust sample, from which we isolated a gram-negative, catalase and oxidase-positive rod that did not form capsule or spores. It presents a single polar flagellum and forms tiny gray colonies on MM. When this bacterium was grown on MM plates with chloranilic acid as sole carbon source a clear halo was formed around colonies, this bacterium was called TQ07. Glucose, fructose, arabinose, xylose, succinate, acetate, citrate, lactate, pyruvate, tartrate, malonate, glutamate, glycerol, ethanol, *n*-propanol, and *n*-butanol also supported growth. No growth occurred with saccharose, maltose, lactose, starch, trehalose, sorbitol, and rhamnose. These characteristics led us to the classification of strain TQ07 as *Pseudomonas* sp. Fatty acid analysis

performed by Microbial ID, Inc. (Newark, Del.) allowed the unambiguous identification of the isolated strain as *Pseudomonas putida*.

P. putida TQ07 ability to degrade chloranilic acid was determined using different chloranilic acid concentrations in the culture medium. We found that bacterial growth and chloride release showed a strict linear relation (data not shown). The doubling time of *P. putida* TQ07 in MM with 400 mg/l of chloranilic acid as carbon source is less than 5 h and this bacterium present a 16 h growth lag (Fig. 1). To determine whether chloranilic acid was completely degraded by *P. putida* strain TQ07 we determined, along a 48 h growth period, the extent of chloride ion release, the chemical oxygen demand (COD), as well as the rupture of the chloranilic acid ring (Fig. 1).

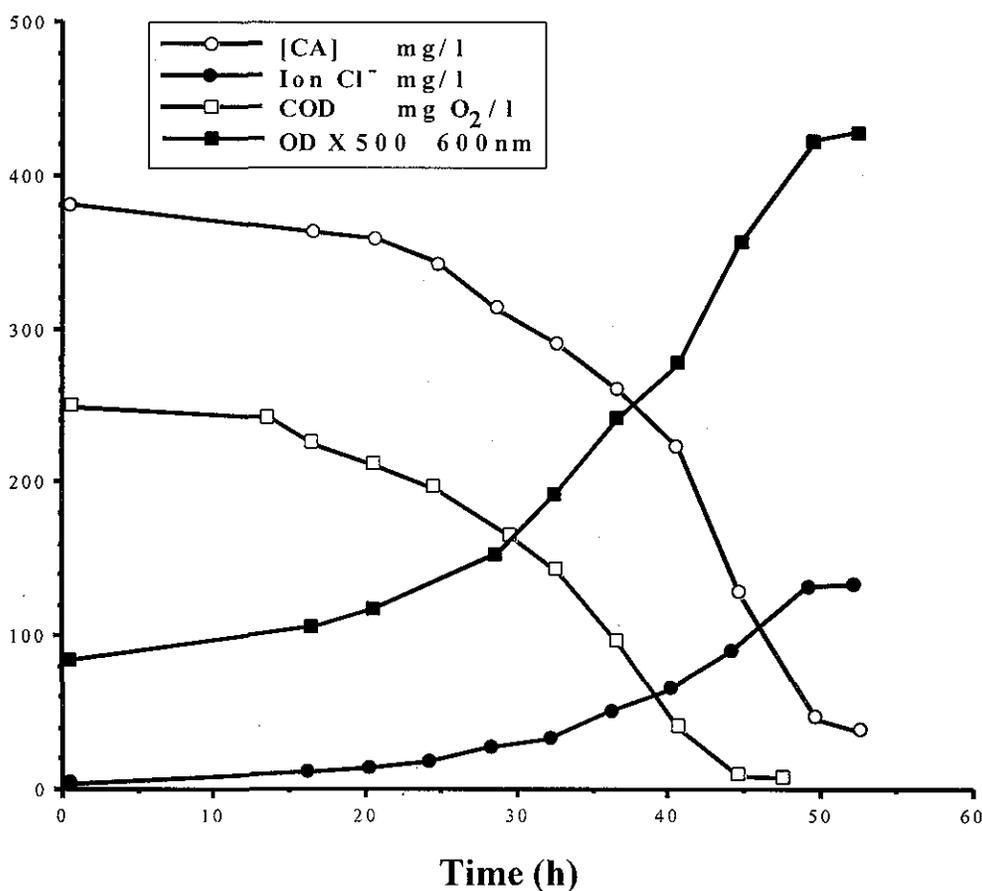


Fig. 1. Growth of *Pseudomonas putida* strain TQ07 with chloranilic acid as the only carbon source and degradation of this compound. Symbols correspond to: ■ optical density at 600 nm are multiplied for 500, ○ concentration of chloranilic acid ([CA]) mg/l, ● chloride release mg/l (subtracting the chloride concentration that is part of the culture medium), and □ chemical oxygen demand (COD) mg O₂/l.

We found that after this period more than 95% of the chloride supplied as part of the chloranilic acid molecule was released to the culture medium, that the supernatant COD decreased 97% and that 92% of the chloranilic acid was degraded. These results show that *P. putida* TQ07 is an efficient chloranilic acid degrading bacterium, but it was also apparent that it has an extremely limited substrate range since no other aromatic or chloroaromatic compounds could be used as source of carbon (data not shown). This behavior is atypical of bacteria able to catabolize chloroaromatic compounds.

Selection and characterization of TQ07 mutants unable to degrade chloranilic acid. *P. putida* TQ07 forms uncolored halos around the colonies when grown on nutrient agar supplemented with chloranilic acid (Fig. 2). Using this phenotype we isolated 18 mutants of 3000 mini-Tn5lacZ2 insertions that were defective in halo formation on nutrient broth agar supplemented with chloranilic acid (Fig. 2).

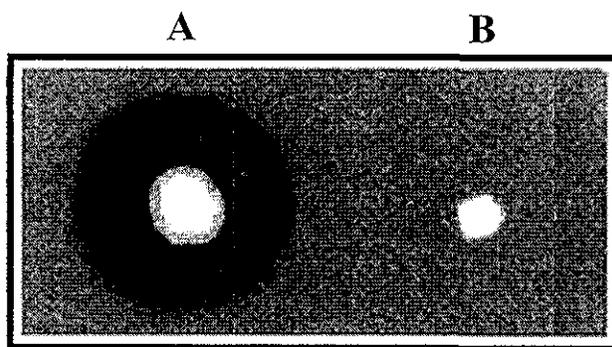


Fig. 2. Phenotype of *Pseudomonas putida* TQ07 mutants defective in chloranilic acid degradation: (A) TQ07 wild type; and (B) Cad mutants.

None of the isolated mutants were able to grow on minimal salt medium with chloranilic acid as carbon source, and 16 of them were able to grow with pyruvate or succinate as substrates, suggesting that they were specifically affected in the chloranilic acid degradation pathway. The 16 mutants unable to specifically degrade chloranilic acid (Cad mutants) were the product of a single transposon insertion as judge by the pattern of Southern blot hybridization using mini-Tn5lacZ2 as probe (data not shown). The Cad mutants were classified into five groups depending on the size of the *Pst*I fragment that hybridized with the mini-Tn5lacZ2 transposon (data not shown). Here we show the characterization of the gene (*cadA*) disrupted in mutant Cad26. This mutant, as other three Cad mutants,

has the mini-*Tn5lacZ2* transposon insertion on a 17-kb *Pst*I fragment as judged by the increase in size of the hybridizing band where the transposon was inserted (Fig. 3) and hybridization with mini-*Tn5lacZ2* transposon (data not shown).

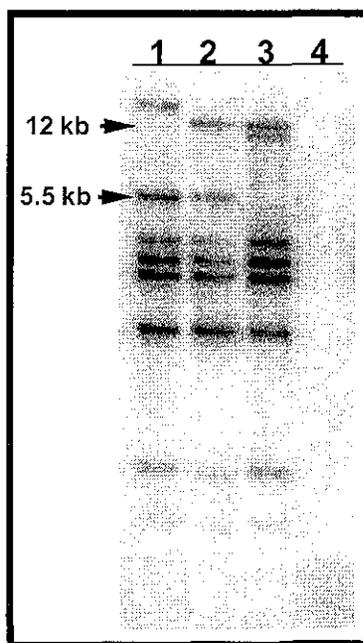


Fig. 3. Southern blot hybridization of total DNA digested with *Pst*I endonuclease from *Pseudomonas putida* TQ07 mutants unable to degrade chloranilic acid using pLG3020 as probe. Lanes correspond to: 1) Hybridization pattern of mini-*Tn5lacZ2* insertions within the pLG3020 12-kb fragment. Mutants 26, 58, 64 and 78 present this pattern. 2) Hybridization pattern of the wild type TQ07 strain and other mutants with insertions not contained in the genomic region of pLG3020 insert. 3) Hybridization pattern of mini-*Tn5lacZ2* insertions within the pLG3020 5.5-kb fragment. Mutants 50 and 82 present this pattern. 4) Hybridization pattern of the spontaneous TQ07 Cad mutants.

Identification of the *cadA* gene. The 17-kb *Pst*I fragment containing the mini-*Tn5lacZ2* transposon was cloned from mutant Cad26 onto plasmid pBluescript SK+ rendering plasmid pCA17.

A broad-host-range cosmid vector pCP13 was used for the construction of a gene library of TQ07 total DNA. This gene library was screened by colony hybridization using the 17-kb pCA17 insert as probe. A cosmid clone (pLG3020) that hybridized with this probe was later shown to complement mutant Cad26 for halo formation on nutrient agar supplemented with chloranilic acid and for growth on MM with this compound as sole carbon source. The pLG3020 *Pst*I fragments were subcloned onto the broad host range vector pMP220 (Spaink et al. 1987) and

the recombinant plasmids were transferred to mutant Cad26. As expected, this mutant was fully complemented by plasmid pLG12PP containing the 12-kb *Pst*I insert (Fig 4). To localize in more detail the gene that complemented mutant Cad26 a series of deletion plasmids were constructed with several restriction endonucleases (Fig. 4). From this analysis we defined that the 3-kb region contained in plasmid pLG3EX encoded the gene disrupted in mutant Cad26 (Fig. 4).

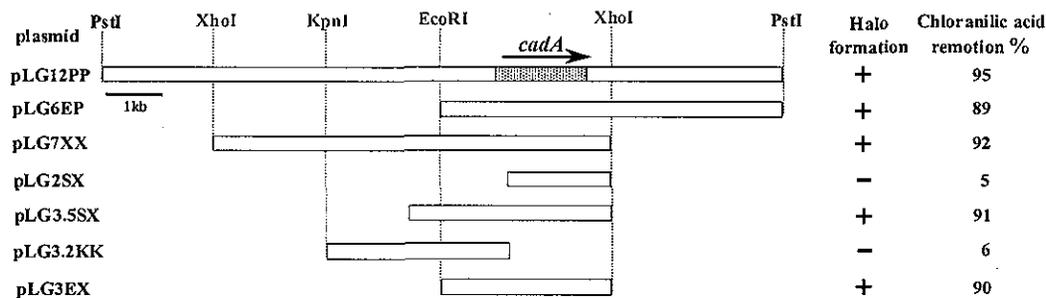


Fig. 4. Partial restriction map and deletion analysis of the pLG12PP 12-kb *Pst*I fragment. The direction of *cadA* transcription is shown. The measurement of chloranilic acid degradation and halo formation is described in Material and Methods.

The nucleotide sequence of the 3-kb pLG3EX insert revealed one open reading frame (ORF) of 1662 bp (here called *cadA*) and no other ORF was identified in this region. This result suggests that *cadA* was the gene disrupted in mutant Cad26. This conclusion was confirmed by sequencing the regions of the pCA17 insert flanking the mini-Tn5*lacZ2* transposon insertion (Fig. 5). The *cadA* gene was preceded by a putative ribosome binding sequence at -12 nucleotides from the translational start site. Analysis of the *cadA* upstream sequence with the promoter prediction program (<http://www.fruitfly.org/seq-tools/promoter.html>) revealed the sequence TGGATA-N₁₇-TAGAAC at positions -68 to -40 with respect to the ATG start codon. This sequence is homologous to the promoters recognized by RNA polymerase containing the σ^{70} subunit TTGACA-N_{17±1}-TATAAT (Deretic et al. 1989).

The deduced amino acid sequence of the protein encoded by the *cadA* gene is a polypeptide of 553 amino acid residues showing a significant homology over the whole sequence with FAD-dependent monooxygenases involved in the degradation of aromatic and chloroaromatic compounds. The proteins showing the highest homology are 2,4-dihydroxybenzoate monooxygenase (DxnD) from

Sphingomonas paucimobilis RW1 (Armengaud et al. 1999); a putative polyketide hydroxylase (SchC) from *Streptomyces halstedii* (Blanco et al. 1993); and 3-(2-hydroxyphenyl) propionic acid monooxygenase (OhpB) from *Rhodococcus* sp. (Powell and Archer 1998). DxnD, SchC and OhpB showed overall identities to CadA, of 34%, 29% and 27%, respectively. The alignment of *P. putida* TQ07 CadA and *Sphingomonas paucimobilis* RW1 DxnD is shown in figure 5. On the other hand, we found that CadA has a small motif that was identified as involved in FAD binding in all proteins containing this cofactor (Eggink et al. 1990). CadA also contains 11 of the 18 amino acid residues that are conserved in all phenol-hydroxylases (Kukor and Olsen 1992) and a $\beta\alpha\beta$ ADP binding motif (Wierenga et al. 1986) that has been found in many FAD-dependent hydroxylases (Fig. 5).

CadA	M-----	-----	-----	-----	-----	1
DxnD	HGAWAKCEFV	UHLTORAKSP	NNLPPPPAGK	GQITPKAUHI	IKASQILTKL	50
CadA	-----	-----	TESKUIVIQA	GAUGLTLAMD	LASPDTEUUV	31
DxnD	SRPIAFRIMS	ICERIGMLPC	SEKRFIVGG	GPCDMLSDI	DLSRAGTFSIL	100
			♦♦♦♦♦	♦♦♦♦♦	♦♦♦♦♦	
CadA	UETARAGEAP	AUKCNSISSR	SMEUYARLQ	AKKIHVEUGP	SDHSTDLST	81
DxnD	LQAK-PRTRK	NPQARATQAR	TMEHVARLGF	SKEIRSLGPA	KQVPTDIRVF	149
	♦					
CadA	TSUTGIPLSR	LVLPSANGAK	EGUPSPOSM	PTPEPSRAN	QIFFEPUIFE	131
DxnD	TRYSKQELAR	FQLRSGDAD	RAIRKIGGS	TGRELPAVP	QMVVEULAR	199
CadA	HASKQSRITL	LNARHEFEYU	QEKHARVAV	ADLDSSEIKE	ISGAVYUCCD	181
DxnD	HARESELASU	NVGWRHIDFE	QARDGCSATU	EEARTKQAK	IRAEVYUQAD	249
CadA	QSSSIIIRTHI	GATFIQTPI	QK-----VQ	SSFIRAPKLL	ELIGSNPAM	225
DxnD	QARSIVARSAL	GISVAGETGV	HADFFGGTIV	ALYLARADFY	DQUKASRAM	299
CadA	YVALNPRACG	TIRIIOGKER	WNUHNFVNH	EDYDDIDRDV	RIARQLLGDEP	275
DxnD	YMAFVREARS	WLRARUNGDE	FSPHTQCKPG	EDATIDEARA	HELFLQQVMGM	349
			In5			
CadA	DFEVEISQE	NWU-GRANVA	DKHRDGRFI	AGDACHLIE	RAQVDMNAGI	324
DxnD	ALDIEIDMG	TKVADHALYU	EQMUSAVIL	AGDARHFTF	AGSLGVNTAV	399
				x x		
CadA	ADADLAKML	ARSCQGHADA	GILDAVEAEK	KPI TEQISNI	ITEMRVARUMH	374
DxnD	EDAMLGAKL	ARRILKQDAGP	ELERSYEFER	SKLAKANTGV	ARGLADSTGM	449
	x x x	x x x	x x x			
CadA	QRANVEDII	EEDSPAGEERS	RKRUGEQSH	LELQQCSAG	LNYGVFYSBS	424
DxnD	---FIRSPAL	EEDSPEGVAA	RKERSDYLNT	HARKEFNIPG	UTFGGRYDGS	496
CadA	PIIAYDGDH	RAYSMHEVQP	STURDCRAPH	UHLLEGARSLV	DELGPVYITLU	474
DxnD	AVIUPDGSDA	PPDTANEVIQ	SATPDCRAPH	HLDDGASLV	DTFDFEWTLL	546
CadA	RIDBTISIGP	-LVOARHKAN	UPIKULQKP	SEADGQVETG	LTLVARDQVU	523
DxnD	PLVPGAGAGA	DLIARREARG	LQKLUUQVPT	SEARALVESD	CUIIRADQIU	596
CadA	ARAGNSUPDD	A---EQEVEL	IAGVAVR-AR	TREU		553
DxnD	GRSHREPYDA	NAUFDDLELGH	VASTSQVATE	AGAL		630

Fig. 5. Comparison of the deduced amino acid sequences of *cadA* and *dxdD*. The amino acid residues are shown in one-letter code. The amino acid residues that are conserved in the sequences compared are shadowed. Rhombuses point out the amino acid residues presumably involved in FAD-binding. The putative ADP-binding site is underlined. Crosses indicate the 11 of 18 amino acid residues that are conserved among phenol hydroxylases.

Several genes involved in chloranilic acid degradation are clustered in the *P. putida* TQ07 genome. To determine whether other genes involved in chloranilic acid degradation were linked to *cadA* we did a Southern blot analysis of total DNA extracted from the 16 Cad mutants, using the pLG3020 as probe. Using this approach we determined that other five Cad mutants (Cad50, Cad58, Cad64, Cad78 and Cad82) contained the mini-Tn*SlacZ2* transposon insertion in the TQ07 genome region cloned in plasmid pLG3020 (Fig. 3). Partial sequence of the DNA disrupted by the transposon in each of these mutants showed that they contained the transposon insertion in different genes. As expected these five mutants were fully complemented by plasmid pLG3020 for halo formation on nutrient agar supplemented with chloranilic acid and for growth on chloranilic acid as sole carbon source (data not shown).

Escherichia coli HB101 containing plasmid pLG3020 makes degradation halos when grown on nutrient agar supplemented with chloranilic acid, but was unable to grow with this compound as sole source of carbon (data not shown). This result suggests that most, but not all genes encoding proteins involved in chloranilic acid degradation are clustered in the TQ07 region cloned in plasmid pLG3020.

Chloranilic acid catabolic genes are genetically unstable. Generally, the genes encoding the enzymes involved in the degradation of aromatic compounds are plasmid encoded in *P. putida* (Hardman et al. 1986). To determine whether the chloranilic acid catabolic pathway was plasmid encoded in strain TQ07 we used different methods to visualize plasmid DNA, but these experiments were not successful. We could not visualize plasmid molecules in *P. putida* TQ07, even using techniques that permit the visualization of *Rhizobium* megaplasmids (Eckardt 1978; Kado and Liu 1981), and that worked in our hands (data not shown). However upon several subcultures in nutrient agar supplemented with chloranilic acid we detected some TQ07 derivatives that were not longer able to form degradation halos. Southern blot analysis of total DNA extracted from these spontaneous TQ07 Cad mutants using plasmid pLG3020 as probe revealed that they lack all the sequences homologous to the cosmid insert (Fig. 3). These results strongly suggest that at least part of the chloranilic acid degradation pathway, including the *cadA* gene and the genes contained in plasmid pLG3020 are encoded in a megaplasmid or else in an unstable chromosomal region.

DISCUSSION

We selected chloranilic acid as a model compound to study the biodegradation of chloroaromatics because there are several reports in the literature that suggested that benzoquinones are intermediates in the degradation of chloro or nitro aromatic compounds in different microorganisms. These reports include pentachlorophenol degradation by *Flavobacterium* sp. (Steiert and Crawford 1986); *p*-nitrophenol assimilation by a mutant derivative of *Arthrobacter* sp. JS1490 (Jain et al. 1994); 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid degradation by *Burkholderia cepacia* AC1100 (Zaborina et al. 1998); and 2,4-dinitrotoluene catabolism in *Burkholderia* sp. DNT (Haigler et al. 1996). Unexpectedly however, we isolated a *Pseudomonas putida* strain (TQ07) which was a very efficient chloranilic acid degrader (Fig. 1), but which was unable to degrade other chloroaromatic compounds. *P. putida* TQ07, however, has a potential use in chloranilic acid degradation in water and soil polluted environments.

We studied in detail one transposon-derived Cad mutant and showed that a single gene (*cadA*) was inactivated. The analysis of CadA amino acid sequence suggested that this enzyme was a FAD-dependent monooxygenase involved in chloranilic acid catabolism. Our results unequivocally assigned CadA a function in degradation of chloranilic acid, but at present we do not know its role in this catabolic pathway. We are now working in the molecular characterization of other Cad mutants and in the identification of chloranilic acid degradation intermediaries in order to understand the *P. putida* TQ07 catabolic pathway.

We determined that several genes encoding enzymes involved in chloranilic acid degradation (*cad*) are clustered in the *P. putida* TQ07 chromosome and that this genetic region is unstable. It is thus possible that the *cad* genes are encoded in an insertion element, which is integrated in the chromosome. Recently two conjugative catabolic transposons were reported: The *clc* gene cluster of *Pseudomonas* sp. strain B13 conferring 3-chlorobenzoate degradation is present on the chromosome as a 105-kb mobile genetic element (*clc* element) (Ravath et al. 1998). The *bph* and *sal* gene clusters of *P. putida* KF715 that encode for salicylate and biphenil degradation respectively are present on the KF715 chromosome in a 90-kb mobile genetic element too (*bph-sal* element) (Nishi et al. 2000).

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was financed in part by CONACyT through project 0028. L. G. Treviño-Quintanilla thanks CONACyT and PADEP-UNAM for financial support during his Ph.D. studies.

REFERENCES

Armengaud J, Timmis KN, Witich RM (1999) A functional 4-hydroxysalicylate / hydroxyquinol degradative pathway gene cluster is linked to the initial dibenzo-p-dioxin pathway genes in *Sphingomonas* sp. strain RW1. *J Bacteriol* 181: 3452-3461

Blanco G, Pereda A, Brian P, Mendez C, Chater KF, Salas JA (1993) A hydroxylase-like gene product contributes to synthesis of a polyketide spore pigment in *Streptomyces halstedii*. *J Bacteriol* 175: 8043-8048

Clesceri LS, Greenberg AE, Trussell RR (1989) Standard Methods for the examination of water and wastewater, 3rd edn. Port City Press, Baltimore, Maryland

Darzins A, Chakrabarty AM (1984) Cloning of genes controlling alginate biosynthesis from a mucoid cystic fibrosis isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 159: 9-18

De Lorenzo V, Herrero M, Jakubzik V, Timmis KN (1990) Mini-*Tn5* transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J Bacteriol* 172: 6568-6572

Deretic V, Konyecsni WM, Mohr CD, Martin DW, Hibler W (1989) Common denominators of promoter control in *Pseudomonas* and other bacteria. *Bio/technol.* 7: 1249-1254

Eckardt T (1978) A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* 1: 584-588

Eggink G, Engel H, Vriend G, Terpstra P, Witholt B (1990) Rubredoxin reductase of *Pseudomonas oleovorans*: structure relationship to other flavoprotein oxidoreductases based on one NAD and two FAD finger prints. *J Mol Biol* 212: 135-142

Figurski DH, Helinski DR (1979) Replication of an origin-containing derivate of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 1648-1652

Frank KH, Fosch DD (1992) Utilization of 3-chloro-2-methyl benzoic acid by *Pseudomonas cepacia* MB2 through *meta* fission pathway. *Appl Environ Microbiol* 57: 1920-1928

Haigler BE, Suen WC, Spain JC (1996) Purification and sequence analysis of 4-methyl-5-nitrocatechol oxygenase from *Burkholderia* sp. strain DNT. *J Bacteriol* 178: 6019-6024

Hardman DJ, Gowland PC, Slater JH (1986) Large plasmids from soil bacteria enriched on halogenated alkanolic acids. *Appl Environ Microbiol* 51: 44-51

Jain RK, Dreisbach JH, Spain JC (1994) Biodegradation of p-nitrophenol via 1,2,4-benzenetriol by an *Arthrobacter* sp. *Appl Environ Microbiol* 61: 1279-1289

Kado CI, Liu ST (1981) Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmid. *J Bacteriol* 145: 1365-1373

Kukor JJ, Olsen RH (1992) Complete nucleotide sequence of *tbuD*, the gene encoding phenol / cresol hydroxylase from *Pseudomonas pickettii* PK01, and functional analysis of the encoded enzyme. *J Bacteriol* 174: 6518-6526

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

- Miyauchi K, Suh SK, Nagata Y, Takagi M** (1998) Cloning and sequencing of a 2,5-dichlorohydroquinone reductive dehalogenase gene whose product is involved in degradation of γ -hexachlorocyclohexane by *Sphingomonas paucimobilis*. *J Bacteriol* 180: 1354-1359
- Nishi A, Tominaga K, Furukawa K** (2000) A 90-kilobase conjugative chromosomal element coding for biphenyl and salicylate catabolism in *Pseudomonas putida* KF715. *J Bacteriol* 182: 1949-1955
- Palleroni NJ** (1984) Gram-negative aerobic rods and cocci. In: Krieg NR, Holt JG (eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology* Vol 1. The Williams & Wilkins Co. Baltimore Maryland, pp 140-199
- Powell JAC, Archer JAC** (1998) Molecular characterization of a *Rhodococcus ohp* operon. *Anton Van Leeuwen*. 74: 175-188
- Ravath R, Studer S, Springael D, Zehnder AJB, van der Meer JR** (1998) 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
- Remberger M, Hynning PA, Neilson AH** (1991) 2,5-dichloro-3,6-dihydroxybenzo-1,4-quinone: Identification of a new organochlorine compound in kraft bleachery effluents. *Environ Sci Technol* 25: 1903-1907
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989) *Molecular cloning a laboratory manual*, 2nd edn. Harbor Laboratory Press, Cold Spring New York
- Smibert RM, Krieg NR** (1981) General characterization. In: Gerhardt RGE, Murray RN, Costilow RN, Nester EW, Wood WA, Krieg NR, Phillips GB (eds) *Manual of methods for general bacteriology*. ASM, Washington DC, pp 409-443
- Spaink HP, Okker RJH, Wijffelman CA, Pees E, Lugtenberg BJJ** (1987) Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* sym plasmid pRL1J1. *Plant Mol Biol* 9: 27-39
- Steiert JG, Crawford RL** (1986) Catabolism of pentachlorophenol by a *Flavobacterium* sp. *Biochem Biophys Res Commun* 141: 825-830
- Van der Meer JR, de Vos WM, Harayama S, Zehnder AJB** (1992) Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiol Rev* 56: 677-694
- Wierenga RK, Terpstra P, Hol WGJ** (1986) Prediction of the occurrence of the ADP-binding $\beta\alpha\beta$ -fold in proteins, using an amino acid sequence fingerprint. *J Mol Biol* 187: 101-107
- Zaborina O, Daubaras DL, Zago A, Xun L, Saido K, Klem T, Nikolic D, Chakrabarty AM** (1998) Novel pathway for conversion of chlorohydroxyquinol to maleylacetate in *Burkholderia cepacia* AC1100. *J Bacteriol* 180: 4667-4675