



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**DISEÑO DE UN CONSORCIO BACTERIANO SINTÉTICO PARA DEGRADAR  
COMPUESTOS AROMÁTICOS MONOCÍCLICOS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
JAIME ROSAS DÍAZ

TUTOR PRINCIPAL  
DRA. LILIANA PARDO LÓPEZ  
[Instituto de Biotecnología](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. MARCELA AYALA ACEVES  
[Instituto de Biotecnología](#)  
DR. MIGUEL ÁNGEL CEVALLOS GAOS  
[Centro de Ciencias Genómicas](#)

Cuernavaca, Morelos. Octubre, 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

El presente trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de Investigación en Programas Institucionales II, adscrito al Departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo el programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas.

Este trabajo se realizó gracias a la beca de CONACyT para estudios de posgrado nivel maestría con número de becario 484726.

Esta investigación ha sido financiada por el Fondo Sectorial CONACYT-SENER-Hidrocarburos, proyecto 201441. Esta es una contribución del Consorcio de Investigación del Golfo de México (CIGoM). Reconocemos a PEMEX por promover ante el Fondo la demanda específica sobre los derrames de hidrocarburos y el medio ambiente.

Investigación realizada gracias al Programa UNAM-PAPIIT IN207019 “Investigación de nuevas dioxigenasas marinas”. Además, se realiza un amplio reconocimiento al Programa de Apoyo a los Estudiantes del Posgrado (PAEP) por todos los apoyos otorgados.

## Dedicatoria

A mi familia

En especial a mi madre, que me ha impulsado día con día a llegar hasta este punto de mi vida, además de que siempre me ha apoyado de un sinfín de maneras. Gracias mamá por creer en mí y por todo lo que me has dado. También a mi hermano que confió en que lo lograría y que a pesar de los momentos difíciles que hemos vivido siempre hemos estado unidos, y siempre lo estaremos. Con cariño para los dos, los amo.

## **Agradecimientos**

A mi directora de tesis la Dra. Liliana Pardo López, ya que desde que llegué al laboratorio siempre me estuvo apoyando de diversas formas, además de que gracias a sus enseñanzas y regaños he aprendido muchas cosas tanto profesionalmente como a nivel personal. Es una excelente doctora y aun mejor persona, estoy muy agradecido con ella, pero sobre todo gracias por el apoyo en la etapa más difícil que pasé durante la maestría, sin ella no lo habría conseguido.

A mi comité tutor integrado por el Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos y la Dra. Marcela Ayala Aceves de los cuales aprendí mucho y que además de orientarme durante la realización mi trabajo de investigación, me apoyaron para la realización de varios experimentos. También agradezco a la Biol. Rosa Román Miranda quien es técnico de la Dra. Ayala, ya que me apoyo enormemente en análisis de mis muestras en el HPLC.

A todos mis compañeros de laboratorio Sofía, Itzel, Diego, Isaac, José Luis, Luis Felipe, Enrique, Katya, Alejandra, Sandra y especialmente a Libertad ya que fue ella quien fungió como mi instructora cuando llegué al laboratorio, gracias a todos por tantas alegrías dentro y fuera del lab. A Raúl que nos ayuda a mantener ordenado y limpio el laboratorio, además de las ocasiones que jugamos futbol.

A mis amigos de la generación y del IBt, con los cuales forjé grandes amistades, Arturo, Omar, Beto, Dani, Pepe plantas, los del equipo de futbol palomas tikas (Axel, Álvaro, Edgar, Jorge, Juanito, Rafa y Adrián), así como las chicas que me integraron a sus entrenamientos de futbol (Steph, Marieli, Ale, Dani y Sandra). Y especialmente a Thalía, quien se ha convertido en una persona muy importante para mí y que deseo conservar en mi vida, te amo y quiero esto.

A mis hermanos de otra madre que tengo en Pachuca, a Hill, Iván, Mauricio, Diego y nuestro queridísimo Miguel que ya no se encuentra con nosotros físicamente pero siempre vivirá en nuestros corazones, este logro también es tuyo carnalito. También a mi super amigo y ex roomie Urbano con el que he tenido tantas pláticas y vivido muchas aventuras, un abrazo homs. Finalmente, a Anahí que, aunque nuestros caminos se hayan separado después de que estuvieron juntos por muchos años, siempre nos vamos a querer y apoyar.

A Toño y Gloria de Docencia que siempre hacen un excelente trabajo.

## Glosario

|       |  |
|-------|--|
| HAPs  | Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos  |
| VOC   | Superfamilia Vicinal Oxygen Chelate  |
| SOGOM | Campaña Oceanográfica del Suroeste del Golfo de México   |
| CIGoM | Consorcio de Investigación del Golfo de México   |
| PCR   | Reacción en cadena de la polimerasa por sus siglas en inglés                                     |
| BLAST | Herramienta utilizada para alinear y comparar secuencias (Basic Local Alignment Search Tool)     |
| NCBI  | National Center for Biotechnology Information  |
| KEGG  | Base de datos de genes y genomas (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)                       |
| RAST  | Servidor para anotar genomas parciales o completos (Rapid Annotation using Subsystem Technology) |
| ANI   | Average Nucleotide Identity  |
| MFS   | Superfamilia de transportadores de membrana (Major Facilitator Superfamily)                      |
| IcIR  | Familia de reguladores transcripcionales   |
| AAHS  | Aromatic Acid: H <sup>+</sup> Symporter  |
| ABC   | ATP-binding cassette transporter   |

## Índice de Figuras

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. Representación esquemática de cada tipo de compuesto aromático. ....  | 1  |
| Figura 2. Estructura de los 16 HAPs enlistados como contaminantes prioritarios por la US EPA .....  | 2  |
| Figura 3. Fuentes ambientales de compuestos aromáticos .....  | 4  |
| Figura 4. Reacciones realizadas por enzimas oxigenasas.....   | 5  |
| Figura 5. Metabolismo aerobio de diferentes aromáticos vía intermediarios di- o trihidroxilados .....   | 6  |
| Figura 6. Diferentes reacciones catalizadas por enzimas intra y extradiol dioxigenasas .....  | 7  |
| Figura 7. Vías de degradación de diferentes intermediarios centrales en el metabolismo de compuestos aromáticos .....   | 9  |
| Figura 8. Factores bióticos y abióticos que inciden en la degradación de los compuestos aromáticos .....  | 10 |
| Figura 9. Procesamiento de reacciones complejas por una sola población o un consorcio microbiano .....  | 11 |
| Figura 10. Tipos de interacciones metabólicas .....   | 13 |
| Figura 11. Método para obtener un consorcio bacteriano sintético a partir de un consorcio natural.....  | 14 |
| Figura 12. Mapa de las diferentes estaciones muestreadas durante la campaña SOGOM-I (CiGoM, 2016).....  | 15 |
| Figura 13. Abundancia relativa de los géneros bacterianos obtenidos mediante secuenciación del fragmento V3-V4 del gen 16S.....   | 15 |
| Figura 14. Abundancia relativa de los géneros bacterianos obtenidos mediante secuenciación del fragmento V3-V4 del gen 16S, utilizando cultivos bacterianos enriquecidos con fenantreno ..... | 16 |
| Figura 15. Representación de la metodología empleada para evaluar el crecimiento de cada cepa en cada uno de los diferentes antibióticos utilizados... ..                                     | 19 |
| Figura 16. Diseño esquemático de la cinética de crecimiento para los aislados y el consorcio.....   | 21 |
| Figura 17. Procedimiento para calcular la abundancia relativa de cada cepa dentro del consorcio .....   | 23 |
| Figura 18. Fotografía de las diferentes cepas aisladas de los consorcios crecidos en fenantreno. ....   | 26 |
| Figura 19. Fotografías de las bandas de DNA genómico extraído y del producto de PCR purificado .....  | 27 |
| Figura 20. Cajas de medio LB sin antibiótico y con antibiótico con las diluciones realizadas con la cepa <i>Paenarthrobacter</i> sp .....   | 29 |
| Figura 21. Cajas de medio EDM con antibiótico y LB con antibiótico con las diluciones realizadas con la cepa <i>Halomonas</i> sp.....   | 30 |
| Figura 22. Cinéticas de crecimiento y disminución de ácido benzoico en diferentes concentraciones .....   | 32 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 23. Cinéticas de crecimiento y disminución de ácido gentísico en diferentes concentraciones .....  | 33 |
| Figura 24. Cinéticas de crecimiento y disminución de ácido protocatecuico en diferentes concentraciones.....  | 35 |
| Figura 25. Cinéticas de crecimiento y disminución de benzoato y gentisato.....  | 37 |
| Figura 26. Cinéticas de crecimiento y disminución de benzoato y protocatecuato  | 38 |
| Figura 27. Cinéticas de crecimiento y disminución de gentisato y protocatecuato   | 39 |
| Figura 28. Cinéticas de crecimiento de los aislados y el consorcio en presencia de tres compuestos aromáticos.....  | 40 |
| Figura 29. Porcentaje de degradación de cada uno de los tres compuestos en presencia de un aislado o en consorcio. ....   | 40 |
| Figura 30. Modelo de interacción entre <i>Paenarthrobacter</i> sp. y <i>Halomonas</i> sp ....   | 42 |
| Figura 31. Genomas secuenciados de las cepas de <i>Paenarthrobacter</i> sp., <i>Alcanivorax</i> sp., <i>Halomonas</i> sp. y <i>Pseudomonas</i> sp.....          | 44 |
| Figura 32. Árbol inferido con FastME 2.1.456 a partir de las distancias GBDP ....   | 45 |
| Figura 33. Vías de degradación del benzoato (KEGG) presentes en el genoma de <i>Alcanivorax xenomutans</i> .....  | 46 |
| Figura 34. Vías de degradación del benzoato (KEGG) presentes en el genoma de <i>Paenarthrobacter</i> sp.....  | 47 |
| Figura 35. Enzima gentisato 1,2 dioxigenasa (KEGG).....   | 47 |
| Figura 36. Vías de degradación del benzoato (KEGG) presentes en el genoma de <i>Halomonas litopenaei</i> .....  | 48 |
| Figura 37. Enzima homogentisato 1,2 dioxigenasa (KEGG).....   | 48 |
| Figura 38. Vía de degradación del benzoato por la vía intradiol. Posición y dirección de estos genes dentro del genoma de <i>Paenarthrobacter</i> sp.....       | 50 |
| Figura 39. Vía de degradación del protocatecuato por la vía intradiol. Posición y dirección de estos genes dentro del genoma de <i>Paenarthrobacter</i> sp..... | 51 |
| Figura 40. Vía de degradación del gentisato. Posición de estos genes dentro del genoma de <i>Paenarthrobacter</i> sp.....                                       | 52 |
| Figura 41. Vías de degradación del benzoato y del protocatecuato. Posición de estos genes dentro del genoma de <i>Halomonas litopenaei</i> .....                | 54 |

## Índice de tablas

|   |    |
|---|----|
| Tabla 1. Lista de algunas cepas reportadas como degradadoras de compuestos aromáticos .....   | 10 |
| Tabla 2. Parámetros para la PCR .....   | 18 |
| Tabla 3. Método de gradiente empleado para medir de manera individual cada uno de los tres compuestos aromáticos .....  | 22 |
| Tabla 4. Cepas bacterianas con mayor similitud con el aislado S14-6 con base en el gen RNA ribosomal 16S .....  | 27 |
| Tabla 5. Cepas bacterianas con mayor similitud con el aislado S03-2 con base en el gen RNA ribosomal 16S. ....  | 28 |
| Tabla 6. Cepas bacterianas con mayor similitud con el aislado S05-3 con base en el gen RNA ribosomal 16S. ....  | 28 |
| Tabla 7. Cepas bacterianas con mayor similitud con el aislado S03-7 con base en el gen RNA ribosomal 16S. ....  | 28 |
| Tabla 8. Parámetros cinéticos de las dos cepas y el consorcio en diferentes concentraciones de ácido benzoico. ....   | 32 |
| Tabla 9. Parámetros cinéticos de las dos cepas y el consorcio en diferentes concentraciones de ácido gentísico. ....  | 34 |
| Tabla 10. Parámetros cinéticos de las dos cepas y el consorcio en diferentes concentraciones de ácido protocatecuico. ....  | 35 |
| Tabla 11. Parámetros cinéticos de las dos cepas y el consorcio en diferentes mezclas de compuestos aromáticos. ....   | 41 |
| Tabla 12. Estadísticas sobre el ensamble del genoma de los cuatro aislados, <i>Alcanivoax</i> , <i>Paenarthrobacter</i> , <i>Halomonas</i> y <i>Pseudomonas</i> . ....                              | 43 |
| Tabla 13. Comparación por pares de los aislados contra los genomas de las especies tipo más cercanas de acuerdo a índices genómicos como Mash D y fastANI. ....                                     | 45 |
| Tabla 14. Contexto genómico de los genes implicados en la degradación de benzoato dentro del genoma de <i>Paenarthrobacter</i> sp., así como de las proteínas que codifican. ....                   | 49 |
| Tabla 15. Contexto genómico de los genes implicados en la degradación de protocatecuato dentro del genoma de <i>Paenarthrobacter</i> sp., así como de las proteínas que codifican. ....             | 50 |
| Tabla 16. Contexto genómico de los genes implicados en la degradación de gentisato dentro del genoma de <i>Paenarthrobacter</i> sp., así como de las proteínas que codifican. ....                  | 52 |
| Tabla 17. Contexto genómico de los genes implicados en la degradación de benzoato y protocatecuato dentro del genoma de <i>Halomonas litopenaei</i> , así como de las proteínas que codifican. .... | 53 |
| Tabla A 1. Porcentaje de cobertura e identidad de las diferentes enzimas de <i>Paenarthrobacter</i> sp. relacionadas con la degradación de benzoato .....   | 55 |

|   |    |
|---|----|
| Tabla A 2. Porcentaje de cobertura e identidad de las diferentes enzimas de <i>Paenarthrobacter</i> sp. relacionadas con la degradación de protocatecuato. ....           | 55 |
| Tabla A 3. Porcentaje de cobertura e identidad de las diferentes enzimas de <i>Paenarthrobacter</i> sp. relacionadas con la degradación de gentisato. ....                | 56 |
| Tabla A 4. Porcentaje de cobertura e identidad de las diferentes enzimas de <i>Halomonas litopenaei</i> relacionadas con la degradación de benzoato y protocatecuato..... | 56 |

## Índice

|   |     |
|---|-----|
| Dedicatoria .....   | I   |
| Agradecimientos.....  | III |
| Glosario .....  | IV  |
| Índice de Figuras.....  | V   |
| Índice de tablas .....  | VII |
| Resumen .....   | XI  |
| Abstract .....  | XII |
| 1. Introducción.....  | 1   |
| 1.1. Compuestos aromáticos .....  | 1   |
| 1.2. Fuentes de compuestos aromáticos .....   | 2   |
| 1.2.1. Destino ambiental de estos compuestos aromáticos .....   | 3   |
| 1.3. Biodegradación de los compuestos aromáticos por microorganismos.....                                     | 3   |
| 1.3.1. Vías aerobias de degradación periféricas o superiores .....  | 5   |
| 1.3.2. Vías aerobias de degradación centrales o inferiores .....  | 7   |
| 1.3.3. Factores que influyen en la capacidad de degradar compuestos aromáticos .....                          | 10  |
| 1.4. Géneros bacterianos degradadores de compuestos aromáticos .....  | 10  |
| 1.4.1. Consorcios microbianos naturales degradadores .....  | 11  |
| 1.4.2. Consorcios microbianos sintéticos.....   | 12  |
| 2. Antecedentes directos .....  | 14  |
| 3. Justificación.....   | 16  |
| 4. Hipótesis.....   | 17  |
| 5. Objetivo General .....   | 17  |
| 5.1. Objetivos Específicos.....   | 17  |
| 6. Metodología.....   | 18  |
| 6.1. Obtención de los aislados .....  | 18  |
| 6.1.1. Extracción de DNA genómico y amplificación del gen 16S.....  | 18  |
| 6.1.2. Secuenciación y blast del 16S de los aislados .....  | 19  |
| 6.2. Marcaje de las cepas con diferentes antibióticos .....   | 19  |
| 6.3. Cinética de crecimiento de los aislados y el consorcio en presencia de un solo compuesto aromático ..... | 20  |

|   |    |
|---|----|
| 6.3.1. Cinética de crecimiento de los aislados y el consorcio en presencia de dos o más compuestos aromáticos. .... | 21 |
| 6.4. Medición de DO <sub>600nm</sub> y concentración del compuesto aromático .....                                  | 21 |
| 6.5. Abundancia relativa de cada aislado dentro del consorcio .....   | 23 |
| 6.6. Secuenciación y ensamble del genoma de los aislados .....  | 23 |
| 6.6.1. Identificación taxonómica.....   | 25 |
| 6.6.2. Anotación funcional de los componentes del consorcio.....  | 25 |
| 6.6.3. RAST .....   | 25 |
| 7. Resultados y discusión.....  | 26 |
| 7.1. Aislados crecidos en presencia de fenantreno.....  | 26 |
| 7.1.1. Extracción del DNA genómico y amplificación del gen 16S.....   | 26 |
| 7.1.2. Identificación del género de los aislados .....  | 27 |
| 7.2. Marcaje de cepas.....  | 29 |
| 7.3. Cinética de crecimiento de los aislados y el consorcio en presencia de un compuesto aromático.....             | 30 |
| 7.3.1. Cinética de crecimiento de los aislados en dos o más compuestos aromáticos .....                             | 36 |
| 7.4. Modelo de interacción .....  | 41 |
| 7.5. Secuenciación y ensamble del genoma de los componentes del consorcio.....                                      | 42 |
| 7.5.1. Identificación taxonómica.....   | 44 |
| 7.5.2. Anotación funcional de los componentes del consorcio.....  | 46 |
| 7.5.3. RAST .....   | 49 |
| 8. Conclusiones.....  | 54 |
| 9. Perspectivas.....  | 55 |
| Anexos .....  | 55 |
| Bibliografía .....  | 57 |

## Resumen

Los compuestos aromáticos pueden definirse como moléculas orgánicas conformadas por uno o más anillos aromáticos. Estos compuestos están presentes naturalmente en las plantas (como lignina, aminoácidos y taninos), y el petróleo. Otras fuentes incluyen aquellas derivadas de actividades antropogénicas como la agricultura, fuentes domésticas y la industria. Muchos de estos compuestos aromáticos están catalogados como contaminantes de prioridad ambiental. Se ha encontrado que diversos microorganismos tienen la capacidad de degradar estos compuestos, siendo las bacterias aerobias los degradadores más activos. La transformación de estos compuestos estructuralmente diversos, a través de vías metabólicas periféricas resulta en la formación de intermediarios claves como el catecol, protocatecuato y gentisato, los cuales en algunos casos no pueden ser degradados completamente. En este trabajo se obtuvieron cuatro aislados bacterianos en la región costera del Golfo de México en la cual se encontró una alta concentración de compuestos aromáticos. Estas cepas fueron capaces de crecer en presencia de fenantreno y pertenecen a los géneros *Alcanivorax*, *Paenarthrobacter*, *Halomonas* y *Pseudomonas*. Se probaron para ver si podían crecer en presencia de benzoato, gentisato y protocatecuato como única fuente de carbono. Nuestros resultados mostraron que *Alcanivorax xenomutans* y *Pseudomonas* sp. no tiene la capacidad de crecer en estos compuestos mientras que *Paenarthrobacter* sp. y *Halomonas litopenaei* tuvieron la capacidad de crecer en presencia de tres y dos de estos compuestos respectivamente. Además, en la mezcla de los tres compuestos aromáticos, observamos que *Paenarthrobacter* sp. tuvo una mayor tasa de crecimiento que *Halomonas litopenaei* y que las bacterias en el consorcio (integrado por estas dos cepas). Sus genomas fueron secuenciados y ensamblados para identificar las posibles rutas metabólicas empleadas en la degradación de estos compuestos aromáticos: encontramos que nuestros datos experimentales fueron corroborados con los datos obtenidos en los genomas. Finalmente, no observamos un mayor crecimiento o degradación en el consorcio en comparación con las cepas de manera individual: esto puede ser explicado debido a que ambos aislados cuentan con todas las enzimas necesarias para degradar completamente cada compuesto, siendo *Paenarthrobacter* sp. el aislado donde observamos la mayor tasa de crecimiento y degradación de estos compuestos aromáticos.

## Abstract

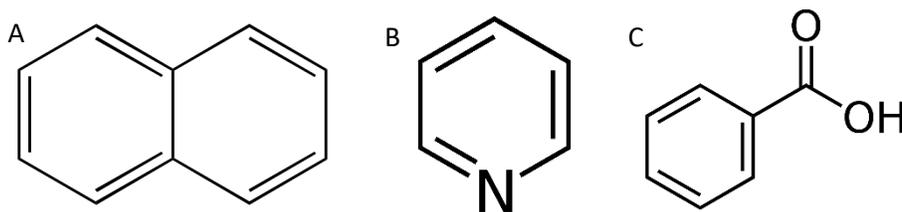
Aromatic compounds can be defined as organic molecules formed by one or more aromatic rings. These compounds are present in nature as lignin, amino acids and tannins. Although other sources of these compounds also include those derived from anthropogenic activities such as agriculture, domestic sources and industry. Many of these aromatic compounds are catalogued as environmental priority pollutants. It has been found that several microorganisms have the capacity of degrading these compounds, being aerobic bacteria the most active. The transformation of these structurally diverse compounds, through peripheral metabolic pathways, results in the formation of key intermediates such as catechol, protocatechuate and gentisate, that in some cases, cannot be degraded completely. In this work, four bacterial isolates were obtained from the coastal region of the Gulf of Mexico in which a high concentration of aromatic compound was found. These strains were capable of growth in the presence of phenanthrene and belong to the genera *Alcanivorax*, *Paenarthrobacter*, *Halomonas* and *Pseudomonas*. We tested if these strains could grow in the presence of benzoate, protocatechuate, and gentisate as the sole carbon source. Our results showed that *Alcanivorax xenomutans* and *Pseudomonas* sp. do not have the capacity of growth in any of these compounds, while *Halomonas litopenaei* and *Paenarthrobacter* sp. are able of growing in two or three of these compounds respectively. Moreover, in the mixture of the three aromatic compounds we observed a higher growth rate in *Paenarthrobacter* sp. than *Halomonas litopenaei* and the in the consortium (integrated by these two strains). Their genomes were sequenced and assembled to identify the possible metabolic pathways used in the degradation of aromatic compounds, where we found that our experimental results were corroborated with the data obtained in the genomes. Finally, we did not observe a larger growth rate or degradation in our consortium compared to individual strains: this could be explained due to the fact that both isolates contain all the necessary enzymes to degrade each compound completely, being *Paenarthrobacter* sp. the isolate where we obtained the highest rate of growth and of degradation of these aromatic compounds.

## 1. Introducción

### 1.1. Compuestos aromáticos

Los compuestos aromáticos pueden ser definidos como moléculas orgánicas conformadas por uno o más anillos aromáticos, por ejemplo, de benceno (Seo et al., 2009), el cual está dentro de las estructuras químicas más abundantes en la naturaleza (Díaz, 2004). La forma del anillo proporciona estabilidad estructural y química debido a un sistema simétrico de electrones  $\pi$ , lo cual los convierte en compuestos recalcitrantes en el ambiente (Vogt et al., 2011).

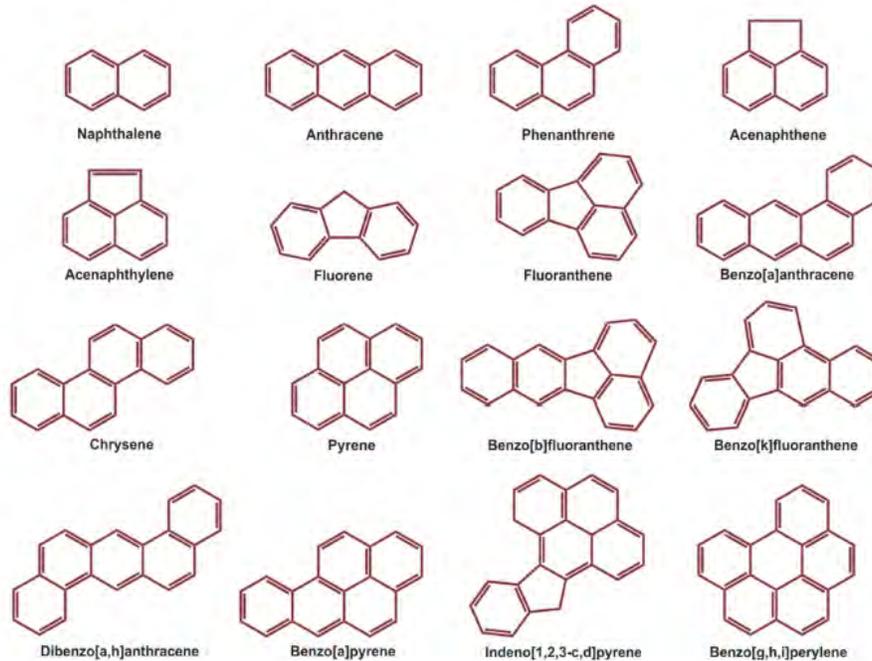
Se dividen principalmente en tres categorías: hidrocarburos aromáticos policíclicos, heterocíclicos y aromáticos sustituidos (Fig. 1).



**Figura 1.** Representación esquemática de cada tipo de compuesto aromático. (A) Policíclicos, (B) heterocíclicos y (C) sustituidos.

Los **hidrocarburos aromáticos policíclicos** son una clase de químicos orgánicos complejos, los cuales están compuestos de carbono e hidrógeno con una estructura de al menos dos anillos de benceno fusionados (Khaiwal et al., 2007; CCME, 2010). Generalmente, la estabilidad electroquímica, persistencia, resistencia hacia la biodegradación e índice carcinogénico de los HAPs aumenta con el incremento en el número de anillos aromáticos, angularidad estructural e hidrofobicidad, por otro lado, la volatilidad tiende a decrecer con el incremento del peso molecular (Marston et al., 2001). Se agrupan en HAPs de bajo peso molecular a aquellos que cuentan con dos o tres anillos aromáticos mientras que los de alto peso molecular poseen cuatro o más anillos aromáticos (Mueller et al., 1996).

Con base en su abundancia y toxicidad, 16 HAPs (Fig. 2) ya han sido enlistados como contaminantes de prioridad ambiental por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (US EPA, por sus siglas en inglés) (Agency for Toxic Substances and Disease Registry [ATSDR], 1990; Abdel-Shafy & Mansour, 2016).



**Figura 2.** Estructura de los 16 HAPs enlistados como contaminantes prioritarios por la US EPA. Tomada de Ghosal et al., 2016.

Los **compuestos heterocíclicos** contienen dentro de su anillo a otros elementos diferentes al carbono, el compuesto puede ser oxígeno, nitrógeno o azufre (Siddiquee, 2014). Los dibenzofuranos, dibenzodioxinas y dibenzotiofenos se encuentran entre los contaminantes ambientales más importantes, estos a menudo coexisten en el ambiente con HAP, así como con otros compuestos aromáticos (Klein, 2000).

Finalmente, los **compuestos aromáticos sustituidos** son un tipo de químicos donde uno o más átomos de hidrógeno del núcleo de la estructura son reemplazados con un grupo funcional como alquilo, hidroxilo, halógeno o con otros grupos de sustituyentes más grandes (March, 1985).

## 1.2. Fuentes de compuestos aromáticos

Se encuentran abundantemente en la naturaleza como: lignina, aminoácidos y taninos. Otras fuentes de estos compuestos incluyen aquellas derivadas de actividades antropogénicas como la agricultura (insecticidas y herbicidas), fuentes domésticas (lodos de depuradoras) y la industria (solventes, conservantes de madera, detergentes y petróleo) (Cinar, 2004).

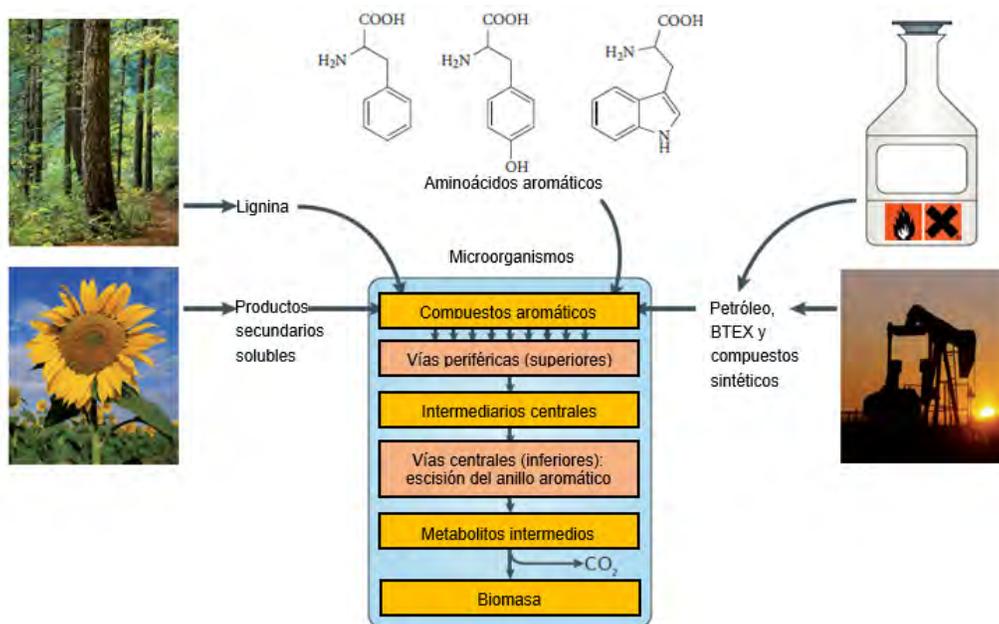
Muchos de los compuestos aromáticos derivados de actividades antropogénicas que son liberados hacia el medio se encuentran entre los principales contaminantes ambientales ya que son tóxicos para los organismos vivos (Cao et al, 2009). Además de que la presencia de estos compuestos aromáticos en el ambiente presenta algunos problemas importantes, incluyendo: (1) algunos de ellos presentan un reto en el tratamiento de aguas residuales, y (2) contaminan las aguas superficiales y subterráneas (Cinar, 2004).

### **1.2.1. Destino ambiental de estos compuestos aromáticos**

En el ambiente, estos compuestos pueden estar sujetos a diversos fenómenos físicos, químicos o biológicos, que pueden dar lugar a su transformación, eliminación o transporte a otros compartimentos ambientales. En los cuales se incluye la evaporación, dilución, precipitación, lixiviación, secuestro, reacciones abióticas (hidrólisis, fotooxidación, oxidaciones químicas), bioacumulación y biodegradación microbiana (Izquierdo, 2013).

### **1.3. Biodegradación de los compuestos aromáticos por microorganismos**

La degradación de estos compuestos aromáticos en el ambiente está dominada por bacterias aerobias y anaerobias, así como de hongos aerobios (Fuchs et al., 2011). Los cuales expresan genes de diferentes rutas catabólicas, permitiéndoles usar una amplia gama de compuestos aromáticos como únicas fuentes de carbono y energía (Harayama & Timmis, 1992). La capacidad general de las bacterias para usar tales compuestos está relacionada con el hecho de que la gran parte de estos compuestos se encuentran formando mezclas complejas con otros compuestos orgánicos que se producen de manera natural, como los encontrados en exudados de las plantas, en suelos, e incluso en materia orgánica disuelta de agua dulce y agua de mar (Landry, 2012). Por lo tanto, estos microorganismos están constantemente expuestos a diversos compuestos aromáticos estructuralmente heterogéneos que son potencialmente metabolizables, dónde no es posible saber si los componentes de estas mezclas son usados de manera simultánea o secuencial (Harwood & Parales, 1996; Pérez-Pantoja et al., 2015). En consecuencia, los microorganismos tienen un rol central en el reciclaje del carbono a partir de anillos aromáticos (Fig. 3).



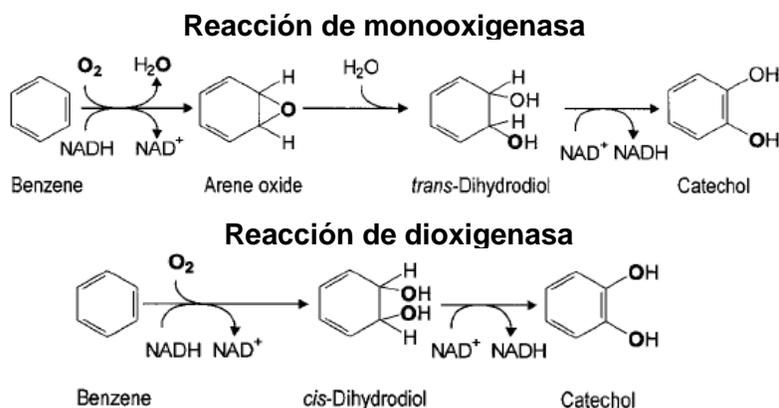
**Figura 3.** Fuentes ambientales de compuestos aromáticos, los cuales son tomados por parte de microorganismos para ser transformados a través de las vías periféricas (superiores) en algunos intermediarios centrales claves como el catecol, protocatecuato, gentisato y benzoil-CoA. Las vías centrales (inferiores) luego dividen el anillo aromático en metabolitos intermedios centrales como el acetil-CoA, succinil- coA y piruvato. Tomada de Fuchs et al., 2011.

La biodegradación de un compuesto aromático involucra una serie de pasos que utilizan diferentes enzimas (Abbasian et al., 2015), las cuales, ya sea en condiciones aerobias o anaerobias, desestabilizan el anillo de benceno a través de modificaciones químicas reversibles e irreversibles (Díaz et al., 2013). En estas reacciones, una porción del sustrato es oxidado para obtener energía mientras que otra parte es asimilada para formar masa celular (Díaz, 2004).

Existen dos principales vías metabólicas que utilizan las bacterias para degradar los compuestos aromáticos dependiendo de la presencia o ausencia de oxígeno. En el catabolismo aerobio de los compuestos aromáticos, el oxígeno se utiliza como aceptor final de electrones y también como coenzima para la hidroxilación y la escisión del anillo oxigenolítico (esteroidal) del compuesto aromático. En contraste, en el catabolismo anaeróbico de los compuestos aromáticos se emplea una estrategia completamente diferente para atacar el anillo aromático mediante la adición de fumarato, dióxido de carbono o grupos metilo, además de que se utiliza como aceptor final de electrones el nitrato, sulfato o iones férricos (Carmona et al., 2009).

### 1.3.1. Vías aerobias de degradación periféricas o superiores

En condiciones aerobias, el primer paso en la degradación de estos compuestos aromáticos es una oxidación catalizada por enzimas oxigenasas de hierro no hemo de Rieske, flavoproteínas y monooxigenasas solubles di (Fe), las cuales se encargan de la activación y posterior degradación del anillo aromático (Gibson & Parales, 2000), estas se clasifican en; monooxigenasas (hidroxilasas) o dioxigenasas (Huijbers et al. 2014; Parales & Resnick 2004) (Fig. 4).



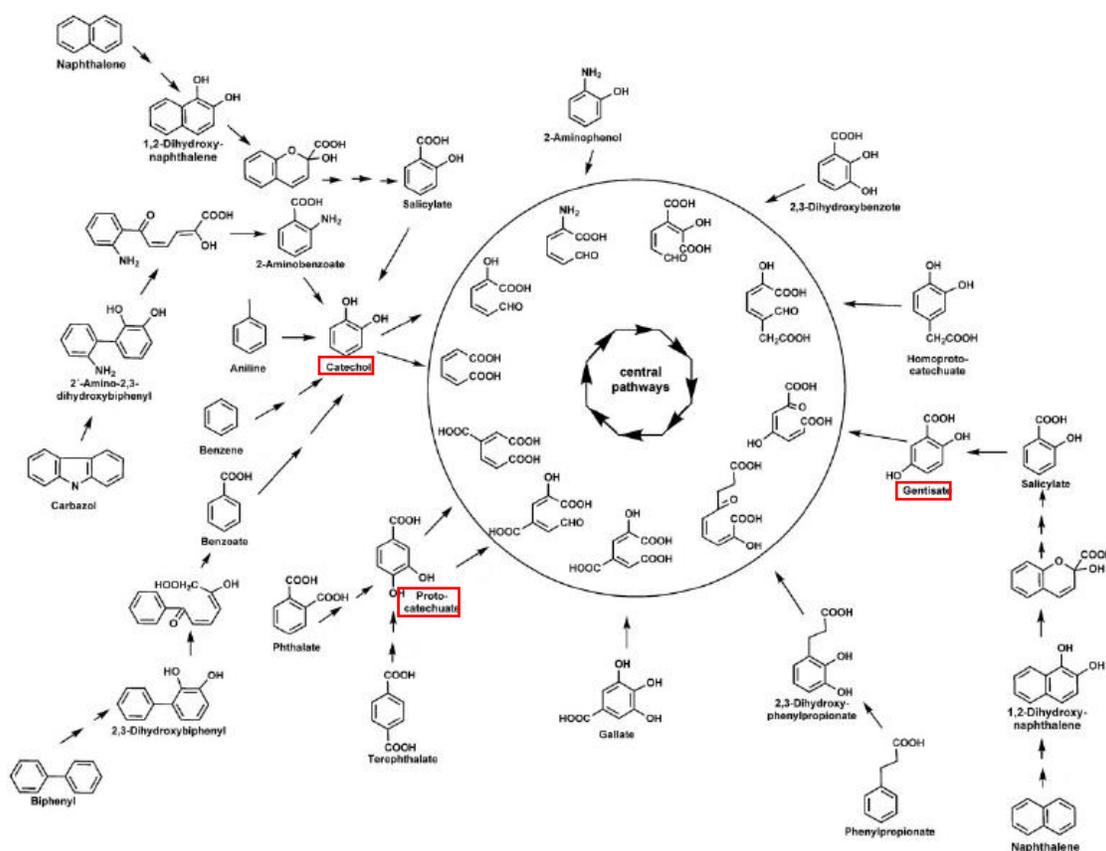
**Figura 4.** Reacciones realizadas por enzimas oxigenasas. Las monooxigenasas incorporan un átomo de oxígeno del  $O_2$  al sustrato mientras que el segundo es reducido a  $H_2O$ . Las dioxigenasas incorporan ambos átomos de oxígeno al sustrato. Tomada de Fritsche & Hofrichter, 2000.

Las monooxigenasas catalizan la escisión del enlace oxígeno-oxígeno del  $O_2$ , insertando un átomo de oxígeno dentro del anillo aromático formando fenoles y posteriormente catecoles, mientras que el otro es reducido a  $H_2O$  (Ladino-Orjuela et al., 2015).

Las dioxigenasas, por otro lado, llevan a cabo la dihidroxilación del anillo aromático dando como resultado la formación de un *cis*-dihidrodiol, el cual es rearomatizado hacia un diol intermediario por la acción de una deshidrogenasa. La dioxigenasa es una enzima integrada por varios componentes que generalmente consiste en una reductasa, ferredoxina y subunidades oxigenasa terminales (Mallick et al., 2011).

La transformación de estos compuestos aromáticos estructuralmente diversos a través de vías metabólicas periféricas da como lugar intermediarios clave como el catecol (1,2-dihidroxibenceno), protocatecuato (3,4-dihidroxibenzoato) y gentisato (2,5-dihidroxibenzoato) (Fig. 5), los cuales son posteriormente canalizados a través

de unas pocas vías centrales (inferiores) hacia el metabolismo celular (Cao et al., 2009).



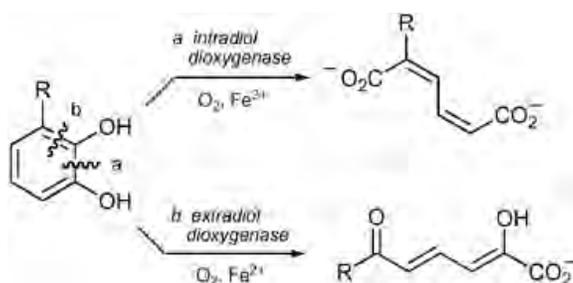
**Figura 5.** Metabolismo aerobio de diferentes aromáticos vía intermediarios di- o trihidroxilados. Los metabolitos intermediarios más importantes como el catecol, gentsato y protocatecuato están remarcados con rojo. Tomada de Duarte et al., 2014.

Sin embargo, en los estudios sobre la degradación de HAPs por consorcios microbianos, las vías inferiores son casi siempre ignoradas. En 2006, Luan et al., detectaron metabolitos intermedios producidos durante la degradación de HAPs por un consorcio bacteriano, esto sugiere que este consorcio contiene múltiples vías superiores y únicamente una vía inferior. De igual manera, durante el tratamiento biológico de aguas residuales en plantas que contienen un reactor anóxico y otro aerobio en serie, los compuestos aromáticos pueden no ser degradados completamente, generando intermediarios centrales como el catecol, gentsato y protocatecuato durante la biodegradación aerobia (Cinar, 2004). Siendo este un fenómeno común observado en la degradación de HAPs (Dastgheib et al., 2012).

Se ha encontrado que la presencia de enzimas dioxigenasas capaces de degradar tales compuestos desempeñan papeles fundamentales en los procesos de la biodegradación de HAPs (Wang et al., 2018), esto debido a que la acumulación de estos metabolitos intermedios procedentes de la degradación de estos compuestos aromáticos puede ser igual o más tóxicos que el compuesto original (Moscoso et al., 2012)

### 1.3.2. Vías aerobias de degradación centrales o inferiores

Los intermediarios di o trihidroxilados obtenidos a partir de las vías superiores pueden ser canalizados hacia las vías de degradación inferiores ya sea por enzimas intra o extradiol dioxigenasas, cada una de las cuales pueden escindir el anillo aromático por la vía intradiol (orto) y extradiol (meta) respectivamente (Fritsche & Hofrichter, 2000) (Fig. 6). La reacción intradiol que se lleva a cabo entre los dos grupos hidroxilos lo realiza una dioxigenasa empleando Fe (II) como cofactor (Guzik et al., 2013). Mientras que la reacción extradiol ejecutada en el enlace carbono-carbono adyacente a uno de los grupos hidroxilos lo llevan a cabo dioxigenasas usando Fe (III) como cofactor (Suenaga et al., 2014).



**Figura 6.** Diferentes reacciones catalizadas por enzimas intra y extradiol dioxigenasas. Tomada de Mendel et al., 2004.

Contrario a la superfamilia de las intradiol dioxigenasas en la cual todos sus miembros pertenecen a una misma superfamilia, las enzimas reportadas involucradas en la escisión extradiol de compuestos aromáticos pueden ser categorizadas en tres diferentes superfamilias; Tipo I extradiol dioxigenasas (por ejemplo la catecol 2,3-dioxigenasas), las cuales pertenecen a la superfamilia VOC, las tipo II o superfamilia LigB extradiol dioxigenasas que abarca, entre otras a las

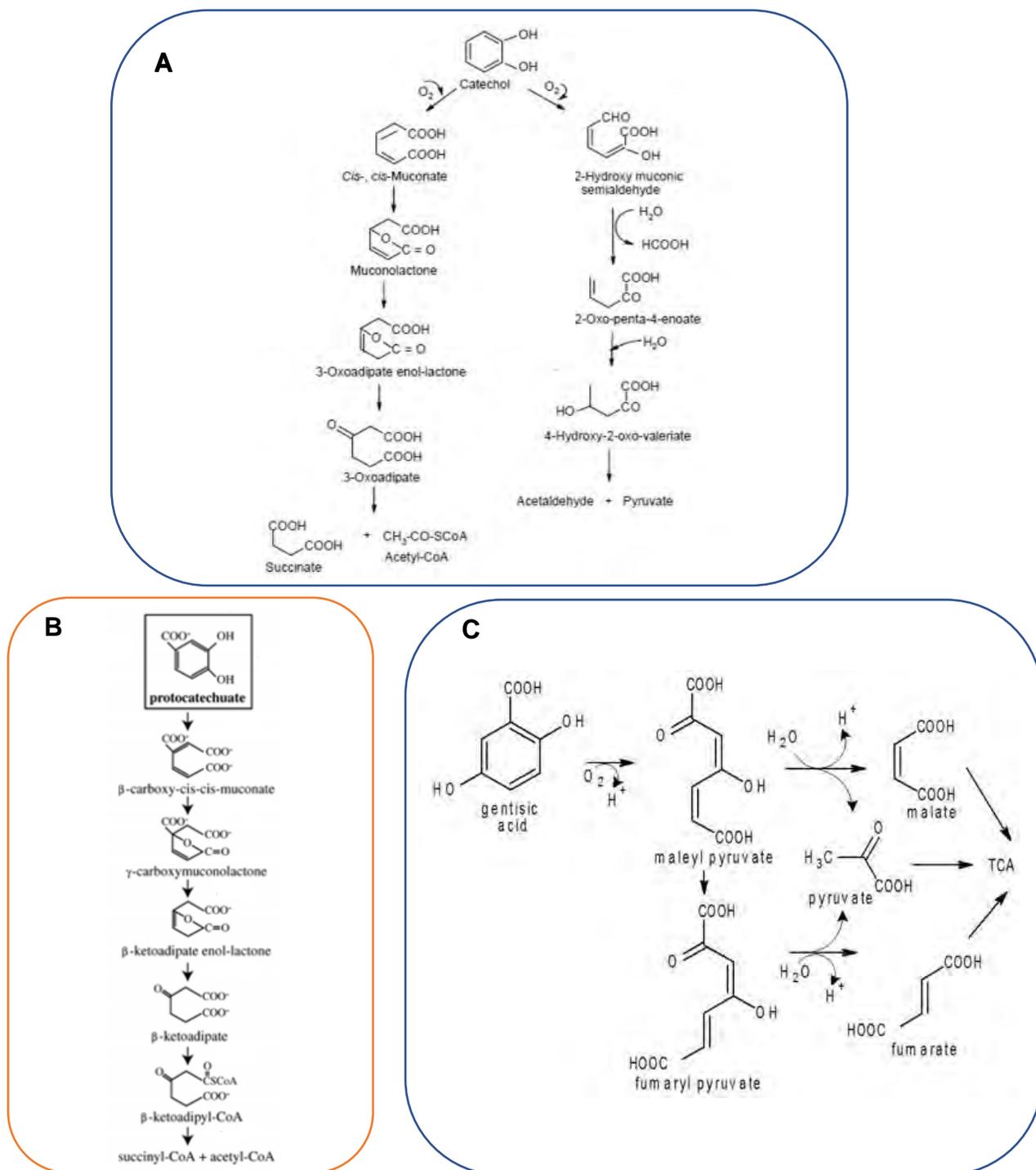
protocatecuato 4,5-dioxigenasas y las tipo III, enzimas como las gentisato dioxigenasas, que comprende a la superfamilia cupin (Duarte, 2014).

Sin embargo, existen un grupo de dioxigenasas hidroxiladoras del anillo que se sabe son de gran importancia en la degradación de compuestos aromáticos, las cuales son la enzima catecol 1,2 dioxigenasa, catecol 2,3 dioxigenasa, gentisato 1,2 dioxigenasa y protocatecuato 3,4 dioxigenasa (Azhari et al., 2007; Tánacsics et al., 2008; Wang 2007).

En el caso de la vía *ortho* del catecol, el metabolismo del mismo es iniciado por una reacción intradiol catalizada por una catecol 1,2-dioxigenasa resultando en la formación de *cis,cis*-muconato, el cual es subsecuentemente transformado en muconolactona por una muconato cicloisomerasa. La muconolactona isomerasa cambia de posición el doble enlace para formar 3-oxoadipato-enol-lactona (primer intermediario común entre la vía del catecol y el protocatecuato (Pérez-Pantoja, 2010). Por la vía *meta*, el catecol es convertido en 2-hidroxi-muconato semialdehído por la enzima extradiol catecol 2,3 dioxigenasa, este compuesto es transformado en 2-oxopent-dienoato por una deshidrogenasa, posteriormente es catabolizado por una 2-oxopent-dienoato hidratasa en 4-hidroxi-2-oxovalerato, el cual finalmente es convertido en piruvato y acetaldehído por una enzima 4-hidroxi-2-oxovalerato aldolasa (Nešvera et al., 2015) (Fig. 7A).

En la vía *ortho* del protocatecuato este es escindido en la posición 3,4 por una protocatecuato 3,4-dioxigenasa, formando  $\beta$ -Carboxi-*cis,cis*-muconato (Phale et al., 2019), el cual es transformado en  $\gamma$ -carboximuconolactona por una 3-carboxi-*cis,cis*-muconato cicloisomerasa, finalmente una enzima 4-carboximuconolactona descarboxilasa transforma este intermediario en 3-oxoadipato-enol-lactona (Buchan et al., 2004) (Fig. 7B), el cual converge con la vía de degradación del catecol y que posteriormente es integrado a la vía del  $\beta$ -ceto-adipato, donde posteriormente un grupo de enzimas lo convierten en un intermediario de los ácidos tricarbónicos (Li et al., 2010).

En la vía de degradación del gentisato, una enzima gentisato 1,2-dioxigenasa rompe el anillo aromático entre el grupo carboxilo y el grupo hidroxilo más próximo formando maleilpiruvato, el cual puede ser convertido en intermediarios del ciclo de Krebs a través de dos rutas, una escisión hidrolítica da lugar a la formación de piruvato y malato hecha por una maleilpiruvato hidrolasa, o la isomerización hacia fumarilpiruvato y la subsecuente reacción hidrolítica por una fumarilpiruvato hidrolasa para formar fumarato y piruvato (Crawford & Frick, 1977) (Fig. 7C).



**Figura 7.** Vías de degradación de diferentes intermediarios centrales en el metabolismo de compuestos aromáticos. (A) Vía *ortho* y *meta* de la degradación de catecol. Tomada de Nešvera et al., 2015 (B) Vía *ortho* de degradación del protocatecuato. Tomada de Buchan et al., 2004. (C) Vía *meta* de degradación del gentisato Tomada de Vrchotova, et al., 2013.

### 1.3.3. Factores que influyen en la capacidad de degradar compuestos aromáticos

La capacidad de biodegradación de los compuestos aromáticos por los microorganismos depende en gran medida de las propiedades del compuesto *per se*, del medio en el que se encuentran y finalmente de las características propias de los microorganismos (Fig. 8).



**Figura 8.** Factores bióticos y abióticos que inciden en la degradación de los compuestos aromáticos. Modificada de Ghosal et al., 2016.

### 1.4. Géneros bacterianos degradadores de compuestos aromáticos

Se han logrado aislar una gran cantidad de bacterias de diferentes entornos naturales que cuentan con la capacidad de degradar compuestos aromáticos, dentro de los cuales destacan los géneros de bacterias marinas como *Cycloclasticus* sp. *Marinobacter* sp. y *Pseudomonas* sp. (Tabla 1), siendo este último género y las especies estrechamente relacionadas a él, las más estudiadas debido a su habilidad de degradar un amplio rango de contaminantes (Wackett, 2003).

**Tabla 1.** Lista de algunas cepas reportadas como degradadoras de compuestos aromáticos (Seo et al., 2009).

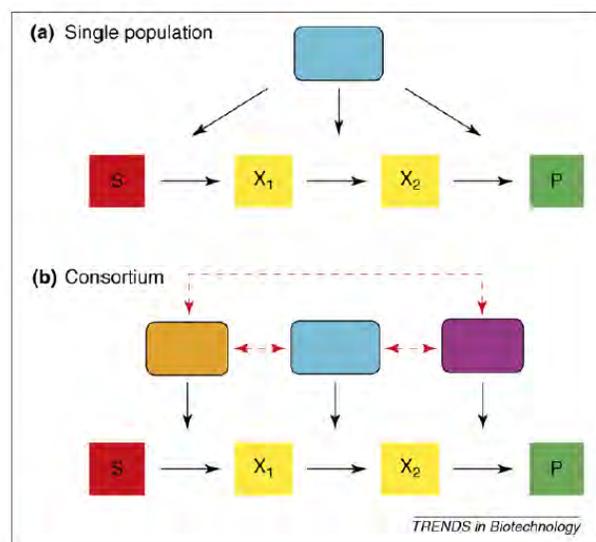
| Género                         | Sustrato     | Referencia             |
|--------------------------------|--------------|------------------------|
| <i>Arthrobacter</i> sp.        | Fluoreno     | Casellas et al., 1997  |
| <i>Bacillus cereus</i>         | Pireno       | Kazunga y Aitken, 2000 |
| <i>Burkholderia xenovorans</i> | Benzoato     | Denef et al., 2005     |
| <i>Cycloclasticus</i> sp.      | Pireno       | Wang et al., 2008      |
| <i>Marinobacter</i> sp.        | Naftaleno    | Hedlund et al., 2001   |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>  | Fenantreno   | Romero et al., 1991    |
| <i>Pseudomonas stutzeri</i>    | Pireno       | Kazunga y Aitken, 2000 |
| <i>Rhodococcus</i> sp.         | Benzotiofeno | Kirimura et al., 2002  |

Sin embargo, por lo general se ha observado que no es muy común que un microorganismo en particular cuente con todos los genes necesarios para la completa mineralización de contaminantes orgánicos tales como los compuestos aromáticos policíclicos (Ghosal et al., 2016). Por otro lado, se ha observado que los consorcios microbianos pueden realizar funciones más complicadas en comparación con poblaciones individuales ya que puede ser más robusto frente a fluctuaciones ambientales (Brenner et al, 2008).

#### 1.4.1. Consorcios microbianos naturales degradadores

En la naturaleza las bacterias no se encuentran de manera aislada, sino que están asociadas formando consorcios donde son capaces de cumplir tareas como la degradación de contaminantes tales como los compuestos aromáticos. Se ha visto que las comunidades degradadoras de estos compuestos están ampliamente distribuidas y pueden enriquecerse en ambientes marinos que estén contaminados (Hassanshahian et al., 2015).

Estas comunidades microbianas tienen una flexibilidad metabólica más amplia y son capaces de catalizar muchos procesos más eficientemente debido a que las vías metabólicas y los sistemas enzimáticos de diferentes organismos pueden ser combinados cooperativamente (Großkopf & Soyer, 2014) (Fig. 9).



**Figura 9.** Procesamiento de reacciones complejas por (a) una sola población o (b) un consorcio microbiano. La generación de un producto (P) a partir de un sustrato (S) puede requerir múltiples pasos a través de la síntesis de varios intermediarios (X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub>). Tomada de Brenner et al, 2008.

Sin embargo, existen limitaciones significantes al tratar de responder cuestiones fundamentales ecológicas y evolutivas que rodean a las comunidades microbianas naturales (Jessup et al., 2004). Incluso en las comunidades microbianas naturales más simples integradas por decenas o miles de especies usualmente no es posible verificar experimentalmente qué especies son parte activa de la comunidad o cuáles están desempeñando funciones clave (Curtis et al., 2002).

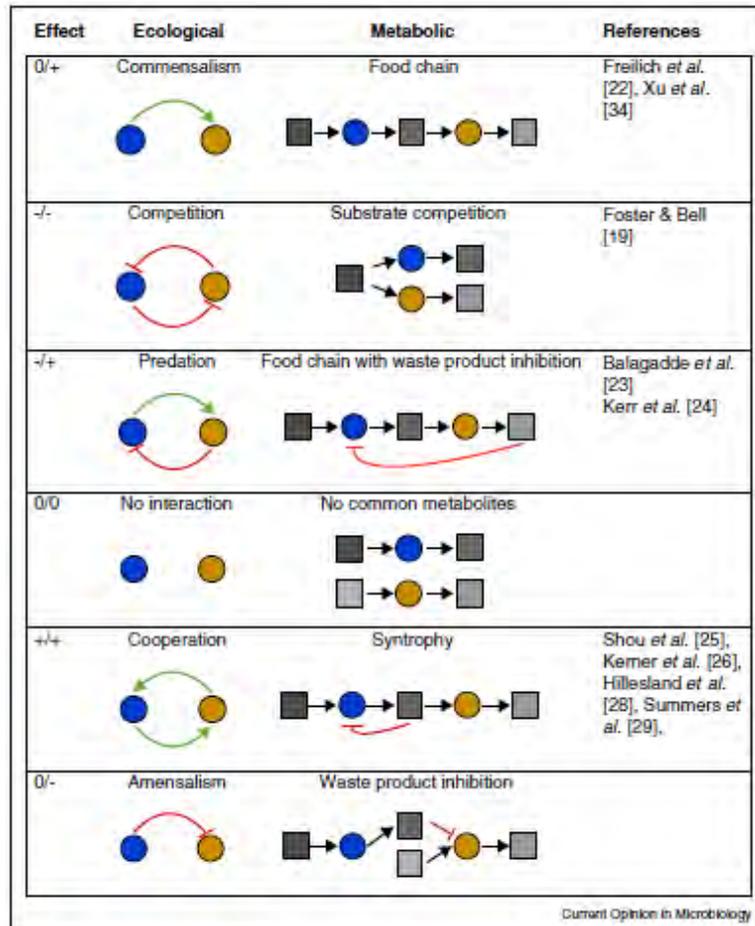
#### **1.4.2. Consorcios microbianos sintéticos**

Mientras que los consorcios naturales son difíciles de analizar, los medios de cultivo enriquecido son claves entre la transición de comunidades naturales y sintéticas. Estos son cultivos obtenidos a partir de muestras ambientales donde se promueve el crecimiento de microorganismos manipulando la composición del medio (Ponomarova & Patil, 2015). Estas comunidades sintéticas proporcionan una mayor reducción en la complejidad, creando un sistema más manejable para el descubrimiento de intercambios metabólicos (Song et al., 2014), los cuales contribuyen a través de la división de labores a la realización de tareas a nivel comunidad como la biodegradación (Lykidis et al., 2011).

Las comunidades construidas con aislados provenientes de ambientes similares maximiza el parecido con la comunidad natural y preserva interacciones autóctonas moldeadas por la coadaptación/evolución (Stadie et al., 2013). Cabe resaltar que la estabilidad de estas comunidades está basada entre las múltiples interacciones que tienen lugar entre los miembros de la comunidad, implicando interacciones químicas (transferencia de metabolitos, comunicación, antibiosis) así como interacciones celulares (agregación celular, formación de biofilm y depredación) (Jagmann & Philipp, 2014).

El tipo de interacciones basadas en la transferencia de metabolitos depende del efecto neto que tenga un organismo A sobre un organismo B, el cual puede ser neutral, positivo o negativo, dando como resultado seis diferentes tipos de interacciones basales encontradas en las comunidades microbianas (Fig. 10). Una de las cuales es el comensalismo, que se da cuando el organismo B se aprovecha del producto de desecho del organismo A, el cual no es afectado por esta interacción. La competencia se da cuando ambos organismos luchan por el mismo sustrato. Mientras que la depredación ocurre cuando uno de los metabolitos producido por algún organismo inhibe el crecimiento del otro, por otro lado, la

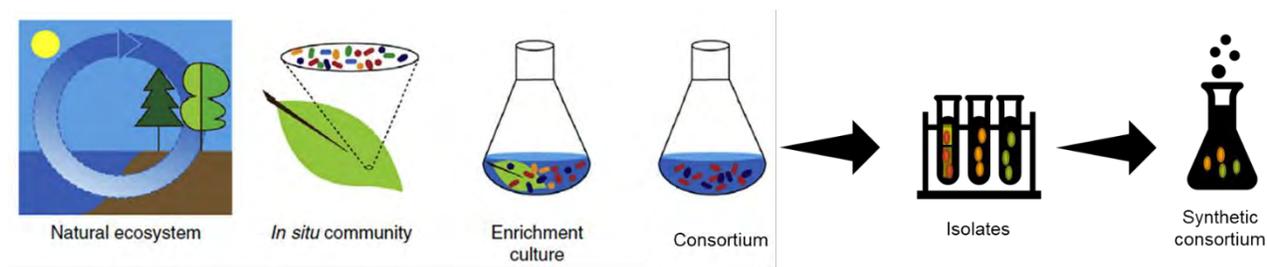
sintrofia sucede cuando el metabolito producido por el organismo A, el cual lo inhibe, es tomado por el organismo B (Großkopf & Soyer, 2014).



**Figura 10.** Tipos de interacciones metabólicas. Los círculos azules y amarillos representan diferentes cepas mientras que lo cuadrados representan los metabolitos. Las interacciones estimulatorias o inhibitorias están indicadas con flechas rojas y verdes. Tomada de Großkopf & Soyer, 2014.

Un consorcio microbiano sintético se puede definir como una comunidad que fue creada artificialmente mediante el cultivo mixto de diferentes especies seleccionadas (dos o más), bajo condiciones de medio bien definidas (Fig. 11). Existen diferentes maneras de diseñar un consorcio microbiano sintético (Jia *et al.*, 2016). Una de las cuales está basada en la función, este enfoque se centra en determinar primero una función para la comunidad y luego caracterizar la estructura y dinámica de la misma en detalle. Dentro de este enfoque, las comunidades microbianas “naturales” utilizadas en biotecnología son de mucho interés, ya que la

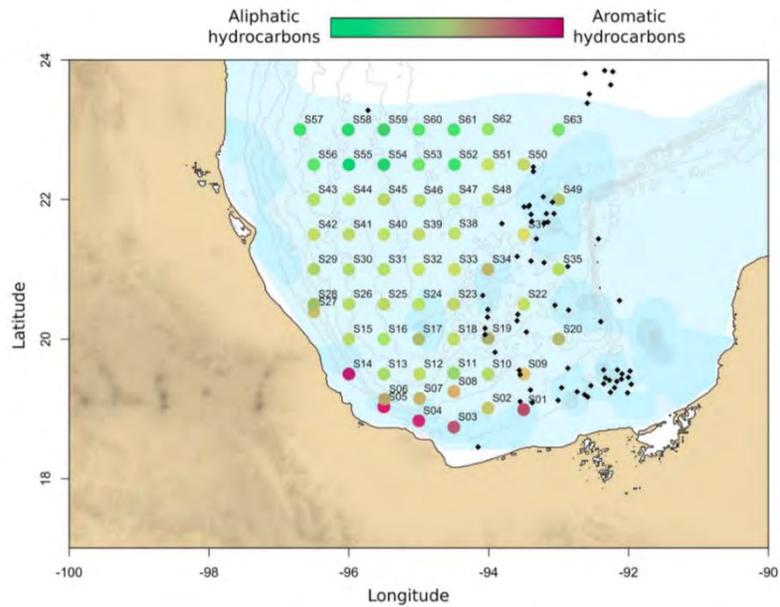
producción o degradación de una sustancia en particular puede actuar como una medida objetiva de desempeño.



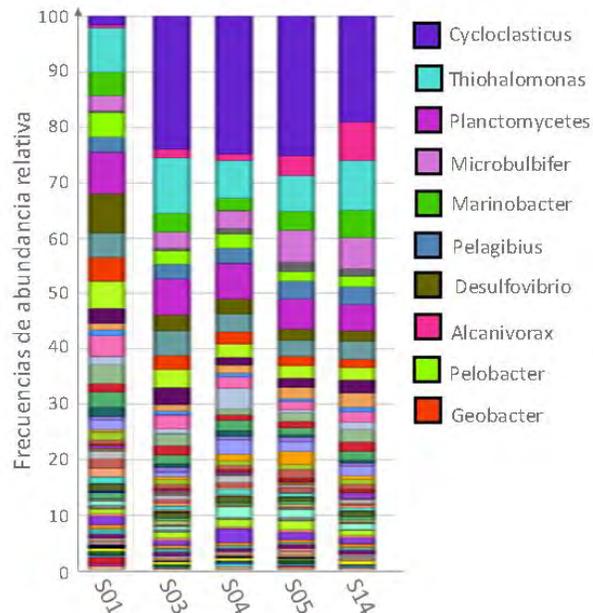
**Figura 11.** En esta ilustración se representa el método para obtener un consorcio bacteriano sintético a partir de un consorcio natural. Modificada de Ponomarova & Patil, 2015.

## 2. Antecedentes directos

Un estudio realizado a partir de la campaña oceanográfica del suroeste del Golfo de México SOGOM-I (2016), acerca de la concentración de hidrocarburos presentes en el sedimento marino demostró que, en la región costera de Veracruz, hay una mayor concentración de hidrocarburos aromáticos policíclicos, en comparación con los hidrocarburos alifáticos (Fig. 12). En las estaciones correspondientes a esta región se realizó un análisis de la diversidad microbiana presente en las muestras de sedimento, mediante la secuenciación masiva del fragmento V3-V4 del gen ribosomal 16S. Los resultados muestran una gran diversidad microbiana comparable con otros sedimentos marinos del mundo y se describen algunos géneros reportados como degradadores de compuestos aromáticos, *Cycloasticus*, *Geobacter* y *Marinobacter* (Fig. 13).

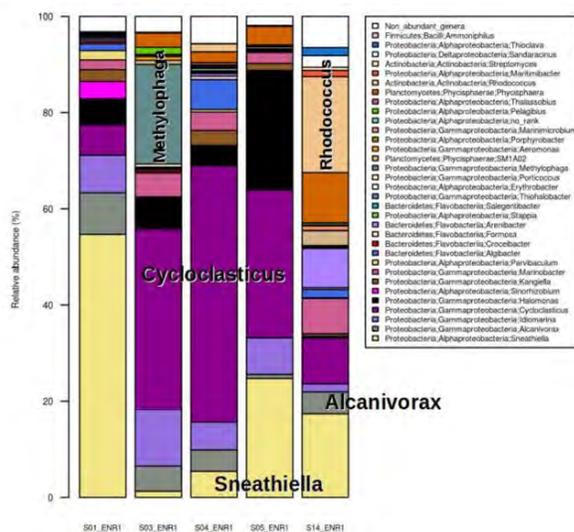


**Figura 12.** En este mapa se indican las diferentes estaciones muestreadas durante la campaña SOGOM-I (CIGoM, 2016). Cada círculo representa una estación de muestreo, los de color verde indican una mayor concentración de hidrocarburos alifáticos que aromáticos, mientras que los rojos lo contrario. Los puntos negros indican la presencia de chapopoterías naturales. Datos no publicados.



**Figura 13.** Abundancia relativa de los géneros bacterianos obtenidos mediante secuenciación del fragmento V3-V4 del gen 16S, utilizando cinco diferentes sedimentos del suroeste del Golfo de México con una alta concentración de compuestos aromáticos. Datos no publicados.

Las muestras de cada estación se cultivaron en presencia de fenantreno como única fuente de carbono durante tres meses, obteniendo así consorcios bacterianos conformados desde 300 hasta 490 géneros distintos (Fig. 14); siendo los géneros más abundantes *Cycloclasticus*, *Alcanivorax*, *Sneathiella* y *Marinobacter*.



**Figura 14.** Abundancia relativa de los géneros bacterianos obtenidos mediante secuenciación del fragmento V3-V4 del gen 16S, utilizando cultivos bacterianos enriquecidos con fenantreno. En blanco se encuentran concentrados los géneros con menor abundancia. Datos no publicados.

Dado que se encontraron géneros relacionados con la degradación de compuestos aromáticos, es probable que se puedan aislar a cepas bacterianas a partir de consorcios enriquecidos que tengan la capacidad de metabolizar sustratos aromáticos.

### 3. Justificación

Para abordar las dificultades asociadas al estudio de las comunidades naturales es posible crear un sistema modelo de comunidades artificiales que conserven las características clave de sus contrapartes naturales, con la finalidad de evaluar sus contribuciones metabólicas de una manera controlada. En este proyecto de investigación proponemos utilizar los consorcios sintéticos como una herramienta biotecnológica empleada para la degradación de una mezcla de compuestos

aromáticos, dada la limitada capacidad que presentan los cultivos aislados para degradar mezclas complejas de estos compuestos.

#### **4. Hipótesis**

Un consorcio bacteriano sintético compuesto de aislados provenientes de sedimentos del Golfo de México con una alta concentración de hidrocarburos aromáticos, es capaz de degradar compuestos aromáticos monocíclicos más eficientemente que sus partes por separado.

#### **5. Objetivo General**

Diseñar un consorcio bacteriano sintético para degradar compuestos aromáticos monocíclicos.

##### **5.1. Objetivos Específicos**

1. Aislar y caracterizar molecularmente bacterias provenientes del Golfo de México con capacidad de crecer en presencia de fenantreno.
2. Evaluar el crecimiento y capacidad de degradación de las cepas seleccionadas sobre compuestos aromáticos por separado y en diferentes combinaciones.
3. Secuenciar el genoma de los aislados y analizar las vías metabólicas involucradas en la degradación de compuestos aromáticos monocíclicos.
4. Inferir las interacciones ecológicas entre las cepas del consorcio en presencia de una mezcla de compuestos aromáticos.

## 6. Metodología

### 6.1. Obtención de los aislados

Con el objetivo de separar a los aislados bacterianos a partir de los consorcios enriquecidos en fenantreno se realizaron diluciones seriadas, las cuales se plaquearon en cajas de EDM sólido compuesto por ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) NaCl 23,6; KCl 0,64;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  4,53;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  5,94;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,98; agar 15; triptona 5 y extracto de levadura 1. Se seleccionaron aproximadamente 40 colonias diferentes de acuerdo a su morfología y se platearon en nuevas cajas de EDM.

Estos mismos aislados se resembraron en 5 ml de medio Burk líquido compuesto por ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0.183;  $\text{CaCl}_2$  0.073;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,267;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.16;  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.0002;  $\text{FeSO}_4$  0.005; NaCl 11.68;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.8;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2. Además, se le adicionó fenantreno al 0.01% (p/v) como única fuente de carbono, esto con el objetivo de seleccionar a las cepas degradadoras que pudieran estar metabolizando este compuesto.

#### 6.1.1. Extracción de DNA genómico y amplificación del gen 16S

Para extraer el DNA genómico de los aislados obtenidos se utilizó el kit Quick-DNA Miniprep de Zymo Research empleando el protocolo para células en suspensión y proteasa K. Para amplificar el gen 16S se utilizaron oligonucleótidos universales 27F (5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG3') y 1492R (I) (5' GGTTACCTTGTTACGACTT3') en un equipo C1000 Series Touch Thermal Cyclers de Bio-Rad empleando las condiciones de tiempo y temperatura óptimas de amplificación (Tabla 2).

**Tabla 2.** Los parámetros para la PCR se definieron con base a la naturaleza de los oligonucleótidos y de la enzima *Phusion*.

| Paso                      | Temperatura | Tiempo  |
|---------------------------|-------------|---------|
| Desnaturalización inicial | 98 °C       | 0.30 s  |
|                           | 98 °C       | 0:10 s  |
| 26 ciclos                 | 60 °C       | 0:30 s  |
|                           | 72 °C       | 1:00 s  |
| Extensión final           | 72 °C       | 10:00 s |

Se purificó el producto de PCR con el kit High Pure PCR Product Purification de Roche para su posterior secuenciación.

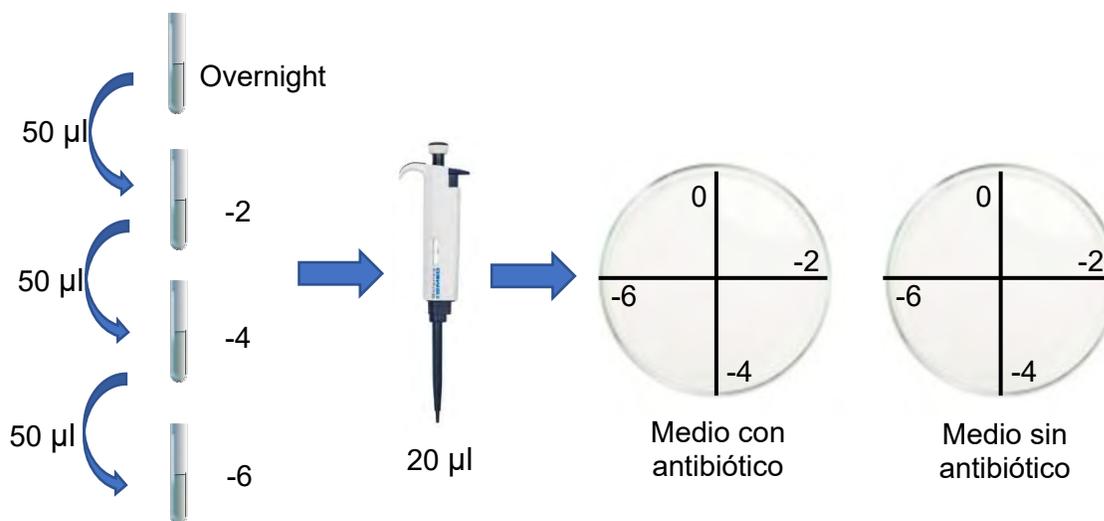
### 6.1.2. Secuenciación y blast del 16S de los aislados

Se secuenció el producto del PCR mediante el método de Sanger a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología, UNAM. Con las secuencias obtenidas se realizó un BLAST en el servidor de la página del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) con la base de datos de las secuencias del RNA ribosomal 16S y excluyendo secuencias de muestras no cultivables y ambientales.

### 6.2. Marcaje de las cepas con diferentes antibióticos

Para identificar a los diferentes aislados dentro de un consorcio se optó por marcarlos a cada uno con diferentes antibióticos. Para ello se utilizaron cuatro diferentes antibióticos (uno por cada aislado), estreptomycin 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , rifampicina 30  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , ácido nalidíxico 20  $\mu\text{g ml}^{-1}$  y kanamicina 30  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , con cada uno de ellos se prepararon cajas de medio sólido tanto en LB como en EDM, como control se prepararon cajas sin antibiótico.

Se realizaron cultivos overnight de cada cepa en un volumen de tres mililitros, de los cuales se tomaron 50  $\mu\text{l}$  para realizar diluciones -2, -4 y -6 en tubos con cinco mililitros de medio de cultivo. Posteriormente, se dividieron las cajas con antibiótico y sin antibiótico en cuatro cuadrantes y en cada una de ellas se colocaron 20  $\mu\text{l}$  de cultivo overnight de cada cepa, así como de las tres diluciones correspondientes. Estas cajas se incubaron a 30  $^{\circ}\text{C}$  durante dos días (Fig. 15).



**Figura 15.** Representación de la metodología empleada para evaluar el crecimiento de cada cepa en cada uno de los diferentes antibióticos utilizados.

Para el caso donde no hubiera crecimiento en alguno de los antibióticos se optó por realizar diluciones hasta  $-6$ , para después tomar 100  $\mu\text{l}$  y plaquearlos hasta en ocho cajas en los medios con antibiótico donde ninguna de las cepas logró crecer.

Al conseguir que cada uno de los aislados creciera en presencia de un antibiótico en particular, se procedió a picar una colonia y estriarla en una nueva caja con antibiótico, esto se realizó hasta en tres ocasiones con la finalidad de obtener colonias puras. Finalmente, se realizaron ensayos para probar que no hubiera resistencia cruzada entre las diferentes cepas, es decir, que únicamente crecieran en un solo antibiótico. Para ello se volvieron a realizar diluciones hasta  $-6$  y se platearon en los diferentes medios con antibiótico.

### **6.3. Cinética de crecimiento de los aislados y el consorcio en presencia de un solo compuesto aromático**

Para comprobar la habilidad de los aislados y el consorcio para degradar compuestos aromáticos monocíclicos se comenzó con la preparación de los pre-inóculos de cada cepa en medio rico líquido overnight, 180 rpm a  $30^{\circ}\text{C}$ . Se tomó la cantidad necesaria del pre-inóculo para inocular a cada tubo de ensayo 5 ml de medio Burk de tal manera que se iniciara con una  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  cercana a 0.1, este pre-inóculo se vertió en un tubo eppendorf estéril de 1.5 ml y se centrifugó a 5000 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos, se decantó el sobrenadante, se le añadió un mililitro de agua Milli-Q (MQ) estéril y se volvió a centrifugar bajo los mismos parámetros.

Los compuestos aromáticos elegidos para realizar estos ensayos fueron el ácido benzoico, ácido gentísico y el ácido protocatecuico en tres diferentes concentraciones; 0.06%, 0.08% y 0.1% (p/v), los cuales se diluyeron en agua MQ estéril para posteriormente ser añadidos al medio (para el caso del ácido benzoico se tuvo que calentar previamente el agua). Debido al carácter ácido de estos compuestos, fueron neutralizados hasta alcanzar un pH 7 añadiendo NaOH 5M al medio. Cada uno de estos medios se filtró con un filtro estéril para jeringa de 0.45  $\mu\text{m}$ .

Finalmente se inocularon por separado cada una de las cepas y el consorcio en seis tubos, tres tubos para medir crecimiento de las cepas y otros tres tubos para medir la disminución del compuesto aromático. Estos tubos se incubaron a  $30^{\circ}\text{C}$  a 180 rpm (Fig. 16).



**Figura 16.** Diseño esquemático de la cinética de crecimiento para los aislados y el consorcio. Los óvalos naranjas representan a las bacterias.

### 6.3.1. Cinética de crecimiento de los aislados y el consorcio en presencia de dos o más compuestos aromáticos.

Para evaluar por un lado el crecimiento, y por otro la disminución de la concentración de los compuestos aromáticos se realizó la misma metodología de inoculación y preparación del medio que con los compuestos de manera individual, solo que en este caso se probó con tres diferentes combinaciones de dos compuestos cada una, a una concentración de 0.05% cada uno, es decir, una concentración final de 0.1% sumando ambos compuestos aromáticos. Por último, el ensayo en presencia de los tres compuestos aromáticos a una concentración de 0.033% cada uno para obtener también una concentración final de 0.1%. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

### 6.4. Medición de DO<sub>600nm</sub> y concentración del compuesto aromático

Para medir la DO se tomaron 400 µl de muestra y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 600nm, estas mediciones se tomaron cada ocho horas con un espectrofotómetro Jenway modelo 6320D.

Para medir la concentración de cada compuesto aromático se tomaron 200 µl de muestra también cada ocho horas y se centrifugaron a 10000 rpm durante 10 minutos, se tomó del sobrenadante el volumen correspondiente y se diluyó en agua estéril alcanzando un volumen final de 200 µl, esto con el objetivo de tener mediciones más confiables que van desde 0.1 a 1, para ello se utilizó el lector de microplaca Synergy 2 Multi-Mode de BioTek. Como cada compuesto tiene un espectro de absorbancia diferente, se tomó la absorbancia máxima de cada uno para poder medir su concentración, siendo la del ácido benzoico a 230nm (Cabel et al., 2000), ácido gentísico y protocatecuico a 332nm y 260nm respectivamente

(Robbins, 2003). Para calcular la concentración de cada compuesto aromático se realizó una curva patrón. De igual manera se calcularon parámetros cinéticos tales como la velocidad de crecimiento específica, tiempo de duplicación y velocidad de consumo volumétrico.

Debido a que en presencia de los tres compuestos aromáticos las lecturas en el espectrofotómetro fueron menos precisas se optó por emplear otra metodología. Para extraer los tres compuestos aromáticos se bajó el pH de cada matraz con HCl 1M hasta 2, posteriormente se realizaron dos extracciones de 10 ml con éter dietílico. La fase orgánica recuperada se evaporó en un rotavapor BUCHI R-300 obteniendo así los compuestos aromáticos.

Estas muestras se analizaron con un equipo de HPLC modelo Agilent 1220, con una columna Phenomenex Luna 5 µm C18 100 Å 150 x 3 mm. Para comenzar, se solubilizaron en agua con ácido fosfórico al 0.02% (solución PA) y se diluyeron de tal manera que se obtuvieran picos más definidos, de igual manera cada muestra se filtró con un filtro de jeringa de 0.45 µm. Debido a que estos tres compuestos son muy similares se empleó el método de gradiente para poder identificarlos de manera individual, de igual manera se leyó cada muestra tres veces ajustando la longitud de onda a la que emiten fluorescencia cada uno (Tabla 3).

**Tabla 3.** Método de gradiente empleado para medir de manera individual cada uno de los tres compuestos aromáticos.

| Tiempo | A%* | B%** | Flujo ml min <sup>-1</sup> |
|--------|-----|------|----------------------------|
| 0      | 80  | 20   | 0.4                        |
| 3      | 80  | 20   | 0.4                        |
| 8      | 20  | 80   | 0.4                        |
| 11     | 20  | 80   | 0.4                        |
| 13     | 80  | 20   | 0.4                        |
| 17     | 80  | 20   | 0.4                        |

\*Solución PA

\*\*Acetonitrilo

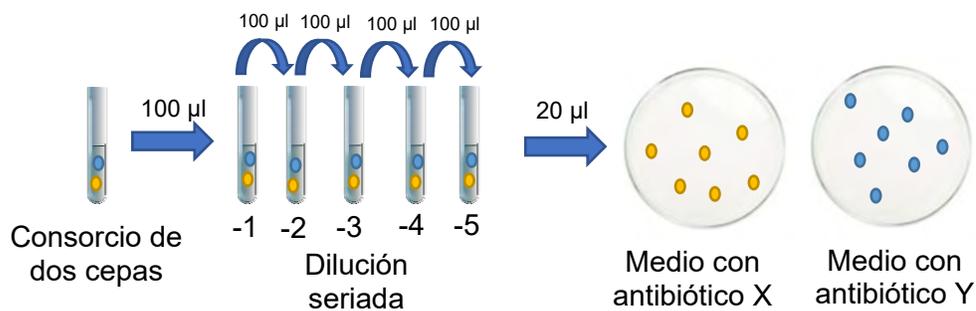
Para calcular el porcentaje degradado de cada uno de estos compuestos se utilizó la siguiente fórmula descrita por Ren et al., 2018:

$$\text{Porcentaje de degradación (\%)} = \frac{C_{ck} - C_f}{C_{ck}} \times 100$$

Donde Cck representa la concentración final de cada sustrato en el control abiótico y Cf representa la concentración de cada sustrato en presencia de cada una de las cepas y el consorcio.

### 6.5. Abundancia relativa de cada aislado dentro del consorcio

Con el objetivo de determinar la abundancia de cada cepa dentro del consorcio sometido a diferentes condiciones de crecimiento (diversos sustratos y sus combinaciones), se realizaron triplicados de los cuales se tomaron 100 µl por tubo para poder hacer diluciones seriadas hasta -5, se tomaron 20 µl y se plaquearon en cajas que contenían cada una, un antibiótico diferente, esto con el objetivo de que cada cepa creciera con su respectivo antibiótico (Fig. 17). Para cada ensayo se calculó la abundancia relativa en tres diferentes tiempos, al inicio, durante la fase exponencial y finalmente la fase estacionaria, para ello se contaron las unidades formadoras de colonias de cada cepa por triplicado, así como las totales para poder sacar el porcentaje de cada aislado.



**Figura 17.** Procedimiento para calcular la abundancia relativa de cada cepa dentro del consorcio. Cada una de las cepas es resistente a un antibiótico en particular. La cepa amarilla solo es resistente al antibiótico X, mientras que la cepa azul solo es resistente al antibiótico Y.

### 6.6. Secuenciación y ensamble del genoma de los aislados

Para reconstruir el genoma de los componentes del consorcio, estas cepas se crecieron por separado en cajas de medio rico. Se levantó el tapete celular de cada caja y se inocularon todas juntas en dos matraces de 50 ml los cuales contenían 25 ml de medio Burk adicionado con 0.02% de fenantreno (p/v) como única fuente de carbono. Estos matraces se incubaron durante dos semanas a 30 °C. Posteriormente el DNA de cada cultivo fue extraído utilizando el kit quick-gDNA miniprep (Zymo Research) siguiendo las especificaciones del fabricante. Se

visualizó el DNA obtenido en un gel de agarosa al 1%. El DNA extraído se envió a la unidad de secuenciación masiva del Instituto de Biotecnología para ser secuenciado por tecnologías de Oxford Nanopore MinION e Illumina.

Las lecturas obtenidas mediante Oxford Nanopore MinION fueron ensambladas usando el algoritmo designado especialmente para lecturas largas Canu v1.7 (Koren et al., 2016).

Con el objetivo de mejorar los ensamblados obtenidos con Canu, se usaron lecturas de Illumina de 2x75 bp obtenidas de los aislados. Para la cepa de *Paenarthrobacter* sp. en la cual no se tuvo buena profundidad de secuenciamiento, su genoma fue ensamblado usando solamente las lecturas de Illumina a través de Velvet v1.2.10 (Zerbino, 2010) con k-meros de 63. Se probaron diferentes estrategias de ensamblaje y se evaluó la integridad y contaminación utilizando CheckM v1.0.12 toolkit (Parks et al., 2015). Para ensamblados híbridos provenientes de lecturas de MinION e Illumina, se probó hybridSPAdes v3.13.0 (Antipov et al., 2016) y MaSuRCA v3.2.8 (Zimin et al., 2013). El primero resultó la mejor opción para *Alcanivorax* sp. y el posterior se desempeñó bien para *Pseudomonas* sp. Para el caso de *Alcanivorax xenomutans* y *Paenarthrobacter* sp., los contigs resultantes fueron mejorados con las herramientas REAPR v1.0.18 (Hunt et al., 2013), BESST v2.2.5 (Sahlin et al., 2014), GapFiller v1-10 (Nadalin et al. 2012) e iCORN2 v0.95 (Otto et al., 2010).

Debido a que en esta primera aproximación no fue posible secuenciar el genoma de *Halomonas* sp. se decidió secuenciarlo de manera independiente. Para ello se partió de medio EDM suplementado con glucosa al 0.1% (v/v), para después extraer y visualizar el DNA bajo la misma metodología empleada anteriormente. También se mandó a secuenciar a la unidad de secuenciación masiva del Instituto de Biotecnología, pero únicamente por tecnologías de Illumina.

A partir de las lecturas de Illumina de 2x75 bp se evaluaron dos ensambladores diferentes, ABySS 2.0 (Jackman et al., 2017) y Velvet v1.2.10 (Zerbino, 2010) con k-meros de 41, siendo este último con el que se obtuvo mejores resultados, de igual modo se evaluó la calidad del genoma y se mejoró con las mismas herramientas que en los otros aislados.

Para crear las imágenes circulares de los genomas se utilizó el programa DNA Plotter/Artemis, con el cual se abrió el archivo .fasta de cada genoma. Posteriormente se carga el archivo .gff del genoma (obtenido del RAST a partir del

archivo .fasta), y finalmente se seleccionó la opción para poder ser visualizado en DNAPlotter.

### **6.6.1. Identificación taxonómica**

Estos genomas ensamblados fueron analizados en comparación con genomas de referencia en la plataforma TYGS (Meier-Kolthoff & Göker, 2019) con la finalidad de tener una identificación taxonómica más exacta. Para complementar estos resultados también se utilizó Mash D (Ondov et al., 2016), el cual es un estimador de distancias filogenéticas, así como un fastANI (Jain et al., 2018).

### **6.6.2. Anotación funcional de los componentes del consorcio**

Se realizó la anotación funcional de cada uno de los genomas para poder identificar las posibles vías de degradación con las que cuenta cada una de las cepas, esto en el servidor KEGG (<https://www.genome.jp/tools/kaas/>) empleando el método BBH (bi-directional best hit), y seleccionando el set de genes para procariontes.

### **6.6.3. RAST**

A partir de los resultados de las vías de degradación de interés que se obtuvieron en el KEGG, se utilizó la herramienta RAST (<http://rast.theseed.org/FIG/rast.cgi>), dejando los parámetros predeterminados, esto con el objetivo de identificar el contexto genómico de los genes implicados en estas vías.

De igual manera se hizo un Blast de proteínas en el NCBI ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)) de cada una de las secuencias de aminoácidos de las proteínas que estuvieran involucradas con la degradación de estos compuestos aromáticos, esto con la finalidad de corroborar que las anotaciones realizadas por el RAST fueran correctas.

## 7. Resultados y discusión

### 7.1. Aislados crecidos en presencia de fenantreno

Se lograron aislar cuatro cepas con diferente morfología a partir de los consorcios enriquecidos con fenantreno. (Fig. 18). Sin embargo, al medir el crecimiento y la capacidad de degradar este hidrocarburo aromático, de cada una de estas cepas de manera individual, no se encontraron resultados positivos en ninguna de ellas. En un estudio similar hecho por Wang et al., en 2018, aislaron cepas pertenecientes a los géneros de *Halomonas*, *Chromohalobacter*, *Thalassospira*, y *Alcanivorax* a partir un consorcio enriquecido con fenantreno, las cuales tampoco fueron capaces de crecer de manera individual en presencia de este compuesto aromático. Lo que estos autores explican es que probablemente estas cepas jueguen un papel importante en la degradación río abajo (vías centrales) de estos HAPs ya que en ellas se pudieron encontrar diferentes genes implicados en la degradación de intermediarios centrales.



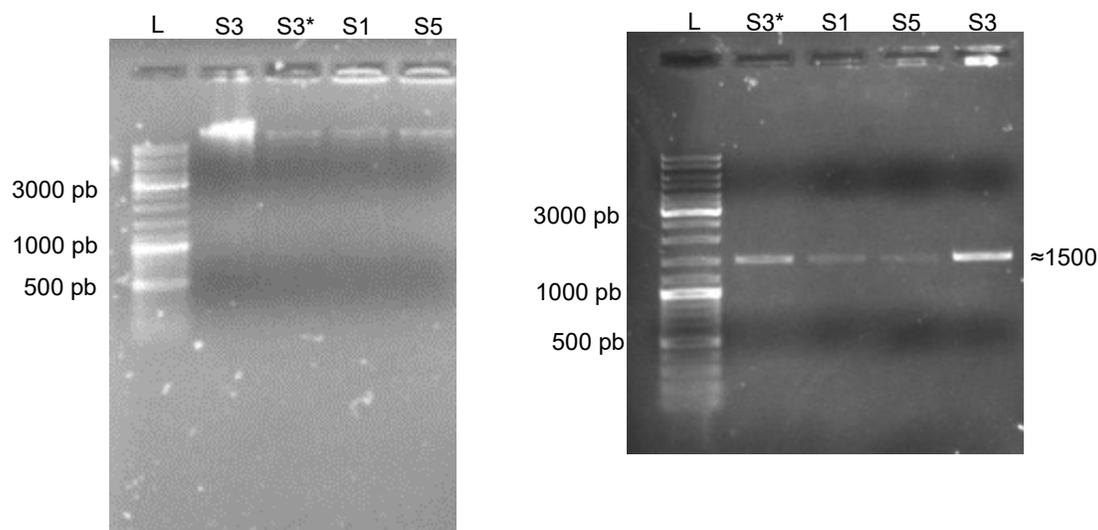
**Figura 18.** En esta fotografía se observan las diferentes cepas aisladas de los consorcios crecidos en fenantreno.

Estas cepas nombradas arbitrariamente S14-6, S03-7, S03-2, S05-3, provienen de las estaciones S14, S03, y S05 respectivamente.

#### 7.1.1. Extracción del DNA genómico y amplificación del gen 16S

Para la identificación de las cepas aisladas, se extrajo el DNA genómico y se utilizó como templado para una PCR utilizando oligonucleótidos universales (27F y 1492R) que amplifican el gen 16S ribosomal. Para comprobar la extracción de DNA, así como la amplificación y purificación del producto de la PCR, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% (Fig. 19). Posteriormente el fragmento 16S

se secuenció por el método de Sanger en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología.



**Figura 19.** En la fotografía de la izquierda se observan las bandas del DNA genómico extraído. En la fotografía de la derecha se muestra el producto de PCR purificado. (L) Ladder, (S1) S14-6, (S3\*) S03-7, (S3) S03-2, y (S5) S05-3.

### 7.1.2. Identificación del género de los aislados

Las secuencias obtenidas fueron analizadas utilizando el programa Blast del NCBI, dando como resultado que los aislados anteriormente nombrados S14-6, S03-2, S05-3 y S03-7 pertenecen a los géneros de *Alcanivorax* (Tabla 4), *Paenarthrobacter* (Tabla 5), *Halomonas* (Tabla 6) y *Pseudomonas* (Tabla 7), respectivamente.

**Tabla 4.** Cepas bacterianas con mayor similitud con el aislado S14-6 con base en el gen RNA ribosomal 16S

| Descripción   | Puntuación máxima | Puntuación total | Cobertura | Valor E | Identidad |
|---|-------------------|------------------|-----------|---------|-----------|
| <i>Alcanivorax xenomutans</i> strain JC109 16S ribosomal RNA gene. _partial sequence  | 1539              | 1539             | 99%       | 0.0     | 99.88%    |
| <i>Alcanivorax dieselolei</i> strain B5 16S ribosomal RNA gene. _partial sequence     | 1526              | 1526             | 100%      | 0.0     | 99.52%    |
| <i>Alcanivorax dieselolei</i> strain B-5 16S ribosomal RNA gene. _partial sequence    | 1526              | 1526             | 100%      | 0.0     | 99.52%    |
| <i>Alcanivorax balearicus</i> strain MACL04 16S ribosomal RNA gene. _partial sequence | 1485              | 1485             | 100%      | 0.0     | 98.58%    |

**Tabla 5.** Cepas bacterianas con mayor similitud con el aislado S03-2 con base en el gen RNA ribosomal 16S.

| Descripción   | Puntuación máxima | Puntuación total | Cobertura | Valor E | Identidad |
|---|-------------------|------------------|-----------|---------|-----------|
| <i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i> strain G2-1 16S ribosomal RNA gene. _partial sequence | 1308              | 1308             | 100%      | 0.0     | 99.72%    |
| <i>Paenarthrobacter aurescens</i> strain DSM 20116 16S ribosomal RNA gene. _partial sequence    | 1280              | 1280             | 100%      | 0.0     | 99.02%    |
| <i>Paenarthrobacter ilicis</i> strain DSM 20138 16S ribosomal RNA gene. _partial sequence       | 1266              | 1266             | 100%      | 0.0     | 98.60%    |
| <i>Arthrobacter bambusae</i> strain THG-GM18 16S ribosomal RNA gene. _partial sequence          | 1230              | 1230             | 100%      | 0.0     | 97.76%    |

**Tabla 6.** Cepas bacterianas con mayor similitud con el aislado S05-3 con base en el gen RNA ribosomal 16S.

| Descripción   | Puntuación máxima | Puntuación total | Cobertura | Valor E | Identidad |
|---|-------------------|------------------|-----------|---------|-----------|
| <i>Halomonas saccharovitans</i> strain AJ275 16S ribosomal RNA gene. _partial sequence  | 1463              | 1463             | 100%      | 0.0     | 97.87%    |
| <i>Halomonas aestuarii</i> Hb3 16S ribosomal RNA gene. _partial sequence                | 1459              | 1459             | 100%      | 0.0     | 97.76%    |
| <i>Halomonas shengliensis</i> strain SL014B-8516S ribosomal RNA gene. _partial sequence | 1459              | 1459             | 100%      | 0.0     | 97.76%    |
| <i>Halomonas aidingensis</i> strain S-3116S ribosomal RNA gene. _partial sequence       | 1454              | 1454             | 100%      | 0.0     | 97.64%    |

**Tabla 7.** Cepas bacterianas con mayor similitud con el aislado S03-7 con base en el gen RNA ribosomal 16S.

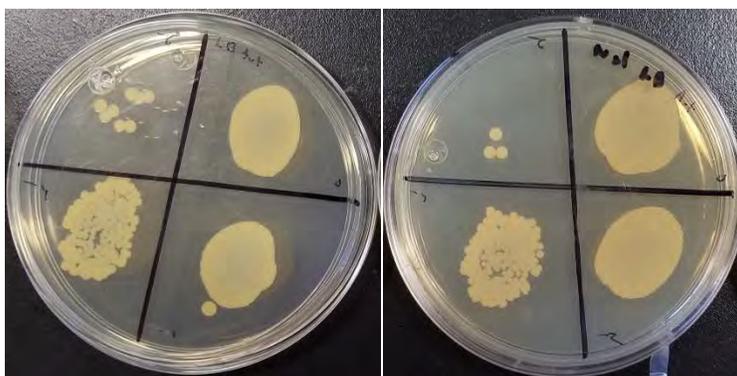
| Descripción  | Puntuación máxima | Puntuación total | Cobertura | Valor E | Identidad |
|--|-------------------|------------------|-----------|---------|-----------|
| <i>Pseudomonas alcaligenes</i> strain ATCC 14909 16S ribosomal RNA gene. _partial sequence | 1447              | 1447             | 99%       | 0.0     | 98.42%    |
| <i>Pseudomonas alcaligenes</i> strain 14159 16S ribosomal RNA gene. _partial sequence      | 1441              | 1441             | 98%       | 0.0     | 98.65%    |
| <i>Pseudomonas alcaligenes</i> strain 12411 16S ribosomal RNA gene. _partial sequence      | 1389              | 1389             | 99%       | 0.0     | 97.10%    |
| <i>Pseudomonas alcaligenes</i> 16S ribosomal RNA gene. _partial sequence                   | 1389              | 1389             | 95%       | 0.0     | 98.60%    |

Cabe destacar que ya existen reportes sobre la capacidad de degradación de compuestos aromáticos por parte de especies pertenecientes a estos géneros. En un estudio se encontró que entre los géneros más predominantes en la degradación de HAP, en sedimentos del océano Ártico, se encontraba *Alcanivorax* (Dong et al., 2015). Recientemente se encontró mediante un análisis genómico que la cepa *Paenarthrobacter* sp. HW13, la cual fue aislada de un consorcio degradador de lignina, posee ocho clústeres de genes relacionados con la degradación de compuestos aromáticos (Moraes et al., 2018). Oie et al., (2007) descubrieron que

*Halomonas campisalis* fue capaz de degradar compuestos aromáticos, tales como el benzoato y salicilato en condiciones de salinidad y pH altos. Por último, Nwinyi y colaboradores (2016), aislaron a dos cepas pertenecientes al género de *Pseudomonas* capaces de degradar parcialmente compuestos aromáticos complejos como el pireno, criseno, naftaleno y fluorantreno a bajas concentraciones.

## 7.2. Marcaje de cepas

Se logró marcar satisfactoriamente cada uno de los aislados con un antibiótico en particular. En la cepa *Paenarthrobacter* sp. se encontró que cuenta con una resistencia natural al ácido nalidíxico (Fig. 20). Recientemente en un estudio se pudo aislar de un manglar a una cepa perteneciente al género *Paenarthrobacter*, la cual pudo crecer en un medio de cultivo selectivo para actinobacterias que contenía 20 mg/L de ácido nalidíxico (Li et al., 2019). Las otras tres cepas en nuestro estudio fueron forzadas a crecer en cada uno de los antibióticos restantes, obteniendo un crecimiento de *Alcanivorax* sp. con rifampicina, *Halomonas* sp. con estreptomicina y por último *Pseudomonas* sp. con kanamicina.



**Figura 20.** Cajas de medio LB sin antibiótico (izquierda) y con antibiótico (derecha) con las diluciones realizadas con la cepa *Paenarthrobacter* sp. Se puede observar que esta cepa en particular tiene una resistencia innata al ácido nalidíxico ya que su crecimiento es muy similar en ambos medios.

De igual modo, se comprobó que no hubiera crecimiento por parte de los aislados en un antibiótico diferente al que se le había asignado (Fig. 21).



**Figura 21.** Cajas de medio EDM con antibiótico (izquierda) y LB con antibiótico (derecha) con las diluciones realizadas con la cepa *Halomonas* sp. Se puede observar que esta cepa únicamente crece en presencia del antibiótico que se le fue asignado.

Con estos resultados fue posible identificar la abundancia relativa de cada uno de los aislados que se encontraran formando parte de un consorcio sintético.

### **7.3. Cinética de crecimiento de los aislados y el consorcio en presencia de un compuesto aromático**

Los cuatro aislados bacterianos que se mencionaron en la sección anterior, fueron crecidos en presencia de tres compuestos aromáticos, ácido benzoico, gentísico y protocatecuico. Esto dio como resultado que únicamente dos de ellos pudieron crecer en presencia de cada uno de los compuestos. Por lo anterior, se seleccionaron solo las cepas *Paenarthrobacter* sp. y *Halomonas* sp. para conformar el consorcio bacteriano de este estudio. Estas cepas lograron crecer de manera aislada y en consorcio hasta una concentración de 0.1% con cada uno de los tres compuestos aromáticos.

#### *Ácido benzoico*

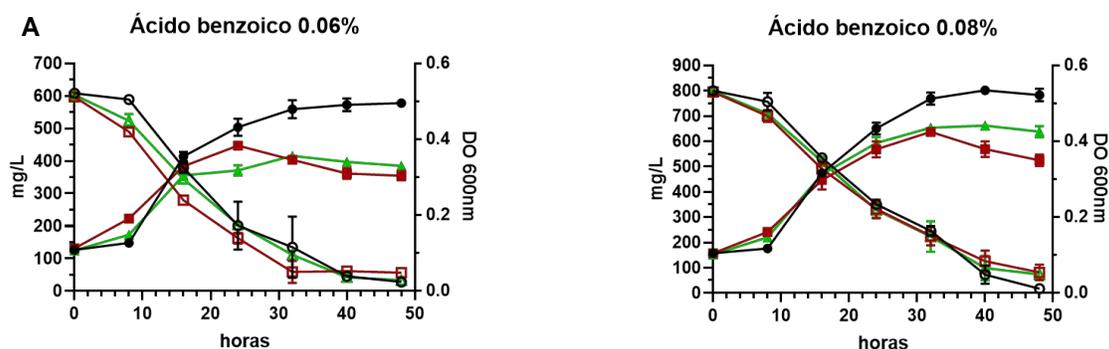
Se realizaron cinéticas de crecimiento de las dos cepas y el consorcio con ácido benzoico. Se observó que *Paenarthrobacter* sp. creció en las tres concentraciones probadas 0.06%, 0.08% y 0.1% a pesar de que su fase latencia fue más prolongada (Fig. 22A). La velocidad de crecimiento de *Halomonas* sp. fue menor que la de *Paenarthrobacter* sp. (Tabla 8), incluso el cultivo decae después de las 32 horas. La velocidad de crecimiento de las dos cepas juntas fue mayor que la de *Halomonas* sp. sola, pero no pudo superar en crecimiento a *Paenarthrobacter* sp. Esta diferencia en su crecimiento nos indica que ambas cepas compiten por el mismo

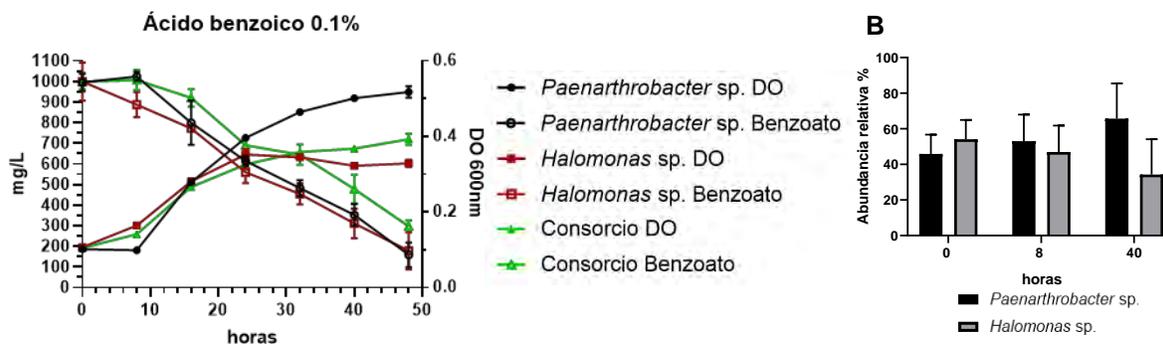
sustrato cuando se encuentran juntas, así como lo señala Freilich y colaboradores (2011).

La velocidad de consumo volumétrico de este compuesto aromático en las diferentes concentraciones probadas fue muy similar para los aislados y el consorcio (Tabla 8). Si bien es cierto que la concentración del compuesto aromático disminuye prácticamente de la misma manera en los aislados y en el consorcio, independientemente de su concentración, el crecimiento fue muy diferente en cada uno de ellos. Esto podría deberse a que *Paenarthrobacter* sp. aprovecha el ácido benzoico de una manera más eficiente que *Halomonas* sp.

La abundancia relativa de cada aislado dentro del consorcio se inclina favorablemente hacia *Paenarthrobacter* sp. la cual conforma un 61% del consorcio después de 40 horas (Fig. 22B).

Hasta la fecha no se ha reportado a alguna cepa perteneciente al género de *Paenarthrobacter* que tenga la capacidad de crecer en presencia de ácido benzoico, sin embargo, Meng y colaboradores (2017) encontraron en el genoma de *Paenarthrobacter nicotinovorans* Hce-1 genes asociados a la degradación de este compuesto. Oie et al., (2007) encontraron que la cepa *Halomonas campisalis* logró crecer hasta una concentración de 0.16% de benzoato.





**Figura 22.** (A) Cinéticas de crecimiento y disminución de ácido benzoico en diferentes concentraciones. Las figuras rellenas representan la densidad óptica mientras que las figuras sin relleno simbolizan la concentración del sustrato. (B) Abundancia relativa de las dos cepas que conforman el consorcio tomada en diferentes tiempos.

**Tabla 8.** Parámetros cinéticos de las dos cepas y el consorcio en diferentes concentraciones de ácido benzoico.

| %    | Cepa                        | Velocidad de crecimiento ( $\text{h}^{-1}$ ) | Tiempo de duplicación (h) | Velocidad de consumo volumétrico ( $\text{g/L h}^{-1}$ ) |
|------|-----------------------------|--|---------------------------|--|
| 0.06 | <i>Paenarthrobacter</i> sp. | $0.077 \pm 0.004$                            | $9.063 \pm 0.435$         | $0.024 \pm 0.005$  |
|      | <i>Halomonas</i> sp.        | $0.053 \pm 0.001$                            | $13.129 \pm 0.15$         | $0.020 \pm 0.001$  |
|      | Consorcio                   | $0.05 \pm 0.003$                             | $13.974 \pm 0.708$        | $0.020 \pm 0.001$  |
| 0.08 | <i>Paenarthrobacter</i> sp. | $0.082 \pm 0.001$                            | $8.49 \pm 0.11$           | $0.025 \pm 0.002$  |
|      | <i>Halomonas</i> sp.        | $0.056 \pm 0.005$                            | $12.453 \pm 1.076$        | $0.023 \pm 0.003$  |
|      | Consorcio                   | $0.060 \pm 0.001$                            | $11.468 \pm 0.201$        | $0.024 \pm 0.002$  |
| 0.1  | <i>Paenarthrobacter</i> sp. | $0.087 \pm 0.002$                            | $7.98 \pm 0.211$          | $0.027 \pm 0.002$  |
|      | <i>Halomonas</i> sp.        | $0.051 \pm 0.003$                            | $13.508 \pm 0.808$        | $0.022 \pm 0.005$  |
|      | Consorcio                   | $0.050 \pm 0.004$                            | $13.787 \pm 1.058$        | $0.020 \pm 0.004$  |

El valor  $\pm$  expresa la desviación estándar.

### Ácido gentísico

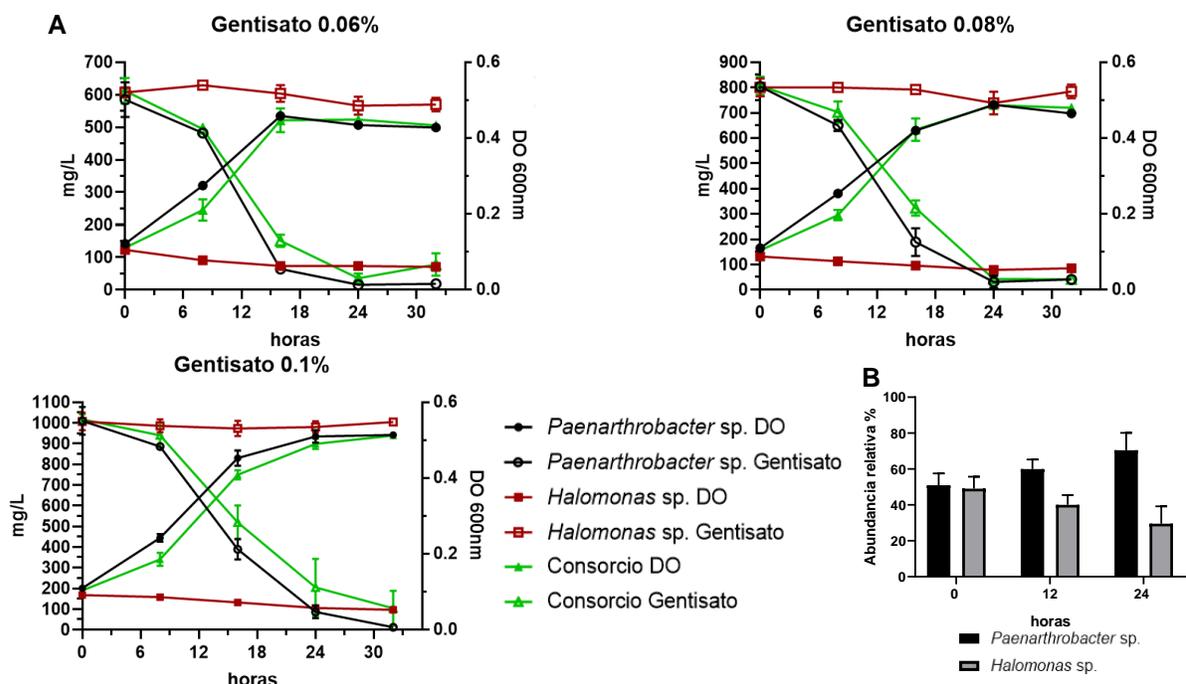
En el caso del ácido gentísico, cabe señalar que *Halomonas* sp. no pudo crecer en presencia de este compuesto aromático bajo ninguna concentración: esto se relaciona con el hecho de que la cantidad de gentisato en el medio se mantiene constante a lo largo de toda la cinética; es decir, que probablemente esta bacteria no es capaz de tomarlo del medio (Fig. 23A). Por otro lado, *Paenarthrobacter* sp. y el consorcio tuvieron velocidades de crecimiento similares en las tres diferentes concentraciones de este compuesto aromático (Tabla 9).

Del mismo modo es posible observar que la velocidad de consumo volumétrico es parecida en *Paenarthrobacter* sp. y el consorcio en las concentraciones 0.06 y

0.08%, y que para el caso de la cepa sola, esta aumenta con la concentración de gentisato; debido a esto es posible observar una diferencia significativa en la velocidad de consumo volumétrico entre *Paenarthrobacter* sp. ( $0.039 \pm 0.002 \text{ g/L h}^{-1}$ ) y el consorcio ( $0.031 \pm 0.005 \text{ g/L h}^{-1}$ ) a una concentración de 0.1% (Tabla 9).

Como era de esperarse, la cepa predominante dentro de este consorcio fue *Paenarthrobacter* sp., la cual constituye el 68.25% del consorcio una vez alcanzada la fase estacionaria. Sin embargo, a pesar del hecho de que no se detectó crecimiento de *Halomonas* sp. en presencia de este compuesto aromático, ésta se mantuvo presente a lo largo de toda la cinética; lo cual podría deberse a que estuviese tomando de alguna forma, un intermediario en la vía de degradación del gentisato que *Paenarthrobacter* sp. estuviese expulsando hacia el medio (Fig. 23B).

No existen reportes en la literatura sobre la capacidad de degradar gentisato por parte de cepas pertenecientes a este género, sin embargo, Moraes y colaboradores (2018) encontraron en el genoma de una cepa perteneciente al género de *Panearthrobacter* genes implicados en la degradación de gentisato y protocatecuato.



**Figura 23.** (A) Cinéticas de crecimiento y disminución de ácido gentísico en diferentes concentraciones. Las figuras rellenas representan la densidad óptica mientras que las figuras sin relleno simbolizan la concentración del sustrato. (B) Abundancia relativa de las dos cepas que conforman el consorcio tomada en diferentes tiempos.

**Tabla 9.** Parámetros cinéticos de las dos cepas y el consorcio en diferentes concentraciones de ácido gentísico.

| %    | Cepa                        | Velocidad de crecimiento (h <sup>-1</sup> ) | Tiempo de duplicación (h) | Velocidad de consumo volumétrico (g/L h <sup>-1</sup> ) |
|------|-----------------------------|---|---------------------------|---|
| 0.06 | <i>Paenarthrobacter</i> sp. | 0.083 ± 0.004                               | 8.352 ± 0.369             | 0.033 ± 0.003   |
|      | <i>Halomonas</i> sp.        | -   | -                         | -   |
|      | Consortio                   | 0.087 ± 0.005                               | 7.991 ± 0.464             | 0.029 ± 0.004   |
| 0.08 | <i>Paenarthrobacter</i> sp. | 0.084 ± 0.006                               | 8.271 ± 0.524             | 0.035 ± 0.001   |
|      | <i>Halomonas</i> sp.        | -   | -                         | -   |
|      | Consortio                   | 0.088 ± 0.006                               | 7.942 ± 0.521             | 0.033 ± 0.002   |
| 0.1  | <i>Paenarthrobacter</i> sp. | 0.089 ± 0.003                               | 7.829 ± 0.261             | 0.039 ± 0.002   |
|      | <i>Halomonas</i> sp.        | -   | -                         | -   |
|      | Consortio                   | 0.086 ± 0.003                               | 8.083 ± 0.31              | 0.031 ± 0.005   |

El valor ± expresa la desviación estándar.

### Ácido protocatecuico

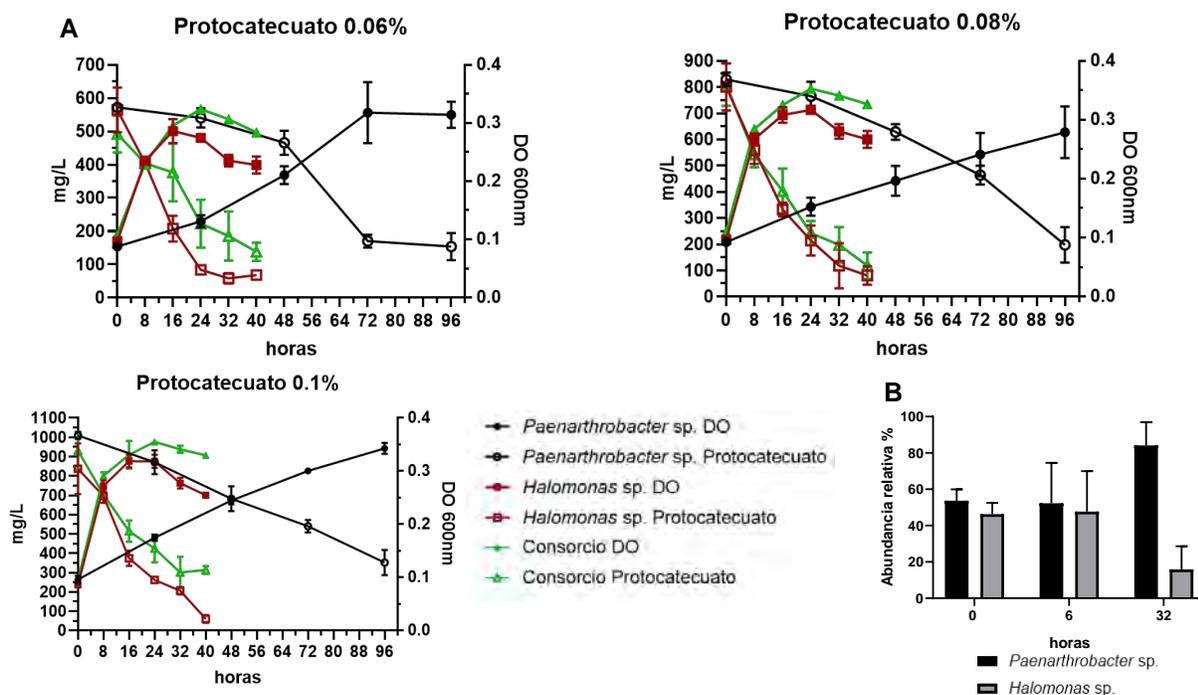
Finalmente, para el caso del ácido protocatecuico se pudo observar que la velocidad de crecimiento por parte de *Paenarthrobacter* sp. en presencia de este compuesto aromático fue más lento en comparación con *Halomonas* sp., así como del consorcio, ya que su tiempo de duplicación es de  $39.517 \pm 7.517$  h, mientras que a *Halomonas* sp. es de  $10.368 \pm 1.143$  h a una concentración de 0.06% (Tabla 10).

Con este sustrato el crecimiento de *Halomonas* sp. y del consorcio es muy similar durante la fase exponencial; no obstante, al llegar a la fase estacionaria es posible observar una disminución de la densidad óptica mayor en el aislado que en el consorcio, lo cual sucede en las tres diferentes concentraciones probadas (Fig. 24A).

La velocidad de consumo volumétrico es mayor en *Halomonas* sp.  $0.022 \pm 0.006$  g/L h<sup>-1</sup>, en comparación con el consorcio  $0.011 \pm 0.002$  g/L h<sup>-1</sup>, esto a una concentración de 0.06% de protocatecuato, sin embargo, en las otras dos concentraciones la velocidad de consumo fue muy similar.

Ambos aislados se encuentran en una proporción similar durante la fase exponencial; sin embargo, *Paenarthrobacter* sp. se convierte en la cepa predominante después de esta fase. Esto podría explicar en parte el hecho de que en el consorcio el crecimiento y la disminución en la concentración del protocatecuato fuera diferente en comparación con *Halomonas* sp. Estas diferencias podrían deberse al hecho de que *Paenarthrobacter* sp. aprovechará mejor esta fuente de carbono (Fig. 24B).

No existen reportes sobre cepas de *Paenarthrobacter* que sean capaces de crecer en presencia de protocatuato. Abdelkafi y colaboradores (2006) encontraron una especie de *Halomonas* capaz de degradar ácido protocatecuico a una concentración de 0.077%.



**Figura 24.** (A) Cinéticas de crecimiento y disminución de ácido protocatecuico en diferentes concentraciones. Las figuras rellenas representan la densidad óptica mientras que las figuras sin relleno simbolizan la concentración del sustrato. (B) Abundancia relativa de las dos cepas que conforman el consorcio tomada en diferentes tiempos.

**Tabla 10.** Parámetros cinéticos de las dos cepas y el consorcio en diferentes concentraciones de ácido protocatecuico.

| %    | Cepa                        | Velocidad de crecimiento (h <sup>-1</sup> ) | Tiempo de duplicación (h) | Velocidad de consumo volumétrico (g/L h <sup>-1</sup> ) |
|------|-----------------------------|---|---------------------------|---|
| 0.06 | <i>Paenarthrobacter</i> sp. | 0.018 ± 0.003                               | 39.517 ± 7.517            | 0.008 ± 0.001   |
|      | <i>Halomonas</i> sp.        | 0.067 ± 0.008                               | 10.368 ± 1.143            | 0.022 ± 0.006   |
|      | Consortio                   | 0.062 ± 0.003                               | 11.128 ± 0.570            | 0.011 ± 0.002   |
| 0.08 | <i>Paenarthrobacter</i> sp. | 0.016 ± 0.002                               | 44.611 ± 4.258            | 0.006 ± 0.001   |
|      | <i>Halomonas</i> sp.        | 0.073 ± 0.005                               | 9.56 ± 0.62               | 0.029 ± 0.004   |
|      | Consortio                   | 0.068 ± 0.002                               | 10.257 ± 0.236            | 0.025 ± 0.010   |
| 0.1  | <i>Paenarthrobacter</i> sp. | 0.02 ± 0.002                                | 35.644 ± 3.465            | 0.007 ± 0.001   |
|      | <i>Halomonas</i> sp.        | 0.082 ± 0.002                               | 8.488 ± 0.213             | 0.029 ± 0.006   |
|      | Consortio                   | 0.078 ± 0.006                               | 8.933 ± 0.693             | 0.026 ± 0.009   |

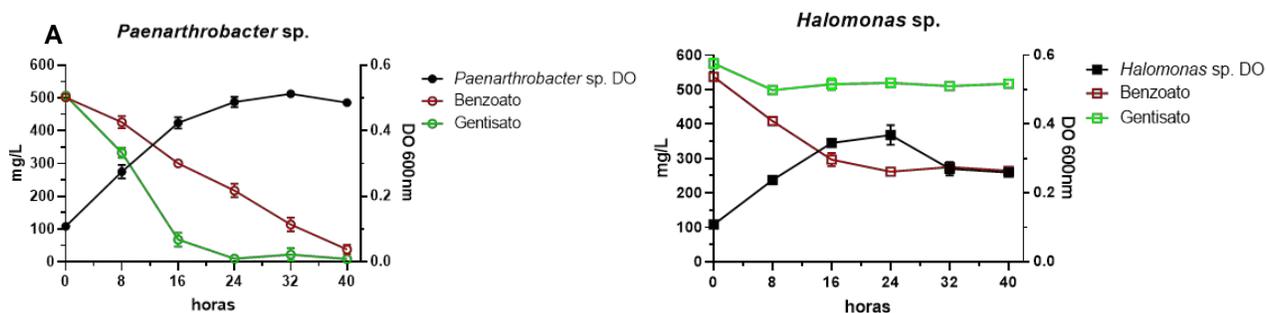
El valor ± expresa la desviación estándar.

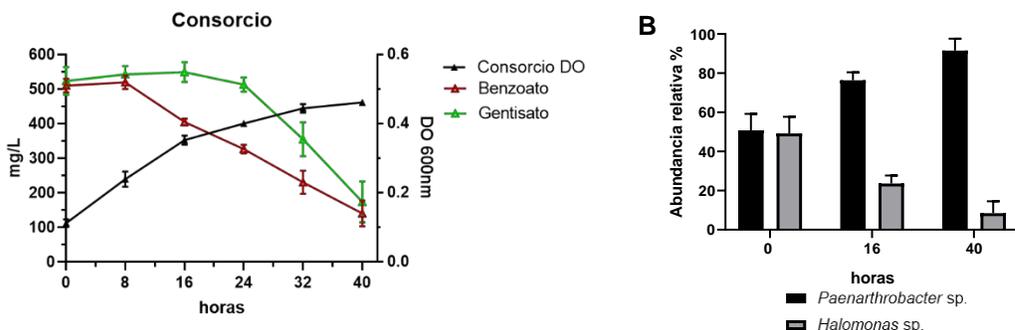
### 7.3.1. Cinética de crecimiento de los aislados en dos o más compuestos aromáticos

#### Ácido benzoico/ácido gentísico

En la combinación de dos diferentes compuestos aromáticos hecha con ácido benzoico y gentísico, se encontró que la cepa *Paenarthrobacter* sp. utiliza ambos aromáticos de manera simultánea, siendo el gentisato su fuente preferencial de carbono ya que la velocidad de consumo volumétrico es de  $0.028 \pm 0.002$  g/L h<sup>-1</sup>, mientras que de benzoato es de  $0.013 \pm 0.001$  g/L h<sup>-1</sup>. En estudios similares también se ha encontrado que bacterias pertenecientes al género *Roseobacter* y *Cupriavidus pinatubonensis* degradan de manera simultánea compuestos aromáticos (Gulvik & Buchan 2013; Pérez-Pantoja et al., 2015). En el caso de *Halomonas* sp. la presencia de gentisato parece tener un efecto antagónico en esta cepa sobre su capacidad de tomar el benzoato del medio, el cual se encuentra a una concentración de 0.05%, ya que después de 40 horas solo disminuyó aproximadamente 47.12% (Fig. 25A), mientras que con el benzoato como única fuente de carbono y a una concentración dos veces mayor, se obtuvo una disminución del 68.87% en el mismo lapso de tiempo (Fig. 22A). Esto ya se ha demostrado en otros trabajos sobre la represión en la degradación que se da en mezclas de compuestos aromáticos (Nichols & Harwood, 1995); lo cual podría deberse a que el gentisato estuviera interfiriendo en la capacidad de esta cepa de transportar el benzoato dentro de la célula.

Cuando se prueba el consorcio, es posible observar que el benzoato es primer sustrato en ser tomado, mientras que el gentisato comienza a disminuir de manera importante después de las 24 horas. Esto podría deberse a una competencia por el mismo sustrato por ambas cepas, ya que durante la etapa exponencial *Paenarthrobacter* sp. desplaza de manera importante a *Halomonas* sp., al punto de que después de 40 horas la abundancia de *Paenarthrobacter* sp. dentro del consorcio es del 91.64% (Fig. 25B).



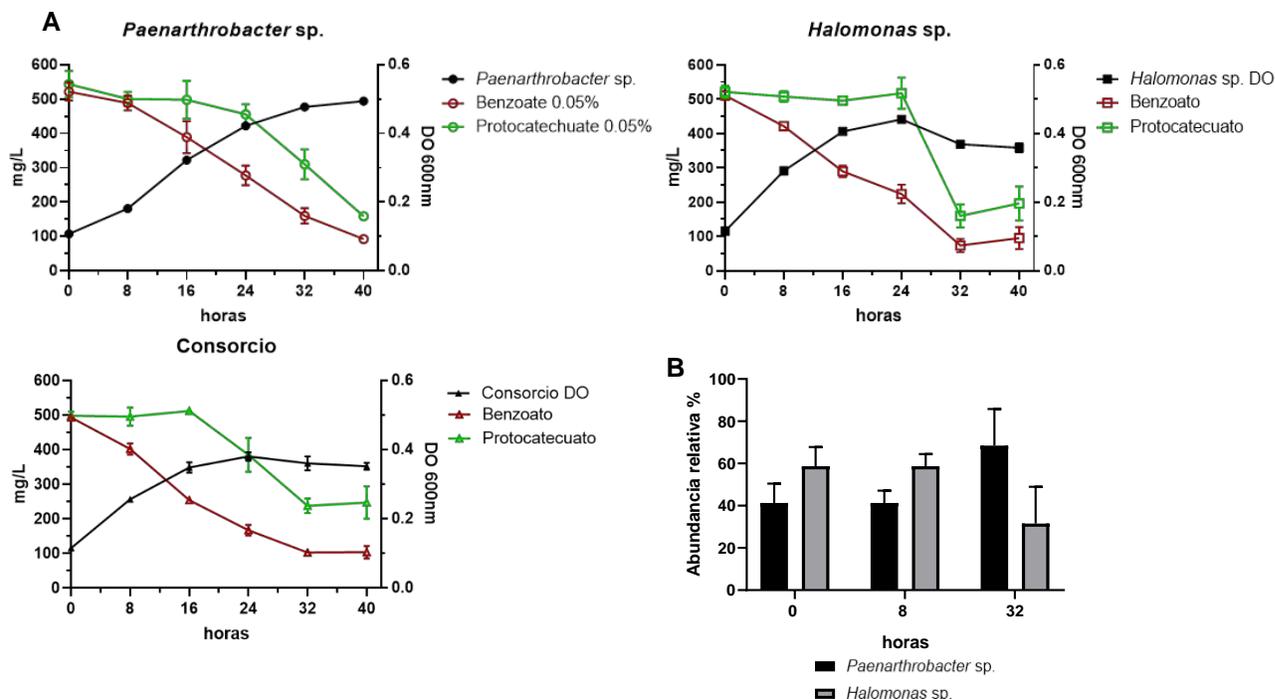


**Figura 25.** (A) Cinéticas de crecimiento y disminución de benzoato y gentisato. Las figuras rellenas representan la densidad óptica mientras que las figuras sin relleno simbolizan la concentración de cada uno de los sustratos. (B) Abundancia relativa de las dos cepas que conforman el consorcio tomada en diferentes tiempos.

### Ácido benzoico/ácido protocatecuico

En cuanto a la combinación de los sustratos formada por protocatecuato y benzoato, tanto las cepas como el consorcio prefieren en primera instancia este último sustrato como fuente de carbono, llegando a degradar cerca del 80% de este compuesto. En el caso del protocatecuato, *Paenarthrobacter* sp. es la cepa en la que hay una mayor disminución en la concentración de este compuesto después de 40 horas, alcanzando cerca del 68.22% (Fig. 26A). Cabe resaltar el hecho de que, para el caso de *Paenarthrobacter* sp., la presencia de benzoato favorece de alguna manera que esta cepa pueda tomar el protocatecuato más rápido que si este compuesto estuviera solo, ya que la velocidad de consumo volumétrico del protocatecuato a una concentración de 0.06% es de  $0.008 \pm 0.001$  g/L h<sup>-1</sup> (Tabla 10), mientras que en una mezcla con benzoato a una concentración similar (0.05%), la velocidad de consumo volumétrico es de  $0.012 \pm 0.001$  g/L h<sup>-1</sup> (Tabla 11). Diversos estudios han encontrado que en mezclas de compuestos aromáticos se pueden originar estos efectos sinérgicos, como por ejemplo en la cepa *Saggittula stellata* E-37, que incrementó su velocidad de crecimiento en una mezcla de benzoato/p-hidroxibenzoato (Gulvik & Buchan 2013).

En cuanto a la abundancia relativa de cada cepa dentro del consorcio, esta se mantiene sin muchos cambios dentro de las primeras ocho horas, donde *Halomonas* sp. es ligeramente predominante y el benzoato comienza a disminuir; a diferencia del protocatecuato que al parecer permanece en la misma concentración que la inicial, algo parecido a lo que sucede en las cepas por separado. Sin embargo, a las 32 horas el género predominante del consorcio se vuelve *Paenarthrobacter* sp., con un 66% (Fig. 26B).



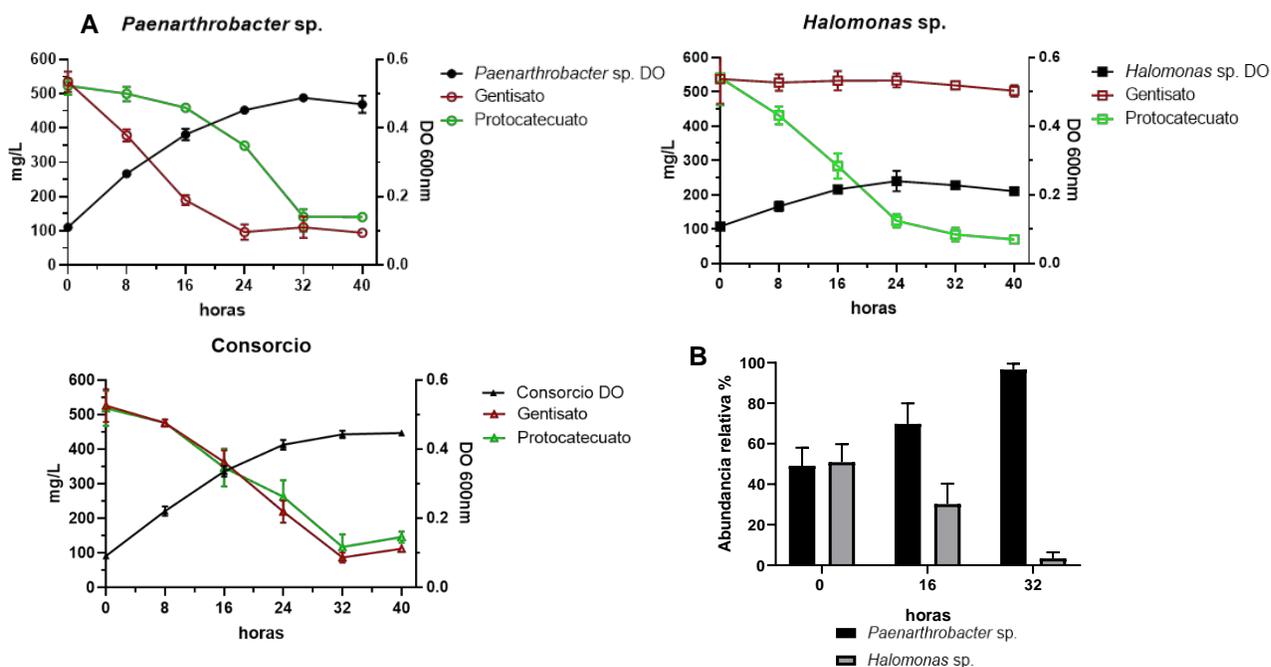
**Figura 26.** (A) Cinéticas de crecimiento y disminución de benzoato y protocatecuato. Las figuras rellenas representan la densidad óptica mientras que las figuras sin relleno simbolizan la concentración de cada uno de los sustratos. (B) Abundancia relativa de las dos cepas que conforman el consorcio tomada en diferentes tiempos.

### Ácido gentísico/ácido protocatecuico

Finalmente, en la combinación de gentisato y protocatecuato, se puede observar que en *Paenarthrobacter sp.* disminuye de manera preferencial el gentisato, ya que la velocidad de consumo volumétrico es de  $0.022 \pm 0.003 \text{ g/L h}^{-1}$ , en comparación con  $0.015 \pm 0.001 \text{ g/L h}^{-1}$  del protocatecuato; y al igual que en la cinética con benzoato y protocatecuato (Fig. 26A), pareciera ocurrir el mismo efecto sinérgico. Por otra parte, en *Halomonas sp.* se puede observar que al igual que en los demás ensayos, el gentisato no es tomado del medio. También cabe señalar el hecho de que parece ser que en *Halomonas sp.* el gentisato limita de alguna manera su crecimiento (Fig. 27A).

Si bien es cierto que la concentración de ambos sustratos disminuye de manera similar tanto en *Paenarthrobacter sp.* como en el consorcio después de 32 horas, en el consorcio es posible observar que ambos compuestos disminuyen a la par ( $0.014 \pm 0.001 \text{ g/L h}^{-1}$  y  $0.013 \pm 0.002 \text{ g/L h}^{-1}$ ), a diferencia del aislado por sí solo, donde preferentemente decrece más rápidamente el gentisato. Esto podría deberse a que de alguna manera *Halomonas sp.*, la cual está presente en casi la tercera

parte del consorcio durante la fase exponencial, pudiera estar ayudando al otro aislado tomando el protocatecuato del medio. Aunque finalmente, al alcanzar la fase estacionaria, el consorcio está conformado casi exclusivamente por *Paenarthrobacter* sp. (Fig. 27B).



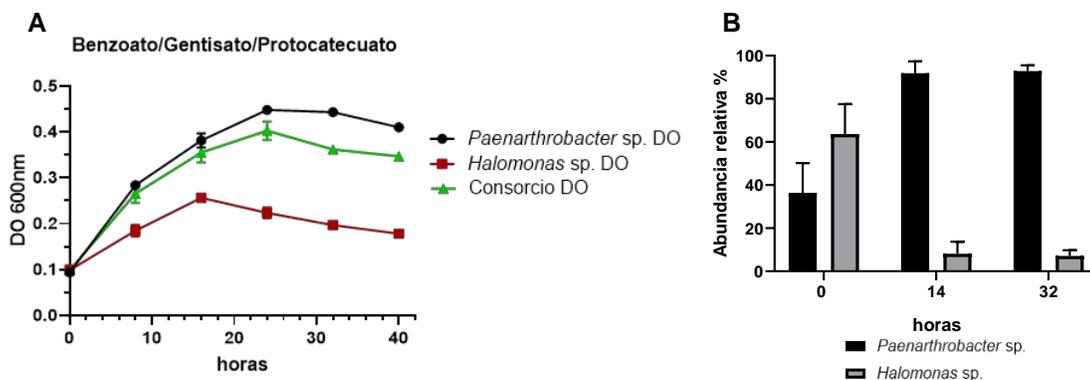
**Figura 27.** (A) Cinéticas de crecimiento y disminución de gentisato y protocatecuato. Las figuras rellenas representan la densidad óptica mientras que las figuras sin relleno simbolizan la concentración de cada uno de los sustratos. (B) Abundancia relativa de las dos cepas que conforman el consorcio tomada en diferentes tiempos.

### Ácido gentísico/ácido benzóico/ácido protocatecuico

En el ensayo realizado con los tres compuestos aromáticos, *Paenarthrobacter* sp. y el consorcio tienen una velocidad de crecimiento similar durante las primeras 16 horas ( $0.088 \pm 0.005 \text{ h}^{-1}$  y  $0.08 \pm 0.008 \text{ h}^{-1}$  respectivamente), siendo el aislado el que logra un mayor crecimiento. Por otro lado, al pasar este lapso de tiempo, la cepa de *Halomonas* sp. se queda muy rezagada y después de las 16 horas comienza a decrecer lentamente (Fig. 28A).

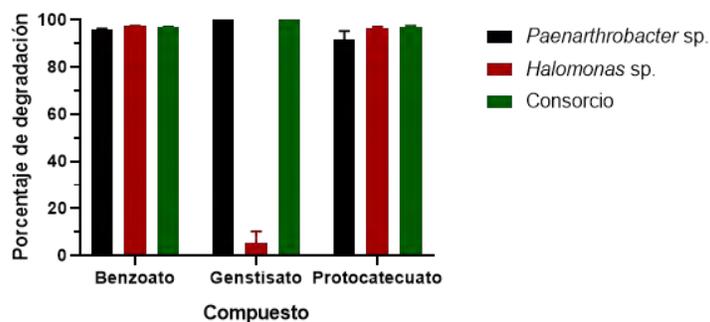
Dentro del consorcio, este parece estar conformado en su gran mayoría por *Paenarthrobacter* sp., constituyendo cerca del 90% del mismo desde la fase exponencial hasta la fase estacionaria, lo cual confirma en gran medida todos los resultados obtenidos previamente, donde este aislado demostró tener en la mayoría

de los casos un mayor crecimiento, así como una mayor abundancia dentro del consorcio (Fig. 28B).



**Figura 28.** (A) Cinéticas de crecimiento de los aislados y el consorcio en presencia de tres compuestos aromáticos. (B) Abundancia relativa de las dos cepas que conforman el consorcio tomada en diferentes tiempos.

El porcentaje de degradación de cada compuesto fue muy similar tanto en los aislados como en el consorcio, alcanzando cerca del 95% para el caso del benzoato y el protocatecuato; mientras que con el gentisato prácticamente se degradó todo este compuesto en presencia de *Paenarthrobacter* sp. y del consorcio. Sin embargo, también es posible ver una pequeña disminución de este último con *Halomonas* sp.: esto puede deberse a un fenómeno de cometabolismo, donde un compuesto que no es degradado de manera individual, puede serlo en presencia de un compuesto similar (Ghosal et al., 2016), o simplemente a un error técnico (Fig. 29).



**Figura 29.** Porcentaje de degradación de cada uno de los tres compuestos en presencia de un aislado o en consorcio.

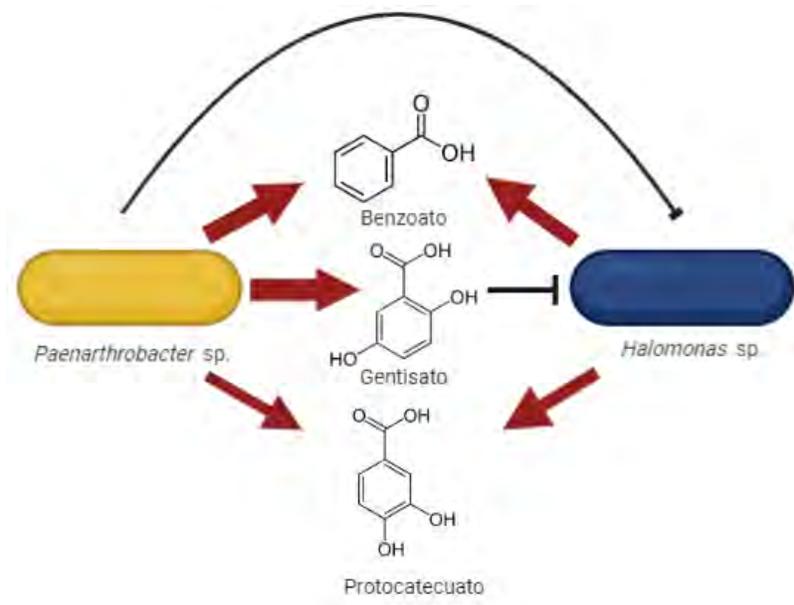
**Tabla 11.** Parámetros cinéticos de las dos cepas y el consorcio en diferentes mezclas de compuestos aromáticos.

| Mezcla           | Cepa                        | Velocidad de crecimiento (h <sup>-1</sup> ) | Tiempo de duplicación (h) | Velocidad de consumo volumétrico (g/L h <sup>-1</sup> ) |               |
|------------------|-----------------------------|---|---------------------------|---|---------------|
|                  |                             |   |                           | Sustrato*   | Sustrato**    |
| Benzoato*        | <i>Paenarthrobacter</i> sp. | 0.085 ± 0.003                               | 8.153 ± 0.241             | 0.013 ± 0.001   | 0.028 ± 0.002 |
| Gentisato**      | <i>Halomonas</i> sp.        | 0.073 ± 0.003                               | 9.556 ± 0.35              | 0.015 ± 0.002   | -             |
|                  | Consortio                   | 0.072 ± 0.005                               | 9.719 ± 0.716             | 0.012 ± 0.001   | 0.016 ± 0.003 |
| Benzoato*        | <i>Paenarthrobacter</i> sp. | 0.069 ± 0.002                               | 10.065 ± 0.277            | 0.013 ± 0.001   | 0.012 ± 0.001 |
| Protocatecuato** | <i>Halomonas</i> sp.        | 0.078 ± 0.006                               | 8.874 ± 0.626             | 0.013 ± 0.001   | 0.020 ± 0.001 |
|                  | Consortio                   | 0.069 ± 0.004                               | 10.054 ± 0.518            | 0.015   | 0.011 ± 0.002 |
| Gentisato*       | <i>Paenarthrobacter</i> sp. | 0.077 ± 0.003                               | 8.983 ± 0.329             | 0.022 ± 0.003   | 0.015 ± 0.001 |
| Protocatecuato** | <i>Halomonas</i> sp.        | 0.044 ± 0.004                               | 16.037 ± 1.608            | 0.017 ± 0.004   | -             |
|                  | Consortio                   | 0.081 ± 0.005                               | 8.54 ± 0.572              | 0.014 ± 0.001   | 0.013 ± 0.002 |
| Benzoato         | <i>Paenarthrobacter</i> sp. | 0.088 ± 0.005                               | 7.934 ± 0.488             | -   | -             |
| Gentisato        | <i>Halomonas</i> sp.        | 0.06 ± 0.003                                | 11.653 ± 0.54             | -   | -             |
| Protocatecuato   | Consortio                   | 0.08 ± 0.008                                | 8.688 ± 0.775             | -   | -             |

El valor ± expresa la desviación estándar.

#### 7.4. Modelo de interacción

Con base en todos los resultados obtenidos se elaboró un modelo de interacción entre los dos aislados seleccionados para formar el consorcio: esto cuando se encuentran en presencia de tres compuestos aromáticos monocíclicos de manera simultánea. Aquí se propone que *Paenarthrobacter* sp. tiene una mayor preferencia por el gentisato, seguida por el benzoato y finalmente por el protocatecuato. Por otro lado, *Halomonas* sp. tiene preferencia por el benzoato y después por el protocatecuato, siendo el gentisato un compuesto no degradable por esta cepa. Finalmente se propone que *Paenarthrobacter* sp. tiene un efecto negativo sobre *Halomonas* sp. inhibiéndola competitivamente, ya que ambas cepas tienen la habilidad de degradar los mismos compuestos (Fig. 30).



**Figura 30.** En este modelo de interacción entre *Paenarthrobacter sp.* y *Halomonas sp.* se representa con el tamaño de las flechas azules, la preferencia de cada una de estas cepas por cada compuesto, la flecha negra significa inhibición y la flecha roja punteada indica inhibición competitiva.

## 7.5. Secuenciación y ensamble del genoma de los componentes del consorcio

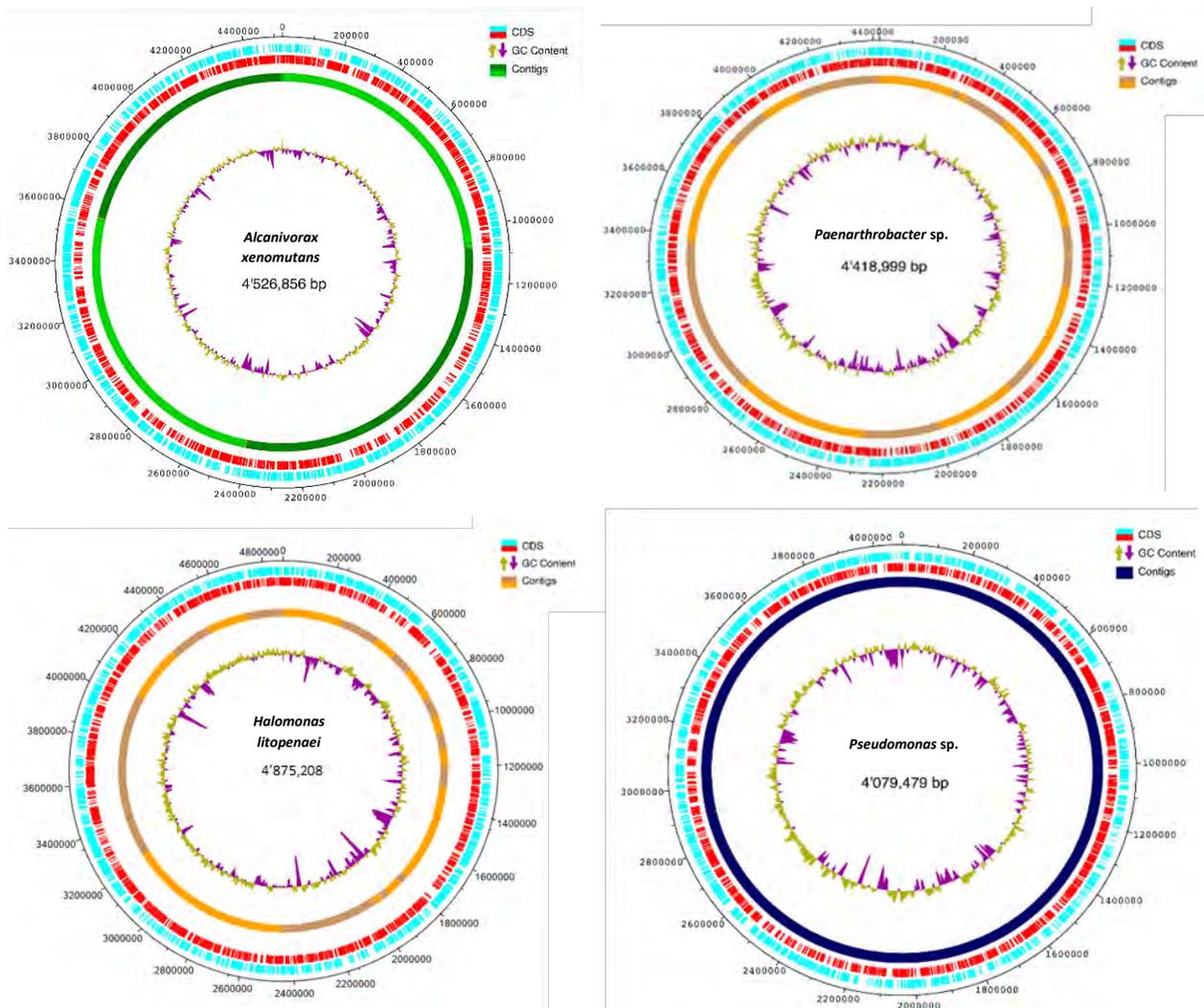
Los genomas de *Alcanivorax sp.* y *Pseudomonas sp.* fueron ensamblados con secuencias híbridas provenientes de Nanopore e Illumina, mientras que para *Paenarthrobacter sp.* y *Halomonas sp.* únicamente se utilizaron secuencias de Illumina.

El “completeness” de cada uno de los cuatro genomas está por encima del 95%, mientras que la contaminación está por debajo del 1%, lo cual habla de que la calidad de los genomas ensamblados fue muy alta. A pesar de que *Halomonas sp.* cuenta con el genoma más grande, no es el que contiene el mayor número de genes ya que el genoma de *Alcanivorax sp.* es quien tiene un total de 4201 genes predichos. Mientras que el genoma de menor tamaño y menor número de genes es el de *Pseudomonas sp.* (Tabla 12).

**Tabla 12.** Estadísticas sobre el ensamble del genoma de los cuatro aislados, *Alcanivorax*, *Paenarthrobacter*, *Halomonas* y *Pseudomonas*.

| Género                  | Completeness | Contaminación | Contigs | Tamaño del genoma | N50/L90   | Número de genes |
|-------------------------|--------------|---------------|---------|-------------------|-----------|-----------------|
| <i>Alcanivorax</i>      | 100          | 0.19          | 37      | 4526856           | 1158427/4 | 4201            |
| <i>Paenarthrobacter</i> | 99.71        | 0.39          | 50      | 4418999           | 230091/20 | 4140            |
| <i>Halomonas</i>        | 99.45        | 0.65          | 50      | 4875208           | 313055/16 | 4187            |
| <i>Pseudomonas</i>      | 98.86        | 0.43          | 1       | 4079479           | 4079479/1 | 3770            |

El genoma de *Pseudomonas* sp. se pudo ensamblar en un solo contig; el de *Alcanivorax* sp. por aproximadamente 37 contigs, donde el N90 está comprendido en aproximadamente 4 contigs. Finalmente, el de *Paenarthrobacter* sp. y *Halomonas* sp. se compone cada uno por 50 contigs, donde el L90 de cada uno de ellos es de 20 y 16 respectivamente (Fig. 31).

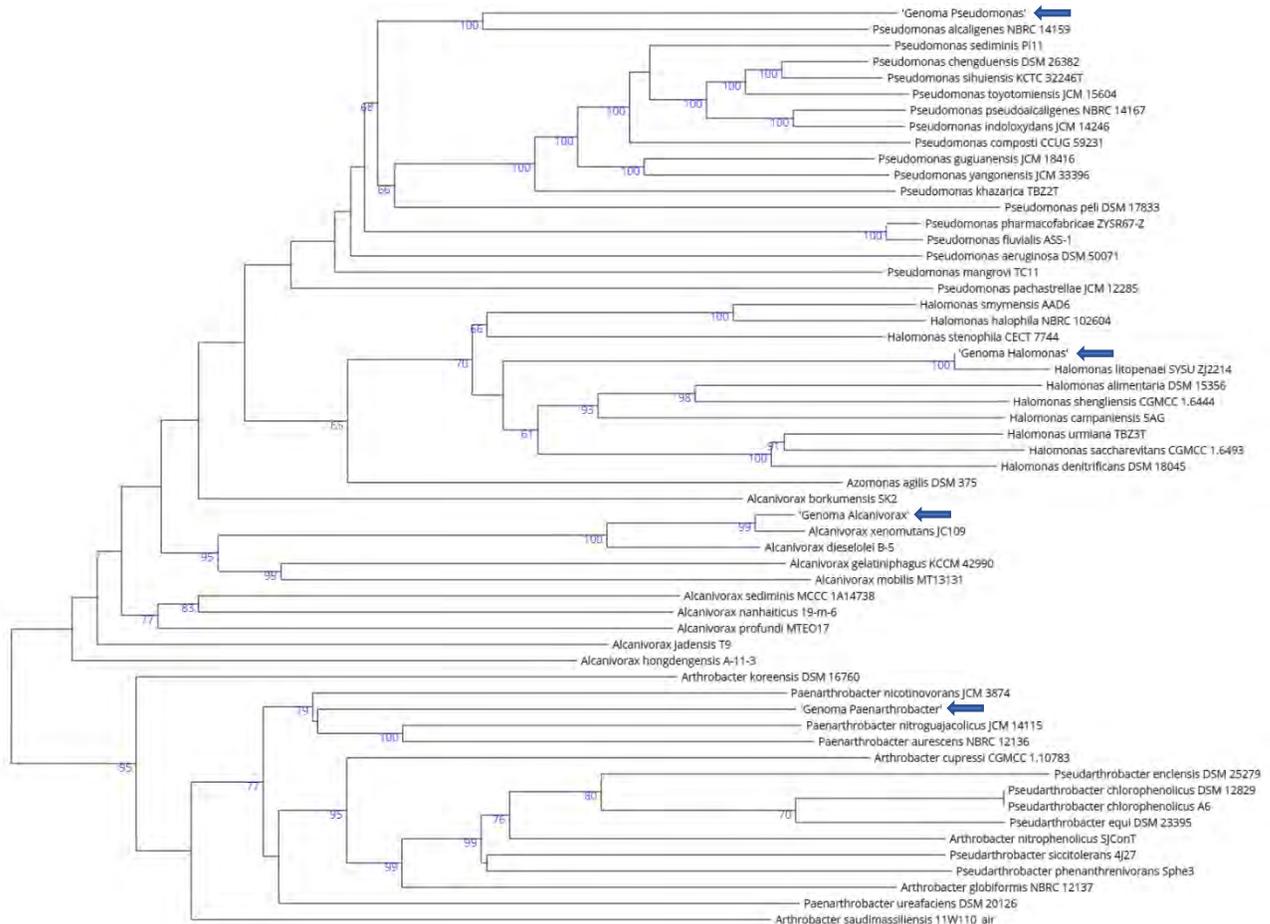


**Figura 31.** Genomas secuenciados de las cepas de *Paenarthrobacter sp.*, *Alcanivorax sp.*, *Halomonas sp.* y *Pseudomonas sp.* En cada uno de los genomas están representados los CDS (proteínas que se predijeron en cada genoma) en color azul cian los que codifican en la hebra positiva y en rojo los de la hebra negativa. También se representa el porcentaje de GC que hay a lo largo de cada uno de los genomas.

### 7.5.1. Identificación taxonómica

Los resultados obtenidos con TYGS corroboran los géneros de cada uno de los aislados que ya se habían identificado anteriormente con base al gen 16S, esto puede observarse de igual manera en la filogenia realizada con este mismo servidor ya que cada aislado se agrupa en el clado correspondiente a su género (Fig. 32). De igual modo, con este mismo análisis se pudo determinar hasta nivel de especie dos de nuestros aislados, *Alcanivorax xenomutans* y *Halomonas litopenaei* mientras que en el caso de *Paenarthrobacter* y *Pseudomonas* muy probablemente se traten

de especies nuevas, esto se corroboró con los valores de Mash D y fastANI ya que, en ambos casos, los valores de cada una de estas cepas contra las referencias más cercanas se encontraban fuera del rango establecido para delimitar especies (Tabla 13).



**Figura 32.** Árbol inferido con FastME 2.1.456 a partir de las distancias GBDP (Genome BLAST Distance Phylogeny) calculadas a partir de secuencias del genoma. Las longitudes de las ramas se escalan en términos de la fórmula de distancia GBDP  $d_5$ ; los números sobre las ramas son valores de soporte de pseudo-bootstrap de GBDP de 100 replicaciones.

**Tabla 13.** Comparación por pares de los aislados contra los genomas de las especies tipo más cercanas de acuerdo a índices genómicos como Mash D y fastANI.

| Cepa                    | Mash D <sup>1</sup> | fastANI % <sup>2</sup> | Referencia  |
|-------------------------|---------------------|------------------------|---|
| <i>Alcanivorax</i>      | 0.01258             | 98.39                  | <i>Alcanivorax xenomutans</i> Strain: JC109       |
| <i>Halomonas</i>        | 0.01899             | 98.50                  | <i>Halomonas litopenaei</i> Strain: SYSU ZJ2214   |
| <i>Pseudomonas</i>      | 0.11575             | 86.88                  | <i>Pseudomonas alcaligenes</i> Strain: NBRC 14159 |
| <i>Paenarthrobacter</i> | 0.12827             | 84.11                  | <i>Paenarthrobacter aureescens</i>                |

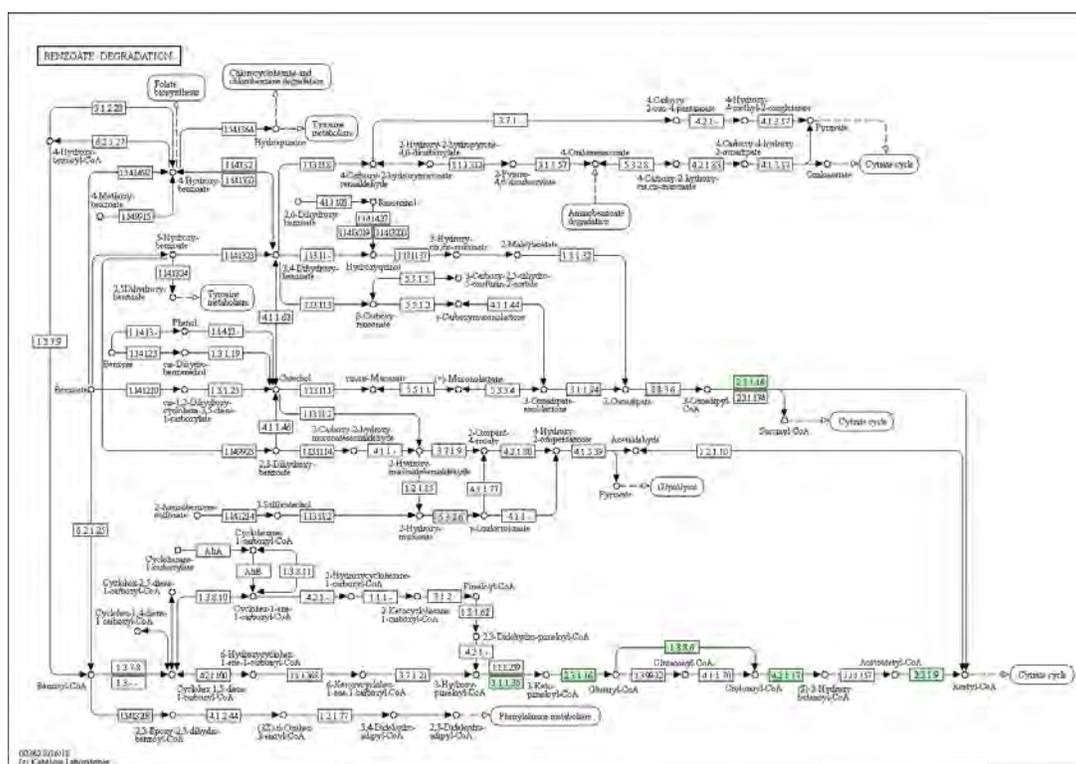
<sup>1</sup> Delimita especies con valor < 0.05

<sup>2</sup> Delimita especies con valor > 95%

## 7.5.2. Anotación funcional de los componentes del consorcio

Con la información de los cuatro genomas se realizó la anotación funcional de cada uno, con la finalidad de buscar enzimas implicadas en la degradación de compuestos aromáticos.

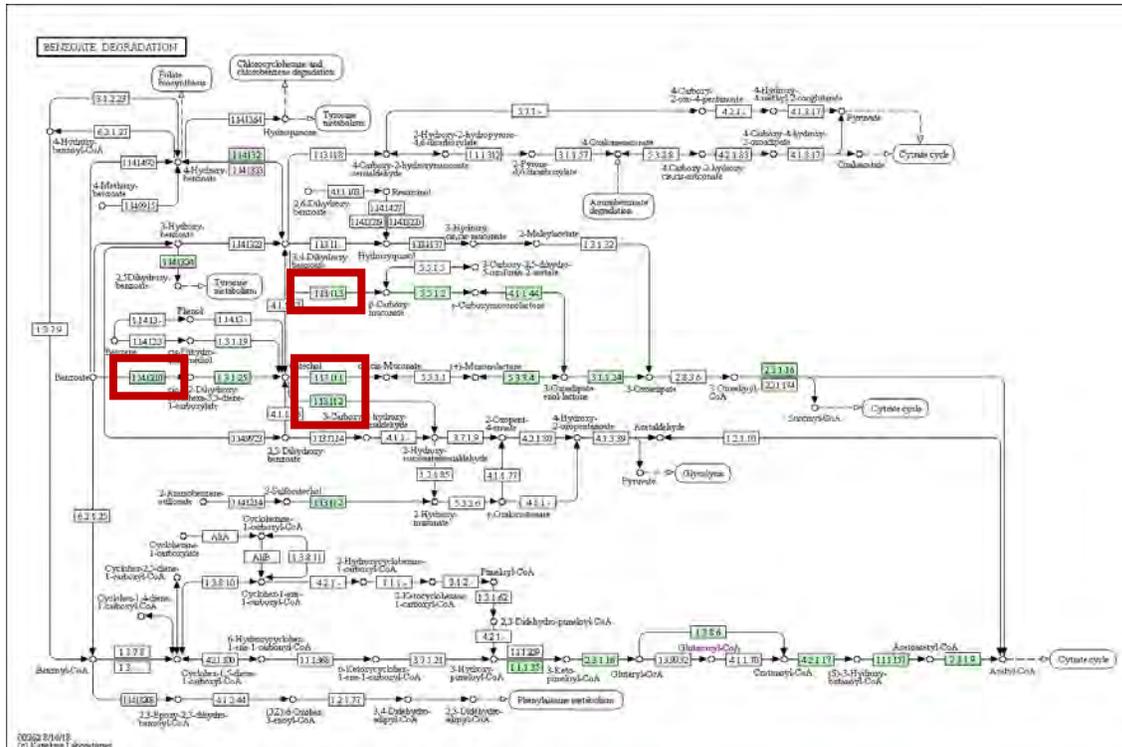
Se analizaron los genes de las cepas *Alcanivorax xenomutans* y *Pseudomonas* sp. que no crecieron en ninguno de los compuestos aromáticos, y no fue posible identificar enzimas relacionadas en los primeros pasos de la degradación de los compuestos aromáticos empleados en este trabajo de investigación. *Alcanivorax xenomutans* cuenta con siete de las enzimas que están relacionadas en la vía de degradación del benzoato, pero ninguna de ellas está implicada en la activación de compuestos clave como el catecol, gentisato o protocatecuato (Fig. 33).



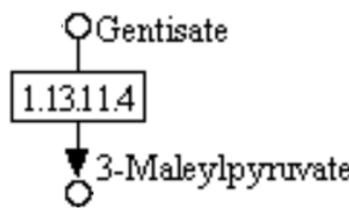
**Figura 33.** Vías de degradación del benzoato obtenida del KEGG, los recuadros verdes indican las enzimas que están presentes en el genoma de *Alcanivorax xenomutans*.

Lo mismo sucede en el caso de *Pseudomonas* sp. la cual cuenta con un total de nueve funciones moleculares relacionadas con la degradación del benzoato, pero ninguna de ellas se encuentra en los primeros pasos de la degradación de compuestos aromáticos, es decir, de enzimas dioxigenasas.

Por otra parte, en el genoma de *Paenarthrobacter* sp. es posible encontrar hasta cinco dioxigenasas diferentes implicadas, en la activación de compuestos aromáticos de interés tales como el benzoato, catecol, gentisato y protocatecuato, las cuales son, benzoato 1,2 dioxigenasa, catecol 1,2 dioxigenasa, catecol 2,3 dioxigenasa, protocatecuato 3,4 dioxigenasa (Fig. 34) y gentisato 1,2 dioxigenasa (Fig. 35).



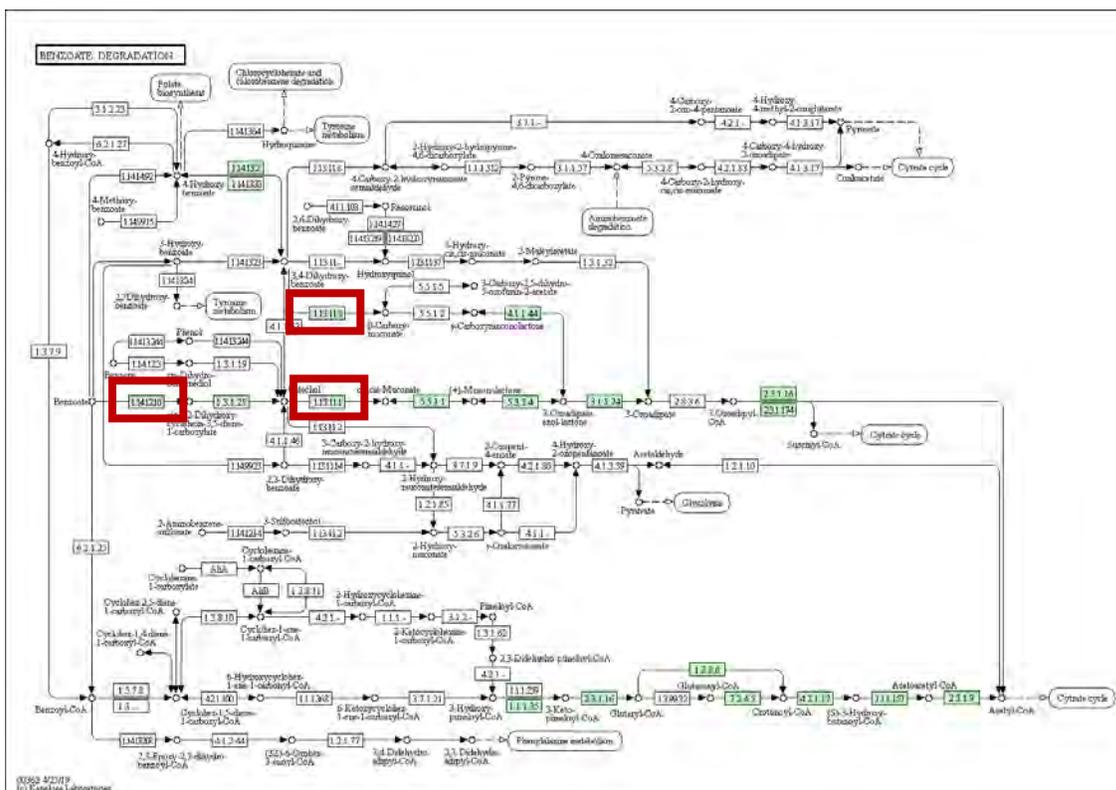
**Figura 34.** Vías de degradación del benzoato obtenida del KEGG, los recuadros verdes indican las enzimas que están presentes en el genoma de *Paenarthrobacter* sp. Los recuadros rojos indican a las diferentes dioxigenasas encontradas en esta cepa.



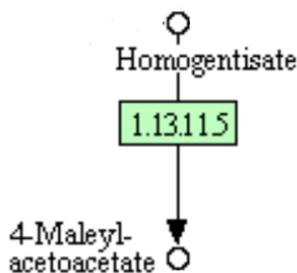
**Figura 35.** La enzima gentisato 1,2 dioxigenasa está relacionada con el metabolismo de tirosina, la cual cataliza la reacción que convierte el gentisato en 3-maleil piruvato.

Es por ello que la cepa de *Paenarthrobacter* sp. es capaz de crecer en presencia de benzoato, gentisato y protocatecuato, ya que cuenta con enzimas dioxigenasas específicas para cada uno de estos compuestos, las cuales son parte crucial dentro de la degradación de estos compuestos aromáticos.

De igual manera, fue posible encontrar cuatro diferentes enzimas dioxigenasas en el genoma de *Halomonas litopenaei* las cuales son: benzoato 1,2 dioxigenasa, catecol 1,2 dioxigenasa, protocatecuato 3,4 dioxigenasa (Fig. 36), y homogentisato 1,2 dioxigenasa (Fig. 37), cuyo sustrato también es un intermediario central en la degradación de compuestos aromáticos (Arias-Barrau et al., 2004).



**Figura 36.** Vías de degradación del benzoato obtenida del KEGG, los recuadros verdes indican las enzimas que están presentes en el genoma de *Halomonas litopenaei* Los recuadros rojos indican a las diferentes dioxigenasas encontradas en esta cepa.



**Figura 37.** La enzima homogentisato 1,2 dioxigenasa está relacionada con el metabolismo de tirosina, la cual cataliza la reacción que convierte el homogentisato en 4-maleil acetoacetato.

De acuerdo a los resultados obtenidos de la anotación funcional, se puede destacar la razón por la cual *Halomonas litopenaei* únicamente puede degradar el benzoato y el protocatecuato, ya que solamente cuenta con las dioxigenasas responsables de la degradación de estos dos compuestos aromáticos.

### 7.5.3. RAST

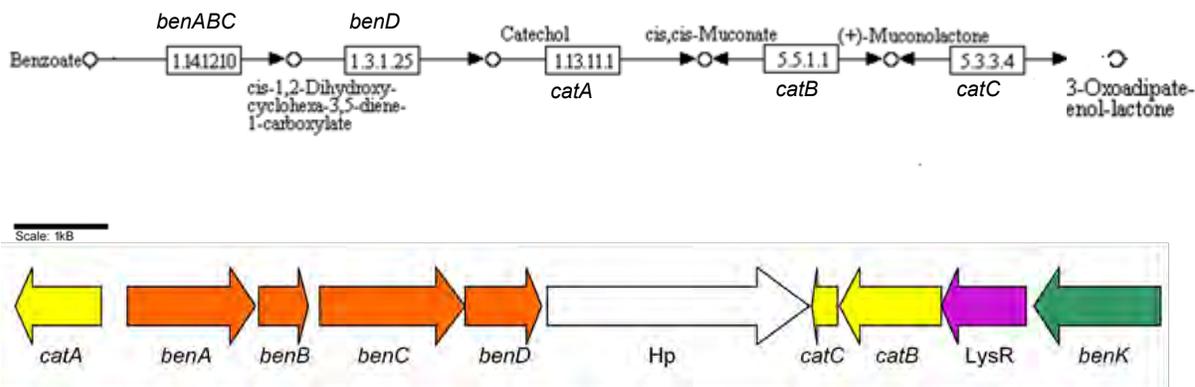
Debido a que únicamente en dos de los cuatro aislados se encontraron enzimas dioxigenasas implicadas en la degradación de los compuestos aromáticos de interés, se decidió buscar tanto en *Paenarthrobacter* sp. como en *Halomonas litopenaei* los genes que estuvieran en el contexto genómico de estas enzimas y que pudieran estar implicados en la degradación de compuestos aromáticos. De igual manera se realizó una búsqueda manual de cada una de ellas en el NCBI para corroborar las anotaciones hechas por el RAST (ver Anexo 1 y 2).

En *Paenarthrobacter* sp. se encontraron genes responsables del transporte (*benK*) y degradación (*benABCD* y *catABC*) del benzoato dentro del mismo contexto genómico (Tabla 14), los cuales en conjunto son capaces de transformarlo hasta 3-oxoadipato enol-lactona (Fig. 38). De igual manera, al realizar el Blast de las secuencias de aminoácidos obtenidas con el RAST, se encontró que una de estas proteínas hipotéticas tiene un 93.14% de identidad con un regulador transcripcional LysR de *PseudoArthrobacter* sp., el cual está asociado con la degradación de compuestos aromáticos (Maddocks & Oyston, 2009). Jiménez et al., (2010) mencionan que, así como en nuestra cepa de *Paenarthrobacter* sp., es común encontrar que los genes relacionados con la regulación, transporte y degradación de compuestos aromáticos estén agrupados en operones y/o clústeres.

**Tabla 14.** Contexto genómico de los genes implicados en la degradación de benzoato dentro del genoma de *Paenarthrobacter* sp., así como de las proteínas que codifican.

| Inicio | Final  | Hebra | Gen         | Proteína   |
|--------|--------|-------|-------------|--|
| 137934 | 137005 | -     | <i>catA</i> | Catecol 1,2-dioxigenasa (EC 1.13.11.1)                     |
| 138216 | 139601 | +     | <i>benA</i> | Benzoato 1,2-dioxigenasa subunidad alfa (EC 1.14.12.10)    |
| 139636 | 140172 | +     | <i>benB</i> | Benzoato 1,2-dioxigenasa subunidad beta (EC 1.14.12.10)    |
| 140294 | 141865 | +     | <i>benC</i> | Benzoato 1,2-dioxygenasa, componente ferredoxina reductasa |
| 141865 | 142692 | +     | <i>benD</i> | Benzoato deshidrogenasa (EC 1.3.1.25)                      |
| 142753 | 145584 | +     | /           | Proteína hipotética  |
| 145889 | 145611 | -     | <i>catC</i> | Muconolactona isomerasa (EC 5.3.3.4)                       |
| 147010 | 145910 | -     | <i>catB</i> | Muconato cicloisomerasa (EC 5.5.1.1)                       |
| 147927 | 147007 | -     | /           | Regulador transcripcional de la familia LysR               |
| 149378 | 148008 | -     | <i>benK</i> | Transportador de benzoato                                  |

'/' Indica no disponible



**Figura 38.** Arriba. Vía de degradación del benzoato por la vía intradiol. Abajo. Posición y dirección de estos genes dentro del genoma de *Paenarthrobacter* sp. Las flechas amarillas indican genes relacionados con la degradación de catecol, naranjas con el benzoato, la morada con un gen regulador y la verde con un gen transportador.

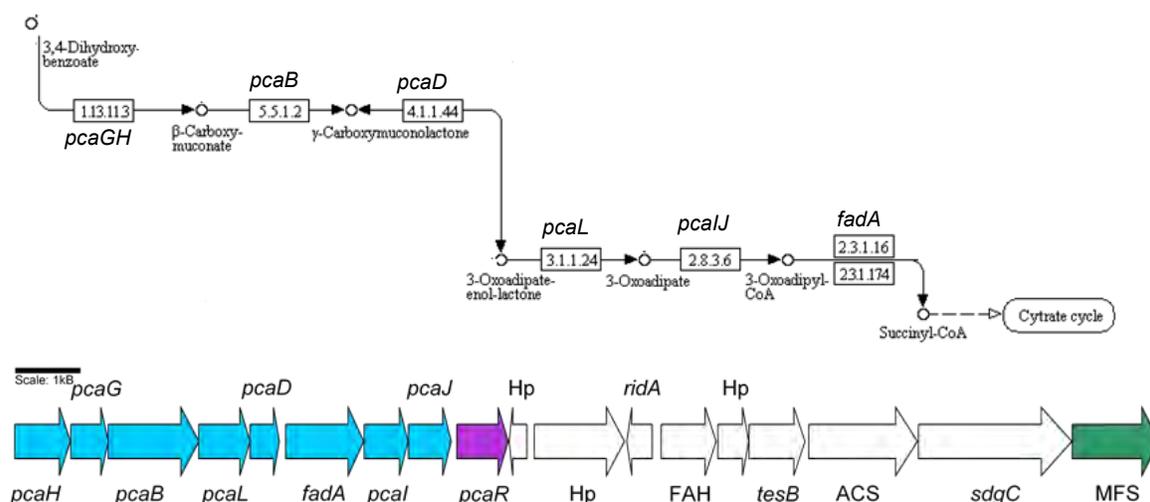
De la misma manera se encontraron agrupados los genes responsables de la degradación de protocatecuato dentro del genoma de *Paenarthrobacter* sp. (Tabla 15). Estos pueden transformar este compuesto aromático hasta un intermediario del metabolismo central, el succinil-CoA. Así mismo, es posible identificar un transportador del tipo MFS (Pao et al., 1998), los cuales están asociados al transporte de compuestos aromáticos. De igual modo se encuentra la proteína *pcaR*, la cual es un regulador positivo de los genes *pca* que intervienen en el metabolismo del protocatecuato (Parales & Harwood, 1993) (Fig. 39).

**Tabla 15.** Contexto genómico de los genes implicados en la degradación de protocatecuato dentro del genoma de *Paenarthrobacter* sp., así como de las proteínas que codifican.

| Inicio | Final | Hebra | Gen         | Proteína  |
|--------|-------|-------|-------------|---|
| 12629  | 13498 | +     | <i>pcaH</i> | Protocatecuato 3,4-dioxigenasa cadena beta (EC 1.13.11.3)       |
| 13503  | 14087 | +     | <i>pcaG</i> | Protocatecuato 3,4-dioxigenasa cadena alfa (EC 1.13.11.3)       |
| 14084  | 15499 | +     | <i>pcaB</i> | 3-carboxi- <i>cis,cis</i> -muconato cicloisomerasa (EC 5.5.1.2) |
| 15492  | 16295 | +     | <i>pcaL</i> | Beta-ceto adipato enol-lactone hidrolasa (EC 3.1.1.24)          |
| 16292  | 16750 | +     | <i>pcaD</i> | 4-carboximuconolactona descarboxilasa (EC 4.1.1.44)             |
| 16847  | 18064 | +     | <i>fadA</i> | 3-cetoacil-CoA tiolasa (EC 2.3.1.16)                            |
| 18069  | 18755 | +     | <i>pcaI</i> | 3-oxoadipato CoA-transferasa subunidad A (EC 2.8.3.6)           |
| 18758  | 19426 | +     | <i>pcaJ</i> | 3-oxoadipato CoA-transferasa subunidad B (EC 2.8.3.6)           |
| 19512  | 20315 | +     | <i>pcaR</i> | Proteína reguladora   |
| 20605  | 20327 | -     | /           | Proteína hipotética   |
| 20717  | 22123 | +     | /           | Proteína hipotética   |
| 22555  | 22157 | -     | <i>ridA</i> | Proteína ridA   |
| 22694  | 23548 | +     | /           | Proteína de la familia fumarilacetoacetato hidrolasa            |
| 23574  | 24056 | +     | /           | Proteína hipotética   |

|       |       |   |             |   |
|-------|-------|---|-------------|---|
| 24060 | 24932 | + | <i>tesB</i> | Acil-CoA tioesterasa II (EC 3.1.2.-)                      |
| 24989 | 26683 | + | ACS         | Acil-coenzyme A sintetasa                                 |
| 26698 | 29088 | + | <i>sdgC</i> | Proteína putativa bifuncional hidroxilasa/oxidorreductasa |
| 29091 | 30449 | + | /           | Transportador de la familia MFS                           |

'/' Indica no disponible



**Figura 39.** Arriba. Vía de degradación del protocatecuato por la vía intradiol. Abajo. Posición y dirección de estos genes dentro del genoma de *Paenarthrobacter* sp. Las flechas azules representan los genes de degradación del protocatecuato, la morada un gen regulador, la verde un gen transportador de compuestos aromáticos, finalmente las flechas blancas son genes que no están relacionados en esta vía de degradación.

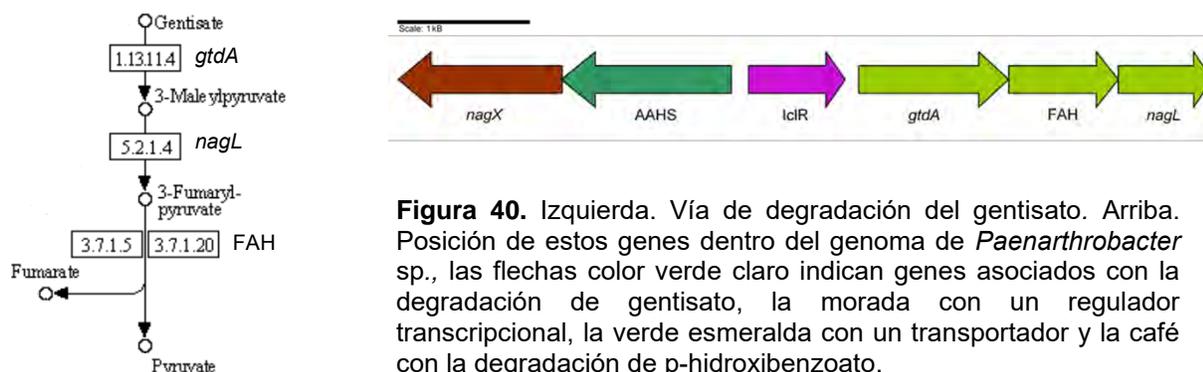
En el caso de los genes implicados en la degradación del gentisato, con la anotación del RAST únicamente se encontraron otros tres genes asociados con la degradación de este compuesto (Tabla 16), sin contar a la enzima dioxigenasa. Entre ellos se encuentran un transportador del tipo MFS, un regulador transcripcional de la familia IclR, el cual también está relacionado con el metabolismo de compuestos aromáticos (Molina-Henares et al., 2005), y una enzima isomerasa, la cual lleva a cabo la siguiente reacción después de la activación del gentisato (Fig. 40). No se encontró en el contexto genómico alguna de las dos enzimas involucradas en el metabolismo de 3-fumarilpiruvato, sin embargo, un trabajo de Pircher et al., (2011) encontró que de manera *in vitro* una fumarilacetoacetato hidrolasa también tiene actividad acilpiruvato hidrolasa (E.C. 3.7.1.5), lo cual podría indicarnos que está enzima es la responsable de convertir el fumarilpiruvato en fumarato y piruvato. Finalmente, también se encontró el gen *nagX* el cual interviene en la degradación del 3-hidroxibenzoato para convertirlo en

gentisato (Park et al., 2007), esto puede indicar que esta cepa también cuenta con la capacidad de degradar dicho compuesto.

**Tabla 16.** Contexto genómico de los genes implicados en la degradación de gentisato dentro del genoma de *Paenarthrobacter* sp., así como de las proteínas que codifican.

| Inicio | Final | Hebra | Gen         | Proteína   |
|--------|-------|-------|-------------|--|
| 47986  | 46736 | -     | <i>nagX</i> | Putativa n-hidroxibenzoato hidroxilasa               |
| 49277  | 47979 | -     | /           | Transportador de la familia MFS                      |
| 49410  | 50147 | +     | /           | Regulador transcripcional de la familia IclR         |
| 50250  | 51395 | +     | <i>gtdA</i> | Gentisato 1,2-dioxigenasa (EC 1.13.11.4)             |
| 51395  | 52231 | +     | /           | Proteína de la familia fumarilacetoacetato hidrolasa |
| 52231  | 52950 | +     | <i>nagL</i> | Maleilpiruvato isomerasa (EC 5.2.1.4)                |

'/' Indica no disponible



**Figura 40.** Izquierda. Vía de degradación del gentisato. Arriba. Posición de estos genes dentro del genoma de *Paenarthrobacter* sp., las flechas color verde claro indican genes asociados con la degradación de gentisato, la morada con un regulador transcripcional, la verde esmeralda con un transportador y la café con la degradación de p-hidroxibenzoato.

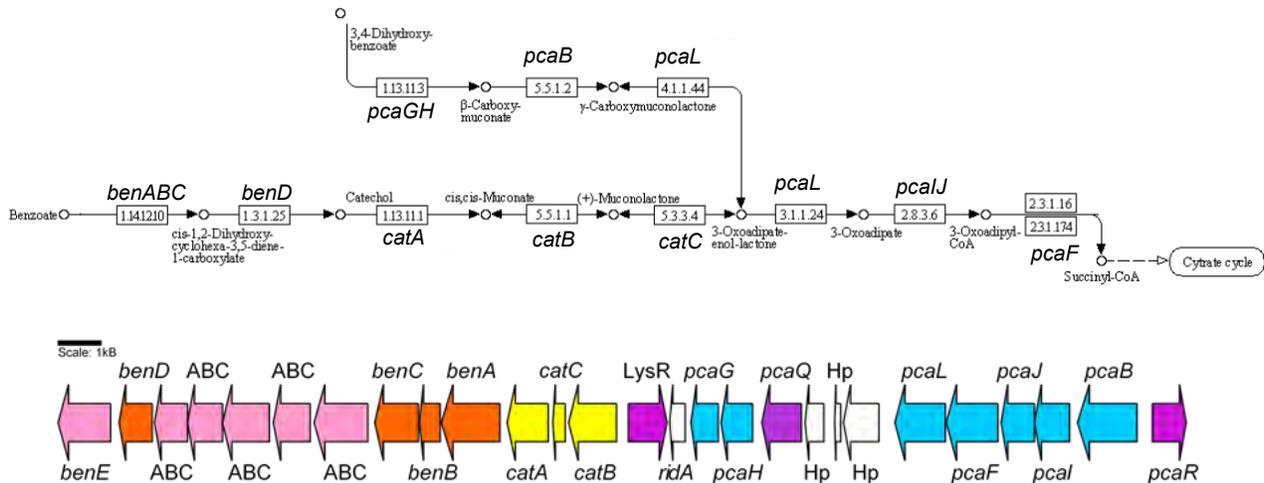
En el caso de *Halomonas litopenaei*, se encontró que las vías de degradación de benzoato y de protocatecuato estaban localizadas muy cerca una de la otra dentro del genoma. Es importante destacar que, a diferencia de los transportadores pertenecientes a la familia AAHS (Aromatic Acid: H<sup>+</sup> Symporter) encontrados en *Paenarthrobacter* sp., los cuales transportan pequeños solutos en respuesta a un gradiente iónico, se sugiere que *Halomonas litopenaei* utilizaría otro tipo de mecanismo dependiente de ATP perteneciente a la superfamilia ABC, para poder tomar el protocatecuato del medio (Tabla 17), el cual ya se ha descrito que es regulado positivamente por la proteína *pcaQ* (MacLean et al., 2011). Este aspecto respondería en parte el porqué a pesar de que *Halomonas litopenaei* y *Paenarthrobacter* sp. degradan casi el mismo porcentaje de cada compuesto aromático, la primera tiene un menor crecimiento, lo cual sugeriría que una parte de la energía que obtiene del catabolismo de cada sustrato la emplea en la internalización del mismo.

Al igual que *Paenarthrobacter* sp., esta cepa contiene dentro de su maquinaria celular las enzimas necesarias para llevar a cabo la transformación total, ya sea del benzoato o del protocatecuato hasta un metabolito intermediario en el ciclo del citrato (Fig. 41). Debido a esto, no se observó que el consorcio tuviera un mayor crecimiento o un mayor potencial de degradar compuestos aromáticos, o ambos, en comparación con los aislados por sí solos, ya que para que suceda este fenómeno, debe existir un intercambio de nutrientes de una cepa a la otra, ya sea de manera unidireccional (comensalismo) o bidireccional (sintrofia o mutualismo) (Klitgord & Segrè, 2010).

**Tabla 17.** Contexto genómico de los genes implicados en la degradación de benzoato y protocatecuato dentro del genoma de *Halomonas litopenaei*, así como de las proteínas que codifican.

| Inicio | Final | Hebra | Gen         | Proteína  |
|--------|-------|-------|-------------|---|
| 46732  | 45506 | -     | <i>benE</i> | Transportador de benzoato   |
| 47701  | 46928 | -     | <i>benD</i> | Benzoato deshidrogenasa (EC 1.3.1.25)   |
| 48525  | 47755 | -     | /           | Transportador de benzoato, proteína de unión a ATP  |
| 49340  | 48522 | -     | /           | Transportador de benzoato, componente ATPasa  |
| 50431  | 49337 | -     | /           | Transportador de aminoácidos de cadena ramificada (TC 3.A.1.4.1)  |
| 51383  | 50523 | -     | /           | Permeasa del transportador de aminoácidos de cadena ramificada  |
| 52727  | 51474 | -     | /           | Transportador ABC, proteína de unión a sustrato   |
| 53906  | 52887 | -     | <i>benC</i> | Benzoato 1,2-dioxigenasa, componente ferredoxina reductasa  |
| 54415  | 53927 | -     | <i>benB</i> | Benzoato 1,2-dioxigenasa subunidad beta (EC 1.14.12.10)   |
| 55806  | 54439 | -     | <i>benA</i> | Benzoato 1,2-dioxigenasa subunidad alfa (EC 1.14.12.10)   |
| 56932  | 55973 | -     | <i>catA</i> | Catecol 1,2-dioxigenasa (EC 1.13.11.1)  |
| 57329  | 57039 | -     | <i>catC</i> | Muconolactona isomerasa (EC 5.3.3.4)  |
| 58524  | 57406 | -     | <i>catB</i> | Muconato cicloisomerasa (EC 5.5.1.1)  |
| 58799  | 59701 | +     | /           | Regulador transcripcional LysR  |
| 60125  | 59763 | -     | <i>ridA</i> | Proteína ridA   |
| 60895  | 60257 | -     | <i>pcaG</i> | Protocatecuato 3,4-dioxigenasa cadena alfa (EC 1.13.11.3)   |
| 61695  | 60958 | -     | <i>pcaH</i> | Protocatecuato 3,4-dioxigenasa cadena beta (EC 1.13.11.3)   |
| 62833  | 61910 | -     | <i>pcaQ</i> | Activador transcripcional   |
| 63356  | 62919 | -     | /           | Proteína hipotética   |
| 63748  | 63608 | -     | /           | Proteína hipotética   |
| 64640  | 63813 | -     | /           | Proteína hipotética   |
| 66189  | 65011 | -     | <i>pcaL</i> | Beta-cetoadipato enol-lactona hidrolasa (EC 3.1.1.24) / 4-carboximuconolactona descarboxilasa (EC 4.1.1.44) |
| 67413  | 66208 | -     | <i>pcaF</i> | 3-oxoadipil-CoA tiolasa (EC 2.3.1.174)  |
| 68265  | 67486 | -     | <i>pcaJ</i> | 3-oxoadipate CoA-transferasa subunidad B (EC 2.8.3.6)   |
| 69083  | 68262 | -     | <i>pcaI</i> | 3-oxoadipate CoA-transferasa subunidad A (EC 2.8.3.6)   |
| 70655  | 69267 | -     | <i>pcaB</i> | 3-carboxy- <i>cis,cis</i> -muconato cicloisomerasa (EC 5.5.1.2)   |
| 71012  | 71803 | +     | <i>pcaR</i> | Proteína reguladora   |

'/' Indica no disponible



**Figura 41.** Arriba. Vías de degradación del benzoato y del protocatecuato, las cuales convergen en un intermediario en común, el 3-oxoadipato enol-lactona. Abajo. Posición de estos genes dentro del genoma de *Halomonas litopenaei*, las flechas de color naranja indican los genes que intervienen en la degradación del benzoato, las rosas en el transporte de compuestos aromáticos, las amarillas en la degradación del catecol, las azules con el protocatecuato, las moradas con genes reguladores y por último las blancas con genes que no tienen relación con estas vías.

## 8. Conclusiones

Dos de los cuatro aislados, *Paenarthrobacter* sp. y *Halomonas litopenaei* fueron capaces de crecer en presencia de tres y dos diferentes compuestos aromáticos respectivamente.

*Paenarthrobacter* sp. fue la cepa con el mayor crecimiento y disminución en la concentración de los compuestos aromáticos en casi todos los ensayos realizados.

El consorcio compuesto por *Paenarthrobacter* sp. y *Halomonas litopenaei*, en la mayoría de los casos, estaba conformado mayoritariamente por *Paenarthrobacter* sp.

Este consorcio no mostró tener una mayor capacidad de degradación o de crecimiento que sus partes por separado, ya que cada una de las cepas cuenta con todos los genes necesarios para el transporte, regulación y degradación de cada uno de los compuestos aromáticos.

Los resultados obtenidos mediante las pruebas experimentales fueron corroborados en parte, con la anotación funcional de cada uno de los genomas.

## 9. Perspectivas

Probar la capacidad de degradar 3-hidroxibenzoato por parte de *Paenarthrobacter* sp.

Probar la capacidad de degradar homogentisato por parte de *Halomonas litopenaei*

Probar a ambas cepas con otros aislados que potencialmente cuenten con vías de degradación periféricas de compuestos aromáticos para ver si formando un consorcio sintético existe un mayor potencial de degradación.

## Anexos

Anexo 1. Porcentaje de identidad de las diferentes enzimas implicadas en la degradación de compuestos aromáticos de *Paenarthrobacter* sp.

**Tabla A 1.** Porcentaje de cobertura e identidad de las diferentes enzimas de *Paenarthrobacter* sp. relacionadas con la degradación de benzoato.

| Enzima   | Cepa  | Cobertura | Identidad |
|--|---|-----------|-----------|
| Catecol 1,2-dioxigenasa                                    | <i>Phycoccus</i> sp. SLBN-51                  | 96%       | 94.65%    |
| Benzoato 1,2-dioxigenasa subunidad grande                  | <i>Pseudarthrobacter</i> sp. NIBRBAC000502771 | 100%      | 98.92%    |
| Benzoato 1,2-dioxigenasa subunidad pequeña                 | <i>Arthrobacter</i> sp. BB-1                  | 100%      | 94.38%    |
| Benzoato 1,2-dioxigenasa, componente ferredoxina reductasa | <i>Kocuria</i> sp. ZOR0020                    | 65%       | 81.69%    |
| Benzoato deshidrogenasa                                    | <i>Phycoccus</i> sp. SLBN-51                  | 100%      | 93.82%    |
| Muconolactona isomerasa                                    | <i>Phycoccus</i> sp. SLBN-51                  | 100%      | 93.48%    |
| Muconato cicloisomerasa                                    | <i>Kocuria palustris</i>                      | 99%       | 78.02%    |
| Regulador transcripcional de la familia LysR               | <i>Pseudarthrobacter</i> sp. NIBRBAC000502771 | 100%      | 93.14%    |
| Transportador del tipo MFS                                 | <i>Pseudarthrobacter</i> sp. NIBRBAC000502771 | 100%      | 93.86%    |

**Tabla A 2.** Porcentaje de cobertura e identidad de las diferentes enzimas de *Paenarthrobacter* sp. relacionadas con la degradación de protocatecuato.

| Enzima   | Cepa                                   | Cobertura | Identidad |
|--|--|-----------|-----------|
| Regulador transcripcional de la familia IclR       | <i>Arthrobacter</i> sp. EpRS71         | 100%      | 96.09%    |
| Protocatecuato 3,4-dioxigenasa subunidad beta      | <i>Paenarthrobacter nicotinovorans</i> | 100%      | 97.58%    |
| Protocatecuato 3,4-dioxigenasa subunidad alfa      | <i>Arthrobacter</i> sp. TS-15          | 99%       | 96.32%    |
| 3-carboxi- <i>cis,cis</i> -muconato cicloisomerasa | <i>Paenarthrobacter nicotinovorans</i> | 100%      | 84.78%    |
| 3-oxoadipato enol lactona hidrolasa                | <i>Arthrobacter</i> sp. Rue61a         | 97%       | 90.73%    |
| 4-carboximuconolactona descarboxilasa              | <i>Arthrobacter</i> sp. cf158          | 95%       | 95.17%    |

|  |  |      |        |
|--|--|------|--------|
| 3-cetoacil-CoA tiolasa                   | <i>Arthrobacter bacterium</i>          | 98%  | 90.5%  |
| 3-oxoadipato CoA-transferasa subunidad A | <i>Arthrobacter</i> sp. M2012083       | 100% | 97.37% |
| 3-oxoadipato CoA-transferasa subunidad B | <i>Arthrobacter</i> sp. TS-15          | 100% | 98.2%  |
| Proteína reguladora                      | <i>Arthrobacter</i> sp. Hiyo6          | 97%  | 77.01% |
| Transportador de la familia AAHS         | <i>Paenarthrobacter nicotinovorans</i> | 100% | 94.91% |

**Tabla A 3.** Porcentaje de cobertura e identidad de las diferentes enzimas de *Paenarthrobacter* sp. relacionadas con la degradación de gentisato.

| Enzima                                       | Cepa                                       | Cobertura | Identidad |
|--|--|-----------|-----------|
| 3-hidroxibenzoato 6-hidroxilasa              | <i>Arthrobacter</i> sp. PM3                | 100%      | 87.2%     |
| Transportador de la familia AAHS             | <i>Arthrobacter</i> sp. cf158              | 99%       | 90.26%    |
| Regulador transcripcional de la familia IclR | <i>Paenarthrobacter aurescens</i>          | 99%       | 92.59%    |
| Gentisato 1,2-dioxigenasa                    | <i>Arthrobacter globiformis</i> NBRC 12137 | 100%      | 90.03%    |
| Fumarilacetoacetato hidrolasa                | <i>Paenarthrobacter aurescens</i>          | 100%      | 94.60%    |
| Maleilpiruvato isomerasa                     | <i>Arthrobacter</i> sp. TS-15              | 100%      | 81.12%    |

## Anexo 2. Porcentaje de identidad de las diferentes enzimas implicadas en la degradación de compuestos aromáticos de *Halomonas litopenaei*

**Tabla A 4.** Porcentaje de cobertura e identidad de las diferentes enzimas de *Halomonas litopenaei* relacionadas con la degradación de benzoato y protocatecuato.

| Enzima   | Cepa                        | Cobertura | Identidad |
|--|-----------------------------|-----------|-----------|
| Simporter de la familia BenE                                   | <i>Halomonas</i> sp. S2151  | 100%      | 99.26%    |
| Benzoato deshidrogenasa  | <i>Halomonas</i> sp. BN3-1  | 100%      | 99.22%    |
| Transportador de la familia ABC                                | <i>Halomonas</i> sp. S2151  | 100%      | 100%      |
| Transportador de la familia ABC                                | <i>Halomonas</i> sp. S2151  | 100%      | 100%      |
| Permeasa del transportador de aminoácidos de cadena ramificada | <i>Halomonas</i> sp. BN3-1  | 100%      | 99.73%    |
| Permeasa del transportador de aminoácidos de cadena ramificada | <i>Halomonas</i> sp.        | 100%      | 99.65%    |
| Transportador ABC, proteína de unión a sustrato                | <i>Halomonas</i> sp. YLB-10 | 100%      | 99.52%    |
| Benzoato 1,2-dioxigenasa, componente ferredoxina reductasa     | <i>Halomonas</i> sp. BN3-1  | 100%      | 99.12%    |
| Benzoato 1,2-dioxigenasa subunidad pequeña                     | <i>Halomonas</i> sp. BN3-1  | 100%      | 99.38%    |
| Benzoato 1,2-dioxigenasa subunidad grande                      | <i>Halomonas</i> sp.        | 100%      | 99.56%    |
| Catecol 1,2-dioxigenasa  | <i>Halomonas</i> sp. YLB-10 | 100%      | 99.69%    |
| Muconolactona Delta-isomerasa                                  | <i>Halomonas</i> sp. LBP4   | 100%      | 90.62%    |
| Muconato cicloisomerasa  | <i>Halomonas</i> sp. BN3-1  | 100%      | 99.19%    |
| Regulador transcripcional de la familia LysR                   | <i>Halomonas</i> sp.        | 100%      | 99.67%    |

|   |                             |      |        |
|---|-----------------------------|------|--------|
| Proteína RidA   | <i>Halomonas</i> sp. S2151  | 100% | 99.17% |
| Protocatecuato 3,4-dioxigenasa subunidad alfa                       | <i>Halomonas</i> sp.        | 100% | 99.06% |
| Protocatecuato 3,4-dioxigenasa subunidad beta                       | <i>Halomonas</i> sp.        | 100% | 99.18% |
| Factor transcripcional PcaQ   | <i>Halomonas</i> sp. YLB-10 | 100% | 99.35% |
| 3-oxoadipato enol-lactonasa / 4-carboximuconolactona descarboxilasa | <i>Halomonas korensis</i>   | 98%  | 89.43% |
| 3-oxoadipil-CoA tiolasa   | <i>Halomonas</i> sp. BN3-1  | 100% | 99.5%  |
| CoA-transferasa subunidad beta                                      | <i>Halomonas</i> sp. BN3-1  | 100% | 98.84% |
| CoA transferasa subunidad alfa                                      | <i>Halomonas</i> sp. S2151  | 100% | 99.63% |
| 3-carboxi- <i>cis,cis</i> -muconato cicloisomerasa                  | <i>Halomonas</i> sp.        | 99%  | 93.62% |
| Regulador transcripcional de la familia lclR                        | <i>Halomonas</i> sp.        | 100% | 98.86% |

## Bibliografía

Abbasian, F., Lockington, R., Mallavarapu, M., & Naidu, R. (2015). A Review on the Genetics of Aliphatic and Aromatic Hydrocarbon Degradation. *Applied biochemistry and biotechnology*, 178. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1881-y>.

Abdelkafi, S., Labat, M., Casalot, L., Chamkha, M. and Sayadi, S. (2006), Isolation and characterization of *Halomonas litopenaei* strain IMPC, a p-coumaric acid-metabolizing bacterium that decarboxylates other cinnamic acids under hypersaline conditions. *FEMS Microbiology Letters*, 255, 108-114. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2005.00061.x>

Abdel-Shafy, H.I., & Mansour, M.S.M. (2016). A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum*, 25, 107–123. <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2015.03.011>

Agency for Toxic Substances and Disease Registry [ATSDR] (1990). Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons. Acenaphthene, Acenaphthylene, Anthracene, Benzo[a]anthracene, Benzo[a]pyrene, Benzo[b]fluoranthene, Benzo[g,i,h]perylene, Benzo[k]fluoranthene, Chrysene, Dibenzo[a,h]anthracene, Fluoranthene, Fluorene, Indeno[1,2,3-c,d]pyrene, Phenanthrene, Pyrene. Atlanta, GA: Agency for Toxic Substances and Disease Registry.

Antipov, D., Korobeynikov, A., McLean, J. S., & Pevzner, P. A. (2016). hybridSPAdes: an algorithm for hybrid assembly of short and long reads. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 32(7), 1009–1015. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv688>

Arias-Barrau, E., Olivera, E. R., Luengo, J. M., Fernández, C., Galán, B., García, J. L., Díaz, E., & Miñambres, B. (2004). The homogentisate pathway: a central

catabolic pathway involved in the degradation of L-phenylalanine, L-tyrosine, and 3-hydroxyphenylacetate in *Pseudomonas putida*. *Journal of bacteriology*, 186(15), 5062–5077. <https://doi.org/10.1128/JB.186.15.5062-5077.2004>

Azhari, N.E., Chabaud, S., Percept, A., Bru, D., & Martin-Laurent, F. (2007). *pcaH*, a molecular marker for estimating the diversity of the protocatechuate degrading bacterial community in the soil environment. *Pest Management Science*, 63(5), 459–467.

Brenner, K., You, L. & Arnold, F. H. (2008). Engineering microbial consortia: a new frontier in synthetic biology. *Trends in Biotechnology*, 26(9), 483–489.

Buchan, A., Neidle, E.L., & Moran, M.A. (2004). Diverse Organization of Genes of the  $\beta$ -Ketoacid Pathway in Members of the Marine Roseobacter Lineage. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(3) 1658-1668. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.3.1658-1668.2004>

Cabel, Jr. A.C., Aragon, G.M., Trazona, R.G., Magdadar, M.C., (2000). Application of sodium benzoate in surface water flow measurements in Mindanao geothermal production field, Philippines. *In: Proceedings World Geothermal Congress 2000, Kyushu – Tohoku, Japan, May 28– June 10, 1019–1024.*

Cao, B., Nagarajan, K., & Loh, K. (2009). Biodegradation of aromatic compounds: Current status and opportunities for biomolecular approaches. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85, 207-228. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2192-4>

Carmona, M., Zamarro, M.T., Blázquez, B., Durante-Rodríguez, G., Juárez, J.F., Valderrama, J.A., Barragán, M.J., García, J.L., & Díaz, E. (2009). Anaerobic catabolism of aromatic compounds: a genetic and genomic view. *Microbiology and molecular biology reviews*, 73(1), 71–133. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00021-08>

CCME (Canadian Council of Ministers of the Environment) (2010). Canadian Soil Quality. *Guidelines for Carcinogenic and Other Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (Environmental and Human Health Effects)*. Scientific Criteria Document (revised). 216 pp.

Cinar, O. (2004). Biodegradation of central intermediate compounds produced from biodegradation of aromatic compounds. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 26(5), 341-345. <https://doi.org/10.1007/s00449-004-0364-2>

Crawford, R.L., & Frick, T.D. (1977). Rapid spectrophotometric differentiation between glutathione-dependent and glutathione-independent gentisate and homogentisate pathways. *Applied and Environmental Microbiology*, 34, 170–174.

- Curtis, T. P., Sloan, W. T., & Scannell, J. W. (2002). Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(16), 10494–10499. <https://doi.org/10.1073/pnas.142680199>
- Dastgheib, S.M., Amoozegar, M.A., Khajeh, K., Shavandi, M., & Ventosa, A. (2012). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a halophilic microbial consortium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95(3), 789–798.
- Díaz E., Jiménez J.I., & Nogales J. (2013). Aerobic degradation of aromatic compounds. *Current Opinion in Biotechnology* 431–442. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.10.010>
- Díaz, E. (2004). Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. *International microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology*, 7, 173-180.
- Dong, C., Bai, X., Sheng, H., Jiao, L., Zhou, H., & Shao, Z. (2015). Distribution of PAHs and the PAH-degrading bacteria in the deep-sea sediments of the high-latitude Arctic Ocean. *Biogeosciences*, 12, 2163-2177.
- Duarte, M., Jauregui, R., Vilchez-Vargas, R., Junca, H., D. & Pieper, D.H. (2014). AromaDeg, a novel database for phylogenomics of aerobic bacterial degradation of aromatics. *Database: the journal of biological databases and curation*, 2014, bau118. <https://doi.org/10.1093/database/bau118>
- Freilich, S., Zarecki, R., Eilam, O., Segal, E.S., Henry, C.S., & Kupiec, M., Gophna, U., Sharan, R., & Ruppín, E. (2011). Competitive and cooperative metabolic interactions in bacterial communities. *Nature communications*, 2, 589. <https://doi.org/10.1038/ncomms1597>
- Fritsche, W. & Hofrichter, M. (2008). Aerobic Degradation by Microorganisms. *In Biotechnology (eds H. Rehm and G. Reed)*. <https://doi.org/10.1002/9783527620951.ch6>
- Fuchs, G., Boll, M., & Heider, J. (2011). Microbial degradation of aromatic compounds—from one strategy to four. *Nature Reviews Microbiology*, 9, 803-816. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2652>
- Ghosal, D., Ghosh, S., Dutta, T. K., & Ahn, Y. (2016). Current State of Knowledge in Microbial Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A Review. *Frontiers in microbiology*, 7, 1369. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01369>

Gibson, D.T., & Parales R.E. (2000). Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 11, 236–243.

Großkopf, T., & Soyer, O.S. (2014). Synthetic microbial communities. *Current opinion in microbiology*, 18, 72–77.

Gulkiv, C.A., & Buchan, A. (2013). Simultaneous Catabolism of Plant-Derived Aromatic Compounds Results in Enhanced Growth for Members of the Roseobacter Lineage. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(12), 3716-3723. <https://doi.org/10.1128/AEM.00405-13>

Guzik, U., Hupert-Kocurek, K., & Wojcieszynska, D. (2013). Intradiol dioxygenases — The key enzymes in xenobiotics degradation. R. Chamy, F. Rosenkranz (Eds.), *Biodegradation of hazardous and special products, InTech Rijeka, Croatia*, 129-153.

Harayama S., & Timmis K.N. (1992). Aerobic biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria. In H. Sigel, and A. Sigel (ed.), *Metal ions in biological systems*. New York, N.Y.

Harwood, C.S., & Parales, R.E. (1996). The  $\beta$ -ketoadipate pathway and the biology of self-identity. *Annual Review of Microbiology*, 50, 553–590.

Hassanshahian, M., Abarian, M., & Cappello, S. (2015). Biodegradation of Aromatic Compounds. *Biodegradation and Bioremediation of Polluted Systems - New Advances and Technologies*. <https://doi.org/10.5772/60894>

Huijbers, M.M., Montersino, S., Westphal, A.H., Tischler, D., & van Berkel, W.J. (2014). Flavin dependent monooxygenases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2–17. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2013.12.005>

Hunt, M., Kikuchi, T., Sanders, M., Newbold, C., Berriman, M., & Otto, T. D. (2013). REAPR: a universal tool for genome assembly evaluation. *Genome biology*, 14(5), R47. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-5-r47>

Izquierdo, A.R. (2013). Biodegradación de HAPs durante la biorremediación aeróbica de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo. Análisis de poblaciones bacterianas y genes funcionales (Tesis doctoral). Universitat de Barcelona, España.

Jackman, S. D., Vandervalk, B. P., Mohamadi, H., Chu, J., Yeo, S., Hammond, S. A., Jahesh, G., Khan, H., Coombe, L., Warren, R. L., & Birol, I. (2017). ABySS 2.0: resource-efficient assembly of large genomes using a Bloom filter. *Genome research*, 27(5), 768–777. <https://doi.org/10.1101/gr.214346.116>

- Jagmann, N., & Philipp, B., (2014). Design of synthetic microbial communities for biotechnological production processes. *Journal of Biotechnology*, 184, 209-218. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.05.019>.
- Jain, C., Rodriguez-R, L. M., Phillippy, A. M., Konstantinidis, K. T., & Aluru, S. (2018). High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. *Nature communications*, 9(1), 1-8.
- Jardine, J.L., Abia, A., Mavumengwana, V., & Ubomba-Jaswa, E. (2017). Phylogenetic Analysis and Antimicrobial Profiles of Cultured Emerging Opportunistic Pathogens (Phyla Actinobacteria and Proteobacteria) Identified in Hot Springs. *International journal of environmental research and public health*, 14(9), 1070. <https://doi.org/10.3390/ijerph14091070>
- Jessup, C.M., Kassen, R., Forde, S.E., Kerr, B., Buckling, A., Rainey, P.B., & Bohannan, B.J. (2004). Big questions, small worlds: microbial model systems in ecology. *Trends in ecology & evolution*, 19(4), 189-197.
- Jia, X., Liu, C., Song, H., Ding, M., Du, J., Ma, Q., & Yuan, Y. 2016. Design, analysis and application of synthetic microbial consortia. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 1(2),109-117.
- Jiménez, J.I., Nogales, J., García, J.L., & Díaz, E. (2010). A genomic view of the catabolism of aromatic compounds in *Pseudomonas*. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, Timmis, K. (ed). Springer: Berlin, Heidelberg, 1297–1325.
- Khaiwal, R., Sokhi, R., & Van Grieken, R. (2007). Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Source attribution, emission factors and regulation. *Atmospheric Environment*, 42, 2895-2921. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2007.12.010>
- Klein, J. (2000). Possibilities, limits and future developments of soil bioremediation. *Biotechnology, Environmental Processes II*, 465-507.
- Klittgord, N., & Segrè, D. (2010). Environments that Induce Synthetic Microbial Ecosystems. *PLOS Computational Biology*, 6(11): e1001002. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1001002>
- Koren, S., Walenz, B. P., Berlin, K., Miller, J. R., Bergman, N. H., & Phillippy, A. M. (2017). Canu: scalable and accurate long-read assembly via adaptive k-mer weighting and repeat separation. *Genome research*, 27(5), 722–736. <https://doi.org/10.1101/gr.215087.116>

Ladino-Orjuela, G., Gomes, E., Da Silva, R., Salt, C., & Parsons, J. (2015). Metabolic Pathways for Degradation of Aromatic Hydrocarbons by Bacteria. *Reviews of environmental contamination and toxicology*, 237, 105-121. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-23573-8\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-319-23573-8_5)

Landry, C., & Tremblay, C. (2012). Compositional differences between size classes of dissolved organic matter from freshwater and seawater revealed by an HPLC-FTIR system. *Environmental Science & Technology*, 46, 1700–1707. <https://doi.org/10.1021/es203711v>.

Li, D., Yan, Y., Ping, S., Chen, M., Zhang, W., Li, L., Lin, W., Geng, L., Liu, W., Lu, W., & Lin, M. (2010). Genome-wide investigation and functional characterization of the beta-ketoadipate pathway in the nitrogen-fixing and root-associated bacterium *Pseudomonas stutzeri* A1501. *BMC microbiology*, 10, 36. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-36>

Li, F., Liu, S., Lu, Q., Zheng, H., Osterman, I., Lukyanov, D., Sergiev, P., Dontsova, O., Liu, S., Ye, J., Huang, D., & Sun, C. (2019). Studies on Antibacterial Activity and Diversity of Cultivable Actinobacteria Isolated from Mangrove Soil in Futian and Maowehai of China. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM*. 2019. 3476567. <https://doi.org/10.1155/2019/3476567>.

Luan, T.G., Yu, K.S., Zhong, Y., Zhou, H.W., Lan, C.Y., & Tam, N.F. (2006) Study of metabolites from the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by bacterial consortium enriched from mangrove sediments. *Chemosphere*, 65(11), 2289–2296.

Lykidis, A., Chen, C.L., Tringe, S.G., McHardy, A.C., Copeland, A., Kyrpides, N.C., Hugenholtz, P., Macarie, H., Olmos, A., Monroy, O., & Liu W.T. (2011). Multiple syntrophic interactions in a terephthalate-degrading methanogenic consortium. *The ISME Journal*, 5(1), 122-130.

MacLean, A. M., Haerty, W., Golding, G. B., & Finan, T. M. (2011). The LysR-type PcaQ protein regulates expression of a protocatechuate-inducible ABC-type transport system in *Sinorhizobium meliloti*. *Microbiology (Reading, England)*, 157(Pt 9), 2522–2533. <https://doi.org/10.1099/mic.0.050542-0>

Maddocks, S., & Oyston, P. (2009). Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology (Reading, England)*, 154, 3609-3623. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/022772-0>

Mallick, S., Chakraborty, J., & Dutta, T.K. (2011). Role of oxygenases in guiding diverse metabolic pathways in the bacterial degradation of low-molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review. *Critical Reviews in Microbiology*, 37(1), 64–90. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2010.512268>

March, J. (1985). *Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure* (3rd ed.), New York: Wiley, ISBN 0-471-85472-7

Marston, C.P., Pereira, C., Ferguson, J., Fischer, K., Hedstrom, O., Dashwood, W., & Baird, W.M. (2001). Effect of a complex environmental mixture from coal tar containing polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) on the tumor initiation, PAH–DNA binding and metabolic activation of carcinogenic PAH in mouse epidermis. *Carcinogenesis*, 22(7), 1077–1086. <https://doi.org/10.1093/carcin/22.7.1077>

Meier-Kolthoff, J.P., & Göker, M. (2019). TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. *Nature communications* 10, 2182. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10210-3>

Mendel, S., Arndt, A., & Bugg, T. (2004). Lactone synthesis activity in a site-directed mutant of an extradiol catechol dioxygenase enzyme. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, 5, 666-668.

Meng, J., Sun, X., Li, S., & Liang, H. (2017). Draft Genome Sequence of *Paenarthrobacter nicotinovorans* Hce-1. *Genome announcements*, 5(30), e00727-17. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00727-17>

Molina-Henares, A.J., Krell, T., Eugenia Guazzaroni, M., Segura, A. & Ramos, J.L. (2006). Members of the IclR family of bacterial transcriptional regulators function as activators and/or repressors. *FEMS Microbiology Reviews*, 30: 157-186. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2005.00008.x>

Moraes, E. C., Alvarez, T. M., Persinoti, G. F., Tomazetto, G., Brenelli, L. B., Paixão, D., Ematsu, G. C., Aricetti, J. A., Caldana, C., Dixon, N., Bugg, T., & Squina, F. M. (2018). Lignolytic-consortium omics analyses reveal novel genomes and pathways involved in lignin modification and valorization. *Biotechnology for biofuels*, 11, 75. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1073-4>

Moriya, Y., Itoh, M., Okuda, S., Yoshizawa, A. C., & Kanehisa, M. (2007). KAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server. *Nucleic acids research*, 35(Web Server issue), W182–W185. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm321>

Moscoso, F., Tejjiz, I., Deive, F.J., & Sanromán, M.A. (2012) Efficient PAHs biodegradation by a bacterial consortium at flask and bioreactor scale. *Bioresource Technology*, 119(3), 270–276.

Mueller, J., Cerniglia, C., & Pritchard, P. (1996). Bioremediation of environments contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons. In R. Crawford & D. Crawford (Eds.), *Bioremediation: Principles and Applications (Biotechnology Research, 125-194)*. Cambridge: Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511608414.007>

Nadalin, F., Vezzi, F., & Policriti, A. (2012). GapFiller: a de novo assembly approach to fill the gap within paired reads. *BMC bioinformatics*, 13 Suppl 14(Suppl 14), S8. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-S14-S8>

Nešvera, J., Rucká, L., & Pátek, M., (2015). Catabolism of Phenol and Its Derivatives in Bacteria: Genes, Their Regulation, and Use in the Biodegradation of Toxic Pollutants. *Advances in applied microbiology*, 93, 107-160.

Nichols, N. N., & Harwood, C. S. (1995). Repression of 4-hydroxybenzoate transport and degradation by benzoate: a new layer of regulatory control in the *Pseudomonas putida* beta-ketoadipate pathway. *Journal of bacteriology*, 177(24), 7033–7040. <https://doi.org/10.1128/jb.177.24.7033-7040.1995>

Nwinyi, O. C., Ajayi, O. O., & Amund, O. O. (2016). Degradation of polynuclear aromatic hydrocarbons by two strains of *Pseudomonas*. *Brazilian journal of microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 47(3), 551–562. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.04.026>

Oie, C.S., Albaugh, C.E., & Peyton, B.M. (2007). Benzoate and salicylate degradation by *Halomonas campisalis*, an alkaliphilic and moderately halophilic microorganism, *Water Research*, 41(6), 1235-1242. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.12.029>

Ondov, B. D., Treangen, T. J., Melsted, P., Mallonee, A. B., Bergman, N. H., Koren, S., & Phillippy, A. M. (2016). Mash: fast genome and metagenome distance estimation using MinHash. *Genome biology*, 17(1), 132.

Otto, T. D., Sanders, M., Berriman, M., & Newbold, C. (2010). Iterative Correction of Reference Nucleotides (iCORN) using second generation sequencing technology. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 26(14), 1704–1707. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq269>

Overbeek, R., Olson, R., Pusch, G. D., Olsen, G. J., Davis, J. J., Disz, T., Edwards, R. A., Gerdes, S., Parrello, B., Shukla, M., Vonstein, V., Wattam, A. R., Xia, F., & Stevens, R. (2014). The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic acids research*, 42(Database issue), D206–D214. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1226>

Pao, S.S., Paulsen, I.T., & Saier, M.H., Jr. (1998). Major facilitator superfamily. *Microbiology and molecular biology reviews*, 62(1), 1–34.

Parales, R., & Resnick, S. (2004). Aromatic hydrocarbon dioxygenases. *In: Singh A, Ward O (eds) Biodegradation and bioremediation*. Springer, Berlin, 175–195.

Parales, R.E., & Harwood, C.H. (1993). Regulation of the *pcaIJ* genes for aromatic degradation in *Pseudomonas putida*. *Journal of Bacteriology*, 175, 5829–5838.

Park, M., Jeon, Y., Jang, H.H., Ro, H.S., Park, W., Madsen, E.L., & Jeon, C.O. (2007). Molecular and biochemical characterization of 3-hydroxybenzoate 6-hydroxylase from *Polaromonas naphthalenivorans* CJ2. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 5146–5152.

Parks, D. H., Imelfort, M., Skennerton, C. T., Hugenholtz, P., & Tyson, G. W. (2015). CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome research*, 25(7), 1043–1055. <https://doi.org/10.1101/gr.186072.114>

Pérez-Pantoja, D., González, B., & Pieper, D.H. (2010). Aerobic Degradation of Aromatic Hydrocarbons. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, 799–837 [https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4\\_60](https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4_60)

Pérez-Pantoja, D., Leiva-Novoa, P., Donoso, R., Little, C., Godoy, M., Pieper, D., & Gonzalez, B. (2015). Hierarchy of Carbon Source Utilization in Soil Bacteria: Hegemonic Preference for Benzoate in Complex Aromatic Compound Mixtures Degraded by *Cupriavidus pinatubonensis* Strain JMP134. *Applied and environmental microbiology*, 81. <https://doi.org/10.1128/AEM.04207-14>

Pircher, H., Straganz, G. D., Ehehalt, D., Morrow, G., Tanguay, R. M., & Jansen-Dürr, P. (2011). Identification of human fumarylacetoacetate hydrolase domain-containing protein 1 (FAHD1) as a novel mitochondrial acylpyruvase. *The Journal of biological chemistry*, 286(42), 36500–36508. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.264770>

Phale, P., Sharma, A., & Gautam, K. (2019). 11 - Microbial degradation of xenobiotics like aromatic pollutants from the terrestrial environments.

*Pharmaceuticals and Personal Care Products: Waste Management and Treatment Technology*, 259-278. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816189-0.00011-1>

Ponomarova, O., & Patil, K.R. (2015). Metabolic interactions in microbial communities: untangling the Gordian knot. *Current Opinion in Microbiology*, 27, 37-44, ISSN 1369-5274, <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.06.014>

Robbins, R.J. (2003). Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(10), 2866-2887. <https://doi.org/10.1021/jf026182t>

Sahlin, K., Vezzi, F., Nystedt, B., Lundeberg, J., & Arvestad, L. (2014). BESST--efficient scaffolding of large fragmented assemblies. *BMC bioinformatics*, 15(1), 281. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-15-281>

Seo, J.S., Keum, Y.S., & Li, Q.X. (2009). Bacterial degradation of aromatic compounds. *International journal of environmental research and public health*, 6(1), 278–309. <https://doi.org/10.3390/ijerph6010278>

Siddiquee, S. (2014). Recent Advancements on the Role and Analysis of Volatile Compounds (VOCs) from Trichoderma. *Biotechnology and Biology of Trichoderma. Elsevier*, 139-175. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59576-8.00011-4>.

Song, H., Ding, M.Z., Jia, X.Q., Ma, Q., & Yuan, Y.J. (2014). Synthetic microbial consortia: from systematic analysis to construction and applications. *Chemical Society reviews*, 43(20), 6954-6981.

Stadie, J., Gulitz, A., Ehrmann, M.A., & Vogel, R.F. (2013). Metabolic activity and symbiotic interactions of lactic acid bacteria and yeasts isolated from water kefir. *Food Microbiology*, 35(2), 92-98.

Suenaga, H., Mizuta, S., Miyazaki, K., & Yaoi, K. (2014). Diversity of extradiol dioxygenases in aromatic degrading microbial community explored using both culture-dependent and culture independent approaches. *FEMS Microbiology Ecology*, 367–379.

Táncsics, A., Szoboszlai, S., Kriszt, B., Kukolya, J., Baka, E., Márialigeti, K., & Révész, S. (2008). Applicability of the functional gene catechol 1,2-dioxygenase as a biomarker in the detection of BTEX-degrading *Rhodococcus* species. *Journal of applied microbiology*, 105(4), 1026–1033.

Vogt, C., Kleinsteuber, S., & Richnow, H.H. (2011). Anaerobic benzene degradation by bacteria. *Microbial biotechnology*, 4(6), 710–724. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2011.00260.x>

Vrchotova, B., Macková, M., Macek, T., & Demnerová, K. (2013). Bioremediation of chlorobenzoic acids. *Applied bioremediation - active and passive approaches*. InTech, Rijeka, 3–32.

Wackett, L.P. (2003). *Pseudomonas putida*—A versatile biocatalyst. *Nature Biotechnology*, 21, 136–138.

Wang, C., Huang, Y., Zhang, Z., & Wang, H. (2018). Salinity effect on the metabolic pathway and microbial function in phenanthrene degradation by a halophilic consortium. *AMB Express*. 8. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0594-3>

Wang, Z. (2007). Co-variations of bacterial composition and catabolic genes related to PAH degradation in a produced water treatment system consisting of successive anoxic and aerobic units. *The science of the total environment*, 373(1), 356–362.

Zerbino, D. R. (2010). Using the Velvet de novo assembler for short-read sequencing technologies. *Current protocols in bioinformatics*, Chapter 11, Unit–11.5. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi1105s31>

Zimin, A. V., Marçais, G., Puiu, D., Roberts, M., Salzberg, S. L., & Yorke, J. A. (2013). The MaSuRCA genome assembler. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 29(21), 2669–2677. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt476>