



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA TIERRA**

MAESTRÍA EN BIOCIENCIAS

**Identificación de enzimas y metabolitos intermediarios involucrados
en la degradación de Benzo[a]pireno por *Bacillus licheniformis* M2-7**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO EN
MAESTRÍA EN BIOCIENCIAS**

PRESENTA:

Q.B.P. JOSEPH GUEVARA LUNA

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. YANET ROMERO RAMÍREZ

CO- DIRECTOR:

DR. SERGIO ENCARNACIÓN GUEVARA

CHILPANCINGO, GRO., MAYO 2017.




UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA TIERRA
Maestría en Biociencias


Av. Lázaro Cárdenas S/N. Ciudad Universitaria. Chilpancingo, Gro. C.P. 39090. Tel 01 747 47 1 93 10 ext: 3601


APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 23 días del mes de febrero de dos mil diecisiete, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Biociencias, para examinar la tesis titulada **"Identificación de enzimas y metabolitos intermediarios involucrados en la degradación de Benzo[a]pireno por *Bacillus licheniformis* M2-7"**, presentada por el alumno **Joseph Guevara Luna**, para obtener el Grado de Maestría en Biociencias. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

El Comité Tutorial


Dra. Yanet Romero Ramírez
Dirección de tesis



Dr. Sergio Manuel Encarnación Guevara
Codirección de tesis


Dra. Ma. Elena Moreno Godínez

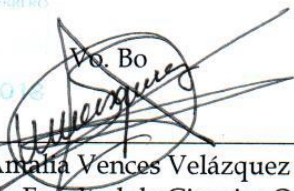

Dra. Jeiry Toribio Jiménez


Dra. Patricia Álvarez Fitz


Vo. Bo


Dra. Isela Parra Rojas
Coordinadora del Posgrado de la Facultad de
Ciencias Químico Biológicas


Vo. Bo


Dra. Amalia Vences Velázquez
Directora de la Facultad de Ciencias Químico
Biológicas

La presente tesis se realizó en el Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología Ambiental perteneciente a la Facultad de Ciencias Químico Biológicas en la Universidad Autónoma de Guerrero bajo la dirección de la Dra. Yanet Romero Ramírez; el Laboratorio de Proteómica perteneciente al Centro de Ciencias Genómicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la codirección del Dr. Sergio Manuel Encarnación Guevara y asesoría del Biólogo Ángel Gabriel Martínez Batallar; el Laboratorio de Toxicología y Salud Ambiental perteneciente a la Facultad de Ciencias Químico Biológicas con la asesoría de la Dra. Patricia Álvarez Fitz; el Laboratorio 09 del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la asesoría del Dr. José Alberto Hernández Eligio; la Central Analítica en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Zacatenco con la asesoría de la Maestra Elvira Ríos Leal; y en el Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos con la asesoría del Dr. Macdiel Acevedo Quiroz.

Este trabajo contó con el financiamiento del proyecto fortalecimiento del posgrado en Biociencias, clave 249671 de los Fondos Mixtos CONACyT Gobierno del Estado de Guerrero, y con el apoyo de una beca CONACyT (N° 402669) durante el periodo de dos años.

DEDICATORIA

A mi madre, Lilia Guevara Luna, por brindarme su apoyo incondicional en esta etapa de mi vida, por confiar en mí y por su infinito amor.

Este trabajo va para ti, con mucho cariño.

A mi hermano Vicente, por ser mi amigo ante todo, por todos los momentos gratos y no gratos vividos, y por brindarme su apoyo a pesar de la distancia.

AGRADEZCO

A **mi madre**, por todo el apoyo incondicional, amistad y consejos que me brindó durante todo este trayecto. ¡Te amo mamá!

A mi directora de tesis, la **Dra. Yanet Romero**, por todo el apoyo brindado durante la elaboración de este proyecto. Por siempre levantar mi ánimo y hacerme ver el lado bueno durante los momentos de incertidumbre. Eres una gran persona, una gran investigadora, pero sobre todo, sabes ser una buena amiga. ¡Muchas Gracias!

A la **Dra. Patricia Alvarez Fitz**, quien siempre me ayudo a resolver las grandes dudas que me invadían, por guiarme en el rumbo del trabajo, pero sobre todo por brindarme su amistad y paciencia.

A mis sinodales, el **Dr. Sergio Encarnación**, la **Dra. Jeiry Toribio** y la **Dra. Ma. Elena Moreno** por su apoyo, consejos y observaciones aportadas durante la realización de los experimentos así como en la redacción de esta tesis.

A mis amigos, los **“Holi cosis!!!” (Adán, Alma, Juan Carlos, Maggiess y Chewitzin)**. Chicos, gracias a ustedes este par de años fueron muy llevaderos. Gracias por su amistad, apoyo y los buenos momentos de diversión y desestrés.

A **Floreilla, Roger**, y las “gemelas” (**Miriam y Karen**), por su sincera amistad y grata comprensión en mis momentos de estrés. Son unas grandes personas y en cualquier etapa que se encuentren, siempre podrán contar conmigo.

A **Karen Cortes de Darcy, Ana OC y Miying**, por su amistad y apoyo en estos dos grandes años.

Y a todos aquellos que me brindaron su apoyo durante el transcurso de realización de esta tesis. ¡Muchas gracias!

Índice

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
JUSTIFICACIÓN	6
OBJETIVOS	7
MATERIAL Y MÉTODOS	8
RESULTADOS	13
DISCUSIÓN	21
CONCLUSIONES	26
ANEXOS	27
REFERENCIAS	31

RESUMEN

Antecedentes: El benzo[a]pireno es reconocido como un hidrocarburo aromático policíclico potencialmente carcinogénico y mutagénico por lo que la Agencia de Protección Ambiental de EE. UU. lo ha enlistado como un contaminante prioritario para remediación, siendo importante la remoción de este compuesto del ambiente. El uso de bacterias termófilas capaces de biodegradar este compuesto a formas más sencillas ha sido explorado en las últimas décadas ya que provee ventajas en comparación con organismos mesofílicos. **Objetivo:** Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue identificar las enzimas de la bacteria termófila *Bacillus licheniformis* M2-7 implicadas en la biotransformación de benzo[a]pireno, así como los metabolitos generados. **Materiales y métodos:** La cepa fue inoculada en medio mínimo salino durante 24 h, suplementado con 10 µg de naftaleno, fenantreno, pireno o benzo[a]pireno. El sobrenadante de los cultivos se obtuvo por centrifugación y se realizó extracción con acetato de etilo. Los extractos fueron corridos en una cromatografía en capa fina y revelados en luz ultra violeta. La caracterización de la estructura química se llevó a cabo mediante RMN ¹H y ¹³C, así como CG-EM. Mediante el uso de electroforesis en doble dimensión se estudió el proteoma de la cepa M2-7, y se realizó la medición de actividades enzimáticas en extractos celulares totales. **Resultados:** La cepa M2-7 mostró una disminución en la cantidad de células viables conforme transcurren las primeras 3 h de cultivo con benzo[a]pireno (~1.6x10⁵ células mL⁻¹), sin embargo el mismo efecto se aprecia en el control (1.2x10⁵ células mL⁻¹). Los extractos obtenidos muestran que el proceso de biotransformación sobre el benzo[a]pireno mediado por la cepa M2-7 comienza durante las primeras 3 h de cultivo. El cromatograma del compuesto 1 mostró un pico con un tiempo de retención de 17.38 min, el espectro de masas mostró un ion molecular aproximado de *m/z* 167, coincidiendo con el peso molecular de la fórmula química C₆H₄(COOH)₂, confirmando su estructura química como ácido ftálico. Se detectó actividad de la enzima catecol 2,3-dioxigenasa (0.33 U/mg de proteína). **Conclusiones:** Lo anterior sugiere que la cepa M2-7 realiza la biotransformación del benzo[a]pireno a ácido ftálico mediante la enzima catecol 2,3-dioxigenasa.

Palabras clave: *Bacillus licheniformis*, benzo[a]pireno, biotransformación, ácido ftálico

ABSTRACT

Background: Benzo[a]pyrene is recognized as a potentially carcinogenic and mutagenic polycyclic aromatic hydrocarbon, so the U.S. Environmental Protection Agency has listed it as a priority contaminant for remediation, being priority the removal of this compound from the environment. The use of thermophilic bacteria capable of biodegrading this compound to simpler forms has been explored in recent decades as it provides advantages compared to mesophilic organisms. **Aim:** The aim of the present study was to identify the enzymes of the thermophilic bacteria *Bacillus licheniformis* M2-7 involved in the biotransformation of benzo[a]pyrene as well as the metabolites generated. **Materials and methods:** The strain was inoculated in minimal saline medium for 24 h, supplemented with 10 µg of naphthalene, phenanthrene, pyrene or benzo[a]pyrene. The culture supernatant was obtained by centrifugation and extraction was performed with ethyl acetate. The extracts were run on a Thin Layer Chromatography and developed in ultra violet light. The characterization of the chemical structure was carried out through ^1H and ^{13}C NMR experiments, as well as GC-MS. Two-dimensional electrophoresis was used to study the M2-7 strain proteome, and enzymatic activities were measured in total cell extracts. **Results:** The strain M2-7 showed a decrease in the number of viable cells as the first 3 h of culture with benzo[a]pyrene ($\sim 1.6 \times 10^5$ cells mL $^{-1}$) elapsed, however the same effect is seen in the control (1.2×10^5 cells mL $^{-1}$). The extracts obtained show that the biotransformation process on the benzo[a]pyrene mediated by the strain M2-7 begins during the first 3 h of culture. The chromatogram of compound 1 showed a peak with a retention time of 17.38 min, the mass spectrum showed an approximate molecular ion of m/z 167, coinciding with the molecular weight of the chemical formula $\text{C}_6\text{H}_4(\text{COOH})_2$, confirming its chemical structure such as phthalic acid. Activity of the enzyme catechol 2,3-dioxygenase (0.33 U/mg protein) was detected. **Conclusions:** This suggests that strain M2-7 performs the biotransformation of benzo[a]pyrene to phthalic acid by the enzyme catechol 2,3-dioxygenase.

Key words: *Bacillus licheniformis*, benzo[a]pyrene, biotransformation, phthalic acid

INTRODUCCIÓN

Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) son compuestos de dos o más anillos de benceno fusionados en arreglos de manera linear, angular o en grupos (Sawulski *et al.*, 2014; Seo *et al.*, 2009; Chauhan *et al.*, 2008), y de acuerdo a el número de anillos pueden clasificarse de bajo y alto peso molecular. En el último caso se encuentra el Benzo[a]pireno (BaP), con cinco anillos de benceno fusionados, por lo que posee baja solubilidad en agua y volatilidad así como un alto coeficiente de reparto octanol-agua (6.35; Sawulski *et al.*, 2014; Mohandass *et al.*, 2012; IARC, 2010). Este contaminante, junto con los demás hidrocarburos, se forma e introduce en el ambiente de manera natural como resultado de incendios forestales y de pastizales, o mediante procesos como: la carbonización, filtraciones de petróleo o erupciones volcánicas. Sin embargo, la principal fuente de diseminación es a través de actividades antropogénicas como: la quema de combustible fósil, basura y desechos municipales, el tráfico vehicular, humo de cigarrillos de tabaco, por derrames accidentales de crudo y disposición equivocada de desechos de petróleo (Seo *et al.*, 2009; Haritash y Kaushik, 2009).

El BaP es un compuesto que se encuentra ampliamente distribuido en el ambiente gracias a las diversas fuentes que lo originan y a su elevada recalcitrancia, por lo que puede encontrarse en aire, suelo y sedimentos, superficies marinas, así como en agua subterránea e inclusive en ambientes extremos, resultando en su consumo y acumulación por componentes de las distintas cadenas tróficas, logrando penetrar la membrana celular donde es activado por enzimas del citocromo P₄₅₀ a epóxidos y dihidrodioles que pueden unirse a proteínas y al ADN, formando aductos enlazados covalentemente, los cuales conducen a mutaciones, desarrollo de malformaciones, tumores y cáncer (Abdel-Shafy y Mansour, 2016; Harvey, 1996). Por lo anterior, el BaP ha sido clasificado como un carcinógeno de tipo 1 (IARC, 2010) y en base a su ecotoxicidad, la Agencia de Protección Ambiental de EE. UU. (US EPA, por sus siglas en inglés) ha enlistado este compuesto dentro de los 16 HAPs contaminantes prioritarios para remediación (USEPA, 1984).

Las propiedades perjudiciales del BaP mencionadas anteriormente, han planteado el desarrollo de procesos como: la remoción de tierra, la incineración o el llenado de suelos para su adecuada eliminación. Sin embargo, debido al costo de estos tratamientos y el riesgo de generar intermediarios con mayor polaridad y toxicidad surge la necesidad de buscar técnicas alternativas para la remoción del BaP en una manera económica y amigable con el ambiente (Lamichhane *et al.*, 2016; Chibwe *et al.*, 2015). Desde hace algunos años se ha estudiado la capacidad de ciertos microorganismos para degradar los contaminantes ambientales como el BaP. En base a ello, ha surgido la biorremediación, la cual utiliza la versatilidad metabólica de los microorganismos para degradar o transformar los contaminantes orgánicos en metabolitos inofensivos o mineralizarlos en dióxido de carbono y agua (Seo *et al.*, 2009).

En base a estudios de biorremediación, se ha demostrado la habilidad de bacterias para degradar una amplia variedad de HAPs, entre los que se incluyen los géneros *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Cycloclasticus*, *Burkholderia*, *Rhodococcus*, *Polaromonas*, *Neptunomonas* y *Janibacter* (Lu *et al.*, 2011), sin embargo, pocas son las bacterias que poseen la capacidad de utilizar y metabolizar BaP. La mayor parte de los conocimientos sobre el metabolismo de BaP se ha adquirido a partir de bacterias mesófilas como, *Pseudomonas saccharophila* (Chen y Aitken, 1999), *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 (Moody *et al.*, 2004), *Arthrobacter oxydans* B4 (Peng *et al.*, 2012), *Bacillus cereus* y *B. vireti* (Mohandass *et al.*, 2012), *B. subtilis* (Lily *et al.*, 2009), *Sphingomonas yanoikuyae* JAR02 (Rentz *et al.*, 2008) y *Klebsiella pneumoniae* PL1 (Ping *et al.*, 2014), el cual inicia con la oxidación de uno de los anillos de benceno a un intermediario *cis*-dihidrodiol mediante la actividad de un multicomponente de dioxigenasas hidroxilantes de anillo (Sawulski *et al.*, 2014). Sin embargo, el BaP y otros HAPs de alto peso molecular, a menudo presentan baja biodisponibilidad en condiciones mesofílicas ya que existe una lenta transferencia de masa de estos compuestos, limitando su biodegradación (Zeinali *et al.*, 2007). En este sentido, el uso de bacterias termófilas es considerado como una estrategia alterna al uso de microorganismos mesofílicos ya que permite estudiar el metabolismo de los HAPs a elevadas temperaturas debido a que al incrementar la temperatura, la solubilidad de los HAPs aumenta, con lo cual se mitigan los problemas relacionados con la biodisponibilidad limitada de éstos (Zeinali *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2012).

Pocos son los estudios que se han descrito sobre el empleo bacterias termófilas capaces de utilizar HAPs como única fuente de carbono y energía (Müller *et al.*, 1998; Annweiler *et al.*, 2000; Zeinali *et al.*, 2007; Mohamed *et al.*, 2006; Viamajala *et al.*, 2007; Zheng *et al.*, 2011) y los reportes sobre los mecanismos moleculares implicados en dicho proceso son escasos en la literatura (Vandera *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2014), por lo que la búsqueda de nuevas cepas termófilas que posean enzimas implicadas en la biodegradación/biotransformación de BaP y otros HAPs con la ayuda de las estrategias de biorremediación es de gran importancia, sin embargo, éstas requieren métodos confiables para identificar, monitorear, atenuar o eliminar los diversos HAPs contaminantes (Chauhan y Jain, 2010; Seo *et al.*, 2009).

La aplicación de las técnicas denominadas "ómicas" en muestras ambientales, ha sido de ayuda para desarrollar modelos para predecir la actividad microbiana bajo diversas condiciones de biodegradación. En los últimos años se ha observado un aumento sustancial en el uso de enfoques proteómicos en estudios biotecnológicos ambientales, permitiendo examinar los cambios globales en la composición o abundancia de estos productos, así como la identificación de proteínas clave implicadas en la respuesta de microorganismos a la presencia de contaminantes ambientales (Chen *et al.*, 2016; Chauhan y Jain, 2010).

A pesar de las ventajas que ofrecen las diferentes ramas y tecnologías aplicadas a la biorremediación, como la proteómica, pocos son los estudios sobre la identificación de las enzimas y demás componentes involucrados en la biodegradación/biotransformación de HAPs de alto peso molecular como el BaP en bacterias termófilas. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue identificar las enzimas implicadas en la biotransformación de BaP en *Bacillus licheniformis* M2-7 y conocer el producto de biotransformación de dicho contaminante. Con estos resultados se podrá diseñar, en un futuro, estrategias de biorremediación de sitios contaminados con BaP.

JUSTIFICACIÓN

El BaP es un contaminante orgánico persistente, por lo que su presencia en el ambiente es de mayor preocupación ya que por sus propiedades tóxicas, mutagénicas y carcinogénicas tiene efectos perjudiciales en la población humana, la flora y fauna. Actualmente la eliminación del BaP se da mediante procesos de remediación físicos (excavación del suelo, incineración o contención) o químicos (lavados de suelo y/o adición de agentes altamente oxidantes), sin embargo, implementar los procesos antes descritos más que eliminar el contaminante, genera residuos tóxicos que se dispersan agravando así la contaminación. Por lo anterior, la búsqueda de estrategias de biorremediación ha conllevado a la caracterización y uso de bacterias capaces de biotransformar y/o biodegradar el BaP del ambiente. Los géneros bacterianos con las capacidades antes mencionadas destacan a *Pseudomonas sp.*, *Enterobacter sp.*, y *Bacillus sp.*, todas ellas han desarrollado la capacidad de tolerar, biodegradar o biotransformar BaP en compuestos con un menor grado de toxicidad, permitiendo así su adaptación en estas condiciones de estrés. Por lo anterior, el presente estudio se enfocó en identificar las enzimas de *B. licheniformis* M2-7 implicadas en la biotransformación de BaP, que podrán utilizarse en un futuro en el diseño de estrategias para biorremediar sitios contaminados con BaP.

OBJETIVOS

General:

Identificar enzimas y metabolitos intermediarios involucrados en la degradación de Benzo[a]pireno por *Bacillus licheniformis* M2-7.

Específicos:

1. Identificar los HAPs que pueden ser degradados por las bacterias termófilas aisladas del estado de Guerrero.
2. Caracterizar los productos de biotransformación del Benzo[a]pireno generados por la cepa *B. licheniformis* M2-7.
3. Realizar un análisis proteico en presencia y ausencia de Benzo[a]pireno como fuente de carbono para identificar enzimas clave involucradas en su degradación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio de tipo experimental utilizando la cepa *B. licheniformis* M2-7 cultivada en Medio Mínimo Salino (MMS), seleccionando previamente el HAP que presentara un patrón de biodegradación/biotransformación, para ello la cepa fue expuesta a naftaleno, fenantreno, pireno y benzo[a]pireno a una concentración final de 10 µg durante 13 días, monitoreando por Cromatografía en Capa Fina (CCF) la producción de compuestos diferentes (ver figura 6, anexo I). Se utilizó como control la cepa *B. licheniformis* M2-7 cultivada en MMS sin fuente de carbono. Cada uno de los experimentos realizados en este estudio se llevó a cabo por triplicado en tres momentos independientes.

Hidrocarburos y sustratos

El naftaleno, fenantreno, pireno y BaP utilizados fueron grado HPLC ($\geq 96\%$) y el catecol con pureza $\geq 99\%$ (Sigma Aldrich, Toluca, México). Así mismo, todos los disolventes utilizados fueron grado reactivo.

Medio y condiciones de cultivo

El crecimiento de la cepa *B. licheniformis* M2-7 se llevó a cabo en caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI, por sus siglas en inglés; BIOXON, para 1 L: infusión de cerebro corazón, 6 g; peptona de carne, 6 g; NaCl, 5 g; dextrosa, 3 g; peptona de gelatina, 14.5 g; KNa_2PO_4 , 2.5 g). Para la cuenta viable se utilizó agar Soya Trypticaseína (BIOXON; para 1 L: digerido pancreático de caseína, 15 g; digerido papaíco de harina de soja, 5 g; NaCl, 5 g; agar, 15 g). La temperatura de cultivo fueron 50°C con agitación de 150 rpm, en condiciones de oscuridad.

La cepa *B. licheniformis* M2-7 fue cultivada en frascos de 413 mL conteniendo 50 mL de MMS modificado (Zeinali *et al.*, 2008) cuya composición en g/l es: NH_4Cl , 1; Na_2HPO_4 , 0.380; $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.380; $\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.080; CaCl_2 , 0.070; KCl, 0.040; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.001, suplementado con 2.5 mL de una solución de elementos trazas, conteniendo $\text{MgCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.027 g; H_3BO_3 , 0.031 g; ZnCl_2 , 0.050 g, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.02 g; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.036 g y $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.03 g por litro de MMS, con un pH final de 7.

Evaluación del crecimiento de Bacillus licheniformis M2-7 en BaP

El efecto del BaP sobre el crecimiento de *B. licheniformis* M2-7 fue evaluado a partir de un cultivo de aproximadamente 12-16 h en caldo BHI del cual se colectaron las células mediante centrifugación a 3,400 rpm durante 15 min. a temperatura ambiente y lavadas tres veces con MMS estéril. Aproximadamente 3 mL de la suspensión de células, con una densidad óptica a 600nm ($D.O_{600nm}$) de 0.9, por mililitro, fueron colocados en 50 mL de MMS a una $D.O_{600nm}$ final de 0.5. Los frascos inoculados fueron incubados a 50°C en condiciones de oscuridad en una incubadora con agitación a 150 rpm durante un período de adaptación de 3 h (Wang *et al.*, 2011) y después de 3 h el cultivo fue suplementado con BaP a una concentración final de 10 µg. Para corroborar la viabilidad de la cepa M2-7 durante el período de crecimiento, se realizó una colecta de alícuotas de 1 mL de medio de cultivo en tubos Eppendorf en tiempos de 3, 6, 12 y 24 h; posteriormente se realizaron diluciones seriadas de 10^{-1} a 10^{-4} y se realizó una siembra en agar Soya Tripticaseína durante 20 a 24 h a 50°C. Terminado el tiempo de incubación se determinaron las Unidades Formadoras de Colonia por mililitro (UFC/mL) de cultivo. De igual forma se realizó una extracción de proteína empleando el reactivo para Extracción de Proteína Bacteriana B-PER® (Thermo Scientific) siguiendo las recomendaciones del fabricante y realizando una cuantificación de proteína total (Bradford, 1976). Se monitoreó también el crecimiento de *B. licheniformis* M2-7 en cultivos suplementados con naftaleno, fenantreno y pireno a una concentración de 10 µg, bajo las condiciones de crecimiento antes descritas. Como control negativo se utilizó MMS inoculado con *B. licheniformis* M2-7, así como MMS suplementado con BaP sin inóculo control abiótico.

Extracción orgánica y cromatografía en capa fina

El MMS suplementado con naftaleno, fenantreno, pireno o BaP fue separado del paquete celular en un tubo Falcón centrifugando a 3,500 rpm durante 10 min. Una vez obtenido el sobrenadante, éste fue transferido a tubos Falcón de 50 mL y se realizó una extracción con acetato de etilo agitando durante 10 min. Finalizada la extracción, se colectó la fase orgánica en un matraz bola (1,000 mL) y el disolvente fue evaporado con ayuda de un rotavapor digital durante 15 min. A continuación, se colectó el extracto resuspendiendo con acetato de etilo

depositándolo en viales de vidrio de 5 mL. El extracto fue eluido en una placa cromatográfica HPTLC Gel de Silice F₂₅₄ utilizando un sistema hexano:acetona (7:3) y revelados en luz UV a 365 nm (Bubinas *et al.*, 2008). Para el ensayo de fotoestabilidad se utilizaron las condiciones antes descritas y la placa fue expuesta a condiciones de luz y temperatura ambiente durante 24 h (Cope y Kalkwarf, 1987).

Caracterización de metabolitos intermediarios de la biotransformación de BaP.

Se realizó una semi purificación de los productos de biotransformación del BaP mediante una cromatografía en columna. Brevemente, el extracto obtenido se mezcló con Silica gel (Merck Kiesegel 60, 0.2-0.5 mm; Darmstadt, Germany) resuspendido en hexano y se hizo pasar a través de una columna de vidrio (100 mL) empacada con Silica gel (Merck Kiesegel 60, 0.063-0.1 mm; Darmstadt, Germany). Se utilizó un sistema de elución isocrático (hexano 100%) y se realizó un lavado con acetona. Las fracciones obtenidas fueron monitoreadas en placas cromatográficas en las condiciones descritas anteriormente. Los metabolitos con mayor polaridad fueron separados en una placa cromatográfica semipreparativa (RF C18 HPTLC F₂₆₀) con un sistema de elución hexano:metanol:agua (6:4:0.5) y revelada a 365 nm). Los compuestos fluorescentes fueron raspados y se recuperaron con 10 mL de acetona. Las fracciones se colocaron en viales y se dejó evaporar el hexano o acetona a temperatura ambiente. Una vez libre de disolvente, el extracto fue enviado al Centro de Investigaciones Químicas, perteneciente a la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Las estructuras fueron determinadas por medio de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de protón (¹H) a 400 MHz y a 100 MHz para carbono (¹³C) utilizado tetrametilsilano (TMS) como referencia interna (Alvarez-Fitz *et al.*, 2012). Los espectros obtenidos fueron analizados con ayuda del software NMRnotebook 2.80 build 0.0.

Por otra parte, se realizó una cromatografía de gases – espectrometría de masas (GC-EM) de las fracciones. Brevemente, el análisis se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases (Perkin Elmer Autosystem) con detector de ionización de flama equipado con una columna Chrompack CP-SIL 8CB de 25m x 0.32 x 0.4. La temperatura fue de 180°C por 3 min, seguido por un

incremento a una velocidad de $3^{\circ}\text{C min}^{-1}$ hasta 300°C manteniendo por 10 min. El extracto fue concentrado a 50 μL en diclorometano y el volumen de inyección fue de 2 μL con nitrógeno como fase móvil (flujo de 8.1 psi). El detector de masas operó en modo SIR para la obtención de los espectros para la identificación del compuesto. Los espectros obtenidos fueron comparados con la base de datos de la biblioteca de espectros de masas del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST, por sus siglas en inglés) (Meena *et al.*, en 2016).

Análisis proteómico en geles 2D

Para este análisis se utilizaron cultivos en las condiciones antes mencionadas; como control negativo se utilizó un cultivo en ausencia de BaP. Se colectó un volumen de 50 mL de cada cultivo y se centrifugaron a 3,400 rpm durante 15 min a temperatura ambiente, posteriormente se colectaron los sobrenadantes y se almacenaron en refrigeración a 4°C hasta su uso. Por otra parte, el pellet celular fue resuspendido en 1 mL de agua milliQ y sonicado en un Sonicador Soniprep MSE 150 en baño de hielo durante 5 minutos (30 segundos de pulso con intervalos de 1 minuto), la extracción de proteína y montaje de los geles en 2-D se realizó según lo establecido por Encarnación *et al.*, (2005). Se utilizó el software PDQuest Advanced versión 8.0.1 para la comparación de imágenes de geles en 2D.

Análisis bioinformático

Se realizó la búsqueda de las secuencias de los genes que codifican para las enzimas catecol 1,2-dioxigenasa (C12O) [EC 1.13.11.1] y catecol 2,3-dioxigenasa (C23O) [EC 1.13.11.2] en cepas del género *Bacillus* en el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Posteriormente se realizó una comparación con ayuda del BLASTtn suite (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para encontrar similitudes en la secuencia de los genes del género *Bacillus*, considerando un $\geq 95\%$ de similitud.

Actividad enzimática

El paquete de células de *B. licheniformis* M2-7 fue colectado a partir de cultivos de 12-16 h en medio BHI y centrifugadas a 3,400 rpm durante 10 min. Posteriormente, se realizó una suspensión celular de 3 mL (D.O._{600nm} 0.5) con la cual se inoculó un total de 50 mL de MMS adicionado con 10 µg de BaP. Los frascos se colocaron en una incubadora con agitación (SSI5 SHEL LAB) a 150 rpm y 50°C en oscuridad durante 3 h. Concluido el tiempo de incubación, las células fueron colectadas mediante centrifugación a 3,400 rpm durante 15 min a temperatura ambiente. El paquete de células obtenido fue lavado tres veces con buffer de fosfatos (50 mM, pH 7.2) y resuspendido en un volumen total de 2 mL del mismo buffer. La suspensión de células fue sonicada en un Sonicador Soniprep MSE 150, en baño de hielo, por 20 s con intervalos de 1 min durante un total de 5 min y centrifugada a 4000 rpm por 15 min a 4°C. El sobrenadante obtenido fue utilizado como extracto para los ensayos enzimáticos (Guzik *et al.*, 2013). La concentración de proteína total fue determinada mediante el método de (Bradford, 1976). Como control se utilizó extracto de células cultivadas en MMS sin fuente de carbono, así como buffer de fosfatos (PBS, por sus siglas en inglés) con catecol.

La actividad de la enzima C12O fue evaluada espectrofotométricamente mediante la formación de ácido *cis,cis*-mucónico a 260 nm (λ_{260} 16,800 M⁻¹ cm⁻¹), y la actividad de la enzima C23O se monitoreó mediante la detección de semialdehído 2-hidroximucónico a 375 nm (λ_{375} 36,000 M⁻¹ cm⁻¹) en un NANODROP 2000c (Thermo Scientific). La mezcla de reacción contenía 20 µL de catecol (100 mM, disuelto en buffer de fosfatos pH 6), 20 µL de extracto celular de un cultivo de 3 h de *B. licheniformis* M2-7 con BaP (20 µg), y 960 µL de buffer de fosfatos (50 mM, pH 7.2) en un volumen final de 1 mL. La medición de la actividad se llevó a cabo a temperatura ambiente. Una unidad de enzima fue definida como la cantidad de enzima que cataliza 1 mmol de sustrato por minuto. Los resultados se muestran como actividad enzimática por miligramo de proteína total en los extractos celulares (Wojcieszynska *et al.*, 2010).

RESULTADOS

Evaluación del crecimiento de la cepa Bacillus licheniformis M2-7 en BaP y otros HAPs

El análisis de la capacidad de la cepa *B. licheniformis* M2-7 para biotransformar naftaleno, fenantreno, pireno y BaP mostró que la cepa puede realizar un proceso de biotransformación sobre el pireno y el BaP en los primeros 5 días de cultivo (ver anexo I, figura 6C y D). Debido a que el BaP es uno de los HAPs que mayor persistencia y efectos adversos tiene al ambiente y organismos vivos, se evaluó el comportamiento de la cepa M2-7 en presencia de BaP.

En la figura 1A se muestra la cinética de crecimiento de *B. licheniformis* M2-7 durante 24 h de cultivo en presencia de BaP donde se aprecia que la concentración de proteína disminuye conforme transcurren las primeras 3 h de cultivo, sin embargo, la concentración de proteína continua constante hasta alcanzar las 24 h de cultivo. Por otra parte, se realizó un conteo de células vivas durante 24 h de cultivo en presencia de BaP (figura 1B) donde se observó que la cantidad de células viables disminuyó en las tres primeras horas de cultivo ($\sim 1.6 \times 10^5$ células mL^{-1}), sin embargo el mismo efecto se apreció en el control (MMS sin fuente de carbono, 1.2×10^5 células mL^{-1}).

Biotransformación de BaP por la cepa B. licheniformis M2-7

En la figura 2 se observa la biotransformación sobre el BaP en los extractos obtenidos de los cultivos de *B. licheniformis* M2-7 en intervalos de 3, 6, 12, 24 h y hasta los 15 días de cultivo; lo cual muestra que el proceso de biotransformación inicia durante las primeras 3 h de cultivo, interpretado por la intensidad de la mancha del compuesto presente en dicho tiempo (carril 2; compuesto 1), ya que no se asemeja al patrón de fluorescencia observado en la referencia del BaP (carril 1), así mismo en todos los demás carriles (3-17) se observa una mancha con mayor polaridad, sugiriendo la presencia de otros dos compuestos diferentes al inicial, denominados como compuesto 2 y 3 (C2 y C3, respectivamente) diferentes al BaP.

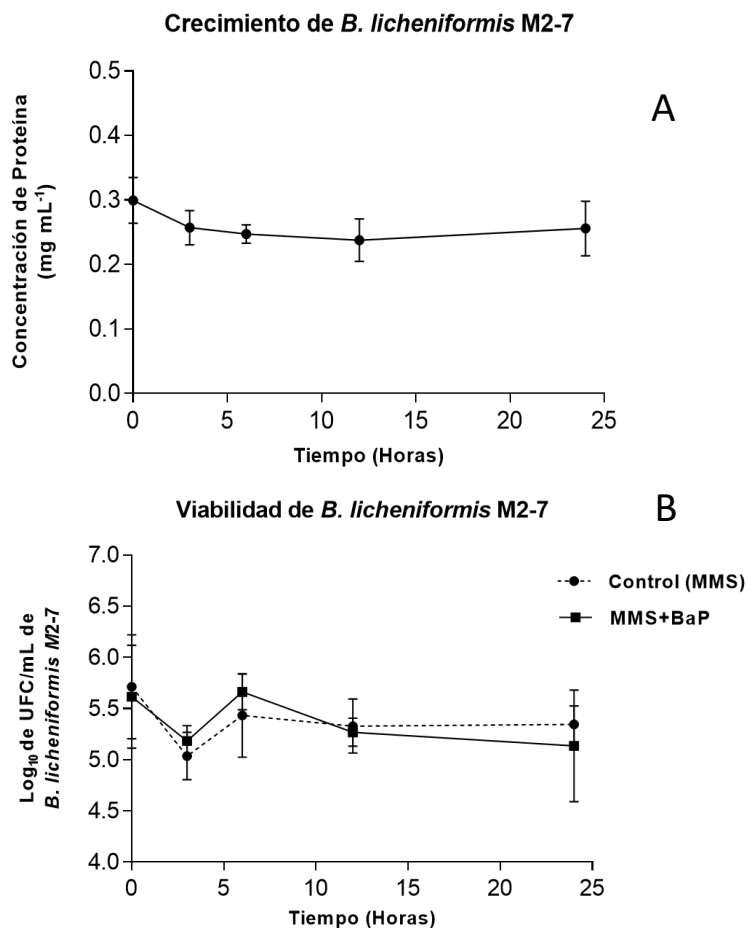


Figura 1. Cinética de crecimiento de *B. licheniformis* M2-7 en presencia de BaP (10 μ g). A) Cuantificación de proteína en un cultivo de 24 horas en MMS adicionado con BaP. B) Cuenta viable de células (Log_{10} UFC mL⁻¹) en MMS sin fuente de carbono (●, Control) y en MMS adicionado con BaP (■, MMS+BaP). Los valores se muestran como la media de tres replicas y con barras verticales se representa la desviación estándar.

La figura 3A muestra el estándar de BaP fotooxidado como una mancha color café (carril 1A), mientras que los demás puntos (2A-8A) no sufren dicho proceso. En la figura 3B se muestra un cambio en el patrón de fluorescencia del BaP pero no así con los extractos de los diferentes tiempos de cultivo.

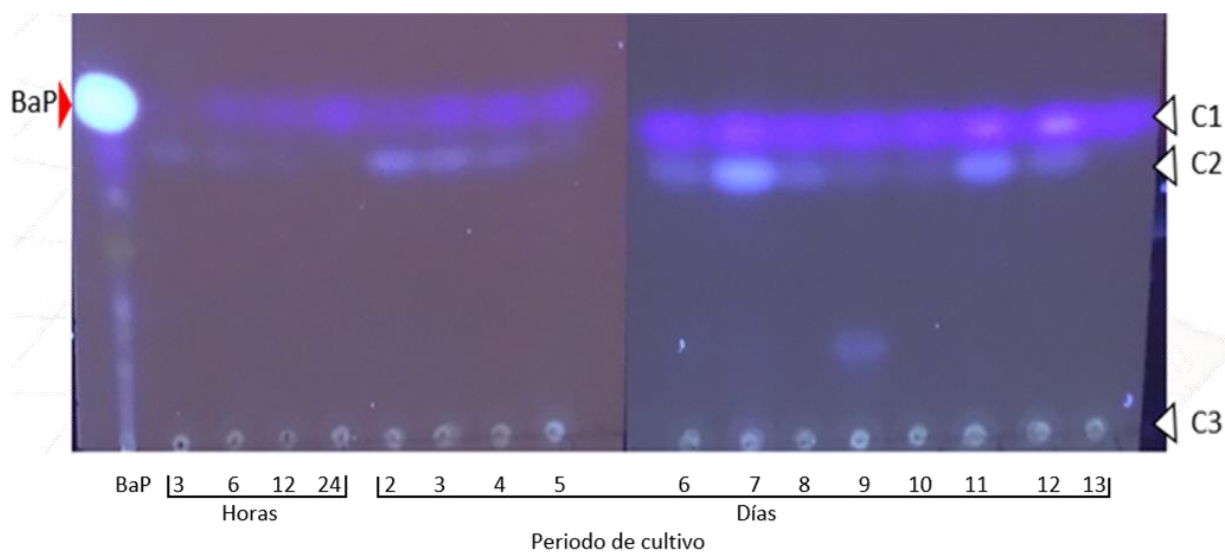


Figura 2. Biotransformación de BaP por la cepa *B. licheniformis* M2-7. Cromatografía en capa fina de los extractos obtenidos de un cultivo en MMS+BaP (10 μ g) en diferentes tiempos. Los compuestos 1 (C1), 2 (C2) y 3 (C3) resultado de la biotransformación se indican con \blacktriangleleft , y con \blacktriangleright se indica el estándar de BaP. En cada carril se utilizó un total de 2 μ L de extracto.

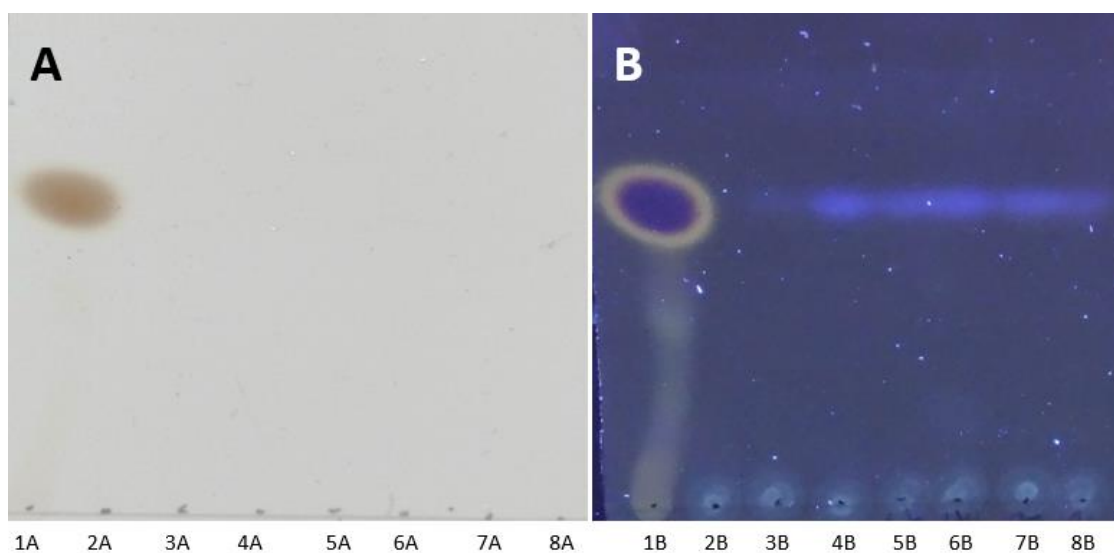


Figura 3. Fotooxidación de BaP y fotoestabilidad del producto de biotransformación. En el panel A se observa el BaP fotooxidado (1A) después de 24 h. El panel B muestra el patrón de fluorescencia del producto de fotooxidación del BaP (B; 1B) así como del C1 obtenido en tiempos de 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96 y 120 h (2B-8B). La placa fue expuesta a condiciones de luz y temperatura ambiente durante 24 h.

Análisis químico del producto de biotransformación del BaP

En la elución del extracto total se obtuvieron un total de 20 fracciones, de las cuales las fracciones 5 a 9 mostraron la presencia del compuesto 1. Por otra parte, el lavado con acetona mostró la presencia de los compuestos 2 y 3. Una vez obtenidas las fracciones se realizó un análisis estructural de los compuestos y del estándar de BaP mediante CG-EM y RMN ^1H y ^{13}C .

El espectro de RMN ^1H del estándar de BaP mostró señales correspondientes a 12 protones con desplazamientos químicos (δ) entre 8.79 a 9.92 ppm., mientras que en el espectro de RMN ^{13}C se observaron 20 picos entre δ 132.03 a 138.91 ppm. En conjunto, los datos muestran la presencia de protones y carbonos dentro de anillos aromáticos con enlaces dobles entre C-C (Anexo II, figura 7A y B); lo cual concuerda con el espectro de RMN ^1H y ^{13}C reportados para el BaP por (Unkefer *et al.*, 1983). Además, el análisis por cromatografía de gases mostró un pico con un tiempo de retención 22.22 min con una abundancia relativa del 100% y su espectro de masas muestra un ion molecular con pico base en una relación carga/masa (m/z) de 252 (Anexo II, figura 7C y D), lo cual corresponde al peso molecular del BaP ($252.31 \text{ g mol}^{-1}$).

Por otra parte, el cromatograma de gases del compuesto 1 muestra un pico con un tiempo de retención de 17.38 min y abundancia relativa del 100% (Anexo III, figura 8A). El espectro de masas muestra un ion molecular aproximado de m/z 167, el cual coincide con el peso molecular de la fórmula química $\text{C}_6\text{H}_4(\text{COOH})_2$. Además, la comparación del compuesto con la base de datos del NIST muestra una coincidencia con el ácido ftálico (NIST 110661; Anexo III, figura 8B). Para realizar la comprobación de la estructura sugerida por el espectro de masas, se realizó el análisis de la estructura química del compuesto 1 por RMN de ^1H y ^{13}C . El análisis de los espectros de RMN ^1H establece la presencia de picos en δ 1.74 a 2.18 ppm. (Anexo III, figura 8C) característico de grupos ^-OH , los cuales resuenan en la región alta del espectro, difiriendo completamente con los observados en el BaP. Por otra parte, los picos observados en el espectro de ^{13}C (Anexo III, figura 8D) indican la presencia de al menos 8 átomos de carbono en δ 24.01 a 41.86 ppm. El análisis de los datos sugiere que la estructura del compuesto 1 corresponde al ácido ftálico.

Identificación del proceso molecular de biotransformación de BaP por B. licheniformis M2-7

Para evaluar el mecanismo molecular por el cual la cepa *B. licheniformis* M2-7 es capaz de biotransformar el BaP en ácido ftálico en las primeras 3 h de cultivo, se realizó una electroforesis en doble dimensión en búsqueda de proteínas que pudieran estar involucradas en dicho evento. En la figura 4 y 5 se puede apreciar el proteoma de la cepa *B. licheniformis* M2-7 a tiempos de 3, 6, 12 y 24 h de cultivo. Los resultados muestran que durante las 24 h de cultivo no existe un cambio en el patrón de expresión de proteínas del control o la condición con BaP (10µg). Debido a la ausencia de diferencias en el proteoma de *B. licheniformis* M2-7 se llevó a cabo la búsqueda y medición de actividades de enzimas candidatas C120 y C230 en extractos celulares totales de la cepa M2-7.

Búsqueda de enzimas involucradas en la biotransformación de BaP

Se llevó a cabo la búsqueda de enzimas candidatas en el genoma de M2-7 para explicar el proceso de biotransformación de BaP a ácido ftálico. Durante la búsqueda *in silico* en el genoma de *B. licheniformis* DSM 13 (ATCC 14580) se detectó la presencia de la enzima catecol 2,3-dioxigenasa (Rey *et al.*, 2004); la cepa DSM13 mostró un 100% de similitud con la especie *B. licheniformis* M2-7 en base al 16S ADNr, sugiriendo la presencia de esta enzima en nuestra cepa modelo (ver anexo IV, figura 9). Además, en base a la literatura, existen especies del género *Bacillus* donde se ha reportado la presencia de la enzima C120, por lo cual se llevó a cabo la búsqueda de dicha enzima en nuestra cepa de estudio.

Actividad de las enzimas catecol dioxigenasas en extractos celulares

Tomando en cuenta los datos obtenidos por el análisis *in silico* se procedió a medir la actividad de las enzimas C120 y C230 a partir de extracto celular total de la cepa M2-7 en diferentes condiciones. No se detectó actividad de la enzima C120 en *B. licheniformis* M2-7 cuando se cultivó en MMS sin fuente de carbono ni al exponer la cepa a BaP (Tabla 1). Por otra parte, la actividad de la enzima C230 pudo ser detectada en la cepa *B. licheniformis* M2-7 cultivada en

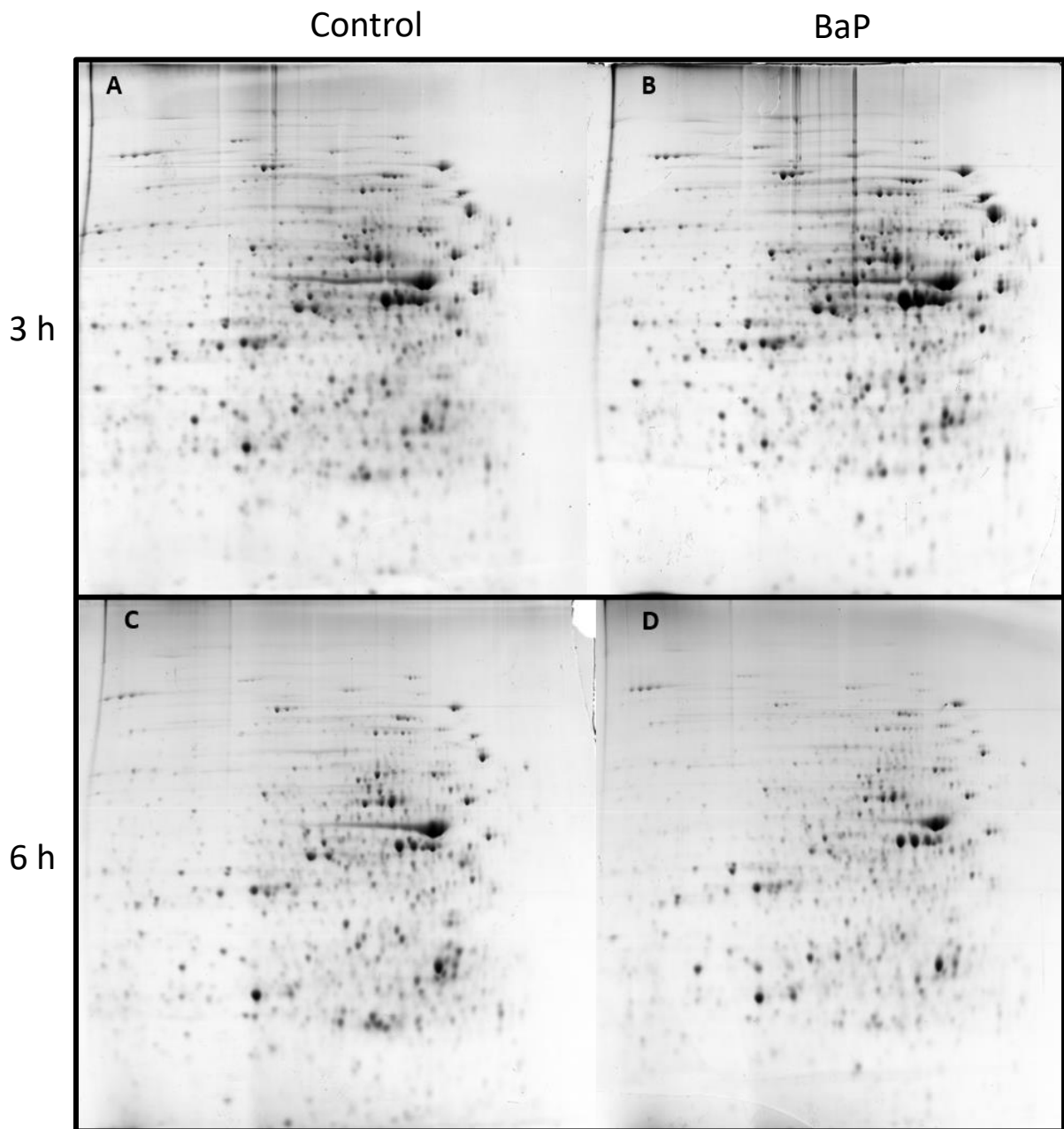


Figura 4. Electroforesis en doble dimensión de proteínas obtenidas en diferentes puntos de cultivo de la cepa *B. licheniformis* M2-7. A= Control (3 h); B= BaP (3 h); C= Control (6 h); D= BaP (6 h).

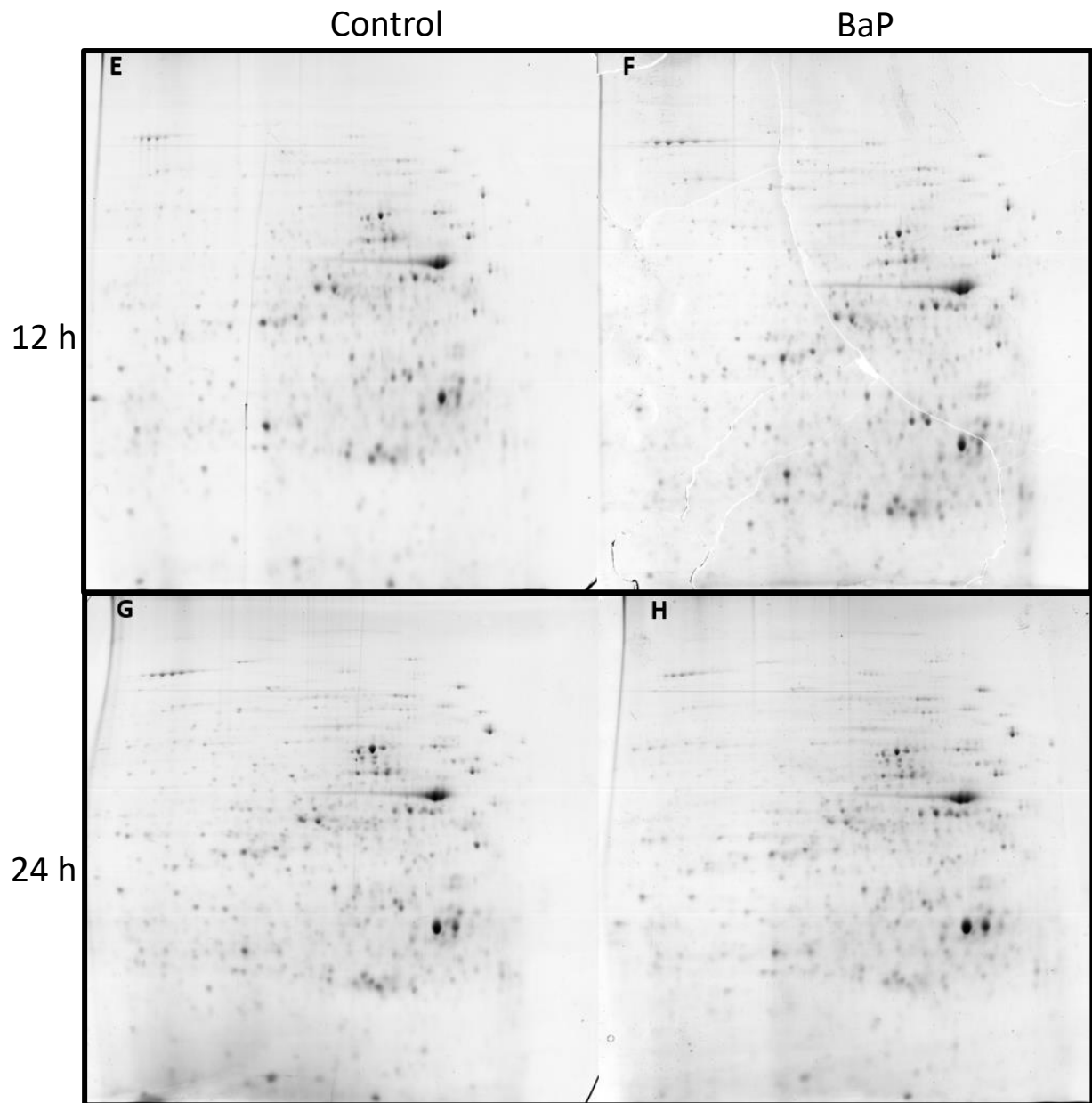


Figura 5. Electroforesis en doble dimensión de proteínas obtenidas en diferentes puntos de cultivo de la cepa *B. licheniformis* M2-7. E= Control (12 h); F= BaP (12 h); G= Control (24 h) y H= BaP (24 h).

MMS suplementado con BaP (0.33 U/mg de proteína), y no así cuanto la cepa es cultivada en MMS sin fuente de carbono. El comportamiento de la reacción fue validado con el control de buffer de fosfatos (PBS) y catecol comprobando que no existió reacción entre ambos compuestos (Tabla 1).

Tabla 1. Actividad de las enzimas catecol 1,2-dioxigenasa y catecol 2,3-dioxigenasa en extracto celular total de *B. licheniformis* M2-7 expuesto a 10µg de BaP. El sustrato utilizado fue catecol (100mM).

Condición de cultivo	Enzima (U/mg de proteína) _± DS	
	Catecol 1,2-dioxigenasa	Catecol 2,3-dioxigenasa
M2-7+MMS	ND	ND
M2-7+MMS+BaP	ND	0.33 _± 1.18
PBS+Catecol	ND	ND

ND= No detectado bajo las condiciones estimadas.

DS= Desviación estándar

DISCUSIÓN

La capacidad de utilizar HAPs como fuente de carbono por parte de microorganismos termófilos radica en el cambio de las propiedades fisicoquímicas de los HAPs en presencia de elevadas temperaturas, ya que la solubilidad y biodisponibilidad de éstos aumenta en esta condición y por ende la transferencia de masa, lo que origina que los HAPs puedan entrar en contacto con la superficie microbiana favoreciendo así su biodegradación (Zeinali *et al.*, 2008). Diversos géneros bacterianos mesofílicos han sido aislados y caracterizados como degradadores de HAPs de bajo peso molecular. Sin embargo, pocos son los estudios en donde se ha determinado la capacidad de degradación de HAPs de alto peso molecular por cepas termófilas (Zeinali *et al.*, 2007; Mohamed *et al.*, 2006; Viamajala *et al.*, 2007; Zheng *et al.*, 2011). Entre los géneros termófilos sobresalientes como degradadores de HAPs se encuentran *Nocardia*, *Mycobacterium*, *Geobacillus* y *Bacillus*. Este último es conocido por estar presente en una gran diversidad de ambientes (Layton *et al.*, 2011) confiriendo a éste ventajas para su supervivencia en sitios extremos y/o con presencia de compuestos contaminantes.

El comportamiento que presenta la cepa *B. licheniformis* M2-7 en presencia de BaP fue determinado mediante la concentración de proteína total en el medio de cultivo (figura 1A) así como por viabilidad celular (figura 1B), mostrando que no hay un aumento en la cantidad de proteína ni de células viables durante las 24 h de cultivo en el control ($\sim 1.2 \times 10^5$ células mL⁻¹) o cuando es expuesta a 10 µg de BaP ($\sim 1.6 \times 10^5$ células mL⁻¹). Sin embargo, es evidente que la cepa M2-7 está llevando a cabo un proceso de biotransformación del BaP durante ese periodo de cultivo, ya que los datos de cromatografía en capa fina mostraron la presencia de compuestos que difieren al patrón de fluorescencia del BaP (C1, C2 y C3; figura 2). Además, mediante un ensayo de fotooxidación (figura 3) se observó que estos compuestos no sufren un proceso de fotooxidación ya que, al comparar los diferentes puntos en la placa, se observa una mancha intensa que indica la oxidación del BaP. Como se indica en la literatura la estructura química del BaP es susceptible a sufrir un proceso de fotooxidación cuando es expuesto a luz y O₂ generando quinonas (Kot-Wasik *et al.*, 2004), por lo cual los datos obtenidos sugieren que los compuestos C1, C2 y C3 son fotoestables.

Reportes en la literatura indican que el primer paso en la biodegradación o biotransformación de HAPs se debe a la acción de dioxigenasas, las cuales incorporan átomos de oxígeno en los carbonos dentro del anillo de benceno, lo que resulta en la formación de dihidrodioles que continua hasta la formación de intermediarios del ciclo del ácido tricarbóxico (Samanta *et al.*, 2002), y la mayoría de las transformaciones llevadas a cabo por bacterias reducen la mutagenicidad logrando detoxificar el HAP (Juhasz *et al.*, 2000). Los datos antes mencionados sugieren un fenómeno que puede deberse a un proceso de detoxificación por parte de la cepa *B. licheniformis* M2-7 frente al BaP.

Debido a que el BaP es un compuesto mutagénico, tumorigénico y además se encuentra ampliamente distribuido en el ambiente, es importante determinar si la biotransformación de este compuesto origina intermediarios que posean un mayor o menor grado de toxicidad (Moody *et al.*, 2004). En base a los datos obtenidos mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas, se demostró que el compuesto 1 difiere del BaP, ya que sus tiempos de retención fueron 17.36 min. (Anexo II, figura 8A) y 22.22 min (Anexo I, figura 7A), respectivamente. Además se demostró por RMN ^1H y ^{13}C que el compuesto 1 es ácido ftálico (Anexo II, figura 8C y D) generado como un metabolito intermediario durante la biotransformación de BaP por la cepa M2-7 durante las primeras 24 h de exposición a éste. Estos datos se asemejan, aunque de manera no específica, a los resultados mostrados por Sowada *et al.*, en 2014 donde demuestran la capacidad de una cepa de *B. licheniformis* procedente de la microbiota de la piel para realizar procesos de biodegradación/biotransformación de BaP, sin embargo, aún sin caracterizar los metabolitos, consideran los sobrenadantes obtenidos como potencialmente tóxicos y a los cuales le atribuyen la disminución en el crecimiento de la cepa. Además Bang *et al.*, en 2011 conjuntan datos que sustentan el papel del ácido ftálico como un compuesto de toxicidad aguda baja; estos datos sugieren que la disminución en la viabilidad celular de *B. licheniformis* M2-7 ($\sim 1.6 \times 10^5$ células mL^{-1}) cuando es expuesta a BaP ($10 \mu\text{g}$) puede deberse a un efecto tóxico que ejerce el ácido ftálico sobre la cepa M2-7, sin embargo para comprobar este fenómeno es necesario realizar pruebas de citotoxicidad de este compuesto. Por otro lado, no se debe descartar el hecho de que la cepa termófila *B. licheniformis* M2-7 puede estar realizando un

proceso de detoxificación al generar ácido ftálico a partir de BaP, y por ende no se observa crecimiento (figura 1).

Hasta la fecha, la presencia de ácido ftálico como un intermediario en la degradación de HAPs de alto peso molecular ha sido observada en la ruta de degradación de pireno por la cepa *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 propuesta por Kim *et al.*, (2007), así como por Meena *et al.*, (2016) quienes reportan la presencia de ácido ftálico durante el metabolismo de pireno por la cepa *B. megaterium* YB3 y estableciéndolo como un probable metabolito terminal. Peng *et al.*, (2012) reportan la cepa *Arthrobacter oxydans* B4 capaz de biodegradar BaP, observando el ácido 1,2-benzenodicarboxílicobutilmetilester y dibutil ftalato como intermediarios. Sin embargo, en nuestro conocimiento y en base a la literatura consultada, no hay reportes sobre la presencia de ácido ftálico como un intermediario en la transformación de BaP por el género *Bacillus*, por lo cual el presente estudio puede ser considerado como el primero en realizar dicho reporte.

Como ya se encuentra reportado en la literatura, el primer paso en la biodegradación o biotransformación de HAPs se debe a la acción de enzimas denominadas dioxigenasas (Samanta *et al.*, 2002). Por lo anterior, mediante un análisis proteómico se realizó la búsqueda de diferencias en el patrón de expresión de proteínas en la cepa M2-7 expuesta a 10 µg de BaP. Los datos obtenidos no demuestran cambios significativos en el patrón de expresión cuando la cepa fue sometida a BaP o cultivada en condiciones de inanición durante las 24 h de cultivo (figura 4 y 5). A pesar de las ventajas del estudio del proteoma de microorganismo con ayuda de geles de 2D, como lo son el uso de equipo relativamente barato y bajos requerimientos de muestra, fraccionamiento de los péptidos con una alta resolución y sensibilidad con pérdida mínima de especies hidrófobas, muchas veces es considerada una técnica con características que limitan su uso en procesos de biodegradación o biotransformación ya que es un procedimiento que requiere mucho tiempo y carece de automatización; además de la necesidad indiscutible de realizar estudios repetidos (al menos tres estudios repetidos por muestra) para la evaluación de la reproducibilidad del patrón

proteico así como el tiempo necesario para la evaluación e interpretación de los datos (Chauhan y Jain, 2010).

A pesar de lo observado, es importante señalar que el rango de pH utilizado en el estudio es de 4 a 8, limitando el análisis de probables enzimas, por lo cual hablar de una ausencia de proteínas y/o enzimas que estén involucradas en la biotransformación de BaP no es adecuado. Estudios realizados por Kim *et al.*, en 2007 observan un fenómeno similar mientras analizaron las proteínas involucradas en la degradación de pireno por *M. vanbaalenii* PYR-1, encontrando un total de 25 proteínas involucradas en la degradación de HAPs, sin embargo el análisis es realizado en un gel de una dimensión. Por lo anterior, el análisis de las proteínas de la cepa M2-7 involucradas en la biotransformación de BaP se llevó a cabo siguiendo una estrategia diferente, la cual consistió en medir la actividad de enzimas dioxigenasas y poder comprobar la participación de éstas en el proceso de biotransformación de BaP por *B. licheniformis* M2-7.

La búsqueda bioinformática de genes que codifican enzimas implicadas en la degradación de HAPs de alto peso molecular mostró la presencia del gen que codifica para la enzima C23O en la cepa *B. licheniformis* ATCC 1458 (Rey *et al.*, 2004). Los datos antes mencionados sugieren la presencia de este gen de manera cromosomal en cepas de *B. licheniformis*, sin embargo es preciso realizar ensayos para comprobar dicha hipótesis. Además, en el presente estudio, la cepa termófila *B. licheniformis* M2-7 mostró actividad de la enzima C23O (0.33 U/mg de proteína) en un cultivo con 20 µg de BaP de 3 h. Se ha demostrado que en los primeros pasos de la degradación de HAPs las dioxigenasas catalizan las reacciones de oxidación permitiendo la ruptura del anillo de benceno, formando *cis*-dihidrodiolés como primeros intermediarios (Pandey *et al.*, 2016).

La capacidad de las dioxigenasas para mediar la generación de intermediarios durante el metabolismo de HAPs ha sido ampliamente demostrada. Meena *et al.*, (2016) reportan que la cepa *B. megaterium* YB3 es capaz de biotransformar pireno a ácido fenantrenodicarboxílico y ácido 1,2-bencenodicarboxílico (ácido ftálico) mediante la actividad de las enzimas C120 y naftaleno dioxigenasa. Por otra parte, la presencia de la enzima catecol 1,2-dioxigenasa fue encontrada en la cepa *Bacillus* sp. TN41 durante su exposición a fenol (Đokić *et al.*, 2011b).

Lo anterior sugiere que la cepa M2-7 puede llevar a cabo un ataque en la región bahía del BaP mediante la enzima C23O, la cual incorpora oxígeno molecular generando BaP-9,10-dihidrodiol, el cual posteriormente es escindido por la misma enzima vía *meta*, generando ácido ftálico como un intermediario (Fig. 5).

Las enzimas involucradas en el catabolismo de HAPs han sido ampliamente estudiadas en las últimas décadas. Sin embargo, el conocimiento de la biodegradación o biotransformación bacteriana proviene de estudios sobre la degradación de HAPs de bajo peso molecular por bacterias mesófilas, por lo cual las enzimas y genes involucrados en la degradación de HAPs de alto peso molecular en cepas termófilas no han sido completamente elucidados (Sho *et al.*, 2004), por lo que se requiere de más análisis bioquímicos y genómicos para entender la fisiología de la cepa M2-7 durante su exposición a BaP.

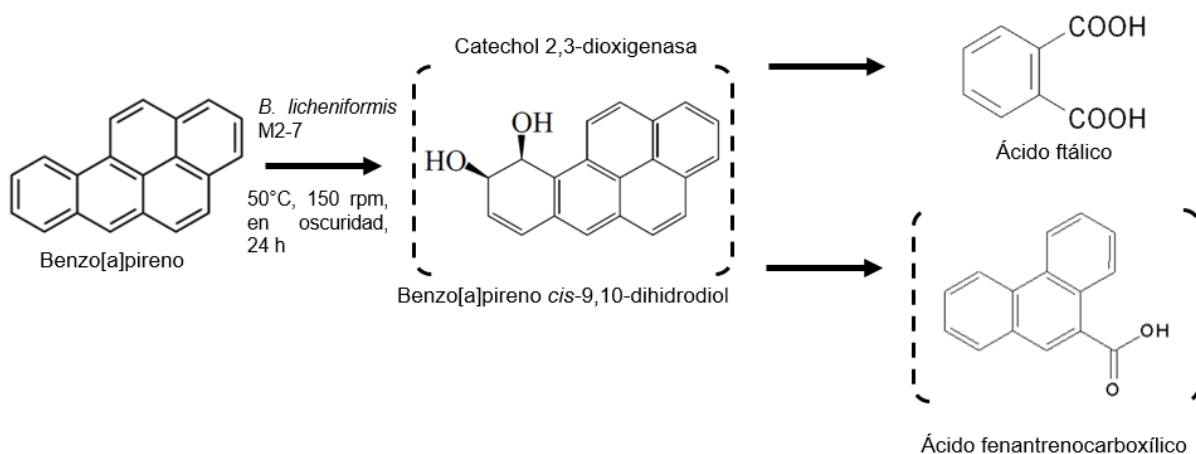


Figura 5. Vía propuesta en la biotransformación de BaP por la cepa termófila *B. licheniformis* M2-7. Las líneas discontinuas muestran compuestos candidatos no identificados en el presente estudio.

CONCLUSIONES

- La cepa termófila *B. licheniformis* M2-7 puede realizar la biotransformación de BaP a una concentración de 10 µg. Además se observó que esta cepa puede biotransformar pireno.
- *B. licheniformis* M2-7 biotransformar BaP a ácido ftálico durante las primeras 24 horas de cultivo a una temperatura de 50°C.
- El análisis proteómico de la cepa *B. licheniformis* M2-7 no mostró un cambio en el patrón de expresión de proteínas bajo la condición control ni en presencia de BaP. Sin embargo, se detectó la actividad de la catecol 2,3-dioxigenasa (0.33 U/mg de proteína) durante las primeras 3 h de cultivo en presencia de 10 µg de BaP.
- Los resultados muestran que la cepa M2-7 puede ser candidata para realizar la biotransformación de BaP en un corto tiempo (3 a 24 h), por lo cual se puede emplear en estrategias de biodegradación acopladas a cultivos de otros microorganismos y así favorecer la mineralización del BaP.

ANEXOS

ANEXO I

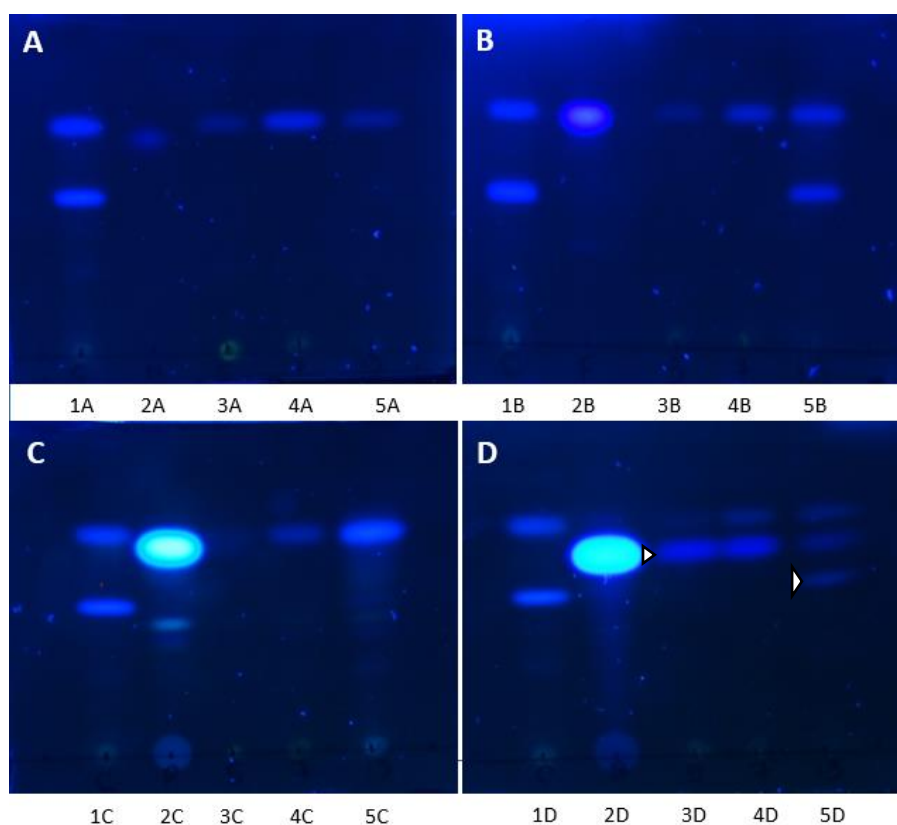


Figura 6. Cromatografía en capa fina de extractos obtenidos con acetato de etilo del cultivo de la cepa *B. licheniformis* M2-7 en diferentes HAPs. Panel A, Naftaleno (1A medio de cultivo sin inculo ni naftaleno; 2A, referencia de naftaleno; 3A, 4A y 5A representan los extractos de 5, 7 y 13 días de cultivo, respectivamente); Panel B Fenantreno (1B medio de cultivo sin inculo ni fenantreno; 2B, referencia de fenantreno; 3B, 4B y 5B representan los extractos de 5, 7 y 13 días de cultivo, respectivamente); Panel C, Pireno (1C, medio de cultivo sin inculo ni pireno; 2C, referencia de pireno; 3C, 4C y 5C representan los extractos de 5, 7 y 13 días de cultivo, respectivamente); Panel D, Benzo[a]pireno (1D, medio de cultivo sin inculo ni BaP; 2D, referencia de Benzo[a]pireno; 3D, 4D y 5D representan los extractos de 5, 7 y 13 días de cultivo, respectivamente). Los extractos representan la colecta de triplicados del cultivo en momentos independientes.

ANEXO II

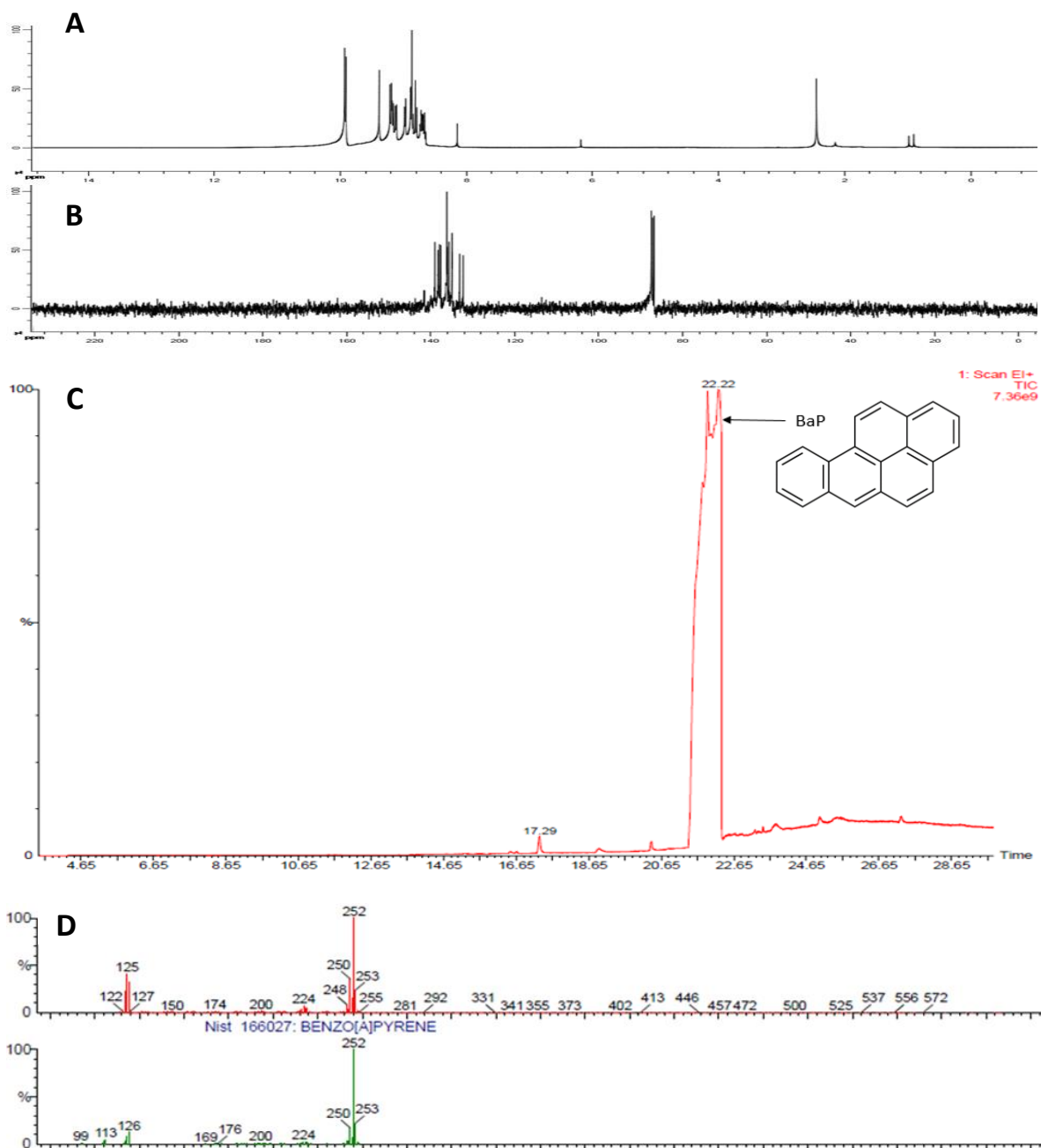


Figura 7. Análisis químico del BaP. A) Espectro de RMN ^1H ; B) espectro de RMN ^{13}C ; C) Cromatografía de gases del BaP, y D) espectro de masas y espectro de coincidencia consultado en la base de datos NIST.

ANEXO III

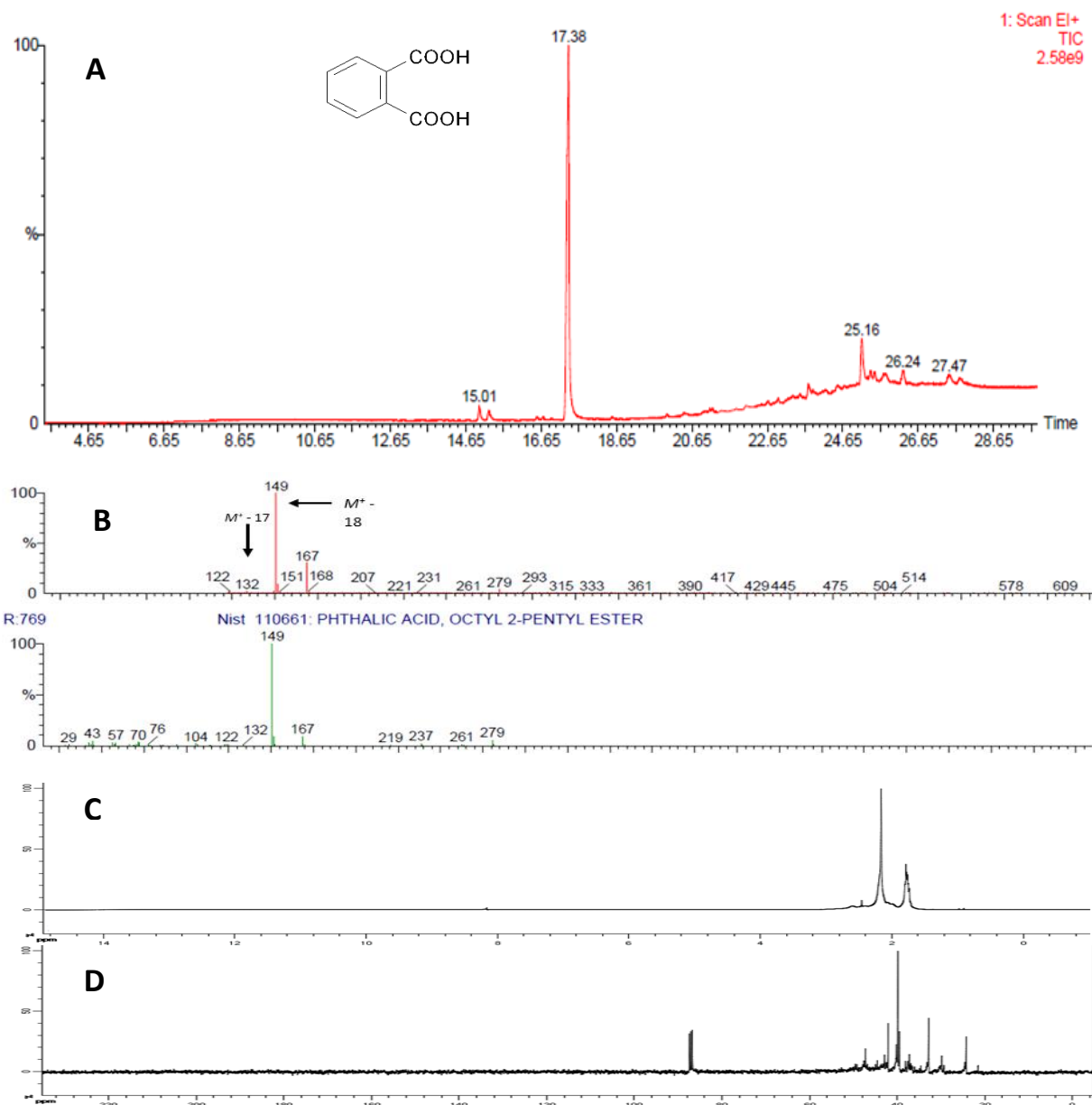


Figura 8. Análisis químico del compuesto 1. A) Cromatografía de gases del compuesto; B) espectro de masas y espectro de coincidencia consultado en la base de datos NIST para el compuesto 1; C) espectro de RMN ^1H , y D) espectro de RMN ^{13}C .

ANEXO IV



Figura 9. Análisis de la secuencia de la enzima C230 en cepas pertenecientes al género *Bacillus*. Búsqueda bioinformática de la secuencia del gen que codifica para la enzima Catecol 2,3-dioxigenasa en cepas pertenecientes al género *Bacillus* mediante BLAST, utilizando la base de datos de NCBI.

REFERENCIAS

- Abdel-Shafy, H.I., Mansour, M.S.M.** (2016). A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egypt. J. Pet.* 25, 107–123.
- Alvarez-Fitz, P., Alvarez, L., Marquina, S., Luna-Herrera, J., Navarro-García, V.M.** (2012). Enzymatic reduction of 9-methoxytariacuripyronone by *Saccharomyces cerevisiae* and its antimycobacterial activity. *Mol. Basel Switz.* 17, 8464–8470.
- Annweiler, E., Richnow, H.H., Antranikian, G., Hebenbrock, S., Garms, C., Franke, S., Francke, W., Michaelis, W.** (2000). Naphthalene Degradation and Incorporation of Naphthalene-Derived Carbon into Biomass by the Thermophile *Bacillus thermoleovorans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 518–523.
- Bang, D.Y., Lee, I.K., Lee, B.-M.** (2011). Toxicological Characterization of Phthalic Acid. *Toxicol. Res.* 27, 191–203.
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Bubinas, A., Giedraitytė, G., Kalėdienė, L., Nivinskiene, O., Butkiene, R.** (2008). Degradation of naphthalene by thermophilic bacteria via a pathway, through protocatechuic acid. *Cent. Eur. J. Biol.* 3, 61–68.
- Chauhan, A., Fazlurrahman, Oakeshott, J.G., Jain, R.K.** (2008). Bacterial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: strategies for bioremediation. *Indian J. Microbiol.* 48, 95–113.
- Chauhan, A., Jain, R.K.** (2010). Biodegradation: gaining insight through proteomics. *Biodegradation* 21, 861–879.
- Chen, S.-H., Aitken, M.D.** (1999). Salicylate Stimulates the Degradation of High-Molecular Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by *Pseudomonas saccharophila* P15. *Environ. Sci. Technol.* 33, 435–439.
- Chen, H., Song, Q., Diao, X., Zhou, H.** (2016). Proteomic and metabolomic analysis on the toxicological effects of Benzo[a]pyrene in pearl oyster *Pinctada martensii*. *Aquat. Toxicol.* 175, 81–89.
- Cope, W.C., y D.R. Kalkwarf.** (1987). Photooxidation of selected polycyclic aromatic hydrocarbons and pyrenequinones coated on glass surfaces. *Environ. Sci. Technol.* 21, 643-648.
- Đokić L, Narancic T, Nikodinovic-Runic J, Bajkic S, Vasiljevic B.** (2011b) Four *Bacillus sp.* soil isolates capable of degrading phenol, toluene, biphenyl, naphthalene, and other aromatic compounds exhibit different aromatic catabolic potentials. *Arch Biol Sci* 63: 1057– 1067.
- Encarnación, S., Hernández, M., Martínez-Batallar, G., Contreras, S., Vargas, M. del C., Mora, J.** (2005). Comparative proteomics using 2-D gel electrophoresis and mass spectrometry as tools to dissect stimulons and regulons in bacteria with sequenced or partially sequenced genomes. *Biol. Proced.* 117–135.

- Guzik, U., Hupert-Kocurek, K., Sitnik, M., Wojcieszynska, D.** (2013). High activity catechol 1,2-dioxygenase from *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2 as a useful tool in cis,cis-muconic acid production. *Antonie Van Leeuwenhoek* 103, 1297–1307.
- Haritash, A.K., Kaushik, C.P.** (2009). Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *J. Hazard. Mater.* 169, 1–15.
- Harvey, R.G.** (1996). Mechanisms Of Carcinogenesis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Polycycl. Aromat. Compd.* 9, 1–23.
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans.** (2010). Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.* 92, 1–853.
- Kim, S.-J., Kweon, O., Jones, R.C., Freeman, J.P., Edmondson, R.D., Cerniglia, C.E.** (2007). Complete and Integrated Pyrene Degradation Pathway in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 Based on Systems Biology. *J. Bacteriol.* 189, 464–472.
- Juhasz, A. I., Stanley, G. a., Britz, M. I.** (2000). Microbial degradation and detoxification of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia* strain VUN 10,003. *Let. Appl. Microbiol.* 30, 396–401.
- Kot-Wasik, A., Dbrowska, D., Namieśnik, J.** (2004). Photodegradation and biodegradation study of benzo(a)pyrene in different liquid media. *J. Photochem. Photobiol. Chem.* 168, 109–115.
- Layton, C., Maldonado, E., Monroy, L., Constanza-Corrales, L., Consuelo-Sánchez, L.** (2011). *Bacillus spp.*; perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos. *NOVA - Publicación Científica EN CIENCIAS BIOMÉDICAS.* 15(9), 113 - 214
- Lily, M.K., Bahuguna, A., Dangwal, K., Garg, V.** (2009). Degradation of Benzo[a]pyrene by a novel strain *Bacillus subtilis* BMT4i (MTCC 9447). *Braz. J. Microbiol. Publ. Braz. Soc. Microbiol.* 40, 884–892.
- Lu X.Y., Zhang T, Fang H.H.** (2011). Bacteria-mediated PAH degradation in soil and sediment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89, 1357–1371.
- Ma, Y.-L., Lu, W., Wan, L.-L., Luo, N.** (2014). Elucidation of Fluoranthene Degradative Characteristics in a Newly Isolated *Achromobacter xylosoxidans* DN002. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 175, 1294–1305.
- Meena, S.S., Sharma, R.S., Gupta, P., Karmakar, S., Aggarwal, K.K.** (2016). Isolation and identification of *Bacillus megaterium* YB3 from an effluent contaminated site efficiently degrades pyrene. *J. Basic Microbiol.* 55, 1–10.
- Mohamed, M.E., Al-Dousary, M., Hamzah, R.Y., Fuchs, G.** (2006). Isolation and characterization of indigenous thermophilic bacteria active in natural attenuation of bio-hazardous petrochemical pollutants. *Int. Biodeterior. Biodegrad., 13th International Biodeterioration and Biodegradation Symposium: State-of-the-Art in Biodeterioration, Biodegradation, and Bioremediation* 58, 213–223.

- Mohandass, R., Rout, P., Jiwal, S., Sasikala, C.** (2012). Biodegradation of benzo[a]pyrene by the mixed culture of *Bacillus cereus* and *Bacillus vireti* isolated from the petrochemical industry. *J. Environ. Biol. Acad. Environ. Biol. India* 33, 985–989.
- Moody, J.D., Freeman, J.P., Fu, P.P., Cerniglia, C.E.** (2004). Degradation of Benzo[a]pyrene by *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 340–345.
- Müller, R., Antranikian, G., Maloney, S., Sharp, R.** (1998). Thermophilic degradation of environmental pollutants, in: Antranikian, G. (Ed.). *Biotechnology of Extremophiles, Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 155–169.
- Peng, H., Yin, H., Deng, J., Ye, J.-S., Chen, S.-N., He, B.-Y., Zhang, N.** (2012). Biodegradation of Benzo[a]pyrene by *Arthrobacter oxydans* B4. *Pedosphere* 22, 554–561.
- Ping, L., Zhang, C., Zhang, C., Zhu, Y., He, H., Wu, M., Tang, T., Li, Z., Zhao, H.** (2014). Isolation and characterization of pyrene and benzo[a]pyrene-degrading *Klebsiella pneumonia* PL1 and its potential use in bioremediation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 3819–3828.
- Rentz, J.A., Alvarez, P.J.J., Schnoor, J.L.** (2008). Benzo[a]pyrene degradation by *Sphingomonas yanoikuyae* JAR02. *Environ. Pollut.* 151, 669–677.
- Rey, M.W., Ramaiya, P., Nelson, B.A., Brody-Karpin, S.D., Zaretsky, E.J., Tang, M., Lopez de Leon, A., Xiang, H., Gusti, V., Clausen, I.G., Olsen, P.B., Rasmussen, M.D., Andersen, J.T., Jørgensen, P.L., Larsen, T.S., Sorokin, A., Bolotin, A., Lapidus, A., Galleron, N., Ehrlich, S.D., Berka, R.M.** (2004). Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species. *Genome Biol.* 5, R77.
- Samanta, S.K., Singh, O.V., Jain, R.K.** (2002). Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends Biotechnol.* 20, 243–248.
- Sawulski, P., Clipson, N., Doyle, E.** (2014). Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on microbial community structure and PAH ring hydroxylating dioxygenase gene abundance in soil. *Biodegradation* 25, 835–847.
- Seo, J.-S., Keum, Y.-S., Li, Q.X.** (2009). Bacterial Degradation of Aromatic Compounds. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 6(1), pp. 278–309.
- Sho, M., Hamel, C., Greer, C.W.** (2004). Two distinct gene clusters encode pyrene degradation in *Mycobacterium* sp. strain S65. *FEMS Microbiol. Ecol.* 48, 209–220.
- Sowada, J., Schmalenberger, A., Ebner, I., Luch, A., Tralau, T.** (2014). Degradation of benzo[a]pyrene by bacterial isolates from human skin. *FEMS Microbiol. Ecol.* 88, 129–139.
- Unkefer, C.J., London, R.E., Whaley, T.W., Daub, G.H.** (1983). Carbon-13 and proton NMR analysis of isotopically labeled benzo[a]pyrenes. *J. Am. Chem. Soc.* 105, 733–735.
- USEPA** (The United States Environmental Protection Agency). IEA Coal Research (1984). List of the Sixteen PAHs with Highest Carcinogenic Effect.

- Vandera, E., Samiotaki, M., Parapouli, M., Panayotou, G., Koukkou, A.I.** (2015). Comparative proteomic analysis of *Arthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3 on phenanthrene, phthalate and glucose. *J. Proteomics* 113, 73–89.
- Viamajala, S., Peyton, B.M., Richards, L.A., Petersen, J.N.** (2007). Solubilization, solution equilibria, and biodegradation of PAH's under thermophilic conditions. *Chemosphere* 66, 1094–1106.
- Wang, X.-B., Chi, C.-Q., Nie, Y., Tang, Y.-Q., Tan, Y., Wu, G., Wu, X.-L.** (2011). Degradation of petroleum hydrocarbons (C6-C40) and crude oil by a novel *Dietzia* strain. *Bioresour. Technol.* 102, 7755–7761.
- Wojcieszynska, D., Guzik, U., Greń, I., Perkosz, M., Hupert-Kocurek, K.** (2010). Induction of aromatic ring: cleavage dioxygenases in *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2 in cometabolic systems. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 27, 805–811.
- Zeinali, M., Vossoughi, M., Ardestani, S. K.** (2007). Characterization of a moderate thermophilic *Nocardia* species able to grow on polycyclic aromatic hydrocarbons. *Lett. Appl. Microbiol.* 45, 622–628.
- Zeinali, M., Vossoughi, M., Ardestani, S.K.** (2008). Naphthalene metabolism in *Nocardia otitidiscaviarum* strain TSH1, a moderately thermophilic microorganism. *Chemosphere* 72, 905–909.
- Zhang, J., Zhang, X., Liu, J., Li, R., Shen, B.,** (2012). Isolation of a thermophilic bacterium, *Geobacillus* sp. SH-1, capable of degrading aliphatic hydrocarbons and naphthalene simultaneously, and identification of its naphthalene degrading pathway. *Bioresour. Technol.* 124, 83–89.
- Zheng, C., He, J., Wang, Y., Wang, M., Huang, Z.** (2011). Hydrocarbon degradation and bioemulsifier production by thermophilic *Geobacillus pallidus* strains. *Bioresour. Technol.* 102, 9155–9161.