



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA CEPA CON
ACTIVIDAD 2,3 EXTRADIOL DIOXIGENASA Y EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE
LA ENZIMA RESPONSABLE DE DICHA ACTIVIDAD**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias**

**PRESENTA:
KARLA SOFIA MILLAN LOPEZ**

**TUTOR PRINCIPAL
Dra. Liliana Pardo López
IBt-UNAM**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dr. José Adelfo Escalante Lozada
IBt-UNAM
Dra. Hortencia Silva Jiménez
IIO-UABC**

Cuernavaca, Morelos. Marzo, 2021



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.

Índice

<i>Resumen</i>	8
<i>Introducción</i>	9
<i>Marco teórico</i>	10
<i>Explotación petrolera en México</i>	10
<i>Golfo de México y derrames de petróleo</i>	10
<i>Componentes del petróleo</i>	13
<i>Hidrocarburos aromáticos</i>	14
<i>Bacterias degradadoras de hidrocarburos aromáticos</i>	15
<i>Antecedentes</i>	21
<i>Justificación</i>	27
<i>Hipótesis</i>	27
<i>Objetivo general</i>	28
<i>Objetivos específicos</i>	28
<i>Metodología</i>	29
<i>Expresión heteróloga del gen putativo Xyle/CatE.</i>	33
<i>Ensayo estándar para determinación de actividad enzimática 2,3 extradiol dioxigenasa en proteína purificada.</i>	36
<i>Caracterización bioquímica de la enzima 2,3 extradiol dioxigenasa</i>	36
<i>pH óptimo</i>	36
<i>Temperatura óptima</i>	36
<i>Salinidad</i>	37
<i>Especificidad de la enzima por el sustrato</i>	37
<i>Caracterización molecular, análisis bioinformático y búsqueda de enzimas involucradas de degradación de compuestos aromáticos en el genoma del aislado</i>	37
<i>Análisis estructural de la proteína</i>	38
<i>Resultados</i>	40
<i>Aislamiento de una cepa con actividad 2,3 extradiol dioxigenasa a partir del consorcio positivo a la actividad</i>	40
<i>Identificación molecular de la cepa positiva a la actividad</i>	41
<i>Análisis bioinformático del genoma</i>	45
<i>Análisis estructural de la proteína</i>	48

<i>Expresión heteróloga del gen responsable de la actividad</i>	<i>51</i>
<i>Identificación de clona positiva a la actividad 2,3 extradiol dioxigenasa.....</i>	<i>52</i>
<i>Expresión de la enzima 2,3 extradiol dioxigenasa</i>	<i>54</i>
<i>Purificación de la enzima 2,3 extradiol dioxigenasa</i>	<i>57</i>
<i>Caracterización bioquímica de la enzima 2,3 extradiol dioxigenasa</i>	<i>59</i>
<i>Determinación de pH óptimo.....</i>	<i>59</i>
<i>Determinación de la actividad en salinidad</i>	<i>60</i>
<i>Determinación de la actividad sobre sustratos análogos al catecol.....</i>	<i>62</i>
<i>Determinación de temperatura óptima</i>	<i>62</i>
<i>Resultados del análisis bioinformático del genoma completo en búsqueda de genes involucrados en la degradación de compuestos aromáticos.....</i>	<i>64</i>
<i>Análisis del genoma.....</i>	<i>64</i>
<i>Genes involucrados en degradación de compuestos aromáticos.</i>	<i>64</i>
<i>Discusión</i>	<i>71</i>
<i>Conclusiones.....</i>	<i>87</i>
<i>Perspectivas</i>	<i>88</i>
<i>Referencias.....</i>	<i>89</i>
<i>Anexo 1. Cálculo de actividad.</i>	<i>101</i>
<i>Anexo 2. Genomas utilizados para hacer el ANI. Se emplearon los 278 genomas disponibles en NCBI hasta junio del 2019.</i>	<i>105</i>
<i>Anexo 3. Tabla de referencias taxonómicas.</i>	<i>107</i>
<i>Anexo 4. Manual de reactivos utilizados.....</i>	<i>111</i>

Índice de figuras

Figura 1. Puntos de emanaciones naturales de petróleo identificados en el Golfo de México vía remota mediante la detección de manchas superficiales en el mar	12
Figura 2. Esquematización del proceso de disipación de las manchas de petróleo generadas en el mar mediante procesos físicos, químicos y biológicos.....	13
Figura 3. Estructuras de las fracciones de hidrocarburos más abundantes en el petróleo. 14	
Figura 4. Convergencia de las rutas de degradación de compuestos mono y poli aromáticos	16
Figura 5. Esquematización del acomodo espacial de la molécula de 2,3 ED.	18
Figura 6. Secuencia de aminoácidos codificante para la enzima 2,3 ED.....	19
Figura 7. Representación de la superficie molecular de la pared interna del sitio activo de la enzima 2,3 ED.	20
Figura 8. Mecanismo de acción propuesto de la enzima 2,3 ED..	20
Figura 9. Catecol y moléculas análogas en estructura analizadas para la actividad 2,3 ED. 23	
Figura 10. Esquematización de los puntos de muestreo realizados por el CIGoM.....	24
Figura 11. Esquematización de las profundidades de muestreo realizadas por el CIGoM en una de las estaciones localizada en el sur del Golfo de México.....	24
Figura 12. Ensayo espectrofotométrico de producción de S-2HMC.....	26
Figura 13. Esquematización de la metodología general propuesta para el desarrollo del proyecto.....	29
Figura 14. Catecol por goteo. Método para la detección de la actividad 2,3 ED en placas de medio sólido	30
Figura 15. Esquematización del método espectrofotométrico para la detección de la producción de S-2HMC.....	31
Figura 16. Vector de clonación pET-22b con el fragmento codificante para la enzima 2,3 ED.	34
Figura 17. Cambio de coloración en el consorcio AD18 con actividad 2,3 ED por goteo de catecol.....	40
Figura 18. Morfología de los aislados obtenidos de la dispersión del consorcio. 14A (AD18-5S), 14B (AD18-5J)..	41
Figura 19. Árbol filogenético de las cepas aisladas del consorcio positivo generado utilizando el gen 16S rARN de los dos aislados.	42
Figura 20. Barrido espectral del producto (S 2-HMC) generado por la enzima 2,3 ED en los dos aislados (AD18; 5J y 5S).....	43
Figura 21. Mapa de calor ANI (Average Nucleotide Identity) con 278 genomas de <i>Pseudomonas stutzeri</i> disponibles en NCBI hasta junio del 2019.....	45
Figura 22. Contexto genómico de los genes involucrados en la degradación de benzoato en <i>Pseudomonas stutzeri</i> D18 (meta)	46
Figura 23. Resultados del análisis de la secuencia de aminoácidos de la enzima 2,3 ED mediante BLASTP.....	48
Figura 24. Modelado predicho de uno de los monómeros de la enzima catecol 2,3 ED de <i>Pseudomonas stutzeri</i> D18.	49
Figura 25. Secuencia de aminoácidos y estructura de la enzima 2,3 ED..	50

Figura 26. Electroforesis de los fragmentos amplificados por PCR.....	51
Figura 27. Coloración amarilla característica de la actividad 2,3 ED.	52
Figura 28. Gel de electroforesis de las clonas evaluadas para la actividad 2,3 ED digeridas con las enzimas de restricción <i>EcoRI-XhoI</i>	53
Figura 29. Protocolo de las condiciones de inducción de la expresión de la proteína 2,3 ED utilizadas inicialmente.	54
Figura 30. Inducción de la producción de la proteína 2,3 ED visualizadas en SDS-PAGE. ...	55
Figura 31. Formación de cuerpos de inclusión en células de <i>E. coli</i> de la clona 10 (C10) ...	55
Figura 32. Fracciones de la proteína de interés en cada una de las muestras, analizado por densitometría con el programa Image J.....	56
Figura 33. Proceso de purificación de la proteína 2,3 ED visualizado mediante un gel SDS-PAGE..	57
Figura 34. Gel SDS-PAGE del proceso de purificación de la enzima 2,3 ED empleando un gradiente de imidazol (60 mM-300 mM).	58
Figura 35. Barrido espectral entre 300 y 500 nm para determinar la aparición de productos espontáneos al adicionar el sustrato (catecol).....	59
Figura 36. Determinación de pH óptimo de la actividad 2,3 ED.	60
Figura 37. Determinación de la actividad 2,3 ED al adicionar concentraciones crecientes de NaCl.....	61
Figura 38. Actividad 2,3 ED relativa en agua de mar a un pH de 7.31.....	62
Figura 39. Determinación de la actividad de la enzima por el sustrato sobre catecol y moléculas análogas en estructura.....	62
Figura 40. Determinación de temperatura óptima de la actividad 2,3 ED entre 10 y 60 °C.	63
Figura 41. Vías de degradación del benzoato; vías <i>orto</i> y <i>meta</i> de ruptura del catecol.....	65
Figura 42. Crecimiento del aislado <i>P. stutzeri</i> D18 en ácido benzoico.	66
Figura 43. Vía de degradación del tolueno.	68
Figura 44. Contexto genómico de los genes de la vía de degradación del tolueno encontrados en el genoma de <i>P. stutzeri</i> AD18.	69
Figura 45. Vía de degradación del xileno	70
Figura 46. Abundancia relativa de lecturas de los géneros presentes en el consorcio D18..	72
Figura 47. Abundancia de 2,3 ED agrupadas por género reportadas en UniProt hasta noviembre del 2019.....	74
Figura 48. Contexto genómico de los genes involucrados en la degradación de benzoato en <i>Pseudomonas stutzeri</i> (<i>orto</i>).	75
Figura 49. Regulación cruzada en las vías de degradación <i>meta</i> y <i>orto</i> del catecol en <i>Pseudomonas putida</i> mt2.....	76
Figura 50. Resultados de BLASTP de la comparación de la secuencia de aminoácidos de los dos reguladores..	77
Figura 51. Esquematación de los datos de pH óptimo para la enzima 2,3 ED reportadas presentando un promedio de 7.5 y un rango de actividad entre 2 y 10.7.	79
Figura 52. Gráfica de DO contra tiempo se muestra la línea de tendencia y los valores de pendiente y el coeficiente de correlación.	103

Índice de tablas

Tabla 1. Aporte estimado de petróleo derramado en el Golfo de México entre los años 1993-2010. (NOOA; Lee <i>et al.</i> , 2015).....	11
Tabla 2. Localización de los aminoácidos importantes en la interacción de la proteína con el cofactor (Fell) y sustrato (catecol) (Kita <i>et al</i> 1999; Viggiani <i>et al.</i> , 2004).	19
Tabla 3. Actividad 2,3 ED reportada por diversos autores en distintos géneros bacterianos y en metagenotecas generadas a partir de muestras ambientales en presencia de hidrocarburos.	21
Tabla 4. Resultados de la evaluación de la actividad 2,3 ED en metagenotecas, aislados y consorcios bacterianos hidrocarbonoclastas del Golfo de México. En paréntesis en rojo se marcan las muestras positivas a la actividad 2,3 ED.	25
Tabla 5. Programas utilizados para realizar el ensamble del genoma.....	31
Tabla 6. Tampones utilizados en los diferentes pH analizados.	36
Tabla 7. Genes putativos encontrados por porcentaje de identidad con genes de la vía de degradación de benzoato en <i>Pseudomonas stutzeri</i> , se marca en negritas el gen putativo <i>catE-xylE</i>	46
Tabla 8. Actividad relativa porcentual obtenida para el ensayo enzimáticos 2,3 ED utilizando proteína purificada, extracto total de la clona y aislado <i>P. stutzeri</i>	58
Tabla 9. Identificación de enzimas implicadas en la degradación de tolueno en <i>P. stutzeri</i> AD18.	67
Tabla 10. Abundancia de los géneros bacterianos reportados para la línea base del Golfo de México S18.....	73
Tabla 11. Rangos de pH y pH óptimos para enzimas 2,3 ED previamente descritas en la literatura.	78
Tabla 12. Rangos de actividades específicas reportadas para enzimas 2,3 ED en diferentes géneros bacterianos.	80
Tabla 13. Histórico de temperaturas en el Golfo de México 1985-2015.....	81
Tabla 14. Temperaturas óptimas reportadas provenientes de diversos ambientes.	82
Tabla 15. Actividad sobre moléculas análogas al catecol.	85
Tabla 16. Valores obtenidos para la corrección microplaca-celda.	101
Tabla 17. Lecturas de absorbancia a 375 nm durante 3 minutos en la cinética de producción de S-2HMC por la enzima 2,3 ED en tampón de fosfatos 50 mM a pH 7.4. ...	102
Tabla 18. Resumen de los valores calculados.	103

Abreviaturas

2,3 ED	2,3 Extradiol Dioxigenasa
3MBZ	3 Metil Benzoato
Bz	Benzoato
CIGoM	Consortio de Investigación del Golfo de México
DO	Densidad Óptica
DWH	Deepwater Horizon
GoM	Golfo de México
HAP	Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos
MC	Metil Catecol
MMF	Metagenómica-Malla-Fina
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NGoM	Norte del Golfo de México
S-2HMC	Semialdehído 2-Hidroximuconato

Agradecimientos

El presente trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de la Dra. Liliانا Pardo LInPI 2 (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.

Mis más sinceros agradecimientos a mi tutora la Dra. Liliانا Pardo López por brindarme la oportunidad de pertenecer a su magnífico grupo de trabajo, por la confianza que siempre me ha dado, por siempre darse un momento para estar de manera académica y personal, por la manera de festejar los logros y afrontar los fracasos. Muchas gracias por su gran apoyo en todos los sentidos.

A los miembros del Laboratorio de Investigaciones Institucionales II del Instituto de Biotecnología de la UNAM mi segunda familia: Diego, Isaac, Jaime, Jorge, Dr. José Luis, al Dr. Luis Felipe, a mis compañeras y amigas Libertad e Itzel.

Especialmente al Team dioxigenasas: Dra. Julieta Rodríguez y Katy Ornelas que han dejado una gran marca en mi vida y mi corazón.

A mi comité tutor por su gran apoyo durante el desarrollo de este proyecto: Al Dr. José Adelfo Escalante Lozada y a la Dra. Hortencia Silva Jiménez.

Al comité evaluador:
Dr. Ayixon Sánchez Reyes
Dra. Clarita Olvera Carranza
Dra. Claudia Rodríguez Almazán
Dr. Enrique Rudiño Piñera
Dr. Ramón Alberto Batista-García

Con todo mi cariño y amor agradezco a mis padres que siempre han estado para escucharme y apoyarme en todo, a mis hermanos Raúl, Carlos, Kayra y Angel por su apoyo y afecto.

Este trabajo se realizó gracias a la beca de CONACyT para estudios de posgrado nivel maestría con número de becario 957581.

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.



Resumen

El petróleo es un recurso natural altamente explotado, durante su manejo pueden ocurrir derrames provocando contaminación a los ecosistemas. Una de las fracciones más abundantes del petróleo son los hidrocarburos aromáticos los cuales de manera natural tienden a degradarse muy lentamente. Las bacterias han demostrado ser unas importantes herramientas en la degradación de los compuestos aromáticos, teniendo el potencial de llevar a cabo la degradación completa de estos compuestos.

Entre los compuestos aromáticos contaminantes destaca el catecol que es un importante intermediario en las vías de degradación de compuestos aromáticos contaminantes como el benceno, tolueno, fenol, naftaleno, antranilato y salicilato. La ruptura del catecol es catalizada por la enzima 2,3 extradiol dioxigenasa (EC 1.13.11.2) generando productos monitoreables fácilmente, lo cual le confiere una alta importancia en la degradación y monitoreo de compuestos aromáticos.

El objetivo de este trabajo fue el aislamiento y caracterización molecular de una cepa con actividad 2,3 extradiol dioxigenasa y la expresión heteróloga de la enzima responsable de la actividad. Se identificó un aislado con la actividad enzimática a partir de un consorcio proveniente de una muestra de columna de agua del Golfo de México que fue clasificada mediante un análisis bioinformático como *Pseudomonas stutzeri*. Posteriormente se identificó la enzima 2,3 extradiol dioxigenasa la cual fue expresada heterológamente y purificada mediante cromatografía de afinidad. Se analizó la actividad catalítica de la enzima realizando ensayos cinéticos encontrando la actividad óptima en un pH de 7.4 a 15 °C sobre catecol, presentando hasta 50% de actividad sobre su análogo el 4 clorocatecol. La enzima presenta adicionalmente actividad hasta del 50% en agua de mar y una actividad específica de 0.1199 ± 0.0114 U.

Introducción

La utilización de los combustibles fósiles ha contribuido enormemente al desarrollo humano, uno de los principales contribuyentes es el petróleo que representa el principal recurso energético del planeta. Los combustibles fósiles actualmente representan aproximadamente el 86% de la demanda mundial de energía primaria, la cual está aumentando gradualmente, obteniéndose en gran medida de la combustión de petróleo (36%) seguida por el carbón (27%) y el gas natural (23%) (Maggio *et al.*, 2012).

Desafortunadamente esto también ha traído consigo consecuencias ecológicas negativas (Abas *et al.*, 2015); por ejemplo, la contaminación por la ignición de combustibles fósiles es la principal amenaza ambiental y para la salud humana a nivel mundial (Perera, 2018). El aire se ve afectado por la combustión de carbón, diésel, gasolina, petróleo y gas natural; que es utilizado para la producción de electricidad, la calefacción, en el transporte y la industria.

El empleo de combustibles fósiles para la producción de energía, produce casi todas las emisiones de dióxido de azufre y óxido de nitrógeno para el ambiente (EPA, 2016), aunado a esto los derrames petroleros y su combustión generan grandes cantidades de CO₂ (Díaz *et al.*, 2004); en donde también se emiten hidrocarburos aromáticos (HA), dióxido de nitrógeno y azufre, mercurio y productos químicos volátiles (Perera, 2017) provocando contaminación en ambientes acuáticos y terrestres.

Para contender con esta problemática se han estudiado mecanismos de degradación de los componentes contaminantes liberados al ambiente, una de los compuestos en donde se ha enfocado una gran atención son los HA.

Durante el proceso de degradación de los HA se generan intermediarios centrales importantes como el catecol, la eliminación de este compuesto del ambiente de manera natural es muy lenta debido la presencia de un anillo bencénico que le confiere una alta estabilidad.

Las bacterias han demostrado ser una herramienta versátil, empleando enzimas especializadas para la degradación de los HA como el catecol.

Uno de los mecanismo de degradación del catecol es la reacción catalizada por la enzima 2,3 extradiol dioxigenasa que cataliza la incorporación de dos átomos de oxígeno en el anillo bencénico provocando la apertura del anillo generando semialdehido 2 hidroximuconato, esta actividad enzimática es fácilmente detectable al generar un visible cambio de coloración amarillo a

partir de un sustrato incoloro. Estas características la perfilan como una herramienta en la degradación de hidrocarburos y como bioindicador de la presencia de estos.

Marco teórico

Explotación petrolera en México

En 1904 se hizo el primer uso comercial de hidrocarburos en México, logrando colocarse como uno de los principales productores mundiales en la década de 1920. La explotación petrolera a gran escala en el Golfo de México comenzó desde 1975, aumentando en gran medida el desarrollo industrial y a la vez generando problemas de contaminación que afectan el ecosistema. Actualmente el Golfo de México es una de las regiones petroleras más productivas del mundo, encontrándose en el octavo lugar a nivel mundial para los primeros meses del 2019 con un aproximado de 1,653.29 miles de barriles por día (Botello, 2005, Soto *et al.*, 2004, JODI Oil, 2019).

La explotación petrolera se desarrolla principalmente en plataformas marinas y zonas de humedales, aumentando así el riesgo de accidentes petroleros en estos sitios (Sarat, 2003).

Golfo de México y derrames de petróleo

El ambiente marino del Golfo de México presenta características particulares como:

- Temperatura superficial, presenta un promedio entre 29.7 y 28.8 °C, la cual desciende al aumentar la profundidad obteniendo temperaturas de 20 °C entre los 40 y 63 metros de profundidad y alcanzando los 0 °C en el fondo marino (Piola *et al.*, 2013; Turner *et al.*, 2001).

- pH, para el año 2015 la Oficina Nacional de Administración Oceánica (NOAA) y Atmosférica reportó el pH de la superficie marina del Golfo de México entre 8 y 8.14.

- Salinidad, en el Golfo de México se presenta un gradiente de salinidad generado por las corrientes marinas y el flujo de agua dulce proveniente de los

ríos, se ha calculado un promedio: el agua superficial presenta salinidades máximas entre 36.7 y 36.8‰ que decrece al incrementar la profundidad alcanzando a los mil metros de profundidad hasta un 34.97‰ (Invemar, 2004; Piola, 2013).

Desde el inicio de la explotación petrolera han ocurrido importantes derrames, en la tabla 1 se muestra una breve recopilación de los mismos. Además en las actividades de extracción se pueden generar derrames de hidrocarburos y explosiones, provocando acumulación de residuos de perforación y lodos aceitosos (JODI Oil 2019; Ibarra *et al.*, 2003).

Uno de los derrames más importantes ocurrió en la plataforma Deepwater Horizon (DWH) en abril del 2010, en el que fueron vertidos aproximadamente 4.1 millones de barriles al mar contaminando la superficie y el fondo marino. Este suceso cambió la percepción del mundo en cuanto al riesgo ambiental asociado con explosiones en plataformas petroleras y ocasionó cambios en los requisitos regulatorios (Lee *et al.*, 2015).

Tabla 1. Aporte estimado de petróleo derramado en el Golfo de México entre los años 1993-2010. (NOAA; Lee *et al.*, 2015).

Año	Derrame	Cantidad derramada
1979	Colisión Mimosas/Burmah	7.8 millones de galones
1979	Ixtoc	113-300 millones de galones
1984	Alvenus	2.7 millones de galones
1990	Megaborg	5.1 millones de galones
1993	Ocean 255	336,000 galones
2005	Huracán Katrina	8 millones de galones
2010	Deepwater Horizon	172.2 millones de galones

La presencia de petróleo en el mar no se debe exclusivamente al aporte generado en las zonas de exploración y producción, también existen filtraciones naturales. Las emanaciones naturales del fondo marino llegan a la superficie marina en donde se acumulan para formar manchas de petróleo que flotan en la superficie, lo que hace posible su detección remota (Figura 1) (MacDonald *et al.*, 1993). MacDonald y colaboradores en el año 2015

identificaron 914 distintas zonas de emanaciones naturales de hidrocarburos. Según el Consejo Nacional de Investigación de la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos, en el 2015 las emisiones naturales del petróleo representaron a escala global aproximadamente el 46% anual de las aportaciones de hidrocarburos al ambiente marino (NRS, 2003). Cientos de millones de litros de petróleo entran al ambiente marino cada año provenientes de fuentes naturales y antropogénicas (Head *et al.*, 2006).

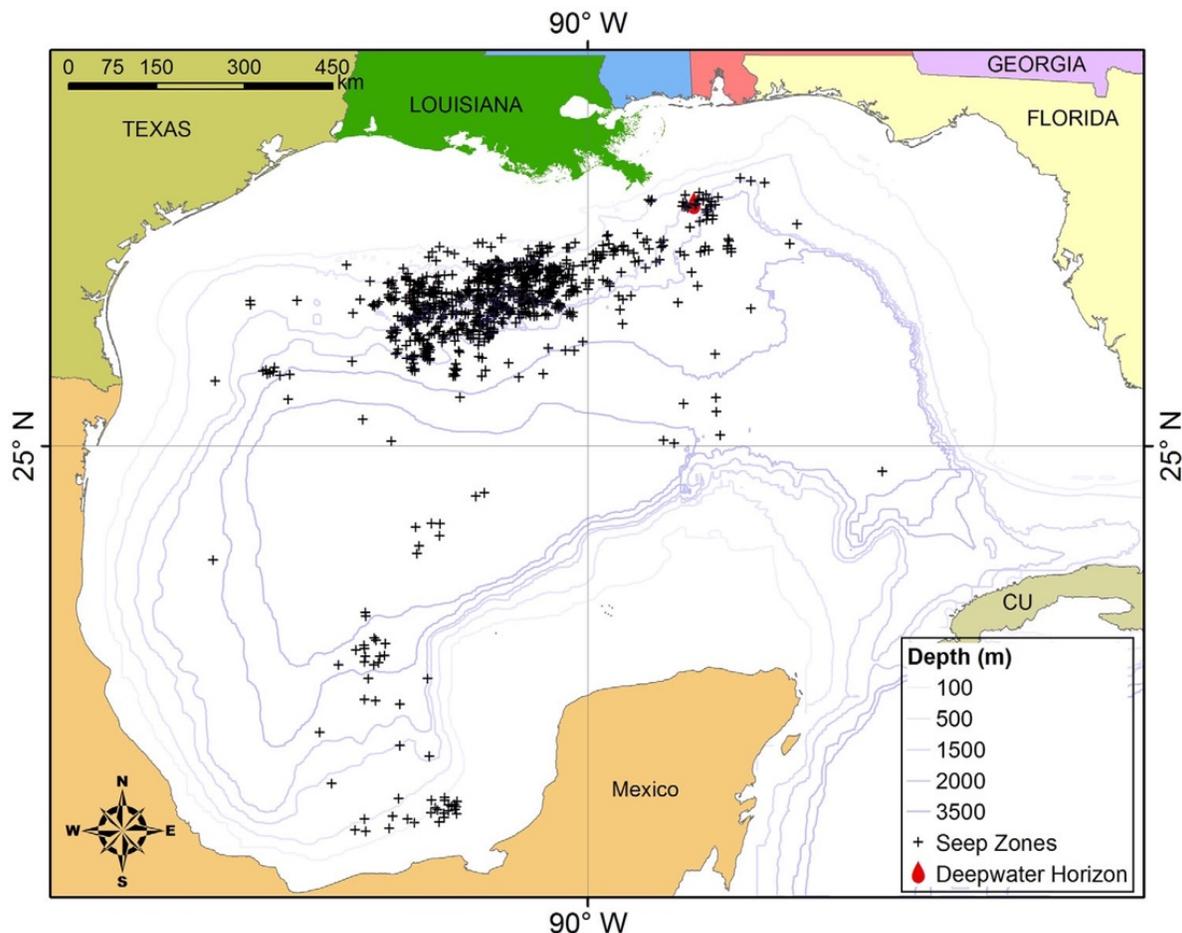


Figura 1. Puntos de emanaciones naturales de petróleo identificados en el Golfo de México vía remota mediante la detección de manchas superficiales en el mar (MacDonald *et al.*, 2015).

Cuando ocurre un derrame en el mar, como se mencionó anteriormente se forman manchas aceitosas que flotan en la superficie y se extienden debido a las corrientes marinas; la suma de procesos físicos, químicos y biológicos que actúan sobre el derrame de hidrocarburo cambian su extensión y composición inicial, disminuyendo el volumen de la mancha en la superficie, siendo cada vez menos visible hasta desaparecer (Reed *et al.*, 1999). La disipación de la mancha de petróleo puede ocurrir mediante dos procesos; la biodegradación

que se refiere a procesos biológicos y la meteorización referida a los procesos físicos y químicos (Figura 2), (Guerrero, 2014).

Los métodos de remoción del petróleo generalmente usados son: físicos que utilizan la remoción manual o colección pasiva absorbente, químicos mediante la adición de dispersantes y biológicos con el enriquecimiento de nutrientes y productos microbianos (Michel *et al.*, 2000).

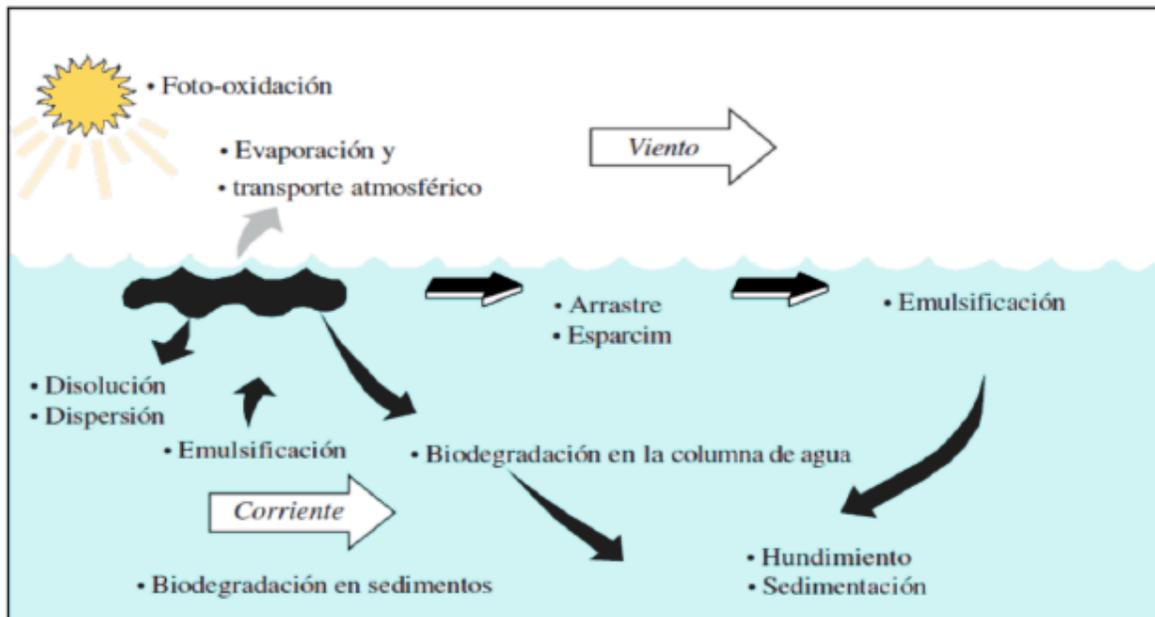


Figura 2. Esquematación del proceso de disipación de las manchas de petróleo generadas en el mar mediante procesos físicos, químicos y biológicos (Modificado de Guerrero, 2014).

Componentes del petróleo

El petróleo crudo está constituido principalmente por hidrocarburos (50-98%), que son compuestos químicos de hidrógeno y carbono, mayormente presentes como alcanos, cicloalcanos (Figura 3a) y aromáticos (Figura 3b), estos últimos contienen por lo menos un anillo bencénico en su estructura molecular lo que les confiere una alta estabilidad (Espina *et al.*, 2005).

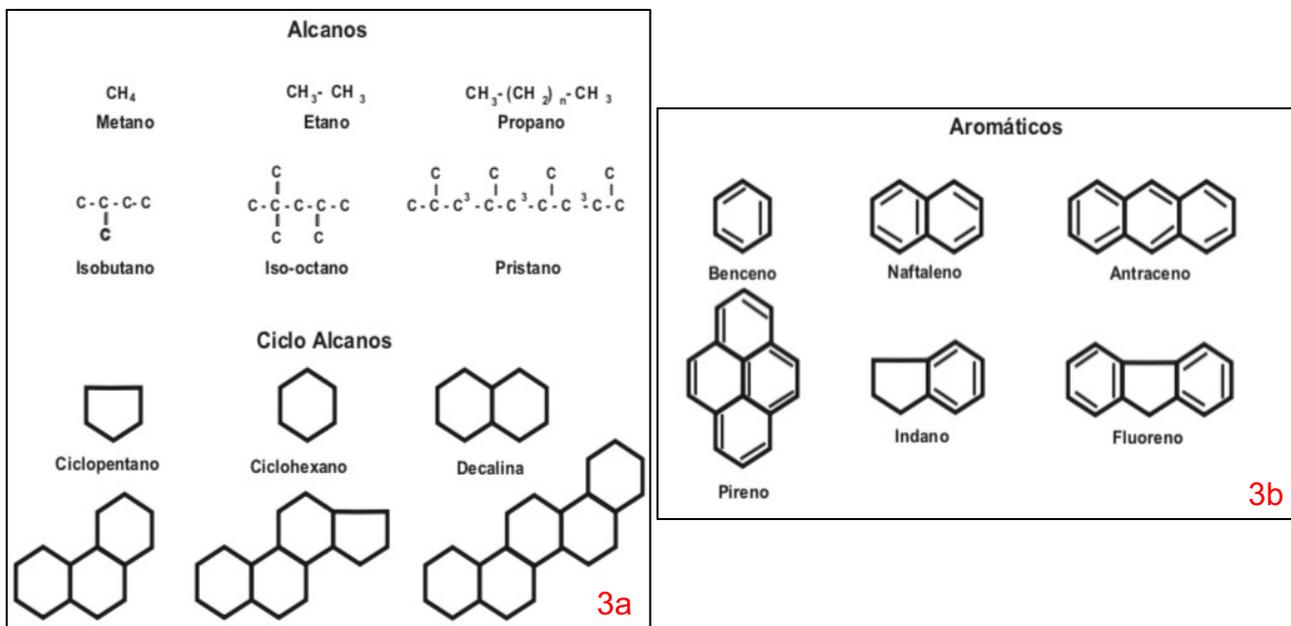


Figura 3. Estructuras de las fracciones de hidrocarburos más abundantes en el petróleo. En la parte superior de la figura (3a) se muestran los alcanos no cíclicos y en la parte inferior los cicloalcanos; mientras que en la figura (3b) se esquematizan los hidrocarburos aromáticos monocíclicos y policíclicos (Espina *et al.*, 2005).

Hidrocarburos aromáticos

Los compuestos aromáticos están ampliamente distribuidos en la naturaleza y son producto de la pirólisis de los compuestos orgánicos (Gibson, 1984). En el petróleo, estos compuestos son usualmente más abundantes que los compuestos saturados, son poco polares o no polares, contienen un anillo bencénico íntimamente relacionado en su estructura molecular.

Además pueden contener sustituciones en algún carbono (Fuchs *et al.*, 2011). Son extremadamente tóxicos ya que se acumulan en tejidos y se retienen por mucho tiempo (Espina *et al.*, 2005).

Entre los aromáticos monocíclicos más importantes se encuentran los compuestos BTX (Benceno, Tolueno y Xileno) los cuales son los mayores componentes de la gasolina (Cunha, *et al.*, 2002) y están catalogados como compuestos de alta importancia por la EPA debido a su alta toxicidad (Eriksson, *et al.*, 1998).

Bacterias degradadoras de hidrocarburos aromáticos

La biodegradación es una herramienta prometedora en sitios contaminados con hidrocarburos, siendo una estrategia rentable y puede conducir a una mineralización completa de los compuestos contaminantes (Kothari *et al.*, 2014).

Se han aislado algunos géneros de bacterias capaces de degradar compuestos aromáticos abriendo la posibilidad de estudiarlas bioquímicamente y molecularmente (Gibson *et al.*, 1984), encontrándose géneros como *Arthrobacter* (Conn & Dimmick., 1947), *Bacillus* (Cohn., 1872), *Mycobacterium* (Lehmann & Neumann., 1896), *Pseudomonas* (Migula., 1894), *Rhodococcus* (Zopf., 1891), *Sphingomonas* (Yabuuchi *et al.* 1990; Dean-Ross *et al.*, 2002; Kazunga *et al.*, 2000).

La susceptibilidad de los hidrocarburos a la biodegradación está en función de su configuración molecular, los hidrocarburos alifáticos sufren una degradación más rápida ya que son más hidrosolubles y la microbiota los utiliza como fuente de carbono, mientras que las estructuras aromáticas y cíclicas son más resistentes a los mecanismos de degradación por la energía que se necesita para romper los enlaces (Ponce-Vélez *et al.*, 2005).

La primera fase de la degradación de compuestos aromáticos ocurre en las vías periféricas, conocida también como vía de degradación superior en donde se da la activación del anillo bencénico por monooxigenasas, generando intermediarios centrales, los cuales son degradados en la vía de degradación inferior dando lugar a la posterior apertura del anillo generando moléculas que se pueden utilizar para generar biomasa (Zeyaullah *et al.*, 2009).

El catecol es uno de los intermediarios en las vías de degradación de diversos compuestos aromáticos como el benceno, tolueno, fenol, naftaleno, antranilato y salicilato (Figura 4a), (Van Der Meer, 1992). Los catecoles son los contaminantes orgánicos más abundantes del medio ambiente, siendo de gran preocupación por su persistencia y toxicidad, surgiendo la necesidad de desarrollar ciertas medidas para su eliminación (Leatham *et al.*, 1983; Zeyaullah *et al.*, 2009).

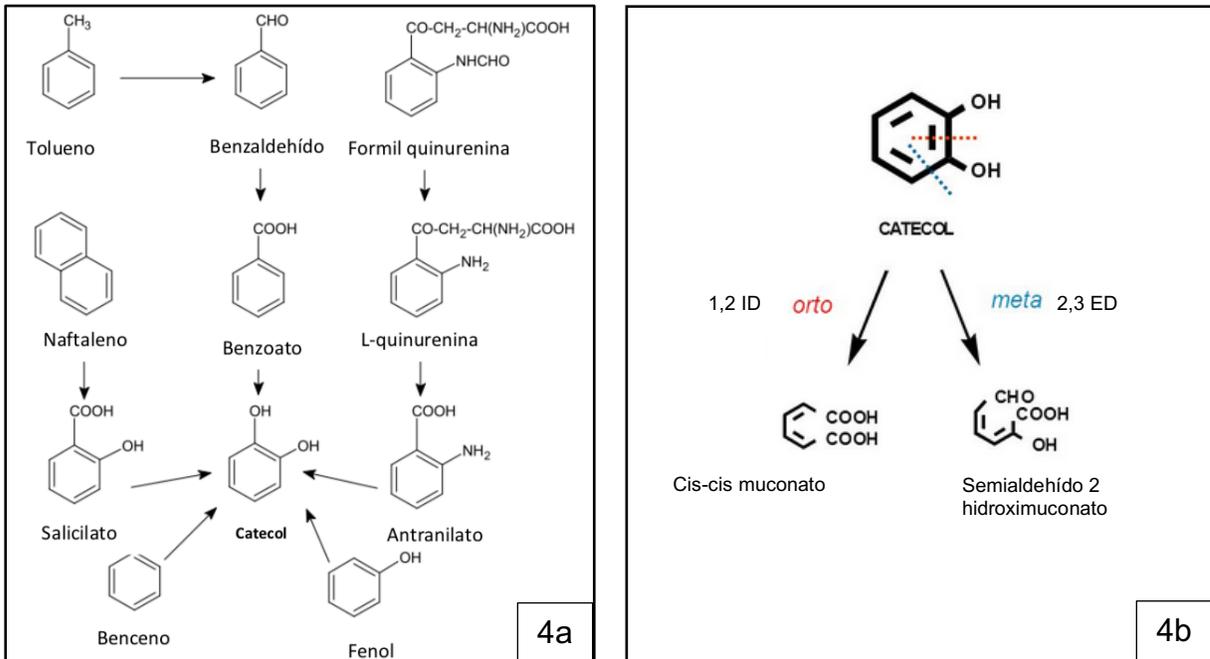


Figura 4. Convergencia de las rutas de degradación de compuestos mono y poli aromáticos. El catecol se encuentra en un punto central de diversos compuestos aromáticos como benzoato, naftaleno, tolueno y fenol (4a). La ruptura del anillo de catecol es realizada por enzimas específicas que catalizan su escisión mediante la introducción de oxígeno (4b) (Modificado de Zeyaullah *et al.*, 2009).

Las dos reacciones críticas: dihidroxilación de anillo y escisión de anillo son las funciones más importantes de las dioxigenasas. La primera dioxigenasa descrita fue la catecol 1,2-dioxigenasa, que escinde el anillo aromático del catecol (Feist *et al.*, 1969).

Los sustratos de las dioxigenasas involucradas en la escisión del anillo, generalmente contienen dos grupos hidroxilo en dos carbonos adyacentes; las dioxigenasas se pueden clasificar en dos grupos según el modo de escisión del anillo aromático.

Las enzimas de corte en sitio *orto* conocidas como intradiol dioxigenasas (1,2ID) dividen el anillo aromático del catecol entre dos grupos hidroxilo produciendo *cis cis* muconato que se puede determinar espectrofotométricamente a 260 nm, son típicamente dependientes de FeIII y la proteína presenta coloración café.

Mientras que el corte en sitio meta lo realizan las enzimas extradiol dioxigenasas (2,3 ED) también conocidas como catecol 2,3 extradiol dioxigenasa, 2,3-pirocatecasa, catecol 2,3-oxigenasa, catecol oxigenasa, metapirocatecasa y pirocatecol 2,3-dioxigenasa (EC 1.13.11.2). Estas enzimas provocan la ruptura del anillo aromático entre un carbono hidroxilado y otro carbono adyacente no hidroxilado (Figura 4b) mediante la inserción de dos átomos de dióxigeno, formando un un producto de color amarillo intenso a partir de un sustrato incoloro, el semialdehído 2 hidroximuconato (S-2HMC) producto de la reacción. Además se puede monitorear espectrofotométricamente a 375 nm y son metaloenzimas dependientes de FeII, la proteína no presenta coloración (Harayama *et al.*, 1989).

Los organismos que contienen las vías degradativas de benzoato o hidroxibenzoato pueden utilizar las moléculas de catecol como su única fuente de carbono y energía (Broderick, 1999).

De manera general, esta actividad enzimática es más común que la escisión de intradiol en las vías de degradación de hidrocarburos aromáticos, sin embargo su mecanismo de reacción y algunos aspectos estructurales han sido pobremente estudiado debido a la relativa inaccesibilidad del Fe II. (Broderick, 1999).

La estructura de la enzima 2,3 ED de *Pseudomonas putida* (Migula., 1895) fue cristalizada por primera vez por Kita y colaboradores en 1999. La enzima fue designada como 1MPY, presenta una conformación en homotetrámero de subunidades idénticas (Figura 5), similar a las enzimas 2,3-dihidroxibifenil y 1,2-dioxigenasa involucradas en la ruptura de compuestos aromáticos, aunque existe una baja identidad de secuencia de aminoácidos entre estas enzimas.

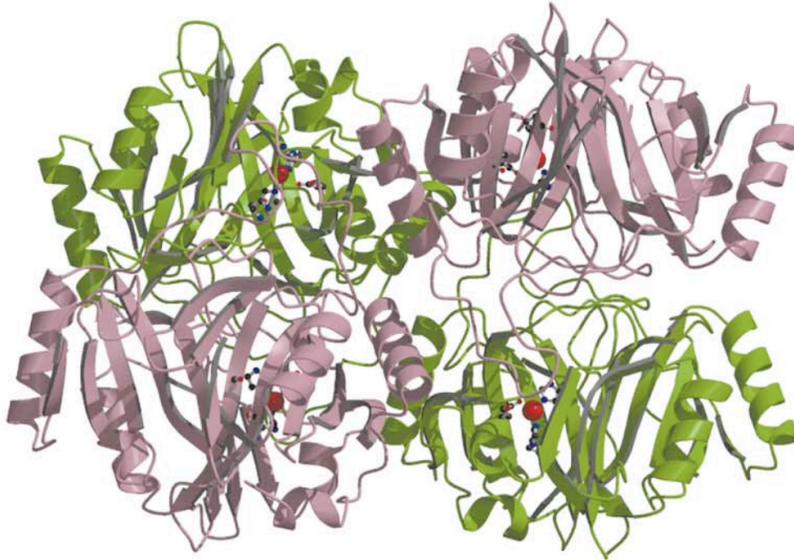


Figura 5. Esquematación del acomodo espacial de la molécula de 2,3 ED. Los monómeros de proteínas se dibujan en rosa o verde. Los átomos de Fe se muestran como esferas rojas y los tres residuos ligados al átomo de Fe (II) se muestran como modelos de bola y palo. Modificado de Kita *et al.*, 1999.

La mayoría de estas enzimas contienen un ion ferroso en el sitio activo, que se une a la cadena polipeptídica a través de una tríada conservada de dos histidinas y un ácido glutámico. El monómero comprende el dominio N-terminal (1-149) el cual contiene ocho cadenas β y dos hélices α mientras que el dominio C-terminal (150-307) está compuesto por nueve hebras β y cuatro hélices α con un total de 17 hebras β y 6 hélices α características en estas enzimas. En la figura 6 se muestran estas regiones con verde y amarillo respectivamente, empleando la información combinada de las estructuras 2,3-dihydroxibifenil y 1,2-dioxigenasa se ha identificado una región central conservada del sitio activo que comprende tres ligandos de Fe (II) (His153, His214 y Glu265), una tirosina (Tyr255) y dos residuos de histidina (His199 e His246). Los sitios conservados relacionados con la unión al cofactor (FeII) y al sustrato (catecol) (Tabla 2) se muestran marcados con rojo sobre la secuencia de aminoácidos, representada en la figura 6. Así mismo se ha descrito la composición de los aminoácidos presentes en las paredes internas del sitio activo conformado por los residuos de aminoácidos His153, Leu155, Ala189, Phe191, His199, His214, His246, Leu248, Thr249, Tyr255, Glu265 e Ile291 (Kita *et al.*, 1999; Viggiani *et al.*, 2004; Jouanneau., 2009).

Tabla 2. Localización de los aminoácidos importantes en la interacción de la proteína con el cofactor (Fell) y sustrato (catecol) (Kita *et al* 1999; Viggiani *et al.*, 2004).

Unión	Sitio
Fell	His-153, His 214, Gly 265
Catecol	Tyr-255, His199, His 246

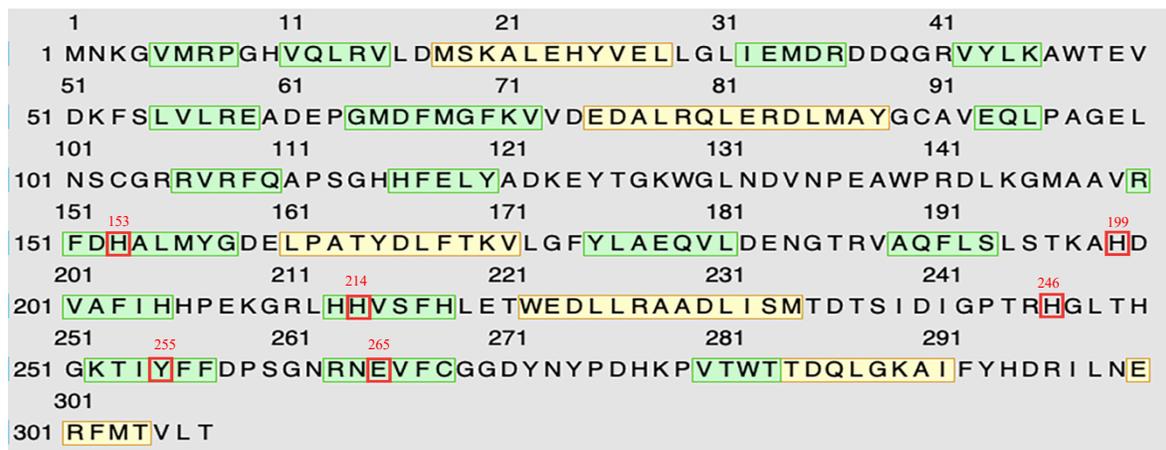


Figura 6. Secuencia de aminoácidos codificante para la enzima 2,3 ED, en verde se resaltan las 17 hebras β y en amarillo las 6 hélices α características de estas enzimas. Los recuadros rojos indican sitios conservados relacionados con la interacción con el cofactor (Fe II) y el sustrato (Catecol).

Adicionalmente, se ha reportado que el ion ferroso del sitio activo de esta enzima se oxida fácilmente a la forma férrica por varios agentes oxidantes, lo que lleva consigo la inactivación de la enzima. Se ha logrado estabilizar la estructura de la enzima mediante la adición de acetona, sin embargo la acetona es un inhibidor competitivo del catecol. Las extradiol dioxigenasas emplean un mecanismo común para reconocer el resto del anillo catecol de varios sustratos e incorporar el oxígeno (Kita *et al.*, 1999; Kobayashi *et al.*, 1995).

El mecanismo de reacción de las extradiol dioxigenasas como se mencionó anteriormente, no está completamente descrito, es un proceso catalítico que se produce a través de dos pasos: la unión de los sustratos de catecol e incorporación de los átomos de oxígeno al sustrato.

Se sugiere que dos moléculas de agua se unen al Fe del sitio activo: una molécula de agua ocupa la posición trans en la His214, y otra molécula de agua ocupa la posición trans en la Glu265. En el sitio activo de la 2,3 ED, solo el

Glu265, la Tyr255 y las moléculas de agua pueden tomar una forma aniónica (figura 7).

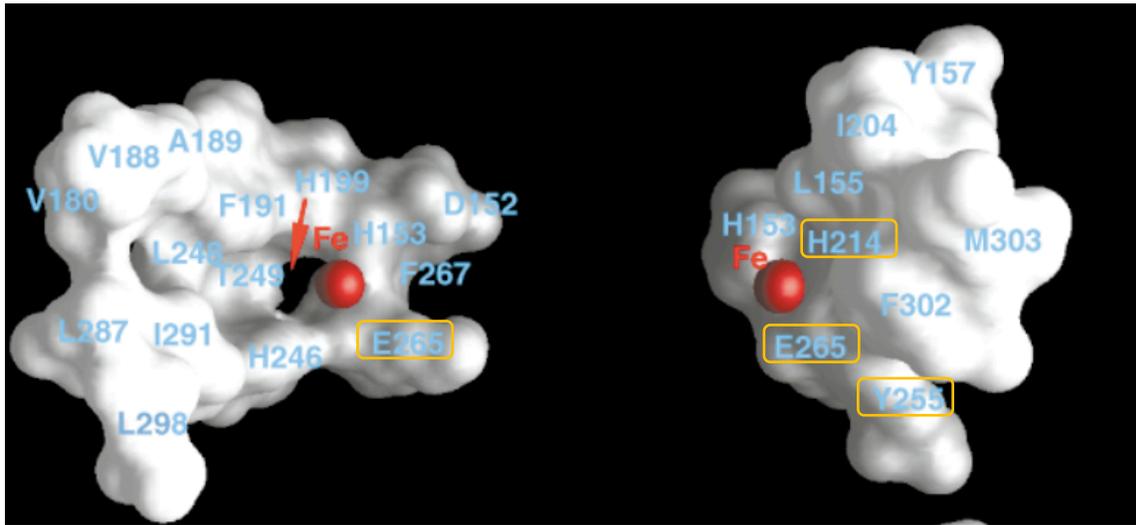


Figura 7. Representación de la superficie molecular de la pared interna del sitio activo de la enzima 2,3 ED. Se muestran dos vistas desde la entrada al sitio catalítico del sustrato. La esfera roja representa el átomo de FeII y la flecha roja indica el sitio de entrada para el sustrato.

El átomo de hierro en el sitio activo está coordinado por el llamado motivo de la tríada facial 2-His-1-carboxilato (dos histidinas y un glutamato o aspartato), que ocupa solo una cara del esfera de coordinación. La cara opuesta está ocupada por una molécula de agua desplazable y los hidroxil oxígenos del sustrato catecol. La unión del sustrato desencadena la liberación del agua, abriendo así un sitio de coordinación para el oxígeno molecular, que luego aparentemente es activado por un electrón transferido desde el sustrato a través del hierro en la figura 8 se representa el mecanismo de reacción propuesto para la reacción (Kita *et al* 1999; Cho *et al.*, 2010).

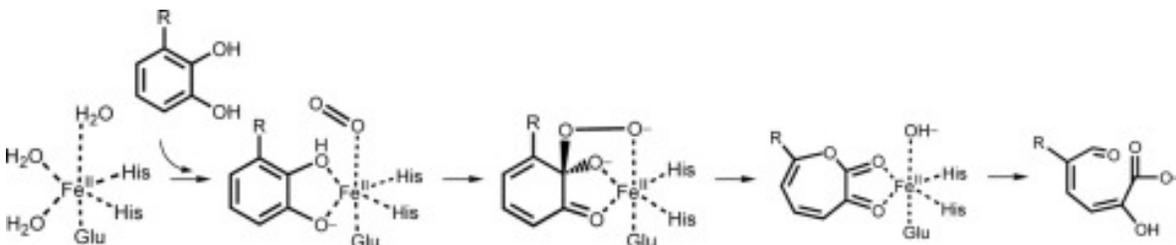


Figura 8. Mecanismo de acción propuesto de la enzima 2,3 ED. En donde se une el hierro que se encontraba previamente unido a la enzima 2,3 ED al sustrato en los grupos hidroxilo presentes en los carbonos 2 y 3, provocando la liberación de una molécula de agua, posteriormente se transfiere

un oxígeno molecular del hierro al sustrato y finalmente se libera la molécula de hierro y el producto. Modificado de Cho *et al.*, 2010.

Antecedentes

La actividad 2,3 ED ha sido descrita en diversas especies bacterianas y en metagenotecas generadas con muestras obtenidas, regularmente provenientes de sitios contaminados directamente con petróleo o sus derivados. Usualmente estas enzimas se identifican en aislados provenientes de muestras de suelo, la actividad enzimática 2,3 ED está fuertemente representada en el género *Pseudomonas* (Broderick, 1999), (Tabla 3).

El importante papel en la degradación de compuestos contaminantes de la enzima le ha conferido una gran importancia biotecnológica, siendo propuestas como herramientas de biorremediación en sitios contaminados con hidrocarburos participando en el tratamiento de aguas residuales y en la descontaminación de suelos (Hupert-Kocurek *et al.*, 2013; Guzik *et al.* 2009).

Tabla 3. Actividad 2,3 ED reportada por diversos autores en distintos géneros bacterianos y en metagenotecas generadas a partir de muestras ambientales en presencia de hidrocarburos.

Organismo	Ambiente	Referencia
<i>Pseudomonas</i> sp.	Mezcla de suelo y aguas residuales	Reineke <i>et al.</i> , 1984
	Agua contaminada con xileno y naftaleno	Mesarch <i>et al.</i> , 2000
<i>Pseudomonas putida</i>	Suelo contaminado con tolueno	Hallier-Soulier <i>et al.</i> , 1996
	Lodos activados	Suenaga <i>et al.</i> , 2014
<i>Alcaligenes eutrophus</i> (Cupriavidus necator Makkar & Casida., 1987), <i>Acinetobacter</i> spp (Brisou & Prévot., 1954), <i>Burkholderia</i> spp (Yabuuchi <i>et al.</i> , 1993), <i>Comamonas</i> spp (De Vos <i>et al.</i> , 1985), <i>Pseudomonas</i> spp, <i>Ralstonia</i> spp (Yabuuchi <i>et al.</i> , 1996), <i>Sphingomonas</i> spp (Yabuuchi <i>et al.</i> , 1990)	Lago, Tokio	Kasuga <i>et al.</i> , 2007

<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> (<i>Pseudomonas oleovorans</i> (Lee & Chandler., 1941)	Mar Báltico	Jõesaar <i>et al.</i> , 2017
Metagenotecas	Suelo contaminado con HAP	Festa, 2016

En la biorremediación de aguas residuales, se ha observado que algunas enzimas tienden a mostrar una baja estabilidad en determinadas condiciones ambientales como pH y temperaturas. La caracterización de la actividad catalítica de la 2,3 ED ha sido ampliamente estudiada sobre la molécula de catecol, enfocándose principalmente en estos aspectos.

El pH y temperatura pueden afectar la estabilidad de la enzima al alterar la conformación de la misma, el sustrato y el entorno donde ocurre la reacción (Sinha *et al.*, 2014). El estudio de la actividad enzimática 2,3 ED en las diferentes condiciones de alcalinidad y acidez se ha efectuado con diferentes aislados de los géneros *Planococcus*, *Alcaligenes*, *Azotobacter* y *Pseudomonas* entre otros. La determinación de la actividad se ha realizado en un amplio rango de pH (2.2 y 10.7), con una media de pH óptimo de 7.5 (Zhu *et al.*, 2008; Sala-Trepát *et al.*, 1971; Hupert-Kocurek *et al.*, 2013; Wei *et al.*, 2010), mientras que el análisis de la actividad sobre diferentes temperaturas se ha desarrollado entre 10 y 90 °C, siendo más común el análisis de la actividad a 25 °C, temperatura estándar en la que se realizan los ensayos.

Algunos autores sugieren que la temperatura óptima de reacción de algunas enzimas podría estar relacionada con la temperatura del ambiente en el que se aislaron los organismos (Atlas *et al.*, 1998; Olukunle *et al.*, 2015). Es importante mencionar que la mayoría de las enzimas 2,3 ED caracterizadas provienen de muestras obtenidas de suelo que difiere considerablemente a las temperaturas presentes en el ambiente marino.

Como se mencionó anteriormente la mayoría de los estudios realizados con estas enzimas se centran en la ruptura de la molécula de catecol. Sin embargo, también se analiza la escisión del anillo aromático de moléculas análogas en estructura al catecol como el 3-metil catecol intermediario central de la vía de degradación de benzoato (3MC), el 4 metil-catecol, producto de degradación central del tolueno y xileno (4MC) y el 4 clorocatecol intermediario en la degradación de clorohexano y clorobenceno (4CC) mostrados en la figura 9. Como se mencionó anteriormente se ha propuesto que el mecanismo utilizado

es muy similar y la mayoría de las enzimas 2,3 ED reportadas presentan preferencia por el catecol (Guo *et al.*, 2015, Hupert-Kocurek *et al.*, 2012, Takeo *et al.*, 2007, Kobayashi *et al.*, 1995)

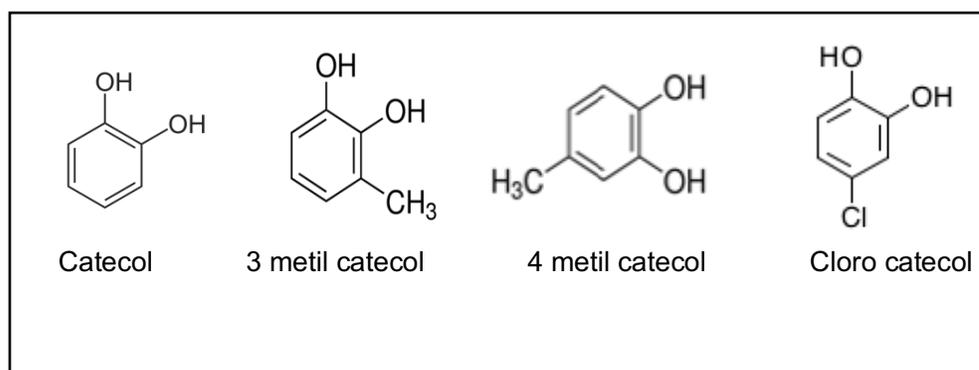


Figura 9. Catecol y moléculas análogas en estructura analizadas para la actividad 2,3 ED.

Este trabajo se realizó bajo el marco de actividades de la línea 4 del Consorcio de Investigación del Golfo de México (CIGoM) el cual fue creado en el 2014 con el objetivo de generar herramientas de conservación, desarrollo biotecnológico y modelos numéricos que pudieran ayudar a establecer planes de contingencia y actividades de mitigación en caso de ocurrir derrames de hidrocarburos a gran escala además de poder generar información para evaluar su impacto ambiental, el objetivo de la línea es identificar bacterias con el potencial de degradar hidrocarburos, para lograrlo las muestras que se obtienen son analizadas en busca de actividades enzimáticas involucradas en la degradación de compuestos derivados del petróleo.

El CIGoM realiza campañas oceanográficas en las que se toman muestras de diferentes localizaciones geográficas (Figura 10) a diferentes profundidades de la columna de agua, además se colecta sedimento. En la figura 11 se muestra un ejemplo de las profundidades muestreadas.

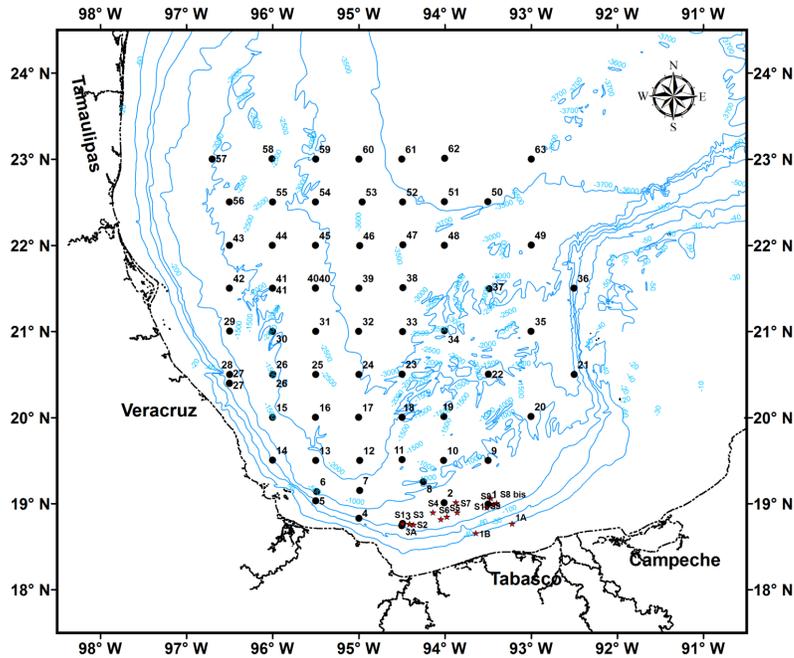


Figura 10. Esquematización de los puntos de muestreo realizados por el CIGoM en una campaña realizada en el 2016, donde se realiza una extensa cobertura del territorio marino del Golfo de México (Modificada de Dr. Adolfo Gracia).

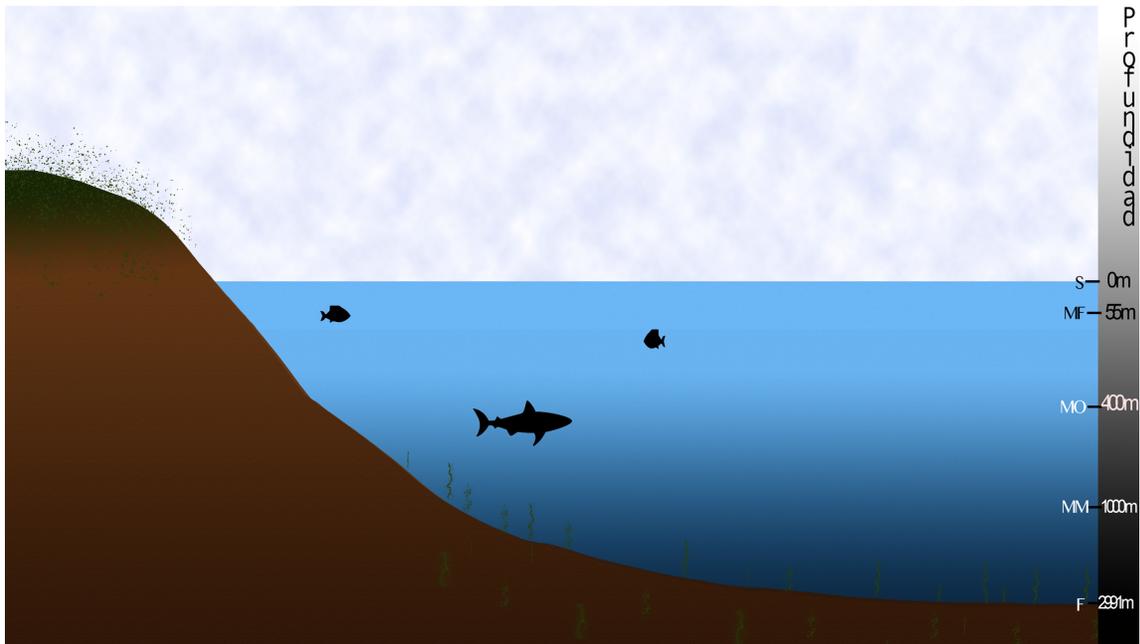


Figura 11. Esquematización de las profundidades de muestreo realizadas por el CIGoM en una de las estaciones localizada en el sur del Golfo de México (Estación D18-MMF). Las profundidades varían en cada estación de muestreo.

En muestreos previos de agua y sedimento realizados por el CIGoM se obtuvieron aislados y consorcios bacterianos también se generaron dos metagenotecas que fueron analizadas en busca de la actividad enzimática 2,3 ED monitoreando la ruptura del anillo de catecol. Donde se identificaron 9 consorcios positivos a la actividad, en la tabla 4 se muestra un breve resumen de las muestras analizadas y la identificación de los consorcios positivos (Millán-López, 2018).

Tabla 4. Resultados de la evaluación de la actividad 2,3 ED en metagenotecas, aislados y consorcios bacterianos hidrocarbonoclastas del Golfo de México. En paréntesis en rojo se marcan las muestras positivas a la actividad 2,3 ED.

Muestras evaluadas: 5,154				
Campaña	Profundidad	Metagenotecas	Consortios	Aislados
MMF	Máxima Fluorescencia	3766 clonas (0)	47 (9)	7 (0)
	Mil metros	1289 clonas (0)		
SOGOM II	Sedimento	-	20 (0)	25 (0)

Con la finalidad de poder comparar los 9 consorcios positivos a la actividad, se realizó una cinética de producción de S-2HMC, encontrando la mayor actividad en el consorcio D18 (Figura 12).

Producción de S-2HMC

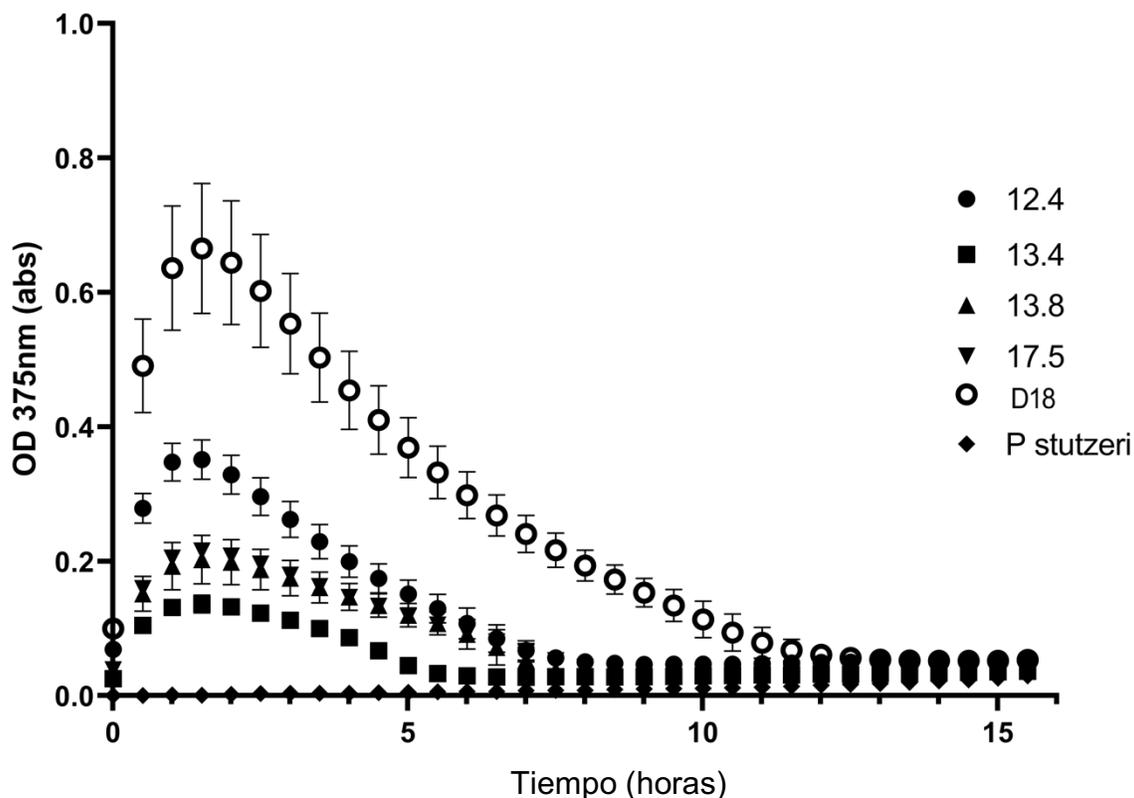


Figura 12. Ensayo espectrofotométrico de producción de S-2HMC. Se reportan valores de absorbancia a 375 nm después de adicionar el sustrato tomando lecturas cada 30 minutos durante 16 horas, las muestras 12.4, 13.4, 13.8, 17.5 y AD18 corresponden a consorcios con actividad 2,3 ED aislados del GoM, *P. stutzeri* sin la enzima 2,3 ED es el control negativo.

Se seleccionó el consorcio D18 para realizar la dispersión y obtener un aislado con la actividad 2,3 ED en el presente proyecto.

Justificación

A través de los años se ha vertido petróleo al ambiente marino derivado a la actividad antropogénica, pero también de manera natural con las emanaciones provenientes del fondo marino, provocando una presión selectiva en los microorganismos presentes en estos sitios, haciendo posible identificar bacterias con mecanismos especializados para poder aprovechar las diferentes fracciones de petróleo para obtener energía para subsistir.

Entre las fracciones más abundantes en el petróleo se encuentran los hidrocarburos aromáticos, el proceso de atenuación de estos compuestos de manera natural es muy lenta, uno de los métodos de remoción de estos compuestos del ambiente es la biodegradación. La utilización de organismos vivos como las bacterias pueden conducir a una mineralización completa de estos compuestos de una manera más rápida, esto se logra mediante la utilización de enzimas específicas. La temperatura óptima de reacción de algunas enzimas está relacionada con la temperatura del ambiente en el que se aislaron los organismos.

Una de las moléculas clave generadas durante el proceso de degradación de hidrocarburos aromáticos es el catecol, pues en él converge la degradación de diversos compuestos aromáticos encontrándose entre los compuestos contaminantes más abundantes del medio ambiente, su ruptura es catalizada por la enzima 2,3 extradiol dioxigenasa (2,3 ED) incorporando dos átomos de oxígeno en el anillo bencénico, provocando la escisión del anillo haciéndolo perder estabilidad y aumentando la susceptibilidad a la degradación, esta reacción es fácil de monitorear al generar un producto con color a partir de un sustrato incoloro.

En este proyecto se pretende identificar una enzima 2,3 ED bacteriana proveniente del Golfo de México y evaluar su actividad catalítica en diferentes condiciones de reacción similares a las presentes en el ambiente marino.

Hipótesis

La enzima 2,3 extradiol dioxigenasa obtenida de una bacteria aislada de un ambiente marino expuesto a estrés abiótico propio del ecosistema y a la presencia constante a hidrocarburos, presentará características catalíticas

óptimas similares a las condiciones presentes en el ambiente de donde se obtuvo, en los parámetros de pH, salinidad y temperatura.

Objetivo general

Aislar y caracterizar molecularmente la cepa bacteriana con actividad 2,3 extradiol dioxigenasa, expresar heterológamente la enzima responsable de dicha actividad.

Objetivos específicos

1. Aislar una cepa con actividad 2,3 extradiol dioxigenasa a partir del consorcio positivo a la actividad.
2. Identificar molecularmente la cepa positiva a la actividad, secuenciar y analizar bioinformáticamente el genoma de la cepa positiva a la actividad 2,3 extradiol dioxigenasa.
3. Expresar heterológamente el gen *XylE/catE* y purificar la enzima 2,3 extradiol dioxigenasa.
4. Caracterizar bioquímicamente la enzima 2,3 extradiol dioxigenasa en diferentes condiciones de pH, salinidad y temperaturas.

Metodología

A continuación se muestra de manera general el diagrama de flujo del desarrollo experimental utilizado en este trabajo (Figura 13).

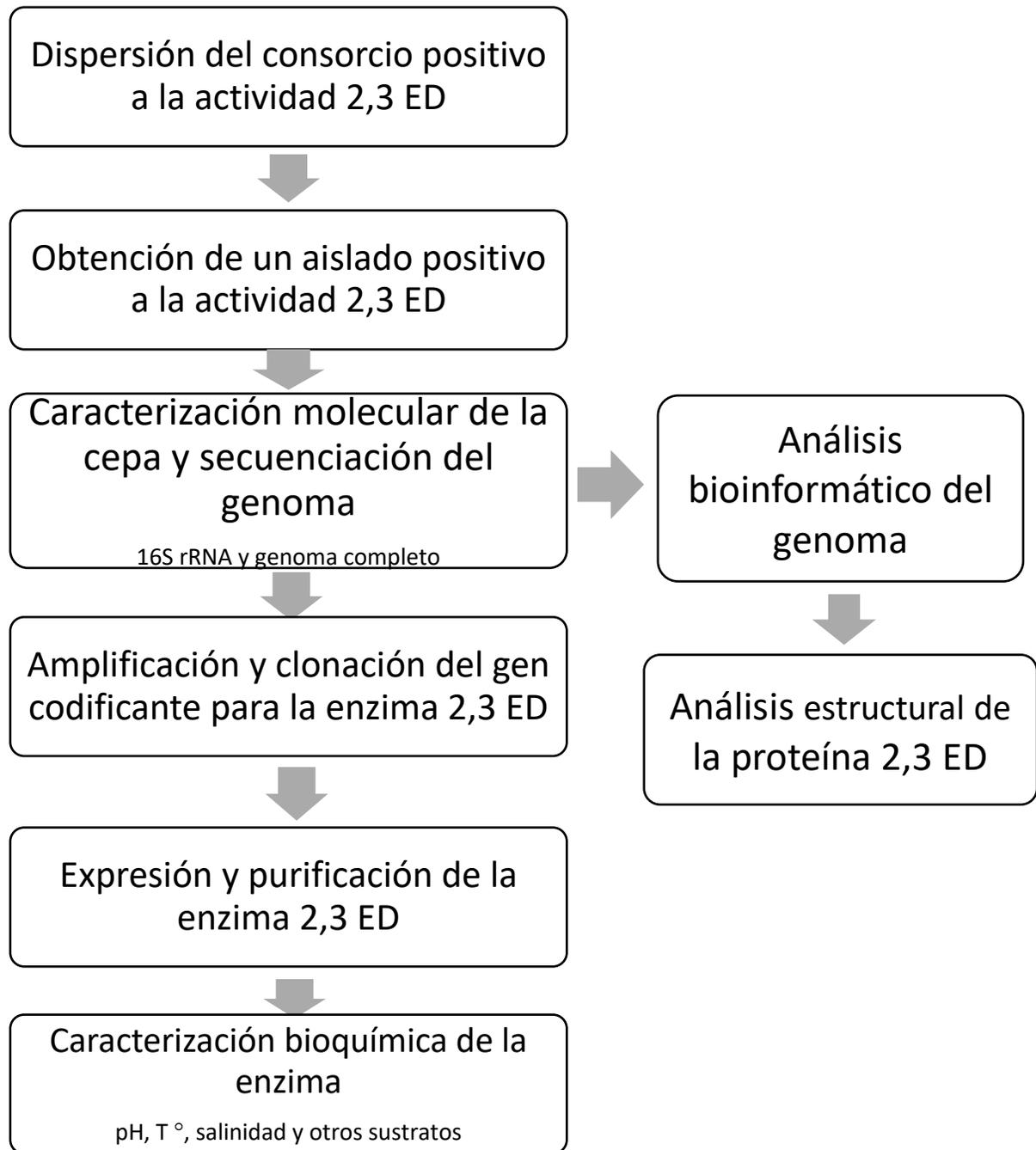


Figura 13. Esquematación de la metodología general propuesta para el desarrollo del proyecto.

Identificación del aislado con actividad 2,3 extradiol dioxigenasa a partir del consorcio positivo a la actividad.

Con el objetivo de identificar un aislado con actividad 2,3 ED, el consorcio se dispersó mediante diluciones seriadas, se inoculó la dilución 1×10^{-6} en medio LB sólido suplementado con fenol 5mM, las placas se incubaron durante 24 horas a 30 °C.

Se seleccionaron colonias al azar que fueron goteadas con una solución de catecol 50mM, se corroboró que estuvieran axénicas mediante microscopía utilizando un microscopio digital EVOS™ FL.

Las colonias que presentaron coloración amarilla después de 5 minutos de incubación a temperatura ambiente posterior a la adición del catecol, se consideraron cepas positivas a la actividad (Figura 14). Posteriormente se empleó el método espectrofotométrico que consiste en el monitoreo de la generación del producto (S-2HMC); para lo cual se adiciona la mezcla de 10 μ g de extracto crudo proteico obtenido por sonicación de la pastilla celular de 3 ml de cultivo de cada una de las muestras y 180 μ L de tampón de fosfatos 50mM y el sustrato a una placa de Elisa de 96 pozos para luz visible Corning™, midiendo el incremento en absorbancia a 375 nm con un lector de placas marca Epoch 2 (BioTek Instruments) (Figura 15).

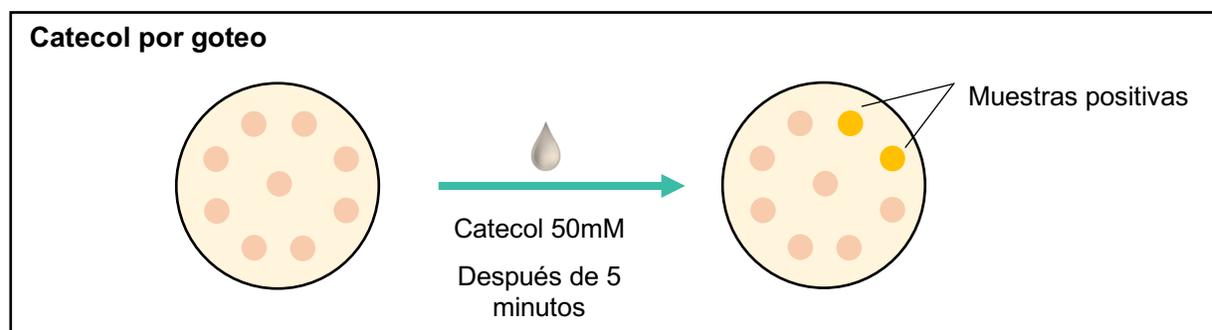


Figura 14. Catecol por goteo. Método para la detección de la actividad 2,3 ED en placas de medio sólido después de 5 minutos de goteo del sustrato (catecol), se esquematiza el cambio de coloración amarillo en las muestras positivas.

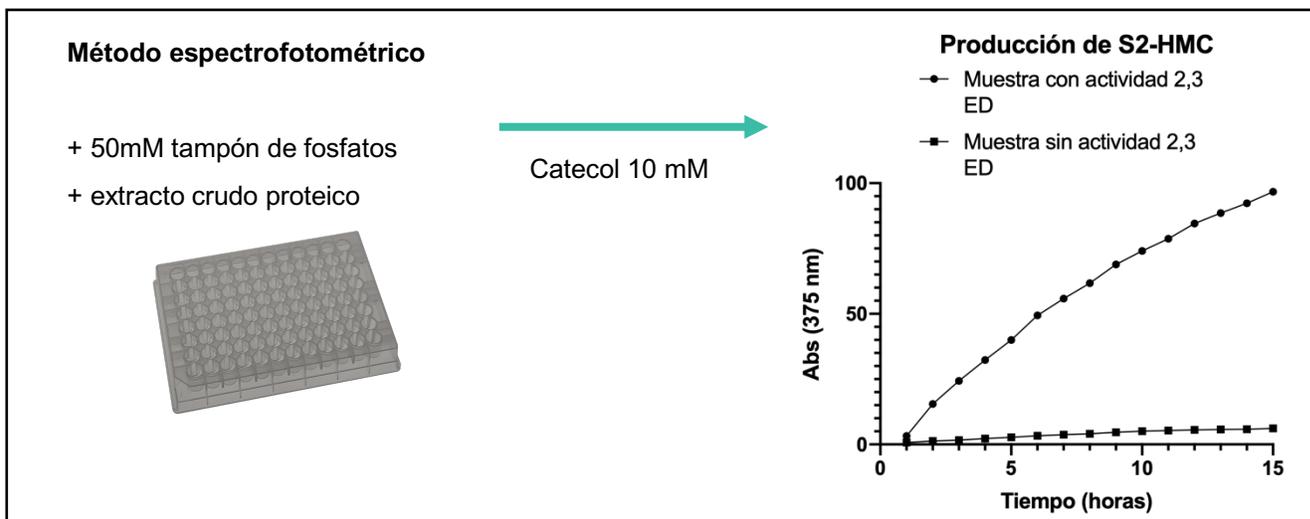


Figura 15. Esquematación del método espectrofotométrico para la detección de la producción de S-2HMC, indicativo de la actividad 2,3 ED en proteína de las muestras a analizar, se esquematiza el incremento en absorbancia a 375 nm a través del tiempo.

Identificación molecular del aislado con actividad 2,3 extradiol dioxigenasa.

Se identificaron dos cepas con actividad 2,3 ED las cuales fueron identificadas molecularmente amplificando el gen 16S rARN por PCR, utilizando los oligonucleótidos universales 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT) reportados por Lane *et al.*, 1991 y Turner *et al.*, 1999. Los fragmentos generados se secuenciaron en la unidad de secuenciación masiva del IBt-UNAM <<http://www.uusmd.unam.mx>>. Las secuencias se analizaron empleando BLASTn y la base de datos NCBI manteniendo los parámetros predeterminados y se seleccionaron las secuencias con mayor identidad. Se realizaron alineamientos múltiples de secuencias de nucleótidos utilizando el programa MUSCLE ofrecido por MEGA 7, utilizando el método 'neighbor-joining tree', el cual permitió inferir filogenias moleculares que fueron utilizadas para generar un árbol filogenético para identificar las cepas.

El ADN genómico del aislado se obtuvo con el kit Quick-DNA Microprep de Zymo Research que fue utilizado para la secuenciación completa del genoma mediante la tecnología Illumina. En la tabla 5, se muestran los pasos y los programas con los que se realizó el ensamble y la anotación del genoma.

Tabla 5. Programas utilizados para realizar el ensamble del genoma.

Programa	Función
AbySS (Simpson <i>et al.</i> , 2009) VELVET (Zerbino <i>et al.</i> , 2008)	Ensamble
REAPR (Hunt <i>et al.</i> , 2013) GapFiller (Nadalín <i>et al.</i> , 2012) SSpace (Boetzer <i>et al.</i> , 2011) iCORN (Otto <i>et al.</i> , 2010)	Corrección de errores de ensamble y relleno de gaps
GeneMarkS (Besemer <i>et al.</i> , 2014)	Predicción de genes
Kraken (Wood <i>et al.</i> , 2014) MetaPhlan (Truong <i>et al.</i> , 2015) Phyla_AMPHORA (Wan.g & Wu., 2013)	Anotación taxonómica

Expresión heteróloga del gen putativo *Xyle/CatE*.

Con el genoma ensamblado e identificando la secuencia del gen de interés (ver análisis bioinformático) se diseñaron oligonucleótidos específicos para la amplificación por PCR del fragmento de ADN codificante para el gen putativo *Xyle/CatE* empleando la enzima Phusion High-Fidelity DNA Polymerase de Thermo Scientific.

Se utilizó un gel de agarosa al 1% para identificar por tamaño (923 pb) del gen putativo *Xyle/catE* y el vector pET-22b(+) que cuenta con un casete de resistencia a ampicilina y una etiqueta His • carboxilo-terminal. En la figura 16 se señalan en amarillo los sitios de restricción empleados para linearizar y clonar en el plasmido los cuales fueron incluidos en los oligonucleótidos. Posteriormente se purificaron las dos bandas del gel de agarosa al 1%, utilizando el kit GeneJET Gel Extraction de Thermo Scientific.

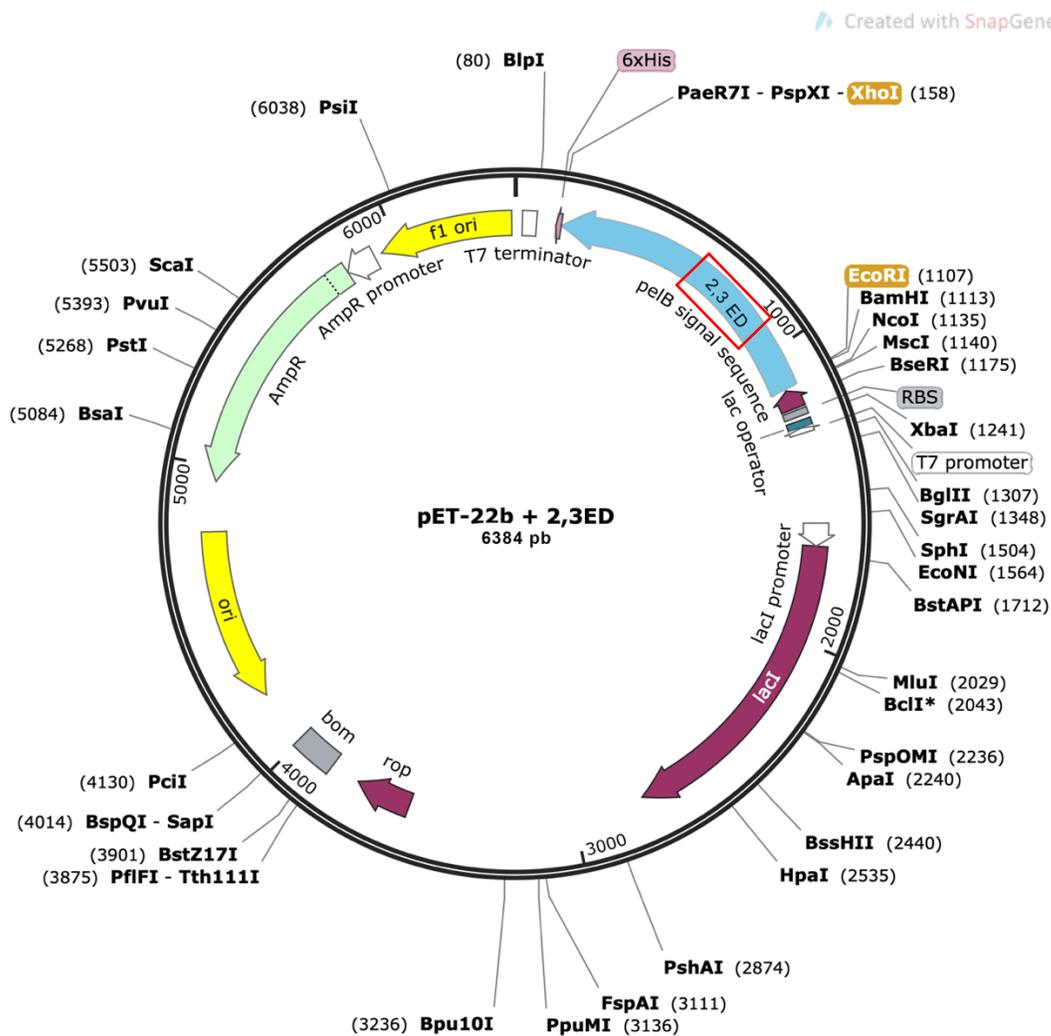


Figura 16. Vector de clonación pET-22b con el fragmento codificante para la enzima 2,3 ED. Se resaltan en amarillo los sitios de restricción empleados para la clonación. El recuadro rojo y la flecha azul representa el fragmento codificante para la enzima 2,3 ED. Imagen generada en SnapGene.

Con los productos de la purificación se realizaron digestiones enzimáticas dobles con *EcoRI* y *XhoI* (Thermo Fisher) a 37 °C que es la temperatura óptima de ambas enzimas empleando el tampón Tango 2X, para posteriormente hacer la ligación del fragmento amplificado con el vector pET-22b(+).

Se transformó por electroporación en el equipo MicroPulser Electroporator (BioRad) en la cepa BL21 E3 de *Escherichia coli*, se seleccionaron transformantes positivas a las cuales se le extrajo plásmido y mediante enzimas de restricción se liberó el fragmento de interés y se secuenció. Posteriormente, se realizaron ensayos de expresión heteróloga.

Purificación de la enzima 2,3 extradiol dioxigenasa

Se llevó a cabo la estandarización de las condiciones de inducción en medio LB (500 ml) con diferentes concentraciones de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) (0.1 mM a 1 mM), temperaturas (10 a 37 °C), para mejorar la solubilidad de la proteína se realizó también la inducción a 42 °C ya que se ha reportado la presencia de chaperonas de choque térmico que pueden ayudar al correcto plegamiento de la proteína (Chen *et al.*, 2002), en la inducción en esta condición se ajustó el medio de cultivo a 3mM de NaCl.

Las células se incubaron a 37 °C hasta alcanzar densidad óptica (DO) de 0.1 a 600 nm, posteriormente se realizó la incubación a hasta alcanzar DO de 0.6 y se adicionó el IPTG, para la incubación se probaron tiempos de 1 a 3 hrs.

Posteriormente se preservaron en hielo y se centrifugaron a 1.5 g en centrífuga refrigerada a 4 °C, las pastillas celulares se preservaron a -20 °C.

En el proceso de purificación por cromatografía de afinidad se empleó la resina Ni-NTA Agarose de QIAGEN. Empleando amortiguadores específicos para cada fase del proceso de purificación en la columna de afinidad a Níquel (Ver Anexo 4 Manual de reactivos utilizados).

Se realizó la lisis celular homogeneizando la pastilla con 15 ml tampón de Lisis que contiene 10mM de imidazol empleando 2-5ml por gramo de peso húmedo, a 4 °C, se adicionó cComplete™ 1X Protease Inhibitor Cocktail y

lisozima 1 mg/ml, se incubó durante 1 hora en hielo y se procedió a lisar las muestras mediante sonicación en 5 ciclos (10 ON/30 OFF) a una amplitud 70% manteniendo la muestra siempre en frío. Se centrifugó la muestra durante 30 minutos a 1.9 g a 4 °C, se recuperó el sobrenadante y se conservó a la misma temperatura.

Para visualizar el porcentaje de proteína presente en el sobrenadante se empleó la utilidad “Analyse Gels” del programa Image J versión 1.53 empleando imágenes obtenidas de los geles de acrilamida del proceso de purificación de la enzima.

Por último se purificó la proteína mediante cromatografía de afinidad empleando la columna de afinidad de níquel, para lo cual se dejó interaccionar los 15 ml del sobrenadante filtrado con (2 ml de resina que se encuentra al 50% en etanol al 20%) durante toda la noche en agitación a 180 rpm empleando el agitador Labnet Orbit 300 a 4 °C. Posteriormente se transfirió la mezcla proteína-resina a una columna plástica de una capacidad de 10 ml en donde se realizaron los lavados y la elución correspondientes con los diferentes amortiguadores en gradiente de 20 mM a 300 mM de imidazol, adicionando de 4 a 6 volúmenes de cada tampón con las diferentes concentraciones de imidazol. Se colectó cada una de las fracciones resultantes en microtubos de 1.5 ml de capacidad (aproximadamente 1 ml), el flujo de las eluciones fue a gravedad. La presencia de la proteína se visualizó en un gel SDS-PAGE al 12% y se definieron las condiciones óptimas para la purificación. Para realizar las pruebas enzimáticas sin interferencia del imidazol, éste se removió de la muestra purificada utilizando filtros Amicon Ultra-0.5 mL (3K), centrifugando a 14,000 x g por 30 minutos a 4 °C tres veces con tampón de fosfatos a pH 7.4.

Las cuantificación de las concentraciones de proteína se realizó utilizando el método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando el reactivo comercial Bio-Rad Protein Assay siguiendo las indicaciones del proveedor y albúmina de suero bovino (ASB) ≥96% de Sigma para realizar la curva patrón la metodología seguida se describe a detalle en el anexo de materiales y métodos.

Ensayo estándar para determinación de actividad enzimática 2,3 extradiol dioxigenasa en proteína purificada.

Para determinar la actividad 2,3 ED sobre catecol se midió la formación de S-2HMC a 375 nm ($\epsilon = 36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), utilizando un lector de placa Epoch 2 de BioTek, en microplacas de 96 pocillos Corning en una mezcla de reacción que contenía 50 μL de catecol (2 mM), 145 μL de tampón fosfato pH 7.4 (50 mM) y 5 μL de extracto crudo que contenían 25 μg de proteína, la reacción se realizó en un volumen total de 200 μL a 30 °C. Los ensayos se hicieron por triplicado y se realizaron reacciones control sin la adición de enzima, para cada ensayo, pre incubando la microplaca a 30 °C por 5 minutos y se realizaron lecturas por 5 minutos después de la adición del sustrato.

Una unidad de actividad se definió como la cantidad de enzima que genera 1 μmol de producto por minuto a 30 °C. La actividad específica se define como U por miligramo de proteína. En el Anexo 1 se muestran los pasos utilizados para hacer los cálculos de actividades.

Caracterización bioquímica de la enzima 2,3 extradiol dioxigenasa

pH óptimo

Con el fin de determinar el pH óptimo de la reacción se midió la actividad a 30 °C en un rango de 1-12 utilizando los tampones de la tabla 6:

Tabla 6. Tampones utilizados en los diferentes pH analizados.

Tampón (0.05M)	pH
Glicina-HCl	1-2
Fosfato-citrato	3-4-5
Fosfato de potasio	6-7-7.4-8
Glicina-NaOH	9-10-11-12

Temperatura óptima

La determinación de temperatura óptima del ensayo se determinó en el tampón y pH definido como óptimo, se emplearon dos metodologías las temperaturas entre 25-60 °C se realizaron en las condiciones definidas en microplaca, mientras que las temperaturas bajas 10-25 °C se determinaron en reacciones de 500 μL que contenían 50 μM de sustrato, tampón de fosfatos y

enzima en celdas de cuarzo de 1 cm utilizando un espectrofotómetro Beckman DU-640 (Beckman Coulter) se mantuvo la temperatura durante el ensayo, las temperaturas ensayadas fueron 10, 13, 15, 20, 25, 30, 40 °C.

Salinidad

La determinación de las condiciones de salinidad óptimas de reacción en diferentes concentraciones de salinidad se analizaron empleando cloruro de sodio (NaCl) (Sigma-Aldrich) que fue adicionado en concentraciones crecientes de 0 hasta 2000 mmol/L, con las condiciones óptimas previamente establecidas ajustando el pH en cada una de las concentraciones.

Especificidad de la enzima por el sustrato

Con el fin de determinar la especificidad de la enzima por el sustrato (catecol) se emplearon moléculas análogas en estructura al catecol. La actividad sobre los análogos se analizó empleando cada uno de los coeficientes de extinción molar reportados para cada uno de los sustratos; 3MC ($\epsilon = 13,400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, 388 nm), 4MC ($\epsilon = 28,100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, 379 nm) y 4CC ($\epsilon = 36,100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, 379 nm) utilizando la metodología establecida anteriormente con las mismas concentraciones de sustrato disolviendo cada uno de los sustratos en agua destilada o en tampón de fosfato de potasio 50 mM a pH 7.4 (Takeo *et al.*, 2007).

Caracterización molecular, análisis bioinformático y búsqueda de enzimas involucradas de degradación de compuestos aromáticos en el genoma del aislado

Con el fin de analizar los genes involucrados en otros procesos metabólicos relevantes en la degradación de hidrocarburos aromáticos, a partir del genoma ensamblado se realizó la búsqueda de genes, utilizando RAST version 2.0 <<https://rast.nmpdr.org>>, BLAST KOALA version 2.2 <<https://www.kegg.jp/blastkoala/>> y la base de datos de KEGG <<https://www.kegg.jp>>.

Rapid Annotations using Subsystems Technology (RAST)

Es un servicio en línea totalmente automatizado para anotar genomas bacterianos y arqueales, que identifica genes que codifican proteínas, ARNr y ARNt, asigna funciones a los genes, predice qué subsistemas están representados en el genoma, utiliza esta información para reconstruir la red metabólica y hace que la salida sea fácilmente descargable para el usuario. Utiliza una colección curada manualmente que representa conjuntos de familias de proteínas (Aziz *et al.*, 2008).

Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)

En esta enciclopedia de genes y genomas se vincula la información genómica con información funcional. Se forman tres bases de datos; Genes: almacena la información genómica, es una colección de catálogos de genes para todos los genomas completamente secuenciados y algunos genomas parciales con anotaciones actualizadas de las funciones genéticas, Pathway: contiene representaciones gráficas de procesos celulares (metabolismo, transporte de membrana, transducción de señales, etc.) y Ligandos: reúne información sobre compuestos químicos, moléculas enzimáticas y reacciones enzimáticas (Kanehisa *et al.*, 2000)

KEGG Orthology And Links Annotation (BLAST KOALA)

Es una herramienta de KEGG para la caracterización funcional de secuencias de genomas y metagenomas, es un servidor que mediante anotación automática que realizan asignaciones de KO (ortología KEGG) para caracterizar funciones genéticas individuales y reconstruir rutas de KEGG (Kanehisa *et al.*, 2016).

Análisis estructural de la proteína

Con el fin de tener un acercamiento a la estructura de la enzima 2,3 ED se realizó la predicción de la estructura secundaria de la proteína con el servidor en línea I-TASSER version 5.1 <<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER>> en el que se procesan los datos de estructura primaria generando múltiples alineamientos con proteínas previamente cristalizadas para seleccionar como templado la plantilla con mejor puntuación; y el análisis del alineamiento se realizó con MatchMaker de UCSF Chimera que superponen estructuras de proteínas o ácidos nucleicos

creando primero alineamientos de secuencia por pares, luego ajustando los pares de residuos alineados.

Resultados

Aislamiento de una cepa con actividad 2,3 extradiol dioxigenasa a partir del consorcio positivo a la actividad

Con el objetivo de identificar un aislado positivo a la actividad 2,3 ED a partir del consorcio (Figura 17), se realizó la dispersión de colonias por dilución seriada en medio sales marinas suplementado con fenol, se obtuvieron dos aislados positivos a la actividad con diferente morfología de colonia (AD18 5S, AD18 5J).

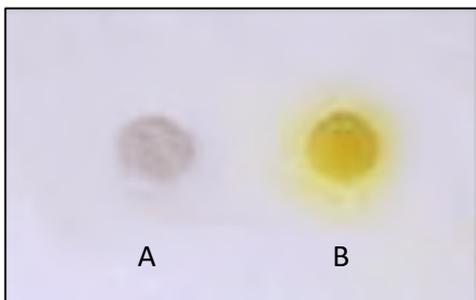


Figura 17. Cambio de coloración en el consorcio AD18 con actividad 2,3 ED por goteo de catecol, (A) sin adicionar el sustrato, (B) después de 5 min de adicionar el sustrato en medio sales marinas suplementado con fenol.

Los dos aislados identificados con actividad 2,3 ED (AD18-5S, AD18-5J) fueron analizados por microscopía encontrándose solo una morfología bacilar en ambos aislados (Figura 18AB).

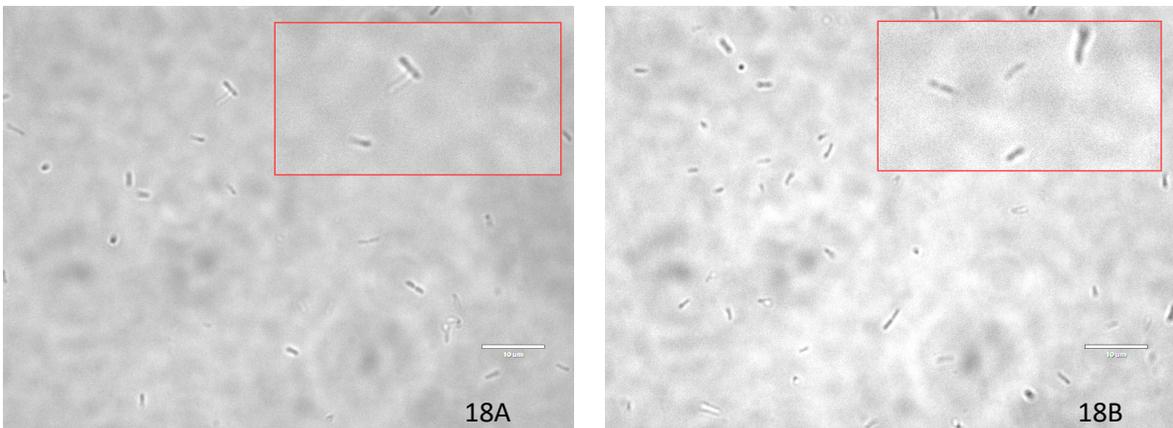


Figura 18. Morfología de los aislados obtenidos de la dispersión del consorcio. 14A (AD18-5S), 14B (AD18-5J). Imágenes obtenidas con microscopio 100x, en los recuadros rojos se muestran las imágenes aumentadas para facilitar su visualización.

Identificación molecular de la cepa positiva a la actividad

La identificación molecular de las cepas se logró mediante la amplificación del gen 16S rARN en los dos aislados (AD18 5S, AD18 5J) utilizando la técnica de PCR y oligonucleótidos universales. Los productos de PCR fueron secuenciados y las secuencias obtenidas se utilizaron para búsqueda de similitud de secuencias con el programa BLASTn. Se realizaron alineamientos múltiples de secuencias lo que permitió generar un árbol filogenético para identificar las cepas. Se utilizó como grupo externo *Vibrio cholerae* perteneciente a la misma clase (Gammaproteobacteria), encontrándose una alta similitud con cepas del género *Pseudomonas*, sin embargo, el análisis no nos permitió identificarlas a nivel de especie (Figura 19), Lalucat y colaboradores en el 2006 analizaron las secuencias de diferentes especies de *Pseudomonas*, encontrando una alta similitud de secuencias a nivel de 16S rARN entre las especies *P. mendocina* (Palleroni, 1970), *P. alcaligenes* (Monias, 1928), *P. pseudoalcaligenes*, *P. xanthomarina* (Romanenko *et al.*, 2005) y *P. balearica* (Bennasar *et al.*, 1996).

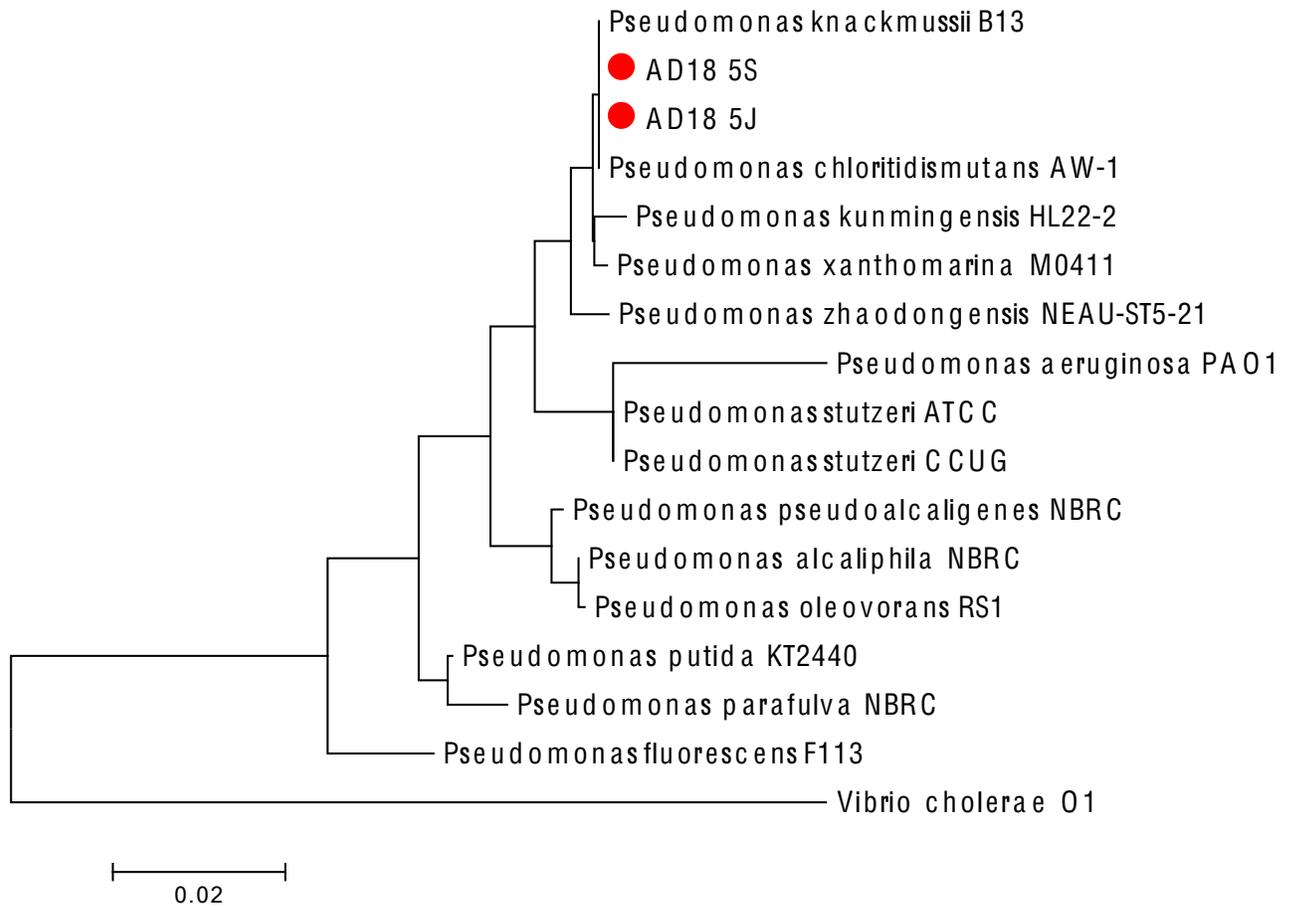


Figura 19. Árbol filogenético de las cepas aisladas del consorcio positivo generado utilizando el gen 16S rARN de los dos aislados. Los círculos rojos denotan los dos aislados analizados que se encuentran en la misma rama con *Pseudomonas knackmussii* y *Pseudomonas chloritidismutans*. Árbol generado utilizando el programa MUSCLE ofrecido por MEGA 7 utilizando el método 'neighbor-joining tree'.

Con el objetivo de seleccionar uno de los aislados con actividad, se realizó una cinética de producción de S-2HMC empleando el método espectrofotométrico con la misma cantidad de proteína para comparar la actividad de las dos cepas; se observó que la actividad 2,3 ED en ambos aislados fue superior al consorcio, la cepa AD18-5S presentó mayores valores de absorbancia en estas condiciones, sin embargo las dos cepas tuvieron comportamientos muy similares (figura 20).

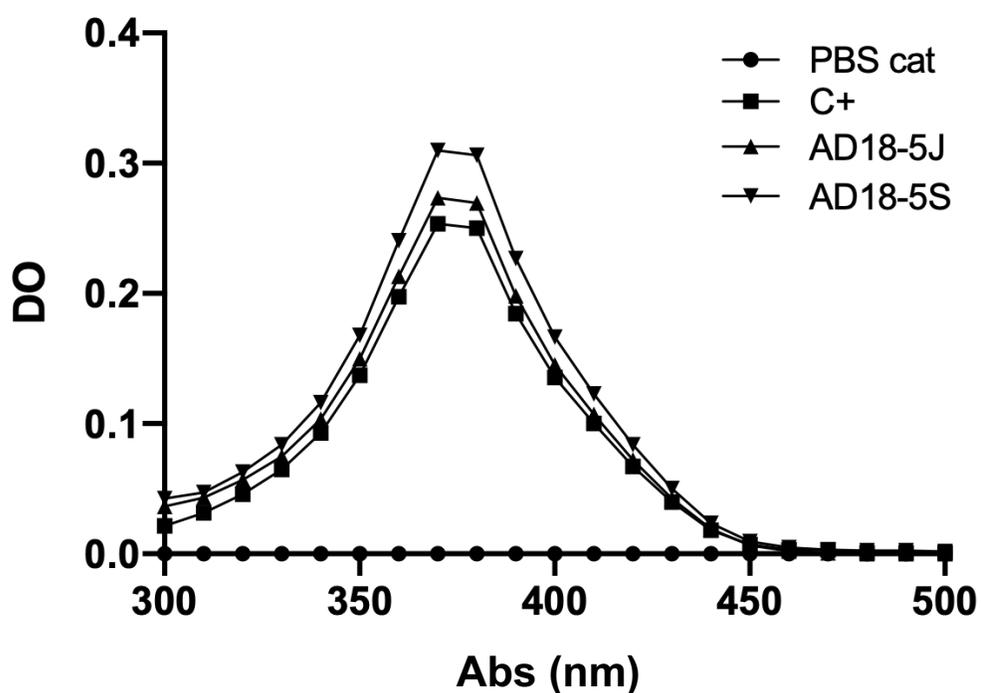


Figura 20. Barrido espectral del producto (S 2-HMC) generado por la enzima 2,3 ED en los dos aislados (AD18; 5J y 5S) y el consorcio AD18 (C+) en donde se observa el pico máximo de absorbancia a 375 nm, se muestra como control negativo el tampón de fosfatos con la adición del sustrato (PBS cat) en donde no hay generación del producto (S 2-HMC). La enzima obtenida del aislado y las dos clonas evaluadas presentan un comportamiento muy similar en el barrido realizado.

Se seleccionó el aislado AD18-5S por tener mayores valores de absorbancia en el ensayo espectrofotométrico y se realizó la secuenciación de su genoma utilizando la tecnología Illumina. Los datos obtenidos se utilizaron para hacer el ensamblaje del genoma con la ayuda de la Dra. Ernestina Godoy (IBt) y la Dra. Nancy Rivera (IBt) utilizando el pipeline de la unidad de secuenciación masiva del IBt-UNAM que comprende la utilización de los programas ABySS y VELVET.

Así mismo se utilizó el programa checkM (Parks *et al.*, 2015) para seleccionar el mejor ensamble con base a sus estadísticas y se conservó la salida de VELVET.

El ensamble se mejoró con el programa REAPR, el cual rompe el ensamble de acuerdo con la cobertura de las secuencias crudas; con GapFiller de la salida de REAPR, se rellenaron los gaps con las secuencias crudas; SSpace hace scaffolding, GapFiller de la salida de Sspace, los gaps se cubrieron con las secuencias crudas, iCORN 2 que generó la salida final para la anotación, obteniendo 26 contigs con un tamaño promedio de 177,506 pares de bases y un total de 4,615,171 bases.

Finalmente se utilizó checkM para determinar la contaminación de los diferentes ensamblajes reconstruidos y el *completeness* del genoma el cual indica que tan completo está el genoma ensamblado, obteniendo un 0.14 y un 99.94 respectivamente.

La comparación del genoma completo del genoma y la determinación del valor ANI, se realizó con un análisis de ANI (Average Nucleotide Identity) comparando el genoma del aislado positivo a la actividad 2,3 ED, con secuencias de otros genomas ensamblados de *Pseudomonas stutzeri* (Sijderius., 1946), disponibles en bases de datos de NCBI hasta junio del 2019, mostrando una identidad superior 98% con los genomas de los aislados *Pseudomonas stutzeri* DSM 50227 (ANI= 98.08964 %) y *Pseudomonas stutzeri* NCTC10475 (ANI= 98.08525 %) (Figura 21). Además formó un cluster con 33 cepas más mostrando una identidad superior al 96% pero inferior a 98% en el Anexo 2 se muestran todos los genomas utilizados para realizar el ANI.

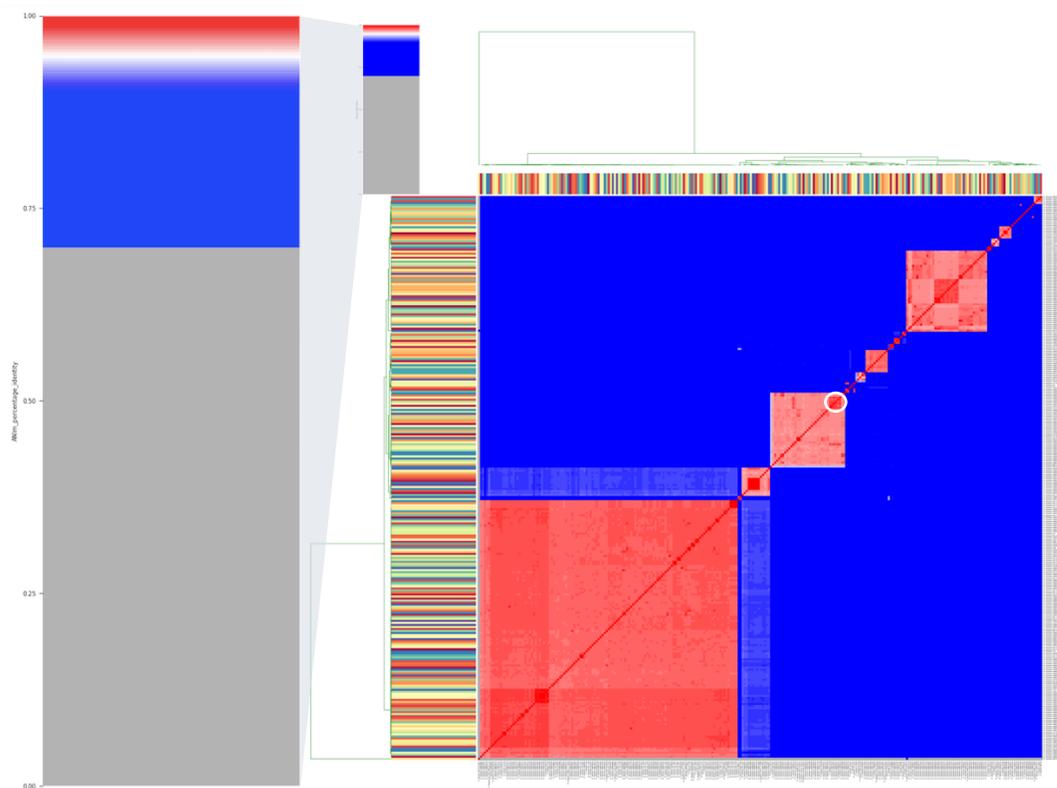


Figura 21. Mapa de calor ANI (Average Nucleotide Identity) con 278 genomas de *Pseudomonas stutzeri* disponibles en NCBI hasta junio del 2019. A la izquierda se muestra la escala de color representada en el mapa de calor en donde se representan en gris los porcentajes de identidad inferiores a 70%, en azul entre 70% y 90% y en rojo los valores superiores a 90%. El círculo blanco indica el sitio donde se converge con el genoma de la cepa AD18 5S.

Análisis bioinformático del genoma

Con el fin de identificar la secuencia codificante para la enzima 2,3 ED del aislado de *P. stutzeri* se realizó la búsqueda del gen por similitud de secuencias con 2,3 ED ya reportadas, lo que permitió identificar el gen putativo *xylE/CatE* de 923 pb (figura 18 flecha roja), (ruptura *meta*) junto a 9 genes más involucrados en la degradación de benzoato. Se analizó el contexto genómico de los 10 genes situados organizadamente como un operón de 11,337 pb (Figura 12) en la tabla 7 se muestra el gen con el que tiene mayor porcentaje de identidad de secuencia y el organismo al que pertenece adicionalmente se muestra el EC. Number y el producto génico.

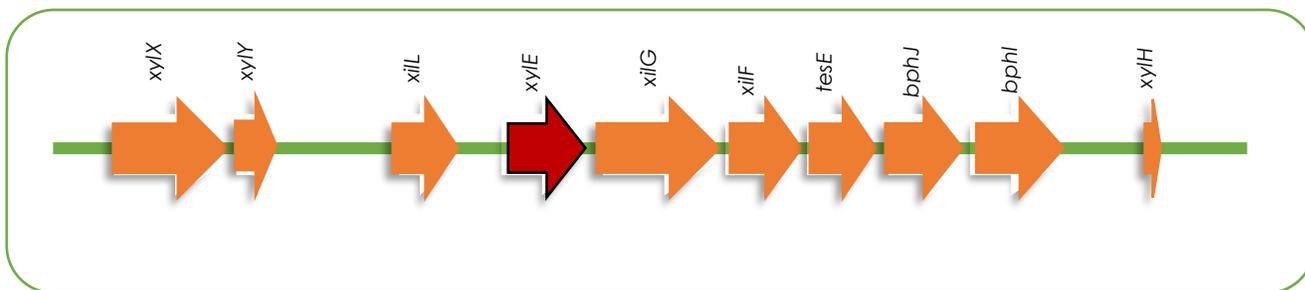


Figura 22. Contexto genómico de los genes involucrados en la degradación de benzoato en *Pseudomonas stutzeri* D18 (*meta*), en rojo se muestra el gen putativo *xyIE/CatE*.

Tabla 7. Genes putativos encontrados por porcentaje de identidad con genes de la vía de degradación de benzoato en *Pseudomonas stutzeri*, se marca en negritas el gen putativo *catE-xyIE*.

Gen con identidad	Porcentaje de identidad	Número EC	Producto génico
<i>benA-xyIX</i>	<i>Acinetobacter baylyi</i> (66%)	1.14.12.10	Benzoato 1,2-dioxigenasa subunidad alfa
<i>benB-xyIY</i>	<i>Acinetobacter baylyi</i> (62%)	1.14.12.10	Benzoato 1,2-dioxigenasa subunidad beta
<i>benD-xilL</i>	<i>Acinetobacter baylyi</i> (60%)	1.3.1.25	1,2-dihidroxiciclohexa-3,5-diene-1-carboxilato dehidrogenasa
<i>catE-xyIE</i>	<i>Pseudomonas alkylphenolica</i> (50%)	1.13.11.2	Catecol 2,3-dioxigenasa
<i>xyIG</i>	<i>Pseudomonas putida</i> (93%)	1.2.1.85	Putativa 5-carboximetil-2-hidroxiacetilaldehído dehidrogenasa oxidoreductasa
<i>xyIF</i>	<i>Pseudomonas putida</i> (93%)	3.7.1.9	2-semialdehído hidroximucónico hidrolasa
<i>tesE</i>	<i>Pseudomonas testosteroni</i> (62%)	4.2.1.132	2-hidroxihexa-2,4-dienoato hidratasa
<i>bphJ</i>	<i>Paraburkholderia xenovorans</i> (62%)	1.2.1.10	Acetaldehído dehidrogenasa
<i>bphI</i>	<i>Paraburkholderia xenovorans</i> (76%)	4.1.3.39	4-hidroxi-2-oxovalerato aldolasa
<i>xyIH</i>	<i>Pseudomonas putida</i> (98%)	5.3.2.6	4-oxalocrotonate tautomerasa

Además se identificaron genes involucrados en la degradación de otros compuestos aromáticos, ver la sección Resultados del análisis bioinformático

de genes involucrados en la degradación de compuestos aromáticos en el genoma.

Análisis estructural de la proteína

Con el fin de analizar la secuencia lineal de aminoácidos obtenida para la proteína 2,3 ED y seleccionar por identidad de secuencia el alineamiento con mayor identidad se empleó BLASTP, en donde la secuencia de nuestra proteína se alineó con el 100% de cobertura y 100% de identidad con multiespecies de Proteobacterias: entre las que se encontraron los géneros *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Achromobacter* y *Oceanobacter* (Figura 23).

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
639 bits(1649)	0.0	Compositional matrix adjust.	307/307(100%)	307/307(100%)	0/307(0%)
Query 1		MNKGVMRPGHVQLRVLDMSKALEHYVELLGLIEMDRDDQGRVYLKAWTEVDKFSVLVREA			60
Sbjct 1		MNKGVMRPGHVQLRVLDMSKALEHYVELLGLIEMDRDDQGRVYLKAWTEVDKFSVLVREA			60
Query 61		DEPGMDFMGFKVVDEDALRQLERDLMAYGCAVEQLPAGELNSCGRRVRFQAPSGHHFELY			120
Sbjct 61		DEPGMDFMGFKVVDEDALRQLERDLMAYGCAVEQLPAGELNSCGRRVRFQAPSGHHFELY			120
Query 121		ADKEYTGKWLNDVNPEAWPRDLKGMAAVRFDHALMYGDEL PATYDLFTKVLGFYLAEQV			180
Sbjct 121		ADKEYTGKWLNDVNPEAWPRDLKGMAAVRFDHALMYGDEL PATYDLFTKVLGFYLAEQV			180
Query 181		LDENGTRVAQFLSLSTKAHDVAFIHHPEKGRLLHHVSFHLETWEDLLRAADLISMTDTSID			240
Sbjct 181		LDENGTRVAQFLSLSTKAHDVAFIHHPEKGRLLHHVSFHLETWEDLLRAADLISMTDTSID			240
Query 241		IGPTRHGLTHGKTIYFFDPSGNRNEVFCGGDYNYPDHKPVTTDQLGKAIFYHDRILNE			300
Sbjct 241		IGPTRHGLTHGKTIYFFDPSGNRNEVFCGGDYNYPDHKPVTTDQLGKAIFYHDRILNE			300
Query 301		RFMTVLT 307			
Sbjct 301		RFMTVLT 307			

Figura 23. Resultados del análisis de la secuencia de aminoácidos de la enzima 2,3 ED mediante BLASTP, en donde se observa un 100% de cobertura e identidad con la enzima catecol 2,3 dioxigenasa en multi especies.

Posteriormente se realizó la predicción de la estructura de la proteína con el programa I-TASSER en donde se seleccionó la plantilla de la subunidad A de la estructura de la enzima 2,3 ED de *Pseudomonas putida* mt-2 conocida como 1MPY.

Con el fin de comparar ambas estructuras se realizó la sobreposición de las estructuras y su análisis empleando el programa MatchMaker de UCSF Chimera en donde se observaron las 6 hélices α y las 17 cadenas β características para estas enzimas en ambas estructuras.

En la figura 24 se muestra la predicción del modelado obtenido por I-TASSER, se marca el primer aminoácido metionina 1 y el último en el carboxilo terminal treonina 307, al hacer la sobreposición con la estructura cuaternaria los

extremos carboxilo quedan expuestos mientras que los amino se encuentran predichos a estar en la parte interna del homotetrámero.

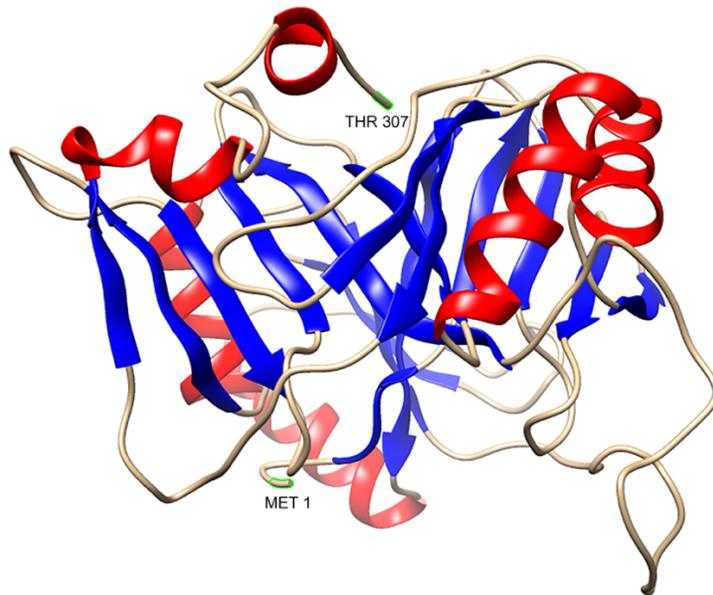
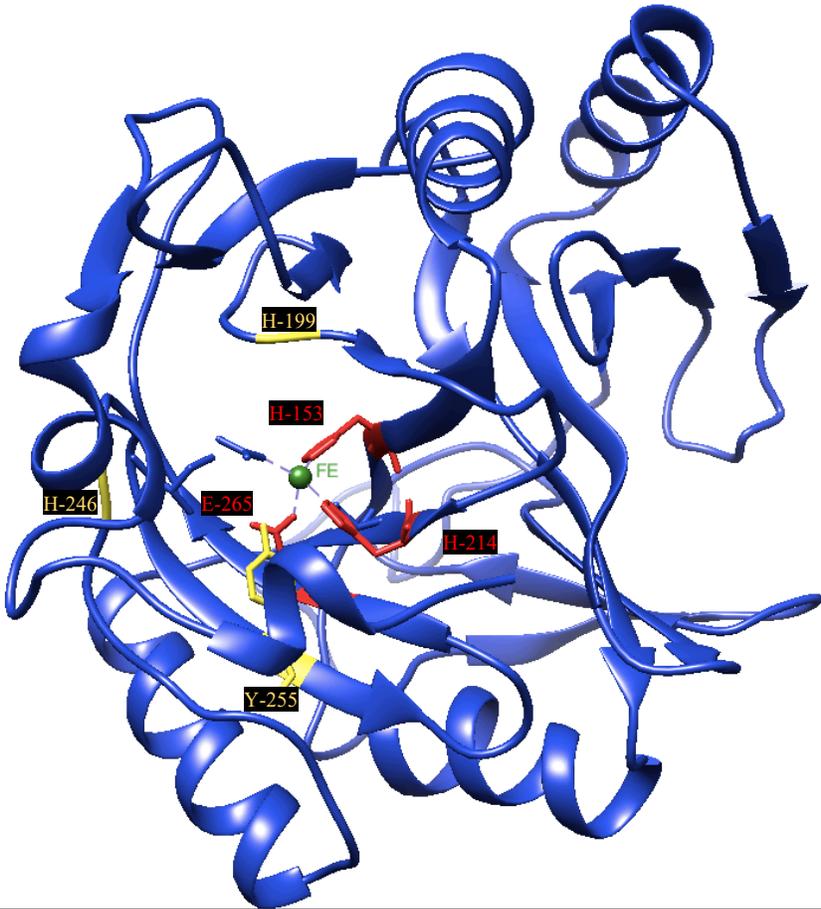


Figura 24. Modelado predicho de uno de los monómeros de la enzima catecol 2,3 ED de *Pseudomonas stutzeri* D18 con la sobreposición de estructura de la subunidad A de 1MPY, en azul se muestran las cadenas β y en rojo las α hélices.

Posteriormente se realizó la búsqueda de los sitios conservados con interacción con el cofactor y el sustrato reportados previamente en la literatura sobre la secuencia de la enzima catecol 2,3 ED de *Pseudomonas stutzeri* D18, identificando los 6 sitios conservados en la secuencia de aminoácidos (Figura 25a), lo que se ve reflejado en la interacción con el cofactor y el sustrato conservados en la figura 25b se muestra el modelado predicho de una de las subunidades de la proteína y sus interacciones con el cofactor en rojo y en amarillo con el sustrato.

1	11	21	31	41
1	MNKG	VMRP	GHV	QLRV
	LD	MSKALE	EHYVEL	LGL
	IEMDR	DDQGR	VYLK	AWTEV
51	DKFS	LVLRE	ADEP	GMDFMG
	FKV	VDE	EDALR	QLERD
	L	MAY	GCAV	EQLP
	PAGEL			
101	NSCGR	RVR	FQAP	SGH
	HFEL	YADKEY	TGKWGL	NDVNPE
	AWPRDL	KGMAA	V	R
151	¹⁵³ FD	H	ALMYG	DE
	LPATY	DLFT	KV	LG
	FYLA	EQV	L	DENGTR
	V	AQFL	S	L
	STKA	H	D	
199				
201	VAFI	H	HPEK	GR
	L	H	V	S
	F	H	L	E
	TWED	LL	RAAD	L
	I	S	M	T
	D	T	S	I
	D	I	G	P
	T	R	H	G
	L	T	H	
246				
251	²⁵⁵ G	K	T	I
	Y	F	F	D
	P	S	G	N
	R	N	E	V
	F	C	G	G
	D	Y	N	P
	D	H	K	P
	V	T	W	T
	T	D	Q	L
	G	K	A	I
	F	Y	H	D
	R	I	L	N
	E			
301	R	F	M	T
	V	L	T	

a)



b)

Figura 25. Secuencia de aminoácidos y estructura de la enzima 2,3 ED. a) Secuencia, en verde se resaltan las 17 hebras β y en amarillo las 6 hélices α características de estas enzimas. Los recuadros rojos indican sitios conservados relacionados con la interacción con el cofactor (Fe II) y el sustrato (Catecol). b) Estructura predicha para la enzima 2,3 ED, se muestran los sitios conservados con

interacción con el cofactor (Fell) en rojo, los sitios en amarillo corresponden a los sitios conservados que interaccionan con el sustrato (catecol). En verde se ejemplifica una molécula de Fell.

Expresión heteróloga del gen responsable de la actividad

Con el objetivo de realizar la expresión heteróloga del gen codificante para la enzima 2,3 ED, con los datos obtenidos de la secuenciación del genoma, se identificó por homología el gen putativo *catE* el cual codifica para la enzima 2,3 ED. Se analizó la secuencia del gen *catE* y se generaron oligonucleótidos para amplificar el gen *catE* (923 pb):

Fw2,3 ED	TTGT <u>AGAATT</u> CATGAACAAAGGTGTAATGCGA
Rv2,3 ED	CATCTCGAGGGTCAGCACGGTCATGAATCG

Se subrayan los sitios de restricción para EcoRI y Xho1 respectivamente.

Se realizó la amplificación mediante la técnica de PCR obteniendo el fragmento esperado de 923 pb al utilizar una temperatura de alineamiento de 59 °C. El fragmento fue sometido a una electroforesis en un gel de agarosa al 1% para identificar el tamaño del gen putativo *catE* (Figura 26).

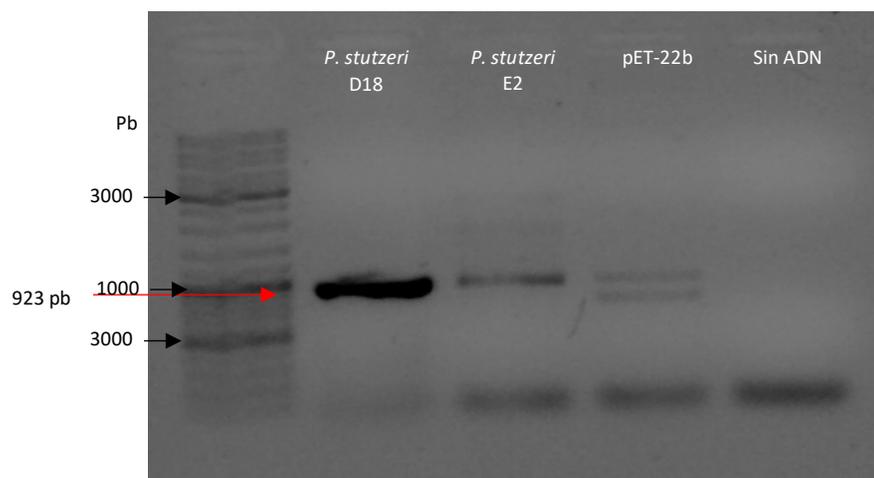


Figura 26. Electroforesis de los fragmentos amplificados por PCR. Los fragmentos fueron separados en un gel de agarosa al 1%. Carril 1- Fragmento amplificado de 923 pb a partir de ADN de *P. stutzeri* D18 positiva a la actividad 2,3 ED, Carril 2-Control negativo *P. stutzeri* sin el gen *CatE*, Carril 3- Plásmido pET-22b, Carril 4-Sin ADN. La flecha roja indica el fragmento esperado de 923 pb.

Con el objetivo de obtener el plásmido linealizado y el fragmento de ADN para la clonación se cortaron y purificaron las bandas del gel de electroforesis que corresponden al vector pET-22b y al inserto obtenido por PCR. Se realizó la digestión doble de los productos de purificación empleando las enzimas *EcoRI-XhoI* una vez digeridos se realizó la ligación del fragmento amplificado con el vector pET-22b en una relación 1:3 y finalmente se transformó en cepas de *E. coli* BL21 E3.

Identificación de clona positiva a la actividad 2,3 extradiol dioxigenasa

La identificación de la clona positiva a la actividad se realizó empleando el método colorimétrico (Figura 27), en donde se puede apreciar el color amarillo dado por el S-2HMC hidroximuconato al adicionar el sustrato en la clona con el fragmento codificante para la enzima 2,3 ED.



Figura 27. Coloración amarilla característica de la actividad 2,3 ED. Se muestran 7 clonas evaluadas en busca de la actividad, en la clona 10 se muestra la formación de S-2HMC, presentando coloración amarilla, en todas las colonias se adiciono la misma concentración de catecol utilizando el método de goteo.

Una vez que se seleccionó la clona positiva con el método colorimétrico, se corroboró el resultado mediante una digestión doble *EcoRI-XhoI* de la clona y del vector vacío (Figura 28), observando el fragmento liberado en la clona con actividad mientras que en el vector pET-22b no hubo liberación de fragmento. Finalmente se secuenció el plásmido de la clona positiva encontrándose un 100% de identidad a la secuencia identificada esperada para el gen putativo 2,3 ED empleando BLASTP, la clona positiva se denominó C10.

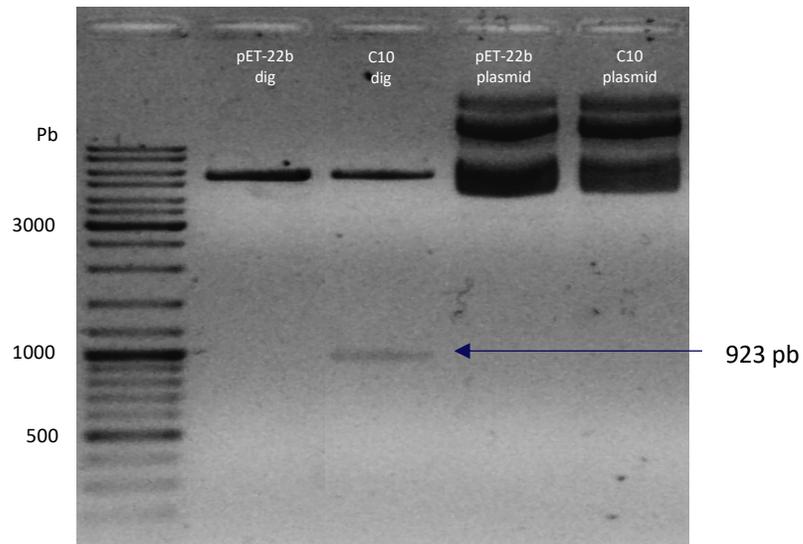


Figura 28. Gel de electroforesis de las clonas evaluadas para la actividad 2,3 ED digeridas con las enzimas de restricción *EcoRI-XhoI*. Carril 1-Plásmido sin digerir, Carril 2-Clona 10 sin digerir, Carril 3-Plásmido digerido, Carril 4-Plásmido digerido. La flecha señala el fragmento liberado esperado de 923pb en la clona 10.

Expresión de la enzima 2,3 extradiol dioxigenasa

Para la expresión de la proteína se siguieron los pasos ilustrados en la Figura 29. El primer ensayo de expresión se incubó en condiciones de inducción estándar para *E. coli* (37 °C, 200 rpm), se observó la proteína de interés con el tamaño aproximado de 35 kDa. La proteína se encontró dividida entre la fracción en la fracción soluble e insoluble (Figura 30), mientras que en el pET-22b vacío utilizado como control negativo no hubo inducción en ninguna de las fracciones.

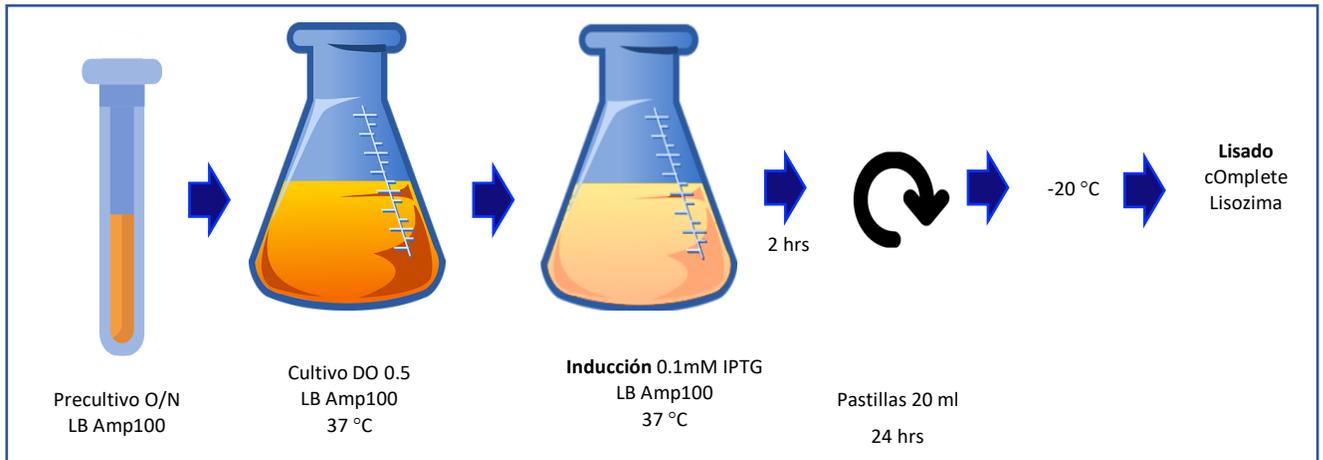


Figura 29. Protocolo de las condiciones de inducción de la expresión de la proteína 2,3 ED utilizadas inicialmente.

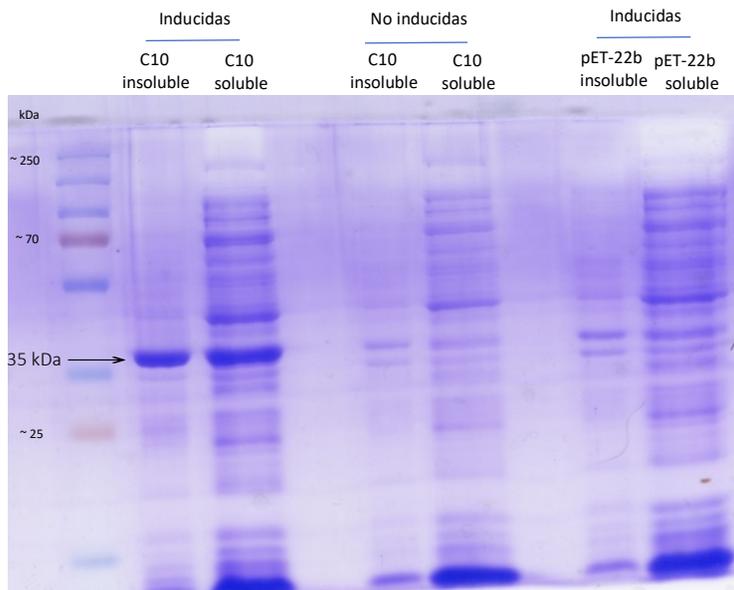


Figura 30. Inducción de la producción de la proteína 2,3 ED visualizadas en SDS-PAGE. Se muestran las fracciones solubles e insolubles obtenidas después de la lisis de la Clona 10 y del pET-22b.

A continuación las células bacterianas fueron observadas en el microscopio evidenciando la formación de cuerpos de inclusión, como lo reportado por Carrió (1998) en las células inducidas, se muestran con flechas rojas (Figura 31a) mientras que en las células sin inducir no se evidenciaron estos cuerpos de inclusión (Figura 31b).

Con el fin de aumentar la fracción de proteína soluble en el proceso de purificación y disminuir los cuerpos de inclusión se probaron diferentes temperaturas de inducción durante la expresión entre 4 y 42 °C.

Sin embargo el análisis a bajas temperaturas (4 °C, 18 °C y 30 °C) de inducción no logró aumentar la cantidad de proteína encontrada en la fracción soluble. Adicionalmente, se aumentaron los ciclos de lisis por sonicatedo lo que permitió observar una mayor cantidad de la proteína de interés en la fracción soluble, por lo que se realizó la expresión a 37 °C y la lisis con 6 ciclos de sonicación.

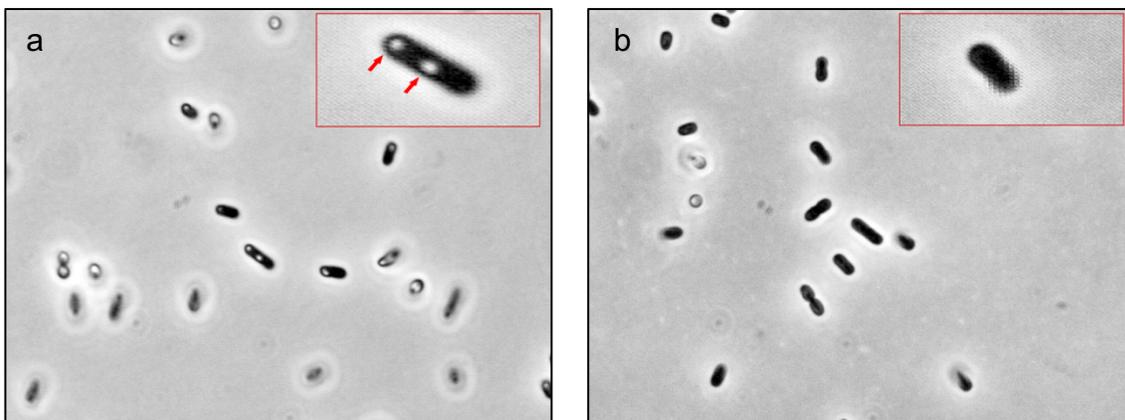


Figura 31. Formación de cuerpos de inclusión en células de *E. coli* de la clona 10 (C10). a) Células después de 2 horas de inducción a 37 °C durante 2 horas ; b) Células sin inducir. En los recuadros rojos ubicados en la parte superior derecha de las figuras se observa la imagen en aumento para facilitar su visualización. Las flechas rojas de la figura 26 indican los cuerpos de inclusión visibles de una de las células de *E. coli* de la clona 10 inducidas.

Se determinó mediante densitometría el porcentaje de proteína correspondiente al tamaño de la 2,3 ED (35 kDa), presente en cada una de las fracciones: fracción soluble (38.78 %) y fracción insoluble (61.21 %) definiendo

como 100 % el extracto total de proteína. Se emplearon las mismas cantidades volumétricas de extracto para cada muestra (Figura 32).

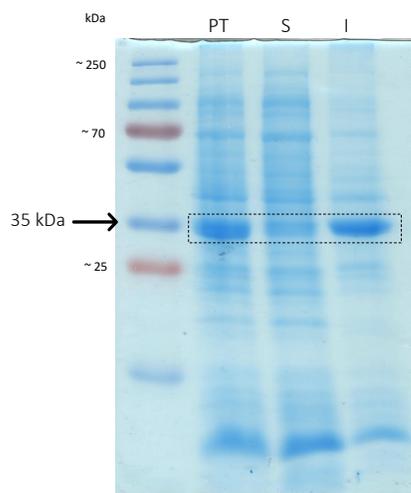


Figura 32. Fracciones de la proteína de interés en cada una de las muestras, analizado por densitometría con el programa Image J. Carril PT: Proteína total, Carril S: Fracción soluble, Carril I: Fracción insoluble. La flecha negra señala el fragmento correspondiente a la proteína 2,3 ED. En el recuadro punteado se denota la fracción de la proteína 2,3 ED en cada una de las muestras.

Purificación de la enzima 2,3 extradiol dioxigenasa

Con el objetivo de monitorear la actividad 2,3 ED con la proteína pura se realizó la purificación por cromatografía de afinidad con el extracto total obtenido de la proteína soluble expresada. Se utilizó una columna de afinidad a níquel (Figura 33), la cual fue eluida utilizando 250 mM de imidazol. La banda de peso esperada (35 kDa) fue visualizada en un gel SDS-PAGE al 10% de acrilamida.

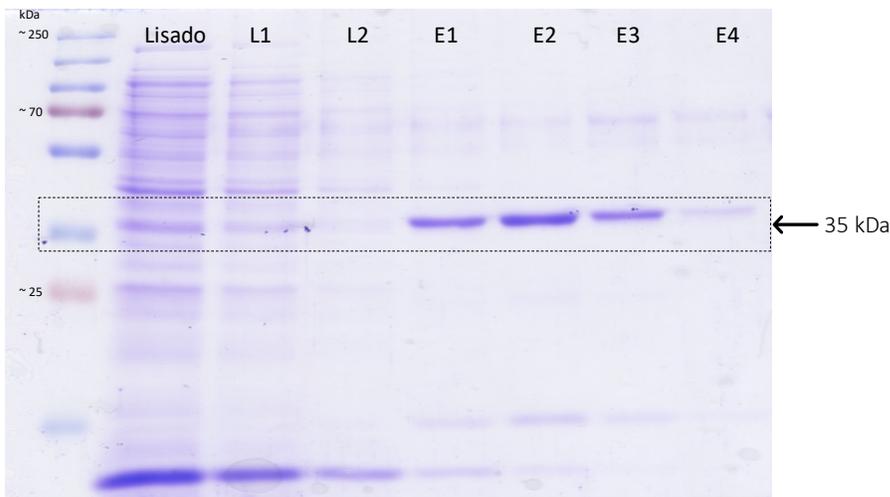


Figura 33. Proceso de purificación de la proteína 2,3 ED visualizado mediante un gel SDS-PAGE al 12 %. Carril 1-Lisado total de la proteína, Carril 2,3-Lisado celular, Carril 4,5,6,7-Eluciones obtenidas con 250 mM de imidazol. En el recuadro punteado se señala el tamaño aproximado de 35 kDa esperado para la enzima, observándose un mayor enriquecimiento en las eluciones 1,2,3.

Para mejorar el proceso de purificación se utilizó una elución con imidazol en gradiente (Figura 34) encontrando la proteína con menos contaminaciones con la elución con 120 mM de imidazol.

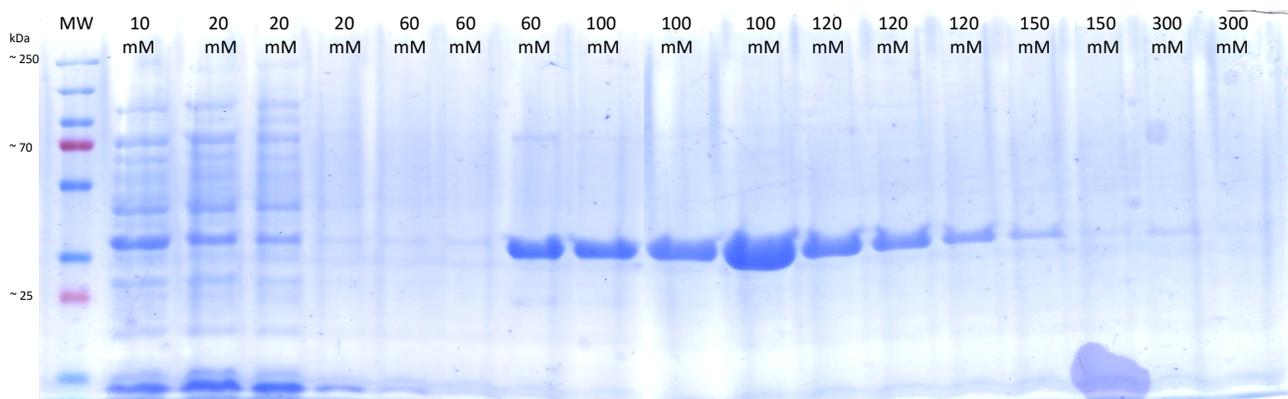


Figura 34. Gel SDS-PAGE al 12 % donde se visualizan las fracciones obtenidas durante el proceso de purificación de la enzima 2,3 ED empleando un gradiente de imidazol (60 mM-300 mM) en donde se observa una mejor elución en 100 mM.

Con el fin de comparar la actividad enzimática observada en el aislado *P. stutzeri* y el extracto total sin purificar con la fracción purificada, se realizaron ensayos enzimáticos siguiendo la metodología previamente descrita; se emplearon 25 µg de proteína en todos los casos y 50 uM de sustrato, encontrándose una mayor actividad en la proteína purificada; la muestra antes de la purificación y la proteína proveniente del aislado no son realmente comparables con la proteína purificada ya que se cuantifican también otras proteínas y no sólo la enzima 2,3 ED, sin embargo nos ayuda a observar si nuestro proceso de purificación es exitoso y se preserva la actividad (Tabla 8).

Tabla 8. Actividad relativa porcentual obtenida para el ensayo enzimáticos 2,3 ED utilizando 25 ug proteína purificada, extracto total de la clona y aislado *P. stutzeri*. Se deifinio como 100% la actividad observada en la proteína purificada.

Muestra*	Actividad relativa (%)
<i>P. stutzeri</i> D18	7.30 ± 0.49
Extracto C10	13.96 ± 3.43
Purificada	100 ± 8.98

*Se emplearon 25µg de cada muestra. Los datos presentados corresponden a los promedios obtenidos a partir de tres muestras biológicas con tres réplicas técnicas ± sus desviaciones estandar.

Caracterización bioquímica de la enzima 2,3 extradiol dioxigenasa

Determinación de pH óptimo

Para la determinación del pH óptimo de la reacción, se monitoreó el comportamiento del sustrato en los diferentes pH mediante un barrido espectrofotométrico (Figura 35) en donde se observó la formación de productos espontáneos en los dos pH más altos (11, 12), utilizando 400 μ M de sustrato.

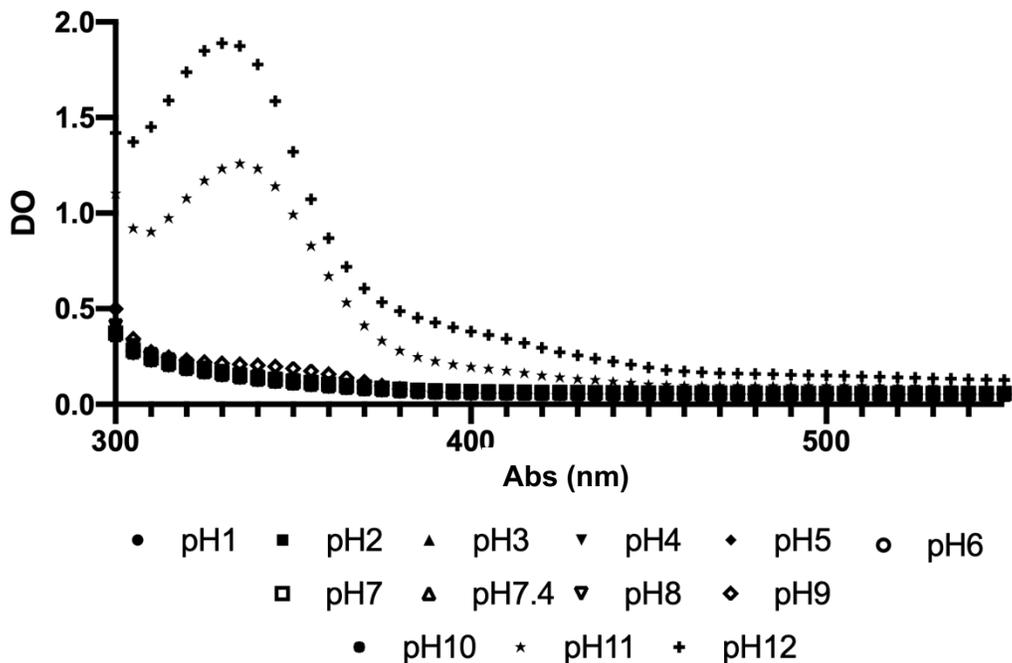


Figura 35. Barrido espectral entre 300 y 500 nm realizado con el fin de determinar la aparición de productos espontáneos al adicionar el sustrato (catecol) en cada uno de los tampones en los pH utilizados (1-12) sin adición de enzima. Datos generados a partir de tres muestras biológicas con tres réplicas técnicas.

Posteriormente se realizaron los ensayos por triplicado y además se utilizaron blancos sin proteína para cada punto. En la figura 36 se muestran los datos de la actividad relativa obtenidos, tanto en los pH más ácidos (1 y 2) en tampón Glicina-HCl y (3 y 4) Fosfato-citrato no se logró ver actividad; en los pH más alcalinos (Glicina-NaOH 9, 10, 11 y 12) la proteína se precipita, además el sustrato (catecol) se oxida rápidamente en los pH 11 y 12.

Se observó una buena actividad enzimática entre pH 6 y 9 con la actividad óptima en pH 7.4 con un valor de 92.73 ± 5.58 mU (0.09273 ± 0.00558 U).

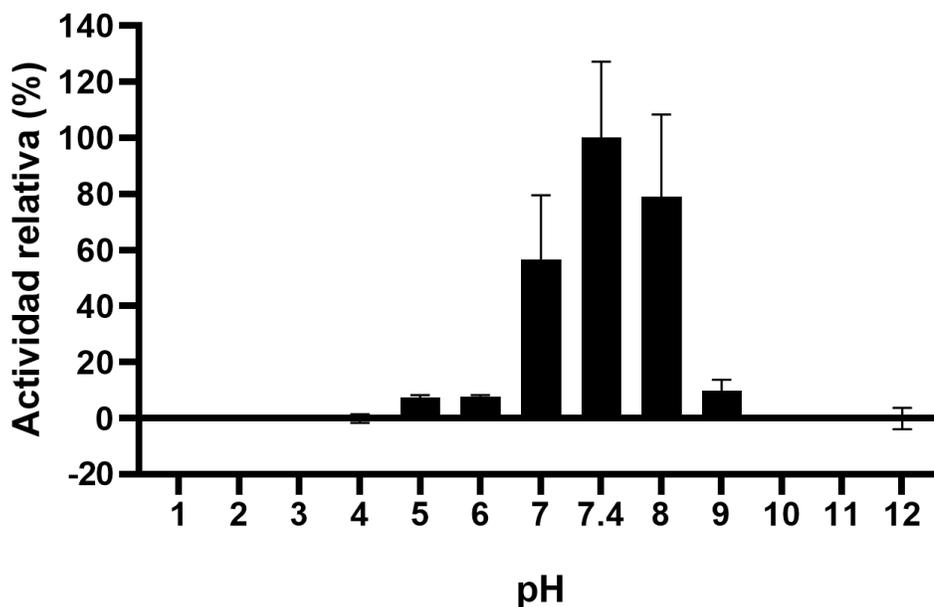


Figura 36. Determinación de pH óptimo de la actividad 2,3 ED. Las barras indican la actividad relativa obtenida en cada pH presentados en el eje horizontal. Se logró detectar la actividad entre pH 5 a 9 y se obtuvo la mayor actividad a un pH de 7.4. Datos generados a partir de tres muestras biológicas con tres réplicas técnicas.

Determinación de la actividad en NaCl

Con el fin de evaluar la actividad enzimática en condiciones de salinidad adicionales se empleó cloruro de sodio, con las condiciones de pH definido como óptimo se analizó el comportamiento de la actividad adicionando a la reacción concentraciones crecientes de NaCl (0-2000 mmol/L). Se observó una mejor actividad sin adición de la sal y hubo una disminución del 25% desde la menor concentración probada (100 mM) de NaCl, en 800 mM retiene más del 50 % de actividad mientras que en la mayor concentración utilizada tiene actividad superior a 30 % (Figura 37).

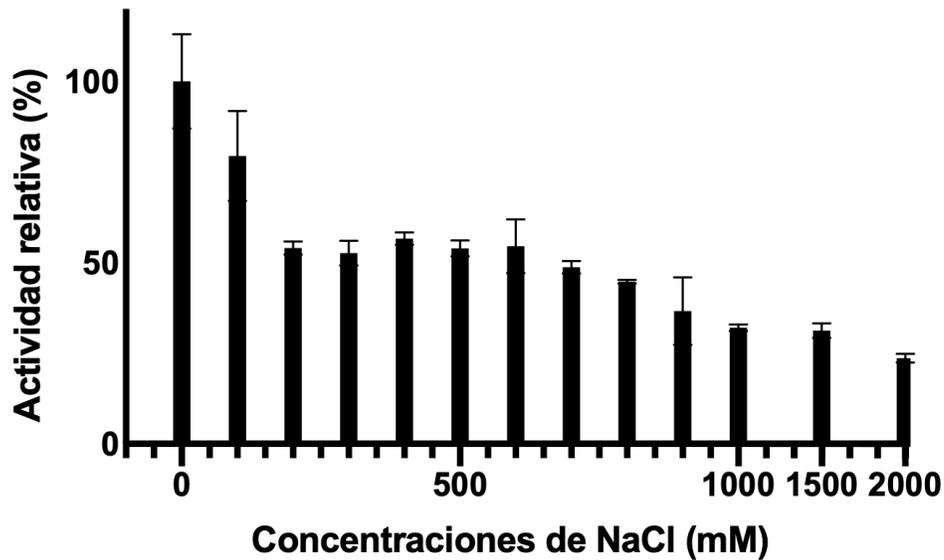


Figura 37. Determinación de la actividad 2,3 ED al adicionar concentraciones crecientes de NaCl. Se observa la mejor actividad sin la adición de cloruro de sodio en la reacción. Se definió como 100% la actividad obtenida sin adicionar NaCl. Datos generados a partir de tres muestras biológicas con tres réplicas técnicas.

En un ensayo complementario en agua de mar proveniente del Golfo de México con un pH 7.31 se logró observar una actividad superior al 50% en las condiciones de ensayo definidas anteriormente (Figura 38), encontrando mayor actividad en el tampón de fosfatos.

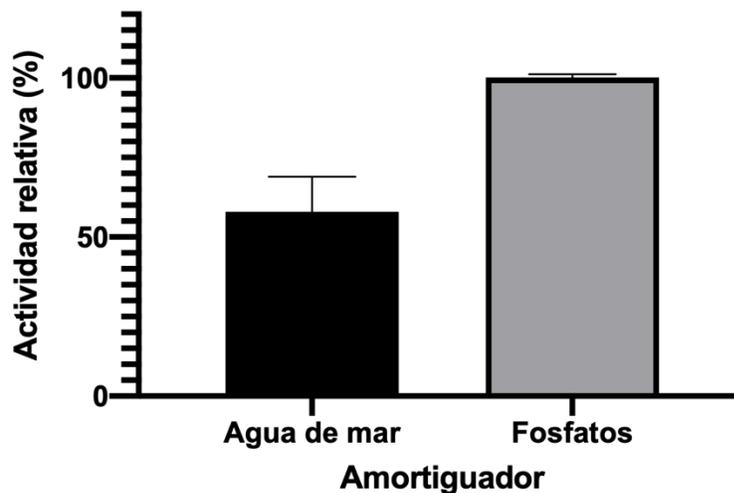


Figura 38. Actividad 2,3 ED relativa en agua de mar a un pH de 7.31 y amortiguador de fosfatos de potasio 50 mM. Se definió como 100% la actividad encontrada en tampón de fosfatos de potasio. Datos generados a partir de tres muestras biológicas con tres réplicas técnicas.

Determinación de la actividad sobre sustratos análogos al catecol

Para determinar la afinidad de la enzima por el sustrato catecol se monitoreó la ruptura de moléculas análogas en estructura al catecol se trabajó en las condiciones definidas como óptimas en el ensayo; se realizaron los ensayos empleando los sustratos 3MC, 4MC y 4CC utilizando los diferentes coeficientes de extinción molar descritos previamente en la literatura para hacer los cálculos en U y mU. Se definió como 100% la actividad sobre catecol; la enzima presenta actividad superior al 50 % sobre 4 CC en las condiciones ensayadas mientras que en los catecoles con grupos metilo la actividad fue menor al 30% presentando la actividad más baja en 3 MC (8.9%) (Figura 39). Se observa una alta especificidad sobre catecol, teniendo buena actividad sobre 4CC.

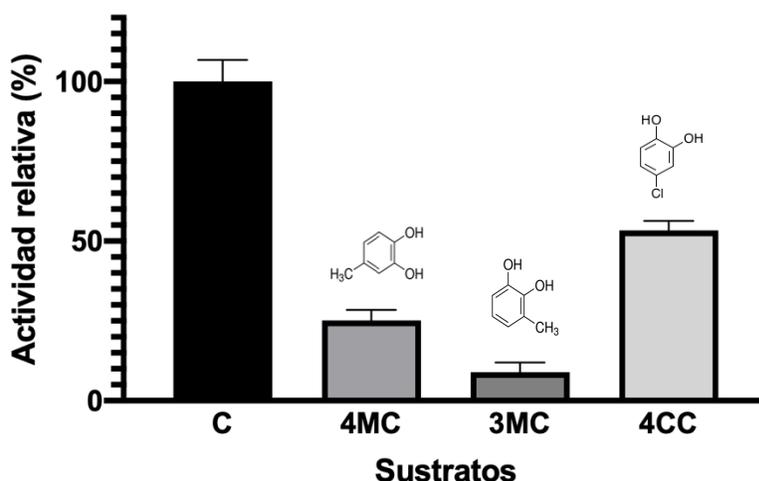


Figura 39. Determinación de la actividad de la enzima por el sustrato catecol y moléculas análogas en estructura. C-Catecol, 4MC-4 metil catecol, 3MC-3 Metil catecol y 4CC-4 Cloro catecol. Se observa la mejor especificidad sobre C seguido por 4CC, 4MC y 3MC. Se muestran las estructuras de cada una de las moléculas en la parte superior de las columnas. Todos los sustratos se solubilizaron en tampón de fosfatos 50 mM a pH 7.4. Datos generados a partir de tres muestras biológicas con tres réplicas técnicas.

Determinación de temperatura óptima

Con el fin de determinar la temperatura óptima de la reacción con las condiciones de pH óptimo y amortiguador previamente definidas se analizaron

diferentes temperaturas en un rango de 10 a 60 °C empleando la metodología de celda y placa (Figura 40) encontrando la temperatura óptima a 15 °C, el rango de actividad de la enzima 2,3 ED fue superior al 50 % entre 10 °C y 55 °C, lo que la presenta como una enzima con un amplio rango de actividad.

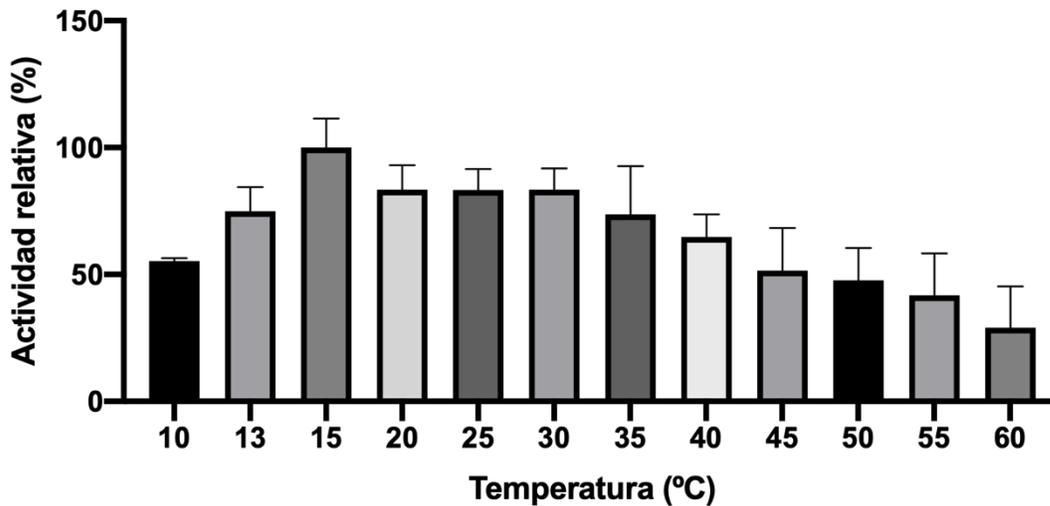


Figura 40. Determinación de temperatura óptima de la actividad 2,3 ED entre 10 y 60 °C. Se definió como 100 % la actividad más alta observada que corresponde a 15 °C. Datos generados a partir de tres muestras biológicas con tres réplicas técnicas.

Como se esperaba, la temperatura óptima de reacción se encuentra entre las temperaturas más bajas probadas similares a las condiciones presentes en el ambiente marino del Golfo de México.

Resultados del análisis bioinformático del genoma completo en búsqueda de genes involucrados en la degradación de compuestos aromáticos

Análisis del genoma

A partir del genoma ensamblado se realizó la búsqueda de genes involucrados en otros procesos metabólicos relevantes en la degradación de compuestos derivados del petróleo.

Genes involucrados en degradación de compuestos aromáticos.

Como ya se mencionó previamente se encontraron por homología genes involucrados en la degradación de benzoato. En la figura 41 se muestran las enzimas encontradas en el genoma del aislado AD18 *P. stutzeri* implicadas en esta vía, entre las cuales se encuentran las enzimas implicadas en la ruptura de la molécula de catecol en las posiciones *orto* (EC. 1.13.11.1) catecol 1,2 intradiol dioxigenasa y *meta* (EC. 1.13.11.2) catecol 2,3 extradiol dioxigenasa la cual fue caracterizada en este estudio. La vía *orto* se encuentra incompleta pues no se encontraron las enzimas (EC. 3.1.1.24, EC. 2.8.3.6 y EC. 2.3.1.) las cuales se encargan del metabolismo de los productos de la ruptura del catecol posteriores a la apertura del anillo en posición *orto*, mientras que las todas las enzimas de la vía *meta* si están anotadas. Las vías de degradación se consultaron en KEGG (Benzene degradation pathway).

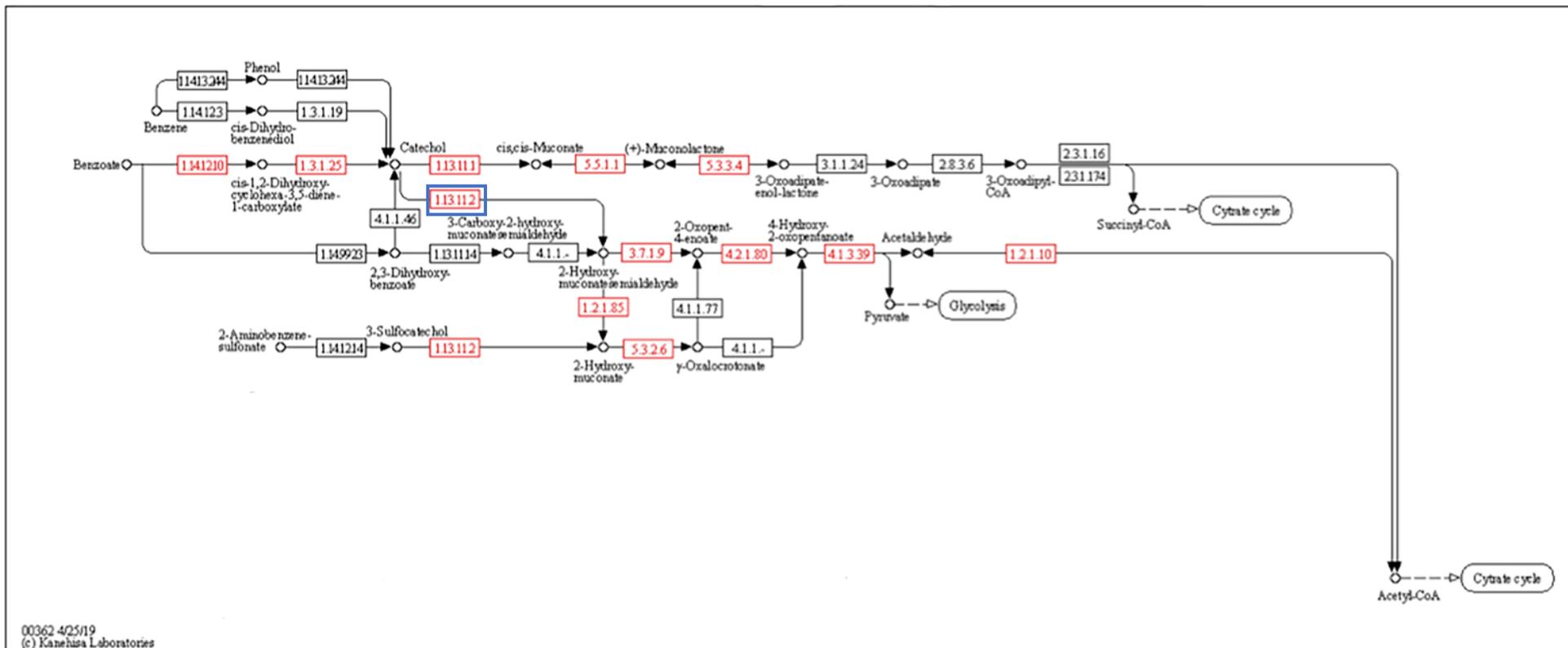


Figura 41. Vías de degradación del benzoato; vías *orto* y *meta* de ruptura del catecol. En rojo se muestran las enzimas encontradas por identidad de secuencia en el genoma de la cepa *P. stutzeri* D18 mientras que en negro se denotan las enzimas que no están anotadas, en el recuadro azul se muestra la enzima caracterizada en este trabajo (Modificado de KEGG Benzene degradation pathway).

En experimentos preliminares se logró determinar la ruptura del catecol por la vía *meta* en presencia de ácido benzoico al 0.01% después de 78 horas a 30 °C en agitación 200 rpm mediante la detección de la coloración amarilla en el medio, la cual fue corroborada posteriormente mediante barridos espectrofotométricos realizados con el sobrenadante. Encontrando el pico más alto de absorbancia a 375 nm, en la figura 42 se muestra el crecimiento del aislado en presencia de ácido benzoico (42a) y el control que corresponde a medio rico LB sin adición del compuesto aromático (42b).

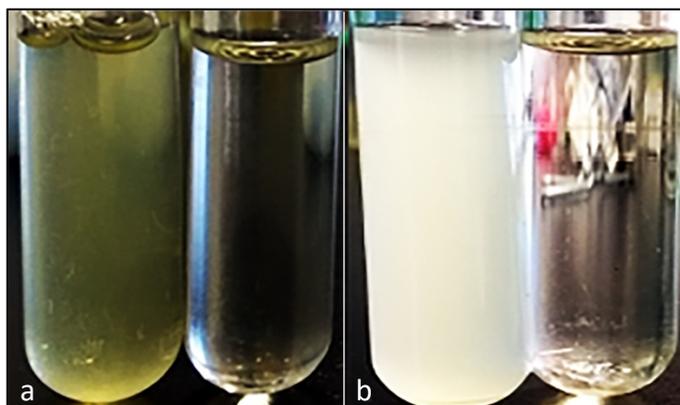


Figura 42. Crecimiento del aislado *P. stutzeri* D18 en ácido benzoico. a) Crecimiento en medio LB suplementado con 0.1% de ácido benzoico. b) Crecimiento en medio LB. Se observa coloración amarilla en medio suplementado con ácido benzoico.

Como se menciona anteriormente se detectó la enzima 1,2 ID por lo que se analizó la vía *orto* del catecol en el aislado, en la cual se produce cis-cis muconato que es monitoreable espectrofotométricamente a 260nm, sin embargo en ensayos preliminares no se logró identificar la actividad de la enzima 1,2 dioxigenasa codificada por el gen *catA*.

Además se identificó un gen de tolerancia al tolueno lo que sugirió que se podrían encontrar otros genes de degradación de este compuestos aromático. Se analizó el genoma en busca de las enzimas de la vía de degradación de tolueno con enzimas de referencia. Se encontraron enzimas involucradas en degradación de tolueno hasta incorporarlo a la vía de degradación de benzoato, que fueron analizadas con un BLASTP (Tabla 9) para identificar a las enzimas con las que se presentase el mejor porcentaje de identidad en la base de datos de NCBI, en la figura 43 se muestra la vía de degradación de tolueno de KEGG y se marcan las enzimas encontradas. Las vías de degradación se consultaron en KEGG (Toluene degradation pathway).

Tabla 9. Identificación de enzimas implicadas en la degradación de tolueno en *P. stutzeri* AD18.

EC. NUMBER	Gen	Organismo	Porcentaje de identidad
1.14.15.26	XylM	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	98.00%
1.1.1.90	XylB	<i>Pseudomonas putida</i>	99.18%
1.2.1.28	XylC	<i>Pseudomonas multiespecies</i>	100%

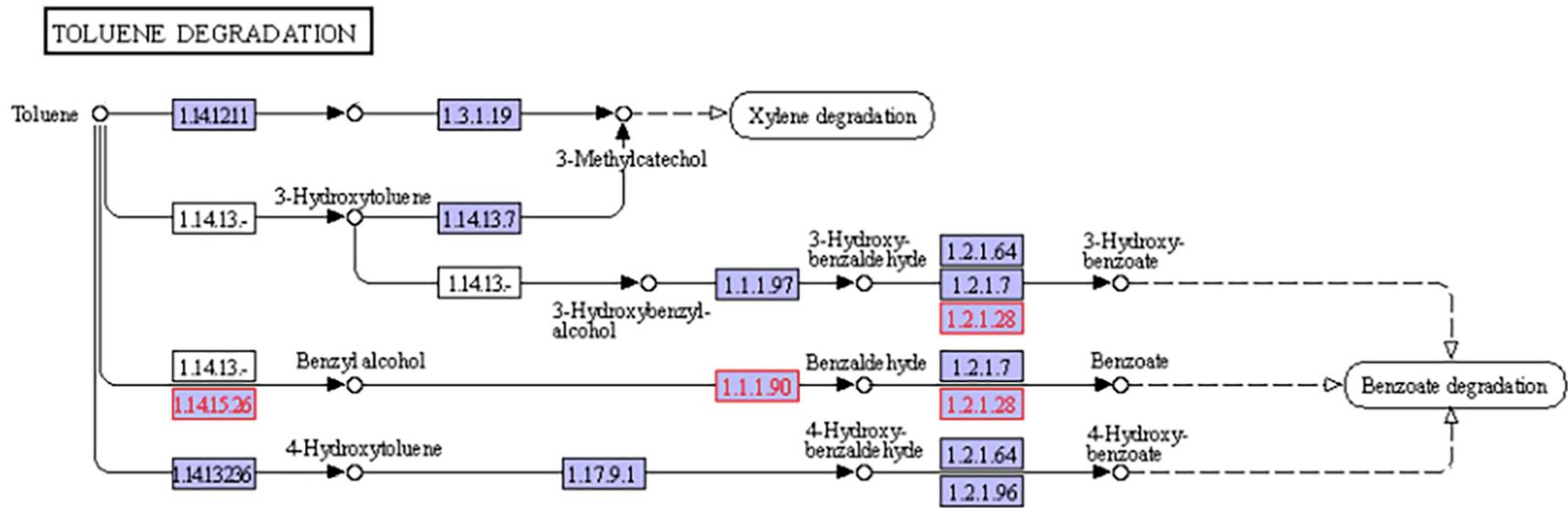


Figura 43. Vía de degradación del tolueno, en rojo se muestran las enzimas identificadas en *P. stutzeri* D18, mientras que en azul y blanco las enzimas que no se encontraron en el genoma del aislado. (Modificado de KEGG Toluene degradation pathway).

Posteriormente se analizó el contexto genómico de las enzimas encontradas para la degradación de tolueno, encontrándolas muy cercanas entre ellas (Figura 44).

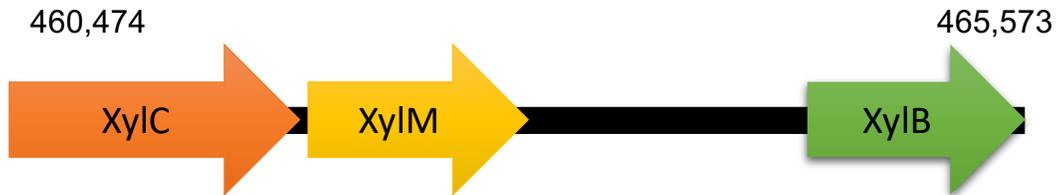


Figura 44. Contexto genómico de los genes de la vía de degradación del tolueno encontrados en el genoma de *P. stutzeri* AD18.

El producto del metabolismo del tolueno por estas enzimas puede ser metabolizado en la vía de degradación de benzoato para la cual se tienen identificados los genes en el aislado. Esto sugiere que el aislado podría degradar tolueno.

Los genes identificados para la vía de degradación de tolueno participan en el metabolismo superior de xileno en la figura 45 se muestran las enzimas encontradas para la degradación de xileno, los EC number en color azul son enzimas que no se encuentran en el genoma de *P. stutzeri*. Las vías de degradación se consultaron en KEGG (Xylene degradation pathway).

Discusión

En un análisis experimental y bioinformático previo, sobre la abundancia de géneros bacterianos presentes en el consorcio positivo a la actividad 2,3 ED realizado en el laboratorio de la Dra. Liliana Pardo por la bióloga Libertad Adaya García y la Dra. Ernestina Godoy Lozano, se encontró que más del 90% de los géneros identificados corresponde a *Pseudomonas*, siendo el género más abundante seguido por *Staphylococcus* (Rosenbach., 1884). Además se presentan bacterias pertenecientes por lo menos a 26 géneros más (Datos no publicados) (Figura 46). La actividad enzimática 2,3 ED está altamente representada en el género *Pseudomonas* lo cual concordó con la identificación de la cepa D18 al género *Pseudomonas*.

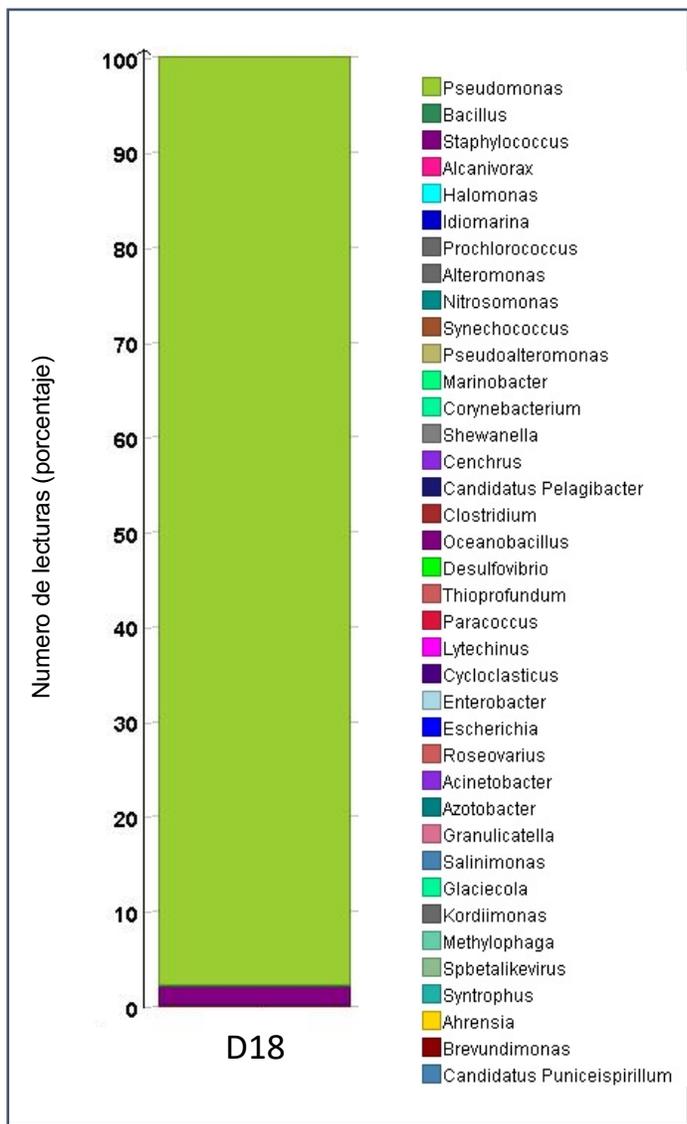


Figura 46. Abundancia relativa de lecturas de los géneros presentes en el consorcio D18. En donde se observa que la mayor abundancia corresponde al género *Pseudomonas*.

A la fecha no existen reportes de la abundancia de género de bacterias de la columna de agua de la estación D18 en el Golfo de México, sin embargo en 2018 Godoy-Lozano y colaboradores reportaron la abundancia de los géneros en sedimento que forman parte de la línea base del swGoM.

En la tabla 10 se muestran los géneros correspondientes al punto de muestreo Sedimento 18 (S18) encontrándose al género *Pseudomonas* entre las más abundantes.

Tabla 10. Abundancia de los géneros bacterianos reportados para la línea base del Golfo de México S18.

Género	Abundancia relativa promedio (%)
<i>Spongiispira</i> (Kaesler <i>et al.</i> , 2008)	7.622447
<i>Thiopfundum</i> (Takai <i>et al.</i> , 2010)	6.893847
<i>Rhodovibrio</i> (Imhoff <i>et al.</i> , 1998)	5.64693
<i>Pelobacter</i> (Schink & Pfennig., 1983)	3.952169
<i>Desulfonatronum</i> (Pikuta <i>et al.</i> , 1998)	3.760074
<i>Desulfovibrio</i> (Kluyver & van Niel., 1936)	3.478182
<i>Geokalibacter</i> (Zavarzina <i>et al.</i> , 2007)	2.592723
<i>Phycisphaera</i> (Fukunaga <i>et al.</i> , 2010)	2.349478
<i>Desulfoviregula</i> (Kaksonen <i>et al.</i> , 2007)	1.819794
<i>Dehalogenimonas</i> (Moe <i>et al.</i> , 2009)	1.806154
<i>Pseudomonas</i>	1.190084
<i>Geobacter</i> (Lovley <i>et al.</i> , 1995)	1.665208
<i>Colwellia</i> (Deming <i>et al.</i> , 1988)	0.604704

Aunque las condiciones en sedimento son diferentes a las que se encuentran en muestras de agua, nos da una idea de los géneros bacterianos que se encuentran presentes en el ambiente marino.

Se ha encontrado una estrecha relación entre el género *Pseudomonas* y la presencia de compuestos aromáticos. El género *Pseudomonas* tiene una gran participación en la degradación de compuestos aromáticos, los datos en UniProt para las catecol 2,3 ED descritas hasta noviembre del 2019 mostraron que el 7% de estas enzimas corresponden al género *Pseudomonas* ocupando el segundo lugar sólo después de *Streptomyces* (Waksman & Henrici 1943) (Figura 47). Al analizar a nivel de especie las enzimas 2,3 ED del género *Pseudomonas* el 11% corresponden a *P. stutzeri* ocupando el tercer lugar.

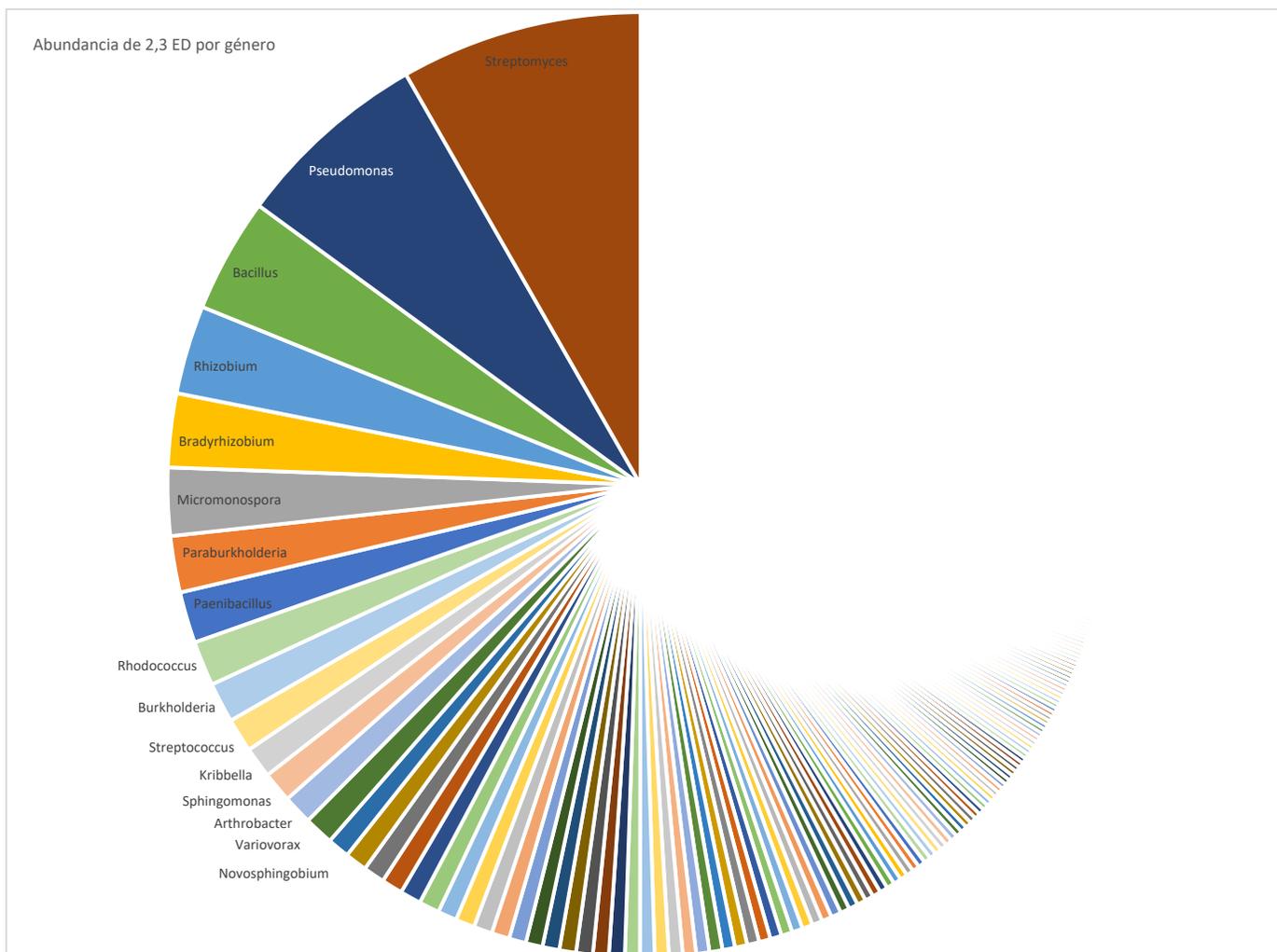


Figura 47. Abundancia de 2,3 ED agrupadas por género reportadas en UniProt hasta noviembre del 2019.

Los datos mencionados anteriormente concuerda con la identificación obtenida para el aislado con actividad 2,3 ED del género *Pseudomonas*.

Se ha descrito que estas enzimas participan en la degradación de compuestos aromáticos como Benzoato, Tolueno y Xileno indirectamente al metabolizar el catecol. Además de la enzima 2,3 extradiol dioxigenasa en el genoma de nuestra cepa, se encontró la vía de degradación de benzoato *orto* en la que participa la enzima 1,2 intradiol dioxigenasa (Figura 48) Ver anexo 1.

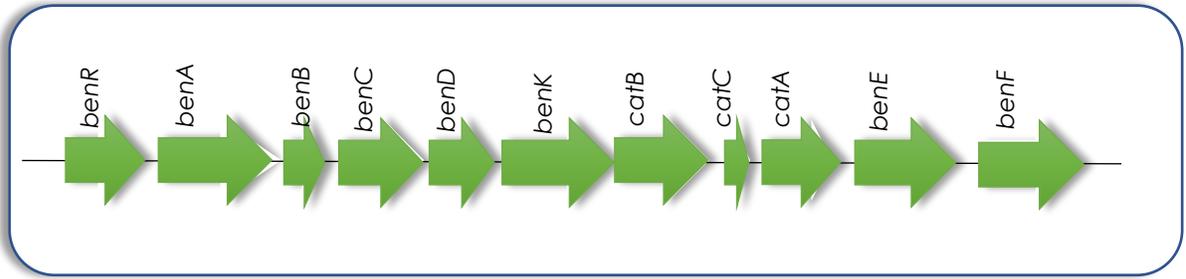


Figura 48. Contexto genómico de los genes involucrados en la degradación de benzoato en *Pseudomonas stutzeri* (orto).

En *Pseudomonas* se ha observado que la vía *orto* desempeña el papel dominante durante el metabolismo de compuestos aromáticos como el naftaleno y salicilato, mientras la vía de degradación *meta* se ha descrito con menos frecuencia, esta vía se induce por salicilato (Barnsley, 1976). Con el objetivo de analizar el comportamiento de las enzimas 2,3 ED y 1,2 ID del aislado *P. stutzeri* D18 se analizó la producción de cis-cis muconato generado en la ruptura del catecol por la vía *orto* es decir por la enzima 1,2 ID, encontrando preferencia por la vía *meta*, pues no fue posible detectar cis-cis muconato.

Para explicar la preferencia de ruptura de catecol por la vía *meta* en el aislado se analizó la activación diferencial de las vías de degradación del catecol, la cual es dependiente del reconocimiento de los inductores por Benzoato (BenR) y por m-Xileno (XylS) que activan los promotores *Pben* y *Pm*, respectivamente.

Se ha reconocido la capacidad de BenR para activar el promotor *Pm* en el sistema TOL en respuesta a benzoato (Kessler *et al.*, 1994), no siendo así de manera inversa, es decir XylS no puede activar al promotor *Pben* en presencia de m-Xileno en condiciones naturales, es decir que se puede dar la activación de la vía *meta* por reconocimiento de benzoato y de m-xileno.

En *Pseudomonas putida* mt-2 se ha encontrado una explicación biológica a esta regulación en el metabolismo de 3 metil benzoato (3MBZ). *Pseudomonas putida* mt-2 contiene los genes cromosómicos *ben* y el plásmido TOL con los genes *Xyl* la degradación de m-xileno genera 3MBZ el cual produce la activación de las proteínas XylS y BenR las cuales se unen a los promotores *Pm* y *Pben* respectivamente. El 3MBZ es entonces metabolizado generando metil catecol (MC), el cual puede ser a su vez metabolizado por la vía *meta* y *orto*.

El corte de la molécula por XylE (*meta*) genera productos metabolizables mientras que la ruptura de la molécula por *catA* (*orto*) produce un metabolito tóxico (2-metil-2-enolactona).

Se sugiere que el mecanismo de regulación evita conflictos metabólicos por activación cruzada de XylS por *Pben* evitando así la acumulación de metabolitos tóxicos por la degradación de 3MBZ por la vía de degradación *orto* Figura 49 (Pérez-Pantoja *et al.*, 2015).

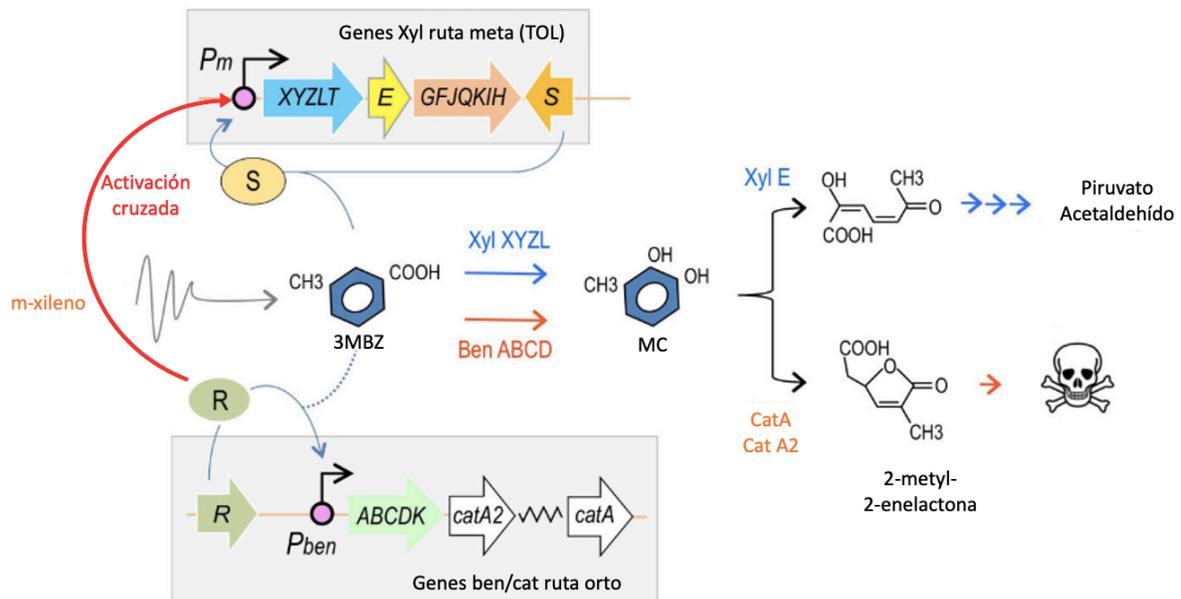


Figura 49. Regulación cruzada en las vías de degradación *meta* y *orto* del catecol en *Pseudomonas putida* mt2, en rojo se muestra la activación cruzada. El metabolismo de m-xileno produce 3MBZ (hexágono azul) que es reconocido por BenR (R) y XylS (S). Su reconocimiento activa los promotores *Pben* o P_m y la subsecuente expresión de genes que permiten su degradación. Como producto de la degradación de 3MBZ se genera MC que es degradado completamente por XylE o parcialmente por CatA en donde se produce 2-metil-2-enolactona que es un metabolito tóxico para la célula. Modificado de Pérez-Pantoja *et al.*, 2015.

Kessler y colaboradores sugieren que esta regulación cruzada de los promotores se da por una alta identidad a nivel de aminoácidos entre los dos reguladores (60%). Para hacer la comparación de las secuencias de los dos reguladores encontrados en el genoma de la cepa de *P. stutzeri* D18 se realizó un BLASTP con los parámetros predeterminados y se encontró que si hay homología con un 66.03% de identidad entre el gen BenR putativo y la secuencia putativa de XylS lo que sugiere una probable activación cruzada,

dando la posibilidad de realizar el corte por la vía *meta* sensando m-xileno o benzoato (Figura 50).

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
429 bits(1102)	1e-156	Compositional matrix adjust.	206/312(66%)	250/312(80%)	1/312(0%)
p_Xy1S 5	LLNEKSQIFVHAEPYAVSDYVNQYVGTHSIRLPKGGRPAGRLHHRIFGCLDLCRISYGG				64
p_BenR 4 R..E..D.H.....H..A.C.Q..RT.S.QAS.S.CK..K....Q.....				63
p_Xy1S 65	VRVISPGLETQCYHLQIILKGHCLWRGHGQEHYFSPGELLLLNPDDQADLTYS				124
p_BenR 64	.H.T..A...I....LLQR.....R.....T.....I....PV.....L..				123
p_Xy1S 125	KLPSVVLDRACSDNNWHKPREGIRFAA-RHNLQQLDGFINLLGLVCDEAEHTKSM				183
p_BenR 124	...ASF.EK...E.Q.QA.V.....GSN..A.SE....GS....I.Q..GSEQ.I.QI..				183
p_Xy1S 184	HYAGIIASKLLEMLGSNVSREIFSKGNPSFERVVQFIEENLKRNLISLERLAELAM				243
p_BenR 184	Q.SR.....CS.A..IR.DP.GDSC...G.IADY.D.H...D..V.Q.....N..L..				243
p_Xy1S 244	LYNLFKHKHAGTTPKNYIRNRKLESIRACLSDPSANVRSITEIALDYGFLHLGRFA				303
p_BenR 244	..L...RKV.....S...Q...Q.HGR.....K..N.....M....M.....S.S.KS				303
p_Xy1S 304	AFGELPSDTRLQ				315
p_BenR 304	T.....R				315

Figura 50. Resultados de BLASTP de la comparación de la secuencia de aminoácidos de los dos reguladores. En negro se muestra la secuencia de proteínas del gen putativo Xy1S y en rojo la secuencia de BenR, los puntos muestran regiones conservadas y en rojo se muestran los aminoácidos diferentes con su sustitución.

Caracterización bioquímica de la enzima 2,3 extradiol dioxigenasa.

La actividad catalítica de la enzima 2,3 ED ha sido propuesta como una valiosa herramienta en la degradación y detección de compuestos aromáticos, uno de los aspectos importantes que se toman en cuenta al momento de emplear estas enzimas en estos procesos es el pH. De manera general muchas de las enzimas son sensibles a los cambios de pH, el aumentar o disminuir el pH óptimo puede afectar su actividad. Una de las causas puede ser la alteración de la conformación de la enzima provocando que el sustrato no entre a su sitio activo, debido a que los ácidos y las bases alteran el pH de la solución y también rompen los puentes salinos que estabilizan principalmente las interacciones iónicas entre los residuos de aminoácidos cargados opuestos en la superficie de la proteína (Sinha *et al.*, 2014).

Se ha reportado que el pH del agua marina se encuentra en un rango de pH entre 7.5 y 8.4 (Chester *et al.*, 2012) mientras que para el Golfo de México de manera general el pH superficial reportado se encuentra entre 8 y 8.14 (NOAA, 2015). Se analizó el comportamiento de las enzimas reportadas 2,3 ED en diferentes condiciones de pH (Tabla 11), el promedio de sus pH óptimo se encuentra en 7.5.

Tabla 11. Rangos de pH y pH óptimos para enzimas 2,3 ED previamente descritas en la literatura, los valores mostrados corresponden a la actividad observada empleando como sustrato el catecol.

Organismo	Rango de pH	pH óptimo	Referencia
<i>Alcaligenes faecalis</i> (Castellani & Chalmers., 1919)	6.8-7.0	7.0	Zhu <i>et al.</i> , 2008
<i>Azotobacter</i> sp. (Beijerinck., 1901)	5.0-10.0	7.0	Sala-Trepat <i>et al.</i> ,1971
<i>Planococcus</i> sp. (Migula 1894)	2.2-10.7	8.0	Hupert-Kocurek <i>et al.</i> , 2013
<i>Pseudomonas</i> sp.	5.5-9.5	7.5	Wei <i>et al.</i> , 2010
<i>P. putida</i> SH1	7.5-8.0	7.5	Shir-Ly <i>et al.</i> , 2010
<i>P. putida</i> mt2	5.0-9.0	6.5	Nakai <i>et al.</i> , 1983
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (Palleroni & Bradbury 1993)	5.0-7.4	9.0	Hupert-Kocurek <i>et al.</i> , 2012

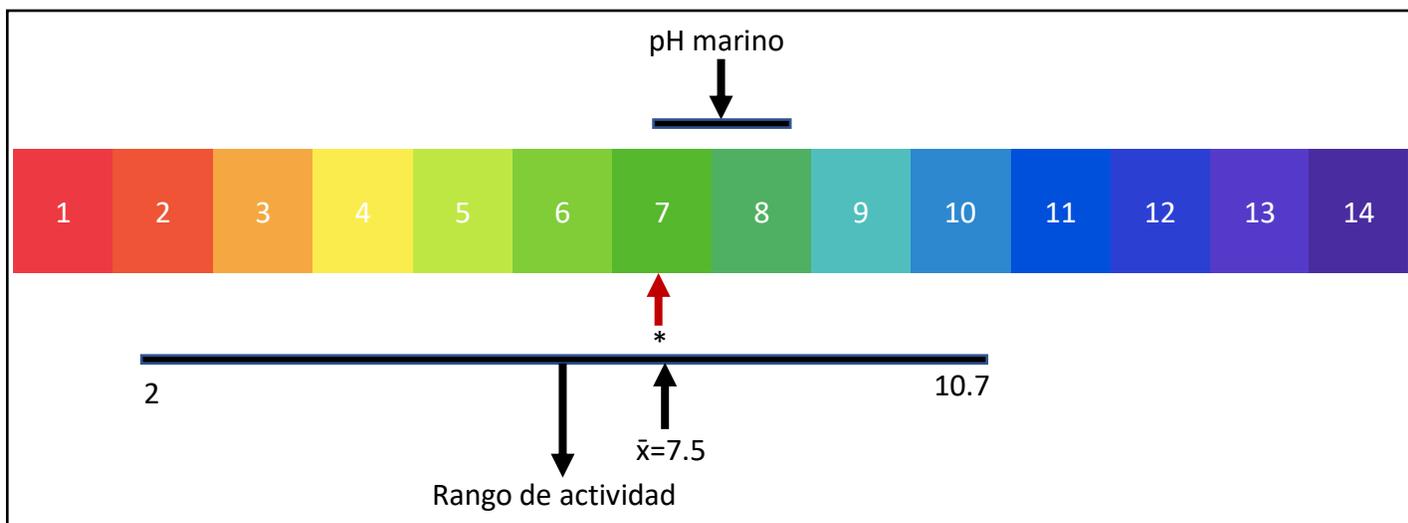


Figura 51. Esquematación de los datos de pH óptimo para la enzima 2,3 ED reportadas presentando un promedio de 7.5 y un rango de actividad entre 2 y 10.7. Se denota el pH marino entre 7 y 8. En la flecha roja se indica el pH óptimo encontrado en este ensayo (7.4).

En nuestra caracterización se obtuvo un pH óptimo 7.4 (Figura 51), lo que la ubica dentro de los valores promedio de estas enzimas y además concuerda con el pH promedio del ambiente marino. Las enzimas reportadas presentan actividad enzimática entre pH 2 y 10.7, mientras que en esta enzima fue posible detectar la actividad entre pH 4 y 9 presentando un comportamiento muy similar a las enzimas reportadas. Los cambios en el pH muy ácidos y básicos podrían ser un factor determinante en su actividad.

Otro de los factores importantes en la actividad enzimática de estas proteínas en diferentes condiciones de pH es la prevalencia de los sitios conservados, pues pueden producir cambios estructurales. Viggiani *et al.*, 2004 sugiere que sustituciones de aminoácidos en los sitios altamente conservados (Tyr255, His246 y His 199) que están involucrados en la catálisis del sustrato, derivan en cambios en la actividad catalítica.

Con el fin de probar esta hipótesis realizan mutaciones puntuales en H246N, H246A, H199N y Y255F, observando actividad fuertemente reducida. Las mutaciones en los sitios 199 y 264 mostraron perfiles de pH diferentes a la proteína silvestre sobre catecol en *P. stutzeri* OX1 (Viggiani *et al.*, 2004). Huper-Kocurek y colaboradores reportan cambios en la tolerancia de pH en mutantes R296Q modificando el pH óptimo en 2 unidades (7 a 5).

Por otro lado, las mutaciones puntuales en Ala-229 e His-294 por cisteínas provocan la formación de un enlace disulfuro entre los residuos Cys se han relacionado con la ampliación del rango de temperatura hasta en 10°C (Wei *et al.*, 2010).

La enzima caracterizada en este trabajo conserva los sitios conservados reportados, lo que concuerda con el su comportamiento típico en los pH probados. Se resalta la importancia de la conservación de estos sitios en la proteína y además brindan la posibilidad de posteriores mutaciones en sitios conservados de la proteína para ampliar su rango de actividad no solo en pH, también en temperaturas.

Con los parámetros previamente utilizados en los ensayos y ajustando el pH a 7.4 en tampón de fosfato-potasio se obtuvieron valores de 119.97 ± 11.41 mU (0.11997 ± 0.01141 U). Se realizó la comparación con los valores reportados en la literatura y en la base de datos de BRENDA en la tabla 12 se muestra un breve resumen de actividades específicas en ensayos en condiciones similares a las utilizadas en este trabajo reportados entre 1969 y 2015. Los valores encontrados para esta enzima se encuentran entre los valores medios encontrados.

Usualmente estas enzimas presentan valores de actividad en el rango de mU, sin embargo algunos autores como Nakai y colaboradores, 1983 reportaron hasta 320 U, que corresponde a 320,000 mU, lo que representa un valor muy alto a comparación de los reportes típicos.

Tabla 12. Rangos de actividades específicas reportadas para enzimas 2,3 ED en diferentes géneros bacterianos, los valores mostrados corresponden a la actividad observada empleando como sustrato el catecol.

Organismo	Rango de actividad (mU)	Rango de actividad (U)	Referencia
<i>Planococcus</i> sp. S5	5.72-43.6	0.00572-0.04360	Hupert-Kocurek <i>et al.</i> , 2012-2015
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	16.29-370	0.01629-0.370	Wojcieszynks <i>et al.</i> ,2011; Guzik <i>et al.</i> ,2009

<i>Arthrobacter citreus</i> (Sacks., 1954)	54	0.0054	Karigar <i>et al.</i> , 2006
<i>Pseudomonas sp.</i>	138 -300,000	0.138-300	Cao <i>et al.</i> ,2008; Wei <i>et al.</i> ,2010; Feist <i>et al.</i> ,1969; Iwaki <i>et al.</i> ,1982; Huang <i>et al.</i> ,2010; Kataeva <i>et al.</i> ,1990; Arenghi <i>et al.</i> ,2001; Takeo <i>et al.</i> ,2007
<i>P. putida</i>	90,000		
<i>P. aeruginosa</i>	1 -802,000	0.001-802	
<i>P. stutzeri</i>	8 – 1,870,000	0.008-1870	

Otra de las características importantes que afectan la actividad enzimática es la temperatura, de manera general las enzimas catalizan la ruptura del sustrato a mayor velocidad en altas temperaturas. Sin embargo en temperaturas muy altas las enzimas tienden a perder estabilidad y se pueden desnaturalizar debilitando los enlaces inherentes a las proteínas, el calentamiento adicional interrumpe los enlaces de hidrógeno dentro de las proteínas y se establecen nuevos enlaces de hidrógeno con el entorno, la temperatura óptima de actividad de las enzimas podría estar relacionada con la temperatura del ambiente en el que se aislaron los microorganismos de donde se obtuvieron (Sinha *et al.*, 2014; Atlas *et al.*, 1998; Olukunle *et al.*, 2015).

En el ambiente marino la temperatura tiende a disminuir al incrementar la profundidad, Turner y colaboradores en el 2001 reportaron un histórico de temperaturas en el GoM entre 1985 al 2015 a diferentes profundidades las cuales se muestran en la tabla 13.

Tabla 13. Histórico de temperaturas en el Golfo de México 1985-2015.

Profundidad (metros)	Temperatura promedio °C
0-10	28.8
10-20	27.2
20-30	25.2
30-40	22.9
40-63	20.1

La mayoría de las enzimas 2,3 ED caracterizadas provienen del suelo (Tabla 14), en donde la temperatura óptima usualmente es superior a 30 °C.

Tabla 14. Temperaturas óptimas reportadas provenientes de diversos ambientes, los valores mostrados corresponden a la actividad observada empleando como sustrato el catecol.

Ambiente	Organismo	Rango de actividad	Temperatura óptima	Referencia
SCP	<i>Pseudomonas putida</i>	25-50 °C	50 °C	Huang <i>et al.</i> , 2010
SCP	Consortio	20-80 °C	40 °C	Guo <i>et al.</i> , 2015
SSCP	Consortio	0-90 °C	60 °C	Guo <i>et al.</i> , 2016
SCP	<i>Pseudomonas</i> sp	30-60 °C	40 y 50 °C	Wei <i>et al.</i> , 2010
LAAR	<i>Planococcus</i> sp.	10-45 °C	35 °C	Hupert-Kocurek <i>et al.</i> , 2014
LAAR	<i>Planococcus</i> sp.	20-90 °C	60 °C	Hupert-Kocurek <i>et al.</i> , 2012
LAAR	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	15-50 °C	35 °C	Wojcieszynska <i>et al.</i> , 2011
LAAR	<i>Planococcus</i> sp.	10-45 °C	35 °C	Hupert-Kocurek <i>et al.</i> , 2013
SCP	<i>Pseudomonas</i> sp	30-70 °C	40 °C	Wei <i>et al.</i> , 2010
SCP	<i>Bacillus</i> y <i>Pseudomonas</i>	30-70 °C	30 y 50 °C	Olunkunle <i>et al.</i> , 2015

SCP= Suelo contaminado con petróleo

SSCP= Suelo salino contaminado con petróleo

LAAR= Lodo activado de planta de tratamiento de aguas residuales.

Los ensayos de enzimas 2,3 ED provenientes de ambientes acuáticos son menos comunes: Sindhu y colaboradores en el 2019 identificaron una enzima 2,3 ED en muestras de lodos y agua dulce de río reportando actividades superiores al 50 % entre 0 y 75 °C, mientras que en entornos marinos las temperaturas reportadas como óptimas para esta actividad enzimática son inferiores.

En los estudios realizados con enzimas obtenidas de microorganismos del ambiente marino, los autores no suelen reportar la profundidad en la que se identifica el organismo con actividad, de manera general las temperaturas

reportadas se encuentran muy cercanas a los 25 °C (Reineke et al., 1984; Cerdan et al., 1995). Aun así, es importante señalar que en los reportes no se hace la caracterización completa de los rangos de temperatura en los ensayos y en muchos casos se limitan solo a detectar la presencia de la enzima mediante la amplificación de la secuencia codificante (Mesarch *et al.*, 2000; Kasuga et al., 2007; He et al., 2016).

En la mayoría de los ensayos de actividad 2,3 ED se emplea una temperatura estandar de 25 °C, sin tomar en cuenta las condiciones del sitio de aislamiento del organismo con la actividad, lo que puede sesgar la información de la temperatura promedio en que funcionan estas enzimas, un ejemplo de esto es el trabajo realizado por Jõesaar y colaboradores en el 2017 analizan un aislado proveniente de una muestra de agua del mar Báltico extraída de la zona sur del Golfo de Finlandia en donde la temperatura media anual promedio es de -17.77 °C, sin embargo no hacen la caracterización completa de la actividad enzimática en diferentes temperaturas, el ensayo se realizó a 25 °C, enfocándose en la generación de intermediarios de la degradación de moléculas más complejas.

Hasta el momento no hay más reportes de esta actividad enzimática en columna de agua en el GoM, la enzima 2,3 ED proveniente de *P. stutzeri* D18 tiene un amplio rango de actividad en las diferentes condiciones de temperatura analizadas, encontrando hasta 50 % de actividad entre los rangos 10-55 °C, mientras que la temperatura óptima fue 15 °C lo cual contrasta con las enzimas caracterizadas de suelos y es similar a los reportes de enzimas marinas (25 °C), sin embargo la temperatura óptima encontrada se asemeja más a las condiciones de donde se obtuvo el aislado *P. stutzeri* D18 que correspondiente a una muestra de columna de agua a una profundidad de 55 metros en donde usualmente la temperatura se reporta en valores cercanos a los 20.1 °C.

De manera general la interacción de un alto contenido de sal con las proteínas no halófitas tiene diferentes implicaciones como: alteración en la estructura del agua local alrededor de la proteína; afectaciones a la solubilidad de la proteína debido a la disminución de los enlaces de hidrógeno intermoleculares, la unión, la estabilidad y la cristalización de las proteínas, pues hay un aumento de la tensión superficial del agua provocando la

eliminación de la capa de agua esencial de la superficie de la proteína y aumento de las interacciones hidrofóbicas, lo que provoca la agregación y precipitación de las proteínas, es decir, la estructura de las proteínas no halófitas y sus funciones se ven afectadas negativamente por las altas concentraciones de sal (Sinha *et al.*, 2014). El crecimiento de *Pseudomonas stutzeri* en diferentes concentraciones de sal no tiene un estudio extenso, sin embargo algunos autores sugieren que la capacidad de estas bacterias para producir biopelículas les podría ayudar a tolerar concentraciones altas de sal (NaCl) (Lami *et al.*, 2020).

Generalmente no se realizan experimentos para examinar la actividad enzimática 2,3 ED en condiciones salinas. En el trabajo realizado por Guo y colaboradores en el 2005 en el que se caracteriza la enzima proveniente de consorcios de suelo salino contaminado con petróleo, la enzima mostró una actividad estable entre 0 y 30 % de NaCl, teniendo mejor actividad sin la adición de NaCl por lo que se catalogó como halotolerante, a diferencia de las enzimas halófilas que comúnmente que se inactivan a una concentración de NaCl inferior a 2 M, seguía activa sin NaCl. La enzima 2,3 ED caracterizada en este estudio exhibe características similares presentando la mejor actividad sin la adición de NaCl, sin embargo se observó una disminución del 25% en la cantidad más baja probada (100 mM).

La actividad enzimática en altas concentraciones de salinidad también ha sido reportada. Sindhu y colaboradores en el 2019 en muestras provenientes de una librería metagenómica elaborada a partir de ADN aislado de muestras de lodos y agua de río encontraron una catecol 2,3 ED halotolerante con una actividad óptima a 1.5 M y conservando 80% de actividad en 3.5 M, en contraste con el comportamiento observado en nuestra caracterización en donde se conserva el 30 % de actividad en 1.5 M de NaCl y presenta 23 % de actividad en la concentración más alta probada (2M).

En el ambiente marino las concentraciones de salinidad se reportan entre 600 y 700mM. En estas condiciones en tampón de fosfatos con el pH óptimo (7.4) se conserva aproximadamente el 50 % de actividad, con el fin de aproximarnos más a las condiciones presentes en el ambiente marino se realizó el mismo ensayo empleando agua de mar a un pH de 7.31 en donde se observan resultados similares obteniendo un 57 % de actividad.

Los enzimas catalizan reacciones específicas reconociendo sitios específicos en el sustrato sin embargo pueden presentar cierto grado de ‘flexibilidad’ que les permite reconocer sustratos análogos al sustrato blanco. Usualmente en el estudio de las enzimas catalizadoras de la ruptura de las moléculas de catecol se utilizan moléculas con grupos metilo en su estructura como (3MC, 4MC) o sustituidas con cloro como 4 CC.

En los ensayos para determinar la actividad de la enzima por sustratos análogos al catecol, la enzima tuvo mejor actividad catalítica sobre catecol, mientras que en los análogos 3MC y 4MC tiene una actividad inferior al 30 % lo que le confiere cierto grado de inespecificidad pues estas moléculas pueden ser reconocidas en el sitio catalítico aunque de manera baja.

Comparada con las enzimas caracterizadas en estas condiciones se encuentra entre los valores más bajos pues en general estas enzimas presentan un buen reconocimiento a las moléculas de catecol con grupos metilo extras. Mientras que en las moléculas de catecol con grupos cloro extra la actividad catalítica de la enzima 2,3 ED de *P. stutzeri* D18 se encuentra en los valores medios, pues reconoce y escinde hasta un 53.38 % de estas moléculas (Tabla 15).

Tabla 15. Actividad 2,3 ED sobre moléculas análogas en estructura al catecol. Donde se observa una mejor actividad sobre catecol en la mayoría de los casos.

	Catecol	3 Metil catecol	4 Metil catecol	4 Cloro catecol	Referencia
Actividad relativa (%)	100	19	57	46	Takeo <i>et al.</i> ,2007
	100	13.7	14.2	27.2	Hupert-Kocurek <i>et al.</i> , 2012
	100	6.12	101.91	44.88	Hupert-Kocurek <i>et al.</i> , 2012
	100	49.5	87.4	50.8	Guo <i>et al.</i> , 2015
	100	239.2	280.7	226.4	Guo <i>et al.</i> , 2015
	73.4	98	66.5	100	Kobayashi <i>et al.</i> , 1995
	100	8.98	25.14	53.38	Este trabajo

*Se defino como 100% la actividad enzimática sobre catecol.

La enzima 2,3 ED caracterizada en este trabajo representa una amplia caracterización de la actividad catalítica en diferentes condiciones de temperatura, pH, salinidades y sustratos análogos al catecol.

Conclusiones

- Se logró obtener e identificar un aislado con actividad 2,3 extradiol dioxigenasa a partir del consorcio positivo a la actividad, el cual fue identificado molecularmente por 16S ribosomal como parte del género *Pseudomonas* y como *P. stutzeri* por análisis de la secuencia completa del genoma.
- Mediante el análisis bioinformático se identificó el gen putativo *xylE/catE* codificante para la enzima 2,3 ED la cual fue amplificada y clonada.
- Se logró expresar heterológamente y purificar la enzima 2,3 ED hasta en un 38.78% en la fracción soluble.
- Se obtuvo una actividad óptima en pH 7.4 con un rango de actividad entre 5 y 9.
- Se determinó una temperatura óptima de reacción de 15 °C con una actividad superior al 50 % entre 10 y 55 °C.
- Se encontró la mejor actividad sin adición de NaCl y hasta un 50 % de actividad en 30 % de NaCl, conservando hasta un 50 % en agua de mar obtenida en el GoM a un pH de 7.31.
- La especificidad de la enzima por los catecoles con grupos metilo (3MC y 4MC) alcanzó hasta un 30% mientras que la actividad sobre el 4CC resultó ser mayor al 50%.
- Se anotó el genoma de *P. stutzeri* D18 y se analizaron las vías involucradas en la degradación de hidrocarburos aromáticos identificando la vía de degradación de benzoato completa y parciales las de tolueno y xileno.
- La enzima 2,3 ED caracterizada en este trabajo representa una amplia caracterización de la actividad catalítica en diferentes condiciones de temperatura, pH, salinidades y sustratos análogos al catecol.

Perspectivas

- Realizar el crecimiento de la cepa con actividad en presencia de FeIII.
- Realizar la determinación de la actividad enzimática 2,3 ED en los sustratos análogos al catecol en las condiciones óptimas de temperatura definidas.
- Con el fin de realizar una caracterización más amplia de la enzima se propone determinar los parámetros cinéticos K_m y V_{max} .
- Caracterizar la estabilidad de la enzima en los diferentes parámetros analizados.
- Realizar mutaciones puntuales en sitios conservados de la proteína para analizar el efecto que se produce en la actividad catalítica en los diferentes parámetros de temperatura, pH y salinidad.
- La fijación de las enzimas 2,3 ED en matrices sólidas como gel de sílice ha demostrado mejorar la actividad catalítica, por lo que sería interesante realizar la fijación de esta enzima y analizar su actividad.

Referencias

Abas N, Kalair A, Khan, N. Review of fossils fuels and future energy technologies. *Futures*. 2015;69:31-49.

Atlas R.M., Bartha R. *Microbial Ecology: Fundamentals and applications*. Benjamin and Cummings Science Publishing. 1998;4:523–530.

Arengi FLG, Berlanda D, Galli E, Sello G, Barbieri P. Organization and Regulation of *meta* Cleavage Pathway Genes for Toluene and o-Xylene Derivative Degradation in *Pseudomonas stutzeri* OX1. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001;67:3304-3308.

Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formsma K, Gerdes S, Glass EM, Kubal M, Meyer F, Olden GJ, Olson R, Osterman AL, Overbeek RA, McNeil LK, Paarmann D, Paczian T, Parrello B, Pusch GD, Reich C, Stevens R, Vassieva O, Vonstein V, Wilke A, Zagnitko O. The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BioMed Central Genomics*. 2008;9:75.

Liu J, Bacosa HP, Liu Z. Potential environmental factors affecting oil-degrading bacterial populations in deep and surface waters of the Northern Gulf of Mexico. *Frontiers in Microbiology*. 2017;7:1-14.

Bae HS, Lee M, Kim JB, Lee ST. Biodegradation of the mixtures of 4-chlorophenol and phenol by *Comamonas testosteroni* CPW301. *Biodegradation*. 1996;7: 463–469.

Barnsley EA. Role and Regulation of the ortho and *meta* Pathways of Catechol Metabolism in *Pseudomonads* Metabolizing Naphthalene and Salicylate. *American Society for Microbiology*. 1976;125:404-408.

Botello AV, Rendón-von O, Gold-Bouchot G, Agráz-Hernández C. Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias. Características, composición y propiedades fisicoquímicas del petróleo. 2005;261- 268.

Boetzer M, Henkel CV, Jansen HJ, Butler D, Pirovano W. Scaffolding pre-assembled contigs using SSPACE. *Bioinformatics*. 2011. 27:(4):578-579.

Bosemer J, Lomsadze A, Borodovsky. GeneMarkS: a self-training method for prediction of gene starts in microbial genomes. Implications for finding sequence motifs in regulatory regions. *Nucleic Acids Research*. 2001. 15:29(12):2607-2618.

Bradford, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. 1976;72: 248–254.

Broderick JB. Catechol dioxygenases. *Essays in Biochemistry*. 1999:34;173-189.

Carrió MM, Corchero JL, Villaverde A. Dynamics of in vivo protein aggregation: building inclusion bodies in recombinant bacteria. *FEMS Microbiol*. 1998:169;9-15.

Cao B, Geng A, Kai-Chee L. Induction of ortho- and *meta*-cleavage pathways in *Pseudomonas* in biodegradation of high benzoate concentration: MS identification of catabolic enzymes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2008:81;99-107.

Chen J, Acton TB, Basu SK, Montelione GT, Inouye M. Enhancement of the Solubility of Proteins Overexpressed in *Escherichia coli* by Heat Shock. *Journal of molecular microbiology biotechnology*. 2002:4;519-524.

Cho HJ, Kim K, Sohn SY, Cho HY, Kim KJ, Kim MH, Kim D, Kim E, Kang BS. Substrate Binding Mechanism of a Type I Extradiol Dioxygenase. *The Journal of Biological Chemistry*. 2010:(285):45;34643-34652.

Cunha, C.D.; Leite, S.G.F. Gasoline biodegradation in different soil microsoms. *Braz. J. Microbiol*. 2000:31; 45-49.

Dawson RMC, Elliot DC, Jones KM. *Data for Biochemical Research*. Oxford at the Clarendon Press. 1969.

Dean-Ross, D.; Moody, J.; Cerniglia, C.E. Utilization of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria isolated from contaminated sediment. *FEMS Microbiol. Ecol*. 2002;41, 1-7.

Díaz E. Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. *International Microbiology*. 2004;7:173–180.

Dubinsky EA, Conrad ME, Chakraborty R, Bill M, Borglin SE, Hollibaugh JT, Olivia Mason U, Piceno YM, Reid FC, Stringfellow WT, Tom LM, Hazen TC, Andersen GL. Succession of Hydrocarbon-Degrading Bacteria in the Aftermath of the Deepwater Horizon Oil Spill in the Gulf of Mexico. *Environmental Science & Technology*. 2013;4,19:10860-10867.

Eriksson M, Swartling A, Dalhammar G. Biological degradation of diesel fuel in water and soil monitored with solid phase micro-extraction and GC-MS. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1998;50:129-134.

Espina S, Vanegas C. Ecotoxicología y contaminación. Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias. Instituto Nacional de Ecología. 2005;2:79-120.

Feist C F, Hegeman GD. Phenol and Benzoate Metabolism by *Pseudomonas putida*: Regulation of Tangential Pathways. *Journal of Bacteriology*. 1969;2:869-877

Fuchs G, Boll M, Heider J. Microbial degradation of aromatic compounds- From one strategy to four. *Nature Reviews Microbiology*. 2011;9:11:803-816.

Gibson DT, Parales RE. Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*. 2000;11;236–243.

Gibson DT, Subramanian V. Microbial Degradation of aromatic hydrocarbons. Marcel Dekker New York Hartmans. 1984:361-369.

Gibson J, Harwood CS. Metabolic Diversity in Aromatic Compound Utilization by Anaerobic Microbes. *Annual Review of Microbiology*. 2002;56:345–69.

Godoy-Lozano EE, Escobar-Zepeda A, Raggi L, Merino E, Gutierrez-Rios RM, Juarez K, Segovia L, Licea-Navarro AF, Gracia A, Sanchez-Flores A, Pardo-Lopez L. Bacterial Diversity and the Geochemical Landscape in the Southwestern Gulf of Mexico. *Frontiers in Microbiology*. 2018; 9: 2528.

Ghosal D, Ghosh S, Dutta TK, Ahn Y. Current State of Knowledge in Microbial Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A Review. *Frontiers in Microbiology*. 2016;7:1369.

Guerrero HJ. Atención de derrames de petróleo crudo en el Golfo de México. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 2014.

Guzik U, Gren I, Wojcieszynks D, Labuzek S. Isolation and Characterization of a Novel Strain of *Stenotrophomonas Maltophilia* Possessing Various Dioxygenases for Monocyclic Hydrocarbon Degradation. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2009;40:285-291.

Hallier-Soulier S, Ducrocq V, Mazure N, Truffaut. Detection and quantification of degradative genes in soils contaminated by toluene. *FEMS Microbiology Ecology*. 1996;20;2:121-133.

Harayama S, Reikik M. Bacterial Aromatic Ring-cleavage Enzymes Are Classified into Two Different Gene Families. *The journal of biological chemistry*. 1989;264;26:15328-15333.

He P, Li L, Liu J, Bai Y, Fang X. Diversity and distribution of catechol 2, 3-dioxygenase genes in surface sediments of the Bohai Sea. *Environmental Microbiology*. 2016;363;10.

Head I.M, Swannell R.P.J. Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in marine habitats. *Current Opinion in Biotechnology*. 1999;10;234–239.

Head IM, Jones DM, Röling FMW. Marine microorganisms make a meal of oil. *Nature Reviews. Microbiology*. 2006;4;3:173-182.

Huang S, Hsu Y, Wu C, Lynn JW, Li W. Thermal Effects on the Activity and Structural Conformation of Catechol 2,3-Dioxygenase from *Pseudomonas putida* SH1. *The Journal of Physical Chemistry*. 2010:114;2.

Hunt M, Kikuchi T, Sanders M, Newbold C, Berriman M, D Otto T. REAPR: a universal tool for genome assembly evaluation. *Genome Biology*. 2013. 14.

Hupert-Kocurek K, Guzik U, Wojcieszńska D. Characterization of catechol 2,3-dioxygenase from *Planococcus* sp. strain S5 induced by high phenol concentration. *Acta Biochimica Polonica*. 2012:59; 345–351.

Hupert-Kocurek K, Saczynska A, Piotrowska-Seget Z. Cadmium increases catechol 2,3-dioxygenase activity in *Variovorax* sp. 12S, a metal-tolerant and phenol- degrading strain. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2013:104:845-853.

Hupert-Kocurek K, Wojcieszylska D, Guzik U, Borowski T. A single amino acid substitution within catalytically non-active N-terminal domain of catechol 2,3-dioxygenase (C23O) increases enzyme activity towards 4-chlorocatechol. 2015:122;64-71.

Ibarra IR, La explotación petrolera en mexicana frente a la conservación de la biodiversidad en el régimen jurídico internacional. *instituto de investigaciones jurídicas*. 2003:1.

Iwaki H, Yamamoto T, Hasegawa Y. Isolation of marine xylene-utilizing bacteria and characterization of *Halioxenophilus aromaticivorans* and its xylene degradation gene cluster. *FEMS Microbiology Letters*. 2018:7;1-8.

Jõesaar M, Viggor S, Heinaru E, Naanuri E, Mehike M, Leito I, Helnaru A. Strategy of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* C70 for effective degradation of phenol and salicylate. *PLoS ONE*. 2017:12;3.

Kanehisa M, Goto S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research*. 2000:28;27-30.

Kanehisa M, Sato Y, Morishima. BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG Tools for Functional Characterization of Genome and Metagenome Sequences. *Journal of Molecular Biology*. 2016:428;726–731.

Karigar C, Mahesh A, Nagenahalli M, Jin D. Phenol degradation by immobilized cells of *Arthrobacter citreus*. *Biodegradation*. 2006:47–55.

Kasuga I, Nakajima F, Furumai H. Diversity of catechol 2,3-dioxygenase genes of bacteria responding to dissolved organic matter derived from different sources in a eutrophic lake. *FEMS Microbiology Ecology*. 2007:61;449-458.

Kataeva IA, Golovleva LA. Catechol 2,3-dioxygenases From *Pseudomonas Aeruginosa* 2x. *Methods in Enzymology*. 1990:188;115-21.

Kazunga C, Aitken, M.D. Products from the incomplete metabolism of pyrene by polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000:66;1917-1922.

Kessler B, Marqués S, Kohler T, Ramos JL, Timmis KN, Lorenzo V. Cross Talk between Catabolic Pathways in *Pseudomonas putida*: XylS - Dependent and -Independent Activation of the TOL *meta* Operon Requires the Same cis-Acting Sequences within the Pm Promoter. *American Society for Microbiology*. 1994:176;5578-5582.

Kita A, Kita Shin-ichi, Fujisawa I, Inaka K, Ishida T, Horiike K, Nozaki M, Miki K. Background: An archetypical extradiol-cleaving catecholic dioxygenase: the crystal structure of catechol 2,3-dioxygenase (metapyrocatechase) from *Pseudomonas putida* mt-2. *Elsevier Science Ltd*. 1999:7;25-34.

Kothari V, Panchal M, Srivastana. *Microbial Degradation of Hydrocarbons*. *Environmental Science*. 2014.

Lalucat J, Bannasar A, Bosch R, García-Valdés E, Palleroni NJ. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2006:70, 510-547

Lami MJ, Caram-Di Santo MC, Zenoff AM, Cristóbal RR, Espinosa-Urgel M, Vincent PA. *Pseudomonas stutzeri* MJL19, a rhizosphere-colonizing bacterium that promotes plant growth under saline stress. *Journal of Applied Microbiology*. 2020:129:5; 1321-1336.

Lampinen J, Raitio M, Perälä A, Oranen, Reija-Riitta H. Microplate Based Pathlength Correction Method for Photometric DNA Quantification Assay. Thermo Fisher Scientific Inc. 2012.

Lane D, Stackebrandt E, Goodfellow M, Wiley J. 16S/23S rRNA sequencing. In: Nucleic acid techniques in bacterial systematics. 1991:115-175.

Leatham G, Crawford RL, Kentkirk T. Degradation of Phenolic Compounds and Ring Cleavage of Catechol by *Phanerochaete chrysosporium*. Applied and Environmental Microbiology. 1983:46,191-197.

Lee K, Boufadel M, Chen B, Foght J, Hodson P, Swanson S, Venosa A. Expert Panel Report on the Behaviour and Environmental Impacts of Crude Oil Released into Aqueous Environments. Royal Society of Canada, Ottawa. 2015.

MacDonald IR, Guinasso NL, Ackleson SG, Amos JF, Duckworth R, Sassen R, Brooks JM. Natural Oil Slicks in the Gulf of Mexico Visible from Space. Journal of geophysical research. 1993:98;16,351-16,364.

MacDonald IR, Garcia-Pineda O, Beet A, Daneshgar SA, Feng L, Graettinger G, French- McCay D, Holmes J, Hu C, Huffer BF, Leifer I, Muller-Karger F, Solow F, Silva M, Swayze G. Natural and unnatural oil slicks in the Gulf of Mexico. Journal of geophysical research. 2015:120;8364–8380.

Mackay D, Callcott D. Partitioning and Physical Chemical Properties of PAHs. Environmental and Resource Studies. The Handbook of Environmental Chemistry Vol. 3 Part I PAHs and Related Compounds (ed. by A. H. Neilson). 1998. 325-345.

Maggio G, Cacciola G. When will oil, natural gas, and coal peak?. Fuel. 2012:98:111–123.

Marston CP, Pereira C, Ferguson J, Fischer K, Hedstrom O, Dashwood WM, Bair MW. 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. 2001:7;1077-1086.

Mesrch M, Nakatsu CH, Nies L. Development of Catechol 2,3-Dioxygenase-Specific Primers for Monitoring Bioremediation by Competitive Quantitative PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000;66;2:678-683.

Michel, J. Interim Preassessment Report, M/V New Carissa Oil Spill, Coos Bay and Waldport, Oregon. Silver Spring, Maryland: Damage Assessment Center, National Oceanic and Atmospheric Administration. 2000:84.

Millán-López KS, Evaluación De La Actividad 2,3 Extradiol Dioxigenasa En Metagenotecas, Aislados Y Consorcios Bacterianos Hidrocarbonoclastas Provenientes Del Golfo De México. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Del Estado De Morelos. 2018.

Nadalin F, Vezzi F, Policriti. GapFiller: a de novo assembly approach to fill the gap within paired reads. *BMC Bioinformatics*. 2012.13.

Nakai C, Hori K, Kagamiyama H, Nakazawa T, Nozaki M. Purification, subunit structure, and partial amino acid sequence of metapyrocatechase. *Journal of Biological Chemistry*. 1983;258;2916-22.

National Research Council (US) Committee on Oil in the Sea: Inputs, Fates, and Effects. *Oil in the Sea III: Inputs, Fates, and Effects*. Washington (DC): National Academies Press (US); 2003. 3, Input of Oil to the Sea. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK220687/>.

Okpokwasili GC, Nweke CO, Microbial growth and substrate utilization kinetics. *Academic Journals*. 2005;4;305-317.

Olukunle OF, Babajide O, Boboye B. Effects of temperature and pH on the Activities of Catechol 2,3- dioxygenase Obtained from Crude Oil Contaminated Soil in Ilaje, Ondo State, Nigeria. *The Open Microbiology Journal*. 2015;9;84-90.

Otto TD, Sanders M, Berriman M, Newbold C. Iterative Correction of Reference Nucleotides (iCORN) using second generation sequencing technology. *Bioinformatics*. 2010. 26(14):1704-7.

Parks HD, Imelfort M, Skennerton CT, Hugenholtz P, Tyson GW. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Research*. 2015;25:1043-1055.

Pearse AGE. *Histochemistry theoretical and applied*. Vol 2, 3rd ed. London, Churchill. 1980.

Perera F, Pollution from Fossil-Fuel Combustion is the Leading Environmental Threat to Global Pediatric Health and Equity: Solutions Exist. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2018:15.

Pérez-Pantoja D, Kim J, Silva-Rocha R, Lorenzo V. The differential response of the Pben promoter of *Pseudomonas putida* mt-2 to BenR and XylS prevents metabolic conflicts in m-xylene biodegradation. *Environmental Microbiology*. 2015;17;64–75.

Piola AR, *Atlas de Sensibilidad Ambiental de la Costa y el Mar Argentino*. Boletín hidrometeorológico. 2013.

Ponce-Vélez G, Botello AV. Niveles de hidrocarburos en el Golfo de México. In: A. V. Botello, J. Rendón-von Osten, G. Gold-Bouchot y C. Agraz-Hernández (Eds.). *Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias*, 2da Edición. Univ. Autón. de Campeche, Univ. Nal. Autón. de México, Instituto Nacional de Ecología. 2005:269-298.

Reed M, Ekrol N, Rye H, Turner L. Oil Spill Contingency and Response (OSCAR) Analysis in Support of Environmental Impact Assessment Offshore Namibia. *Spill Science & Technology Bulletin*. 1999;5:29-38.

Reineke W, Knackmuss H. Microbial Metabolism of Haloaromatics: Isolation and Properties of a Chlorobenzene-Degrading bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*. 1984;47;2:395-402.

Sala-Trepapat JM, Evans WC. The *meta* Cleavage of Catechol by *Azotovacter* Species. 4-Oxalocrotonate Pathway. European Journal of Biochemistry. 1971;20:400-413.

Sarlat LI. La explotación petrolera mexicana frente a la conservación de la biodiversidad en el régimen jurídico internacional. Instituto de investigaciones jurídicas. 2003:1.

Sinha R, Khare SK. Protective role of salt in catalysis and maintaining structure of halophilic proteins against denaturation. Frontiers in microbiology. 2014;5:165.

Shir-Ly H, Yuan-Chang H, Chun-Ming W, Jeffrey WL, Wen-Hsien L. Thermal Effects on the Activity and Structural Conformation of Catechol 2,3-Dioxygenase from *Pseudomonas putida* SH1. J. The Journal of Physical Chemistry. 2010;114:987–992.

Siguemoto ES, Gut JAW. Validation of spectrophotometric microplate methods for polyphenol oxidase and peroxidase activities analysis in fruits and vegetables. Food science and technology. 2017;37:148-153.

Sidhu C, Solanki V, Kumar PA, Gopal KT. Structure Elucidation and Biochemical Characterization of Environmentally Relevant Novel Extradiol Dioxygenases Discovered by a Functional Metagenomics Approach. Applied and Environmental Science. 2019;4:16-19.

Simpson JT, Wong K, Jackman SD, Schein JE, Jones SJM, Birol I. ABySS: a parallel assembler for short read sequence data. Genome Research. 2009. 19(6):1117-23.

Smith MR. The biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria. Biodegradation. 1990;1:191-206.

Soto LA, Sánchez-García S, López-Veneroni D. Environments influenced by natural sites of gas and fossil hydrocarbon seeps in the SW Gulf of Mexico. Universidad y Ciencia. 2004:51-58.

Struhsaker JW, Maxwell BE, Echeverria T. Effects of benzene (A water-soluble component of crude oil) On eggs and larvae of pacific herring and northern anchovy. *Pollution and Physiology of marine organisms*. 1974:253-284.

Suenaga H, Mizuta S, Miyazaki K, Yaoi K. Diversity of extradiol dioxygenase in aromatic-degrading microbial community explored using both culture-dependent and culture-independent approaches. *FEMS Microbiology Ecology*. 2014;90;2:367-379.

Takeo M, Nishimura M, Shirai M, Takahashi H, Negoro S. Purification and Characterization of Catechol 2,3-Dioxygenase from the Aniline Degradation Pathway of *Acinetobacter* sp. YAA and Its Mutant Enzyme, Which Resists Substrate Inhibition. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2007;71;1668-1675.

Truong DT, Franzosa EA, Tickle TL, Scholz M, Weingart G, Pasolli E, Tett A, Huttenhower C, Segata N. MetaPhlan2 for enhanced metagenomic taxonomic profiling. *Nature Methods*. 2015. 12(10):902-3

Turner RE, Rabalais NN, Dubravko J. Trends in summer bottom-water temperatures on the northern Gulf of Mexico continental shelf from 1985 to 2015. *PLoS ONE*. 2017: 12(9).

Turner S, Pryer, KM, Miao VPW, Palmer JD. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 1999;46;327-338.

Van Der Meer JR, de Vos WM, Harayama S, Zehnder AJ. Molecular Mechanisms of Genetic Adaptation to Xenobiotic Compounds. *American Society for Microbiology*. 1992:677-694.

Viggiani A, Siani L, Notomista E, Birolo L, Pucci P, Donato AD. The Role of the Conserved Residues His-246, His-199, and Tyr-255 in the Catalysis of Catechol 2,3-Dioxygenase from *Pseudomonas stutzeri* OX1. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc*. 2004:279;48630-48639.

Wang Z, Wu M. A phylum-level bacterial phylogenetic marker database. *Molecular Biology and Evolution*. 2013. 30(6):1258-62.

Wei J, Zhou Y, Xu T, Lu B. Rational Design of Catechol-2, 3-dioxygenase for Improving the Enzyme Characteristics. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2010:116-126.

Wojcieszynska D, Hupert-Kocurek K, Gren I, Guzik U. High activity catechol 2,3-dioxygenase from the cresols e Degrading *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2011:65;853-858.

Wood DE, Salzberg S. Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome Biology*. 2014.15.

Zerbino DR, Birney E. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Research*. 2008. 18(5):821-9.

Zeyauallah M, Ahmad R, Naseem A, Islam B, Hasan HM, Abdelkafe AS, Benkhayal FA, Rizvi MA, Ali A. Catechol biodegradation by *Pseudomonas* strain: a critical analysis. 2009:7;2211-222.

Zhu C, Zhang L, Zhao L. Molecular cloning, genetic organization of gene cluster encoding phenol hydroxylase and catechol 2,3-dioxygenase in *Alcaligenes faecalis* IS-46. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2008:24;1687–1695.

Anexo 1. Cálculo de actividad.

Se realizó la corrección de la medición de microplaca-celda (k) siguiendo la ecuación reportada por Lampinen *et al.*, 2012; Siguemoto *et al.*, 2017:

$$k = \frac{Abs\ 975^{C*} - Abs\ 900^{C*}}{Abs\ 975^{M*} - Abs\ 900^{M*}}$$

C^* = cubeta M^* = Microplaca

En donde se tomaron lecturas a 900 nm y a 975 nm de H₂O destilada en la microplaca de luz visible (M) y en la celda de cuarzo (C) por triplicado, en la tabla 16 se muestran los valores obtenidos.

Tabla 16. Valores obtenidos para la corrección microplaca-celda.

	Abs 975nm C	Abs 900nm C	Abs 975nm M	Abs 900nm M
R1	0.23	0.072	0.145	0.051
R2	0.234	0.071	0.146	0.05
R3	0.23	0.075	0.15	0.049
Promedios	0.231333333	0.07266667	0.147	0.05

R= Replica

Sustituyendo los valores en la ecuación:

$$k = \frac{0.2313 - 0.07266}{0.147 - 0.050}$$

Tenemos que el valor de k es 1.6357.

Además se utilizó el coeficiente de extinción molar (ϵ) sobre catecol 375nm reportado por Bae *et al.*, 1996.

$$\epsilon = 33,000\ M^{-1}\ cm^{-1}$$

Se hizo la conversión de unidades de M a uM obteniendo un valor de 0.033uM.

Con las condiciones estandarizadas para los ensayos de las cinéticas se toma la región lineal de los datos para calcular la pendiente (**m**) que será tomada como la velocidad inicial (**Vi**), en la tabla 17 se muestran los datos en donde se restaron los valores de los blancos de sustrato sin proteína. En la gráfica (Figura 49) se muestra el tiempo contra los valores de DO. Se dibuja la ecuación de la recta pendiente-ordenada al origen:

$$y = mx + b$$

En donde **m** es la pendiente y **b** es la intercepción en y. Es importante tener en cuenta que el coeficiente de correlación tiene que tener un valor superior a 0.99.

Tabla 17. Lecturas de absorbancia a 375 nm durante 3 minutos en la cinética de producción de S-2HMC por la enzima 2,3 ED en tampón de fosfatos 50 mM a pH 7.4.

Tiempo (min)	DO 375 nm
0	0.02433333
0.16666667	0.04666667
0.33333333	0.06933333
0.5	0.09233333
0.66666667	0.11266667
0.83333333	0.13433333
1	0.156
1.16666667	0.17566667
1.33333333	0.19166667
1.5	0.209
1.66666667	0.22666667
1.83333333	0.24266667
2	0.25933333
2.16666667	0.276
2.33333333	0.29166667
2.5	0.30766667
2.66666667	0.324

2.83333333	0.33933333
3	0.35233333

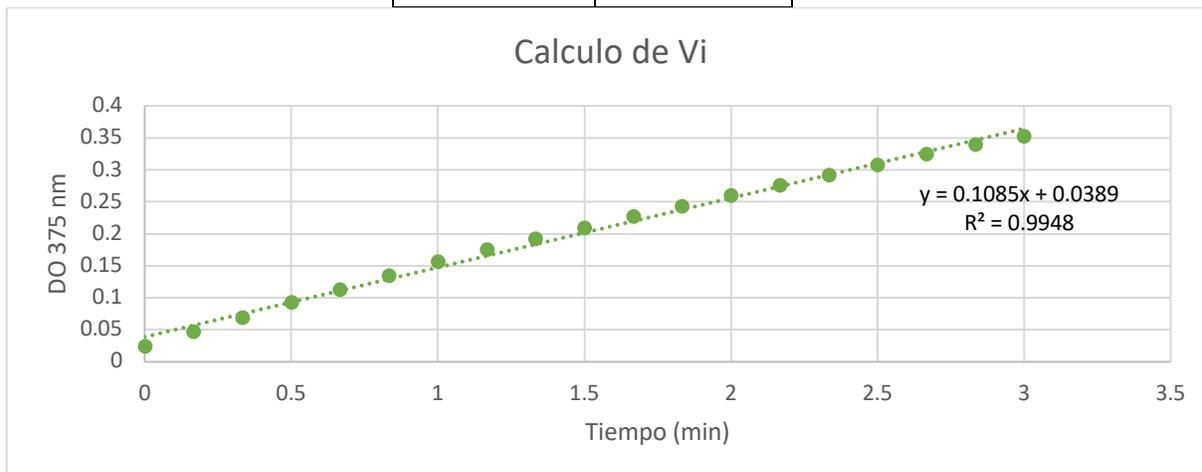


Figura 52. Gráfica de DO contra tiempo se muestra la línea de tendencia y los valores de pendiente y el coeficiente de correlación.

Se calculó el factor de dilución (**FD**) dividiendo la concentración inicial de la proteína entre el stock empleado en el ensayo.

$$FD = \frac{45,368 \text{ ug}}{1000 \text{ ug}}$$

FD= 45.368

Se tomaron en cuenta el volumen de reacción (0.2 ml) y el volumen de enzima (0.01 ml).

En la tabla 18 se muestran los valores calculados

Tabla 18. Resumen de los valores calculados.

Parámetro	Valores
<i>V_i</i>	0.1085
<i>k</i>	1.635738832
ϵ	0.033 uM
Vol. de reacción	0.2 ml
Vol. de enzima	0.01 ml
FD	45.36878563

Concentración de enzima CE (mg)	45.36878563
--	-------------

Para realizar el calcular la actividad volumétrica **Av** el valor obtenido de la **Vi** en la microplaca se multiplicó por el valor **k** y se dividió entre el ϵ se sacó la relación entre el volumen de reacción y de enzima el cual se multiplicó por el **FD** el resultado total se dividió entre 1000 para reportar U/ml.

$$Av = \frac{\frac{(Vi)(k)}{\epsilon} * \left(\frac{Vol. de reaccion}{Vol. de enzima}\right) * (FD)}{1000}$$

La actividad específica **Ae** se calculó dividiendo la **Av** entre la concentración de enzima en mg **CE** y se reporta en U por mg, para reportar mU se multiplicó el valor obtenido por 1000.

$$Ae (mU) = \frac{Av}{CE} * 1000$$

Al sustituir los valores en la ecuación:

$$Av = \frac{\frac{(0.1085)(1.6357)}{0.033 \mu M} * \left(\frac{0.2 ml}{0.01 ml}\right) * (45.3687)}{1000}$$

∴

$$Av = 4.879967309 \text{ U*min}$$

$$Ae (mU) = \frac{4.8799}{45.3687} * 1000$$

$$Ae = 107.559667 \text{ mU*min*mg}$$

Anexo 2. Genomas utilizados para hacer el ANI. Se emplearon los 278 genomas disponibles en NCBI hasta junio del 2019.

P. stutzeri AD18-5S

<i>P. stutzeri</i> UBA3971	<i>P. stutzeri</i> UBA1495	<i>P. stutzeri</i> NCTC11607	<i>P. stutzeri</i> UBA7250
<i>P. stutzeri</i> UBA3984	<i>P. stutzeri</i> UBA1502	<i>P. stutzeri</i> CM14	<i>P. stutzeri</i> UBA7343
<i>P. stutzeri</i> UBA4107	<i>P. stutzeri</i> UBA1642	<i>P. stutzeri</i> AK6	<i>P. stutzeri</i> UBA6631
<i>P. stutzeri</i> UBA4113	<i>P. stutzeri</i> UBA1598	<i>P. stutzeri</i> ATCC 17588	<i>P. stutzeri</i> UBA6635
<i>P. stutzeri</i> UBA4134	<i>P. stutzeri</i> UBA1599	<i>P. stutzeri</i> NCTC10475	<i>P. stutzeri</i> UBA6639
<i>P. stutzeri</i> UBA4160	<i>P. stutzeri</i> UBA1637	<i>P. stutzeri</i> NCTC10450	<i>P. stutzeri</i> UBA6643
<i>P. stutzeri</i> UBA4155	<i>P. stutzeri</i> UBA1646	<i>P. stutzeri</i> PS_001	<i>P. stutzeri</i> UBA6649
<i>P. stutzeri</i> UBA4163	<i>P. stutzeri</i> UBA1648	<i>P. stutzeri</i> KGS-8	<i>P. stutzeri</i> UBA6702
<i>P. stutzeri</i> UBA3453	<i>P. stutzeri</i> UBA1656	<i>P. stutzeri</i> KGS-2	<i>P. stutzeri</i> UBA6752
<i>P. stutzeri</i> UBA3460	<i>P. stutzeri</i> UBA1804	<i>P. stutzeri</i> SGAir0442	<i>P. stutzeri</i> UBA6760
<i>P. stutzeri</i> UBA3454	<i>P. stutzeri</i> UBA1810	<i>P. stutzeri</i> PS_050	<i>P. stutzeri</i> UBA6822
<i>P. stutzeri</i> UBA3517	<i>P. stutzeri</i> UBA1807	<i>P. stutzeri</i> PS_066	<i>P. stutzeri</i> UBA6892
<i>P. stutzeri</i> UBA3552	<i>P. stutzeri</i> UBA1168	<i>P. stutzeri</i> PS_087	<i>P. stutzeri</i> UBA6896
<i>P. stutzeri</i> UBA3589	<i>P. stutzeri</i> UBA1171	<i>P. stutzeri</i> PS_133	<i>P. stutzeri</i> UBA6826
<i>P. stutzeri</i> UBA3044	<i>P. stutzeri</i> UBA1169	<i>P. stutzeri</i> PS_075	<i>P. stutzeri</i> UBA6275
<i>P. stutzeri</i> UBA3094	<i>P. stutzeri</i> UBA1286	<i>P. stutzeri</i> PS_234	<i>P. stutzeri</i> UBA6287
<i>P. stutzeri</i> UBA3114	<i>P. stutzeri</i> UBA1292	<i>P. stutzeri</i> PS_131	<i>P. stutzeri</i> UBA6279
<i>P. stutzeri</i> UBA3137	<i>P. stutzeri</i> UBA1300	<i>P. stutzeri</i> PS_110	<i>P. stutzeri</i> UBA6312
<i>P. stutzeri</i> UBA3140	<i>P. stutzeri</i> UBA1355	<i>P. stutzeri</i> PS_027	<i>P. stutzeri</i> UBA6301
<i>P. stutzeri</i> UBA3146	<i>P. stutzeri</i> UBA1356	<i>P. stutzeri</i> PS_072	<i>P. stutzeri</i> UBA6318
<i>P. stutzeri</i> UBA3230	<i>P. stutzeri</i> UBA808	<i>P. stutzeri</i> PS_125	<i>P. stutzeri</i> UBA6501
<i>P. stutzeri</i> UBA3248	<i>P. stutzeri</i> UBA803	<i>P. stutzeri</i> PS_128	<i>P. stutzeri</i> UBA6548
<i>P. stutzeri</i> UBA3228	<i>P. stutzeri</i> UBA805	<i>P. stutzeri</i> PS_134	<i>P. stutzeri</i> UBA6556
<i>P. stutzeri</i> UBA3235	<i>P. stutzeri</i> UBA821	<i>P. stutzeri</i> PS_130	<i>P. stutzeri</i> UBA6559
<i>P. stutzeri</i> UBA3232	<i>P. stutzeri</i> UBA861	<i>P. stutzeri</i> PS_197	<i>P. stutzeri</i> UBA6599
<i>P. stutzeri</i> UBA3240	<i>P. stutzeri</i> UBA863	<i>P. stutzeri</i> PS_138	<i>P. stutzeri</i> UBA5840
<i>P. stutzeri</i> UBA3244	<i>P. stutzeri</i> UBA872	<i>P. stutzeri</i> PS_151	<i>P. stutzeri</i> UBA5863
<i>P. stutzeri</i> UBA3349	<i>P. stutzeri</i> UBA904	<i>P. stutzeri</i> PS_211	<i>P. stutzeri</i> UBA5865
<i>P. stutzeri</i> UBA2672	<i>P. stutzeri</i> UBA897	<i>P. stutzeri</i> PS_167	<i>P. stutzeri</i> UBA5929
<i>P. stutzeri</i> UBA3423	<i>P. stutzeri</i> UBA915	<i>P. stutzeri</i> PS_377	<i>P. stutzeri</i> UBA5963
<i>P. stutzeri</i> UBA3418	<i>P. stutzeri</i> UBA990	<i>P. stutzeri</i> PS_257	<i>P. stutzeri</i> UBA5981
<i>P. stutzeri</i> UBA2699	<i>P. stutzeri</i> UBA988	<i>P. stutzeri</i> PS_366	<i>P. stutzeri</i> UBA5985
<i>P. stutzeri</i> UBA2703	<i>P. stutzeri</i> KMS 55	<i>P. stutzeri</i> PS_376	<i>P. stutzeri</i> UBA5562
<i>P. stutzeri</i> UBA1884	<i>P. stutzeri</i> 19	<i>P. stutzeri</i> ATCC 17587	<i>P. stutzeri</i> UBA5569
<i>P. stutzeri</i> UBA2949	<i>P. stutzeri</i> LH-42	<i>P. stutzeri</i> NCTC10473	<i>P. stutzeri</i> UBA5597
<i>P. stutzeri</i> UBA3023	<i>P. stutzeri</i> LH-42	<i>P. stutzeri</i> CM	<i>P. stutzeri</i> UBA6125

<i>P. stutzeri</i> UBA3004	<i>P. stutzeri</i> 40D2	<i>P. stutzeri</i> S2_003_000_R2_15	<i>P. stutzeri</i> UBA5649
<i>P. stutzeri</i> UBA2301	<i>P. stutzeri</i> DCP-Ps1	<i>P. stutzeri</i> SGAir0442	<i>P. stutzeri</i> UBA5661
<i>P. stutzeri</i> UBA2314	<i>P. stutzeri</i> AR9-4	<i>P. stutzeri</i> 1W1-1A	<i>P. stutzeri</i> UBA5710
<i>P. stutzeri</i> UBA2326	<i>P. stutzeri</i> 273	<i>P. stutzeri</i> DW2-1	<i>P. stutzeri</i> UBA5711
<i>P. stutzeri</i> UBA2472	<i>P. stutzeri</i> HI00D01	<i>P. stutzeri</i> 24a13	<i>P. stutzeri</i> UBA5719
<i>P. stutzeri</i> UBA2482	<i>P. stutzeri</i> ODKF13	<i>P. stutzeri</i> DSM 50238	<i>P. stutzeri</i> UBA5790
<i>P. stutzeri</i> UBA2490	<i>P. stutzeri</i> T13	<i>P. stutzeri</i> 28a3	<i>P. stutzeri</i> UBA5140
<i>P. stutzeri</i> UBA2499	<i>P. stutzeri</i> SDM-LAC	<i>P. stutzeri</i> ST27MN3	<i>P. stutzeri</i> UBA5029
<i>P. stutzeri</i> UBA2568	<i>P. stutzeri</i> XLDN-R	<i>P. stutzeri</i> DNSP21	<i>P. stutzeri</i> UBA5117
<i>P. stutzeri</i> UBA2605	<i>P. stutzeri</i> NF13	<i>P. stutzeri</i> 24a75	<i>P. stutzeri</i> UBA5137
<i>P. stutzeri</i> UBA2573	<i>P. stutzeri</i> RCH2	<i>P. stutzeri</i> 4C29	<i>P. stutzeri</i> UBA4749
<i>P. stutzeri</i> UBA2580	<i>P. stutzeri</i> KOS6	<i>P. stutzeri</i> DSM 17088	<i>P. stutzeri</i> UBA4758
<i>P. stutzeri</i> UBA2609	<i>P. stutzeri</i> KF716	<i>P. stutzeri</i> CCUG 36651	<i>P. stutzeri</i> UBA3873
<i>P. stutzeri</i> UBA1830	<i>P. stutzeri</i> TS44	<i>P. stutzeri</i> CCUG 44592	<i>P. stutzeri</i> UBA3876
<i>P. stutzeri</i> UBA1862	<i>P. stutzeri</i> C2	<i>P. stutzeri</i> KC	<i>P. stutzeri</i> UBA3879
<i>P. stutzeri</i> UBA1864	<i>P. stutzeri</i> CCUG 16156	<i>P. stutzeri</i> DSM 50227	<i>P. stutzeri</i> UBA3882
<i>P. stutzeri</i> UBA1890	<i>P. stutzeri</i> CCUG 29243	<i>P. stutzeri</i> UBA7897	<i>P. stutzeri</i> UBA3885
<i>P. stutzeri</i> UBA1892	<i>P. stutzeri</i> DSM 10701	<i>P. stutzeri</i> UBA7844	<i>P. stutzeri</i> UBA4391
<i>P. stutzeri</i> UBA1891	<i>P. stutzeri</i> DSM 4166	<i>P. stutzeri</i> UBA7861	<i>P. stutzeri</i> UBA4480
<i>P. stutzeri</i> UBA1893	<i>P. stutzeri</i> 267_PSTU	<i>P. stutzeri</i> UBA7847	<i>P. stutzeri</i> UBA4482
<i>P. stutzeri</i> UBA1896	<i>P. stutzeri</i> 1223_PMEN	<i>P. stutzeri</i> UBA4963	<i>P. stutzeri</i> UBA4529
<i>P. stutzeri</i> UBA1920	<i>P. stutzeri</i> SLG510A3-8	<i>P. stutzeri</i> UBA7613	<i>P. stutzeri</i> UBA4533
<i>P. stutzeri</i> UBA2003	<i>P. stutzeri</i> ST-9	<i>P. stutzeri</i> UBA7617	<i>P. stutzeri</i> UBA4537
<i>P. stutzeri</i> UBA2056	<i>P. stutzeri</i> NT0128	<i>P. stutzeri</i> UBA7627	<i>P. stutzeri</i> UBA4545
<i>P. stutzeri</i> UBA2054	<i>P. stutzeri</i> NT0124	<i>P. stutzeri</i> UBA7633	<i>P. stutzeri</i> UBA4595
<i>P. stutzeri</i> UBA2064	<i>P. stutzeri</i> BAL361	<i>P. stutzeri</i> UBA7652	<i>P. stutzeri</i> UBA4614
<i>P. stutzeri</i> UBA2081	<i>P. stutzeri</i> CGMCC 1.1803	<i>P. stutzeri</i> UBA7711	<i>P. stutzeri</i> UBA4547
<i>P. stutzeri</i> UBA2080	<i>P. stutzeri</i> YC-YH1	<i>P. stutzeri</i> UBA7713	<i>P. stutzeri</i> UBA4556
<i>P. stutzeri</i> UBA2115	<i>P. stutzeri</i> 19SMN4	<i>P. stutzeri</i> UBA7511	<i>P. stutzeri</i> UBA4558
<i>P. stutzeri</i> UBA1453	<i>P. stutzeri</i> 28a24	<i>P. stutzeri</i> UBA7538	<i>P. stutzeri</i> UBA4603
<i>P. stutzeri</i> UBA1452	<i>P. stutzeri</i> KOS6	<i>P. stutzeri</i> UBA7601	<i>P. stutzeri</i> UBA3963
<i>P. stutzeri</i> UBA1455	<i>P. stutzeri</i> MF28	<i>P. stutzeri</i> UBA7458	<i>P. stutzeri</i> A1501
<i>P. stutzeri</i> UBA1468	<i>P. stutzeri</i> B1SMN1	<i>P. stutzeri</i> UBA7516	
<i>P. stutzeri</i> UBA1470	<i>P. stutzeri</i> PheN2	<i>P. stutzeri</i> UBA7241	

Anexo 3. Tabla de referencias taxonómicas.

Organismo	Referencia taxonómica
<i>Acinetobacter</i>	Brisou J, Prévot AR. Études de systématique bactérienne. X. Révision des espèces réunies dans le genre <i>Achromobacter</i> . <i>Annales de l'Institut Pasteur (Paris)</i> 1954; 86:722-728.
<i>Alcaligenes faecalis</i>	Castellani A, Chalmers AJ. Manual of Tropical Medicine, 3rd ed. Williams Wood and Co., New York, 1919.
<i>Alcaligenes eutrophus</i> <i>Cupriavidus necator</i>	Makkar NS, Casida Jr. LE. <i>Cupriavidus necator</i> gen. nov., sp. nov.: a nonobligate bacterial predator of bacteria in soil. <i>Int. J. Syst. Bacteriol.</i> 1987; 37:323-326.
<i>Arthrobacter</i>	Conn HJ, Dimmick I. Soil Bacteria Similar in Morphology to <i>Mycobacterium</i> and <i>Corynebacterium</i> . <i>J Bacteriol</i> 1947; 54:291-303.
<i>Arthrobacter citreus</i>	Sacks LE. Observations on the morphogenesis of <i>Arthrobacter citreus</i> , spec nov. <i>J Bacteriol</i> 1954; 67:342-345.
<i>Azotobacter</i>	Beijerinck MW. Über oligonitrophile Mikroben. <i>Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Abteilung II</i> 1901; 7:561-582.
<i>Bacillus</i>	Cohn F. Untersuchungen über Bakterien. In: Cohn F (eds), Beiträge zur Biologie der Pflanzen 1 (Heft 2), 1872, Max Müller, Breslau, 1875, p. 127-224.
<i>Burkholderia</i>	Yabuuchi E, Kosako Y, Oyaizu H, Yano I, Hotta H, Hashimoto Y, Ezaki T, Arakawa M. Proposal of <i>Burkholderia</i> gen. nov. and transfer of seven species of the genus <i>Pseudomonas</i> homology group II to the new genus, with the type species <i>Burkholderia cepacia</i> (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. <i>Microbiol Immunol</i> 1992; 36:1251-1275
<i>Comamonas</i>	De Vos P, Kersters K, Falsen E, Pot B, Gillis M, Segers P, De Ley J. <i>Comamonas</i> Davis and Park 1962, gen. nov., nom. rev. emend., and <i>Comamonas terrigena</i> Hugh 1962, sp. nov., nom. rev. <i>Int. J. Syst. Bacteriol.</i> 1985; 35:443-453.
<i>Colwellia</i>	Deming JW, Somers LK, Straube WL, Swartz DG, MacDonald MT. Isolation of an obligately barophilic bacterium and description of a new genus, <i>Colwellia</i> gen. nov. <i>Syst. Appl. Microbiol.</i> 1988; 10:152-160.
<i>Dehalogenimonas</i>	Moe WM, Yan J, Nobre MF, da Costa MS, Rainey FA. <i>Dehalogenimonas lykanthroporepellens</i> gen. nov., sp. nov., a reductively dehalogenating bacterium isolated from chlorinated solvent-contaminated groundwater. <i>Int J Syst Evol Microbiol</i> 2009; 59:2692-2697.
<i>Desulfonatronum</i>	Pikuta EV, Zhilina TN, Zavarzin GA, Kostrikina NA, Osipov GA, Rainey FA. <i>Desulfonatronum lacustre</i> gen. nov., sp. nov.: a new alkaliphilic sulfate-reducing bacterium utilizing ethanol. <i>Mikrobiologiya</i> 1998; 67:123-131.
<i>Desulfovibrio</i>	Kluyver AJ, Van Niel CB. Prospects for a natural system of classification of bacteria. <i>Zentralblatt für Bakteriologie,</i>

	<i>Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene, Abteilung II</i> 1936; 94:369-403.
<i>Desulfoviregula</i>	Kaksonen AH, Spring S, Schumann P, Kroppenstedt RM, Puhakka JA. <i>Desulfoviregula thermocuniculi</i> gen. nov., sp. nov., a thermophilic sulfate-reducer isolated from a geothermal underground mine in Japan. <i>Int J Syst Evol Microbiol</i> 2007; 57:98-102.
<i>Geoalkalibacter</i>	Zavarzina DG, Kolganova TV, Bulygina ES, Kostrikina NA, Turova TP, Zavarzin GA. [<i>Geoalkalibacter ferrihydriticus</i> gen. nov., sp. nov., the first alkaliphilic representative of the family <i>Geobacteraceae</i> , isolated from a soda lake]. <i>Mikrobiologiya</i> 2006; 75:775-785.
<i>Geobacter</i>	Lovley DR, Giovannoni SJ, White DC, Champine JE, Phillips EJ, Gorby YA, Goodwin S. <i>Geobacter metallireducens</i> gen. nov. sp. nov., a microorganism capable of coupling the complete oxidation of organic compounds to the reduction of iron and other metals. <i>Arch Microbiol</i> 1993; 159:336-344.
<i>Mycobacterium</i>	Lehmann KB, Neumann R. Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speziellen bakteriologischen Diagnostik, 1st ed. J.F. Lehmann, München, 1896.
<i>Pelobacter</i>	Schink B, Pfennig N. Fermentation of trihydroxybenzenes by <i>Pelobacter acidigallicigen</i> gen. nov. sp. nov., a new strictly anaerobic, non-spore-forming bacterium. <i>Arch. Microbiol.</i> 1982; 133:195-201.
<i>Phycisphaera</i>	Fukunaga Y, Kurahashi M, Sakiyama Y, Ohuchi M, Yokota A, Harayama S. <i>Phycisphaera mikurensis</i> gen. nov., sp. nov., isolated from a marine alga, and proposal of <i>Phycisphaeraceae</i> fam. nov., <i>Phycisphaerales</i> ord. nov. and <i>Phycisphaerae</i> classis nov. in the phylum <i>Planctomycetes</i> . <i>J Gen Appl Microbiol</i> 2009; 55:267-275.
<i>Planococcus</i>	Migula W. Über ein neues System der Bakterien. <i>Arbeiten aus dem Bakteriologischen Institut der Technischen Hochschule zu Karlsruhe</i> 1894; 1:235-238.
<i>Pseudomonas</i>	Migula W. Über ein neues System der Bakterien. <i>Arbeiten aus dem Bakteriologischen Institut der Technischen Hochschule zu Karlsruhe</i> 1894; 1:235-238.
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	Monias BL. Classification of <i>Bacterium alcaligenes pyocyaneum</i> and <i>fluorescens</i> . <i>Journal of Infectious Diseases</i> 1928; 43:330-334.
<i>Pseudomonas balearica</i>	Bennasar A, Rossello-Mora R, Lalucat J, Moore ER. 16S rRNA gene sequence analysis relative to genomovars of <i>Pseudomonas stutzeri</i> and proposal of <i>Pseudomonas balearica</i> sp. nov. <i>Int J Syst Bacteriol</i> 1996; 46:200-205.
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> <i>Pseudomonas oleovorans</i>	Lee M, Chandler AC. A Study of the Nature, Growth and Control of <i>Bacteria</i> in Cutting Compounds. <i>J Bacteriol</i> 1941; 41:373-386.
<i>Pseudomonas mendocina</i>	Palleroni NJ, Doudoroff M, Stanier RY, Solanes RE, Mandel M. Taxonomy of the aerobic pseudomonads: the properties of the <i>Pseudomonas stutzeri</i> group. <i>J Gen Microbiol</i> 1970; 60:215-231.

<i>Pseudomonas putida</i>	Migula W. <i>Schizomycetes (Bacteria, Bacterien)</i> . In: Engler A, Prantl K (eds), Die Natürlichen Pflanzenfamilien Teil I, Abteilung Ia, Wilhelm Engelmann, Leipzig, 1895, p. 1-44.
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Sijderius R. Heterotrophe bacterien, die thiosulfaat oxydeeren. Thesis University Amsterdam. Kluwer, Deventer, 1946.
<i>Pseudomonas xanthomarina</i>	Romanenko LA, Uchino M, Falsen E, Lysenko AM, Zhukova NV, Mikhailov VV. <i>Pseudomonas xanthomarina</i> sp. nov., a novel bacterium isolated from marine ascidian. <i>J Gen Appl Microbiol</i> 2005; 51:65-71.
<i>Ralstonia</i>	Yabuuchi E, Kosako Y, Yano I, Hotta H, Nishiuchi Y. Transfer of two <i>Burkholderia</i> and an <i>Alcaligenes</i> species to <i>Ralstonia</i> gen. Nov.: Proposal of <i>Ralstonia pickettii</i> (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. Nov., <i>Ralstonia solanacearum</i> (Smith 1896) comb. Nov. and <i>Ralstonia eutropha</i> (Davis 1969) comb. Nov. <i>Microbiol Immunol</i> 1995; 39:897-904.
<i>Rhodococcus</i>	Zopf W. Über Ausscheidung von Fettfarbstoffen (Lipochromen) seitens gewisser Spaltpilze. <i>Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft</i> 1891; 9:22-28.
<i>Rhodovibrio</i>	Imhoff JF, Petri R, Suling J. Reclassification of species of the spiral-shaped phototrophic purple non-sulfur bacteria of the alpha- <i>Proteobacteria</i> : description of the new genera <i>Phaeospirillum</i> gen. nov., <i>Rhodovibrio</i> gen. nov., <i>Rhodothalassium</i> gen. nov. and <i>Roseospira</i> gen. nov. as well as transfer of <i>Rhodospirillum fulvum</i> to <i>Phaeospirillum fulvum</i> comb. nov., of <i>Rhodospirillum molischianum</i> to <i>Phaeospirillum molischianum</i> comb. nov., of <i>Rhodospirillum salinarum</i> to <i>Rhodovibrio salexigens</i> . <i>Int J Syst Bacteriol</i> 1998; 48:793-798.
<i>Sphingomonas</i>	Yabuuchi E, Yano I, Oyaizu H, Hashimoto Y, Ezaki T, Yamamoto H. Proposals of <i>Sphingomonas paucimobilis</i> gen. nov. and comb. nov., <i>Sphingomonas parapaucimobilis</i> sp. nov., <i>Sphingomonas yanoikuyae</i> sp. nov., <i>Sphingomonas adhaesiva</i> sp. nov., <i>Sphingomonas capsulata</i> comb. nov., and two genospecies of the genus <i>Sphingomonas</i> . <i>Microbiol Immunol</i> 1990; 34:99-119.
<i>Spongiispira</i>	Kaesler I, Graeber I, Borchert MS, Pape T, Dieckmann R, von Dohren H, Nielsen P, Lurz R, Michaelis W, Szewzyk U. <i>Spongiispira norvegica</i> gen. nov., sp. nov., a marine bacterium isolated from the boreal sponge <i>Isops phlegraei</i> . <i>Int J Syst Evol Microbiol</i> 2008; 58:1815-1820.
<i>Staphylococcus</i>	Rosenbach FJ. <i>Microorganismen bei den Wund-Infektions-Krankheiten des Menschen</i> . J.F. Bergmann, Wiesbaden, 1884.
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Palleroni NJ, Bradbury JF. <i>Stenotrophomonas</i> , a new bacterial genus for <i>Xanthomonas maltophilia</i> (Hugh 1980) Swings <i>et al.</i> 1983. <i>Int J Syst Bacteriol</i> 1993; 43:606-609.
<i>Streptomyces</i>	Waksman SA, Henrici AT. The Nomenclature and Classification of the <i>Actinomycetes</i> . <i>J Bacteriol</i> 1943; 46:337-341.

<i>Thiopfundum</i>	Takai K, Miyazaki M, Hirayama H, Nakagawa S, Querellou J, Godfroy A. Isolation and physiological characterization of two novel, piezophilic, thermophilic chemolithoautotrophs from a deep-sea hydrothermal vent chimney. <i>Environ Microbiol</i> 2009; 11:1983-1997.
--------------------	--

*En rojo se muestran las especies que han sido re clasificadas.

Anexo 4. Manual de reactivos utilizados

Medios de cultivo utilizados:

Medio Luria-Bertani

Reactivos	Volumen (g/L)
NaCl	10
Extracto de levadura	5
Triptona	10
Agar	18

*En medio sólido adicionar agar después de homogeneizar.

Medio Luria-Bertani + fenol

Reactivos	Volumen (g/L)
NaCl	10
Extracto de levadura	5
Triptona	10
Agar	18
Fenol 94.11 g/mol	Calcular según molaridad

En medio sólido adicionar el sustrato justo antes de vaciar, las cajas se deben mantener en oscuridad.

Manipulación de ADN:

Gel de electroforesis

Se realizan los cálculos para la concentración de agarosa (1 %).

Reactivos	Volumen
Agarosa	0.8 gramos
Agua destilada o tampón de fosfatos	Aforar a 80 ml
Intercalante	3 μ l
Tampón de carga	5 μ l
Muestra	15 μ l

Manipulación de proteínas:

Composición de los tampones utilizados en el proceso de purificación de la proteína

Se emplearon tres tampones en el proceso de purificación, compuestos por la misma base y diferente concentración de imidazol ajustando el pH a 8. Se realizaron ajustes con el tampón de elusión para cubrir el rango de 20 hasta 300 mM de imidazol.

Tampón de lisis	
Reactivo	Concentración (mM)
NaH ₂ PO ₄	50
NaCl	300
Imidazol	<u>10</u>
Tampón de lavado	
NaH ₂ PO ₄	50
NaCl	300
Imidazol	<u>20</u>

Tampón de elusión	
NaH ₂ PO ₄	50
NaCl	300
Imidazol	<u>20-300</u>

También se prepararon los tampones de corrida, el tampón de teñir, de desteñir y tampón de carga para las proteínas.

Tampón de corrida 1L	
Reactivo	Volumen
Tris	3 g
Glicina	4 g
SDS	1 g
Agua destilada	Aforar a 1L
Tampón para teñir	
Azul de Coomasie R-250	0.25 g
Metanol-agua 1:1	90 ml
Ácido acético	10 ml
Azul de bromofenol (0.1%)	100 uL
Tampón para desteñir	
Metanol	50 ml
Ácido acético	50 ml
H ₂ O	400 ml
Tampón para carga de proteínas	

Tris-Cl 0.5M pH 6.8	2.5 ml
SDS	0.4 g
Glicerol	2 ml
<i>B</i> -mercaptoetanol	0.4 ml

Cuantificación de proteína

La proteína se cuantificó diluyendo 1:50 y 1:100 empleando las siguientes concentraciones para la curva patrón.

Concentración (mg/ml)	ASB (1mg/ml)	H ₂ O (uL)
0	0 (uL)	40
0.1	4 (uL)	36
0.15	6 (uL)	34
0.2	8 (uL)	32
0.25	10 (uL)	30
0.3	12 (uL)	28
0.4	16 (uL)	24

Material empleado en los ensayos de actividad enzimática:

Tampón de fosfatos empleados de manera general en los ensayos enzimáticos

Se empleó de manera general el tampón de fosfatos ajustado a pH 7.4.

Reactivos (1M)	Volumen
KH ₂ PO ₄	940 uL

K ₂ HPO ₄	4.6 ml
---------------------------------	--------

Aforar a 100 ml con agua destilada y filtrar.

Catecol (sustrato)

Reactivos	Volumen (g/L)
Catecol	110.1 (g/mol)
Agua destilada o tampón de fosfatos	Calcular según molaridad

*En tampones de pH altos o muy bajos presenta rápida oxidación.

**No solubilizar a temperaturas altas.

Composición de los tampones utilizados para los diferentes pH probados

*Todos los tampones fueron filtrados previo a su utilización.

Tampón (0.05M)	pH
Glicina-HCl	1-2
Fosfato-citrato	3-4-5
Fosfato de potasio	6-7-7.4-8
Glicina-NaOH	9-10-11-12

Glicina-HCl (1, 2) (Dawson, *et al.*, 1969).

Combinar 25 ml de glicina 0.2 M y ajustar el pH con HCl finalmente aforar a 100 ml con agua destilada

Fosfato-citrato (3, 4, 5) (Pearse, 1980).

Preparar las siguientes soluciones concentradas:

- Fosfato de sodio dibásico 0,2 M
- Ácido cítrico 0,1 M

Ajustar a cada pH, como guía se empleó la siguiente tabla.

50 ml Tampón fosfato-citrato		
Na ₂ HPO ₄ 0.2 M (ml)	Citrato 0.1 M (ml)	pH
5.4	44.6	2.6
7.8	42.2	2.8
10.2	39.8	3.0
12.3	37.7	3.2
14.1	35.9	3.4
16.1	33.9	3.6
17.7	32.3	3.8
19.3	30.7	4.0
20.6	29.4	4.2
22.2	27.8	4.4
23.3	26.7	4.6
24.8	25.2	4.8
25.7	24.3	5.0
26.7	23.3	5.2
27.8	22.2	5.4
29.0	21.0	5.6
30.3	19.7	5.8
32.1	17.9	6.0
33.1	16.9	6.2
34.6	15.4	6.4
36.4	13.6	6.6
40.9	9.1	6.8
43.6	6.5	7.0

Fosfato de potasio (6, 7, 7.4, 8).

Preparar las siguientes soluciones concentradas:

- KH_2PO_4 - Fosfato de potasio (monobásico) 1 M
- K_2HPO_4 - Fosfato de potasio (dibásico) 1 M

Ajustar a cada pH, como guía se empleó la siguiente tabla.

1 L 0.05M Tampón de fosfatos		
KH_2PO_4 1 M (ml)	K_2HPO_4 1 M (ml)	pH
32.0	18.0	6.6
29.8	20.2	6.7
26.5	23.5	6.8
24.0	26.0	6.9
21.1	28.9	7.0
18.4	31.6	7.1
16.8	34.2	7.2
13.4	36.6	7.3
11.2	38.8	7.4
9.4	40.6	7.5
7.8	42.2	7.6

Glicina-NaOH (9, 10, 11, 12) (Pearse, 1980).

Preparar las siguientes soluciones concentradas:

- 0,2 M de glicina
- 0,2 NaOH

Adicionar 25 ml de la solución concentrada de glicina y ajustar el pH con NaOH, finalmente aforar con agua destilada a 100 ml, como guía se empleó la siguiente tabla.

0.2 M NaOH(ml)	pH
2.0	8.6
3.0	8.8

4.4	9.0
6.0	9.2
8.4	9.4
11.2	9.6
13.6	9.8
19.3	10.4
22.75	10.6