

IDENTIFICACIÓN DE LA RUTA DE DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POR MEDIO DE INICIADORES DEGENERADOS EN MICROORGANISMOS

Cerratos Hernández Felipe de Jesús (1), Gutiérrez Amézquita Martha Isela (2), López Ramírez Varinia (3), Álvarez Mejía Cesar (4).

1 [Ingeniería Ambiental, Instituto Tecnológico Superior de Abasolo] | [felipe.cerratositesa@gmail.com]

2 [Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico Superior de Irapuato] | [mar_tha19chivas@hotmail.com]

3 [Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico Superior de Irapuato] | [varinialr@gmail.com].

4 [Ingeniería Ambiental, Instituto Tecnológico Superior de Abasolo] | [cesar.alvarez@tecabasolo.edu.mx]

Resumen

La biorremediación de hidrocarburos representa actualmente un reto biotecnológico por la lentitud con la que este contaminante es eliminado del sitio de impacto, actualmente, se han reportado varios géneros bacterianos capaces de degradar hidrocarburos aromáticos. En este trabajo realizamos un análisis bioinformático para el diseño de oligonucleótidos degenerados, cuyo blanco son los genes de degradación de naftaleno. Se construyó una base de datos con los genes reportados en *GeneBank* y *Kegg*, para cada una de las etapas de la ruta (*nahAc*, *nahad*, *nahB*, *nahD*, *nahF*), se seleccionaron al menos 5 géneros bacterianos por cada gene, estas secuencias fueron alineadas, y a partir del consenso se diseñaron los oligonucleótidos, considerando una longitud promedio de 20 nt y 5 bases degeneradas. Estos oligonucleótidos fueron probados en diversos aislados bacterianos que degradan hidrocarburos identificadas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Providencia sp*, *Providencia rettgeri* y *Enterobacter sp*. En los resultados de los PCR's que se realizaron no se obtuvo amplificación de los genes, lo que demuestra que las cepas llevan a cabo una degradación por medio de la activación de otras enzimas, lo que sugiere el diseño de más oligonucleótidos que involucren más géneros bacterianos.

Abstract

Hydrocarbon remediation is currently a biotechnological challenge, because the slow rate of degradation by microorganism, affecting the place where it's was present, over the time. But In this work we design a bioinformatic approach to identify a general aromatic hydrocarbons pathway's degradation, designing and modelling degenerate oligonucleotide, whose target is the degradation genes of naphthalene catabolic pathway. We use the genes previously reported in public GenBank and Kegg databases, for each gene of the route (*nahAc*, *nahad*, *nahB*, *nahD*, *nahF*), were selected at least 5 different bacterial genera. These sequences were aligned, and We use the consensus sequence for degenerate oligonucleotides design, considering an average length of 20 nt and 5 degenerate bases. These oligonucleotides were tested in different bacterial isolates, whose degrades hydrocarbons, previously identified as *Pseudomonas aeruginosa*, *Providencia sp*, and *Enterobacter sp Providencia rettgeri*. For these strains there were not an amplified PCR product suggesting that these isolated has not the genes for naphthalene degradation pathway, It suggests another genes involved in the aromatic degradation pathway instead of naphthalene genes tested here.

Palabras Clave

1 Bioinformática; 2 oligonucleótidos degenerados; 3 Degradadores de hidrocarburos aromáticos.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la actividad humana ha generado una gran cantidad de contaminantes, entre ellos de tipo orgánico que han sido difíciles de eliminar, y se han catalogado como compuestos orgánicos permanentes (COP's). En este grupo encontramos al petróleo y sus derivados, como la gasolina, diesel y combustóleo entre otros, su composición es heterogénea, y consiste principalmente en compuestos alifáticos y aromáticos como se muestra en la imagen 1. Estos últimos representan un reto para los procesos de remediación de suelos [1]. Como alternativa se han desarrollado métodos de biorremediación, a través del uso de microorganismos nativos que degradan de manera natural estos contaminantes [2]. La gran mayoría de esfuerzos realizados por los grupos de investigación, consiste en aislar, identificar y caracterizar estos microorganismos, y la formación de consorcios microbiológicos para hacer más eficiente el proceso de biorremediación [3]. En este trabajo, presentamos una estrategia bioinformática con biología molecular, para la adecuada selección de las cepas seleccionadas para estos consorcios. Seleccionamos los genes de la ruta de degradación de naftaleno como una ruta de degradación de hidrocarburos aromáticos, para posteriormente realizar el diseño de oligonucleótidos degenerados utilizando genes homólogos provenientes de otros géneros bacterianos, y poder realizar la identificación de los genes claves de la degradación de naftaleno, como una medida de su potencial uso para catabolizar hidrocarburos aromáticos. Estos oligonucleótidos fueron probados en 6 aislados bacterianos, provenientes del cepario del Laboratorio de Interacción y Diversidad Microbiana, del ITESI, las cuales previamente se habían demostrado son capaces de degradar hidrocarburos. Nuestros resultados indican que las cepas seleccionadas no son capaces de degradar compuestos aromáticos relacionados con el naftaleno, sin embargo podrían estar presentando rutas de degradación alternativas de estos

compuestos, que no fueron inicialmente consideradas para el diseño de estos oligos.

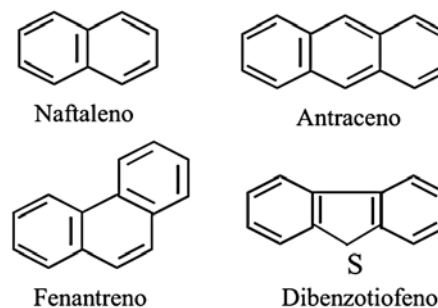


Imagen 1. Estructuras más comunes de hidrocarburos aromáticos [4].

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de los genes para amplificar.

Realizamos una selección de genes previamente reportados, como en el caso de los genes *nah*, que se han estudiado por su participación en la degradación de naftaleno (*nahAc*, *nahad*, *nahB*, *nahD*, *nahF*) [2]. Los géneros de bacterias utilizados en este trabajo pertenecen a cepas aisladas de un sitio de toma clandestina de gasolina y fueron identificadas por 16S ribosomal son *Pseudomonas aeruginosa*, *Providencia sp*, *Enterobacter sp*, *Providencia rettgeri*.

Elaboración de la base de datos.

Los demás genes homólogos fueron seleccionados de las bases de datos públicas del *NCBI* y *Kegg* [5], realizando un análisis comparativo Blast [6] o utilizando las herramientas de comparación de genes internas que ofrece el *Kegg*. En el caso de la base de datos del *Kegg*, en la ventana de inicio de la página aparece una opción de buscador y una barra que despliega varias opciones de búsqueda, en esta barra seleccionamos la opción de ruta de degradación y en la otra sección de buscador se escribe el nombre del hidrocarburo del que se desea conocer. Una vez que se ejecuta la búsqueda, la

página muestra diversas rutas donde pueda estar involucrado el naftaleno. Toda la información de la página se maneja en con la ejecución de los códigos que aparecen junto a la descripción de lo que se busca. Accesamos a la información de la ruta a través de las ligas presentes en los códigos de, los cuales al abrirlas, se muestran los paso de la ruta de degradación, se incluye en esta página, las enzimas que participan en la ruta catabólica y los genes que activan estas enzimas. Al ejecutar el código de algunos de los genes, se muestra la secuencia del gen y se presenta la opción de descargar las secuencias en formato fasta o de ejecutar el análisis comparativo *Blast*.

En el caso del manejo de la base de datos del *NCBI*, la ventana de inicio muestra una barra de búsqueda y una barra desplegable. En esta herramienta se realizó la búsqueda de genes en específico de los ya consultados en la base de datos *Kegg*, y se hizo el análisis comparativo *Blastn* para cada uno de los genes, en esta sección se seleccionaron las secuencias que presentaron mayor similitud y la pagina muestra las todas estas secuencias para poder descargarlas como formato multifasta. Se utilizaron estas bases de datos porque toda la información que muestran esta referenciada en artículos ya publicados.

Obtención de las secuencias y su alineamiento

Las secuencias fueron obtenidas en formato fasta, y fueron comparadas las regiones homologas, las cuales fueron extraídas y preparadas en archivos multifasta para su análisis. La alineación de las secuencias fueron realizadas por medio del programa *CLC sequence viewer* [7] y fueron editadas manualmente, eliminando las inserciones deleciones del alineamiento, considerando aproximadamente entre 300-1000 pb, por medio del programa *BioEdit* [8]. En el mismo programa se ejecuta el comando para crear la secuencia consenso la cual contiene ya las bases degeneradas.

Diseño de los oligonucleótidos degenerados.

Para el diseño de los oligonucleótidos, utilizamos las secuencias consenso que no tuvieran demasiada disimilitud, considerando que al menos cada oligo estuviera formado de al menos 5 base degeneradas, considerando que $Y = C \text{ y } T$, $M = A \text{ y } C$, $S = C \text{ y } G$, $R = A \text{ y } G$, $W = A \text{ y } T$, $K = T \text{ y } G$, y que la temperatura de alineamiento (T_m) no fuera más de 5°C de diferencia entre estos. Los oligonucleótidos fueron sintetizados por la compañía *Sigma* y su secuencia se muestra en la tabla 2.

Análisis de las rutas de degradación por PCR.

Los análisis de PCR fueron realizados en las cepas mostradas en la tabla 1, previamente descritas como degradadoras de petróleo (Gutierrez-Amezquita 2016).

Tabla 1 cepas utilizadas para la amplificación de los genes.

| Cepa | Nombre |
|--------|---------------------------------|
| SA1-1 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . |
| SA3-3 | <i>Providencia sp.</i> |
| SA1-12 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . |
| SS3-1 | <i>Enterobacter sp.</i> |
| AG-13 | <i>Citrobacter freundii</i> . |
| AG-2 | <i>Enterobacter sp.</i> |
| SA1-15 | <i>Providencia rettgeri</i> . |
| SS2-9 | <i>Enterobacter sp.</i> |

Se utilizó la mezcla de reacción de *Fermentans* a un volumen de 25 μl (12.5 μl de la mezcla de reacción, 1 μl de iniciador F, 1 μl de iniciador R, 1 μl de ADN y 9.5 μl de H_2O). Se realizaron dos tipos de amplificación, uno de ellos utilizando el protocolo de PCR de colonia, el cual consiste en picar una colonia y resuspenderla en la mezcla de reacción, y el segundo de manera clásica, con extracción de ADN total de bacterias, utilizando el protocolo descrito en *Sambrook y colaboradores*, de extracción de ADN genómico total bacteriano [9]. También se realizaron PCR's utilizando la mezcla convencional en un volumen de 20 μl (12 μl de H_2O , 2 μl de regulador 10X, 0.8 μl de MgCl_2 , 2 μl de dNTP's, 1 μl de iniciador F, 1 μl de iniciador R, 0.2 μl de *Taq* polimerasa y 1 μl de ADN). Los

iniciadores F y R son respectivamente los oligonucleótidos que se diseñaron.

El programa que se utilizó en el termociclador para hacer el PCR se muestra en la imagen 2.

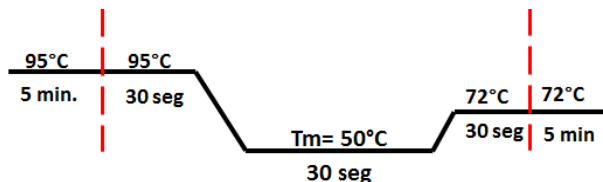


Imagen 2 Programa de amplificación para PCR

Los productos de PCR fueron analizados por medio de electroforesis de agarosa al 1% utilizando GelRed como agente fluorescente, este análisis se hace por medio de la técnica de electroforesis, en el gel de agarosa que se utiliza en la técnica se colocó un volumen de muestra de 2µl, 3µl del regulador de carga Naranja G, y el caso del marcador de peso molecular (1Kb) fue 1.5µl.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 2. Secuencia de los oligonucleótidos degenerados utilizados en este trabajo

| Nombre | Secuencia | Gen | Amplicon | Tm |
|---------|------------------------|-------|----------|------|
| nahAc F | gtctggacctacgccattg | nahAc | 339 | 55.4 |
| nahAc R | gtactagaggcatsctcgaac | | | |
| nahad F | trgacattcaggcttacgg | nahad | 448 | 53.4 |
| nahad R | kaaagaycatcasattgtgcg | | | |
| nahB F | ggttcttgctacatcgcc | nahB | 308 | 52.8 |
| nahB R | catcwatrytaatsacrgtscc | | | |
| nahD F | ggccaaycakcgyttgtc | nahD | 373 | 57.1 |
| nahD R | aargrcrctagatcccagc | | | |
| nahF F | ctrtrccaaggycagatc | nahF | 220 | 50.9 |
| nahF R | racykktgcncctttrtc | | | |

En las cepas con las que se probaron los oligonucleótidos fueron elegidas por que se pusieron en crecimiento en medio *Touson* y como única fuente de carbono se les agregó el 0.1 gr de naftaleno. Todas las cepas mostraron crecimiento denotada por la turbidez en los matraces

Obtención de las secuencias.

Las secuencias descargadas de las bases de datos Kegg y NCBI en formato multifasta fueron de los géneros bacterianos *Pseudomonas sp*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens* y de al menos 7 secuencias para realizar el alineamiento. A partir del alineamiento de estas secuencias se obtuvo una secuencia consenso la cual presenta las bases degeneradas en las partes donde hubo disimilitud en las secuencias, estas secuencia consenso es el punto de partida para el diseño de los oligonucleótidos degenerados.

Diseño de los oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos que se diseñaron se muestran en la tabla 2, con las características y condiciones necesarias para la amplificación. El parámetro más importante a considerar es la temperatura de alineamiento de los oligos (Tm) ya que si esta temperatura es muy alta, evitará un adecuado apareamiento de los iniciadores.

Análisis de las rutas de degradación por PCR.

En las amplificaciones que se realizaron con las cepas de la tabla 1, no se obtuvieron amplificaciones de ninguno de los genes, lo cual sugiere que estas cepas no tienen los genes de la ruta de degradación de naftaleno anteriormente descritos. Por ello, estamos evaluando realizar nuevos análisis para diseñar nuevos oligonucleótidos que involucren un mayor número de genes de otras rutas de degradación de hidrocarburos aromáticos.

El hecho de que no se haya presentado amplificación de estos genes como se muestra en la imagen 3, no demuestra que estas bacterias no degraden hidrocarburos aromáticos, porque estas

pueden estar realizando el proceso de degradación por la activación de las enzimas debido a la expresión de otros genes de alguna ruta catabólica alterna las cuales no fueron consideradas para este trabajo.

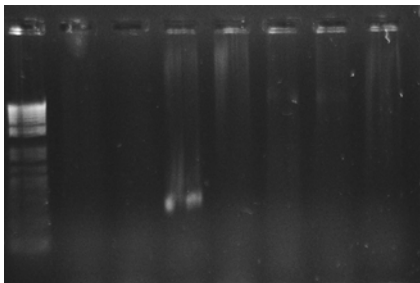


Imagen 3. Resultados de los PCR de los genes de degradación de naftaleno.

CONCLUSIONES

Para poder hacer un análisis de las rutas de degradación de los hidrocarburos aromáticos, se necesita considerar las rutas alternas por las que pueden llevar a cabo una degradación de estos compuestos, y poder incluir un mayor número de secuencias, que estén presentes en una mayor diversidad microbiana.

Los oligonucleótidos que se diseñaron en este trabajo no mostraron amplificación con 8 cepas seleccionadas, pero falta por probar otras cepas aun sin caracterizar y poder definir así alguna ruta de degradación de naftaleno y tener amplificación con algunas que lleven a cabo una ruta de degradación que involucren la expresión de estos genes.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Laboratorio de Diversidad e Interacción Microbiana del Itesi por facilitarnos las cepas con las que se probaron los oligonucleótidos y al Laboratorio de Microbiología y Bioquímica Ambiental del Itesa por las facilidades prestadas para la realización de este trabajo.

REFERENCIAS

- [1] Foght, J. (2008). Anaerobic biodegradation of aromatic hydrocarbons: Pathways and prospects. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 15(2-3), 93-120. <http://doi.org/10.1159/000121324>
- [2] Haritash, A. K., & Kaushik, C. P. (2009). Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials*, 169(1-3), 1-15. <http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.03.137>
- [3] Fuentes, S., Méndez, V., Aguila, P., & Seeger, M. (2014). Bioremediation of petroleum hydrocarbons: Catabolic genes, microbial communities, and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(11), 4781-4794.
- [4] Samanta, S. K., Singh, O. V., & Jain, R. K. (2002). Polycyclic aromatic hydrocarbons: Environmental pollution and bioremediation. *Trends in Biotechnology*, 20(6), 243-248.
- [5] Ogata, H., Goto, S., Sato, K., Fujibuchi, W., Bono, H., & Kanehisa, M. (2008). KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic acids research*, 27(1), 29-34.
- [6] NCBI, R. C. (2013). Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic acids research*, 41(Database issue), D8.
- [7] NCBI, R. C. (2013). Database resources of the National Center for Biotechnology Information.
- [8] Hall, T. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, (41), 95-98.
- [9] Sambrook, J. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third Edition (3 volume set). Cold Spring Harbor Laboratory Press.