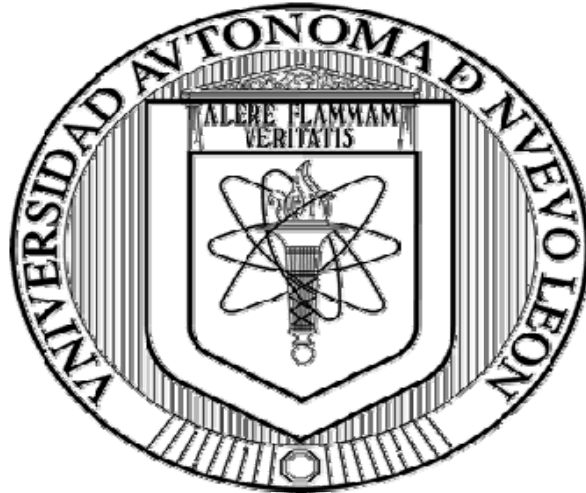


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



ANALISIS MICROBIOLOGICO Y MOLECULAR DE UN CONSORCIO Y UNA
CEPA BACTERIANA PRESENTE EN LA BIODEGRADACION DE LOS BTEX

Por

M.C. JESUS ANTONIO MORLETT CHAVEZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de DOCTOR EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN BIOLOGIA MOLECULAR E INGENIERIA GENETICA

Agosto 2009

ÍNDICE

Capítulo I. introducción	1
Capitulo 2. Revisión de literatura	3
2.1. Introducción	3
2.2. Estructura química y clasificación de los hidrocarburos	4
2.3. Uso de los hidrocarburos aromáticos	5
2.4. Contaminación con hidrocarburos aromáticos	8
2.5. Riesgos a la salud causada por los BTEX	9
2.6. Biorremediación	11
2.7. Función de la diversidad microbiana durante la biorremediación	13
2.8. Adaptación: mecanismos genéticos y fisicoquímicos	15
2.8.1. Mecanismos genéticos	16
2.8.2. Mecanismos fisicoquímicos	17
2.8.2.1. Temperatura	18
2.8.2.2. Oxígeno	18
2.8.2.3. Nutrientes	18
2.8.2.4. pH	18
2.9. Biodegradación bajo condiciones aerobias: rutas catabólicas	19
2.10. Bases moleculares de las bacterias biodegradadoras	21
2.10.1. Proteínas catabólicas expresadas durante la biodegradación de los BTEX	22
2.10.1.1. Enzimas dioxigenasas	22
2.10.1.2. Enzimas monooxigenasas	24
2.10.2. Genes catabólicas	25
2.10.2.1. Expresión de genes que codifican para las	

dioxigenasas	25
2.10.2.2. Expresión de genes que codifican para las monooxigenasas	28
2.11. Regulación de los genes catabólicos	28
Capítulo III. Antecedentes	33
Capítulo IV. Justificación	40
Capítulo V. Objetivos	41
Capítulo VI. Material y Métodos	42
6.1. Material	42
6.1.1. Material biológico	42
6.1.2. Reactivos químicos y enzimáticos	42
6.1.3. Cultivo bacteriológico	44
6.1.4. Equipos e infraestructura	44
6.2. Métodos	47
6.2.1. Enriquecimiento y aislamiento	47
6.2.1.1. Establecimiento del consorcio	47
6.2.1.2. Aislamiento de cepas bacterianas a partir del Consorcio	48
6.2.2. Cinética de remoción de los BTEX	49
6.2.3. Análisis genómico	50
6.2.3.1. Extracción de ADN genómico	50
6.2.3.2. Amplificación de los genes: <i>ADNr 16s</i> , <i>bed</i> y <i>tod</i>	50
6.2.3.3. Clonación en vector topo TA	52
6.2.3.4. Extracción de ADN plasmídico	53
6.2.3.5. Transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena	

de la polimerasa (RT-PCR)	55
6.2.4. Análisis protéico	56
62.4.1. Preparación de proteínas citoplasmáticas y geles SDS-PAGE	56
6.2.4.2. Determinación de secuencias peptídicas	58
Capítulo VII. Resultados	60
7.1. Cinéticas de biodegradación	60
7.1.1. Enriquecimiento y aislamiento	60
7.1.2. Cinética de biodegradación de los BTEX	62
7.1.3. Identificación de cepas bacterianas presentes en el consorcio	64
7.2. Estudio a nivel protéico	68
7.2.1. Perfil de expresión protéico	68
7.2.2. Análisis de las proteínas por LC/MS/MS	72
7.3. Estudio a nivel genómico	75
7.3.1. Amplificación de los genes <i>bed</i> y <i>tod</i>	75
7.3.2. Transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) de los genes <i>bed</i> y <i>tod</i>	79
Capítulo VIII. Discusión	81
8.1. Cinética de biodegradación	81
8.2. Estudio genómico del gen ADNr 16s	82
8.3. Estudio a nivel proteómico	83
8.4. Análisis de proteínas por LC/MS/MS	85
8.4.1. Proteínas de membrana	85
8.4.2. Proteínas implicadas en la oxidación del anillo aromático	85
8.4.3. Proteínas implicadas en la ruptura del anillo aromático	88

8.4.4. Proteínas que participan en el catabolismo de los ácidos grasos	89
8.5. Análisis genómico de los genes <i>bed</i> y <i>tod</i>	90
Capitulo IX. Conclusión	92
X. Recomendaciones	93
XI. Bibliografía	94

CUADROS TESIS

Cuadro 1. Industrias generadoras de compuestos aromáticos.	7
Cuadro 2. Propiedades tóxicas de los BTEX.	10
Cuadro 3. Bacterias biodegradadoras de compuestos aromáticos en condiciones aerobias.	14
Cuadro 4. Primers utilizados para amplificar los genes <i>16s</i> , <i>eta</i> , <i>bed</i> y <i>tod</i> .	51
Cuadro 5. Análisis por PCR de los genes <i>16s</i> , <i>eta</i> , <i>bed</i> y <i>tod</i> .	51
Cuadro 6. Condiciones utilizadas para retrotranscribir el ARN total extraído a partir de la cepa FMB08, consorcio, cepa de referencia y <i>E. coli</i> DH5 α .	56
Cuadro 7. Características de la morfología macro- y microscópica de diez colonias que fueron aisladas a partir de un consorcio que fue capaz de remover los BTEX.	61
Cuadro 8. Comparación de la remoción de cada uno de los BTEX por el consorcio, cepa FMB08 y <i>P. putida</i> F1.	64
Cuadro 9. Comparación de las secuencias del gen ADNr 16S del consorcio aclimatado a gasolina y de la cepa FMB08 contra las secuencias reportadas en el gen bank.	66
Cuadro 10. Pruebas bioquímicas realizadas a la cepa FMB08 aislada a partir del consorcio.	67
Cuadro 11. Proteínas expresadas en presencia de los BTEX y analizadas por LC/MS/MS.	73
Cuadro 12. Análisis por LC/MS/MS de proteínas implicados en la degradación de los BTEX.	75
Cuadro 13. Resumen de los resultados obtenidos a partir de la RT-PCR de los genes <i>bed</i> y <i>tod</i> .	80

FIGURAS TESIS

Figura 1. Estructuras químicas de los BTEX.	4
Figura 2. Producción anual de los BTEX a nivel mundial.	6
Figura 3. Ruta metabólica de los BTEX.	20
Figura 4. Esquema representativo de las dioxigenasas.	22
Figura 5. Comparación de secuencias proteicas que pertenecen a la familia de las dioxigenasas.	24
Figura 6. Oxidación del tolueno a partir de la tolueno dioxigenasa (tod) y de la tolueno monooxigenasa (tmo).	24
Figura 7. Estructura del operón catabólico.	26
Figura 8. Los operones que codifican para las enzimas de la familia de las dioxigenasas, muestran una organización génica muy similar.	27
Figura 9. Mapa genético del operón <i>tod</i> de <i>Pseudomonas putida</i> KL47.	30
Figura 10. Regulación catabólica en presencia del xileno.	31
Figura 11. Activación de la transcripción por los activadores tipo LysR.	32
Figura 12. A) Amplificación del gen tolueno dioxigenasa a partir del ADN cromosómico de diferentes especies del género <i>Pseudomonas</i> .	36
Figura 13. Análisis del perfil proteico de <i>Sphingomonas</i> expuesta a diferentes hidrocarburos poliaromáticos.	38
Figura 14. Comparación del perfil proteico de la cepa <i>Alcanivorax borkumensis</i> expuesta a diferentes alcanos y piruvato.	39
Figura 15. Cinética preliminar de remoción de los BTEX en reactores en lote.	60
Figura 16. Crecimiento de las cepas aisladas en presencia de los BTEX.	62
Figura 17. Cinética de biodegradación de los BTEX utilizando diferentes inóculos.	63
Figura 18. Amplificación y digenstión del gen ADNr16s del consorcio, cepa FMB08, <i>P. putida</i> F1 y <i>E. coli</i> DH5 α .	65
Figura 19. Morfología microscópica de la cepa FMB08 aislada a partir del consorcio.	66
Figura 20. Perfil de expresión proteico de la cepa FMB08 expuesta a los	69

BTEX.

Figura 21. Perfil de expresión proteico de la cepa FMB08.	70
Figura 22. Análisis proteico del consorcio y de la cepa FMB08 expuestos a los BTEX.	71
Figura 23. Amplificación de los genes <i>bed</i> y <i>tod</i> .	75
Figura 24. Comparación de la secuencias nucleotídica y aminoacídica del gen <i>tod</i> de la cepa FMB08 versus la cepa <i>P. putida</i> F1.	78
Figura 25. Análisis de la expresión génica de la cepa FMB08 y del consorcio expuestos a la mezcla de los BTEX y a cada uno de estos compuestos.	80

RESUMEN

Presenta: MC Jesus Antonio Morlett Chavez. Como requisito parcial para obtener el grado de Dr en Ciencias con especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética.

Título: Análisis microbiológico-molecular de un consorcio y una cepa bacteriana capaces de degradar los BTEX.

Introducción: El benceno, tolueno, etilbenceno y xileno (BTEX) son comúnmente contaminantes de mantos freáticos y suelos. Sin embargo, la degradación microbiológica de los hidrocarburos del petróleo se lleva a cabo bajo condiciones aerobias y anaerobias. Durante la degradación aerobia de los hidrocarburos aromáticos, las enzimas dioxigenasas participan activamente en la oxidación y ruptura del anillo aromático.

Objetivo: Caracterizar microbiológicamente un consorcio aclimatado a gasolina y determinar el perfil proteico de éste, además, aislar e identificar cepas bacterianas de éste consorcio.

Resultados y discusión: Se aisló, a partir de un consorcio aclimatado a gasolina, la cepa FMB08. Ésta fue capaz de remover los BTEX más del 90% y se identificó como miembro del genero *Pseudomonas*. Por su parte, el consorcio removió casi el 100% de estos compuestos. A partir del gen ADNr 16s se identificaron algunas bacterias presentes en el consorcio, como: *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Burkholderia*, *Alcanivorax*, *Rhodococcus* and *Bacillus*. Interesantemente, el proteoma de la cepa FMB08 mostró ciertas similitudes en comparación con otras cepas que se han expuesto a hidrocarburos. Además, el gen *tod* (tolueno dioxigenasa) se sobre-expreso en la cepa FMB08 cuando se expuso al tolueno, etilbenceno, xileno y BTEX. En contraste, el gen *tod* de *Pseudomonas putida* F1 (ATCC 700007) solo se sobre-expreso en presencia de tolueno. Varias diferencias tanto en la secuencia nucleotidica como proteica se observaron. Estos datos sugieren y quizá explican la capacidad de FMB08, en comparación con *P. putida* F1, para remover compuestos aromáticos.

Conclusión: El gen *tod* y la cepa FMB08 promete ser una alternativa para remediar sitios contaminados con este tipo de hidrocarburos.

Key words: BTEX, dioxigenases, LC/MS/MS-biodegradation, *Pseudomonas* spp.

Dr Hugo Albero Barrera Saldaña

Director de Tesis

CAPITULO I.

INTRODUCCIÓN

El crecimiento de la industria en todo el mundo ha provocado, además de beneficios para la vida humana, amplio daño al medio ambiente debido a la gran cantidad de desechos tóxicos. Por ejemplo, los BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos) son los compuestos más solubles de todos los componentes de la gasolina y son los agentes más contaminantes presentes en agua y suelo. Además de esto, los BTEX causan diferentes efectos a la salud humana destacando a) la irritación de piel y pulmones, b) cianosis y c) carcinogénesis y mutagénesis. En México, existe una amplia variedad de industrias que utilizan los hidrocarburos aromáticos como materia prima, estos son liberados al medio ambiente y no existe ninguna legislación que limite el uso de los BTEX en la gasolina y en la industria. Además, México es un país en vías de desarrollo por lo que es necesario desarrollar e implementar procesos biotecnológicos a bajo costo y afines con el medio ambiente, para tratar sitios contaminados con los hidrocarburos aromáticos.

La degradación microbiológica de los hidrocarburos del petróleo se lleva a cabo bajo condiciones aerobias y anaerobias. La biodegradación aerobia ha sido ampliamente investigada y múltiples especies con capacidad de remoción de los compuestos xenobióticos se han identificado. Sin embargo, uno de los aspectos más importantes en la biodegradación, además de los microorganismos con capacidades catabólicas, es la identificación de las especies presentes en forma

de consorcios o cultivos puros, para tratar de asemejar las condiciones óptimas para su desarrollo. Esto nos permitiría comprender, optimizar y desarrollar biotecnología específica para la remoción de compuestos de origen antropogénico.

Algunas de las herramientas de biología molecular que se utilizan en la biotecnología se mencionan en seguida. La electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio en una dimensión (SDS-PAGE), dos dimensiones (2D) y la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a la espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS), entre otras, son utilizadas para analizar la síntesis global de proteínas, como un indicador de la expresión génica de la bacteria. El rápido progreso en la investigación de los proteomas microbianos se debe a la gran disponibilidad de secuencias de genomas que varios grupos de investigación han revelado. Además, existen diversos reportes en donde se han amplificado por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciado genes catabólicos responsables de la biodegradación.

En nuestro estudio analizamos el potencial catabólico de la cepa *Pseudomonas putida* FMB08, aislada a partir de un consorcio capaz de degradar los BTEX. Así mismo, realizamos un estudio del perfil proteico de ésta expuesta tanto a la mezcla de los BTEX como a cada uno de estos. Las proteínas que mostraron una expresión diferencial se analizaron por LC/MS-MS. Para confirmar los estudios realizados por proteómica, se amplificaron por PCR y secuenciaron los genes *bed* y *tod*, además por RT-PCR analizamos la expresión génica de ambos genes.

CAPITULO II.

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Introducción

El uso desmedido de los hidrocarburos (aromáticos/alifáticos), así como su liberación en suelo y agua provoca un considerable daño al medio ambiente (Díaz y cols., 2001; Pieper y Reineke, 2000). En comparación con otros hidrocarburos de la gasolina, los BTEX son más solubles en el agua, además de ser genotóxicos (Tsao y cols., 1998; Dean, 1985). Sin embargo, bajo condiciones favorables, se sabe que los BTEX son biodegradados por una amplia variedad de microorganismos (Díaz y cols., 2001; Tsao y cols., 1998; Smith, 1994; Harayama y Timmis, 1992; van der Meer y cols., 1992; Gibson y Subramanian, 1984). En la actualidad, existe interés en explotar la habilidad de estos microorganismos para desarrollar procesos biotecnológicos que permita la remoción de los compuestos aromáticos como los BTEX (Díaz y cols., 2001; Pieper y Reineke, 2000). Algunas de las proteínas más estudiadas son las enzimas dioxigenasas y su participación en el metabolismo de los BTEX. Estudios a nivel proteómico y genómico se han realizado para analizar éstas genes catabólicos y sus productos relacionados con la degradación de los BTEX.

2.2. Estructura química y clasificación de los hidrocarburos aromáticos.

Los compuestos que consisten de carbono e hidrógeno son llamados hidrocarburos y se clasifican en compuestos alifáticos y aromáticos. Los compuestos alifáticos son cadenas lineales o ramificadas de átomos de carbono y de acuerdo a sus tipos de enlace se clasifican en tres grupos: alcanos (enlace sencillo), alquenos (doble enlace) y alquinos (triple enlace). Los hidrocarburos aromáticos (Figura 1) son aquellos hidrocarburos que poseen las propiedades especiales asociadas con el núcleo o anillo del benceno, en el cual hay seis grupos de carbono-hidrógeno unidos a cada uno de los vértices de un hexágono. Estos se clasifican en monocíclicos (contiene un anillo) y/o policíclicos (contienen dos o más anillos) (Battersby y Wilson, 1989; Rooney-Varga y cols., 1999; Widdel y Rabus, 2001; Boll y cols, 2002).

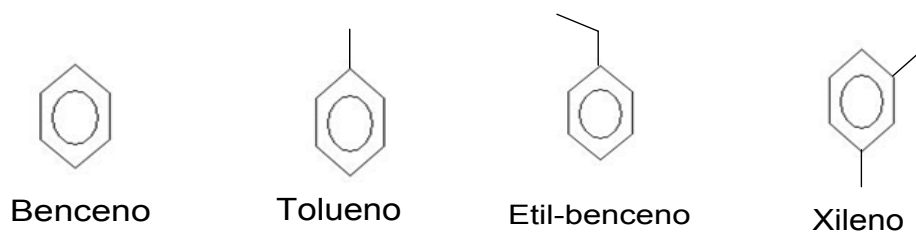


Figura 1. Estructuras químicas de los BTEX. Estos suelen ser un ejemplo de hidrocarburos aromáticos y se encuentran comúnmente en el petróleo crudo.

Las principales fuentes de hidrocarburos aromáticos son la destilación de la hulla y una serie de procesos petroquímicos, en particular la destilación catalítica, la destilación del petróleo crudo y la alquilación de hidrocarburos aromáticos de las series más bajas. Los aceites esenciales que contienen terpenos y *p*-cimeno, también pueden obtenerse de los pinos, los eucaliptos y las plantas aromáticas y

son un subproducto de las industrias papeleras que utilizan pulpa de pino. Los hidrocarburos policíclicos se encuentran en las atmósferas urbanas.

2.3. Uso de los hidrocarburos aromáticos.

Los hidrocarburos aromáticos son la segunda clase de compuestos orgánicos más abundantes en la naturaleza, además son los compuestos químicos más importantes debido a su uso como fuente primaria de energía en todo el mundo. La mayoría de estos compuestos son de origen natural o químicamente sintetizados a partir de hidrocarburos naturales (Smith, 1994; Boll y cols., 2002; Chakraborty y Coates, 2004).

Además, la importancia económica de los hidrocarburos aromáticos ha aumentado progresivamente desde que a principios del siglo XIX se utilizaba la nafta de alquitrán de hulla como disolvente del caucho. En la actualidad, los principales usos de los compuestos aromáticos son: disolventes o constituyentes, en proporción variable, de la gasolina, los aceites de calentamiento y asfalto, entre otros (Potter, 1992; Harwood y Gibson, 1997; Widdel y Rabus, 2001). Se estima que la producción anual de petróleo o compuestos derivados del petróleo a nivel mundial oscila entre 1.7 y 8.8 mil millones de toneladas (Leahy y Colwell, 1990) (Figura 2). Además, estos compuestos son utilizados como materia prima para la elaboración de plásticos, colorantes y solventes (Cuadro 1), pero llama la atención que también son utilizados en la industria agroquímica (para la producción de herbicidas, insecticidas y fertilizantes) y farmacéutica (Harwood y Gibson, 1997).

Por otro lado, se sabe que los hidrocarburos constituyen un amplio y diverso grupo de compuestos con valor agregado y al mismo tiempo causan contaminación al medio ambiente (Greene y cols., 2000).

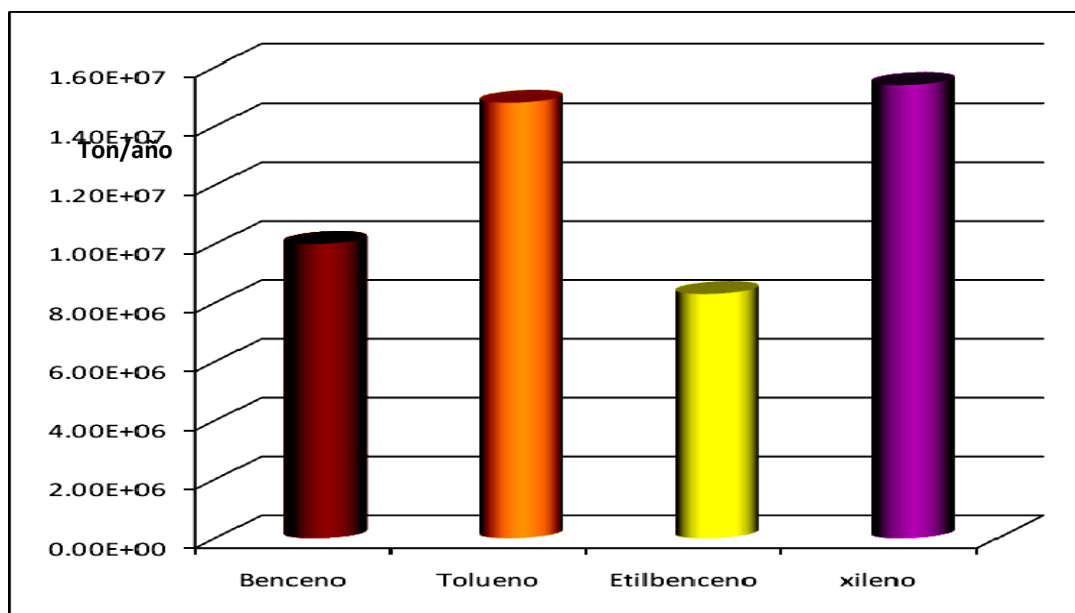


Figura 2. Producción anual de los BTEX a nivel mundial. El xileno es el compuesto que más se produce, seguido por el tolueno, benceno y etilbenceno.

Específicamente, el benceno se ha utilizado ampliamente en la fabricación de estireno, fenoles, anhídrido maleico, detergentes, explosivos, productos farmacéuticos y colorantes. También se ha empleado como combustible, reactivo químico y agente de extracción para semillas y frutos secos. Mientras que el tolueno es un disolvente de aceites, resinas, caucho natural (mezclado con ciclohexano) y sintético, alquitrán de hulla, asfalto, brea y acetilcelulosas (en caliente, mezclado con etanol). Sin embargo, el benceno se ha prohibido como componente de productos destinados al uso doméstico y en muchos países

también se ha prohibido su uso como disolvente y componente de los líquidos de limpieza en seco.

Cuadro 1. Industrias generadoras de compuestos aromáticos.

Compuestos Aromáticos	Fuente
BTEX	Combustibles, solventes, industria alimenticia.
Policíclicos aromáticos	Combustibles.
Alquil fenoles	Surfactantes y detergentes.
Aminas aromáticas	Surfactantes, detergentes, colorantes.
Azo-aromáticos	Colorantes.
Nitro aromáticos	Explosivos, industria farmacéutica, pesticidas y colorantes.

A nivel nacional, en México en el año 2000, 27,280 empresas manifestaron generar 3'705,846.21 ton/año de residuos peligrosos, de los cuales, 1,143 empresas del estado de Nuevo León reportaron haber generado 253,079.48 ton/año, lo que es equivalente al 7% del total (INEGI, 2002). Sin embargo, para el año 2004, a nivel nacional 35,304 empresas manifestaron la generación de 6.17 millones de toneladas de residuos peligrosos (SEMARNAT, 2005a). Es relevante mencionar que hasta el año 2004 se habían identificado 297 sitios contaminados con residuos peligrosos, de los cuales 119 se habían caracterizado, mientras que 12 se consideraban rehabilitados o en proceso de rehabilitación (SEMARNAT, 2005b).

Además en México, durante el año de 2003, se vendieron en todo el país 601,000 barriles diarios de gasolinas y 255,000 barriles diarios de diesel, que permitieron ingresos a PEMEX, del orden de los 280,000 millones de pesos.

2.4. Contaminación con hidrocarburos aromáticos.

La contaminación al medio ambiente es causada por un amplio grupo de hidrocarburos aromáticos y alifáticos, a consecuencia del desarrollo industrial acelerado y de otras actividades antropogénicas (Smith, 1994; Boll y cols., 2002; Chakraborty y Coates, 2004). De manera general, podemos definir el término “xenobiótico” como un compuesto sintético cuya estructura química no ha sido expuesta a los microorganismos a lo largo del tiempo, mientras que los compuestos “persistentes” son aquellos que no son biodegradados o lo son lentamente (Lesinger y Brunner, 1986). Además, cientos de sitios contaminados con residuos peligrosos se han generado en todo el mundo debido al incremento en la cantidad y variedad de estos compuestos, lo cual, ha provocado que el balance entre la liberación de compuestos aromáticos al medio ambiente y la eliminación de los xenobióticos, por procesos naturales, sea alterado (Harwood y Gibson, 1997; Greene y cols., 2000). Cabe señalar que en México al igual que en otros países en vías de desarrollo, el incremento en la actividad industrial ha traído consigo un incremento en el número de accidentes relacionados con almacenamiento, transporte, fugas, derrames, incendios y la disposición clandestina e incontrolada de residuos peligrosos (SEMARNAT, 2002a-b).

Se ha tratado de clasificar los compuestos de origen industrial que resultan nocivos para el medio ambiente evaluando su biodegradabilidad, frecuencia de aparición y toxicidad. Así pues, se han llegado a identificar unos 114 compuestos y 13 metales enumerados por la Agencia de Protección al Medio Ambiente en los Estados Unidos (USEPA, 2006; Leisinger y Brunner, 1986). Sin embargo, de los hidrocarburos aromáticos los BTEX son los más preocupantes, ya que estos compuestos tienen relativamente alta solubilidad en agua y se absorben rápidamente en la superficie de los sitios contaminados, concentrándose así en grandes cantidades sobre la misma (Battersby y Wilson, 1989; Rooney-Varga y cols., 1999). Pero, la situación es aún más compleja si se tiene en cuenta que un elevado número de compuestos, más de 50,000 se encuentran todavía sin clasificar.

2.5. Riesgos a la salud causado por los BTEX.

La absorción de los hidrocarburos aromáticos tiene lugar por inhalación, ingestión y en cantidades pequeñas, por vía cutánea. En general, los derivados monoalquilados del benceno son más tóxicos que los di-alquilados y los derivados de cadena ramificada son más tóxicos que los de cadena simple. Además, estos compuestos pueden causar efectos agudos y crónicos en el sistema nervioso central (Cuadro 2). La intoxicación aguda por estos compuestos produce cefalea, náusea, mareo, desorientación, confusión e inquietud. La exposición aguda a dosis altas puede incluso provocar pérdida de consciencia y depresión respiratoria

(Tsao y cols., 1998; Lovah y cols., 2002). Particularmente, el benceno causa todo tipo de leucemias, mientras que el tolueno, etilbenceno y los isómeros del xileno provocan severo daño al sistema nervioso central (SNC).

Cuadro 2. Propiedades tóxicas de los BTEX.

Compuesto	Daño a la salud
Benceno*	<ol style="list-style-type: none"> 1) Favorece el desarrollo de todo tipo de leucemias. También puede causar anemia aplásica y pancitopenia reversible. 2) Otros metabolitos del benceno interfieren con los ácidos nucleicos.
Tolueno*	<ol style="list-style-type: none"> 1) Las altas concentraciones pueden provocar coma narcótico. 2) Puede ocasionar un cuadro hepatotóxico, además de glomerulonefritis autoinmune. 3) Es teratogénico.
Etilbenceno*	<ol style="list-style-type: none"> 1) Causa intoxicación crónica. 2) Provoca irritación de vías superiores. Alteraciones hematológicas (leucopenia y linfocitosis), trastornos hepáticos y de las vías biliares.
Xileno*	<ol style="list-style-type: none"> 1) Induce daño en los órganos hematopoyéticos y en el sistema nervioso central. 2) Se asocia a defectos neurológicos, alteraciones en la síntesis de proteínas y deterioro de la actividad inmunogénica.
*La intoxicación aguda por estos compuestos produce cefalea, náuseas, mareo, desorientación, confusión e inquietud.	

Debido a los efectos negativos que tienen los BTEX sobre la salud humana, es necesario transformar los sitios contaminados con estos compuestos y una alternativa es la biorremediación, proceso que utiliza la habilidad de los microorganismos para degradar hidrocarburos alifáticos y/o aromáticos entre otros (Grbic-Galic y Vogel, 1987; Weiner y Lovley, 1998; Phelps y Young, 1999).

2.6. Biorremediación.

La biorremediación se define como el diseño de procesos en los que intervienen organismos o productos derivados de éstos para la eliminación de sustancias tóxicas o contaminantes en aguas residuales urbanas, vertidos industriales y entornos naturales contaminados. Ciertamente, la mayoría de los compuestos naturales se degradan con facilidad, aunque existen claras excepciones como la lignina, compuesto que está presente en la madera y es difícil de biodegradar (Kumar Jain y cols., 2005). Pero, esta afirmación no contempla la masiva introducción de una amplia variedad de compuestos aromáticos en la biosfera (Smith, 1994). Sin embargo, la etapa limitante en la biodegradación o detoxificación de estos compuestos es la deficiencia en las rutas metabólicas microbianas. Aunque en algunos casos existan las enzimas adecuadas para llevar a cabo la completa mineralización de estos ciertos xenobióticos, estos procesos no son lo suficientemente rápidos para mantener un equilibrio entre la liberación y eliminación de éstos (Smith, 1994).

Anteriormente, la remoción de los hidrocarburos involucraba procesos fisicoquímicos, sin embargo parece que los procesos biológicos, bajo condiciones aerobias, anaerobias o ambas, han ido ganando terreno en esta área (Shan-gen, 2002). Los procesos fisicoquímicos más comunes son la extracción con solventes u oxidación química, la adsorción por carbono activado e incineración. Sin embargo, este tipo de estrategias resultan ser muy costosas y difíciles de llevar a

cabo (Shan-gen, 2002). Por el contrario, el uso de microorganismos parece ser una opción viable por su versatilidad bioquímica y molecular, además de ser una tecnología sencilla, de bajo costo y compatible con el medio ambiente (Kleerebezem y cols., 1999). Además, el uso de estos microorganismos permite el consumo de menos energía, ofrecen posibilidades de reciclaje y son más específicos.

Las primeras investigaciones acerca de este tema se llevaron a cabo en la década de 1950 y se enfocaron en el medio ambiente que rodeaba a los microorganismos localizados en depósitos de petróleo. Durante las siguientes décadas, el catabolismo microbiano sobre los compuestos aromáticos recibió considerable atención, motivado primero por el uso potencial del petróleo como un sustrato para la producción de proteína celular en la industria alimenticia y después como una solución para la remediación del medio ambiente contaminado por estos compuestos (Chakraborty y Coates, 2004), es decir, los microorganismos son recicladores naturales que convierten los compuestos xenobióticos a productos inofensivos como el dióxido de carbono y el agua (Kumar Jain y cols., 2005). Por ejemplo, Gibson y Subramanian (1984) indicaron que bajo condiciones favorables los BTX son biodegradables. Por su parte, Inouye y cols. (1987) reportaron que *Pseudomonas putida* cepa mt-2 es capaz de biodegradar completamente el tolueno y *meta*- y *para*-xileno. Sin embargo, Tsao y cols. (1998) reportaron que el xileno no fue removido porque a partir de su degradación forma residuos inhibitorios para las bacterias. Pero en un estudio reciente, Cafaro y cols. (2005) reportaron que *P. stutzeri* fue capaz de metabolizar el tolueno y el *orto*-xileno.

Aunque, la degradación biológica de mezclas complejas de sustancias recalcitrantes es todavía un desafío para la biotecnología ambiental actual.

2.7. Función de la diversidad microbiana durante la biorremediación.

La presencia de diversas especies bacterianas en la naturaleza, expande la cantidad de contaminantes químicos que pueden ser degradados (Leahy y Colwell, 1990), sin embargo, los organismos individuales pueden metabolizar un rango limitado de hidrocarburos como sustratos. Por tal motivo, se requiere de la cooperación entre diferentes organismos (consorcios) y la sinergia entre sistemas enzimáticos, para remover del suelo y agua mezclas complejas de hidrocarburos como el petróleo crudo (Leahy y Colwell, 1990).

Una gran cantidad de bacterias aerobias/anaerobias y hongos biodegradadores de hidrocarburos han sido aislados de sistemas marinos y terrestres (Cuadro 3). Por ejemplo, miembros del género *Rhodococcus* han demostrado una marcada habilidad para crecer y utilizar una amplia variedad de compuestos xenobióticos incluyendo hidrocarburos tanto alifáticos como aromáticos (Kim y cols., 2004). Otros microorganismos que han demostrado ser capaces de remover los compuestos aromáticos son del género *Pseudomonas* (Williams y sayers, 1994; Harwood y Parales, 1996; Díaz y cols., 2001), por ejemplo, *P. putida* F1 es capaz de utilizar ya sea al benceno, al tolueno o al etilbenceno como única fuente de carbono y energía. Por su parte, Cooper y Skinner (1980) indicaron que *Escherichia coli* también es capaz de metabolizar ácidos aromáticos. En estudios más

recientes, Lee y Lee (2001) aislaron y caracterizaron la cepa *Ralstonia* sp PHS1, que resultó capaz de remover los BTEX (*orto*). Así mismo, Acuña-Askar y cols. (2003a) reportaron que a partir de una biomasa aclimatada a gasolina aislaron bacterias que fueron identificadas como *P. aeruginosa*, *Pseudomonas* sp, *Bacillus* sp y *Rhodococcus* sp. Al respecto, Knight y cols., (1999) indicaron que un sedimento simple puede ser usado como un consorcio (bacterias y hongos) y enriquecido por poblaciones individuales que pueden degradar un amplio rango de compuestos. Sin embargo, la degradación ocurre después de largos períodos de adaptación, durante los cuales se estimula la actividad bacteriana.

Cuadro 3. Bacterias biodegradadoras de compuestos aromáticos en condiciones aerobias.

Fuente de carbono	Bacterias	Referencia
Fenol y <i>p</i> -cresol	<i>Pseudomonas putida</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P. mendocina</i> , <i>P. Corrugada</i>	Heinaru y cols., 2000
Ácido fenil acético, ácido 3 y 4 hidroxifenilacético	<i>E.coli</i>	Díaz y cols., 2001
Tricloro etileno	<i>Rhodococcus</i> sp.	Malachowsky y cols., 1994
Tolueno y naftaleno	<i>Sphingomonas capsulata</i> , <i>Sphingomonas pavcimobilis</i>	Fredrickson y cols., 1995
Naftaleno, dibenzotiofenos, fenantreno y fluoreno.	<i>Cycloclastycus</i> sp.	Kasai y cols., 1998
2 secbutil 4,6 dinitrofenol	<i>Clostridium bifermentans</i>	Hammill y cols., 1998
Tolueno	<i>Mycobacterium</i> sp.	Tay y cols., 1998
Naftaleno y fenantreno	<i>Neptumonas naphovorans</i>	Hedlund y cols., 1999
2,6 diclorofenol	<i>Ralstonia</i> sp	Hammill y cols., 1998

2.8. Adaptación: mecanismos genéticos y fisicoquímicos.

La selección natural ha actuado favorablemente sobre una población cuando las variaciones introducidas permiten a dicha población obtener un crecimiento más rápido. La continua y rápida evolución genética característica de las bacterias ha facilitado la aparición y diseminación de rutas metabólicas para la degradación de una gran variedad de hidrocarburos aromáticos (Leisinger y Brunner, 1986). Sin embargo, la masiva liberación de agentes xenobióticos durante un corto espacio de tiempo, desde el punto de vista evolutivo, no ha permitido a los microorganismos desarrollar nuevas propiedades catabólicas con la rapidez suficiente para reducir el problema medioambiental originado por la acumulación de estos compuestos en distintos ecosistemas. Sine embargo, varios estudios indican que es posible conseguir una completa mineralización de ciertos agentes xenobióticos sustituyendo lentamente la fuente de carbono metabolizable por el compuesto en estudio. El periodo de exposición al nuevo sustrato puede consistir en días o meses, denominándose “proceso de adaptación microbiana” que provoca la ampliación de la capacidad biodegradativa (Gibson y Subramanian 1984; Grbic-Galic, 1986; Weiner y Lovley, 1998).

Los mecanismos que han desarrollado los microorganismos para llevar a cabo estos procesos, por una parte, en la inducción de enzimas específicas para la degradación del sustrato, y por otra, en la alteración de la actividad enzimática originada por procesos de adaptación genética como la recombinación,

transposición o mutación. Asimismo, los procesos fisicoquímicos son clave para llevar a cabo la biodegradación.

1.7.1. Mecanismos genéticos

Diversos estudios han revelado que cuando un consorcio o un microorganismo se expone a un nuevo sustrato, desarrolla la capacidad de iniciar una serie de cambios (por ejemplo, cambios enzimáticos), para adaptarse y después metabolizar el nuevo sustrato (Grbic-Galic, 1986; Weiner y Lovley, 1998 y Chackraborty y Coates, 2004). Por otro lado, se ha demostrado que rearrreglos en el ADN han precedido a la evolución de diferentes vías catabólicas (Leahy y Colwell, 1990; Van Der Meer y cols., 1992). Se puede decir que hay varios mecanismos o combinaciones genéticas por las cuales las comunidades microbianas pueden adaptarse a la presencia de los xenobióticos en el medio ambiente, por ejemplo:

- 1) El primer paso para la adaptación de la comunidad microbiana es incrementar la fracción de la población de los organismos que toleran o degradan los hidrocarburos aromáticos por inducción de genes apropiados (Leahy y Colwell, 1990; Van Der Meer y cols., 1992).

- 2) Los microorganismos también pueden adaptarse a través de mutaciones de varios tipos (sobre todo del tipo de un simple nucleótido). Varios estudios han ilustrado que mutaciones en un nucleótido puede alterar la unión del sustrato-

enzima (Leahy y Colwell, 1990; Van Der Meer y cols., 1992). Ramos y cols. (1987) y Van Der Meer y cols. (1992) reportaron que la modificación de un residuo aminoácido en la enzima catecol 2,3 dioxigenasa reconoció al 4-etilcatecol como su sustrato.

3) Los microorganismos adquieren la información genética por la transferencia horizontal de genes. Los elementos móviles han demostrado que juegan un papel clave en el rearrreglo del ADN, en la transferencia de genes y en la activación-inactivación de genes silenciadores (Van Der Meer y cols., 1992; Hendrickx y cols., 2006). Van Der Meer y cols. (1992) reportaron que el gen que codifica para la clorobenceno dioxigenasa está flanqueado por dos copias de elementos móviles IS1066 y IS1067.

Además de la adaptación existen otros factores (temperatura, oxígeno, nutrientes, pH, entre otros) que pueden afectar la biodegradación de los hidrocarburos.

1.7.2. Mecanismos fisicoquímicos.

1.7.2.1. Temperatura.

En un estudio realizado por Van Der Meer y cols. (1992), se reportó que la temperatura que oscila entre los 30°C y 40°C permite a los microorganismos biodegradadores incrementar el metabolismo de los hidrocarburos aromáticos. Sin embargo, Lee y Lee (2001) reportaron el aislamiento de *Ralstonia* sp. PHS1 que es termotolerante y capaz de biodegradar a los BTEX.

1.7.2.2. Oxígeno.

El paso inicial en el catabolismo de los hidrocarburos donde participan bacterias y hongos está relacionado con la oxidación del sustrato por las oxigenasas, por lo cual el oxígeno es requerido (Leahy y Colwell, 1990). Sin embargo, el bajo grado de transferencia, la baja solubilidad y el rápido consumo del oxígeno, son usualmente los parámetros limitantes en la remoción de los BTEX (Van Der Meer y cols., 1992).

1.7.2.3. Nutrientes.

La liberación al medio ambiente de excesivas concentraciones de carbono/nitrógeno o carbono/fósforo y bajas concentraciones de nutrientes inorgánicos, provoca condiciones desfavorables para los microorganismos (Leahy y colwell 1990).

1.7.2.4. pH.

En contraste, con la mayoría de los sistemas acuáticos, el pH en el suelo es muy variable (2.5 - 11.0), lo que puede ser una desventaja para los microorganismos ya que su crecimiento se favorece a un pH neutro. Leahy y colwell (1990) observaron que un pH que oscila entre 6.5 y 7.5 favoreció a la mineralización de petróleo crudo.

2.9. Biodegradación bajo condiciones aerobias: rutas catabólicas.

De manera general, en los procesos aerobios, la oxidación de los compuestos aromáticos se lleva a cabo por hongos y bacterias que contienen enzimas mono- o di-oxigenasas y utilizan el oxígeno como aceptor final de electrones para la activación y ruptura del anillo aromático. Posteriormente, estos compuestos son transformados a productos intermedios centrales conocidos como catecol y protocatehuate. Por último, estos son oxidados por una de dos posibles vías (*meta* u *orto*) y en donde los productos resultantes son utilizados en el ciclo de Krebs (Grbic-Galic y Vogel, 1987; Fries y cols., 1994).

Los estudios del catabolismo aerobio (Figura 3) de los compuestos aromáticos han demostrado que las enzimas mono- y di-oxigenasas llevan a cabo el primer paso, que es la activación de los compuestos aromáticos a partir de una reacción de hidroxilación (incorporación de dos átomos de oxígeno al anillo aromático en presencia de oxígeno y NADH). Después la enzima *cis*-dihidrodiol deshidrogenasa lleva a cabo una reacción de deshidrogenación para formar productos intermedios centrales (catecol y protocatehuate) (Gibson y cols., 1975; Zamanian y Mason, 1987; Zylstra y Gibson, 1989; Fong y cols., 1996; Bagnéris y cols., 2005). Posteriormente, el catecol puede ser metabolizado por medio de una de las dos rutas catabólicas conocidas como: a) *orto* en donde participa la enzima catecol 1,2 dioxigenasa (C12O) y b) *meta*, en la que participa la catecol 2,3 dioxigenasa (C23O) y el producto generado en ambas rutas es el *cis-cis* muconato (Harayama y Reik, 1989). Este producto entra a la vía β -cetoadipato para producir β -ceto-

adipil-CoA, que a su vez será convertido en una mezcla de succinil CoA más acetil CoA. Por último, estos compuestos entran al ciclo del ácido tricarboxílico para generar fosfoenolpiruvato, el cual es un precursor de la gluconeogénesis o del mismo ciclo de Krebs (Figura 3). Además de la C1,2O, otras dos enzimas conocidas como muconato-lactonizante y muconato isomerasa también llevan a cabo la ruptura del catecol a través de la ruta *orto*, para producir *cis-cis* muconato (Kasak y cols., 1993; Cerdan y cols., 1994).

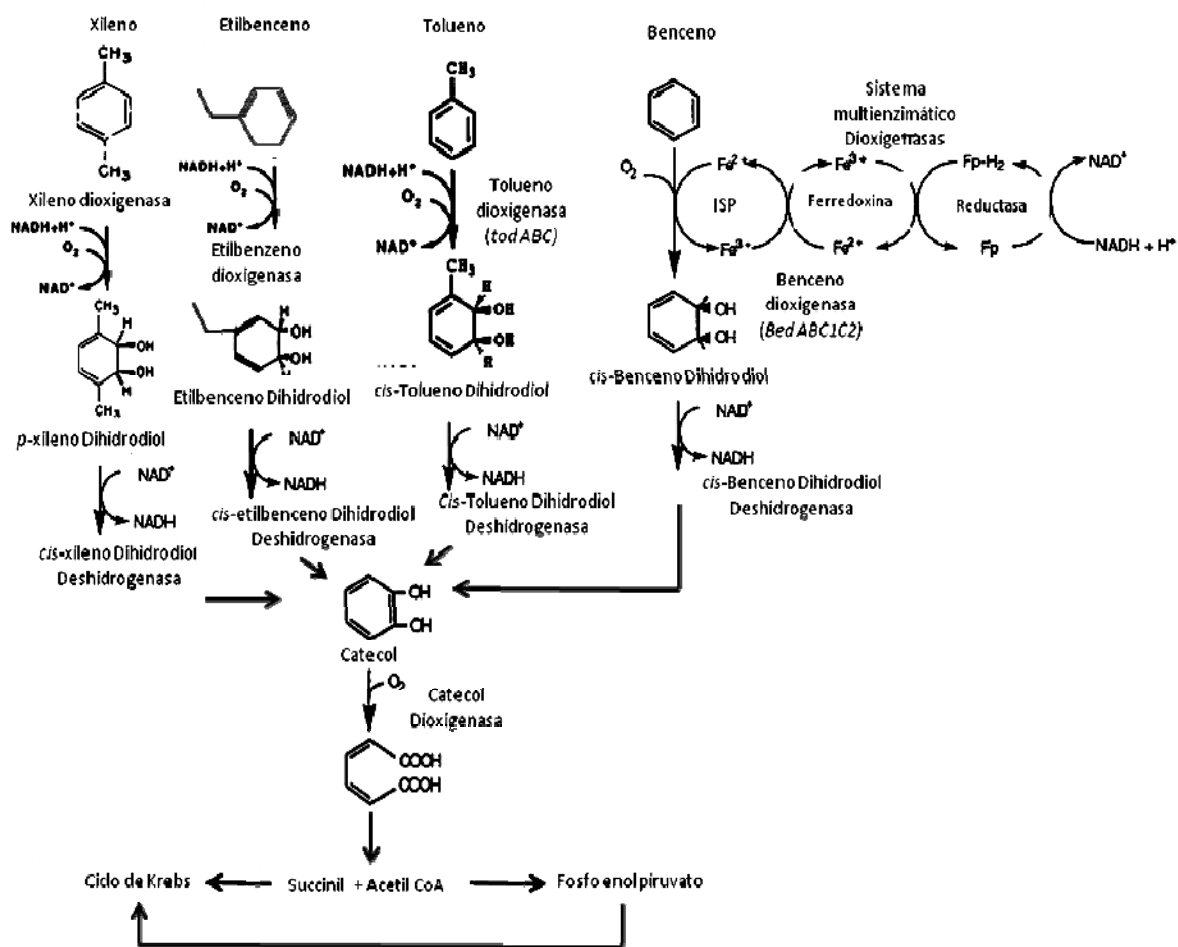


Figura 3. Ruta metabólica de los BTEX. El ataque inicial al anillo aromático se lleva a cabo a través de la mono- o di-oxigenasas, mientras que la catecol dioxigenasa se encarga de la ruptura del anillo aromático (Gibson y cols., 1975; Grbic-Galic y Vogel, 1987; Kasak y cols., 1993; Cerdan y cols., 1994; Heinaru y cols., 2000; Buchan y cols., 2000).

Por su parte, el protocatehuato es convertido a partir de la ruta *orto* en β cetoadipato, en una reacción catalizada por la enzima protocatehuato 3,4 dioxigenasa (P3,4D) (Zylstra y Gibson, 1989). Los productos generados de la conversión del protocatehuato entran a la vía β -cetoadipato para producir succinil CoA más Acetil CoA. (Heinaru y cols., 2000; Buchan y cols., 2000). Una de las características de la P3,4D es que tiene funciones similares a la C1,2O y puede ser inducida tanto por el sustrato como por su producto (β -carboximuconato) (Zylstra y Gibson, 1989).

La detección de microorganismos biodegradadores ha permitido estudiar a los genes catabólicos y sus productos (proteínas). Estos avances se han logrado gracias al empleo de técnicas de biología molecular.

2.10. Bases Moleculares de las Bacterias Biodegradadoras.

Se sabe que las bacterias del suelo poseen una amplia variedad de enzimas para la oxidación inicial de los compuestos aromáticos, formación de productos intermedios (catecol y protocatehuato) y ruptura del anillo aromático (Kasak y cols., 1993). Sin embargo, existen pocos reportes sobre la diversidad génica de los microorganismos biodegradadores, porque pocas enzimas han sido purificadas y estudiadas superficialmente (Harwood y Gibson, 1997; Eglund y Harwood 1999; Heinaru y cols., 2000; Breinig y cols., 2000; Song y Ward, 2005).

2.10.1. Proteínas expresadas durante la biodegradación de los BTEX.

2.10.1.1. Enzimas dioxigenasas.

Una de las principales enzimas que se expresan durante la biodegradación de los hidrocarburos aromáticos son las dioxigenasas, también conocidas como ferroproteínas del grupo no hemo. Previamente, se mencionó que estas enzimas llevan a cabo la hidroxilación de los hidrocarburos aromáticos en presencia de oxígeno y NADH (Zamanian y Mason, 1987; Bagnèris y cols., 2005).

Las dioxigenasas tienen un sistema de tres componentes conocidos como: a) flavoproteína reductasa; b) ferredoxina (transfiere electrones desde el NADH) y c) sitio catalítico con un grupo de Hierro-Azufre referenciado como ISP (Figura 4). Por su parte, el ISP está formado por dos proteínas referenciadas como subunidad α y subunidad β . La subunidad α participa en la transferencia de electrones, contiene el centro catalítico de estas enzimas y contiene el sitio de unión al sustrato. Por su parte la subunidad β sirve para reconocer la región promotora de los operones catalíticos (Irie y cols., 1987; Zilstra y Gibson, 1989; Fong y cols., 1996; Baldwin y cols., 2005, Witzig y cols., 2006).

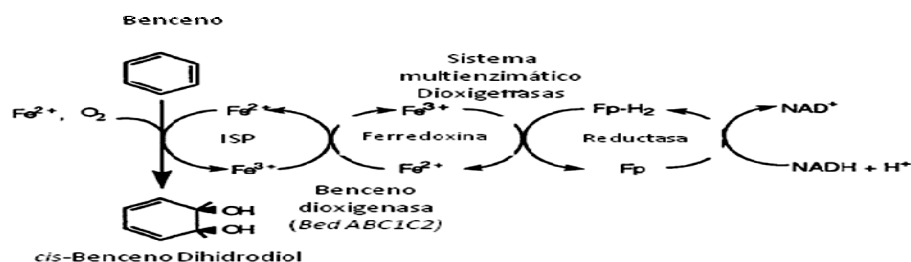


Figura 4. Esquema representativo de las dioxigenasas. Las dioxigenasas son un sistema multienzimático formado por: a) flavoproteína reductasa; b) ferredoxina (transfiere electrones desde el NADH) y c) un sitio catalítico con un clúster de Hierro-Azufre (ISP) (Irie y cols., 1987).

Otra proteína que también participa en el ataque inicial sobre los anillos aromáticos es la enzima benceno deshidrogenasa dependiente de NAD⁺. Fong y cols. (1996) reportaron que ésta enzima es necesaria para convertir el *cis*-benceno dihidrodiol en catecol; así mismo, que es análoga a la *cis*-tolueno dihidrodiol deshidrogenasa y a la glicerol deshidrogenasa de *E. coli*. A su vez, Jiang y cols. (1996) observaron que la subunidad α de todas las dioxigenasas conocidas hasta esa fecha mantenían aminoácidos conservados en su secuencia (Figura 5). En un estudio filogenético realizado por Hendrickx y cols. (2006), reportaron que las enzimas dioxigenasas mostraron alta similitud entre sus secuencias aminoacídicas, lo cual indica que estas proteínas posiblemente provienen de un gen ancestral común. Además, Bagnèris y cols. (2005) indicaron que ninguna de esas enzimas es completamente específica para su sustrato. Por su parte, Witzig y cols. (2006) observaron que escasas diferencias en la secuencia de aminoácidos del ISP α se asocian con cambios dramáticos en la especificidad hacia el sustrato.

Durante la oxidación del catecol participan una de dos enzimas conocidas como C1,2O o C2,3O. La C2,3O de *P. putida* consiste de cuatro subunidades idénticas y cada una contiene un ion ferroso, ésta enzima suele ser inestable cuando el ion se encuentra en forma de Fe (III). Sin embargo, la bacteria tiene un sistema que reduce el Fe (III) a Fe (II), para activar a la C2,3O (Cerdan y cols., 1994). Otra enzima importante es la protocatehuate 3,4 dioxigenasa (P3,4D).

Yen y cols. (1991) reportaron que una ferredoxina que forma parte de la tolueno 4-monooxigenasa mostró una similitud del 28% con la secuencia aminoacídica de la ferredoxina de la tolueno dioxigenasa. Por su parte, Harayama y cols. (1986) indicaron que la enzima xileno monooxigenasa (relacionada con la degradación del xileno), está formada por dos componentes, xylM y xylA. La proteína XylM está relacionada con la enzima alcano-hidroxilasa, mientras que el componente xylA es similar a las ferredoxinas reductasas. Sin embargo, a diferencia de las enzimas dioxigenasas que oxidan moléculas aromáticas, el sustrato para las monooxigenasas son los alcanos o el grupo alquil del anillo aromático. Sabirova y cols. (2006) reportaron que el metabolismo aerobio de los alcanos se lleva a cabo primero por la oxidación de estos en donde participan las enzimas monooxigenasas. Todas las proteínas antes mencionadas son expresadas a partir de genes catabólicos que forman parte de un cierto operón.

2.10.2. Genes catabólicos en bacterias aerobias.

2.10.2.1. Expresión de genes que codifican para las dioxigenasas.

Existen diferentes genes catabólicos relacionados con la biodegradación de hidrocarburos aromáticos y cuyos productos forman un sistema multienzimático, el cual va a iniciar el catabolismo aerobio de este tipo de compuestos (Axcell y Geary., 1975; Irie y cols., 1987; Jiang y cols., 1996).

El grupo de genes que codifican para la benceno dioxigenasa son designados como *bed A* (oxidoreductasa), *bed B* (ferredoxina), *bed C1* y *C2* (oxigenasa terminal [subunidad α y β]), respectivamente (Figura 7) (Irie y cols., 1987; Fong y cols., 1996; Bagneris y cols., 2006). Por su parte, Fong y cols. (1996) identificaron un cuarto gen que fue designado como *bedD*, el cual se encuentra localizado frente al grupo de genes antes mencionados, y codifica para la benceno deshidrogenasa dependiente de NAD⁺, que es necesaria para convertir el *cis*-benceno dihidrodiol en catecol.



Figura 7. Estructura del operón catabólico. Se observa el grupo de genes que son necesarios para expresar la benceno dioxigenasa.

Otro grupo de genes que han sido ampliamente estudiados son los del operón *Tod* (Figura 8), cuyo orden se: *Tod A* (reductasa _{TOL}), *Tod B* (ferredoxina _{TOL}), *Tod C1* y *C2* (ISP (subunidad α y β) _{TOL}), *Tod D* (deshidrogenasa _{TOL}) y *Tod E* (metil-catecol dioxigenasa _{TOL}) (Irie y cols., 1987; Zylstra y Gibson, 1989; Jiang y cols., 1996). Por su parte, el gen responsable de llevar a cabo la remoción del etilbenceno se ha designado como *Ebd* (subunidad α y β) y codifica para la proteína etilbenceno dioxigenasa (Kim y cols., 2004; Bagneris y cols., 2006). Mientras que para la remoción de los isómeros del xileno, se propuó un modelo para la organización de los genes catabólicos, asignados como operón *xyIABC* (upper) y el operón *XyIEGF* (lower) codifican para la catecol 2,3 dioxigenasa, hidroximucónico

semialdehído deshidrogenasa e hidroximucónico semialdehído hidrolasa, respectivamente (Inouye y cols., 1981; Gibson y cols., 1984). En estos operones *xyiC1* y *C2* codifican para la xileno dioxigenasa (subunidad α y β), mientras que *XyIA* y *XyIB* codifican para la xileno oxidasa y la alcohol deshidrogenasa, respectivamente (Inouye y cols., 1981). Además, se identificaron dos genes que funcionan como reguladores de la expresión génica (*XyIR* y *XyIS*). Cabe señalar que los operones referidos, presentan casi la misma composición y arreglos de los genes, al igual que sus secuencias nucleotídicas que son muy similares (Gibson y cols., 1984; Jiang y cols., 1996; Bagnères y cols., 2006).

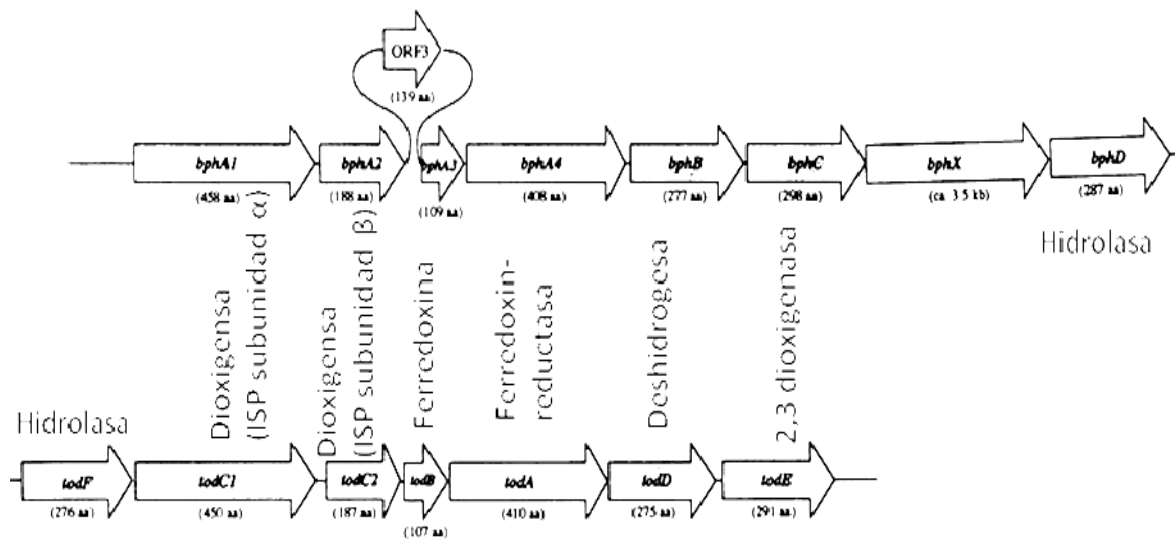


Figura 8. Los operones que codifican para las enzimas de la familia de las dioxigenasas, muestran una organización génica muy similar. Se compara el operón que codifica para la bifenil dioxigenasa (*bph*) y *tod* lo hace para la tolueno dioxigenasa (Zylstra y cols., 1989).

Las tres proteínas que participan en la degradación del catecol (ruta *orto*), son producto de los genes *catA* (C1,2O), *catB* (enzima muconato lactonizante), y *catC* (muconolato isomerasa). Estos genes son inducidos por el catecol y el *cis-cis*

muconato. Los genes *catB* y *catC* están coordinadamente controlados y se encuentran juntos en el cromosoma, mientras que el gen *catA* se encuentra separado de este operón. Estos genes están regulados por el gen *catR* que se encuentra río-arriba del operón *catBC*. La unión de CatR a la región reguladora que incluye su propio promotor, le permite llevar a cabo su autoregulación y activar a los genes *CatBC*. Por otro lado, en el operón *pca* (degradación del protocatehuato) se han identificado los genes *pcaH* y *pcaG*, que codifican para las proteínas muconato-lactonizante y muconolactona isomerasa. Además, se ha identificado el gen *pcaC* que codifica para las subunidades α y β de la P34O. En comparación, la organización de los genes *cat* y de los genes *pca* muestran variaciones en el orden de los genes o en el reacomodo de sus operones (Zylstra y cols., 1989; Van Der Mer y cols., 1992).

2.10.2.2. Expresión de genes que codifican para las monooxigenasas.

Por su parte, los genes que codifican para las monooxigenasas se han designado como *tmoABCDE*. El gen *tmoC* que codifica para una ferreoxina tiene alta similitud en la secuencia nucleotídica con su contraparte, el gen *TodC*.

2.11. Regulación de los genes catabólicos.

Las rutas catabólicas están controladas por proteínas reguladoras (activadoras) específicas. Estas reconocen a inductores (en este caso los BTEX) e interactúan

con la región operador-promotor de los operones catabólicos. De manera general, el control positivo de la regulación enzimática se lleva a cabo de la siguiente manera: en ausencia de un inductor (BTEX), ni la proteína activadora ni la ARN polimerasa (pol) pueden unirse al ADN, pero cuando está presente la molécula inductora (BTEX), ésta se une a la proteína activadora, que a su vez se une al sitio de unión del activador, lo que permite a la ARN polimerasa unirse al promotor e iniciar la transcripción de los genes catabólicos.

A la fecha ya se han identificado genes reguladores de rutas catabólicas y sus productos son:

- 1) Las proteínas TodST controlan la degradación del tolueno (Figura 9) desde el promotor *todX*, el cual se encuentra río-arriba del operón *todXFC1C2BADEGIH*, mientras que los genes *TodST* están localizados río-abajo de *TodH* (Lee y cols., 2006). TodS es una proteína que consta de 978 amino ácidos, un peso de 108 kda y de cinco dominios conocidos como motivos: a) bZIP, que tiene una estrecha región de amino ácidos básicos que posiblemente se unen al ADN diana, b) Hk1 y Hk2 (dominios de histidinas) que se han establecido como potenciales sitios de autofosforilación, y c) G1 y G2, los cuales están relacionados con la unión al ATP y un sitio de unión al oxígeno (Troppel y Van Der Mer, 2004).

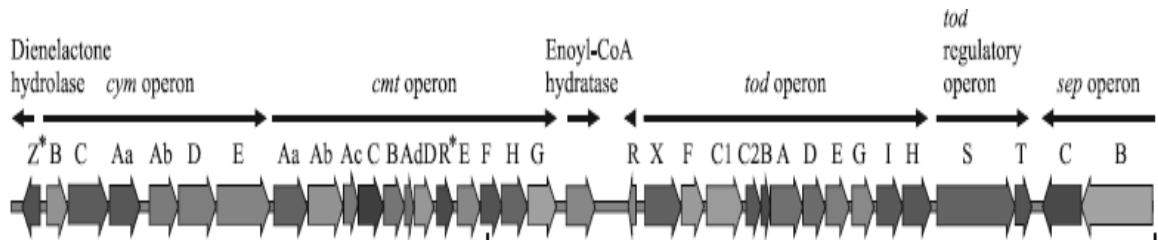


Figura 9. Mapa genético del operón *tod* de *Pseudomonas putida* KL47. Se observa el gen represor (*todR*), el promotor (*todX*) y los genes reguladores (*tod ST*). Las flechas indican la dirección de la transcripción de estos genes (Lee y cols., 2006).

2) La proteína XylS regula su operón catabólico y generalmente actúa como activador de la transcripción en presencia de la molécula inductora (xileno), estos genes se encuentran río-arriba de su operón diana. Sin embargo, se ha observado que la expresión de *xyIS* depende de otra proteína reguladora conocida como XylR. Así mismo, XylR estimula la transcripción de *xyIS* desde un promotor dependiente de σ^{54} (llamado P_{s1}), cuando las células están expuestas al *m*- y *p*-xilenos (Van der Mer 2004; Cowles y cols., 2000; Aranda-Olmedo y cols., 2005). En ausencia de estos inductores, los genes *xyIS* se expresan constitutivamente en niveles muy bajos desde un promotor dependiente de σ^{70} (llamado P_{s2}), mientras que *XylR* también se transcribe desde los promotores dependientes de σ^{70} (conocidos como P_{R1} y P_{R2}). Además, XylR es capaz de reprimir su propia expresión, en presencia de ambos inductores, XylR se enlaza al inductor y la proteína inactiva ($XylR_i$) se convierte en activa ($XylR_a$), para estimular la transcripción de sus genes diana desde el promotor P_u . En presencia de *o*-xileno, XylR no es capaz de reconocer a este inductor, entonces la proteína XylS se sobreexpresa y activa la transcripción desde el promotor P_m (Figura 10).

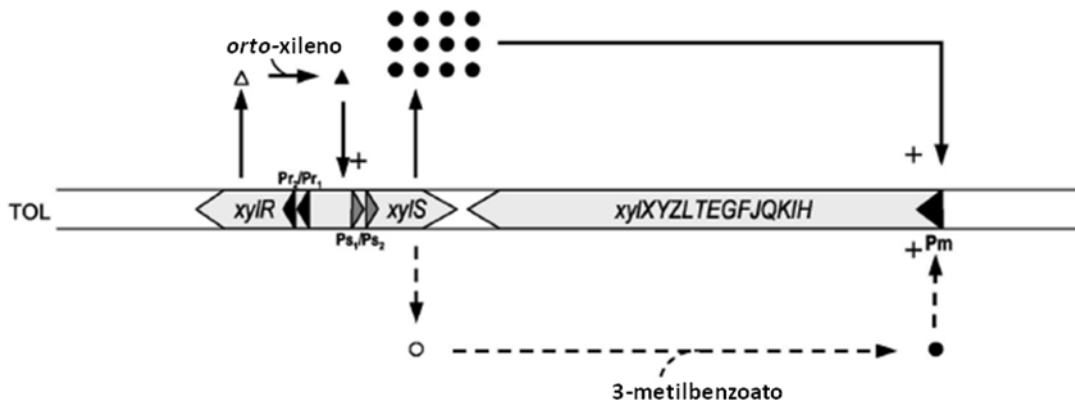


Figura 10. Regulación catabólica en presencia del xileno. La línea punteada describe la situación en presencia de un efector que sigue la vía *meta* (i. e. 3 metilbenzoato) y la línea sólida describe la situación en presencia de un inductor de la vía upper (i. e. *o*-xileno). Los triángulos representan a XylR mientras que los círculos a XylS. Los símbolos claros simbolizan a los reguladores que son incapaces de estimular la transcripción, los símbolos oscuros simbolizan a los reguladores capaces de estimular la transcripción (González-Pérez y cols., 2004).

3) Los reguladores transcripcionales tipo LysR (LTTRs) normalmente codifican para proteínas reguladoras de la transcripción (CatM), excepto *CatR* que codifica para un represor. *CatR* regula el operón catabólico que controla la expresión de los genes *catBCA* durante el metabolismo del catecol, en *P. putida* (Kasak y cols., 1993; van der mer y cols., 1994; Cowles y cols., 2000; Tropel y Van Der Mer, 2004; Aranda-Olmedo y cols., 2005). La proteína *CatR* está compuesta de 394 a 403 aminoácidos y tiene un peso de 32 a 37 Kda. La región que esta relacionada con el sitio de unión al ADN esta localizada en la región amino-terminal en el residuo 66. Los residuos del 95 al 173 y del 196 al 206 son sitios de unión al inductor (Figura 11).

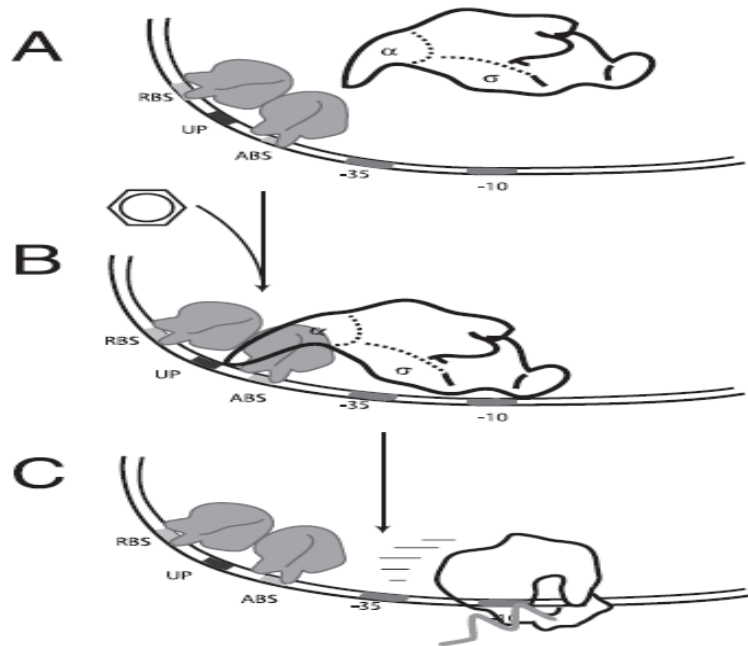


Figura 11. Activación de la transcripción por los activadores tipo LysR. A) Dos subunidades del activador se unen a los sitios denominados como RBS y ABS, en la región +4 -35 del promotor. B) En presencia del catecol (inductor), el activador unido a la ABS cambia su interacción por la subunidad alfa de la ARN polimerasa. C) Este cambio permite, que la ARN polimerasa incremente su afinidad por el promotor e inicia la transcripción (Troppe y Van Der Mer, 2004).

CAPITULO III.

ANTECEDENTES

El rápido e incontrolado desarrollo industrial, ha generado numerosos problemas de contaminación relacionados con el medio ambiente. Los BTEX son hidrocarburos aromáticos que constituyen los componentes mayoritarios de la gasolina (Figura 1) (Tsao y cols., 1998; Potter, 1992). El incremento de su uso en los procesos industriales provoca un considerable daño al medio ambiente (Pieper y Reineke, 2000; Díaz y cols., 2001). Los BTEX, en comparación con otros hidrocarburos de la gasolina, son solubles en el agua, además de ser genotóxicos (Tsao y cols., 1998; Dean, 1985). Estos compuestos se encuentran en el agua potable de uso humano. Sin embargo, se sabe que bajo condiciones favorables, los BTEX son biodegradados por una amplia variedad de microorganismos (Tsao y cols., 1998; Smith, 1994; Harayama y Timmis, 1992; van der Meer y cols., 1992; Díaz y cols., 2001; Gibson y Subramanian, 1984).

Las investigaciones relacionadas con la biodegradación de hidrocarburos iniciaron hace poco más de medio siglo, sin embargo, es relevante destacar que, a pesar del tiempo transcurrido, aun existen muchas interrogantes sobre la naturaleza de los microorganismos, la caracterización de enzimas, así como la elucidación de las vías metabólicas relacionadas con la degradación aerobia de hidrocarburos (Harwood y Gibson, 1997). Por otro lado, con los avances en biotecnología, la biorremediación del aire, el suelo y el agua ha sido uno de los campos de restauración medioambiental que más rápidamente se ha desarrollado. La

biorremediación (término también conocido como biodegradación) bajo condiciones aerobias de los compuestos aromáticos es comúnmente iniciada por un grupo de enzimas conocidas como mono-, di- oxigenasas (Witzig y cols., 2006). Estas enzimas actúan sobre un amplio grupo de hidrocarburos aromáticos incluyendo a los BTEX, los cuáles son utilizados por los microorganismos como única fuente de carbono y de energía.

En nuestro grupo de trabajo se han establecido consorcios aclimatados a diferentes hidrocarburos que son capaces de remover compuestos derivados del petróleo. Acuna-Askar (1998) reportó la biodegradación del aditivo de la gasolina, el éter metil ter-butílico (EMTB) en matrices acuosas y de otros componentes de la gasolina, en suspensiones de suelo (Acuna-Askar y col., 2003a) y agua (Acuna-Askar y col., 2003b) en bioensayos de lote, con posterior estimulación mediante reactores de flujo continuo (Acuna-Askar y col., 2000), para la biodegradación de la gasolina entera (Acuna-Askar y col., 2007), o para algunos de sus componentes (Acuna-Askar y col., 2006a). Adicionalmente, se reportó que el uso de soportes microbianos de fibras naturales (Hu y col., 2004; Acuna-Askar y col., 2007) o sintéticas (Okuda y col., 2007), constituye un factor relevante en la biodegradación de hidrocarburos de la gasolina o diesel mediante la reducción de los tiempos de biodegradación de los contaminantes o en la producción de biosurfactantes (Martins y col., 2006).

Además, los procedimientos de bioaugmentación, por lo general incrementan la velocidad de biodegradación (Acuna-Askar y col., 2004a), independientemente de

las concentraciones de aclimatación de la biomasa utilizada (Acuna-Askar y col., 2004b) o al contacto con el suelo (Acuna-Askar y col., 2005a), con surfactantes (Volkering y col., 1995; Zhang y Miller, 1995; Grimberg y col., 1996; Herman y col., 1997; Acuna-Askar y col., 2005b) o con la presencia de co-sustrato (Pruden y Suidan, 2004). Sin embargo, los procesos de biodegradación existentes son más lentos que la aparición de nuevas sustancias contaminantes en el medio ambiente.

Pero no solo es necesario establecer los consorcios capaces de remover estos compuestos xenobióticos, sino que también es necesario caracterizar los microorganismos presentes en éste para mejorar los procesos de biorremediación. Por su parte, las técnicas de microbiología tales como: medios selectivos, aislamientos de cultivos puros y caracterización fenotípica se han visto limitadas para el estudio de la cuantificación e identificación de la población de bacterias aisladas o que participan dentro de un consorcio, así como su relación, estructura y función (*i.e.*, actividad metabólica) entre los microorganismos constituyentes (Song y Ward, 2005). Para esto, las herramientas moleculares pueden ser útiles para identificar y cuantificar desde una simple célula hasta los niveles más altos de asociación microbiana. Una de las herramientas más utilizadas en el campo de la biotecnología ambiental, es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), así como su combinación con la Transcripción Inversa (RT), en ambos casos, PCR o RT-PCR, se han utilizado muestras de ADN/ARNtotal extraídos de bacterias cultivadas en el laboratorio o que se encuentran en sitios contaminados y empleando iniciadores oligonucleotídicos específicos (“primers”) para amplificar

genes que participan en los procesos claves durante la biodegradación de los BTEX o que ayudan en la identificación de la bacteria (Figura 12).

Sin embargo, la aplicación de la RT-PCR solo provee información sobre la presencia de algún gen catabólico, pero no provee información sobre la diversidad de esos genes (Hendrickx y cols., 2006 b) y no existen primers específicos para amplificar genes catabólicos de algunas enzimas ya reportadas (Baldwin y cols., 2003; Junca y Pieper, 2003; Hendrickx y cols., 2006). Además, hoy en día existen muchas secuencias de genes relacionados con la degradación de los BTEX que no coinciden con los primers ya publicados. Por lo que es necesario diseñar y/o rediseñar los primers específicos para amplificar genes catabólicos de interés (Hendrickx y cols., 2006).

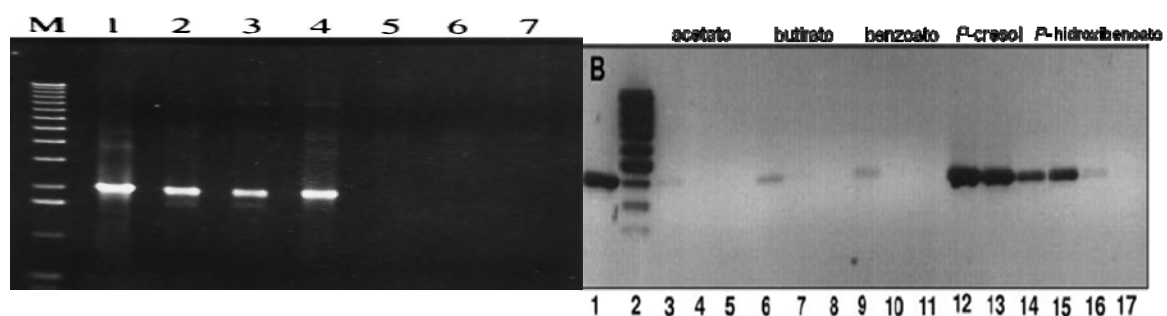


Figura 12. A) Amplificación del gen tolueno dioxigenasa a partir del ADN cromosómico de diferentes especies del género *Pseudomonas*. 1) *P. putida* DOT-T1E, 2) *P. putida* F1, 3) *P. putida* SMO116, 4) *P. putida* MTB6, 5) *P. putida* KT2440, 6) *P. aeuroginosa* O1, 7) *P. mendocina* KR1. B) A partir de la RT-PCR se analizó la expresión del gen *pcm1* en *Geobacter metallireducens* expuesta a diferentes compuestos. Estos resultados se tomaron de la publicación de Peters y cols., 2007.

En biotecnología ambiental, también se ha empleado la electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) que permite analizar e identificar proteínas con potencial catabólico a partir de muestras ambientales (Ogunstein, 1993). Además se han empleado herramientas más poderosas, como la electroforesis en gel de dos dimensiones (2D GE) y la espectrometría de masas en tándem (LC/MS/MS), lo cual, permite analizar la expresión de proteínas e identificar las proteínas a partir de sus huellas peptídicas, respectivamente (Figura 13).

La cromatografía Líquida (LC) en combinación con la espectrometría de masas (MS) proporciona valiosa información que va desde el peso molecular (PM) de un péptido hasta la identificación de un aminoácido. Por lo que, esta tecnología permite analizar los espectros de masas de mezclas complejas de proteínas y otros bio-polímeros. Además, proporciona información detallada al fragmentar los espectros MS/MS, es decir, la primera identificación (MS) es a nivel peptídico y la en la segunda identificación (MS) fracciona la secuencia peptídica para proporcionar la secuencia aminoacídica, lo cual facilita la huella proteómica. Esto puede ser utilizado para propósitos de identificación proteica, perfiles metabólicos y elucidación de secuencias peptídicas.

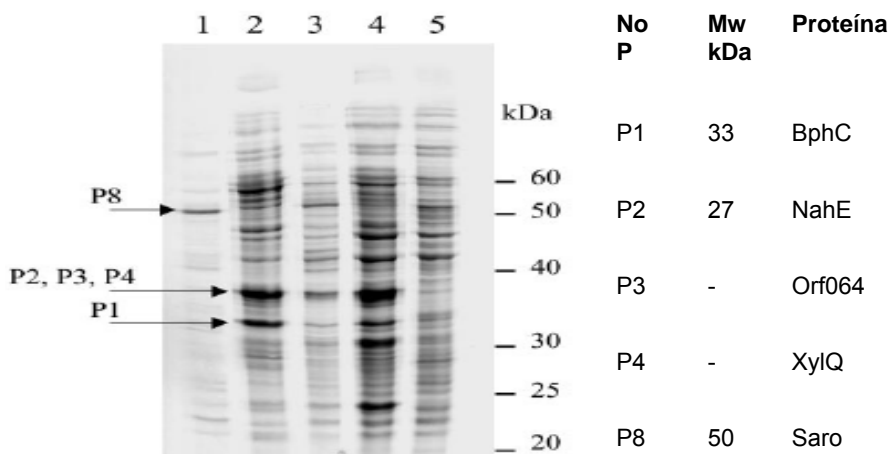


Figura 13. Análisis del perfil proteico de *Sphingomonas* expuesta a diferentes hidrocarburos poliaromáticos. En el carril uno se observa el perfil protéico de *Sphingomonas* expuesta al criseno, en el carril dos expuesta al naftaleno y criseno, en el tres al fenantreno y en el cuarto al naftaleno y succinato. Estos datos se tomaron de la publicación de Demanechè y cols., 2006.

Sabirova y cols. (2006) reportaron el estudio de proteínas diferencialmente reguladas en las fracciones de membrana y citoplasmática de *Alcanivorax borkumensis* (bacteria que crece en presencia de alcanos). Las proteínas tanto de membrana como de citoplasma expresadas diferencialmente (influenciadas por los alcanos) fueron identificadas por comparar las imágenes de las proteínas resueltas en los geles 2D y por el análisis de espectrometría de masas. Las proteínas monooxigenasas y citocromo p450 fueron identificadas a partir de la membrana, mientras que en el citoplasma se identificaron proteínas como la isocitrato liasa y la fosfoenolpiruvato sintetasa, entre otras (Figura 14).

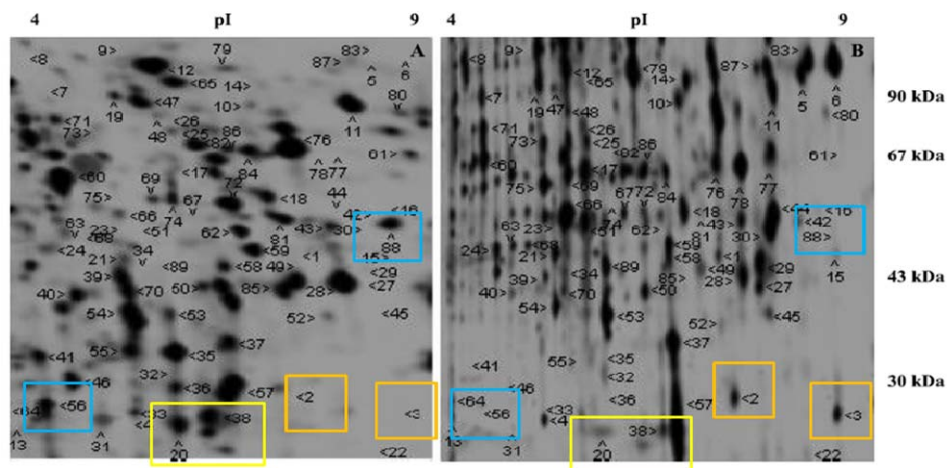


Figura 14. Comparación del perfil proteico de la cepa *Alcanivorax borkumensis* expuesta a diferentes alcanos y piruvato. Las proteínas se analizaron por geles 2D y las manchas diferenciales se analizaron por LC-MS/MS. Estos datos se tomaron de la publicación de Sabirova y cols., 2006.

CAPITULO IV.

JUSTIFICACIÓN

El empleo de microorganismos para la biorremediación de sitios contaminados con hidrocarburos es una opción viable por ser una tecnología sencilla, de bajo costo y compatible con el medio ambiente.

Se han identificado proteínas involucradas en el metabolismo de los hidrocarburos aromáticos; sin embargo, no se ha aprovechado al máximo cada una de esas proteínas. Además, escasos procesos biotecnológicos se han derivado de dichas investigaciones para su uso en la biorremediación.

El estudio de los microorganismos que juegan un papel importante en la biorremediación y el estudio del perfil proteico de estos microorganismos, pueden contribuir a identificar los genes catabólicos relacionados con la degradación de los BTEX.

CAPITULO V.

OBJETIVOS

5.1. Objetivo general.

Caracterizar microbiológicamente un consorcio aclimatado a gasolina y determinar el perfil proteico de éste, además, aislar e identificar cepas bacterianas de éste consorcio.

5.2. Objetivos específicos.

- 5.2.1. Comparar el perfil de biodegradación de los BTEX (como única fuente de carbono) de un consorcio y las cepas aisladas a partir de éste.
- 5.2.2. Determinar la población microbiana del consorcio que se expuso a los BTEX, así como seleccionar, por su capacidad biodegradadora una cepa bacteriana.
- 5.2.3. Comparar el perfil de proteínas expresadas por el consorcio y por la cepa bacteriana en ausencia y presencia de los BTEX.
- 5.2.4. Identificar las proteínas que se expresaron diferencialmente (consorcio y cepa) en ausencia y presencia de los BTEX.
- 5.2.5. Aislar los ARNm's de las proteínas expresadas por el consorcio y por la cepa en presencia de los BTEX.
- 5.2.6. Determinar si los ARNm aislados codifican para proteínas relacionadas con la biodegradación de los BTEX.

CAPITULO VI.

MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Material.

Para el desarrollo del trabajo experimental se requirió de los siguientes productos:

6.1.1. Material biológico.

En el departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la UANL se cuenta con un consorcio aclimatado a gasolina. A partir de este se aislaron diferentes cepas capaces de crecer en presencia de los BTEX; sin embargo, se seleccionó una cepa por su alta eficiencia para remover los BTEX, nuestro grupo la denominó FMB08. Algunos genes se clonaron en el vector TOPO TA de Invitrogen-Life Technologies (Carlsbad, CA).

6.1.2. Reactivos químicos y enzimáticos.

Los reactivos empleados para preparar soluciones amortiguadoras, medios de cultivo, geles, y otros reactivos de grado analítico, necesarios para realizar este trabajo, se obtuvieron de las compañías Sigma Chemical (St, Louis, Missouri, EUA), Merck (Monterrey, México), Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI, EUA), DIFCO Laboratories (Detroit, MI, EUA) y United States Biochemical (Cleveland, Ohio, EUA). El benceno, tolueno, etilbenceno e isómeros del xileno (*o*, *m* y *p*) se adquirieron de Sigma Aldrich Química S.A. de C.V. (México) y presentaron una pureza del 98%. Otros productos químicos usados en este

estudio fueron grado reactivo y se adquirieron de Sigma Aldrich Química S.A. de C.V. (México).

Las enzimas de restricción y los desoxiribonucleótidos empleados en la reacción en cadena de la polimerasa, así como la enzima RNase H empleada en la reacción de transcripción reversa provinieron de New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA, EUA).

Los reactivos empleados para realizar la PCR fueron obtenidos de las siguientes casas comerciales: Taq ADN Polimerasa (Taq Recombinant) y el $MgCl_2$ fueron obtenidas de Fermentas Life Sciences, los iniciadores empleados para la amplificación de los genes 16s, *tod* y *bed* provinieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).

La enzima RNase OneTM utilizada para el tratamiento de las preparaciones de ADN plasmídico, provino de Promega (Promega corporation, Madison, WI, EUA).

La purificación de los fragmentos provenientes de PCR y de digestión enzimática, a partir de geles de agarosa, fue realizada con el Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System obtenido de Promega.

Para la extracción de RNA se empleó TRIzol® Reagent obtenido de Invitrogen-Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA).

La reacción de transcripción reversa se llevó a cabo con la transcriptasa inversa M-MLV obtenida de Invitrogen-Life Technologies.

Las proteínas se digirieron con tripsina [$1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$] (Trypsin 3X, Bovine pancreas, US biological, Swampscott Massachusetts, USA).

6.1.3. Cultivo bacteriológico.

1) *Cultivo líquido*. Para preparar el medio mínimo mineral se utilizaron los siguientes reactivos (en g/L): Na_2HPO_4 [6], KH_2PO_4 [3], NaCl [1], NH_4Cl [1], $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ [0.5], CaCl_2 [0.011] y $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ [0.001]. El $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ se esterilizó por separado al igual que el $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Tanto los reactores como cada una de las soluciones se esterilizaron a 15 lbs de presión durante 15 a 20min. Al medio se le adicionó un complejo multi-vitamínico (1mg/L) y su pH se ajustó a 7.2 ± 0.5 con NaOH.

2) *Cultivo sólido*. Se preparó de la misma manera que el cultivo líquido, únicamente se adicionó agar-agar y este medio se colocó en placas de Petri. En ambos casos se adicionaron los BTEX a una concentración de 50 mg/L (agar-BTEX).

6.1.4. Equipos e infraestructura.

Los equipos utilizados fueron: un horno de microondas Panasonic modelo NNS-754WM, microcentrífuga Eppendorf modelo 5415 (Brinkmann Instruments, Inc. NY EUA), fuentes de poder Thermo EC250-90 (Milford, MA, USA) centrífuga Beckman Allegra TM modelo X-22R, un agitador orbital VWR modelo DS500 (USA), congelador REVCO modelo ULT-1386 de Kendro Laboratory Products (Asheville NC, EUA), termomixer Eppendorf (Westbury, NY, EUA), y un baño de agua LABNET 6 Liter Water Bath (Woodbridge NJ, USA). La cuantificación del

DNA, RNA y el seguimiento del crecimiento bacteriano se efectuaron con un espectrofotómetro de la marca Beckman modelo DU® 530 (Westbury, NY, EUA).

La concentración de los BTEX se determinó usando un cromatógrafo de gases Varian 3400 GC/FID. La columna capilar Petrochol™ (Supelco, Bellefonte, PA) 100 mm x 0.25 mm ID x 0.5 µm de película DH. Los resultados se analizaron por medio del software computacional Sigma plot, versión 10.0. El análisis de las proteínas se llevó a cabo por medio de cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), utilizando el cromatógrafo (Termo Electron, LTQ XL, California, USA).

Las características morfológicas básicas de cada una de las cepas aisladas se analizaron utilizando un microscopio OLYMPUS modelo CKX41 con cámara fotográfica CAMEDIA modelo C-7070 acoplada al microscopio (Olympus corporation Htagaya, Tokyo, Japón). La tinción de Gram se llevó a cabo por medio de un kit “Difco Gram Staining” (Difco Laboratorios, Detroit, MI).

Los reactivos se almacenaron a diferentes temperaturas (4°C o -20°) en un congelador marca TorRey (Monterrey, México). Las reacciones de PCR y RT-PCR fueron realizadas en un termociclador marca Eppendorf Mastercycler gradient (Amburgo, Alemania) La balanza analítica fue de la marca OHAUS modelo AP110S, y la balanza granataria digital de la marca Sartorius modelo 1206MP (Göttingen, Alemania).

El análisis electroforético fue realizado mediante el empleo de cámaras de electroforesis para mini geles de agarosa horizontal Thermo EasyCast™ B2, y la

cámara miniprotean II (BioRad, Hercules California, USA) para geles verticales de poliacrilamida.

Los programas de análisis génicos y proteómicos utilizados fueron: Amplify versión 1.2b (Bill Engels 1992 University of Wisconsin Genetics M. Madison, WI, EUA), OLIGO versión 4.0 (Wojciech Rychlik, National Bioscience Inc., Plymouth, MN, EUA) y el paquete de programas DNASTar (DNASTAR Inc., Madison, WI, EUA). Para la cuantificación del DNA y la determinación de los tamaños se utilizó el software LabWorks versión 4.5.00.0 (©1996-2003, Media Cybernetics, Inc.) y el equipo UVP Mini Darkroom de Bioimaging Systems (Upland, CA, EUA). Para la construcción de los vectores y el análisis de patrones de restricción, fue empleado el programa Vector NTI Suite 9 (Informax 2003, The University of North Carolina Shared Bioinformatics Resource). Para el análisis densitométrico tanto de productos de PCR y proteicos se empleó el programa computacional GEL PRO 3.2 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

Para la identificación de las masas peptídicas se utilizó el programa MASCOT (Matrix Science, Londres, Inglaterra). Para analizar las secuencias nucleotídicas y peptídicas se emplearon los programas computacionales: 1) BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), 2) NEBcutter 2.0 New England Biolabs (<http://www.neb.com>), 3) ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/>) y 4) GENSCAN (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>) (Stanford University, USA).

6.2. Métodos

6.2.1 Enriquecimiento y aislamiento

El consorcio utilizado para este estudio se obtuvo a partir de una biomasa que se ha estado alimentando con gasolina (1,200 mg/L) como única fuente de carbono por más de 5 años.

6.2.1.1. Establecimiento del consorcio

La biomasa aclimatada a gasolina se lavó con un amortiguador Tris-HCl 40mM, pH 7 y en cada paso esta biomasa se centrifugó a 5,000 rpm por 10 min. En un estudio preliminar, se prepararon reactores en lote para establecer los consorcios. Tres frascos color ámbar de 500 mL, previamente esterilizados, se adicionaron a cada uno 250 mL de medio mínimo mineral, se alimentaron con 50 mg/L de los BTEX y se inocularon con 10% v/v de la biomasa previamente descrita. Los controles consistieron de reactores con cada uno de los BTEX pero sin inóculo. Todos los reactores se mantuvieron en constante agitación a 250 rpm y a 36 ± 2 grados centígrados. La concentración de los BTEX en cada uno de los reactores se midió a las 0, 12, 24, 36 y 48 h. A partir de este consorcio se aislaron y purificaron bacterias con capacidad para crecer en presencia de los BTEX (Evans y cols., 1988; Smith, 1994 y Meckenstock y cols., 2000).

6.2.1.2. Aislamiento de cepas bacterianas a partir del consorcio.

A partir de un mL del consorcio extraído de los reactores previamente mencionados, se realizaron diluciones en agua estéril (1×10^{-1} a 1×10^{-5}). Se preparó un total de 5 placas con agar BTEX y se inocularon con 0.1 mL de las diluciones ya descritas. 50 mg/L de cada uno de los BTEX se adicionaron a las cajas que contenían el agar sin solidificar y después al solidificar el agar nuevamente adicionó la misma concentración de estos compuestos. Estos cultivos se mantuvieron por 24 h a una temperatura de 36 ± 2 grados centígrados. A las 24 h se observó el crecimiento bacteriano y se realizó una selección preliminar de las colonias acuerdo a las diferencias en su morfología macroscópica. Las colonias candidatas se propagaron en 4 mL de medio LB previamente esterilizado, estos cultivos se mantuvieron en agitación constante 250 rpm, a $36 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 h. Un mL de cada una de las colonias se transfirió a tubos Eppendorf de dos mL, posteriormente estos cultivos se centrifugaron a 5,000 rpm por 10 min y se lavaron con el buffer Tris-HCl 40mM, pH 7. A los tres mL restantes se les adicionó glicerol a una concentración final de 30%, para su almacenamiento a -80°C hasta su uso.

Posteriormente, se determinó la capacidad de cada una de las cepas aisladas para remover los BTEX. Para esto se construyeron reactores en lote, 12 frascos ámbar de 120 mL previamente esterilizados se adicionaron con 50 mL de medio mínimo mineral, además de 50 mg/L de cada uno de los BTEX y se inocularon con cada una de las colonias previamente descritas. Estos cultivos se mantuvieron

24 h a una temperatura de $36\pm 2^{\circ}\text{C}$. Un reactor inoculado con el consorcio original se mantuvo como control positivo, mientras que el control negativo consistió en reactores con cada uno de los BTEX, pero sin inóculo. Por último, se evaluó la capacidad de remoción de los sustratos, analizando cada 12 h por un periodo de 5 días la concentración de los BTEX por parte de cada una de las colonias que crecieron anteriormente en estos compuestos (Burland y cols., 1999).

6.2.2. Cinética de Remoción de los BTEX

Un total de treinta y tres reactores en lote de 500 mL se adicionaron con 250mL de medio mínimo mineral y se prepararon como se mencionó anteriormente. La concentración de la mezcla de los BTEX utilizada fue de 50mg/L. Siete de los reactores se inocularon con el consorcio, otros siete reactores se inocularon con la cepa FMB08, seleccionada por su capacidad de crecer en presencia de los BTEX, además siete reactores se inocularon con la cepa de referencia *Pseudomonas putida* F1 (ATCC 700007) y por último, siete reactores se inocularon con la bacteria *E.coli* cepa DH5 α . Como control abiótico se utilizó un reactor con 50 mg/L de los BTEX, sin inóculo. Para observar la viabilidad de las células se utilizaron cuatro reactores en lote que contenía cada uno 1 g de glucosa por litro de medio y se inocularon por separado con el consorcio, cepa FMB08, cepa de referencia y *E. coli* cepa DH5 α . Todos los reactores se mantuvieron en constante agitación a 250 rpm y a 36 ± 2 grados centígrados. Después de observar en las cinéticas preliminares, que el consorcio removió la mezcla de los BTEX en casi 32 h, se

decidió determinar la concentración de la mezcla de estos a las 0, 4, 8, 12, 24 y 32 h. El estudio se llevó a cabo por triplicado.

De la misma manera que se realizó la cinética de remoción para la mezcla de los BTEX, se llevó a cabo la cinética de remoción de cada uno de los compuestos del grupo de los BTEX. También se utilizó la misma concentración 50 mg/L de cada uno de estos y se inocularon con el consorcio, cepa FMB08, cepa de referencia y *E. coli* DH5 α .

6.2.3. Análisis Genómico.

6.2.3.1. Extracción de ADN genómico.

A partir de un vial que contenía una muestra de la cepa aislada FMB08 y/o del consorcio se centrifugó a 3,000 rpm y se descartó el sobrenadante. El ADN genómico de la cepa FMB08 y del consorcio se extrajo por medio del DNAeasy kit (Qiagen, GMBH, Hilden, Alemania).

6.2.3.2. Amplificación de los genes: *ADNr 16s*, *bed* y *tod*

Por medio de la PCR: a) se identificaron bacterias a partir de la amplificación de la región 16s ADNr, utilizando el juego de iniciadores denominados (16sF515 y 16sR1492) y b) también a partir de la PCR, se identificaron dos genes catabólicos denominados *bed* y *tod*. Para el gen *bed* se utilizó el siguiente juego de iniciadores *fwdbzm* y *rvbzm*, mientras que para el gen *tod* se utilizaron los iniciadores *fwdtolm* y *rvtolm*, la secuencia de los iniciadores y condiciones de la PCR se mencionan en los Cuadros 4 y 5. Los productos amplificados se resolvieron en geles de agarosa

al 1% que se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 gmL^{-1}) y los amplicones se expusieron a la luz ultravioleta para visualizarlos en el foto-documentador (UVP).

Cuadro 4. Oligonucleotidos (iniciadores) utilizados para amplificar los genes *16s*, *bed* y *tod*.

Gen	Iniciadores	Secuencia
16s	F515	5'-GCGGATCCTCTAGACTGCAGTGCCAGCAGCCGCGGTAA-3'
	R1492	5'-GGCTCGAGCGGCCCGCCGGGTTACCTTGTACGACTT-3'
Bed	Fwdbzm	5'-GAAGGGGACGTAGAATCATG-3'
	Rvbzm	5'-GCTAACGATTGCGTCTTGA-3'
Tod	Fwdtolm	5'-TGAAAAGTGAGAAGACAATG-3'
	Rvtolm	5'-GATTCAGAGTGTCGCCTTCA-3'

Cuadro 5. Análisis por PCR de los genes *ADNr 16s*, *bed* y *tod*. A) Condiciones para amplificar los genes *16s*, *eta*, *bed* y *tod*. B) Ciclos de PCR utilizados durante la amplificación de los genes antes mencionados.

Condiciones de PCR	
ADN (100ng)	1.0 μl
Buffer 10x PCR	2.0 μl
MgCl ₂	2.0 μl

Ciclos de la PCR	Tiempo	Temperatura	Ciclo
Desnaturalización inicial	5 min	94 °C	1 X
Desnaturalización	45 seg	94 °C	35 X
Anillamiento	45 seg	16s 50 °C Bed 54 °C Tod 60 °C	
Extensión	45 seg	72 °C	
Extensión	10 min	72 °C	1X

dNTPs (10 mM)	0.5 μl
Iniciadores 5' (10 mM)	0.4 μl
Iniciadores 3' (10 mM)	0.4 μl
Taq ADN polimerasa (Fermentas)	0.2 μl

Agua esteril	14.5 μ l
Volumen total	20.0 μ l

A)

B)

6.2.3.3. Clonación en vector Topo TA.

Cada uno de los genes amplificados se clonó en el vector topo TA, de acuerdo a las instrucciones del estuche del fabricante (Invitrogen).

1) Producción de vectores a pequeña y mediana escala. Para aumentar la cantidad del material genético de trabajo, se transformaron bacterias DH5 α calcio competente con 1 ng de los vectores Topo portadores de los genes 16s, *ebd* y *tod*. Las bacterias DH5 α -calcio competentes se prepararon de la siguiente forma: una colonia de bacterias fue inoculada en 4 mL de medio LB (bactotriton 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%). Las bacterias crecieron toda la noche a 37°C en agitación constante. Al día siguiente, se inocularon 0.5 mL del cultivo bacteriano en 50 ml de medio LB fresco y se incubaron a 37°C, con agitación constante hasta alcanzar una DO (densidad óptica) de 0.375 a 590 nm. Una vez alcanzada la densidad óptica deseada, las bacterias se centrifugaron a 3,000 rpm por 7 minutos. Luego de eliminado el sobrenadante, la pastilla bacteriana se re-suspendió en 10 mL de CaCl₂ (60 mM) frío. Posteriormente, se sometieron a una nueva centrifugación a 2,500rpm por 5 minutos. Luego de remover el sobrenadante se re-suspendieron en 10 mL de CaCl₂ frío y mantenidas en hielo

durante 30 minutos. Alícuotas de 200µL se prepararon al término del procedimiento.

2) Para la transformación se emplearon 200µL de bacterias, las cuales se incubaron en presencia del vector durante 30 minutos a una temperatura de 4°C. Posteriormente se realizó un choque térmico durante un minuto a una temperatura de 42°C seguido inmediatamente de una incubación en hielo. Para recuperar las bacterias del choque térmico se agregaron 800µL de medio LB y se incubaron durante 1 hora a una temperatura de 37°C, sin agitación. Finalmente, las bacterias se empastillaron mediante centrifugación a 3,000 rpm por 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y resuspendieron en 200 µL de medio LB. Por último estas se sembraron en placas de Petri que contenían LB-Agar con antibiótico kanamicina como medio de selección.

Aquellas colonias presentes luego de la incubación de las placas durante toda la noche a 37°C, se crecieron en 4 mL (pequeña escala) o 50 mL (mediana escala) de medio de selección (LB-antibiótico).

6.2.3.4. Extracción de ADN plasmídico

1) La selección de las clonas recombinantes se realizó mediante el análisis de la presencia del inserto correspondiente al gen de interés. Para ello se crecieron colonias en medio LB, en presencia de kanamicina (50 µg/mL) como antibiótico de selección, a 37°C con agitación continua durante toda la noche. Al día siguiente, 3.5 mL de medio se centrifugaron durante 2 minutos a 14,000rpm, se removió el medio por aspiración y mantuvieron en hielo hasta el momento de realizar la

extracción de ADN plasmídico. El ADN plasmídico se extrajo por el método de la lisis alcalina (Sambrook J y cols, 1989). Las células se re-suspendieron en 150 μ L de solución I (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM pH 8) con el vortex. Se añadió 300 μ L de solución II (preparada en fresco mezclando 0.2 ml de NaOH 10 N, 1.0 ml de SDS 10% y 8.8 ml de agua), se mezcló inmediatamente por inversión, incubando en hielo por 5 minutos. Pasado este tiempo, se agregaron 225 μ L de solución III (acetato de amonio 7.5 M), se mezcló inmediatamente por inversión, incubando en hielo por 5 min. El tubo se centrifugó a 14,000 rpm por 10 minutos y se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo, donde se le hizo una extracción fenol/sevag (medio volumen de fenol y medio volumen de sevag). Se centrifugó nuevamente a 14,000 rpm por 2 minutos y el sobrenadante se transfirió a un tubo donde el DNA plasmídico se precipitó con 0.8 volúmenes de isopropanol al 100% frío. Después de centrifugar a 14,000 rpm por 2 min. la pastilla se lavó dos veces con 1 mL de etanol al 70% frío y se dejó secar al aire y a temperatura ambiente durante 30 minutos; finalmente las pastillas se resuspendieron en 50 μ L de TE 1 X con 1U de RNAsa One, para eliminar el ARN presente en las muestras.

2) Los plásmidos se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8%, utilizando como marcador de peso molecular al bacteriófago λ digerido con la enzima de restricción *Pst*I y cuantificados mediante el empleo del espectrofotómetro leyendo a las longitudes de onda de 260 y 280nm. Para el tamizaje de clonas positivas, se llevó a cabo una amplificación del inserto, empleando los iniciadores M13 (sentido: 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'; antisentido:5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'). La reacción de amplificación fue

realizada bajo las siguientes condiciones: 1^{er} ciclo a 94° durante 5 minutos, más 35 ciclos cada uno, de los cuales consta de: 94°/45s, 52°/45s y 72°/42s, más una incubación final a 72° durante 5 minutos; a partir de las clonas positivas se realizó un patrón de restricción de cada una de estas. Para llevar a cabo este perfil de restricción, los amplicones de las clonas positivas se digirieron con la enzima *AluI* y aquellas clonas que mostraron un perfil de restricción diferente se seleccionaron y secuenciaron con el equipo Liqor. Por último, las secuencias ADNr 16s se compararon con las secuencias nucleotídicas ADNr 16s del GenBank (BlastN).

6.2.3.5. Transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

A partir de la cepa FMB08, del consorcio y de la cepa de referencia, también se extrajo ARN total. Estas células crecieron en presencia de la mezcla de los BTEX y sobre cada uno de estos por separado. El ARN se aisló de estos microorganismos de los cultivos en fase exponencial ($D.O_{600nm} = 1.5$) utilizando el reactivo de trizol y siguiendo el protocolo del fabricante (Invitrogen, Carlsbad California, USA). Por último, éste se trató con DNAsa por 30 minutos a 37 °C (Invitrogen). Además, se extrajo ARN total de *E. coli* (crecida en glucosa) para usarlo como control negativo de la expresión génica. Un microgramo de ARN total se utilizó como templado y se retrotranscribió en ADN complementario (ADNc) usando el estuche comercial Revert AidH Minus First Strand cDNA synthesis kit (Fermentas, ST. Leon-Rot, Germany) (Cuadro 6). Como iniciador se utilizaron los

primers *rvbzm* y *rtolm*. La expresión de los genes *tod* y *bed* se dedujo usando el ADNc como templado para la PCR. Las condiciones de la PCR se mencionan en los cuadros 4 y 5. La amplificación de los genes *bed* y *tod* a partir del ADN genómico de la cepa de referencia se utilizó como control positivo; mientras que la amplificación de estos genes desde el ARN total se utilizó como control negativo. También, se utilizó un control interno amplificando el gen ADNr 16s y como templado se utilizó el ADNc ya descrito.

Cuadro 6. Condiciones utilizadas para retrotranscribir el ARN total extraído a partir de la cepa FMB08, consorcio, cepa de referencia y *E. coli* DH5 α .

Condiciones RT-PCR		
ARN (400 ng)	4 μ l	65 ° C x 5 min
Iniciador 3' (200 ng/ μ l)	1 μ l	
dNTPs (10mM)	1 μ l	
Agua Estéril	8 μ l	
5X first Strand	4 μ l	65 ° C x 2 min
DTT 0.1M	2 μ l	
M.MVLRT (200 U)	1 μ l	37 ° x 50 min
Inactivar 1 μ l de ARNasa 37° C x 30 min		

6.2.4. Análisis protéico.

6.2.4.1. Preparación de proteínas citoplasmáticas y geles SDS-PAGE.

En un primer ensayo, la biomasa de la cepa y del consorcio se recuperaron por centrifugación (5,000 rpm X 10 minutos) a las 0, 8, 16, 24 y 32 h, durante la

cinética de biodegradación. Se pesaron 100 mg (peso húmedo) de éste y se adicionó 1 mL de amortiguador para extracción de proteínas (B-PER-Bacterial Protein Extraction Reagent), siguiendo el resto del protocolo de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Pierce, Rockford IL, USA). Las muestras se mantuvieron a 4°C y se les adicionó un coctel de inhibidor de proteasas [Halt-Protease inhibitor cocktail kit (100X), Pierce] a una concentración final de 1X. Posteriormente, las muestras se sonicaron (Sonicor-ultrasonic processor Up 400a, Copiague N.Y. USA) por seis ciclos (75 W x 30 segundos) con intervalos de 30 segundos entre cada uno. La suspensión sonicada se centrifugó a 14,000 rpm x 30 minutos a 4°C para remover los restos celulares (Sabiroya y cols., 2006). Por último, a 250 µl de la muestra que contiene las proteínas se añadieron 250 µl de agua, 450 µL de cloroformo, 600 µL de metanol y se mezclaron por vórtex (30 segundos). Las muestras se centrifugaron a 13,000 rpm x 5 minutos y sin tocar la fase intermedia (proteínas) se decantó la fase acuosa. Al final, se adicionaron 450 µL de metanol y se centrifugaron de nueva cuenta a 13,000 rpm x 5 minutos. Se retiró el sobrenadante sin perturbar la pastilla de proteínas y el exceso de solvente se retiró secando las proteínas a vacío en el Savant. A la pastilla (proteínas) se les adicionó 25 µL de amortiguador de extracción de proteínas y se determinó la concentración de proteínas por medio del método de Bradford (Bradford, 1976) y como estándar se utilizó albúmina de suero de bovino. La concentración final de las proteínas se ajustó a 20 µg/µL de proteína total con el amortiguador de carga. Las proteínas intracelulares se resolvieron por SDS-PAGE al 12 % y la electroforesis se mantuvo a 100 V en una cámara miniprotean II, a temperatura

ambiente. Los geles se tiñeron con el colorante azul brillante de Coomassie (Bio-safe coomassie, Bio Rad) y como estándar se utilizó un marcador de proteínas de peso molecular conocido (18-120 kDa) (Precision plus protein dual color standards, BioRad).

En un segundo ensayo, los cultivos se recuperaron cuando habían alcanzado la densidad óptica ($DO_{600\text{ nm}}$) de 1.5 para cada uno de los cultivos. Para la extracción de las proteínas se utilizó el procedimiento arriba mencionado (Pierce).

6.2.4.2. Determinación de las secuencias peptídicas.

Después de que se resolvieron las proteínas en el SDS-PAGE y su expresión fue obvia, éstas se extrajeron desde sus respectivas bandas en los geles teñidos y se digirieron con tripsina [$1\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$], de acuerdo al protocolo de Promega (Madison WI, USA).

Se cortan las bandas o manchas con una hoja de bisturí o con una punta de pipeta recortada y depositar cada una en tubos eppendorf. Se Realizarán 2 lavados con agua milli-Q durante 10 min. Añadir acetonitrilo (AcN) hasta que cubra la banda o mancha ($20\ \mu\text{l}$) y esperar 5 min para que el gel se deshidrate y libere el colorante. Repetir esta operación dos veces para que el gel quede más o menos blanco.

Después se realizan los siguientes pasos: 1) se cubren las bandas con una solución 10 mM Di-tio-treitol (DTT) en bicarbonato amónico 25 mM (NH_4HCO_3), 30 min a 56°C . Dejar a temperatura ambiente, eliminar el DTT y añadir AcN que se retira rápidamente para incubar con Iodoacetamida 55mM ($10\ \text{mg}/\text{mL}$) en 25 mM

NH₄HCO₃ durante 15 min en oscuridad. 2) se incuban 5 min con AcN y retirarlo. Añadir NH₄HCO₃ 25 mM e incubar 5 min tras los cuales sin retirar el sobrenadante se añadió un volumen de AcN y se incubó 15 min. Retirar el sobrenadante. 3) se añade tripsina en una concentración de 12,5 ng/μL en 25 mM de NH₄HCO₃ y en un volumen que cubra bastante por encima las bandas que ahora están deshidratadas. Incubar en hielo 45 min para que se absorba pero sin que llegue a actuar. Retirar el sobrenadante y añadir NH₄HCO₃ 25 mM hasta cubrir las bandas. Incubar toda la noche a 37°C (o al menos 6 horas). Tras la digestión agitar con vortex y centrifugar para pasar el sobrenadante a una nueva placa o tubos. 4) Cubrir las bandas con 50% AcN /0.5% ácido trifluoroacético(TFA) y sonicar 10 min. Pasar el sobrenadante a otro tubo o placa. Repetir 3 veces esta operación recogiendo todos los sobrenadantes de cada extracción juntos. Realizar otras tres extracciones con AcN de 10 min cada una y depositar los sobrenadantes junto con los de las tres extracciones anteriores. Secar en centrífuga "savant" y resuspender en 5 μL de 50% AcN en 0.1% TFA. 5) Los péptidos obtenidos de la digestión se extrajeron y se les realizó un análisis por medio de cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) (Haskins y Cols., 2004). Las masas peptídicas se analizaron con el programa MASCOT (Matrix Science, Londres, Inglaterra) y para la identificación de las proteínas se realizó una búsqueda usando la base de datos de proteínas del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

CAPITULO VII.

RESULTADOS

7.1. Cinéticas de biodegradación.

7.1.1. Enriquecimiento y aislamiento.

Se investigó un consorcio con habilidad para remover los BTEX. Para establecer su capacidad de remoción sobre esta mezcla de hidrocarburos, en cultivos en presencia de estos se evaluó la concentración de los BTEX cada 12 h, por un período de 60 h. La cinética demostró que el consorcio removi6 más del 75% de los mismos en 36 h (Figura 15).

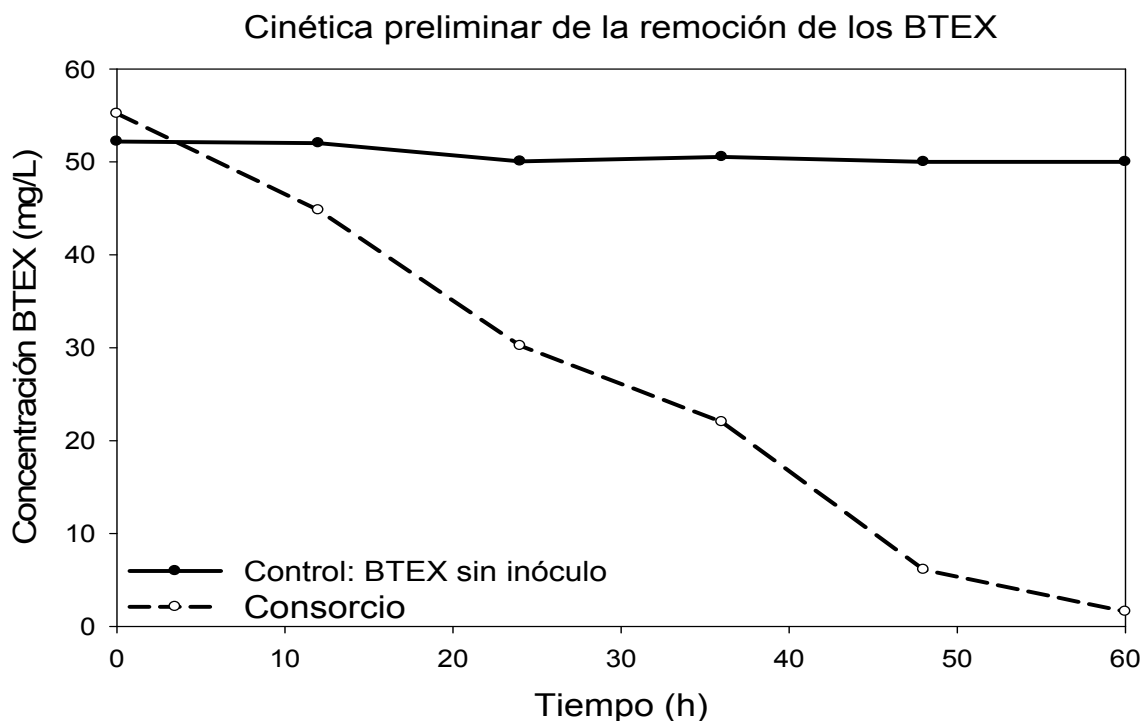


Figura 15. Cinética preliminar de remoción de los BTEX en reactores en lote. Los reactores, además del medio mínimo mineral, contenían 50 [mg/L] de los BTEX y como inóculo se utilizó 10% v/v de biomasa aclimatada a gasolina.

Los resultados también indicaron que el consorcio inició casi inmediatamente la remoción de los BTEX, es decir, no hubo fase de adaptación (período lag). Por su parte los controles no demostraron pérdida significativa de estos compuestos. Los resultados y diseño de la gráfica se analizaron en el programa Sigma Plot v.10.

Después de desarrollar el consorcio, se aislaron diez cepas bacterianas con capacidad para crecer en presencia de los BTEX. Se sembraron diferentes diluciones del consorcio en placas de Petri que contenían agar-BTEX [50 mg/L]. Los cultivos se mantuvieron por 24 h a $36 \pm 2^\circ\text{C}$ y se observó la presencia de diez colonias con diferencias en su morfología macro- y microscópica (Cuadro 7).

Cuadro 7. Características de la morfología macro- y microscópica de diez colonias que fueron aisladas a partir de un consorcio que fue capaz de remover los BTEX.

Colonia	Morfología macroscópica	Morfología microscópica	Tinción de Gram
1	Redonda color crema, 1mm/D.	Bacilo corto	Positiva
2	Presenta margen irregular de color crema.	Bacilo corto	Positiva
3	Polvosa de 1 mm/D	Bacilo corto con esporulación	Positiva
4	Café con centro naranja de 1 mm/D.	Bacilo	Positiva
5	Colonia en forma de estrella de 2mm/D.	Coco	Positiva
6	Crema con centro café de 0.5mm/D	Bacilo corto	Positiva
7	Ovalada color crema, 0.1mm/D.	Bacilo corto	Negativa
8	Ovalada-filamentosa de 1mm de largo.	Bacilo corto con esporulación	Negativa
9	Crema con filamentos de 5 mm/D	Bacilo corto	Negativa
10	Colonia crema, bordes irregular	Bacilo corto	Negativa

Las diez colonias seleccionadas por crecer en presencia de los BTEX, mostraron diferentes patrones de degradación de estos compuestos. Sin embargo, sólo una cepa fue capaz de remover los BTEX en más del 50%, en un tiempo de 36 h. Las características de crecimiento y capacidad de degradación de ésta cepa permitió seleccionarla y denominarla FMB08. Otras tres cepas removieron menos del 25 % de estos compuestos y las seis cepas restantes no removieron los BTEX (Figura 16).

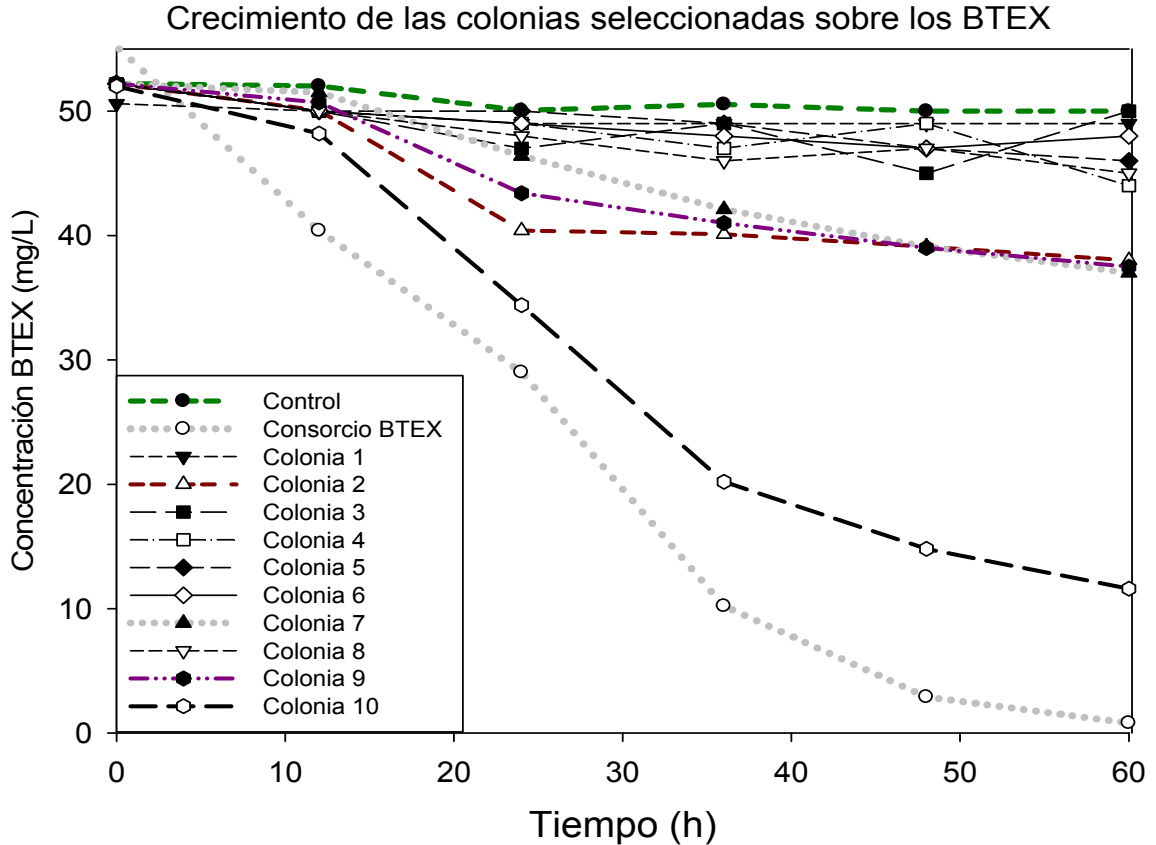


Figura 16. Crecimiento de las cepas aisladas en presencia de los BTEX. Diez colonias candidatas se expusieron a los BTEX [50 mg/L] para determinar su capacidad para utilizar a estos como única fuente de carbono y energía. Las líneas indican la cinética de biodegradación de los BTEX para cada una de las cepas. Cuatro cepas crecieron en presencia de estos compuestos, sin embargo, solo una cepa FMB08 (colonia 10) fue capaz de remover los BTEX en más del 50% en 36 h.

7.1.2. Cinética de Biodegradación de los BTEX.

En este estudio también se comparó la capacidad de remoción del consorcio versus la cepa FMB08, desarrollando cinéticas de remoción de los BTEX en un período de 32 h. Los resultados demostraron que tanto el consorcio como la cepa fueron capaces de remover los BTEX. A partir de la cinética se observó que el consorcio removió el 95% de los BTEX en 32 h, mientras que la cepa removió

casi el 90% de estos, en el mismo tiempo (Figura 17). Por su parte, la cepa de referencia *P. putida* cepa F1 removió el 80 % de los BTEX y los reactores que se mantuvieron sin inocular no se observó pérdida significativa de los BTEX.

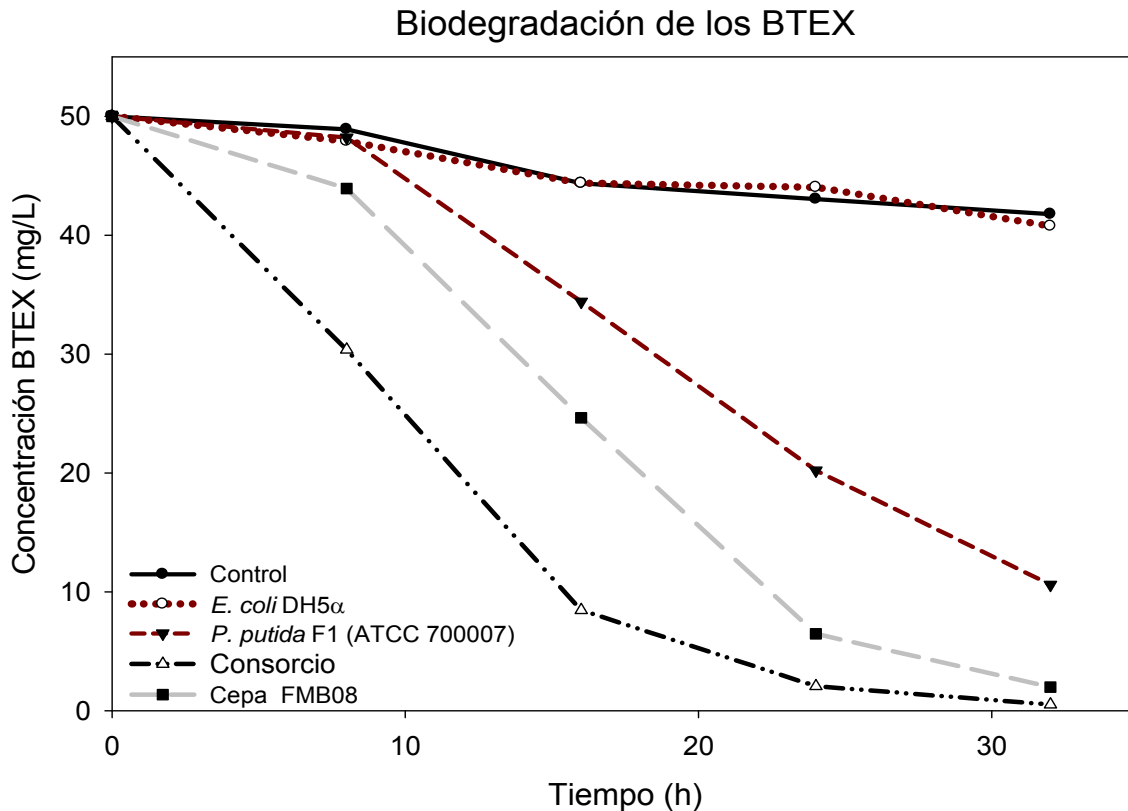


Figura 17. Cinética de biodegradación de los BTEX utilizando diferentes inóculos. La degradación de los BTEX se llevó a cabo tanto por el consorcio como por la cepa FMB08 y *P. putida* F1, Sin embargo, el consorcio alcanzó casi el 95% de remoción, seguido por la cepa FMB08 con más del 85% y la cepa *P. putida* F1 removió menos del 80%.

Los resultados mostraron que el consorcio removió primero el etilbenceno (98.7%), seguido por la remoción del tolueno (97.8%), benceno (96.1%) y por último los xilenos (93%). Sin embargo, los resultados obtenidos con la cepa FMB08 indicaron que removió primero el etilbenceno (97.7%), seguido por el benceno (90.8%), tolueno (94.8%) y xilenos (87.8%) (Cuadro 8).

Cuadro 8. Comparación de la remoción de cada uno de los BTEX por el consorcio, cepa FMB08 y *P. putida* F1.

<div style="text-align: right;">Fuente carbono</div> <div style="text-align: left;">Inoculo</div>	% Remoción Benceno	% Remoción Tolueno	% Remoción Etilbenceno	% Remoción Xileno	% Remoción BTEX
Cepa FMB08	94.8	90.8	97.7	87.8	90
Consortio	96.1	97.8	98.7	93	95
Referencia	80	80	80	25	75
<i>E. coli</i>	5	5	5	5	5
control	6	6	6	6	6

7.1.3. Identificación de cepas bacterias presentes en el consorcio.

Para identificar los posibles microorganismos presentes en el consorcio, se amplificó y secuenció el gen ADNr16s, a partir del ADN genómico extraído del consorcio. La figura 18 muestra los patrones de restricción, como resultado de la digestión de los amplicones del gen ADNr 16s con la enzima *AluI*. Más de quince patrones de restricción fueron observados, lo cual sugiere la presencia del mismo número de cepas bacterianas presentes en el consorcio. Aquellas clonas que resultaron ser diferentes se seleccionaron y secuenciaron los genes ADNr 16s para realizar su caracterización. Las secuencias obtenidas se compararon con las secuencias ya reportadas en el Genbank, indicando que en el consorcio se encuentran presentes bacterias similares de distintos géneros como: *Alcanivorax* sp., *Bacillus* sp., *Burkholderia* sp., *Escherichia* sp., *Pseudomonas* sp., *Ralstonia* sp., *Rhodococcus* sp., y *Shewanella* sp., entre otras (Cuadro 9). Estas bacterias se han descrito por su capacidad de utilizar estos compuestos (aromáticos y/o

alfáticos) como única fuente de carbono y energía. Como control, el gen 16s de *E. coli* DH5α y de la cepa de referencia, también se amplificaron por PCR y secuenciaron.

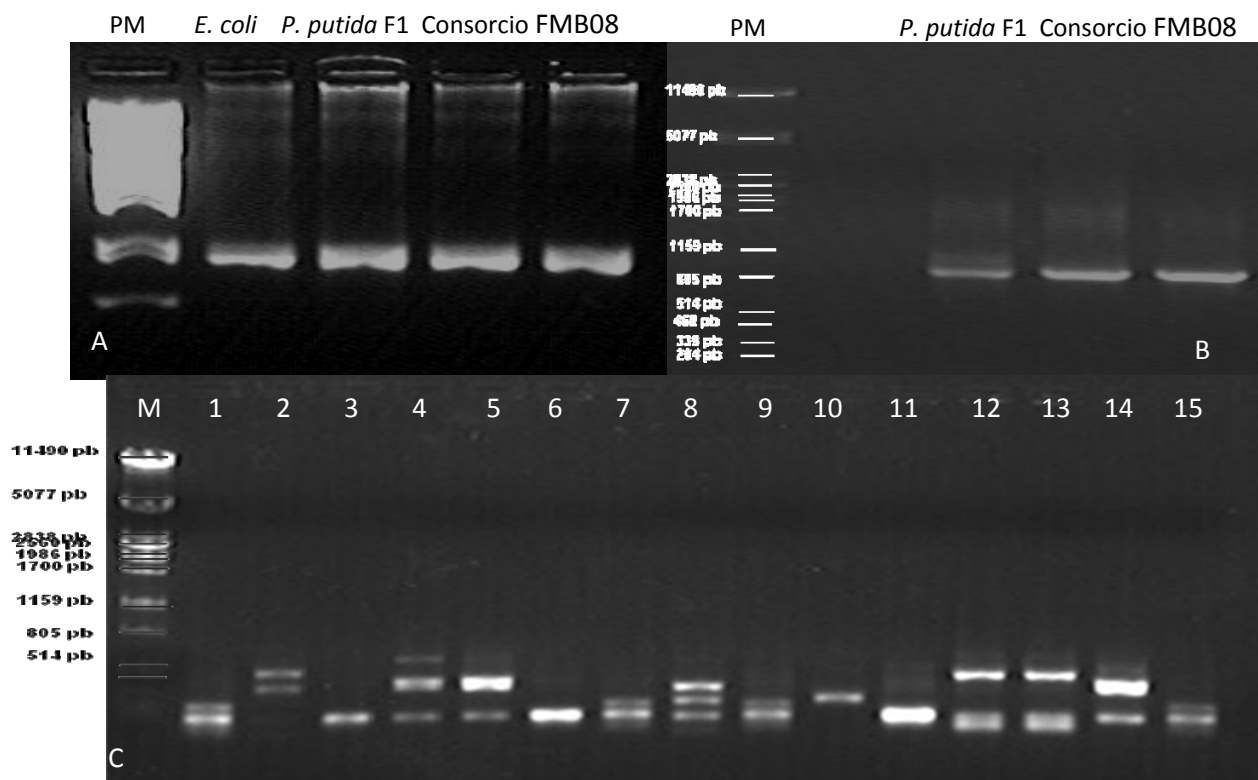


Figura 18. Amplificación y digenstión del gen ADNr16s del consorcio, cepa FMB08, *P. putida* F1 y *E. coli* DH5α. A) Aislamiento del ADN genómico extraído a partir de *E. coli*, *P. putida* F1 (ATCC 700007), consorcio aclimatado a gasolina y de una cepa aislada a partir del consorcio previamente descrito. B) Amplificación del gen ADNr16s de *E. coli*, consorcio y cepa FMB08. C) Patrones de restricción (con *AluI*) realizados a partir de los amplicones obtenidos de las clonas positivas. Los carriles del 1-11 y 14-15 muestran el perfil de restricción de los amplicones de las clonas que portan el gen ADNr 16S del consorcio. Mientras que el carril 12 y 13 muestran el perfil de restricción de las clonas que portan el gen ADNr 16S de la cepa FMB08.

Cuadro 9. Comparación de las secuencias del gen ADNr 16S del consorcio aclimatado a gasolina y de la cepa FMB08 contra las secuencias reportadas en el gen bank.

Cepa bacteriana	Similitud	Cepa bacteriana	Similitud

<i>Pseudomonas putida</i>	99%	<i>Shewanella pealeana</i>	91%
<i>Burkholderia multivorans</i>	99%	<i>Alcanivorax borkumensis</i>	96%
<i>E. coli</i>	98%	<i>Saccharophagus degradans</i>	96%
<i>Bacillus sp. G2DM</i>	98%	<i>Azoarcus denitrificans,</i>	96 %
<i>Ralstonia solanacearum</i>	97%	<i>Alcaligenes degradans</i>	97%

La figura 19 muestra la morfología microscópica la cepa FMB08, esta se observó como un bacilo corto ligeramente curvo, gram negativo, 1 a 5 μm de largo y 0.5 a 1 μm de ancho. Esta cepa se identificó a partir de pruebas bioquímicas (Cuadro 10) y los resultados la identificaron como similar al género *Pseudomonas*. Asimismo se analizó por amplificación (PCR) y secuenciación del gen ADNr16s la cepa FMB08, los resultados mostraron que la secuencia de éste gen también tiene cierta similitud con las secuencias génicas ya reportadas en el Genbank para el género *Pseudomonas*.

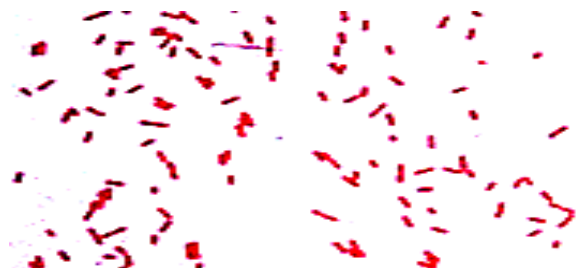


Figura 19. Morfología microscópica de la cepa FMB08 aislada a partir del consorcio. La cepa se tiñó por la técnica de Gram y se observó como un bacilo corto ligeramente curvo, gram negativo, 1 a 5 μm de largo y 0.5 a 1 μm de ancho.

Cuadro 10. Pruebas bioquímicas realizadas a la cepa FMB08 aislada a partir del consorcio.

Prueba	Resultado	Resultado

Cepa	Cepa FMB08	<i>Pseudomonas putida</i> F1 (ATCC 700007)
Morfología	Bacilo corto, gram negativo, 1 a 5µm de largo y 0.5 a 1 µm de ancho	Bacilo corto, gram negativo, 1 a 5µm de largo y 0.5 a 1 µm de ancho
Oxidasa	+	+
Catalasa	+	+
Indol	Neg	Neg
Rojo de metilo	Neg	Neg
Citrato de Simmons	Neg	Neg
TSI	Neg	Neg
Hidrólisis de Urea	Neg	Neg
Hidrólisis de gelatina	Neg	Neg
LIA	Neg	Neg
MIO	Neg	Neg
Kliger	Neg	Neg

7.2. Estudios a nivel proteómico.

7.2.1. Perfil de expresión protéico.

La comparación del perfil proteico permitió identificar bandas proteicas que posiblemente están relacionadas con la biodegradación de los compuestos aromáticos. Las proteínas se extrajeron a partir de la cepa FMB08 y del consorcio expuesto a los BTEX en diferentes tiempos. Estas proteínas se resolvieron por SDS-PAGE al 12% y se tiñeron con el colorante azul brillante de Coomassie. Los resultados observados en los geles mostraron que ciertas proteínas se expresan a tiempos diferentes durante la biodegradación de los BTEX. También, se observó que algunas bandas proteicas incrementan o disminuyen su abundancia relativa. En la figura 20, se observan cuatro bandas proteicas con diferente peso molecular [banda 1 (~60 kDa), banda 2 (~48 kDa), banda 3 (~22 kDa) y banda 4 de (~19 kDa)], que se expresaron a la octava hora. A las horas dieciséis y veinticuatro se observaron otras proteínas que de acuerdo a su peso molecular [banda 5 (~45 kDa) banda 6 (~35 kDa) y banda 7 (~23 kDa)] son diferentes a las proteínas arriba mencionadas. Además, los resultados mostraron que el consorcio y la cepa expuestos a los BTEX, expresaron proteínas diferentes, en comparación con el consorcio y la cepa que crecieron en glucosa.

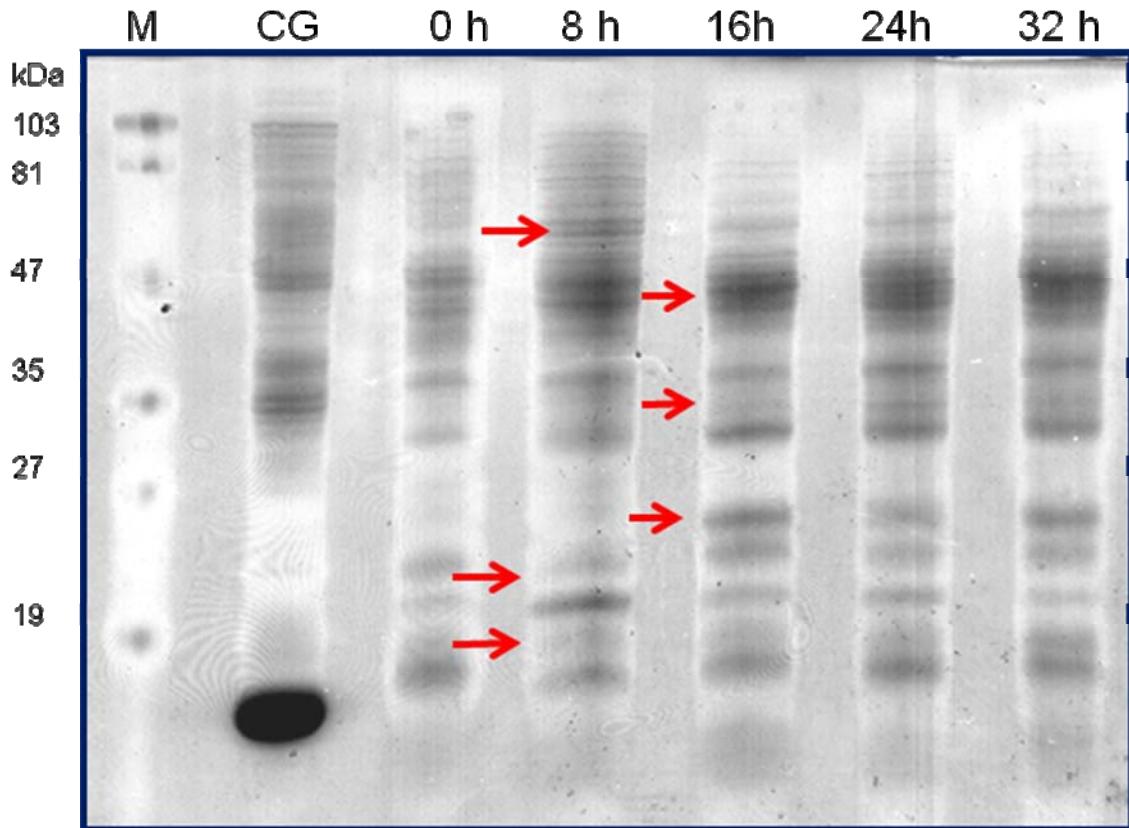


Figura 20. Perfil de expresión proteico de la cepa FMB08 expuesta a los BTEX. La cepa FMB08 se recolectó a diferentes tiempos (0, 8, 16, 24 y 32 h) y las proteínas se resolvieron en SDS-PAGE al 12%. Como control se utilizó la cepa alimentada con glucosa (CG).

En otro ensayo se comparó el perfil proteico de la cepa FMB08 y del consorcio expuesto tanto a la mezcla de los BTEX, como a cada uno de estos por separado. Las proteínas extraídas a partir de la cepa FMB08, se resolvieron en SDS-PAGE al 12% y teñidas con el colorante azul brillante de Coomassie. La Figura 21 muestra las proteínas expresadas diferencialmente en presencia de cada uno de los compuestos. En el carril en el gel que contiene las proteínas de las células expuestas al benceno se destacan tres bandas proteicas: 1) ~ 43 kDa, 2) ~40 kDa y 3) ~30 kDa; mientras que en el carril de las células expuestas al tolueno se

destacan las siguientes bandas proteicas: 1) ~48 kDa, 2) ~38 kDa y 3) ~29 kDa. Por su parte, en el carril de las células expuestas al etilbenceno se observaron cuatro bandas proteicas: 1) ~43 kDa, 2) ~29 kDa, 3) ~28 kDa y 4) ~27 kDa. Por último, en el carril de las células expuestas a los xilenos, se observaron como sobresalientes tres bandas proteicas de: 1) ~33 kDa, ~31 kDa y ~28 kDa. Interesantemente, se observó que la cepa FMB08 expuesta a la mezcla de los BTEX, expresó algunas de las proteínas descritas anteriormente para cada uno de los BTEX. Igualmente, se observó un perfil proteico diferente en comparación con las proteínas extraídas a partir de las células que crecieron en glucosa. Resultados similares se observaron en el análisis de las proteínas extraídas a partir del consorcio expuesta a los BTEX en diferentes tiempos y a cada unos de estos (Figura 22 A y B).

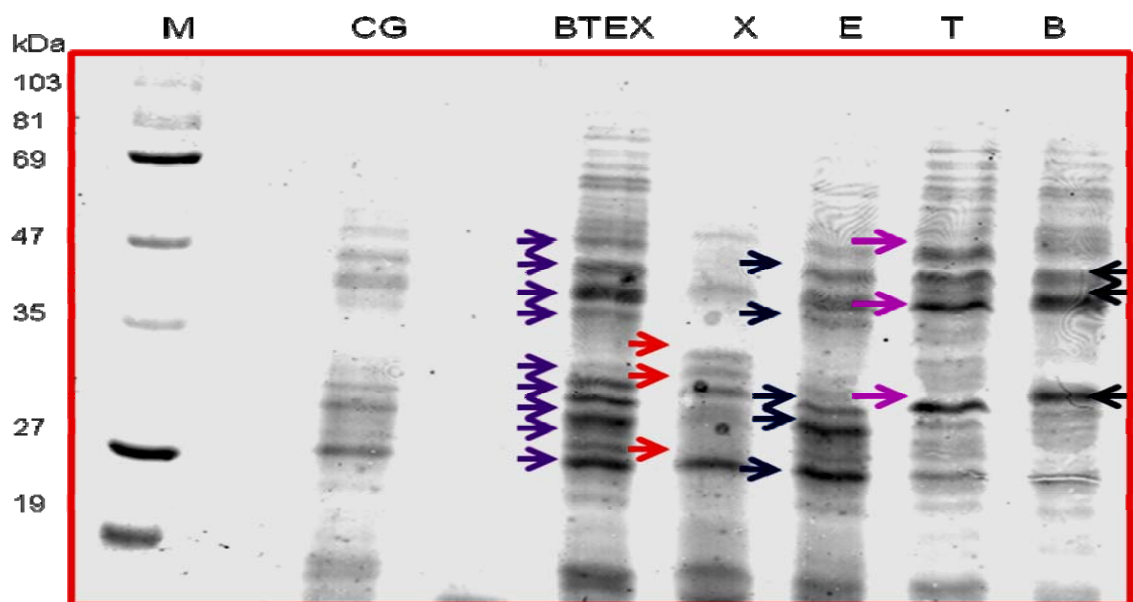


Figura 21. Perfil de expresión proteico de la cepa FMB08. La cepa FMB08 se expuso a los BTEX y a c/u de estos (B, T, E y X). En la figura se destacan proteínas que se expresaron dependiendo de la fuente de carbono a la que se expuso la cepa. M (Marcador) y CG consorcio expuesto a glucosa.

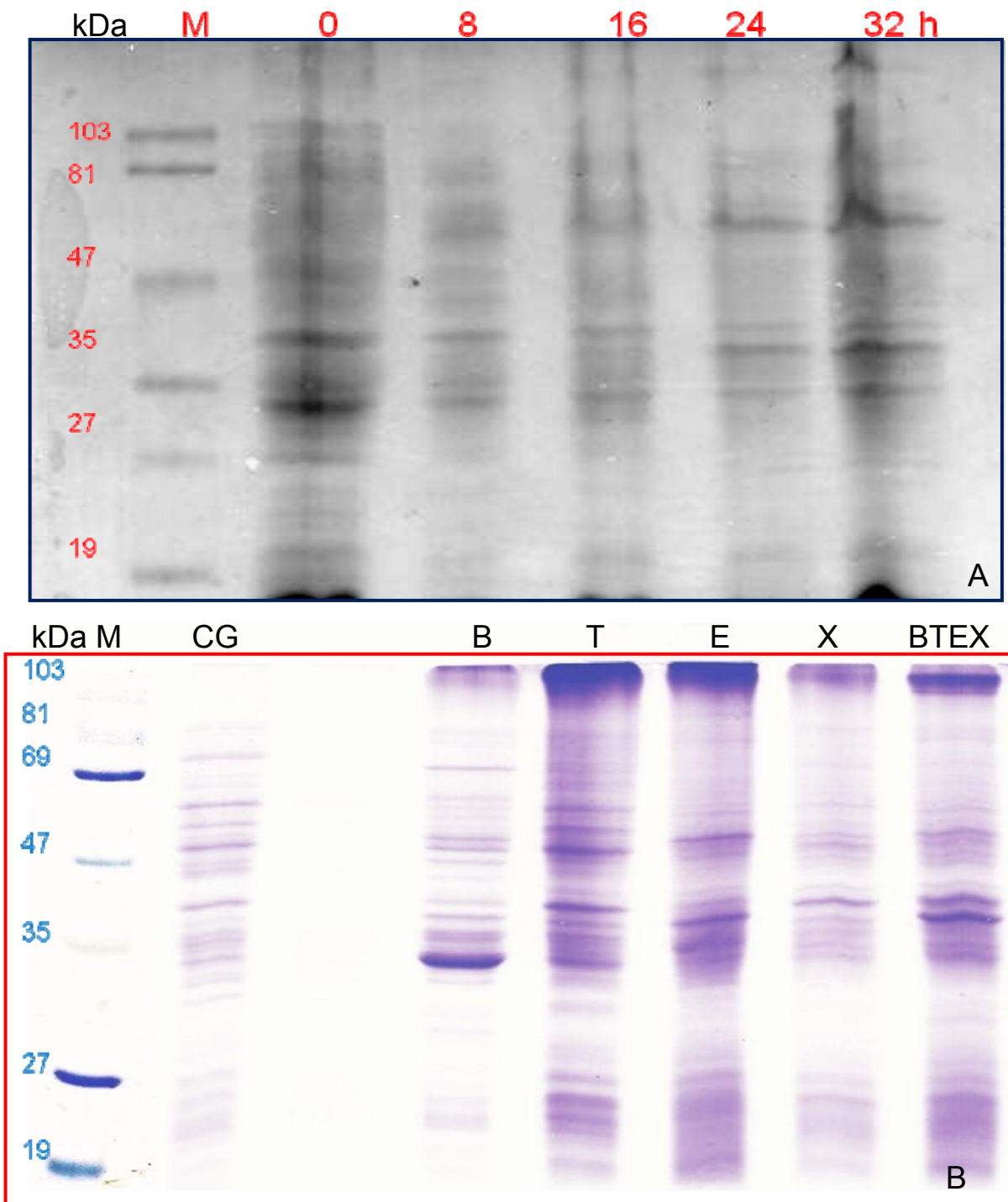


Figura 22. Análisis proteico del consorcio y de la cepa FMB08 expuestos a los BTEX. A) Perfil de expresión proteico del consorcio expuesto a los BTEX. Como control se utilizó el consorcio alimentado con glucosa (CG). Las células se recolectaron a diferentes tiempos. B) Perfil de expresión proteico del consorcio que utilizó como única fuente de carbono a los BTEX y a c/u de estos. El consorcio se recolectó a las 24 h y también se observó que la expresión de proteína depende de la fuente de carbono a la que se expone. Además, también existen diferencias entre las proteínas que se observaron en la cepa y el consorcio.

7.2.2. Análisis de las proteínas por LC/MS/MS.

Las proteínas que se expresaron diferencialmente (referidas más adelante como proteínas candidatas) con respecto al tiempo y a la fuente de carbono, después de analizarse por SDS-PAGE al 12 % (ver Figura 20 y 21), se identificaron por medio de LC-MS/MS. Las proteínas candidatas se extrajeron desde la banda proteica en el gel y posteriormente se digirieron con tripsina a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, para preparar los péptidos para su eventual análisis. Los resultados obtenidos a partir del LC-MS/MS se analizaron en el programa computacional MASCOT y por último la huella proteica obtenida a partir de este programa se comparó con las secuencias proteicas que se encuentran en el Genbank (BLAST). Algunas de las proteínas identificadas fueron citocromo C (35,526 Da), Regulador transcripcional Lys R (33,602 Da), Hidrogenasa Fe-S (19,306 Da), Ferredoxina-dominio de unión Fe-S (12,458 Da), NADH deshidrogenasa (18,308 Da) y la 2,3 catecol-dioxigenasa (32,189 Da). Además, se identificaron la 4 oxalocronato descarboxilasa y la enzima polihidroxiacetonato despolimerasa (Cuadro 11). En el cuadro 12 se muestran las proteínas identificadas a partir de las bandas proteicas extraídas del consorcio y de la cepa expuesta a diferentes fuentes de carbono, algunas de esas proteínas fueron Tioredoxina-disulfuro reductasa (38,518 Da), formato-deshidrogenasa (21,699 Da) y TodF Hidratasa (23,902 Da), entre otras. Todas estas proteínas están implicadas en el metabolismo de los compuestos aromáticos.

Cuadro 11. Proteínas expresadas en presencia de los BTEX y analizadas por LC/MS/MS. Similitud de las proteínas identificadas a partir del consorcio y de la cepa FMB08 expuestos a los BTEX en diferentes tiempos, con las proteínas disponibles en el GenBank.

Candidata	Fuente de Carbono	Proteína parecida a la identificada	PM (Da)	No. Identificación
1	BTEX	Citocromo C	35,626	gil117921118
2	BTEX	Polihidroxialconato despolimerasa	46,973	gil73538528
3	BTEX	Sistema de transporte ABC	59,033	gil84359023
4	BTEX	Hsg48	51,281	gil41651
5	BTEX	Porina	36,591	gil129102
6	BTEX	Factor de elongación Tu-A	43,254	gil57238897
7	BTEX	Citocromo C	10,937	gil121604571
8	BTEX	Regulador transcripcional LysR	33,602	gil126355885
9	BTEX	Dioxigenasa/Glioxilasa	32,189	gil148548089
10	BTEX	4 oxalocronato descarboxilasa	28,222	gil148548088
11	BTEX	Catecol-dioxigenasa	35,000	gil78063176
12	BTEX	Cluster de Fe-S hidrogenasa	19,306	gil77973841
13	BTEX	NADH deshidrogenasa	18,308	gil113871846
14	BTEX	Proteína transporte de electrones ysaA	17,594	gil26250216
15	BTEX	Proteína hipotética BB2842	11,724	gil33601818
16	BTEX	Ferredoxina, dominio de unión Fe-S	12,458	gil149118333
17	BTEX	Proeína hipotética OB2597	10,824	gil84503169
18	BTEX	Ferredoxina (secuencia parcial)	8,530	gil51245500
19	BTEX	Proteína hipotética ED21	8,154	gil149186419
20	BTEX	Proteína hipotética c2B002	9,822	gil56476484
21	BTEX	Proteína hipotética conservada	8,857	gil121531209
22	BTEX	Proteína hipotética azo 1735	12,147	gil119898026
23	BTEX	Proteína Aave1976	12,662	gil120610656

Cuadro 12. Análisis por LC/MS/MS de proteínas implicadas en la degradación de los BTEX. Proteínas identificadas a partir del consorcio y de la cepa FMB08, estas células se expusieron tanto a la mezcla de los BTEX como a cada uno de estos.

Candidata	Fuente de Carbono	Proteína parecida a la identificada	PM (Da)	No. Identificación
1	BTEX, E	Factor de elongación Tu	43,337	gil2886756
2	B	Factor de elongación de la traducción	43,329	gil96718
3	BTEX, B	Proteína de membrana F	40,061	gil85058985
4	T	Tiorredoxina-disulfuro reductasa	38,518	gil84516681
5	BTEX, T	Porina E	48,287	gil26986977
6	X	Regulador transcripcional LysR	33,780	gil26990316
7	BTEX, X	Dioxigenasa/Glioxilasa	32,189	gil148548089
8	BTEX, T	Catecol dioxigenasa	35,000	gil78063176
9	BTEX	Proteína hipotética BammMC	28,692	gil118700962
10	X	Triptófano sintetasa	28,422	gil464911
11	T	Proteína de membrana II	25,538	gil148368
12	BTEX, B, E	Subunidad Ribosomal 50s (L1)	24,208	gil104779745
13	BTEX, T	TodF Hidratasa	23,902	gil135977
14	B	Transportador TRAP-R	21,269	gil84385307
15	B	Proteína permeasa	21,274	gil149187948
16	BTEX, B	Proteína hipotética RF_034	21,986	gil67458826
17	BTEX, T	Formato deshidrogenasa	21,699	gil34733215
18	BTEX	Proteína transporte de electrones	20,523	gil59711541
19	BTEX, T	Mot/TolQ/ExbB	19,762	gil119774393
20	BTEX, T	Cluster de Fe-S hidrogenasa	19,306	gil77973841
21	T	NADH deshidrogenasa	18,308	gil113871846
22	BTEX	Proteína LrgA	18,800	gil148653125
23	BTEX	Proteína Insb (transposon)	11,139	gil140810
24	T	Proteína con función desconocida	17,617	gil117922231
25	T	Ferredoxina proteína de unión Fe-S	19,503	gil83591658

7.3. Estudio a nivel genómico.

Los resultados obtenidos a partir de los estudios de proteómica indicaron que diferentes proteínas identificadas en este trabajo, mostraron similitud con las enzimas dioxigenasas. Para confirmar estos resultados, se realizaron estudios a nivel del genoma y transcriptoma, para ello se amplificaron los genes *bed* y *tod* (subunidad α), a partir de ADN genómico y ADNc del consorcio, cepa *FMB08*, *P. putida* F1 y *E. coli*. Cabe mencionar que estos genes están relacionados en el catabolismo del benceno y tolueno, respectivamente y los resultados confirmaron la expresión de ambos genes.

7.3.1. Amplificación de los genes *bed* y *tod*.

Se extrajo ADN genómico de la cepa *FMB08*, el consorcio, la cepa de referencia y de *E. coli* DH5 α , para amplificarles los genes *bed* y *tod*. Los resultados mostraron un amplicón de 1,400 pb que corresponde al gen *bed*, mientras que para el gen *tod* se obtuvo un producto de 1,353 pb. En ambos casos se amplificaron los genes a partir de los cultivos mencionados arriba, excepto en el caso de *E. coli* (Figura 22 A y B).

Cada uno de los amplicones (*bed* y *tod*) se extrajeron desde el gel de agarosa, se purificaron, se clonaron en el vector Topo TA y por último se secuenciaron. Las secuencias obtenidas se compararon con la secuencia ya reportada en el

GenBank; los genes *bed* de la cepa FMB08 y la cepa de referencia son similares el 98% y 99% respectivamente, al gen de referencia (*P. putida* F1- *bed*). Mientras que el gen *tod* de la cepa FMB08 y de la cepa de referencia son similares el 90% y 99% respectivamente, al gen de referencia (*P. putida* F1- *tod*) (Figura 23 a).

La traducción virtual del gen *tod* de la cepa FMB08, indicó que la proteína *tod* tiene varios cambios de aminoácidos en su secuencia. Estos cambios se encuentran específicamente en el sitio catalítico de la enzima. Al comparar la secuencia peptídica de *tod*, se observó que la proteína de la cepa FMB08 es el 95% similar a la proteína *tod* de *P. putida* F1, reportada por el GenBank (Figura 23 b).

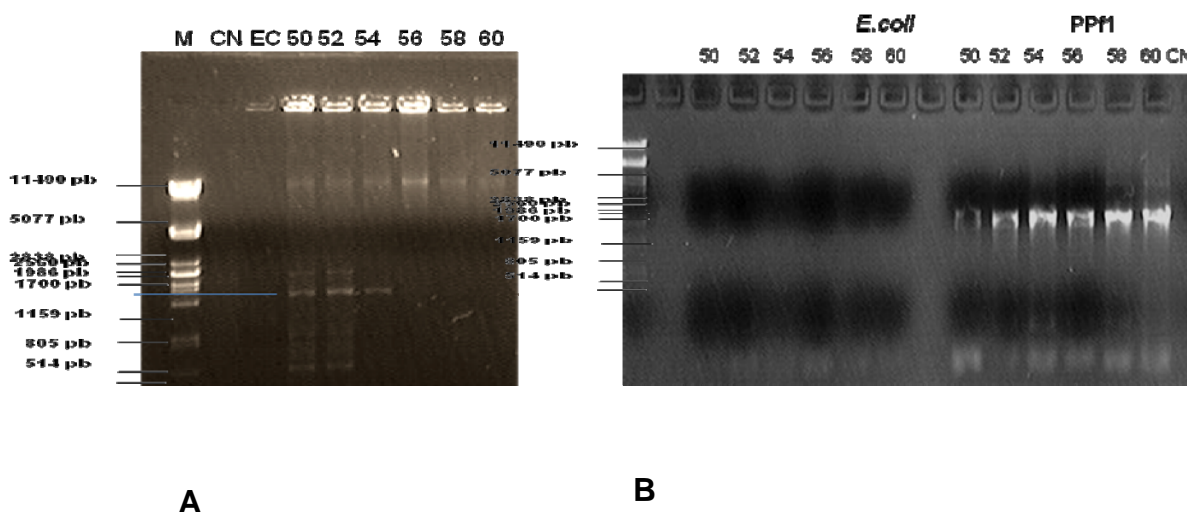


Figura 23. Amplificación de los genes *bed* y *tod*. A) La temperatura de anillamiento para el gen *bed* fue de 54°C y B) para el gen *tod* fue de 58 °C.

ring hydroxylating dioxygenase, alpha subunit

Score = 845 bits (457), Expect = 0.0
Identities = 588/649 (90%), Gaps = 17/649 (2%)
Strand=Plus/Plus

Query	19	CTGTAGACGTTGTTGCTGATCCGCCCGGGTAAACCGAGTCAGTTGTTGACGGTCTAGAT	78
Sbjct	3271822	CTGTAGACGTTGTTGCTGATCCGCCCGGGTAAACCGGGTC-GTTGTCGACGGTCTGG-T	3271879
Query	79	CCATGCTCATCTCGGTTTTGAAAGGGAGACTCCGCGTCTTGAGACCTCGCAGAATGAGCT	138
Sbjct	3271880	CCATGCTCATCTCGGCATTGAAAGGGCGCTCCGCGCCTTGTGGCCTCGCAGGATGTGCT	3271939
Query	139	GGATCATCGACCCAGTACTCACCGACGACCTGTTCTGAACACACGAACACTGCAGAGAATC	198
Sbjct	3271940	GGATC-TCGACCCAGTTCTCCCGTCTGCTCTGCTGAACACGCCA-C-CGGCAGAGAAGG	3271996
Query	199	TGATCAGTATCTGGTGCCGAAAATCTTATTTGAAAACGTGAG-AGACATCTAAAATAGAC	257
Sbjct	3271997	TGGCAGCGTCTGGGCGCGAACTCTTCTTATATCGTCAAGGAG-CATC-AGCATCGAC	3272054
Query	258	CATCGTAATACATCCATACCTCGACCTCGATCAGTCCCGACGACGGATGCCATGTCCGGA	317
Sbjct	3272055	CACCGTAA-ACGCCATACCTCGACCTCGTTCCG-CCCG-CG-CGGATGCCATGTCCGGA	3272110
Query	318	CCGTATTGATACCTGGGAGGAAGGAACACGTGGGGAAGACGGTCATGTGCTCGACCATGA	377
Sbjct	3272111	CCGTATTGATACCTGGGAGGAAGGAACACGTGGGGAAGACGGTCATGTGCTCGACCATGA	3272170
Query	378	GTTTCGAGCCGCGCTCCACGCTACCCAGACGTTCCGGCCGCTTTTCTCGACGCTGGGCCT	437
Sbjct	3272171	GTTTCGAGCCGCGCTCCACGCTACCCAGACGTTCCGGCCGCTTTTCTCGACGCTGGGCCT	3272229
Query	438	TCGGTCCAGTAGCTGGGTGACCTTTGGCCCCATGATGGCAAGCATCAGATTGGGGTCGCC	497
Sbjct	3272230	TCGGTCCAGTAGCTGG-TGACCTTTGGCCCCATGATGGCAAGCATCAGATTGGGGTCGCC	3272288
Query	498	CGACATAGAAGCCACTTCCATGTCCGCCCATGACGCACGGTACTGCTTGCCAACGTGTCG	557
Sbjct	3272289	-GACATAGAAGCCACTTCCATGTCCGCCCATGACGCACGGTACTGCTTGCCAACGTGTCG	3272347
Query	558	GCGGAGCAAGGTCGGCCATTTCAAGGACTTCTGGCAGGCCTGCCAGGATGCCAGACAGAT	617
Sbjct	3272348	GCGGAGCAAGGTCGGCCATTTCAAGGACTTCTGGCAGGCCTGCCAGGATGCCAGACAGAT	3272407
Query	618	GCGAGGTCGTCCCGGCATGGTACCATGTGCGCTGCAAACTGCTCTGCG	666
Sbjct	3272408	GCGAGGTCGTCCCGGCATGGTAC-ATGTCG-CTGCAAACTGCTCTGCG	3272454

```

tod      MNQTDTSPIRLRRSWNTSEIEALFDEHAGRIDPRIYTDEDLYQLELERVFARSWLLLGHE 60
FMB08    MNQTDTSPIRLRRSWNTSEIEPLFDEHAGRIDPRIYTDEDLYQLELERVFARSWLLLGHE 60
          ***** , *****

tod      TQIRKPGDYITTYMGEDPVVVVRQKDASIAVFLNQCRHRGMRICRADAGNAKAFTCSYHG 120
FMB08    TQIRKPGDYITTYMGEDPVVVVRQKDASIAVFLNQCRHRGMRICRADAGNAKAFTCSYHG 120
          *****

tod      WAYDTAGNLVNVPYEAESEFACLNKKEWSPLKARVETYKGLIFANWDENAVDLDTYLGEAK 180
FMB08    WAYDTAGNLVNVPYEAESEFACLNKKEWSPLKARVETYKGLIFANWDENAVDLDTYLGEAK 180
          *****

tod      FYMDHMLDRTEAGTEAIPGVQKWVPCNWKFAAEQFCSDMYHAGTTSHLGILAGLPEDL 240
FMB08    IYMDHMLDRTEPRTAIPGVQKWVPCNWKFAAEQFCSDIYHAGTTSHLGILAGLPEDL 240
          :***** , *****:*****

tod      EMADLAPPTVGKQYRASWGGHSGGFYVGDPNLMLAIMGPKVTSYWTEGPASEKAAERLGS 300
FMB08    EMADLAPPTVGKQYRASWGGHSGGFYVGDPNLRPAIMGPKVTSYWTEGPASEKAAERLGS 300
          *****

tod      VERGSKLMVEHMTVFPTCSFLPGINTVRTWHPRGPNEVEVWAFVVDADAPDDIKEEFRR 360
FMB08    VERGSKLMVEHMTVFPTCSFLPGINTVRTWHPRGPNEIEVWAFTEVDADAPDDIKEELRS 360
          *****:*****

tod      QTLRTFSAGGVFEQDDGENWVEIQHILRGHKARSRPFNAEMSMDQTVDNDPVYPGRISNN 420
FMB08    QTLSTFSAGGVFEQDDGENWVEIQHILRGHKTRSRPFNAEMSMDQTVDNDPVYPGRISNN 420
          *** *****:*****

tod      VYSEEARGLYAHWLRMMTSPDWDALKATR 450
FMB08    VYSEEARGLYAHWLRMMTSPDWDALKATR 450
          *****

```

Figura 24. Comparación de la secuencias nucleotídica y aminoacídica del gen *tod* de la cepa FMB08 versus la cepa *P. putida* F1. A) La secuencia nucleotídica del gen *tod* es el 90% similar el gen de referencia, B) mientras que le secuencia aminoacídicas es el 95 % a la secuencia de la proteína *tod* de referencia.

7.3.2. Transcripción Reversa acoplada a la Reacción en cadena de la Polimerasa (RT-PCR) de los genes *tod* y *bed*.

La expresión de estos genes se investigó en el consorcio y en la cepa FMB08 que crecieron sobre la mezcla de los BTEX y sobre cada uno de estos. Para este objetivo, las células se recolectaron durante la fase exponencial (24 h) y se aisló el ARN total. A partir de éste se llevó a cabo la RT-PCR de los genes *bed* α y *tod* α . En la Figura 24 se observan los resultados para el gen *tod* α que indicaron que este gen se expresó en la cepa FMB08 expuesta a la mezcla de los BTEX, tolueno, etilbenceno y xileno, mas no en presencia del benceno. Estos resultados también se observaron para el consorcio. Sin embargo, en la cepa de referencia, este gen solo se expresó cuando se expuso a los BTEX y tolueno. Para el caso del gen *bed* α , los resultados mostraron que este gen se expresó tanto en la cepa FMB08 como en el consorcio, expuestos a los BTEX y al benceno (datos no mostrados), los resultados se resumen en el Cuadro 12. Como control positivo se utilizó ARN total de extraído de la cepa de referencia expuesta a la mezcla de los BTEX y a cada uno de estos, mientras que para el negativo se utilizó ARN total de *E.coli* DH5 α . Como control interno se utilizó el ARN total tanto de la cepa de referencia como de *E.coli* DH5 α y se realizó una RT-PCR del gen 16S ribosomal.

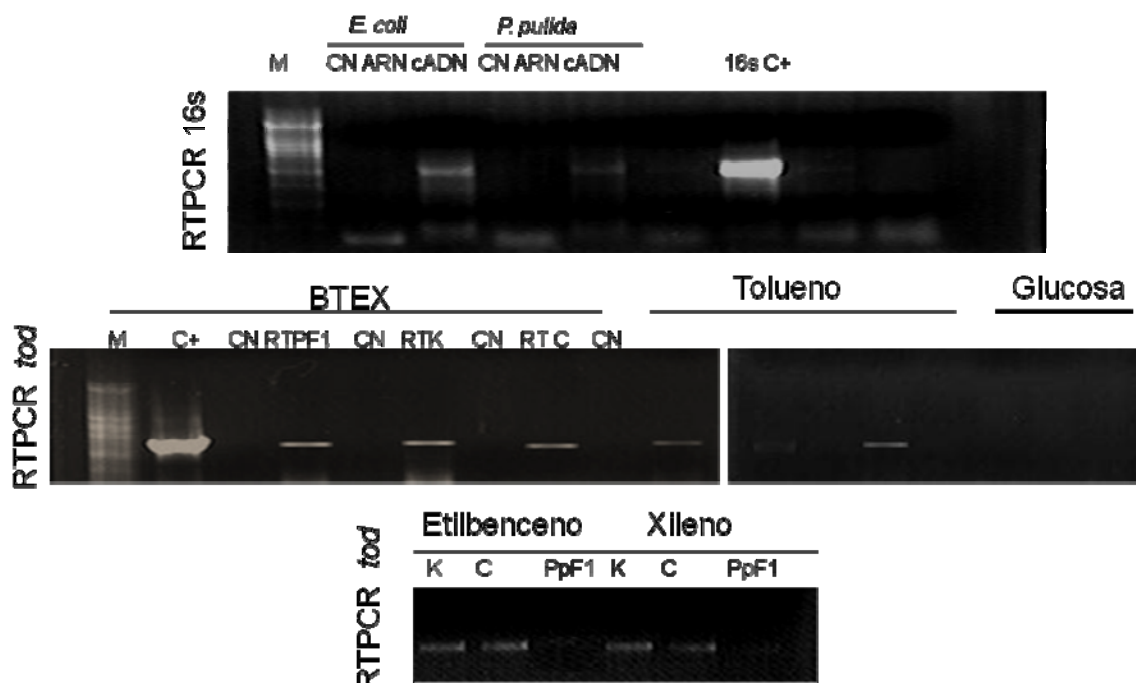


Figura 25. Análisis de la expresión génica de la cepa FMB08 y del consorcio expuestos a la mezcla de los BTEX y a cada uno de estos compuestos. C+ = (control positivo, CN = control negativo (RNA total), K = consorcio, C = cepa FMB08 y PpF1 = *Pseudomonas putida* F1 (ATCC 700007).

Cuadro 12. Resumen de los resultados obtenidos a partir de la RT-PCR de los genes *bed* y *tod*.

Gen	Fuente de inóculo	BTEX	B	T	E	X	Glucosa
Gen <i>tod</i>	Cepa FMB08	+	-	+	+	+	-
	Consorcio	+	-	+	+	+	-
	<i>Pseudomonas putida</i> F1	+	-	+	-	-	-
	<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-
Gen <i>bed</i>	Cepa FMB08	+	+	-	-	-	-
	Consorcio	+	+	-	-	-	-
	<i>Pseudomonas putida</i> F1	+	+	-	-	-	-
	<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-

CAPÍTULO VIII.

DISCUSIÓN

8.1. Cinéticas de biodegradación.

En el presente estudio se caracterizó a nivel microbiológico, bioquímico, genético y proteómico, un consorcio aclimatado a gasolina (capaz de remover casi el 100 % de los BTEX), así como cepas aisladas e identificadas a partir de éste (capaces de remover más del 85 % de estos compuestos). El consorcio estudiado en este trabajo registró mayor porcentaje de remoción de los BTEX que la cepa FMB08 y que la cepa *P. putida* cepa F1 (Figura 16). Los resultados sugieren que las bacterias presentes en el consorcio compiten por el sustrato del medio y que existen asociaciones sintróficas que les pudiera permitir cierta protección contra condiciones adversas como el pH, temperatura y toxicidad de los compuestos; además de la formación de productos secundarios que eventualmente pudieran resultar tóxicos para algunas bacterias. Por su parte, la FMB08, registró mejor nivel de remoción de los BTEX que las nueve cepas restantes (Figura 17). Sin embargo, al exponerla a los BTEX se limita su capacidad de remoción debido a la toxicidad de estos. En un estudio previo, Acuña-Askar y cols. (2006a) reportaron la remoción por un consorcio aclimatado a diesel en un intervalo de 64.8 – 98.9% para benceno, tolueno y etilbenceno, mientras que el *o*-xileno y el éter metil ter-butílico (EMTB) fueron removidos en el intervalo de 18.7 – 40% y 7.2 -10.3%, respectivamente. Mientras que Kim y cols. (2004) reportaron que *Rhodococcus* sp. DK17 removió el *o*-xileno, benceno, tolueno, etilbenceno e isopropilbenceno en

una concentración final de 0.1 % v/v. Lee y Lee (2001) reportaron la completa remoción bajo condiciones aerobias de los BTEX [3 mg/L] oX [1.5mg/L], excepto para los isómeros *m* y *p* del xileno.

La remoción de cada uno de los BTEX por el consorcio registró el siguiente orden en cuanto a eficiencia: etilbenceno, tolueno, benceno y xilenos; mientras que la cepa removió primero el etilbenceno, seguido por el benceno, tolueno y xilenos. Al respecto, Acuña-Askar y cols. (2003) reportaron que el etilbenceno fue el compuesto que registró mayor porcentaje de remoción, por un consorcio aclimatado a gasolina, seguido por el tolueno, *o*-xileno y por último el benceno. Por su parte, Deep y Álvarez-Cohen (1999) indicaron que la degradación de la mezcla de los BTEX difiere significativamente en comparación con la degradación de cada uno de ellos.

8.2. Estudio genómico del gen ADNr 16s.

La amplificación del gen ADNr 16S y su secuenciación permitió identificar bacterias que forman parte del consorcio. La comparación entre las secuencias obtenidas en este trabajo y la secuencia de los genes ya reportados en el GenBank, mostraron cierta similitud con bacterias catalogadas por su capacidad para remover los BTEX (*Alcaligenes degradans*, *Alcanivorax* sp., *Azoarcus denitrificans*, *Bacillus* sp., *B. cepacia*, *Burkholderia* sp., *Escherichia* sp., *Pseudomonas* sp., *Ralstonia* sp., *Rhodococcus* sp., y *Shewanella* sp., entre otras).

La cepa FMB08 se identificó tanto por métodos microbiológicos como por métodos moleculares. Los resultados revelaron ésta presentó cierta similitud con bacterias del género *Pseudomonas*. En un estudio reciente se analizó por medio de bibliotecas genómicas (ARNr 16s) un suelo contaminado con petróleo (Carson city, Michigan). En ese estudio, Allen y cols. (2007) detectaron la presencia de *Methylocapsa acidiphila*, *Brachymonas petroleovorans* y *Sphingomonas aromaticivorans*, entre otras. También Kasai y cols. (2005) analizaron por clonación y secuenciación de los genes ADNr 16s amplificados por medio de la PCR, una población microbiana de un suelo contaminado, sus resultados indicaron la presencia de *B. cepacia*, *Azoarcus denitrificans*, *Alcaligenes degradans*, *E. coli*, *Syntrophus aciditrophicus*, *Geobacter metallireducens*, *B. subtilis* y *R. rhodochocus*, entre otras. Sin embargo, Muyzer y cols. (1993) indicaron que esta tecnología presentaba algunas desventajas, es decir, sólo da información cualitativa de la composición de una población microbiana y que las especies que se encuentran en mínimas cantidades no son detectadas. Pero, Greene y cols. (2000) indicaron que por medio de estas herramientas moleculares se pueden monitorear los procesos metabólicos de las comunidades microbianas en el medio ambiente.

8.3. Estudio a nivel proteómico.

El estudio proteómico empleado en el presente estudio permitió distinguir varias proteínas inducidas por los BTEX.

Las proteínas que se expresaron diferencialmente en las condiciones estudiadas, en el presente trabajo oscilan entre 20 kDa y 60 kDa. Si se compara la cinética de remoción de los BTEX y las proteínas expresadas por las células responsables de la biodegradación, éstas pudieran estar inducidas y relacionadas con enzimas que participan en el metabolismo de los BTEX. Por su parte, Peters y cols. (2007) realizaron un estudio proteómico comparando las proteínas expresadas por *Geobacter metallireducens* en presencia de diferentes compuestos (*p*-cresol, *p*-hidroxibenzoato, benzoato y acetato). En las células que crecieron en *p*-cresol se observaron dos bandas proteicas de 57 y 60 kDa, sugiriendo que esas proteínas juegan un rol importante en el metabolismo del *p*-cresol. Así mismo, Kim y cols. (2004) identificaron enzimas relacionadas en la degradación del *o*-xileno, comparando el patrón proteico entre las cepas DK176 y DK17, que crecieron sobre glucosa y el *o*-xileno, respectivamente; varias bandas proteicas diferentes se observaron en los extractos de la cepa DK17, pero no en los extractos de las células DK176. Asimismo, indicaron que la subunidad α de las enzimas dioxigenasas tiene un peso molecular de ~50kDa, mientras que la subunidad β tiene un peso molecular de ~25kDa. Además, Maeda y cols. (2001) reportaron que el peso molecular de la enzima bifenil-dioxigenasa para la subunidad α fue de 50 kDa y para la subunidad β fue de 23 kDa. También estimaron el peso molecular de la proteína tolueno dioxigenasa $\alpha\beta$ en 52.5 y 21.5 kDa, respectivamente. Estos mismos autores reportaron el peso molecular de una proteína híbrida construida con la subunidad α de la tolueno dioxigenasa (52.5 kDa) y la subunidad β de la enzima bifenil dioxigenasa (23 kDa). En uno de los primeros estudios sobre el

tema, Irie y cols. (1982) reportaron la obtención de cuatro productos proteicos con un peso molecular de P1 = 52, P2 = 22, P3 = 16 y P4 = 43 kDa y establecieron que los del peso molecular de P1 y P2 fueron similares al de la porción terminal de las dioxigenasas. Así como los del peso molecular P3 parecido al de las ferredoxinas, mientras que los del peso molecular de P4 al de la proteína NADH-ferrredoxina reductasa.

8.4. Análisis de las proteínas por LC/MS/MS.

Las huellas proteicas obtenidas a partir de los péptidos analizados por LC-MS/MS, mostraron cierta similitud con algunas proteínas que están relacionadas con el metabolismo de los hidrocarburos aromáticos/alifáticos. De acuerdo a esto se analizó la expresión de las proteínas siguiendo las posibles rutas catabólicas ya descritas para otros microorganismos relacionados con la biodegradación de los BTEX.

8.4.1. Proteínas de membrana.

Una de las proteínas transmembrana identificada tiene cierta similitud con la tioredoxina-disulfuro reductasa (38.5 kDa), la cual participa como donador de electrones. Otra de las proteínas identificadas corresponde aparentemente a la formato deshidrogenasa (21.7 kDa). Al respecto, Kane y cols., 2007; Jormakka y cols., 2002; reportaron que en *E. coli* esta enzima forma parte de un complejo de proteínas de membrana en donde utilizan el formato como donador de electrones en la reducción de nitratos a nitritos. También, se identificó una proteína similar a

la LrgA (18.8 kDa), perteneciente a proteínas transmembrana. Este tipo de proteínas han sido descritas en *Rhodopseudomonas palustris* (Copeland y cols., 2006). También se identificaron otras proteínas con similitud a: los sistemas de transporte ABC (59 kDa), proteína de membrana F (40 kDa), Porina (36 kDa), permeasa (21 kDa) y proteínas de membrana II (25 kDa). Peters y cols. (2007) y Sabirova y cols. (2007), en sus respectivos trabajos, identificaron diferentes proteínas como de transporte ABC (41 – 87 kDa), proteína de membrana (41 kDa), una permeasa de 45 (kDa) y una porina de 36 kDa.

8.4.2. Proteínas implicadas en la oxidación del anillo aromático.

Durante la degradación de los compuestos aromáticos, la hidroxilación inicial la catalizan las enzimas dioxigenasas. Posteriormente, se producen alcoholes y aldehídos y finalmente se lleva a cabo una deshidrogenación que convierte los alcoholes en catecol. Las enzimas que realizan estas funciones contienen un sistema de tres componentes: a) flavoproteína reductasa, b) ferredoxina y c) ISP (Bagneris y cols., 2005; Baldwin y cols., 2005; Witzig y cols., 2006). En la presente investigación, se identificaron algunas proteínas que son similares a las enzimas dioxigenasas, siendo la: a) Hidrogenasa Fe-S (19.3 kDa), b) Ferredoxina-dominio de unión Fe-S (12.4 kDa) y c) NADH deshidrogenasa (18.3 kDa). Al respecto, Patrauchan y cols. (2008) identificaron las enzimas bifenil dioxigenasas y etilbenceno dioxigenasas como responsables del ataque inicial al anillo aromático. También, se identificó una proteína parecida al citocromo C (35.5 kDa), que

podría estar relacionada con el ataque inicial a los BTEX. Mientras que Peters y cols. (2007) identificaron la enzima *p*-cresol metilhidroxilasa-FAD y la aldehído deshidrogenasa como responsables de oxidar el *p*-cresol. Además, reportaron la expresión de los genes *pcmE* y *pcmF*, cuyos productos son las proteínas Rieske [2Fe-2S] (18,459 Da) y citocromo C (35,417Da), respectivamente. Asimismo, Sabirova y cols. (2006) encontraron proteínas inducidas por los alcanos como citocromo p450 (monooxigenasa), alcohol deshidrogenasa, ferredoxina y una oxidoreductasa. Sin embargo, existen algunos reportes que indican que los cluster de [2Fe-2S] no están relacionados directamente en la transformación catalítica del sustrato, pero sí en proporcionar electrones al sitio activo (Tan y Mason, 1990; Tan y cols., 1993; Tang y Chong, 1994; Fong y cols., 1996; Coper y cols., 2002). Por su parte, Fong y cols. (1996) reportaron la presencia de una proteína de 39 kDa identificada como una enzima deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ que es requerida para convertir el benceno en catecol. Además, se identificó una proteína similar a la TodF Hidratasa, que es un componente de la enzima tolueno dioxigenasa, (23.9 kDa). Anteriormente, Zylstra y Gibson (1989) reportaron que esta enzima participa durante la degradación del tolueno. Por último, se identificó la proteína de transporte de electrones *ysaA*, Chen y cols. (2006) indicaron que esta proteína está relacionada con las proteínas 4Fe-4S que pertenecen a las oxidoreductasas. Además, proteínas similares fueron reportadas por Patrauchan y cols. (2008) y Sabirova y cols. (2007). Otras proteínas relacionadas con la oxidación inicial de los compuestos aromáticos también han sido reportadas. Peters y cols. (2007) identificaron otras proteínas por medio LC-MS/MS, una

ligada a FAD (59.3 kDa) y una oxidasa (57 kDa), a partir de extractos crudos de *G. metallireducens* relacionadas en el metabolismo inicial de *p*-cresol.

8.4.3. Proteínas implicadas en la ruptura del anillo aromático.

Se Identificó una enzima parecida a la enzima catecol 2,3 dioxigenasa (32.2 kDa), la cual participa en la ruptura del anillo aromático (Kasak y cols., 1993; Cerdan y cols., 1994). La enzima catecol dioxigenasa rompe el anillo aromático del catecol (Figura 8), permitiendo la formación de cetoadipato enol-lactona, el cual es degradado por la ruta de la beta-oxidación (Gibson y Subramanian, 1984; Orston, 1986; Fong y cols., 1996; Patrucha y cols., 2008). En nuestro estudio identificamos una proteína similar a un regulador transcripcional conocido como Lys R (33.6 kDa), los reguladores transcripcionales LysR, están relacionados con la activación de los genes que expresan la catecol dioxigenasa y tiene un peso molecular entre 32 y 37 kDa (Troppel y van der Mer, 2004). Al respecto, Patrucha y cols. (2008) estudiaron el rol catabólico de las dioxigenasas en el metabolismo del estireno y benceno en *Rhodococcus jostii* RHA1. En sus resultados identificaron las proteínas como etilbenceno dioxigenasas, benceno dioxigenasas y catecol dioxigenasas. Además, a partir del consorcio se identificó una proteína similar a la proteína 4 oxalocronato descarboxilasa (28.2 kDa) que participa en la degradación del benzoato, tolueno y xileno. Este dato sugiere la versatilidad de las bacterias presentes en el consorcio para metabolizar los compuestos aromáticos.

8.4.4. Proteínas que participan en el catabolismo de los ácidos grasos.

Después de la ruptura del catecol, se inicia la formación de ácidos grasos (Orston 1986; Fong y cols., 1996; Patrucha y cols., 2008). En el presente estudio solo se identificó una proteína relacionada con la transformación de los ácidos grasos, la cual tiene similitud con la polihidroxialconato despolimerasa (46.9 kDa). Shöber y cols. (2000) indicaron que es la responsable de degradar ácidos grasos orgánicos como el acetato, butirato y succinato. Conjuntamente, Sabirova y cols. (2006) indicaron que esta enzima se expresó sólo en las células que se expusieron a los alcanos. Por último, la bacteria debe de generar metabolitos precursores desde el acetil CoA, para generar energía y crecimiento celular. En este trabajo se identificó una enzima relacionada al ciclo de los ácidos tricarbónicos (CAT) que mostró cierta similitud a la glioxilasa (32.2 kDa). Sabirova y cols. (2006) indicaron que durante el crecimiento de *A. borkumnesis* sobre los alcanos, se explotó la vía del glioxilato, para generar fosfoenolpiruvato.

Otras proteínas que se identificaron en este trabajo fueron una proteína relacionada con el canal flagelar, Mot/TolQ/ExbB (19.8 kDa), así como una flagelina (57.9 kDa). También se identificó una proteína conocida como Insb que pertenece a un transposón.

8.5. Análisis genómico de los genes *bed* y *tod*.

Después de demostrar con los estudios proteicos la presencia de proteínas similares a las enzimas claves en el catabolismo de los BTEX, se amplificaron los genes catabólicos *bed* y *tod*. La secuencia obtenida a partir del análisis del gen

bed indicó que esta es el 98% similar al gen de referencia. Sin embargo, al obtener la secuencia nucleotídica de *tod*, esta mostró una similitud del 90% con respecto al gen *tod* de *Pseudomonas putida* F1. A partir del análisis *in silico* de la secuencia nucleotídica se dedujo un polipéptido de 451 aminoácidos, similar a la proteína *tod* de *P. putida* F1. El alineamiento de ambas secuencias aminoacídicas indicó un 95% de similitud entre ellas. La diferencia del 5% son sustituciones en estos aminoácidos del sitio catalítico de la enzima, puede estar relacionado con el aumento del potencial catabólico de la cepa FMB08. Al respecto, Witzig y cols., (2006) reportaron que ligeras diferencias en la secuencia de aminoácidos del ISP α se asocian con cambios dramáticos en la especificidad del sustrato. Por su parte, Bagnéris y cols. (2005) demostraron que la sustitución de los aminoácidos (I301V, T305S, I307L y L309V) en la región catalítica de la enzima *tod* aumentó la preferencia por el etilbenceno. Además, Tarasev y cols. (2007), indicaron que muchas de las enzimas dioxigenasas son muy similares en muchos aspectos, pero difieren en su estructura y en el mecanismo de catálisis. Sin embargo, en otro estudio, Jiang y cols. (1996) reportaron que la *TodC1* (ISP alfa) tiene aminoácidos conservados en las siguientes posiciones Glu-214, Asp-219, Tyr-221, His-222 e His 228 y que mutaciones en estos sitios reprimieron la actividad enzimática de la *TodC1*.

Los estudios génicos realizados en el presente trabajo, indicaron que el gen *tod* se expresó tanto en el consorcio como en la cepa FMB08 expuestas a los BTEX, T, E y X. Sin embargo, el gen *tod* de la cepa de referencia se expresó sólo en presencia de los BTEX y T. Estos datos sugieren la presencia de un gen

catabólico más eficiente, sin embargo, esto no significa una proteína catabólica alternativa. Estudios previos han reportado resultados similares, Patrauchan y cols. (2008) amplificaron por RT-PCR los genes *Etb* y *Bph*, cuyos productos participan en el metabolismo del etilbenceno - benceno y bifenil, respectivamente. También, Peters y col. (2007) por medio de la RT-PCR identificaron y determinaron que los genes *Pcml* y *PcmJ*, entre otros, participan en la biodegradación del *p*-cresol. Mientras que Kim y cols. (2004) reportaron la identificación de una enzima conocida como *o*-xileno dioxigenasa capaz de metabolizar el tolueno, etilbenceno y *o*-xileno, que se aisló a partir de *Rhodococcus* sp. cepa DK17. Por su parte, Witzig y cols. (2006) indicaron que varios estudios en cultivos independientes sugieren que abundantes y distintas secuencias de genes con función desconocida existen en la naturaleza.

CAPITULO IX.

CONCLUSIÓN

El consorcio registró alta eficiencia de remoción de los BTEX. Por su parte, la cepa FMB08 registró también su habilidad para crecer en presencia de estos compuestos. A partir del consorcio, se identificaron diferentes bacterias mediante la amplificación y secuenciación del gen ADNr 16s (*Pseudomonas* sp., *Escherichia* sp., *Shewanella* sp., *Burkholderia* sp., *Alcanivorax* sp., *Rhodococcus* sp., *Bacillus* sp. y *Ralstonia* sp.), estas bacterias previamente han sido descritas por su capacidad de degradación de hidrocarburos aromáticos. La cepa FMB08, aislada a partir del consorcio, se identificó tanto por pruebas bioquímicas, como por los análisis del gen ADNr16s. Los resultados indicaron que esta cepa es similar a las bacterias del género *Pseudomonas*. El análisis comparativo del perfil proteico nos permitió identificar proteínas que se expresan o aumentan su expresión en presencia de los BTEX. Las secuencias proteicas analizadas por el programa MASCOT, indicaron que éstas tienen similitud con las proteínas que participan en la biodegradación de los BTEX. Se identificaron los genes *bed* y *tod* que se expresaron en presencia de los BTEX. La secuencia del gen *tod* fue 90% similar a la secuencia de referencia. La proteína *tod* de FMB08 fue 95% similar a la enzima *tod* de la cepa de referencia. Se observaron sustituciones aminoacídicas en la región catalítica de la enzima *tod* de la cepa FMB08. El gen *bed* analizado sólo se expresó en el consorcio y cepa que se expusieron a los BTEX y B. La secuencia nucleotídica tiene un 98% de similitud con la cepa de referencia. El análisis de la

secuencia aminoacídica de bed fue similar en un 100% a la enzima bed de la cepa de referencia.

CAPITULO X
RECOMENDACIONES

CAPITULO XI

BIBLIOGRAFÍA

1. Acuna-Askar, K. (1998). Biodegradation of methyl tert-butyl ether (MTBE) with emphasis on the bioremediation of contaminated sites. Sc.D. dissertation. Tulane University, New Orleans, LA.
2. Acuna-Askar, K., Englande, A.J., Jr., Hu, C. y Jin, G. (2000). Methyl tertiary-butyl ether (MTBE) biodegradation in batch and continuous upflow fixed-biofilm reactors. *Wat. Sci. Tech.* 42(5-6), 153-161.
3. Acuna-Askar, K., Englande, A. J. Jr., Alfaro-Rodriguez, J.F., Rodriguez-Fuentes, H. De Lira Reyes, G., Marmolejo, J.G., Chavez-Gomez, B. y Nevarez-Moorillon, G.V. (2003a). *Evaluation of BTEX biodegradation in liquid and vapor phase in soil slurries*. In: CONSOIL 2003, Remediation Technologies. G.J. Annokkée, F. Arendt, O. Uhlmann (eds.). Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Publishers. Alemania. pp. 2284-2290.
4. Acuna-Askar, K., Englande, A.J., Jr., Ramírez-Medrano, A., Coronado-Guardiola, J.E. y Chávez-Gomez, B. (2003b). *Evaluation of Biomass Production in Unleaded Gasoline and BTEX-fed Batch Reactors*. *Wat. Sci. Tech.* 48(8),127-133.
5. Acuna-Askar, K., Villarreal-Chiu, J.F., Gracia-Lozano, M.V., Garza-Gonzalez, M.T., Chavez-Gomez, B., Rodriguez-Sanchez, I.P. and Barrera-Saldana, H.A. (2004a). *BTE-oX biodegradation kinetics with MTBE through bioaugmentation*. *Wat. Sci. Tech.* 50(5), 85-92.
6. Acuna-Askar, K., G. Moeller-Chavez, H. Rodriguez-Fuentes, G.De Lira-Reyes, J. A. Vidales-Contreras, J. G. Marmolejo and B. Chavez-Gomez. (2004b). BTE-oX biodegradation by biomass acclimated at two different BTEX concentrations. In: Water Environmental Management Series. *Environmental Biotechnology: Advancement in Water and Wastewater Application in the Tropics*. Z. Ujang y M. Henze (eds.). IWA Publishing, Londres. pp 77-84.
7. Acuna-Askar, K., Garcia-Gomez, N.A., Garza Gonzalez, M.T., Rodriguez-Fuentes, H., Vidales-Contreras, J. A., Chavez-Gomez, B., Barrera-Saldana, H.A. (2006a). *Biodegradation of BTEX, MTBE and Ethanol in a continuous flow biofilm reactor*. Proceedings of the VI International Water Association Conference on Biofilm Systems. Amsterdam, Países Bajos, 24-27 de septiembre.
8. Acuna-Askar, K., Gomez-Ibarra C.D., Tijerina-Menchaca, R., Garza-Gonzalez, M.T., and H.A. Barrera-Saldana. (2007). *MTBE biodegradation kinetic rates with and without cosubstrates at short hydraulic retention times*. Proceedings of the 3rd European Conference on MTBE and other fuel oxygenates. Amberes, Bélgica, 7-8 de junio de 2007.
9. Aranda-Olmedo I., J. L. Ramos y S. Marqués. 2005. Integration of Signals through Crc and PtsN in Catabolite Repression of *Pseudomonas putida* TOL Plasmid pWW0. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(8):4191-4198.
10. Allen, J-P., E-A. Atekwana, E-A. Atekwana, J-W. Duris, D-D. Werkema and S. Roosbach. 2007. Microbial community structure in petroleum contaminated sediments corresponds to geophysical signatures. *Appl Environ Microbiol* 73(9):2860-2870.
11. Axcell BC, Geary PJ (1975) Purification and some properties of a soluble benzene-oxidizing system from a strain of *Pseudomonas*. *Biochem J* 146:173-183.
12. Baldwin, B. R., C. H. Nakatsu, and L. Nies. 2003. Detection and enumeration of aromatic oxygenase genes by multiplex and real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:3350-3358.
13. Bagnéris C, Cammack R, Mason JR (2005) Subtle difference between benzene and toluene dioxygenases of *Pseudomonas putida*. *Appl Environ Microbiol* 71(3),1570-1580.
14. Battersby N. S. y V. Wilson. 1989. Survey of the anaerobic biodegradation potential of organic chemicals in digesting sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:433-439.
15. Boll M., G. Fuchs y J. Heider. 2002. Anaerobic oxidation of aromatic compounds and hydrocarbons. *Current Opinion in Chemical Biology*, 6:604-611.
16. Breinig S., E. Schiltz y G. Fuchs. 2000. Genes involved in anaerobic metabolism of phenol in the bacterium *Thauera aromatica*. *Journal of Bacteriology*, 182: 5849-5863.

17. Buchan, A., L. S. Collier, E. L. Neidle y M. A. Moran. 2000. Key aromatic-ring-cleaving enzyme, protocatechuate 3,4 dioxigenase, in the ecologically important marine *Roseobacter* lineage. *Applied and Environmental Microbiology*, 66:4662-4672.
18. Burland S. M. y E. Edwards. 1999. Anaerobic benzene biodegradation linked to nitrate reduction. *Applied and Environmental Microbiology*, 65:529-533.
19. Cerdan. P., A. Wasserfallen, M. Rekik, K.N. Timmis, S. Haramaya. 1994. Substrate specificity of catechol 2,3-Dioxygenase encoded by TOL Plasmid pVWVO of *Pseudomonas putida* and its relationship to cell growth. *J. Bacteriol.* 17(19): 6074-6081.
20. Chakraborty R. y J. D. Coates. 2004. Anaerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64:437-446.
21. Cooper, R. A., and M. A. Skinner. 1980. Catabolism of 3- and 4-hydroxyphenylacetate by the 3,4-dihydroxyphenylacetate pathway in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 143:302-306.
22. Corkery, D. M., K. E. O'Connor, C. M. Buckley, and A. D. W. Dobson. 1994. Ethylbenzene degradation by *Pseudomonas fluorescens* strain CA-4. *FEMS Microbiol. Lett.* 124:23-28.
23. Cowles, C. E., N. N. Nichols, and C. S. Harwood. 2000. BenR, a XylS homologue, regulates three different pathways of aromatic acid degradation in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 182:6339-6346.
24. Deeb RA, Alvarez-Cohen L (2000) Aerobic biotransformation of gasoline aromatics in multicomponent mixtures. *Bioremed J* 4(2):171-179.
25. Demanèche S, Meyer C, Micoud J, Louwagie M, Willison JC, Jouanneau Y (2004) Identification and functional analysis of two aromatic ring-hydroxylating dioxygenases from a *Sphingomonas* strain degrading various polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(11) 6714-6725.
26. Díaz E., A. Fernández, M.A. Prieto, J.L. García. 2001. Biodegradation of aromatic compounds by *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65(4):523-569.
27. Eglund P. G. y C. S. Harwood 1999. BadR a new MarR family member regulates anaerobic benzoate degradation by *Rhodopseudomonas palustris* in concert with AadR, an Fnr family member. *Journal of Bacteriology*, 181:2102-2109.
28. Evans W. C. y G. Fuchs. 1988. Anaerobic degradation of aromatic compounds. *Annual Review of Microbiology*, 42:289-317.
29. Fong KP, Goh CB, Tan HM (1996) Characterization and expression of the plasmid-borne *bedD* gene from *Pseudomonas putida* ML2, which codes for a NAD₁-dependent cis-benzene dihydrodiol dehydrogenase. *J Bacteriol* 178(19):5592-5601.
30. Fries M. R., J. Zhou, J. Chee-Sanford y J. M. Tiedje. 1994. Isolation, characterization, and distribution of denitrifying toluene degraders from a variety of habitats. *Applied and Environmental Microbiology*, 60:2802-2810.
31. Geary, P. J., J. R. Mason, and C. L. Joannou. 1990. Benzene dioxygenase from *Pseudomonas putida* (NCIB 12190). *Methods Enzymol.* 188:52-60.
32. Gibson DT, Mahadevan V, Jerina DM, Yogi H, Yeh HJ: Oxidation of the carcinogens benzo[a]pyrene and benzo[a]anthracene to dihydrodiols by a bacterium. *Science* 1975, 189(4199):295-297.
33. Gibson, D. T., and V. Subramanian. 1984. Microbial degradation of aromatic hydrocarbons, p. 181-252. *In* D. T. Gibson (ed.), *Microbial degradation of organic compounds*. Marcel Dekker, New York.
34. González-Pérez, M.M., J. L. Ramos, y S. Marqués. Cellular XylS Levels Are a Function of Transcription of *xyIS* from Two Independent Promoters and the Differential Efficiency of Translation of the Two mRNAs. *J. Bacteriol.* 186(6): 1898-1901.
35. Grbic-Galic D. y T. M. Vogel. 1987. Transformation of toluene and benzene by mixed methanogenic cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 53:254-260.
36. Greene, E.A., J.G. Kay, K. Jaber, L.G. Stehmeier, G. Voordouv. 2000. Composition of soil microbial communities enriched on a mixture of aromatic hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(12): 5282-5289.
37. Grimberg, S.J., Stringfellow, W.T. y Aitken, M.D. (1996). Quantifying the biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas Stutzeri* P 16 in the presence of a nonionic surfactant. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(7), 2387-2392.

38. Harayama, S., M. Rejik, and K. N. Timmis. 1986. Genetic analysis of a relaxed substrate specificity aromatic ring dioxygenase, toluate 1,2-dioxygenase, encoded by TOL plasmid pWWO of *Pseudomonas putida*. *Mol. Gen. Genet.* 202:226–234.
39. Harayama, S., and K. N. Timmis. 1989. Catabolism of aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas*, p. 151–174. *In* D. A. Hopwood and K. Chater (ed.), *Genetics of bacterial diversity*. Academic Press, Inc., New York, N.Y.
40. Harwood C. S. y J. Gibson. 1997. Shedding light on anaerobic benzene ring degradation: a process unique to prokaryotes? *Journal of Bacteriology*, 179:301-309.
41. Harwood C.S. y R.E. Parales. 1996. The β -ketoacid pathway and the biology of self-identity. *Ann. Rev. Microbiol.* 50:553-590.
42. Heinaru E., J. Truu, U. Stottmeister y A. Heinaru. 2000. Three types of phenol and *p*-cresol catabolism in phenol and *p*-cresol-degrading bacteria isolated from river water continuously polluted with phenolic compounds. *FEMS Microbiology Ecology*, 31:195-205.
43. Hendrickx, B., H. Junca, J. Vosahlova, A. Lindner, I. Ruegg, M. Bucheli-Witschel, F. Faber, T. Egli, M. Mau, M. Schlomann, M. Brennerova, V. Brenner, D. H. Pieper, E. M. Top, W. Dejonghe, L. Bastiaens, D. Springael. 2006. Alternative primer sets for PCR detection of genotypes involved in bacterial aerobic BTEX degradation: Distribution of the genes in BTEX degrading isolates and in subsurface soils of a BTEX contaminated industrial site. *J. Microbiol. Meth.* 64:250– 265.
44. Herman, D.C., Zhang, Y. y Miller, R.M. (1997). Rhamnolipid (biosurfactant) effects on cell aggregation and biodegradation of residual hexadecane under saturated flow conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(9), 3622-3627.
45. Hu, C., Acuna-Askar, K., Englande, A.J., Jr. (2004). *Bioremediation of methyl tertiary-butyl ether (MTBE) by innovative biofilter*. *Wat. Sci. Tech.* 49(1), 87-94.
46. INEGI. (2002). *Estadísticas del Medio Ambiente de la Zona Metropolitana de Monterrey 2001*, México: Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática.
47. Inouye, S., A. Nakazawa, and T. Nakazawa. 1981. Molecular cloning of gene *xyIS* of the TOL plasmid: evidence for positive regulation of the *xyIDEGF* operon by *xyIS*. *J. Bacteriol.* 148:413–418.
48. Irie S, Doi S, Yorifuji T, Takagi M, Yano K (1987) Nucleotide sequencing and characterization of the genes encoding benzene oxidation enzymes of *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* 169(11):5174-5179.
49. Jiang, H. Y., R. E. Parales, N. A. Lynch, and D. T. Gibson. 1996. Site-directed mutagenesis of conserved amino acids in the alpha subunit of toluene dioxygenase: potential mononuclear non-heme iron coordination sites. *J. Bacteriol.* 178:3133–3139.
50. Junca, H. y D. H. Pieper. 2003. Amplified functional DNA restriction to determine catechol 2,3 dioxygenases gene diversity in soil bacteria. *J. Microbiol. Methods.* 55:607-708.
51. Kasai, Y., K. Shindo, S. Harayama, y N. Misawa. 2003. Molecular characterization and substrate preference of a polycyclic aromatic hydrocarbon dioxygenase from *Cycloclasticus* sp. Strain A5. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(11):6688-6697.
52. Kasak. L., R. Horak, A. Nurk, K. Talvik, M. Kivisaar. 1993. Regulation of catechol 1,2 dioxygenases and phenol monooxygenases encoding pheBA operon in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 175(24):8038-8042.
53. Kim D, Kim Y, Jung JW, Zylstra JG, Kim YM, Kim SK, Kim E (2003) Regioselective oxidation of xylene isomers by *Rhodococcus* sp. strain DK17. *FEMS Microbiol Lett.* 223:211–214.
54. Kim D, Chae JC, Zylstra GJ, Kim YS, Kim SK, Nam MH, Kim YM, Kim E (2004) Identification of a novel dioxygenase involved in metabolism of *o*-xylene, toluene, and ethylbenzene by *Rhodococcus* sp. Strain DK17. *Appl Environ Microbiol* 70 (12): 7086-7092.
55. Kleerebezem R., L. W. H. Pol y G Lettinga. 1999. Anaerobic degradation of phthalate isomers by methanogenic consortia. *Applied and Environmental Microbiology*, 65:1152-1160.

56. Knight V. K., L. J. Kerkhof y M. M. Häggblom. (1999). Community analyses of sulfidogenic 2-bromophenol-dehalogenating and phenol-degrading microbial consortia, FEMS Microbiology Ecology, 29, 137-147.
57. Kumar-Jain R, Kapur M, Labana1 S, Lal B, Sarma PM, Bhattacharya D, Thakur IS (2005) Microbial diversity: Application of microorganisms for the biodegradation of xenobiotics. Curr Sci 89(1): 101-112.
58. Leahy, J.G. y Colwell, L.L. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol. Rev.* 54:305-315.
59. Lee, S.K., and Lee, S.B. (2001) Isolation and characterization of a thermotolerant bacterium *Ralstonia* sp. strain PHS1 that degrades benzene, toluene, ethylbenzene, and oxylene. *Appl Microbiol Biotechnol* 56: 270–275.
60. Lee, T.H., Byun, I.G., Kim, Y.O., Hwang, I.S. y Park, T.J. (2006). Monitoring biodegradation of diesel fuel in bioventing processes using *in situ* respiration rate. *Wat. Sci. Tech.*, 53(4-5), 263-272.
61. Leisinger, T., and W. Brunner. 1986. Poorly degradable substances, p. 475-513. In H. J. Rehm and G. Reed (ed.), *Biotechnol.* vol. 8. VCH Publishers, New York.
62. Maeda T, Takahashi Y, Suenaga H, Suyama A, Goto M, Furukawa K (2001) Functional analyses of bph-tod hybrid dioxygenases, which exhibits high degradation activity toward trichloroethylene. *J Biol Chem* 276(32):29833-29838.
63. Martins, V.G., Kalil, S.J., Bertolin, T.E. y Costa, J.A. (2006). Solid state biosurfactant production in a fixed-bed column bioreactor. *Z. Naturforsch.* 61(9-10), 721-726.
64. Meckenstock R. U., E. Annweiler, W. Michaelis, H.H. Rinchnow y B. Schink. 2000. Anaerobic naphthalene degradation by a sulfate-reducing enrichment culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 66:2743-2747.
65. Okuda, T., Alcantara-Garduno, M.E., Suzuki, M., Matsui, C., Kose, T., Nishijima, W. y Okada, M. (2007). Enhancement of biodegradation of oil adsorbed on fine soils in a bioslurry reactor. *Chemosphere*, 68(2), 281-286.
66. Patrauchan, MA, Florizone C, Eapen S, Gómez-Gil L, Sethuraman B, Fukuda M, Davies J, Mohn WW, Eltis LD (2008) Roles of Ring-Hydroxylating Dioxygenases in Styrene and Benzene Catabolism in *Rhodococcus jostii* RHA. *J Bacteriol* 190(1): 37-47.
67. Phelps CD, Young LY. 1999. Anaerobic biodegradation of BTEX and gasoline in various aquatic sediments. *Biodegradation*. 10:15-25.
68. Pieper, D.H. y Reineke W. 2000. Engineering bacteria for bioremediation. *Current Opin Biotechnol* 11:262–270.
69. Peters F, Heintz D, Johannes J, van Dorsselaer A, Boll M (2007). Genes, Enzymes, and Regulation of para-Cresol Metabolism in *Geobacter metallireducens*. *J Bacteriol* 189(13): 4729-4738.
70. Potter, T. L. (1992). Fingerprinting petroleum products: unleaded gasolines. In: Kostecki PT, Calabrese EJ (ed.) *Petroleum contaminated soils*, vol 2. Lewis Publishers, Chelsea, Mich, pp 83–92.
71. Pruden, A. y Suidan, M. (2004). Effect of benzene, toluene, ethylbenzene and p-xylene (BTEX) mixture on biodegradation of methyl tert-butyl ether (MTBE) and tert-butyl alcohol (TBA) by pure culture UC1. *Biodegradation*, 15, 213-227.
72. Ramos, J. L., N. Mermod, and K. N. Timmis. 1987. Regulatory circuits controlling transcription of TOL plasmid operon encoding *meta* cleavage pathway for degradation of alkylbenzoates by *Pseudomonas*. *Mol. Microbiol.* 1:293–300.
73. Rooney-Varga J. N., R. T. Anderson. J. L. Fraga, D. Ringelberg y D. R. Lovley. 1999. Microbial communities associated with anaerobic benzene degradation in a petroleum-contaminated aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65:3056-3063.
74. Sabirova, J.S., M. Ferrer, D. Regenhart, K. N. Timmis y P. N. Golyshin. 2006 Proteomic Insights into Metabolic Adaptations in *Alcanivorax borkumensis* Induced by Alkane Utilization. *J. Bacteriol.* 188 (11): 3763-3773.
75. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
76. SEMARNAT. (2002a). Norma Oficial Mexicana de Emergencia NOM-EM-138-ECOL-2002. *Limites máximos permisibles de contaminación en suelos afectados por hidrocarburos, la*

caracterización del sitio y procedimientos para la restauración. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales, México.

77. SEMARNAT. (2002b). Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Estados Unidos Mexicanos. Compendio de Estadísticas Ambientales. México, D.F.
78. SEMARNAT. (2005a). Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Estados Unidos Mexicanos. Informe de la Situación del Medio Ambiente en México 2005. Compendio de Estadísticas Ambientales. Dirección General de Estadística e Información Ambiental. México, D.F.
79. SEMARNAT. (2005b). Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Subsecretaría de Gestión para la Protección Ambiental. Estados Unidos Mexicanos. Dirección General de Gestión Integral de Materiales y Actividades Riesgosas. México, D.F.
80. Shan-Gen L. 2002. Mechanisms of granular activated carbon anaerobic fluidized-bed process for treating phenols wastewater. *Journal of Environment Science*, 14: 132-135.
81. Shöber U, Thiel C, Jendrossek D (2000) Poly (3-hydroxyvalerato) Depolymerase of *Pseudomonas lemoignei*. *Appl Environ Microbiol* 66(4):1385-1392.
82. Smith M. R. 1994. The physiology of aromatic hydrocarbon degrading bacteria In: *Biochemistry and Microbial Degradation*, (Ed.) C. Ratledge. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 347-378.
83. Song, B. y B. B. Ward. 2005. Genetic Diversity of Benzoyl Coenzyme A Reductase Genes Detected in Denitrifying Isolates and Estuarine Sediment Communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 1516-1523
84. Souza V, Asuar LE, Escalante AE, Eguiarte LE, Forney JF, Lloret L, Rodríguez-Martínez JM, Soberón X, Dirzo R, Elser JJ, (2006) An endangered oasis of aquatic microbial biodiversity in the Chihuahuan desert. *PNAS* 103(17): 6565-6570.
85. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (1998) American Public Health Association/American Water Works Association/Water, 20th edn. Environmental Federation, Washington DC, USA.
86. Tan H. M. y J. R. Mason. 1990. Cloning and expression of the plasmid encoded benzene dioxygenase genes from *Pseudomonas putida* ML2. *FEMS Microbiol Lett* 72:259-264.
87. Tarasev. M, C. S. Kaddis, S. Yin, J. A. Loo, J. Burgner, D. P. Ballou. 2007. Similar enzymes, different structures: phtalato dyoxygenases is an $\alpha_3\alpha_3$ hexamer, not an $\alpha_3\beta_3$ trimer like "normal" rieske oxygenases. *Arch Biochem Biophys*. 466(1):31-39.
88. Tropel D. y J. R. van der Meer. 2004. Bacterial Transcriptional Regulators for Degradation Pathways of Aromatic Compounds. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68(3): 474-500.
89. Tsao, C.W., H.G. Song, R. Bartha. 1998. Metabolism of benzene, toluene and xylene hydrocarbons in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(12):4924-4929.
90. USEPA (2006) FY 2006 Mid-Year Activity Report to UST/LUST Regional Division Directors, Regions 1-10. Office of Solid Waste and Emergency Response, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC. http://www.epa.gov/oust/cat/ca_061_2.pdf.
91. van der Meer, J. R., W. M. de Vos, S. Harayama, and A. J. B. Zehnder. 1992. Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiol. Rev.* 56:677-694.
92. *Microbiol. Rev.* 56:677-694.
93. Volkering, F., Breure, A.M., van Andel, J.G. y Rulkens, W.H. (1995). Influence of nonionic surfactants on bioavailability and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(5), 1699-1705.
94. Weiner J. M. y D. R. Lovley. 1998. Rapid benzene degradation in methanogenic sediments from a petroleum-contaminated aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:1937-1939.
95. Widdel F. y R. Rabus. 2001. Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology*, 12:259-276.
96. Williams, P.A. y J.R. Sayers. 1994. The evolution of pathways for aromatic hydrocarbon oxidation in *Pseudomonas*. *Biodegrad.* 5:195-217.

97. Wischgoll, S., D. Heitz, F. Peters, A. Erxleben, E. Sarnighausen, R. Reski, A. Dorselaer y M. Boll. 2005. Gene clusters involved in anaerobic benzoate degradation of *Geobacter metallireducens*. *Mol. Microbiol.* 58(5):1238-1252.
98. Witzig. R., H. Junca, H. J. Hecht, D. H. Pieper. 2006) Assessment of toluene/biphenyl dioxygenase gene diversity in benzene-polluted soils: Links between benzene biodegradation and genes similar to those encoding isopropylbenzene dioxygenases. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(5):3504-3514.
99. Zamanian, M., and J. R. Mason. 1987. Benzene dioxygenase in *Pseudomonas putida*. *Biochem. J.* 244:611–616.
100. Zhang, Y. y Miller, R.M. (1995). Effect of rhamnolipid (biosurfactant) structure on solubilization and biodegradation of n-alkanes. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:2247-2251.
101. Zylstra GJ, Gibson DT (1989) Toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1. *J Biol Chem* 264:1940-1946.