
BIODEGRADACIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS PERSISTENTES (COP): I. EL CASO DE LOS BIFENILOS POLICLORADOS (PCB)

Biodegradation Of Persistent Organic Pollutants (POPs): I The Case Of Polychlorinated Biphenyls (PCB)

ZIV ARBELI^{1,2*}

¹Dirección de Desarrollo Sectorial Sostenible, Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, Calle 37 No 8-40, Bogotá, Colombia.

²Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, A.A. 14490; Bogotá, D.C., Colombia. aziv@bt.unal.edu.co

*Dirección actual: Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental, Departamento de Biología, Pontificia Universidad Javeriana.

Presentado 31 de mayo de 2008, aceptado 10 de diciembre de 2008, correcciones 21 de enero de 2009.

RESUMEN

Los contaminantes orgánicos persistentes poseen propiedades tóxicas, son resistentes a la degradación, se bioacumulan y son transportados por el aire, el agua y las especies migratorias a través de las fronteras internacionales; en consecuencia se depositan lejos del lugar de su liberación, acumulándose en ecosistemas terrestres y acuáticos. Para atender a esta problemática a nivel mundial se firmó el 23 de mayo de 2001 el Convenio de Estocolmo. Aunque por ahora los COP están prohibidos en la mayoría de los países, todavía existen en el mundo muchos sitios contaminados con estas sustancias. La remediación de sitios que presentan contaminantes orgánicos persistentes requiere consideraciones distintas a las contempladas en la recuperación por contaminación de hidrocarburos. El siguiente texto revisa la literatura sobre la biodegradación anaeróbica y aeróbica de los bifenilos policlorados (PCB) y las posibles estrategias para estimular dicha biodegradación. La degradación de los demás COP será descrita en textos adicionales.

Palabras clave: contaminantes orgánicos persistentes (COP); bifenilos policlorados (PCB); biodegradación; biorremediación.

ABSTRACT

Persistent organic pollutants are chemicals that are toxic to humans and wildlife, remain intact in the environment for long periods, accumulate in living organisms and can become widely distributed geographically by air, water or migrating species. As a result, these contaminants have been found all over the world including in places, such as the Polar Regions, which are very far from their application site. The Stockholm Convention was signed in 23/5/01 in order to cope with this international

environmental problem. Although POPs were banned by most countries, there are still a lot of sites contaminated with these substances. The remediation of these sites is problematic and requires distinct considerations from those which are established for hydrocarbon remediation. This manuscript reviews the literature about anaerobic and aerobic biodegradation of polychlorinated biphenyls (PCB) and possible strategies to stimulate these processes. The degradation of the other POPs would be reviewed in additional texts.

Key words: Persistent organic pollutants (POPs); Polychlorinated biphenyls (PCB); Biodegradation; Bioremediation.

INTRODUCCIÓN

Los Contaminantes Orgánicos Persistentes (COP) son un grupo de sustancias sintéticas de alto riesgo para la salud humana y el medio ambiente. Estas sustancias han sido encontradas alrededor del mundo, incluidas algunas zonas muy alejadas de aquellas en donde se emplearon tales contaminantes, e.g. las zonas polares, además de poblaciones humanas e, incluso, en la leche materna (MacDonald *et al.*, 2000; Polder *et al.*, 2003; She *et al.*, 2007). Para atender esta problemática a nivel mundial, se firmó el 23 de mayo de 2001 el Convenio de Estocolmo. En el texto del convenio se describen las propiedades de los COP de la siguiente forma: “los contaminantes orgánicos persistentes tienen propiedades tóxicas, son persistentes a la degradación, se bioacumulan y son transportados por el aire, el agua y las especies migratorias, a través de las fronteras internacionales y depositados lejos del lugar de su liberación, acumulándose en ecosistemas terrestres y acuáticos” (Convenio de Estocolmo: http://www.pops.int/documents/convtext/convtext_sp.pdf).

Hasta ahora, las características de los COP incluidos en el Convenio de Estocolmo (esto es, PCB, dioxinas, furanos, aldrina, dieldrina, DDT, endrin, clordano, hexaclorobenceno, mirex, toxafeno y heptacloro) responden a patrones muy similares, pues se trata de moléculas orgánicas cíclicas cloradas; 11 de éstas son policíclicas. Por lo tanto, es posible realizar muchas generalizaciones sobre su degradación y comportamiento ambiental. No obstante, entre los candidatos a COP que se están discutiendo en estos momentos se encuentran sustancias con propiedades diferentes. El caso más llamativo es el del sulfonato de perfluorooctano (PFOS), no lipofílico, dispersable en agua por su capacidad tensioactiva, y que no se bioacumula en los tejidos grasos, sino mediante la unión a proteínas con una distribución muy diferente a la de los COP considerados hasta el momento. Evidentemente, la evaluación de esta sustancia requiere un modelo conceptual muy diferente al de los COP incluidos hasta la fecha (MAVDT, 2007a).

En los últimos años se han adelantado en Colombia algunas actividades relacionadas con los COP, entre las cuales se encuentra la prohibición de producción y uso de aldrin, dieldrin, endrin, mirex, toxafeno, hexaclorobenceno (HCB), DDT, heptacloro y clordano; se elaboraron inventarios de su existencia (MAVDT, 2007b; MAVDT, 2007c; MAVDT, 2007d); estudios sobre sus posibles efectos en la salud (MAVDT, 2007e) y análisis socio-económico sobre la implementación del Convenio de

Estocolmo en Colombia (MAVDT, 2007f). A partir de estos inventarios, actualmente se está desarrollando el Plan Nacional de Aplicación del Convenio de Estocolmo en Colombia.

La problemática colombiana relacionada con los sitios contaminados con estas sustancias está muy ligada al uso intensivo de plaguicidas y al manejo de transformadores eléctricos. El manejo inadecuado como consecuencia de la falta de conocimiento sobre su toxicidad y la carencia de normas y controles adecuados, puede conllevar a problemas de contaminación ambiental. En el campo agrícola grandes cantidades de plaguicidas se han tornado obsoletos, debido a la reducción del área sembrada de ciertos cultivos (por ejemplo, el caso del algodón), y a la prohibición del uso de algunos plaguicidas organoclorados. Estos plaguicidas fueron abandonados o enterrados, y posiblemente han contaminado las áreas en donde se encuentran. De igual forma, el manejo inadecuado de transformadores eléctricos o aceites dieléctricos contaminados con PCB en talleres de mantenimiento y en bodegas de almacenamiento son la causa de contaminación en el sector eléctrico. No obstante lo anterior, en el país aún no se ha abordado con suficiente rigor un inventario que incluya análisis químico de suelos, sedimentos o cuerpos de agua para la verificación de sitios sospechosos por contaminación de COP.

Por su naturaleza, los compuestos orgánicos persistentes son difíciles de degradar. La biodegradación, que para muchos contaminantes es el principal mecanismo de degradación, es limitada en el caso de los COP. La dificultad de degradación de COP se atribuye a su estructura química estable (gran tamaño molecular y alto número de cloros), a su carácter xenobiótico y a su baja biodisponibilidad, dada su baja solubilidad en agua y fuerte adsorción al suelo (Hatzinger y Alexander, 1995; Focht, 2003). Por lo tanto, el éxito de la bioremediación para tratar compuestos de tipo COP todavía es limitado. Por ello, las técnicas más usadas en el control de la contaminación por estos compuestos son la incineración, la excavación y disposición en rellenos sanitarios de seguridad y el aislamiento del contaminante en el sitio, mediante capas que eviten o disminuyan su dispersión y su contacto con organismos del tope de la pirámide trófica (Layton *et al.*, 1998; EPA, 2000; Magar, 2003; Ross, 2004).

En Colombia hay varias firmas con considerable experiencia en caracterización y remediación de sitios contaminados. Sin embargo, esta experiencia se basa principalmente en hidrocarburos. La remediación de sitios contaminados con COP se ha convertido en un reto en Colombia y en el exterior. El objetivo del presente documento es la revisión de procesos biológicos de degradación de bifenilos policlorados (PCB) (Fig. 1). Este grupo de moléculas se compone de 209 diferentes congéneres de acuerdo a la cantidad y posición de los átomos de cloro y fueron utilizadas ampliamente en la industria en transformadores condensadores, intercambiadores de calor, sistemas hidráulicas, tintas, pinturas y lubricantes, entre otros (MAVDT, 2007d). La degradación de los demás COP será descrita en un artículo adicional.

MECANISMOS DE DEGRADACIÓN DE MOLÉCULAS HALOORGÁNICAS

Los COP se consideran compuestos xenobióticos (que fueron sintetizados por primera vez por el ser humano) y, por lo tanto, que son foráneos del medioambiente y la microbiota. Sin embargo, en los últimos años se ha encontrado que más de 3.000

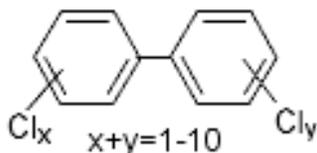


Figura 1. Estructura química de PCB.

moléculas organocloradas se producen naturalmente por organismos tales como bacterias, hongos, insectos, organismos marinos, plantas y mamíferos, así como también, mediante procesos abióticos tales como actividad volcánica e incendios forestales (Gribble, 2003; Haggblom y Bossert, 2003; Meharg y Killham, 2003; van Pée y Unversucht, 2003). De esta forma, en los microorganismos han evolucionado varios mecanismos para la degradación de compuestos organoclorados (Fetzner, 1998; Haggblom y Bossert, 2003; van Pée y Unversucht, 2003). De hecho, se considera que la degradación microbiana de dichos compuestos es el mayor mecanismo que previene su acumulación en el ambiente. En este sentido, se puede hablar de ciclos biogeoquímicos de compuestos organoclorados, de la misma forma como se habla del ciclo del carbono o del ciclo del nitrógeno etc., (Haggblom y Bossert, 2003). No obstante, en el último siglo, la producción industrial de compuestos haloorgánicos incrementó dramáticamente la carga y la variedad de dichos compuestos en el planeta. Mantener esta tendencia y no compensarla con el incremento de la tasa de degradación, ocasionará acumulación de dichos contaminantes, con el consecuente incremento de los riesgos para la salud humana y el medio ambiente. Esta situación es especialmente preocupante en los casos de las moléculas más resistentes para la biodegradación como los COP.

Ahora bien, son conocidas numerosas bacterias y hongos que pueden degradar compuestos haloorgánicos en diversas rutas metabólicas bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas. La biodegradación de moléculas haloorgánicas ocurre, por suerte, con enzimas no específicas (co-metabolismo) o mediante enzimas altamente específicas que tienen como fin el de aprovechar tales moléculas como fuente de nutrientes y/o energía que aportan al crecimiento de dichos microorganismos (Alexander, 1999).

En el co-metabolismo el papel natural de la enzima de degradación es el metabolismo de otra molécula (normalmente no contaminante), pero, dada la baja especificidad de la enzima, afortunadamente esta podría degradar contaminantes con estructuras semejantes. Normalmente este proceso es lento, no completo (degradación parcial) y además, los microorganismos que lo realizan no se benefician de tal proceso. Por el contrario, tal proceso podría ser inhibitorio para los microorganismos, dado que la enzima puede estar ocupada con el sustrato equivocado (inhibición competitiva) o el producto de la reacción ser tóxico (Ensign *et al.*, 1992; Mars *et al.*, 1998; van Hylckama Vlieg y Janssen, 2001). A pesar de la ineficiencia del co-metabolismo, a veces se usa este tipo de reacciones en biorremediación a nivel de campo, siempre y cuando no exista una mejor opción. Los dos ejemplos más importantes de procesos de co-metabolismo de contaminantes haloorgánicos son la oxidación de solventes clorados como PCE y TCE, y de bifenilos policlorados (PCB; Alvarez-Cohen y Speitel, 2001; Arp *et al.*, 2001; Pieper, 2005).

En otros casos el contaminante puede servir a los microorganismos como una fuente de uno o más elementos esenciales para su crecimiento (carbono, nitrógeno, fósforo, o energía; Alexander, 1999). En este escenario la biodegradación está relacionada con el crecimiento de los microorganismos. Para este tipo de degradación las enzimas son normalmente específicas y, por tanto, la tasa de reacción es mucho más rápida. Además, en tales casos la contaminación da una ventaja ecológica a los microorganismos que llevan a cabo el proceso de degradación, pues al hallar una fuente de energía su población irá en aumento y, a su vez se incrementará la tasa de degradación en mayor medida (Alexander, 1999).

Para la estimulación de la degradación de un contaminante se puede considerar la ruta metabólica de la degradación y sus requerimientos; así como la fisiología de la bacteria que produce la degradación. Entre los factores más importantes encontramos: 1) el papel del contaminante en la reacción, e.g. fuente de carbono, donador de electrones, aceptor final de electrones, inhibidor (como en co-metabolismo); 2) sustratos adicionales de la reacción e.g. oxígeno; 3) el donador y aceptor final de electrones para capturar energía; 4) condiciones óptimas para el crecimiento de los microorganismos que degradan el contaminante (potencial rédox, temperatura, pH, etc.) y 5) las características del sitio contaminado (pH, nutrientes, potencial rédox, temperatura, etc.).

Los diferentes mecanismos de degradación de moléculas haloorgánicas han sido descritos en varias revisiones de literatura (Fetzner, 1998; Haggblom y Bossert, 2003; van Pée y Unversucht, 2003). En el presente texto mencionaremos tres ejemplos para mostrar el efecto de la ruta metabólica sobre los mecanismos de estimulación de los procesos de degradación. Los dos primeros ejemplos se relacionan con la deshalogenación oxidativa y deshalogenación hidrolítica. En ambos casos, la etapa clave en la degradación es la incorporación de uno o dos grupos de hidroxilos. En la deshalogenación oxidativa, la fuente de oxígeno es molecular (O_2) y por tanto ocurre estrictamente en condiciones aeróbicas, mientras que en la deshalogenación hidrolítica la fuente del oxígeno es la molécula de agua y puede ocurrir bajo diversas condiciones rédox, según el requerimiento del aceptor de electrones de la bacteria responsable por esta reacción (respiración aeróbica, desnitrificación, etc.).

Un tercer ejemplo tiene que ver con la deshalogenación reductiva, en donde el átomo de cloruro se reemplaza por un átomo de hidrógeno y dos electrones (Holliger *et al.*, 1999; Smidt y de Vos, 2004). Esta reacción puede ocurrir en condiciones aeróbicas o anaeróbicas. En muchos casos de deshalogenación reductiva el compuesto haloorgánico juega el papel de aceptor final de electrones en respiración anaeróbica, donde la energía liberada en la oxidación del donador de electrones se utiliza para formar gradiente de protones y posteriormente para sintetizar ATP. Este proceso se conoce con el nombre de halo-respiración o deshalo-respiración y las bacterias implicadas en él normalmente son anaeróbicas obligatorias. En este sentido, para estimular la halo-respiración es necesario asegurar las condiciones anaeróbicas y adicionar fuentes de carbono y un donador de electrones (e.g. hidrógeno).

Entre las generalizaciones de la biodegradación de compuestos organoclorados se ha determinado que los compuestos que presentan menor número de cloros son más susceptibles a degradación aeróbica (e.g. deshalogenación oxidativa y deshalogena-

ción hidrolítica) y, por el contrario, entre mayor número de cloros es más alto el grado de susceptibilidad a degradación anaeróbica (deshalogenación reductiva; Fetzner, 1998; Haggblom y Bossert, 2003; van Pée y Unversucht, 2003). De hecho, para algunos compuestos como los PCB, dioxinas y furanos, altamente clorados, la única manera para ser degradados completamente es a través de una etapa anaeróbica en la cual ocurre la declorinación reductiva. Solo entonces el producto menos clorado puede degradarse aeróbicamente, en ocasiones hasta alcanzar su mineralización completa. Por lo tanto, en el caso de muchos de los COP parece más atractiva la posibilidad de emplear un proceso anaeróbico-aeróbico combinado (Fetzner, 1998; Haggblom y Bossert, 2003; van Pée y Unversucht, 2003).

BIODEGRADACIÓN DE BIFENILOS POLICLORADOS (PCB)

Los Bifenilos Policlorados (PCB) fueron utilizados ampliamente desde 1929 hasta 1978 en equipos eléctricos como transformadores, condensadores, intercambiadores de calor, sistemas hidráulicos, así como también en la fabricación de pinturas y plásticos. Aproximadamente, se han producido en el mundo 1'324.000 toneladas de PCB que en gran cantidad han ocasionado contaminación al medio ambiente (Iwata *et al.*, 1993; Breivik *et al.*, 2002a; Breivik *et al.*, 2002b; Meijer *et al.*, 2003; Breivik *et al.*, 2007). Al respecto, se estima que solamente en el río Hudson en Estados Unidos fueron liberados entre 95 a 603 toneladas de PCB (EPA, 2000).

Las moléculas de PCB se componen de dos anillos de fenilos con 1 a 10 átomos de cloro (Fig. 1). Existen 209 posibles congéneres de los PCB, de acuerdo a la cantidad y posición de los cloros. Aproximadamente 189 congéneres fueron identificados en mezclas comerciales, 36 de los cuales están considerados como los más significativos por su abundancia y alta toxicidad (McFarland y Clarke, 1989). Es importante mencionar que los PCB fueron comercializados en diferentes mezclas, caracterizadas por el grado de clorización, e.g., Aroclor 1221, 1242 y 1260 contienen respectivamente, 21%, 42% y 60% de cloros en peso. Existe, sin embargo, gran diferencia entre los distintos congéneres de PCB en cuanto a su comportamiento ambiental (persistencia, sorpción, transporte y bioacumulación) y toxicidad. En este sentido, los PCB con mayor cantidad de cloros son más resistentes, se adsorben con más fuerza al suelo o sedimento y tienen mayor tendencia a bioacumularse. Por ejemplo, la solubilidad de PCB cambia de 6 ppm en monoclorobifenil a 0,007 ppm en octaclorobifenil (Borja *et al.*, 2005). Los congéneres más tóxicos presentan una conformación "co-planar". Dichos congéneres no tiene cloros en posición orto, por el contrario, tienen cloros en las dos posiciones para y, por lo menos, en las dos posiciones meta. Estas moléculas se parecen estereo-química y toxicológicamente a 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxin (TCDD) y, por lo tanto, se denominan "como-dioxin" (Dioxin-like; McFarland y Clarke, 1989). Según la lista, elaborada por la Organización Mundial de la Salud, de las Toxicidades Equivalentes a Dioxinas (TEQ por su siglas en inglés) de varios compuestos de "como-dioxin", la TEQ de distintos congéneres de PCB varía de 0,00001 a 0,1, en comparación con la máxima TEQ de 1,0 que fue asignada a 2,3,7,8-TCDD (van den Berg *et al.*, 1998; van den Berg *et al.*, 2006; Haws *et al.*, 2006).

Para llevar a cabo la remediación de un sitio contaminado con PCB hay que tener en cuenta que la contaminación es una mezcla de congéneres. Esto es especialmente

clave cuando se trata de degradación biológica. Las enzimas que catalizan la degradación presentan un rango limitado de moléculas que pueden ser degradadas y hasta la fecha, aún no ha aparecido la "Súper-Bacteria", de tal suerte que para la biorremediación de sitios contaminados con PCB es mejor contar con la comunidad microbiana. La degradación secuencial anaeróbica-aeróbica es especialmente importante para PCB, ya que los congéneres con mayor número de cloros se transforman exclusivamente en condiciones anaeróbicas en procesos de deshalogenación reductiva y los productos de declorinación, congéneres de menor número de cloros, se degradan exclusivamente en condiciones aeróbicas (Wiegel y Wu, 2000; Abraham *et al.*, 2002; Master *et al.*, 2002). Esta combinación es mucho más importante en las mezclas comerciales de mayor clorización del PCB (e.g. Aroclor 1260), e.g., la incubación anaeróbica (cuatro meses) antes de la incubación aeróbica con la cepa LB400 fue indispensable para la degradación de Aroclor 1260 (Master *et al.*, 2002), mientras que mejoró solo un poco (70% *versus* 67%) la degradación aeróbica de Aroclor 1248 con la misma cepa (Evans *et al.*, 1996).

Aunque la investigación sobre la biodegradación y biorremediación de PCB se ha adelantado considerablemente en los últimos 25 años (para revisiones de literaturas véase Bedard y Quensen, 1995; Furukawa, 2000b; Wiegel y Wu, 2000; Abraham *et al.*, 2002; Bedard, 2003; Magar, 2003; Ohtsubo *et al.*, 2004; Pieper, 2005), todavía existen múltiples barreras que han de superarse para lograr un tratamiento eficaz que pueda disminuir las concentraciones de PCB a niveles aceptables (Tiedje *et al.*, 2002). Las barreras son: 1) la baja solubilidad y biodisponibilidad de PCB; 2) la baja eficiencia de deshalogenación anaeróbica; 3) la baja eficiencia de degradación aeróbica; 4) ambos procesos (anaeróbicos y aeróbicos) degradan preferiblemente PCB sin sustitución de cloro en posición de orto, lo que resulta en la acumulación de productos orto. En lo que sigue discutiremos cada barrera y las estrategias para superarlas.

LA BAJA BIODISPONIBILIDAD DE PCB

La biodisponibilidad de compuestos orgánicos se considera una de las más importantes causas que influyen en la tasa de degradación, además de que la baja disponibilidad es considerada como un factor importante que hace a un compuesto recalcitrante (Alexander, 1999; Focht, 2003). Este factor podría limitar tanto la degradación aeróbica como la anaeróbica. Adicionalmente, se considera que la baja disponibilidad es uno de los factores primordiales que explican porqué las metodologías que funcionan en el laboratorio, no funcionan en el campo. En este sentido, la adsorción de compuestos orgánicos al suelo con el tiempo va fortaleciéndose y, por lo tanto, la descontaminación de sitios que fueron contaminados años atrás es más compleja y difícil (Hatzinger y Alexander, 1995; Alexander, 1999; Alexander, 2000).

Algunos intentos de superar esta barrera se han concentrando en la aplicación de surfactantes (e.g. Singer *et al.*, 2000; Fava y Piccolo, 2002; Ferrer *et al.*, 2003). Sin embargo, el éxito de dicho método aún se encuentra limitado. Esto puede explicarse debido a la toxicidad de varios surfactantes para los microorganismos y por el entrapamiento de PCB en las micelas que no genera ningún aumento de la biodisponibilidad (Ohtsubo *et al.*, 2004). Adicionalmente, la inhibición de la degradación

puede atribuirse al hecho de que los surfactantes pueden cambiar la composición de la comunidad microbiana, estimulando bacterias que pueden degradar tales surfactantes (Colores *et al.*, 2000). Además, el surfactante puede disociar las bacterias que están adsorbidas junto a los contaminantes en la matriz y, por lo tanto, alejarlas de estos (Stelmack *et al.*, 1999). En condiciones anaeróbicas es posible que la adsorción de bacterias y PCB en el mismo sólido estimule su deshalogenación (Arbely y Ronen, 2003), y existen especulaciones acerca de que compuestos como los PCB se deshalogenan, también, en su forma adsorbida o sólida (Ballerstedt *et al.*, 2004; Arbely *et al.*, 2006), tal vez de una manera semejante a la reducción de hierro sólido (Ruebush *et al.*, 2006).

Varios estudios han mostrado que los surfactantes de la familia “Tween” son menos tóxicos que otros (Laha y Luthy, 1992; Van Hoof y Jafvert, 1996; Yeh *et al.*, 1998). Además, se encontraron que los surfactantes Tween 60, 61 y 65 pueden servir como fuente de carbono y donadores de electrones para la deshalogenación reductiva de hexaclorobenceno (HCB; Yeh y Pavlostathis, 2005). Tween 80 estimuló la deshalogenación reductiva de HCB (hasta cinco veces más) en concentraciones bajas o iguales a la concentración micelar crítica (30-1200 mg/L), pero, inhibió el proceso en concentraciones significativamente mayores (1,500-5,000 mg/L) (Van Hoof y Jafvert, 1996). Por otro lado, Tween 80 inhibió varias cepas de *Dehalococcoides* spp. (Amos *et al.*, 2007). Aunque el último estudio fue dirigido para realizar deshalogenación de tetracloroetileno (PCE), diferentes estudios han mostrado la importancia de dicho género y otros relacionados en la deshalogenación de PCB (Bunge *et al.*, 2003; Fennell *et al.*, 2004; Fagervolt *et al.*, 2005; Watts *et al.*, 2005; Yoshida *et al.*, 2005; Yan *et al.*, 2006; Kjellerup *et al.*, 2008). Es posible que los biosurfactantes tengan mayor éxito en la remediación, dado que tienen menor toxicidad y son más biodegradables (Golyshin *et al.*, 1999; Ron y Rosenberg, 2001; Makkar y Rockne, 2003; Fava *et al.*, 2003; Mulligan, 2005) y, al menos, un estudio ha mostrado que el biosurfactante *rhamnolipid* estimuló la deshalogenación reductiva de PCB (Cho *et al.*, 2004). Con todo, un mayor conocimiento sobre la compleja interacción entre suelo, surfactante, contaminante y microorganismos puede ayudar en el diseño de mejores estrategias para la aplicación de surfactantes en la remediación de sitios contaminados (Pieper, 2005).

LA BAJA EFICIENCIA DE DESHALOGENACIÓN ANAERÓBICA

El metabolismo anaeróbico de PCB se produce mediante deshalogenación reductiva. Actualmente se conocen ocho procesos distintos de decloración reductiva de PCB según su selectividad, la posición del cloro y de los cloros vecinos. Estos procesos han sido descritos con más detalle en otras revisiones (Bedard y Quensen, 1995; Wiegel y Wu, 2000; Bedard, 2003). Varios estudios indican que diversos procesos son realizados por distintos grupos de bacterias (e.g Wu *et al.*, 1997; Cutter *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2002; Kjellerup *et al.*, 2008). El proceso más común es la desclorización de un cloro en posición meta o para situados entre dos cloros (Doble Flanked). El que lo sigue es la declorización de cloro en posición meta o para situados al lado de un cloro (Flanked). Y menos comunes que los anteriores es la declorización de los cloros sin otros cloros al lado en posiciones meta o para (Bedard, 2003). La declorización menos común se desarrolla en posición orto. Este proceso fue observado en el labora-

torio, aunque para congéneres de menor importancia en mezclas comerciales de PCB (Berkaw *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1997; Kuipers *et al.*, 1999). Teniendo en cuenta lo anterior, la combinación de dos o más procesos complementarios es ideal para lograr mayor desclorización. Este tipo de combinación ha sido observada en algunos sitios (Bedard, 2003). Los productos dominantes (pero no exclusivos) de esta etapa son PCB con menos cloros: entre uno a tres cloros en posiciones orto y orto + para (Evans *et al.*, 1996; Maltseva *et al.*, 1999). Por ejemplo, 2-, 4-, 2,4-, 2,6-, 2,2'-, 2,4'-, 2,2',4-, y 2,4,4'-clorobifeniles fueron 70 a 85% (molar) de los productos de desclorización anaeróbica de Aroclor 1242 (Maltseva *et al.*, 1999).

La investigación sobre la deshalogenación reductiva de PCB ha presentado por muchos años dificultades al cultivar las bacterias que llevan a cabo dicha deshalogenación. Sin embargo, se ha logrado un gran avance en los últimos años, inicialmente al ser identificadas las cepas o-17 y DF-1, filogenéticamente cercanas a *Dehalococcoides*, como las responsables de la desclorización de PCB en cultivos de enriquecimiento (Cutter *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2002). Posteriormente, se descubrió que los cultivos puros de *Dehalococcoides* cepa 195 y cepa CBDB1 pueden deshalogenar PCB, dioxinas polycloradas y furanas polycloradas (Bunge *et al.*, 2003; Fennell *et al.*, 2004). Finalmente, algunos estudios que emplearon métodos moleculares con muestras ambientales han establecido la importancia del género *Dehalococcoides* y otras filogenéticamente cercanas en la deshalogenación reductiva de PCB y dioxinas clorados (Fagervolt *et al.*, 2005; Watts *et al.*, 2005; Yoshida *et al.*, 2005; Yan *et al.*, 2006; Kjellerup *et al.*, 2008). Una de estas cepas, DF-1, ha sido aislada recientemente (May *et al.*, 2008) y su genoma está en proceso de secuenciación (<http://genomesonline.org/index.htm>). Estos nuevos resultados seguramente van a ampliar el conocimiento sobre la deshalogenación reductiva de PCB en los próximos años y, en gran medida, esto redundará en el mejoramiento del proceso de biorremediación en el campo.

Ahora bien, se han propuesto varias estrategias para estimular la deshalogenación reductiva de PCB: 1) adición de fuente de carbono y donador de electrones; 2) adición de surfactantes; 3) adición de otro compuesto halogenado; 4) adición de FeSO_4 ; 5) adición de un consorcio microbiano con capacidad de deshalogenación reductiva de PCB. Estas estrategias se discutirán en lo que sigue.

1. Adición de fuente de carbono y donador de electrones. En condiciones naturales (suelo, sedimento etc.) el carbono se considera como el nutriente limitante para el crecimiento bacteriano (Aldén *et al.*, 2001; Koch *et al.*, 2001). Dado que en el proceso anaeróbico el PCB sirve como aceptor de electrones, y los anillos aromáticos quedan intactos, las bacterias que preforman la halorespiración necesitan una fuente adicional de carbono y donador de electrones para estimular el proceso (Nies y Vogel, 1990; Wiegel y Wu, 2000). Además, la adición de una fuente de carbono estimulará el consumo de aceptores de electrones alternativos que podrían inhibir la deshalogenación (Arbeli *et al.*, 2006). Por lo tanto, el primer nutriente para lograr la biostimulación de la deshalogenación reductiva es probablemente el carbono.

Varios estudios (uno, específicamente, sobre sedimentos del río Bogotá, Gracia-Chaves *et al.*, 2007) han mostrado que la adición de fuentes de carbono estimula la deshalogenación reductiva (Leahy y Shreve, 2000; Aulenta *et al.*, 2005). Normalmente, los halorespiradores pueden utilizar sustratos de uno a tres carbonos (Holliger *et al.*,

1999), aunque es posible agregar fuentes de carbono más complejas como glucosa, molasa o almidón. En condiciones anaeróbicas dichas fuentes de carbono serán fermentadas a alcoholes, ácidos grasos e hidrógeno que pueden alimentar los halorespiradores. Actualmente no hay una única fuente de carbono que se considere ideal para estimular la dehalogenación anaeróbica de PCB (Wiegel y Wu, 2000). Dado que este proceso se lleva a cabo por diferentes bacterias, es lógico que bacterias distintas, necesiten fuentes distintas de carbono, por ejemplo, la cepa o-17 se estimula por acetato (Holoman *et al.*, 1998; Cutter *et al.*, 2001), mientras la cepa DF-1 puede crecer con formato (Wu *et al.*, 2002). Por su reactor Tiedje *et al.*, 2002, han sugerido utilizar fuentes de carbono simples como el etanol, que no influirá en la biodisponibilidad de PCB.

Además del carbono otros nutrientes pueden ser limitantes entre los que se cuentan el nitrógeno, el fósforo y las vitaminas. En ensayos de laboratorio se usan normalmente productos tales como extractos de levadura o de carne para suplir dichos nutrientes. Sin embargo, en los procesos de biorremediación en el campo pueden utilizarse productos económicos que contienen estos nutrientes. Por ejemplo, el Environmental Protection Agency de EEUU (EPA) ha desarrollado un protocolo de bioestimulación de degradación anaeróbica de toxafeno utilizando sangre de animales como fuente de nutrientes (EPA, 2005).

2. Adición de otro compuesto halogenado. Múltiples estudios han demostrado que la deshalogenación reductiva de PCB podría ser estimulada mediante la adición de otros compuestos halogenados como bifenilos (e.g. 2,6-dibromobifenil) y benzoatos halogenados (Van Dort, *et al.*, 1997; Bedard *et al.*, 1998; DeWeerd y Bedard, 1999; Cho *et al.*, 2002). Dichos compuestos probablemente son aceptores de electrones preferibles por los halorespiradores, estimulando el crecimiento de estas bacterias y, como consecuencia, incrementando además la tasa de deshalogenación de PCB. Esta estrategia ha sido probada en campo exitosamente (Bedard *et al.*, 1995). Aparentemente, esta es una de las estrategias más exitosas para la estimulación de la deshalogenación reductiva de PCB, pero, el mayor reto aún es encontrar un compuesto ambientalmente seguro y económico que pueda ser utilizado a escala real.

3. Adición de FeSO_4 . Otra estrategia probada exitosamente en estudios de laboratorio es la adición de FeSO_4 (Zwiernik *et al.*, 1998). En uno de estos estudios se agregaron 10 mM de FeSO_4 al sedimento del río Hudson, inoculado en un caldo de cultivo en condiciones anaeróbicas. La declorización de PCB (Aroclor 1242), preliminarmente en posición meta y para, se incrementó considerablemente. Los autores sugieren que en este caso los deshalogenadores son reductores de sulfato. El sulfato sirve para aumentar dichas bacterias, de tal modo que cuando se agota el sulfato, se inicia el proceso de deshalogenización del PCB. El papel del hierro se aprecia en la titración de sulfides generados en la reducción de sulfato que podrían ser tóxicos para el proceso de la deshalogenación reductiva (Zwiernik *et al.*, 1998). Este estudio parece ser prometedor, dado que FeSO_4 es relativamente económico y no presenta efectos negativos para el medio ambiente. Sin embargo, hasta donde he investigado, esta estrategia no se ha probado en otros estudios. Aunque Tiedje *et al.*,

2002, agregaron FeSO_4 a su reactor, no han comparado este reactor con uno sin FeSO_4 , además, el alcance del estudio no está completamente claro. Adicionalmente, en los últimos años, los estudios han resaltado la importancia de las bacterias de la familia de Dehalococcoides en la deshalogenación anaeróbica de PCB. Hasta donde se sabe, dichas bacterias no son reductoras de sulfato (Kube *et al.*, 2005; Seshadri *et al.*, 2005) siendo contradictorio con la hipótesis de Zwiernik *et al.*, (1998).

4. Bioaugmentación. La bioaugmentación (adición de bacterias deshalogenantes al sitio contaminado) podría ser beneficiosa en ambientes donde no se encuentran bacterias con capacidad de deshalogenación de PCB. Para la deshalogenación de mezclas de PCB es probable que sea necesario agregar consorcios microbianos con amplia capacidad de deshalogenación reductiva. Dado que en diversos lugares se han encontrado diferentes procesos de deshalogenación, es posible que al someter el PCB a dos poblaciones bacterianas con actividades compatibles resulte un proceso de deshalogenación más completo (Tiedje *et al.*, 2002). Varios estudios han mostrado la factibilidad de bioaugmentación en deshalogenación reductiva de PCB (Natarajan *et al.*, 1996; Natarajan *et al.*, 1997; Tiedje *et al.*, 2002), mientras que, por el contrario, otros ensayos han fallado (Wu y Wiegel, 1997; Bedard *et al.*, 1997).

El ensayo de Tiedje *et al.*, 2002, es ejemplo exitoso de bioaugmentación al nivel de laboratorio, demostrando también la complejidad de la bioaugmentación. Los autores adicionaron a un suelo contaminado cultivos de enriquecimiento de dos orígenes distintos que pueden llevar a cabo procesos complementarios de deshalogenación: 1) sedimento de *Silver Lake* que presenta capacidad de deshalogenar PCB altamente clorados, pero su alcance es limitado dado que puede deshalogenar solo cloros en posición meta adyacentes a otro cloro (proceso N: Wiegel y Wu, 2000); 2) sedimento de río Hudson con la capacidad limitada en la deshalogenación de PCB altamente clorados pero pueden remover cloros de posiciones meta y para sin necesidad de que haya presencia de cloro adyacente (proceso M y Q respectivamente: Wiegel y Wu, 2000; Quensen *et al.*, 1990, Tiedje *et al.*, 2002). Al contrario de lo esperado al combinar estos dos sedimentos se expresó principalmente el proceso M frente a una tasa insignificante de los procesos N (del *Silver Lake*) y Q (del río Hudson). Por otro lado, fue mucho más exitoso adicionar microorganismos enriquecidos de sedimento del *Silver Lake*, dejándolos actuar para expresar el proceso N y, posteriormente, para deshalogenar los productos de dicho proceso, agregar el cultivo de sedimento del río Hudson que expresa los procesos M y Q. La combinación de los tres procesos dió como resultado la acumulación de congéneres con cloros en posición orto. El porcentaje de congéneres que tienen cloros solo en posición orto se incrementó del 1% en Aroclor 1260 al 39% en los productos de la deshalogenación.

LA BAJA EFICIENCIA DE DEGRADACIÓN AERÓBICA

La degradación aeróbica es considerada un proceso de co-metabolismo (Hernandez *et al.*, 1995; Pieper, 2005), aunque existen ejemplos de crecimiento de bacterias copladas a la degradación de mono, di o tri-clorobifeniles (Potrawfke *et al.*, 1998; Kim y Picardal, 2000; Kim y Picardal, 2001, Adebusoye *et al.*, 2008b). En ambos casos el proceso está catalizado por enzimas especializadas en la degradación de bifenil (la

ruta de bifenil - bph) o compuestos aromáticos similares. Afortunadamente, estas enzimas también pueden catalizar la degradación de bifenilos clorados. Sin embargo, dado que el sustrato “natural” de estas enzimas es bifenil, la tasa de degradación de PCB es mucho menor y, en muchos casos, se forman productos no completos de degradación. Estos productos y los de la degradación de clorobenzoato (e.g. catecol clorado) pueden inhibir la degradación o ser tóxicos a las bacteria (Bartels *et al.*, 1984; Sondossi *et al.*, 1992; Stratford *et al.*, 1996; Blasco *et al.*, 1997; Dai *et al.*, 2002; Hiraoka *et al.*, 2002; Vaillancourt *et al.*, 2002; Cámara *et al.*, 2004; Parnell *et al.*, 2006). La ruta metabólica de la degradación de bifenil, su genética y sus enzimas fueron estudiadas ampliamente (Ohtsubo *et al.*, 2004; Pieper, 2005). En esta ruta, el bifenil se convierte en ácido benzoico y en ácido 2 hidroxi-penta-2,4-dienoico (Fig. 2). Este último, se convierte, a su vez, en acetil-Co-A y piruvato que alimentan el ciclo de Krebs. Para muchas bacterias el producto final de la degradación de bifenil o PCB es el benzoato o el clorobenzoato respectivamente (Pieper, 2005), mientras que otras bacterias pueden metabolizar también benzoato y clorobenzoato (Arensdorf y Focht, 1994; Potrawfke *et al.*, 1998; Kim y Picardal, 2000, 2001; Kitagawa *et al.*, 2001; Adebuso *et al.*, 2008a).

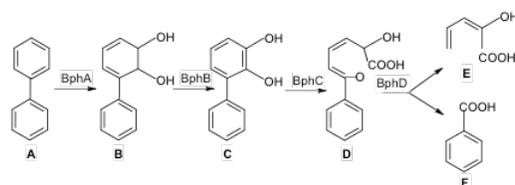


Figura 2. La ruta de degradación aeróbica de bifenil y PCB. Los compuestos son: (A) bifenil; (B) cis 2,3-dihidro-2,3-dihidroxibifenil; (C) 2,3-dihidroxibifenil; (D) 2-hidroxi-6-oxo-6-fenilhexa-2,4-ácido dienoico; (E) 2-hidroxi-penta-2,4-ácido dienoico; (F) ácido benzoico.

Las moléculas aromáticas son antiguas y abundantes en la naturaleza e ingresan al ambiente a través de múltiples rutas, tales como: actividades geotérmicas y volcánicas, cometas y polvo espacial, y mediante su producción en plantas (Liu *et al.*, 2004; Singer *et al.*, 2003; Singer *et al.*, 2004). De acuerdo con esto, las bacterias degradadoras de PCB son abundantes y diversas (Pieper, 2005; Leigh *et al.*, 2006) y se hallan también en suelos o sedimentos no contaminados (Macedo *et al.*, 2007).

Se aislaron degradadores de PCB de diversos géneros tales como *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Comamonas*, *Ralstonia*, *Sphingomonas*, *Acinetobacter*, *Rhodococcus* y *Bacillus* (Pieper, 2005). Es importante resaltar que bacterias aisladas no necesariamente representan la comunidad nativa ni a los degradadores importantes del suelo (e.g. Tillmann *et al.*, 2005; Ritz, 2007). Por ejemplo, el análisis de un suelo con métodos independientes de cultivo indicó que bacterias de los géneros *Pseudonocardia*, *Kribella*, *Nocardiodetes* y *Sphingomonas* son las degradadoras dominantes de bifenil, mientras que los *Rhodococcus* ssp. representaron el 73% de los aislamientos (Leigh *et al.*, 2007). Los genes de degradación están ubicados en plásmidos u otros elementos genéticos móviles (Nishi *et al.*, 2000; Stecker *et al.*, 2003; Takeda *et al.*, 2004; Pieper, 2005). Por lo tanto, la degradación aeróbica de PCB no se puede correlacionar con un género particular de bacterias. Es decir, aunque muchas cepas degradadoras se encuentren en algunos géneros (e.g. los mencionados arriba) no

todos los miembros de estos géneros son degradadores de PCB y, además, no son los únicos géneros que pueden degradar PCB. En este sentido, la presencia o ausencia de dichos géneros en un sitio contaminado con PCB, de ninguna manera puede utilizarse como indicador de la degradación de tales compuestos.

Un mejor indicador para el potencial degradativo de PCB de una comunidad microbiana es la identificación de los genes de degradación. Estos genes pueden ser detectados mediante técnicas moleculares como PCR, o hibridación con cebadores o sondas específicas para dichos genes (Erb y Wagner-Döbler, 1993; Leigh *et al.*, 2007). Sin embargo, también hay variabilidad en tales genes y por tal motivo hay que tener cuidado al interpretar los resultados de este tipo de estudios. Las enzimas de degradación de PCB conocidas hasta la fecha pertenecen a una misma familia y, probablemente, tienen un ancestro común. Sin embargo, estas enzimas presentan gran variabilidad (Asturias *et al.*, 1995; Masai *et al.*, 1995; Fortin *et al.*, 2005; Pieper, 2005). Por ejemplo, las enzimas BphA de *Rhodococcus globerulus* P6 y *Rhodococcus* sp. sepa RHA1 son más cercanas filogénicamente a las dioxigenasas del tolueno que al BphA de las cepas *Burkholderia xenovorans* LB400 y *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 (Asturias *et al.*, 1995; Masai *et al.*, 1995). Finalmente, se debe recordar que, hasta la fecha, la mayoría de los estudios han analizado enzimas de degradación originadas por bacterias aisladas y, por lo tanto, no necesariamente son buenas representantes de las enzimas más importantes en el campo (e.g. Leigh *et al.*, 2007). Se espera que los métodos moleculares independientes del cultivo brinden una mejor aproximación sobre las enzimas importantes *in situ* (Leigh *et al.*, 2007; Suenaga *et al.*, 2007).

La degradación de bifenil es llevada a cabo mediante una serie de enzimas (Fig. 2). En este sentido, si la primera enzima no puede metabolizar un congénere, la degradación no se obtendrá. Al contrario, si una enzima en la mitad de esta cadena no podría metabolizar el metabolito clorado, este metabolito se acumulará. La primera enzima, BphA, tiene todavía mayor influencia dado su regioespecificidad de la dioxigenación, es decir, los carbonos que preferiblemente va a oxidar, influyen en la eficacia del catálisis de las siguientes enzimas en la ruta (Cámara *et al.*, 2007).

Un ejemplo de la especificidad de BphA para diferentes congéneres tiene que ver con los dos grupos BphA en bacterias gram negativas (Mondello *et al.*, 1997). El primer grupo de BphA tiene un rango relativamente estrecho de congéneres y, normalmente, puede degradar congéneres con pocos cloros (hasta cuatro cloros) y puede oxidar exclusivamente los carbonos 2 y 3 (Fig. 2). Los tetraclorobifeniles con cloros en posición 2 y 5 son sustratos pobres para estas enzimas y, hasta la fecha, ninguno de ellos puede degradar 2,5,2',5'-CB. Por otro lado, dichas enzimas son superiores en la degradación de congéneres en dos cloros en las posiciones para como 4,4'-CB y 4,2,4'-CB. El representante más estudiado de este grupo es el *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 (Furukawa y Miyazaki, 1986). El segundo grupo de enzimas tiene un rango relativamente amplio de congéneres que se pueden degradar y una mayor flexibilidad en la posición de los carbonos que pueden oxidarse. Estas enzimas pueden oxidar congéneres con un alto número de cloros (hasta seis sustituciones por bifenil) y tienen la capacidad de oxidar los carbonos de posición 3 y 4, lo que permite la oxidación de 2,5,2',5'-CB. Por otro lado, los congéneres en dos cloros en las posiciones para como 4,4'-CB y 4,2,4'-CB son degradados más lentamente por estas enzimas. El representante más estudiado

de este grupo es el *Burkholderia xenovorans* LB400 (antes *Pseudomonas*; Bopp, 1986). Diferentes congéneres pueden tener diversos cuellos de botella en la cadena metabólica, que va a dar como resultado una acumulación de distintos metabolitos. Como se mencionó anteriormente, algunos de estos metabolitos son tóxicos y la degradación, afortunada para nosotros, resulta ser un suicidio para la bacteria. En los estudios acerca de estos cuellos de botella se han identificado las enzimas BphA (Seeger *et al.*, 1995; Brühlmann y Chen, 1999), BphC (Dai *et al.*, 2002) y BphD (Seah *et al.*, 2000). La enzima BphB tiene un rango relativamente amplio de degradación y normalmente no limita la degradación de PCB (Pieper, 2005), pero cuando la BphA fue mejorada genéticamente, la BphB se convirtió nuevamente en el cuello de botella (Brühlmann y Chen, 1999). El cuello de botella depende del congéner y la bacteria. Así pues, diferentes bacterias tienen distintos rango de bifeniles para degradar. Sin embargo, se pueden hacer varias generalizaciones (Furukawa *et al.*, 1978):

1. La degradación aeróbica es más eficiente con un menor número de cloros (normalmente entre 1-3 cloros), lenta y limitada en 4-6 y prácticamente ausente con un número mayor a 6 cloros.
2. La oxidación del PCB ocurre en posición 2 y 3.
3. Los PCB que tienen dos cloros en la posición orto en el mismo anillo (2,6-) o en anillos diferentes (2,2') son muy resistentes a la degradación.
4. Generalmente los PCB que contienen todos los cloros en el mismo anillo se degradan más rápido que aquellos que contienen el mismo número de cloros, pero que se distribuyen entre los dos anillos.
5. El rompimiento aeróbico del anillo aromático ocurre en el anillo que posee un número menor de cloros.
6. Existen excepciones, y las reglas mencionadas arriba son únicamente generalizaciones. Por ejemplo, hay reportes sobre la degradación de 2,2'-bifenil (Kim y Picardal, 2001), o sobre el ataque preferido al anillo clorado (Kim y Picardal, 2001), o a la oxidación de posiciones 3 y 4 (Seeger *et al.*, 1999) etc.

Biodegradación de clorobenzoato. Uno de los factores claves para el éxito de la degradación de PCB es la mineralización eficaz del clorobenzoato (Bedrard, 2003; Pieper, 2005). La degradación parcial del clorobenzoato produce metabolitos tóxicos tales como clorocatecol, protoanemonin y ácido 5-cloroformil-2-hidroxipenta-2,4-dienoico (Bartels *et al.*, 1984; Sondossi *et al.*, 1992; Arensdorf y Focht, 1994; Blasco *et al.*, 1997; Pérez-Pantoja *et al.*, 2003; Deneff *et al.*, 2006; Martínez *et al.*, 2007). Dichos metabolitos pueden acumularse dado que muchas bacterias tienen rutas no completas de degradación de clorobenzoato (Pavlu *et al.*, 1999; Bedrard, 2003; Pieper, 2005). Algunos autores han encontrado dificultades para enriquecer degradadores de clorobenzoato (Brunsbach y Reineke, 1993; Pavlu *et al.*, 1999), mientras que otros han encontrado que dichos degradadores son abundantes y diversos en suelos prístinos (Fulthorpe *et al.*, 1996; Fulthorpe *et al.*, 1998).

La degradación depende de la estructura del clorobenzoato (número y posición de los cloros) y en muchos casos diferentes bacterias degradan diferentes clorobenzoatos (Pavlu *et al.*, 1999). Lo anterior es importante, dado que en sitios contaminados con mezcla de PCB se espera encontrar mezclas de productos de clorobenzoato. Las di-

ferentes rutas de degradación fueron descritas por Peel y Wyndham, 1997 y Pieper, 2005, algunas de éstas serán mencionadas brevemente en lo que sigue.

El clorobenzoato puede transformarse en clorocatecol (e.g. la ruta de *clc*: Dorn y Knackmuss, 1978), la hidrólisis de 4-clorobenzoato produce un 4-hidroxibenzoato (la ruta de *fcf*: Klages y Lingens, 1979), la dioxigenación de 3-clorobenzoato y 3,4-diclorobenzoato en posición 4 y 5 produce 5-cloroprotocatecuato (Nakatsu y Wyndham 1993). En la medida en que se planea la bioaumentación con degradadores de clorobenzoato, será prudente elegir rutas que no generen productos tóxicos (Blasco *et al.*, 1997). La ruta de 3-oxoadipate (Pieper, 2005) genera el potente antibiótico protoanemonin (Blasco *et al.*, 1997), y la ruta de “meta cleavage” que convierte a 3-clorocatecol en ácido 5-cloroformil-2-hidroxipenta-2,4-dienoico se considera como una reacción de suicidio (Bartels *et al.*, 1984). Aparentemente las rutas preferidas son aquellas que eliminan el cloro en la primera etapa de oxidación y la “orto cleavage” de clorocatecol (Blasco *et al.*, 1997; Tiedje *et al.*, 2002). Adicionalmente, es importante anotar que la bacteria debe tener un buen balance entre la producción y eliminación de metabolitos, de tal manera que los productos tóxicos nunca se acumulen. En este sentido, la consideración final tendrá que tener en cuenta cada caso particular, según el clorobenzoato específico (o la mezcla específica) y las diferentes bacterias disponibles.

LA ESTIMULACIÓN DE LA DEGRADACIÓN AERÓBICA

1. Estimulación de co-metabolismo. En tanto que la degradación de PCB se hace en buena parte por co-metabolismo, donde las bacterias que llevan a cabo la degradación no pueden aprovechar el PCB por crecimiento, una de las posibles estrategias para estimular dichas bacterias es agregar una fuente de carbono adicional que estimule el crecimiento de los degradadores de PCB. La fuente ideal de carbono para estimular específicamente los degradadores de PCB, debe inducir la expresión de los genes de degradación y, además, no ser una fuente tóxica. Por ejemplo, la glucosa no es una buena elección dado que estimula un amplio rango de bacterias, y no necesariamente presenta ventajas ecológicas a los degradadores de PCB, asimismo, no induce la expresión de los genes de degradación de bifenil. Por el contrario, el bifenil puede ser el sustrato ideal, ya que los degradadores de PCB se alimentan naturalmente de este compuesto, y tiene como ventaja, el inducir los genes de degradación. De acuerdo con esto, algunos trabajos han mostrado que el bifenil puede estimular la degradación de PCB (Brunner *et al.*, 1985; Harkness *et al.*, 1993; Fava y Bertin, 1999). Sin embargo, el bifenil es carcinogénico (Focht, 2003) y, por lo tanto, no es buen candidato para ser agregado al ambiente. Algunos estudios han demostrado que sustancias derivadas de plantas, tales como flavonoides (Donnelly *et al.*, 1994) y terpenes, específicamente carvono, limoneno y p-cimeno (Focht, 1995; Gilbert y Crowley 1997; Tandlich *et al.* 2001) pueden estimular la degradación de PCB. De igual manera Hernandez *et al.*, 1997, mostraron que la adición de cáscara de naranja o follaje al suelo con PCB estimuló la degradación del contaminante y aumentó el número de degradadores de PCB. Similarmente, se ha encontrado que los degradadores de PCB (y de bacterias en general) son más numerosos cerca a las raíces y, aparentemente, diferentes degradadores de PCB presentan preferencias hacia raíces de plan-

tas específicas (Leigh *et al.*, 2006) lo que resalta la potencialidad de la fitorremediación (Pieper, 2005).

2. Bioaugmentación. Los problemas mencionados sugieren que la bioaugmentación sea tomada como una opción importante en la degradación aeróbica de PCB. La bioaugmentación puede dar respuesta a las siguientes problemáticas:

- a. La bioaugmentación puede solucionar la baja concentración de degradadores de PCB. Esto es importante dado que la degradación de PCB se lleva a cabo mediante co-metabolismo y las bacterias que los degradan no crecen.
- b. La bioaugmentación puede solucionar la baja concentración de bacterias con capacidad de mineralización de clorobenzoato. Una manera para evitar la toxicidad de los metabolitos de la degradación aeróbica de PCB es agregar o estimular otras bacterias que pueden degradar dichos metabolitos. Esta estrategia ha sido probada exitosamente por Fava y Bertin, 1999, quienes mostraron que la agregación de degradadores de monoclorobenzoato estimuló la degradación de PCB.

Dado que el PCB es una mezcla, puede resultar ventajoso agregar una mezcla de bacterias con capacidades complementarias para degradar diferentes congéneres relevantes de PCB y sus productos tóxicos. Una primera opción es elegir cepas conocidas o aislar nuevas para diseñar este tipo de mezcla. Es importante señalar que los criterios de elección de las cepas deben incluir, además de su capacidad de degradar diferentes congéneres o metabolitos, también su compatibilidad al ambiente, su capacidad de degradar PCB en bajas concentraciones (alta afinidad al sustrato) y alta capacidad de sobrevivir en el ambiente. Una opción alternativa tiene que ver con tomar una muestra del sitio contaminado, enriquecer las bacterias degradadoras de PCB en un reactor (por ejemplo en la presencia de bifenil y PCB) y retornar esta mezcla al ambiente contaminado. Adicionalmente, se pueden agregar consorcios bacterianos de fuentes tales como el compost o el lodo de plantas de tratamiento de agua residual (Di Toro *et al.*, 2006). Finalmente, se pueden agregar una o más bacterias modificadas genéticamente. La última opción sigue siendo todavía teórica, dado que es prohibido liberar al ambiente este tipo de bacterias. En este sentido, la tarea de buscar nuevas bacterias con nuevos genes y con diferentes afinidades al PCB, sigue siendo todavía importante. Esta tarea podría ser facilitada a través de nuevos métodos que permitan analizar rápidamente altas cantidades de muestras (*high-throughput*; Kahl y Hofer, 2003; Goddard y Raymond, 2004).

3. Mejoramiento de bacterias por ingeniería genética. Es posible que la complejidad de la degradación de PCB inhiba la evolución de una bacteria que degrada PCB eficientemente. Es decir, si apareciera una mutación exitosa en la primera enzima, puede ser que la oxidación más eficiente de PCB resultare en mayor acumulación de metabolitos tóxicos. Si bien, es probable que en el futuro la evolución natural “encontrará” una solución a esta complejidad, la evolución artificial (ingeniería genética) puede acelerar el proceso. Teniendo en cuenta lo dicho, pueden considerarse varias estrategias para mejorar la capacidad de las bacterias degradadoras de PCB:

- a. Modificar las enzimas para ampliar el rango de los congéneres que pueden degradar, o para aumentar la velocidad de la reacción o, en algunos casos, para reducir

- su sensibilidad a los productos tóxicos de la degradación (Ohnishi *et al.*, 2004).
- b. Agregar genes de degradación de clorobenzoato, de tal manera que se evite la acumulación de productos tóxicos, como el clorocatecol. Además, mejorando la capacidad de crecimiento del degradador en presencia de PCB.
 - c. Aumentar la expresión de los genes de degradación de PCB, por ejemplo, eliminando el sistema de control para que la expresión sea constitutiva, o cambiando el promotor para que la inducción se realice mediante otra molécula que pueda ser liberada al ambiente.

Como se mencionó anteriormente, la degradación de PCB se lleva a cabo a través de una serie de enzimas y es posible que estas deban ser modificadas en su totalidad o parcialmente. Por ejemplo, al mejorar la enzima BphA, la BphB se convierte en el cuello de botella para algunos congéneres (Brühlmann y Chen, 1999). La modificación de las enzimas puede ser planeada o, por el contrario, ejecutada al azar (Ang *et al.*, 2005). En modificaciones planeadas se identifican aminoácidos claves, según la comparación entre dos enzimas similares con actividades distintas (Kimura *et al.*, 1997; Mondello *et al.*, 1997) o según la estructura tridimensional de la enzima (Suenaga *et al.*, 2002) y se cambian tales ácidos por otros (mutagénesis en sitio dirigido).

Esta estrategia puede ahorrar mucho trabajo en el laboratorio y sirve, además, para probar hipótesis acerca de la importancia de algunos aminoácidos en la degradación, así como también, aportan en la elaboración del mecanismo de la catálisis. Sin embargo, normalmente es imposible identificar todos los aminoácidos claves y, aún más difícil, encontrar parejas o aminoácidos con efectos sinérgicos. Para encontrar estos sitios es necesario aplicar mutaciones aleatorias (Suenaga *et al.*, 2001; Zielinski *et al.*, 2006). En este sentido, esta última estrategia es más engorrosa y tediosa, pero se parece más a la evolución natural. De hecho, se pueden aplicar varias rondas de mutaciones: después de la primera ronda, se eligen los mejores mutantes y, a su vez, a estos mutantes se les aplica de nuevo un procedimiento de mutación aleatoria, en lo que se denomina evolución artificial (Harayama, 1998; Zhao, 2007).

Muchas investigaciones se han concentrado en el mejoramiento de la primera enzima BphA (Furukawa, 2000a, Ohtsubo *et al.*, 2004). La subunidad BphA1 es considerada la más importante en la determinación de la especificidad para diferentes congéneres, así como también, para la determinación de la tasa de reacción (Furukawa, 2000a, Ohtsubo *et al.*, 2004), aunque la subunidad β de la enzima también influye en esta determinación (Hurtubise *et al.*, 1998). Los primeros trabajos probaron, de manera racional, la importancia de varios aminoácidos sobre la especificidad de la enzima para diferentes congéneres y para la posición de la oxidación (es decir, la posición en donde se insertan los hidróxidos). Estos trabajos compararon los genes bphA en *Burkholderia xenovorans* LB400 (antes *Pseudomonas*; Bopp, 1986) y *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 (Furukawa y Miyazaki, 1986). La gran subunidad de la primera enzima BphA1 en estas cepas difiere en 20 de 459 aminoácidos (~4,36%) y las otras 3 subunidades son similares en un 99,3 a 100% de los aminoácidos. Sin embargo, el rango de la degradación de diferentes congéneres es muy distinto (Kimura *et al.*, 1997; Mondello *et al.*, 1997). Con la determinación de las posiciones en donde la secuencia de estos aminoácidos se diferencia, y las mutaciones específicas en estas posiciones, se pueden

identificar algunos aminoácidos que son responsables de la especificidad de la enzima (Kimura *et al.*, 1997; Mondello *et al.*, 1997). Por ejemplo, cambiando Thr 376 (KF707) a Asn 376 (LB400) en la cepa KF707 se amplía el rango de PCB que puede degradarse de manera similar a la cepa LB400 (Kimura *et al.*, 1997). Asimismo, diferentes mutaciones en la misma posición dieron como resultado diferencias de especificidad para la degradación de PCB y dibenzofurano (Suenaga *et al.*, 2006). De igual manera, cambiando Phe 336 (LB400) a Ile 336 (KF707), o Asn 338 (LB400) a Thr 338 (KF707) en la cepa LB400 se mejora su capacidad a degradar 4,4-CB (Mondello *et al.*, 1997).

Suenaga *et al.*, 2002, propusieron un modelo tridimensional de bphA1, confirmando la cercanía de dichas posiciones al sitio activo de la enzima. Asimismo, sus estudios ensancharon el conocimiento de la influencia de mutaciones en estas posiciones y su alrededor (Suenaga *et al.*, 2002; Suenaga *et al.*, 2006). Es importante señalar que hasta la fecha, el mejoramiento de la actividad de bphA para algunos congéneres, da como resultado un detrimento de su actividad en otros congéneres y aún no se ha logrado construir la “súper enzima”.

Una estrategia distinta, pero que podría aplicarse en combinación con la estrategia anterior, es la adición de enzimas de degradación de clorobenzoato a bacterias que degradan PCB. Esto mejora el crecimiento de las bacterias, ya que puede aprovechar el carbono del benzoato, y en tanto evita la acumulación de productos tóxicos incrementa su sobrevivencia. Esta estrategia ha sido probada exitosamente para *Burkholderia xenovorans* LB400 y *Rhodococcus* sp. cepa RHA1 y *Cupriavidus necator* RW112 (Rodriguez *et al.*, 2001; Rodriguez *et al.*, 2006; Wittich y Wolf, 2007). Al elegir los genes de degradación de clorobenzoato es recomendable escoger rutas metabólicas que eviten la formación de productos tóxicos (ver arriba).

Finalmente, es posible incrementar la expresión de los genes de degradación mediante la modificación de su regulación. Esta estrategia se ha probado exitosamente por Ohtsubo *et al.*, 2003, pues determinaron que no solamente se incrementó la tasa de degradación, sino que también se agregaron, sorprendentemente, habilidades para degradar nuevos congéneres.

La ingeniería genética aún está en el nivel de ensayos, a su vez, la aplicación de microorganismos modificados genéticamente todavía está prohibida, aunque en los últimos años se han empezado a valorar los posibles efectos de su aplicación (Aguirre de Cárcer *et al.*, 2007). Es posible suponer que su aplicación en reactores de manera controlada pueda ser más viable, para evitar su salida al medio ambiente (e.g. mediante esterilización). La aprobación de su uso estimulará más investigaciones en esta dirección con el propósito de construir un “súper degradador”, mejorado en todos los genes de la ruta metabólica, que contenga varias copias de dichos genes con capacidades complementarias para degradar diferentes congéneres, y que, además, también incluya genes de mineralización de todos los posibles clorobenzoatos, con una mayor expresión de tales genes, con capacidad de producción de surfactantes y que tienen genes de quimiotaxis por PCB.

EVALUACIÓN DE RIESGO SEGÚN SITIO Y SEGÚN CONGÉNERES O TOXICIDAD

La evaluación de riesgo fue aceptada en muchos países como herramienta importante

para determinar niveles aceptables de contaminantes en el ambiente y las metas de procesos de remediación (Tarazona, 2002; Tarazona y Vega, 2002; MAVDT, 2007a; Wolska *et al.*, 2007). Las tablas genéricas que determinan dichos niveles se refieren a los peores casos posibles para dar protección en amplias condiciones ambientales y a toda la población. Por lo tanto, en muchas ocasiones (que no representan el peor caso posible) se pueden aceptar niveles más altos de contaminación, siempre y cuando, estos niveles no signifiquen mayor riesgo a la salud humana o al medio ambiente. Dichos niveles se determinan mediante un proceso de evaluación de riesgo y son específicos dependiendo del sitio. Por ejemplo, en el peor caso posible el riesgo de exposición por inhalación a los receptores que están a 10 m del suelo contaminado se presenta cuando el suelo no retiene (adsorbe) el contaminante (e.g. suelo arenoso), cuando el viento sopla 24 horas al día en la dirección de los receptores y cuando los receptores permanecen 24 horas en el lugar. Por otro lado, en la realidad el suelo puede ser orgánico y retiene fuertemente el contaminante, el viento es débil, no constante, y sopla en distintas direcciones; y los receptores permanecen en el lugar únicamente una hora al día. Evidentemente, en cada caso, el nivel máximo del contaminante en el suelo que no va a generar efectos adversos a la salud de los receptores es distinto y, por lo tanto, la meta de remediación podría ser específica para cada caso (Tarazona, 2002; Fernández *et al.*, 2006; MAVDT, 2007a).

En el caso de los PCB puede considerarse también la variación en la toxicidad de los diferentes congéneres. Como fue mencionado anteriormente la TEQ de distintos congéneres de PCB varía de 0,00001 a 0,1, en comparación con 2,3,7,8-TCDD (McFarland y Clarke 1989; van den Berg *et al.*, 1998; van den Berg *et al.*, 2006; Haws *et al.*, 2006). Las tablas genéricas que determinan niveles máximos permisibles de contaminación de PCB como conjuntos de congéneres son conservadoras considerando el peor caso posible, mientras que al analizar la concentración de los distintos congéneres en el sitio puede evaluarse mejor el riesgo según la toxicidad de cada uno. De igual manera hay que tener en cuenta que en procesos de biorremediación, los procesos aeróbicos que pueden romper el anillo aromático son más eficientes en remoción de masa, pero dado que ataca los congéneres menos clorados, son menos eficientes en la remoción de toxicidad. Por otro lado, los procesos anaeróbicos no logran el rompimiento de la molécula y, por lo tanto, la disminución en la concentración del contaminante es limitada, resultando en un bajo porcentaje de remoción de masa. Sin embargo, este proceso ataca preferiblemente congéneres más tóxicos, es decir, los congéneres co-planares, y el porcentaje de remoción de la toxicidad podría ser mucho mayor (Mousa *et al.*, 1998; Quensen *et al.*, 1998; Magar, 2003; Ganey y Boyd, 2005).

Revisando la literatura sobre los resultados de estudios toxicológicos y epidemiológicos de PCB, Ross, 2004, llegó a una conclusión todavía más radical. Dado que los únicos efectos notables sobre personas expuestas en su trabajo a elevadas concentraciones de PCB fue la irritación de piel y ojos, y que la exposición a PCB de fuentes ambientales es mucho menor con una tendencia constante a decrecer desde la prohibición de la producción de PCB, el autor dedujo que el riesgo de PCB de fuentes ambientales es bajo. Teniendo en cuenta esta conclusión y los elevados costos de

descontaminación, Ross consideró que la remediación de zonas contaminadas con PCB reporta pocos beneficios a la salud humana.

CONCLUSIONES

La degradación de PCB ha sido estudiada ampliamente. Sin embargo, su aplicación en campo es aún muy limitada. En general, es recomendable usar un esquema constituido por un proceso de degradación anaeróbica, seguido por uno de degradación aeróbica, complementado todo esto con la totalidad de la comunidad microbiana que es esencial para degradar un amplio rango de congéneres, además de un gran número de productos de degradación. La complejidad de la remediación de sitios contaminados con PCB requiere de conocimientos detallados y, por tanto, es necesario seguir investigando y mejorando la biodisponibilidad de PCB, la deshalogenación reductiva y el proceso de degradación aeróbica para superar las barreras relacionadas con la biorremediación de sitios contaminados con PCB.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por la Agencia Canadiense de Desarrollo Internacional. Quiero agradecer a Gustavo Adolfo Silva por su revisión detallada del texto.

BIBLIOGRAFÍA

ANG EL, ZHAO H, OBRAD JP. Recent Advances in the Bioremediation of Persistent Organic Pollutants Via Biomolecular Engineering. *Enzyme Microb Technol.* 2005;37:487-496.

ABRAHAM WR, NOGALES B, GOLYSHIN PN, PIEPER DH, TIMMIS KN. Polychlorinated Biphenyl-Degrading Microbial Communities in Soils and Sediments. *Curr Opin Microbiol.* 2002;5:246-253.

ADEBUSOYE SA, PICARDAL FW, ILORI MO, AMUND OO, FUQUA C. Characterization of Multiple Novel Aerobic Polychlorinated Biphenyl (PCB)-Utilizing Bacterial Strains Indigenous to Contaminated Tropical African Soils. *Biodegradation.* 2008a;19:145-159.

ADEBUSOYE SA, PICARDAL FW, ILORI MO, AMUND OO. Evidence of Aerobic Utilization of Di-ortho-Substituted Trichlorobiphenyls as Growth Substrates by *Pseudomonas* sp. SA-6 and *Ralstonia* sp. SA-4. *Environ Microbiol.* 2008b;10:1165-1174.

AGUIRRE DE CÁRCER D, MARTÍN M, MACKOVA M, MACEK T, KARLSON U, RIVILLA R. The Introduction of Genetically Modified Microorganisms Designed for Rhizoremediation Induces Changes on Native Bacteria in the Rhizosphere but Not in the Surrounding Soil. *ISME J.* 2007;1:215-223.

ALDÉN L, DEMOLING F, BÅÅTH E. Rapid Method of Determining Factors Limiting Bacterial Growth in Soil. *Appl Environ Microbiol.* 2001;67:1830-1838.

ALEXANDER M. *Biodegradation and Bioremediation.* 2 ed. Academic Press; 1999.

ALEXANDER M. Aging, Bioavailability, and Overestimation of Risk from Environmental Pollutants. *Environ Sci Technol.* 2000;34:4259-4265.

ALVAREZ-COHEN L, SPEITEL JR GE. Kinetics of Aerobic Cometabolism of Chlorinated Solvents. *Biodegradation*. 2001;12:105-126.

AMOS BK, DAPRATO RC, HUGHES JB, PENNELL KD, LÖFFLER FE. Effects of the Nonionic Surfactant Tween 80 on Microbial Reductive Dechlorination of Chlorinated Ethenes. *Environ Sci Technol*. 2007;41(5):1710-1716.

ARBELI Z, RONEN Z. Enrichment of a Microbial Culture Capable of Reductive Debromination of the Flame Retardant Tetrabromobisphenol-A, and Identification of the Intermediate Metabolites Produced in the Process. *Biodegradation*. 2003;14:385-395.

ARBELI Z, RONEN Z, DÍAZ BÁEZ M. Reductive Dehalogenation of Tetrabromobisphenol A by Sediment from a Contaminated Ephemeral Stream Bed and an Enrichment Culture. *Chemosphere*. 2006;64:1472-1478.

ARENSDORF JJ, FOCHT DD. Formation of Chlorocatechol meta Cleavage Products by a Pseudomonad During Metabolism of Monochlorobiphenyls. *Appl Environ Microbiol*. 1994;60:2884-2889.

ARP DJ, YEAGER CM, HYMAN MR. Molecular and Cellular Fundamentals of Aerobic Cometabolism of Trichloroethylene. *Biodegradation*. 2001;12(2): 81-103.

ASTURIAS JA, DIAZ E, TIMMIS KN. The Evolutionary Relationship of Biphenyl Dioxygenase from Gram-Positive *Rhodococcus Globerulus* P6 to Multicomponent Dioxygenases from Gram-Negative Bacteria. *Gene*. 1995;156:11-18.

AULENTA F, BIANCHI A, MAJONE M, PETRANGELI PAPINI M., POTALIVO M, TANDOI V. Assessment of Natural or Enhanced In Situ Bioremediation at a Chlorinated Solvent-Contaminated Aquifer in Italy: A Microcosm Study. *Environment Int*. 2005;31:185-190.

BALLERSTEDT H, HANTKE J, BUNGE M, WERNER B, GERRITSE J, ANDREESSEN JR, *et al*. Properties of a Trichlorodibenzo-p-Dioxin-Dechlorinating Mixed Culture with a Dehalococcoides as Putative Dechlorinating Species. *FEMS Microbiol Ecol*. 2004;47:223-234.

BARTELS I, KNACKMUSS HJ, REINEKE W. Suicide Inactivation of Catechol 2,3-Dioxygenase from *Pseudomonas Putida* mt-2 by 3-Halocatechols. *Appl Environ Microbiol*. 1984;47:500-505.

BEDARD DL, QUENSEN JF III. Microbial Reductive Dechlorination of Polychlorinated Biphenyls. En: Young LY, Cerniglia C, editors. *Microbial Transformation and Degradation of Toxic Organic Chemicals*. New York: John Wiley and Sons; 1995. p. 127-216.

BEDARD DL, SMULLEN LA, DEWEERD KA, DIETRICH DK, FRAME GM, MAY RJ, *et al*. Chemical Activation of Microbially-Mediated PCB Dechlorination: A Field Study. *Organohalogen Compd*. 1995;24:23-28.

BEDARD DL, VAN DORT HM, MAY RJ, SMULLEN LA. Enrichment of Microorganisms that Sequentially meta-, para-Dechlorinate the Residue of Aroclor 1260 in Housatonic River Sediment. *Environ Sci Technol*. 1997;31:3308-3313.

BEDARD DL, VAN DORT HM, DEWEERD KA. Brominated Biphenyls Prime Extensive Microbial Reductive Dehalogenation of Aroclor 1260 in Housatonic River Sediment. *Appl Environ Microbiol*. 1998;64:1786-1795.

BEDARD DL. Polychlorinated Biphenyls in Aquatic Sediments: Environmental Fate and Outlook for Biological Treatment. En: Haggblom MM, Bossert ID, editors.

Dehalogenation Microbial Processes and Environmental Applications. Kluwer Academic Publishers; 2003. p. 443-465.

BERKAW M, SOWERS KR, MAY HD. Anaerobic ortho Dechlorination of Polychlorinated Biphenyls by Estuarine Sediments from Baltimore Harbor. *Appl Environ Microbiol.* 1996;62:2534-2539.

BLASCO R, MALLAVARAPU M, WITTICH RM, TIMMIS KN, PIEPER DH. Evidence that Formation of Protoanemonin from Metabolites of 4-Chlorobiphenyl Degradation Negatively Affects the Survival of 4-Chlorobiphenyl Cometabolizing Microorganisms. *Appl Environ Microbiol.* 1997;63:427-434.

BOPP LH. Degradation of Highly Chlorinated PCBs by *Pseudomonas* Strain LB400. *J Ind Microbiol.* 1986;1:23-29.

BORJA J, TALEON DM, AURESENIA J, GALLARDO S. Polychlorinated Biphenyls and their Biodegradation Process. *Biochem.* 2005;40:1999-2013.

BREIVIK K, SWEETMAN A, PACYNA JM, JONES KC. Towards a Global Historical Emission Inventory for Selected PCB Congeners - A Mass Balance Approach 1. Global Production and Consumption. *Sci Total Environ.* 2002a;290:181-198.

BREIVIK K, SWEETMAN A, PACYNA JM, JONES KC. Towards a Global Historical Emission Inventory for Selected PCB Congeners - A Mass Balance Approach 2. Emissions. *Sci Total Environ.* 2002b;290:199-224.

BREIVIK K, SWEETMAN A, PACYNA JM, JONES KC. Towards a Global Historical Emission Inventory for Selected PCB Congeners - A Mass Balance Approach: 3. An Update. *Sci Total Environ.* 2007;377:296-307.

BRÜHLMANN F, CHEN W. Transformation of Polychlorinated Biphenyls by a Novel BphA Variant through the meta-Cleavage Pathway. *FEMS Microbiol Lett.* 1999;179,203-208.

BRUNNER W, SUTHERLAND FH, FOCHT DD. Enhanced Biodegradation of Polychlorinated Biphenyls in Soil by Analog Enrichment and Bacterial Inoculation. *J Environ Quality.* 1985;14:324-428.

BRUNSBACH FR, REINEKE W. Degradation of Chlorobenzoates in Soil Slurry by Special Organisms. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1993;39:117-122.

BUNGE M, ADRIAN L, KRAUS A, OPEL M, LORENTZ WG, ANDRESEN JR, *et al.* Reductive Dehalogenation of Chlorinated Dioxines by an Anaerobic Bacterium. *Nature.* 2003;421:357-360.

CÁMARA B, HERRERA C, GONZÁLEZ M, COUVE E, HOFER B, SEEGER M. From PCBs to Highly Toxic Metabolites by the Biphenyl Pathway. *Environ Microbiol.* 2004;6:842-850.

CÁMARA B, SEEGER M, GONZÁLEZ M, STANDFUß-GABISCH C, KAHL S, HOFER B. Generation by a Widely Applicable Approach of a Hybrid Dioxygenase Showing Improved Oxidation of Polychlorobiphenyls. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73:2682-2689.

CHO YC, OSTROFSKY EB, SOKOL RC, FROHNHOEFER RC, RHEE GY. Enhancement of Microbial PCB Dechlorination by Chlorobenzoates, Chlorophenols and Chlorobenzenes. *FEM Microbiol Ecol.* 2002;42:51-58.

CHO YC, OSTROFSKY EB, RHEE GY. Effects of a Rhamnolipid Biosurfactant on the Reductive Dechlorination of Polychlorinated Biphenyls by *St. Lawrence River*

(North America) Microorganisms. *Environ Toxicol Chem.* 2004;23:1425-1430.

COLORES GM, MACUR RE, WARD DM, INSKEEP WP. Molecular Analysis of Surfactant-Driven Microbial Population Shifts in Hydrocarbon-Contaminated Soil. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66:2959-2964.

CUTTER LA, WATTS JE, SOWERS KR, MAY HD. Identification of a Microorganism that Links its Growth to the Reductive Dechlorination of 2,3,5,6-Chlorobiphenyl. *Environ Microbiol.* 2001;3:699-709.

DAI S, VAILLANCOURT F, MAAROUFI H, DROUIN N, NEAU D, SNIIECKUS V, *et al.* Identification and Analysis of a Bottleneck in PCB Biodegradation. *Nat Struct Biol.* 2002;9:934-939.

DENEF VJ, KLAPPENBACH JA, PATRAUCHAN MA, FLORIZONE C, RODRIGUES JLM, TOSÍ TV, *et al.* Genetic and Genomic Insights into the Role of Benzoate-Catabolic Pathway Redundancy in Burkholderia Xenovorans LB400. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72:585-595.

DEWEERD KA, BEDARD DL. Use of Halogenated Benzoates and Other Halogenated Aromatic Compounds to Stimulate the Microbial Dechlorination of PCBs. *Environ Sci Technol.* 1999;33:2057-2063.

DI TORO S, ZANAROLI G, FAVA F. Intensification of the Aerobic Bioremediation of an Actual Site Soil Historically Contaminated by Polychlorinated Biphenyls (PCBs) through Bioaugmentation with a non Acclimated, Complex Source of Microorganisms. *Microb Cell Fact.* 2006;5:11.

DONNELLY PK, HEDGE RS, FLETCHER JS Growth of PCB Degrading Bacteria on Compounds from Photosynthetic Plants. *Chemosphere.* 1994;28:981-988.

DORN E, KNACKMUSS HJ. Chemical Structure and Biodegradability of Halogenated Aromatic Compounds. Two Catechol 1,2-Dioxygenases from a 3-Chlorobenzoate-Grown Pseudomonad. *Biochem J.* 1978;174:73-84.

ENSIGN SA, HYMAN MR, ARP DJ. Cometabolic Degradation of Chlorinated Alkenes by Alkene Monooxygenase in a Propylene-Grown Xanthobacter Strain. *Appl Environ Microbiol.* 1992;58:3038-3046.

EPA 2000 Superfund Proposed Plan, Hudson River PCBs Superfund Site. <http://www.epa.gov/hudson/feasibility.htm>.

EPA 2005 Reference Guide to Non-combustion Technologies for Remediation of Persistent Organic Pollutants in Stockpiles and Soil EPA-542-R-05-006 <http://www.clu-in.org/POPs>.

ERB RW, WAGNER-DÖBLER I. Detection of Polychlorinated Biphenyl Degradation Genes in Polluted Sediments by Direct DNA Extraction and Polymerase Chain Reaction. *Appl Environ Microbiol.* 1993;59:4065-4073.

EVANS BS, DUDLEY CA, KLASSON KT. Sequential Anaerobic-Aerobic Biodegradation of PCBs in Soil Slurry Microcosms. *Appl Biochem Biotechnol.* 1996;57/58:885-894.

FAGERVOLT SK, WATTS JEM, MAY HD, SOWERS KR. Sequential Reductive Dechlorination of meta-Chlorinated Polychlorinated Biphenyl Congeners in Sediment Microcosms by Two Chloroflexi Phylotypes. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71:8085-8090.

FAVA F, BERTIN L. Use of Exogenous Specialised Bacteria in the Biological Detoxification of a Dump Site-Polychlorinated Biphenyl-Contaminated Soil in Slurry

Phase Conditions. *Biotechnol Bioeng.* 1999;64:240-249.

FAVA F, PICCOLO A. Effects of Humic Substances on the Bioavailability and Aerobic Biodegradation of Polychlorinated Biphenyls in a Model Soil. *Biotechnol Bioeng.* 2002;77:204-211.

FAVA F, BERTIN L, FEDI S, ZANNONI D. Methyl-Betacyclodextrin-Enhanced Solubilization and Aerobic Biodegradation of Polychlorinated Biphenyls in Two Aged Contaminated Soils. *Biotechnol Bioeng.* 2003;81:381-390.

FENNELL DE, NIJENHUIS I, WILSON SF, ZINDER SH, HAGGBLOM MM. Dehalococcoides Ethenogenes Strain 195 Reductively Dechlorinates Diverse Chlorinated Aromatic Pollutants. *Environ Sci Technol.* 2004;38:2075-2081.

FERRER M, GOLYSHIN P, TIMMIS KN. Novel Maltotriose Esters Enhance Biodegradation of Aroclor 1242 by Burkholderia Cepacia LB400. *World J Microbiol Biotechnol.* 2003;19:637-643.

FETZNER S. Bacterial Dehalogenation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1998;50:633-657.

FOCHT D. Strategies for the Improvement of Aerobic Metabolism of Polychlorinated Biphenyls. *Curr Opin Biotechnol.* 1995;6:341-346.

FOCHT DD. Biotransformation of Halogenated Pesticides. En: Haggblom MM, Bossert ID, editors. Dehalogenation, Microbial Processes and Environmental Application. Kluwer Academic Publishers; 2003. p. 303-332.

FORTIN PD, LO AT, HARO MA, KASCHABEK SR, REINEKE W, ELTIS LD. Evolutionarily Divergent Extradiol Dioxygenases Possess Higher Specificities for Polychlorinated Biphenyl Metabolites. *J Bacteriol.* 2005;187:415-421.

FULTHORPE RR, RODEES AN, TIEDJE JM. Pristine Soils Mineralize 3-Chlorobenzoate and 2,4-Dichlorophenoxyacetate via Different Microbial Populations *Appl Environ Microbiol.* 1996;62:1159-1166.

FULTHORPE RR, RODEES AN, TIEDJE JM. High Levels of Endemicity of 3-Chlorobenzoate-Degrading Soil Bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 1998;64:1620-1627.

FURUKAWA K. Engineering Dioxygenases for Efficient Degradation of Environmental Pollutants. *Curr Opin Biotechnol.* 2000a;11:244-249.

FURUKAWA K. Biochemical and Genetic Bases of Microbial Degradation of Polychlorinated Biphenyls (PCBs) *J Gen Appl Microbiol.* 2000b;46:283-296.

FURUKAWA K, MIYAZAKI T. Cloning of Gene Cluster Encoding Biphenil and Chlorobiphenil Degradation in Pseudomonas Pseudoalcaligenes. *J Bacteriol.* 1986;166:392-398.

FURUKAWA K, TONOMURA K, KAMIBAYASHI A. Effect of Chlorine Substitution on the Biodegradability of Polychlorinated Biphenyls. *Appl Environ Microbiol.* 1978;35:223-227.

GANEY PE, BOYD SA. An Approach to Evaluation of the Effect of Bioremediation on Biological Activity of Environmental Contaminants: Dechlorination of Polychlorinated Biphenyls. *Environ Health Perspectives* 2005;113:180-185.

GODDARD JP, REYMOND JL. Enzyme Assays for High-Throughput Screening. *Curr Opin Biotechnol.* 2004;15:314-322.

GILBERT ES, CROWLEY DE. Plant Compounds that Induce Polychlorinated Biphenyl Biodegradation by *Arthrobacter* sp. strain B1B. *Appl Environ Microbiol.* 1997;63:1933-1938.

GOLYSHIN PM, FREDICKSON HL, GIULIANO L, ROTHMEL R, TIMMIS KN, YAKIMOV MM. Effect of Novel Biosurfactant on Biodegradation of Polychlorinated Biphenyls by Pure and Mixed Bacterial Culture. *New Microbiol.* 1999;22:257-267.

GRACÍA-CHAVES MC, ARBELI Z, PLAZAS EC, DÍAZ-BÁEZ MC. Reductive Dehalogenation of Trichlorophenol in Sediment from Rio-Bogotá, Colombia: The Potential for Intrinsic Bioremediation and Biostimulation. *World J Microbiol Biotechnol.* 2007;23:1493-1495.

GRIBBLE GW. The Diversity of Naturally Occurring Organohalogen Compounds, *Chemosphere.* 2003;52:289-297.

HAGGBLOM MM, BOSSERT ID, editores. Dehalogenation, Microbial Processes and Environmental Application. Kluwer Academic Publishers; 2003.

HARKNESS MR, MCDERMOTT JB, ABRAMOWICZ DA, SALVO JJ, FLANAGAN WP, STEPHENS ML, *et al.* *In situ* Stimulation of Aerobic PCB Biodegradation in Hudson River Sediments. *Science.* 1993;259(5094):503-507.

HAWS LC, SU SH, HARRIS M, DEVITO MJ, WALKER NJ, FARLAND WH. *et al.* Development of a Refined Database of Mammalian Relative Potency Estimates for Dioxin-like Compounds. *Toxicol Sci.* 2006;89:4-30.

HATZINGER PB, ALEXANDER M. Effect of Aging of Chemicals in Soil on their Biodegradability and Extractability. *Environ Sci Technol.* 1995;29:537-545.

HERNANDEZ BS, ARENSDORF JJ, FOCHT DD. Catabolic Characteristics of Biphenyl-Utilizing Isolates which Cometabolize PCBs. *Biodegradation.* 1995;6:75-82.

HERNANDEZ BS, KOH SC, CHIAL M, FOCHT DD. Terpene-Utilizing Isolates and their Relevance to Enhanced Biotransformation of Polychlorinated Biphenyls in Soil. *Biodegradation.* 1997;8:153-158.

HIRAOKA Y, YAMADA T, TONE K, FUTAESAKU Y, KIMBARA K. Flow Cytometry Analysis of Changes in the DNA Content of the Polychlorinated Biphenyl Degradator *Comamonas Testosteroni* TK102: Effect of Metabolites on Cell-Cell Separation. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68:5104-5112.

HOLLIGER C, WOHLFARTH G, DIEKERT G. Reductive Dechlorination in the Energy Metabolism of Anaerobic Bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 1999;22:383-398.

HOLOMAN TR, ELBERSON MA, CUTTER LA, MAY HD, SOWERS KR. Characterization of a Defined 2,3,5,6-Tetrachlorobiphenyl-ortho-Dechlorinating Microbial Community by Comparative Sequence Analysis of Genes Coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol.* 1998;64:3359-3367.

HURTUBISE Y, BARRIAULT D, SYLVESTRE M. Involvement of the Terminal Oxygenase Beta Subunit in the Biphenyl Dioxygenase Reactivity Pattern Toward Chlorobiphenyls. *J Bacteriol.* 1998;180:5828-5835.

IWATA H, TANABE S, SAKAL N, TATSUKAWA R. Distribution of Persistent Organochlorines in the Oceanic Air and Surface Seawater and the Role of Ocean on their Global Transport and Fate. *Environ Sci Technol.* 1993;27:1080-1098.

KAHL S, HOFER B. A Genetic System for the Rapid Isolation of Aromatic-Ring-Hydroxylating Dioxygenases Activities. *Microbiology.* 2003;149:1475-1481.

KIM S, PICARDAL F. A Novel Bacterium that Utilizes Monochlorobiphenyls and 4-Chlorobenzoate as Growth Substrates. *FEMS Microbiol Lett.* 2000;185:225-229.

KIM S, PICARDAL F. Microbial Growth on Dichlorobiphenyls Chlorinated on

Both Rings as a Sole Carbon and Energy Source. *Appl Environ Microbiol.* 2001; 67:1953-1955.

KIMURA N, NISHI A, GOTO M, FURUKAWA K. Functional Analysis of a Variety of Chimeric Dioxygenases Constructed from Two Biphenyl Dioxygenases that are Similar Structurally but Different Functionally. *J Bacteriol.* 1997;179:3936-3943.

KITAGAWA W, MIYAUCHI K, MASAI E, FUKUDA M. Cloning and Characterization of Benzoate Catabolic Genes in the Gram-Positive Polychlorinated Biphenyl Degradator *Rhodococcus* sp. Strain RHA1. *J Bacteriol.* 2001;183:6598-6606.

KJELLERUP BV, SUN X, GHOSH U, MAY HD, SOWERS KR. Site-Specific Microbial Communities in Three PCB-Impacted Sediments are Associated with Different In Situ Dechlorinating Activities. *Environ Microbiol.* 2008;10:1296-1309.

KLAGES U, LINGENS F. Degradation of 4-Chlorobenzoic Acid by a *Nocardia* Species. *FEMS Microbiol Lett.* 1979;6:201-203.

KOCH B, WORM J, JENSEN LE, HØJBERG O, NYBROE O. Carbon Limitation Induces-Dependent Gene Expression in *Pseudomonas Fluorescens* in Soil. *Appl Environ Microbiol.* 2001;67:3363-3370.

KUBE M, BECK A, ZINDER SH, KUHL H, REINHARDT R, ADRIAN L. Genome Sequence of the Chlorinated Compound-Respiring Bacterium *Dehalococcoides* Species Strain CBDB1. *Nature Biotechnol.* 2005;23:1269-1273.

KUIPERS B, CULLEN WR, MOHN WW. Reductive Dechlorination of Nonachlorinatedbiphenyls and Selected Octachlorinatedbiphenyls by Microbial Enrichments Cultures. *Environ Sci Technol.* 1999;33:3577-3583.

LAHA S, LUTHY RG. Effects of Nonionic Surfactants on the Solubilization and Mineralization of Phenanthrene in Soil-Water Systems. *Biotechnol Bioeng.* 1992;40:1367-1380.

LAYTON AA, LAJOIE CA, EASTER JP, MUCCINI M, SAYLER GS. An Integrated Surfactant Solubilization and PCB Bioremediation Process for Soil. *Bioremediation J.* 1998;2:43-56.

LEAHY JG, SHREVE GS. The Effect of Organic Carbon on the Sequential Reductive Dehalogenation of Tetrachloroethylene in Landfill Leachates. *Water Res.* 2000;34:2390-2396.

LEIGH MB, PROUZOVA P, MACKOVA M, MACEK T, NAGLE DP, FLETCHER JS. Polychlorinated Biphenyl (PCB)-Degrading Bacteria Associated with Trees in a PCB-Contaminated Site. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72:2331-2342.

LEIGH MB, PELLIZARI VH, UHLÍK O, SUTKA R, RODRIGUES J, OSTROM NE, *et al.* Biphenyl-Utilizing Bacteria and their Functional Genes in a Pine Root Zone Contaminated with Polychlorinated Biphenyls (PCBs). *ISME J.* 2007;1:134-148.

LIU B, BEUERLE T, KLUNDT T, BEERHUES L. Biphenyl Synthase from Yeast-Extract-Treated Cell Cultures of *Sorbus Aucuparia*. *Planta.* 2004;218:492-496.

MACDONALD RW, BARRIE LA, BIDLEMAN TF, DIAMOND ML, GREGOR DJ, SEMKIN RG, *et al.*: Contaminants in the Canadian Arctic: 5 Years of Progress in Understanding Sources, Occurrence and Pathways. *Sci Total Environ.* 2000;254:93-234.

MACEDO AJ, TIMMIS KN, ABRAHAM WR. Widespread Capacity to Metabolize Polychlorinated Biphenyls by Diverse Microbial Communities in Soils With no Significant Exposure to PCB Contamination. *Environ Microbiol.* 2007;9:1890-1897.

MAGAR VS. PCB Treatment Alternatives and Research Directions. *J Environ Engineering*. 2003;129:961-965.

MAKKAR RS, ROCKNE KJ. Comparison of Synthetic Surfactants and Biosurfactants in Enhancing Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Environ Toxicol Chem*. 2003;22:2280-2292.

MALTSEVA OV, TSOI TV, QUENSEN III JF, FUKUDA M, TIEDJE JM. Degradation of Anaerobic Reductive Dechlorination Products of Aroclor 1242 by Four Aerobic Bacteria. *Biodegradation*. 1999;10:363-371.

MARS AE, PRINS G, WIETZES P, DE KONING W, JANSSEN DB. Effect of Trichloroethylene on the Competitive Behavior of Toluene-Degrading Bacteria *Appl Environ Microbiol*. 1998;64:208-215.

MARTÍNEZ P, AGULLÓ L, HERNÁNDEZ M, SEEGER M. Chlorobenzoate Inhibits Growth and Induces Stress Proteins in the PCB-Degrading Bacterium *Burkholderia Xenovorans* LB400. *Arch Microbiol*. 2007;188:289-297.

MASAI E, YAMADA A, HEALY JM, HATTA T, KIMBARA K, FUKUDA M. *et al.* Characterization of Biphenyl Catabolic Genes of Gram-Positive Polychlorinated Biphenyl Degrader *Rhodococcus* sp. Strain RHA1. *Appl Environ Microbiol*. 1995;61:2079-2085.

MASTER ER, LAI VW, KUIPERS B, CULLEN WR, MOHN WW. Sequential Anaerobic-Aerobic Treatment of Soil Contaminated with Weathered Aroclor 1260. *Environ Sci Technol*. 2002;36:100-103.

MAVDT (Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial) Manual de Evaluación y Gestión del Riesgo Asociado a los COP; 2007a.

MAVDT (Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial) Consolidación del Inventario de Plaguicidas COP; 2007b.

MAVDT (Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial) Fuentes y Liberaciones de Dioxinas y Furanos en Colombia. Línea Base 2002; 2007c.

MAVDT (Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial) Inventario Preliminar de Compuestos Bifenilicos Policlorados (PCB) Existentes en Colombia; 2007d.

MAVDT (Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial) Evaluación de los Impactos a la Salud (pública y ocupacional) Asociados a los Contaminantes Organicos Persistentes COP; 2007e.

MAVDT (Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial) Evaluación de las Implicaciones Sociales y Economicas del Uso y Reducción de los COP; 2007f.

MAY HD, MILLER GS, KJELLERUP BV, SOWERS KR. Dehalorespiration with Polychlorinated Biphenyls by an Anaerobic Ultramicrobacterium *Appl Environ Microbiol*. 2008;74:2089-2094.

MCFARLAND VA, CLARKE JU. Environmental Occurrence, Abundance, and Potential Toxicity of Polychlorinated Biphenyl Congeneres: Considerations for a Congener-Specific Analysis. *Environ Health Perspect*. 1989;81:225-239.

MEHARG AA, KILLHAM K. A Pre-Industrial Source of Dioxins and Furans. *Nature*. 2003;421:909-910.

MEIJER SN, OCKENDEN WA, SWEETMAN A, BREIVIK K, GRIMALT JO, JONES KC. Global Distribution and Budget of PCBs and HCB in Background Surface

Soils: Implications for Sources and Environmental Processes. *Environ Sci Technol.* 2003;37:667-672.

MONDELLO FJ, TURCICH MP, LOBOS JH, ERICKSON BD. Identification and Modification of Biphenyl Dioxygenase Sequences that Determine the Specificity of Polychlorinated Biphenyl Degradation. *Appl Environ Microbiol.* 1997;63:3096-3103.

MOUSA MA, GANEY PE, QUENSEN JF III, MADHUKAR BV, CHOU K, GIESY JR, *et al.* Altered Biologic Activities of Commercial Polychlorinated Biphenyl Mixtures after Microbial Reductive Dechlorination. *Environ Health Perspect.* 1998;106:1409-1418.

MULLIGAN CN. Environmental Applications for Biosurfactants. *Environ Pollut.* 2005;133:183-198.

NAKATSU C, WYNDHAM RC Cloning and Expression of the Transposable Chlorobenzoate-3,4-Dioxygenase Genes of *Alcaligenes* sp. BR60. *Appl Environ Microbiol.* 1993;59:3625-3633.

NATARAJAN MR, WU WM, NYE L, WANG H, BHATANGAR L, JAIN MK. Dechlorination of Polychlorinated Biphenyl Congeners by an Anaerobic Consortium. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1996;46:673-677.

NATARAJAN MR, NYE L, WU WM, WANG H, JAIN MK. Reductive Dechlorination of PCB-Contaminated Raisin River Sediments by Anaerobic Microbial Granules. *Biotech Bioeng.* 1997;55:182-190.

NIES L, VOGEL TM. Effects of Organic Substrates on Dechlorination of Aroclor 1242 in Anaerobic Sediments. *Appl Environ Microbiol.* 1990;56:2612-2617.

NISHI A, TOMINAGA K, FURUKAWA K. A 90-kilobase Conjugative Chromosomal Element Coding for Biphenyl and Salicylate Catabolism in *Pseudomonas Putida* KF715. *J Bacteriol.* 2000;182:1949-1955.

OHNISHI K, OKUTA A, JU J, HAMADA T, MISONO H, HARAYAMA S. Molecular Breeding of 2,3-Dihydroxybiphenyl 1,2-Dioxygenase for Enhanced Resistance to 3-Chlorocatechol. *J Biochem.* 2004;135:305-317.

OHTSUBO Y, SHIMURA M, DELAWARY M, KIMBARA K, TAKAGI M, KUDO T, *et al.* Novel Approach to the Improvement of Biphenyl and Polychlorinated Biphenyl Degradation Activity: Promoter Implantation by Homologous Recombination. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69:146-153.

OHTSUBO Y, KUDO T, TSUDA M, NAGATA Y. Strategies for Bioremediation of Polychlorinated Biphenyls. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2004;65:250-258.

PARNELL J, PARK J, DENEV V, TSOI T, HASHSHAM S, QUENSEN J. *et al.* Coping with Polychlorinated Biphenyl (PCB) Toxicity: Physiological and Genome-Wide Responses of *Burkholderia Xenovorans* LB400 to PCB-Mediated Stress. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72:6607-6614.

PAVLU L, VOSÁHLOVÁ J, KLIEROVÁ H, PROUZA M, DEMNEROVÁ K, BRENNER V. Characterization of Chlorobenzoate Degraders Isolated from Polychlorinated Biphenyl-Contaminated Soil and Sediment in the Czech Republic *J Appl Microbiol.* 1999;87:381-386.

PEEL MC, WYNDHAM RC. The Impact of Industrial Contamination on Microbial Chlorobenzoate Degradation in the Niagara Watershed. *Microb Ecol.* 1997;33:59-68.

PÉREZ-PANTOJA D, LEDGER T, PIEPER DH, GONZÁLEZ B. Efficient Turnover

of Chlorocatechols Is Essential for Growth of *Ralstonia eutropha* JMP134(pJP4) in 3-Chlorobenzoic Acid. *J Bacteriol.* 2003;185:1534-1542.

PIEPER DH. Aerobic Degradation of Polychlorinated Biphenyls. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2005;67:170-191.

POLDER A, ODLAND JO, TKACHEV A, FØREID S, SAVINOVA TN, SKAARE JU. Geographic Variation of Chlorinated Pesticides, Toxaphenes and PCBs in Human Milk from Sub-Arctic and Arctic Locations in Russia. *Sci Total Environ.* 2003;306:179-195.

POTRAWFKE T, LÖHNERT TH, TIMMIS KN, WITTICH RM. Mineralization of low-Chlorinated Biphenyls by *Burkholderia* sp. Strain LB400 and by a Two-Membered Consortium Upon Directed Interspecies Transfer of Chlorocatechol Pathway Genes. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1998;50:440-446.

QUENSEN JF III, BOYD SA, TIEDJE JM. Dechlorination of Four Commercial Polychlorinated Biphenyl Mixtures (Aroclors) by Anaerobic Microorganisms from Sediments. *Appl Environ Microbiol.* 1990;56:2360-2369.

QUENSEN JF III, MOUSA MA, BOYD SA, SANDERSON JT, FROESE KL, GIESY JP. Reduction of Ah Receptor Mediated Activity of PCB Mixtures Due to Anaerobic Microbial Dechlorination. *Environ Toxicol Chem.* 1998;17:806-813.

RITZ K. The Plate Debate: Cultivable Communities Have no Utility in Contemporary Environmental Microbial Ecology *FEMS Microbiol Ecol.* 2007;60:358-362.

RODRIGUES JLM, MALTSEVA OV, TSOI TV, HELTON RR, QUENSEN III JF, FUKUDA M, *et al.* Development of a *Rhodococcus* Recombinant Strain for Degradation of Products from Anaerobic Dechlorination of Aroclor 1242. *Environ Sci Technol.* 2001;35:663-668.

RODRIGUES JL, KACHEL CA, AIELLO MR, QUENSEN JF, MALTSEVA OV, TSOI TV, *et al.* Degradation of Aroclor 1242 Dechlorination Products in Sediments by *Burkholderia Xenovorans* LB400 (ohb) and *Rhodococcus* sp. Strain RHA1 (fcb). *Appl Environ Microbiol.* 2006;72:2476-2482.

RON EZ, ROSENBERG E. Natural Roles of Biosurfactants. *Environ Microbiol.* 2001;3:229-236.

ROSS G. The Public Health Implications of Polychlorinated Biphenyls (PCBs) in the Environment. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2004;59:275-291.

RUEBUSH SS, BRANTLEY SL, TIEN M. Reduction of Soluble and Insoluble Iron Forms by Membrane Fractions of *Shewanella oneidensis* Grown under Aerobic and Anaerobic Conditions *Appl Environ Microbiol.* 2006;72:2925-2935.

SEAH SYK, LABBÉ G, NERDINGER S, JOHNSON MR, SNIECKUS V, ELTIS LD. Identification of a Serine Hydrolase as a Key Determinant in the Microbial Degradation of Polychlorinated Biphenyls. *J Biol Chem.* 2000;275:15701-15708.

SEEGER M, TIMMIS KN, HOFER B. Conversion of Chlorobiphenyls into Phenylhexadienoates and Benzoates by the Enzymes of the Upper Pathway for Polychlorobiphenyl Degradation Encoded by the bph Locus of *Pseudomonas* sp. Strain LB400 *Appl Environ Microbiol.* 1995;61:2654-2658.

SEEGER M, ZIELINSKI M, TIMMIS KN, HOFER B. Regiospecificity of Dioxygenation of di- to Pentachlorobiphenyls and their Degradation to

Chlorobenzoates by the bph-Encoded Catabolic Pathway of *Burkholderia* sp. Strain LB400 *Appl Environ Microbiol.* 1999;65:3614-3621.

SESHADRI R, ADRIAN L, FOUTS DE, EISEN JA, PHILLIPPY AM, METHE BA, *et al.* Genome Sequence of the PCE-Dechlorinating Bacterium *Dehalococcoides Ethenogenes*. *Science.* 2005;307(5706):105-108.

SHE J, HOLDEN A, SHARP M, TAÑER M, WILLIAMS-DERRY C, HOOPER K. Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) and Polychlorinated Biphenyls (PCBs) in Breast Milk from the Pacific Northwest. *Chemosphere.* 2007;67:S307-S317.

SINGER AC, GILBERT ES, LUEPROMCHAI E, CROWLEY DE. Bioremediation of Polychlorinated Biphenyl-Contaminated Soil Using Carvone and Surfactant-Grown Bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2000;54:838-843.

SINGER AC, CROWLEY DE, THOMPSON IP. Secondary Plant Metabolites in Phytoremediation and Biotransformation. *Trends Biotechnol.* 2003;21:123-130.

SINGER AC, THOMPSON IP, BAILEY MJ The Tritrophic Trinity: A Source of Pollutant-Degrading Enzymes and its Implications for Phytoremediation. *Curr Opin Microbiol.* 2004;7:239-244.

SMIDT H, DE VOS WM. Anaerobic Microbial Dehalogenation. *Anna Rev Microbiol.* 2004;58:43-73.

SONDOSSI M, SYLVESTRE M, AHMAD D. Effects of Chlorobenzoate Transformation on the *Pseudomonas Testosteroni* Biphenyl and Chlorobiphenyl Degradation Pathway. *Appl Environ Microbiol.* 1992;58:485-495.

STECKER C, JOHANN A, HERZBERG C, AVERHOFF B, GOTTSCHALK G. Complete Nucleotide Sequence and Genetic Organization of the 210-Kilobase Linear Plasmid of *Rhodococcus Erythropolis* BD2. *J Bacteriol.* 2003;185:5269-5274.

STELMACK PL, GRAY MR, PICKARD MA. Bacterial Adhesion to Soil Contaminants in the Presence of Surfactants. *Appl Environ Microbiol.* 1999;65:163-168.

STRATFORD J, WRIGHT M, REINEKE W, MOKROSS H, HAVEL J, KNOWLES C, *et al.* Influence of Chlorobenzoates on the Utilization of Chlorobiphenyls and Chlorobenzoate Mixtures by Chlorobiphenyl/Chlorobenzoate-Mineralising Hybrid Bacterial Strains. *Arch Microbiol.* 1996;165:213-218.

SUENAGA H, GOTO M, FURUKAWA K. Emergence of Multifunctional Oxygenase Activities by Random Priming Recombination. *J Biol Chem.* 2001;276:22500-22506.

SUENAGA H, WATANABE T, SATO M, NGADIMAN, FURUKAWA K. Alteration of Regiospecificity in Biphenyl Dioxygenase by Active-Site Engineering *J Bacteriol.* 2002;184:3682-3688.

SUENAGA H, GOTO M, FURUKAWA K. Active-Site Engineering of Biphenyl Dioxygenase: Effect of Substituted Amino Acids on Substrate Specificity and Regiospecificity. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2006;71:168-176.

TAKEDA H, YAMADA A, MIYAUCHI K, MASAI E, FUKUDA M. Characterization of Transcriptional Regulatory Genes for Biphenyl Degradation in *Rhodococcus* sp. Strain RHA1. *J Bacteriol.* 2004;186:2134-2146.

TANDLICH R, BREZNA B, DERCOVA K. The Effect of Terpenes on the Biodegradation of Polychlorinated Biphenyls by *Pseudomonas Stutzeri*. *Chemosphere.* 2001;44:1547-1555.

TARAZONA JV. Standardizing Chemical Risk Assessment, At Last. *Nature*. 2002;415(6867):14.

TARAZONA JV, VEGA MM. Hazard and Risk Assessment of Chemicals for Terrestrial Ecosystems. *Toxicology*. 2002;181-182:187-91.

TIEDJE JM, TOSÍ TV, PENNELL KD, HANSEN L, WANI A. Enhancing PCB Bioremediation. En: Talley JW, Bajpai R, Conway R, Averett DE, Davis JL, editors. Federal Integrated Biotreatment Research Consortium (FIBRC): Flask to Field Initiative. ERDC/EL TR-02-37. Disponible en la red; 2002.

TILLMANN S, STROMPL C, TIMMIS KN, ABRAHAM WR. Stable Isotope Probing Reveals the Dominant Role of Burkholderia Species in Aerobic Degradation of PCBs. *FEMS Microbiol Ecol*. 2005;52:207-217.

VAILLANCOURT FH, LABBE G, DROUIN NM, FORTIN PD, ELTIS LD. The Mechanism-Based Inactivation of 2,3-Dihydroxybiphenyl 1,2-Dioxygenase by Catecholic Substrates. *J Biol Chem*. 2002;277:2019-2027.

VAN DEN BERG M, BIRNBAUM L, BOSVELD ATC, BRUNSTROM B, COOK P, FEELEY M, *et al*. Toxic Equivalency Factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for Humans and Wildlife. *Environ Health Perspect*. 1998;106:775-792.

VAN DEN BERG M, BIRNBAUM LS, DENISON M, DE VITO M, FARLAND M, FEELEY M, *et al*. The 2005 World Health Organization Reevaluation of Human and Mammalian Toxic Equivalency Factors for Dioxins and Dioxin-Like Compounds. *Toxicol Sci*. 2006;93(2):223-241.

VAN DORT HML, SMULLEN A, MAY RJ, BEDARD DL. Priming Microbial meta-Dechlorination of Polychlorinated Biphenyls that Have Persisted in Housatonic River Sediments for Decades. *Environ Sci Technol*. 1997;31:3300-3307.

VAN HOOFF PL, JAFVERT CT. Reductive Dechlorination of Chlorobenzenes in Surfactant-Amended Sediment Slurries. *Environ Toxicol Chem*. 1996;15:1914-1924.

VAN HYLCKAMA VLIET JET, JANSSEN DB. Formation and Detoxification of Reactive Intermediates in the Metabolism of Chlorinated Ethenes. *J Biotechnol*. 2001;85:81-102.

VAN PÉE KH, UNVERSUCHT S. Biological Dehalogenation and Halogenation Reactions. *Chemosphere*. 2003;52:299-312.

WATTS JEM, FAGERVOLD SK, MAY HD, SOWERS KR. A PCR-Based Specific Assay Reveals a Population of Bacteria within the Chloroflexi Associated with the Reductive Dehalogenation of Polychlorinated Biphenyls. *Microbiology*. 2005;151:2039-2046.

WIEGEL J, WU Q. Microbial Reductive Dehalogenation of Polychlorinated Biphenyls. *FEMS Microbiol Ecol*. 2000;32:1-15.

WITTICH RM, WOLF P. Growth of the Genetically Engineered Strain *Cupriavidus Necator* RW112 with Chlorobenzoates and Technical Chlorobiphenyls. *Microbiology*. 2007;153:186-195.

WOLSKA L, SAGAJDAKOW A, KUCZY SKA A, NAMIE NIK J. Application of Ecotoxicological Studies in Integrated Environmental Monitoring: Possibilities and Problems. *Trends Analytical Chem*. 2007;26:332-344.

WU Q, WIEGEL J. Two Anaerobic Polychlorinated Biphenyl-Dehalogenating Enrichments that Exhibit Different para-Dechlorination Specificities. *Appl Environ Microbiol*. 1997;63:4826-4832.

WU Q, BEDARD DL, WIEGEL J. Effect of Incubation Temperature on the Route of Microbial Reductive Dehalogenation of 2,3,4,6-Tetrachlorobiphenyl in Polychlorinated Biphenyl (PCB)-Contaminated and PCB-Free Freshwater Sediments. *Appl Environ Microbiol.* 1997;63:2836-2843.

WU Q, WATTS JE, SOWERS KR, MAY HD. Identification of a Bacterium that Specifically Catalyzes the Reductive Dechlorination of Polychlorinated Biphenyls with Doubly Flanked Chlorines. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68:807-812.

YAN T, LAPARA TM, NOVAK PJ. The Reductive Dechlorination of 2,3,4,5-Tetrachlorobiphenyl in Three Different Cultures: Evidence for the Involvement of Phylogenetically Similar Dehalococcoides-Like Bacterial Populations. *FEMS Microbiol Ecol.* 2006;55:248-261.

YEH DH, PENNELL KD, PAVLOSTATHIS SG. Toxicity and Biodegradability Screening of Nonionic Surfactants Using a Sediment-derived Methanogenic Consortium. *Water Sci Technol.* 1998;38:55-62.

YEH DH, PAVLOSTATHIS SG. Anaerobic Biodegradability of Tween Surfactants Used as a Carbon Source for the Microbial Reductive Dechlorination of Hexachlorobenzene. *Water Sci Technol.* 2005;52(1-2):343-349.

YOSHIDA N, TAKAHASHI N, HIRAISHI A. Phylogenetic Characterization of a Polychlorinated-Dioxin-Dechlorinating Microbial Community by Use of Microcosms Studies. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71:4325-4334.

ZHAO H. Directed Evolution of Novel Protein Functions. *Biotechnol Bioeng.* 2007;98(2):313-317.

ZIELINSKI M, KAHL S, STANDFUß-GABISCH C, CÁMARA B, SEEGER M, HOFER B. Generation of Novel-Substrate-Accepting Biphenyl Dioxygenases through Segmental Random Mutagenesis and Identification of Residues Involved in Enzyme Specificity. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72:2191-2199.

ZWIERNIK MJ, QUENSEN III JF, BOYD SA. FeSO₄ Amendments Stimulate Extensive Anaerobic PCB Dechlorination. *Environ Sci Technol.* 1998;32:3360-3365.