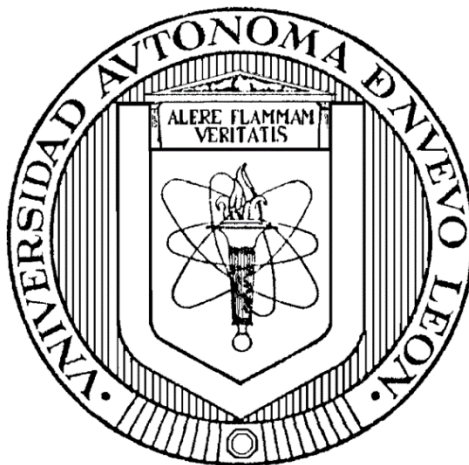


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**CARACTERIZACIÓN DE LOS GENES *TOD* EN  
BACTERIAS AISLADAS DE POZOS PETROLEROS DEL  
ESTADO DE VERACRUZ**

**Por**

**José Norberto García Miranda**

**Como requisito para obtener el Grado de MAESTRÍA EN  
CIENCIAS con Orientación en Microbiología Aplicada**

CARACTERIZACIÓN DE LOS GENES *TOD* EN  
BACTERIAS AISLADAS DE POZOS PETROLEROS DEL  
ESTADO DE VERACRUZ

Aprobación de Tesis:

---

Dr. Edgar Allan Blanco Gámez

Presidente

---

Dra. María Teresa Garza González

Secretaria

---

Dr. Xristo Zárate Kalfópulos

Vocal

---

Dra. María Araceli Hernández Ramírez

Sub-Directora de Estudios de Posgrado

CARACTERIZACIÓN DE LOS GENES *TOD* EN  
BACTERIAS AISLADAS DE POZOS PETROLEROS DEL  
ESTADO DE VERACRUZ

Revisión de Tesis:

---

Dr. Edgar Allan Blanco Gámez

ASESOR

---

Dra. María Teresa Garza González

COMITÉ TUTORIAL

---

Dr. Xristo Zárate Kalfópulos

COMITÉ TUTORIAL

---

Dra. Melissa Marlene Rodríguez Delgado

COMITÉ TUTORIAL

## Resumen

José Norberto García Miranda

Fecha de graduación: Diciembre del 2017

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título de estudio: CARACTERIZACIÓN DE LOS GENES *TOD* EN BACTERIAS AISLADAS DE POZOS PETROLEROS DEL ESTADO DE VERACRUZ.

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias

Número de páginas: 77

Área de Estudio: Microbiología Aplicada

**Propósito y Método de Estudio:** Se reactivaron y se obtuvieron cultivos axénicos de las cepas aisladas de pozos petroleros del cepario de la FCQ de la UANL, una cepa de *E. coli* ATCC® CRM-11229™, y una de *Pseudomonas* sp. del Centro Ambiental de la Universidad de Lancaster. Las cepas aisladas de pozos petroleros se determinaron hasta género y especie por pruebas bioquímicas y por la extracción de DNA genómico y amplificación por PCR del gen de la subunidad pequeña 16S rRNA. Se hicieron pruebas de crecimiento en fenantreno y se seleccionaron las cepas con un mejor crecimiento y después, se hicieron ensayos de mineralización con estas cepas usando tolueno y fenantreno marcado con <sup>14</sup>C. Se alinearon y obtuvieron las secuencias consenso de los genes *tod* y con ello diseñaron 5 pares de oligonucleótidos para los genes *todC1*, *todD*, *todE*, *todG* y *todH*. Con los pares de oligonucleótidos se realizaron las PCR para amplificar los genes *tod* de las cepas capaces de mineralizar tolueno y fenantreno. El propósito de este estudio es saber cómo la mineralización de hidrocarburos por parte de especies de bacterias puede variar si están presentes o no los genes *tod*.

**Contribuciones y conclusiones:** Se determinaron las 13 cepas que pertenecieron a las especies *Bacillus thurigiensis*, *Bacillus subtilis*, *Lysinibacillus fusiformis*, *Aneirinibacillus* sp., *Paenibacillus dendritiformis* y *Pseudomonas aeruginosa*. Las cepas que mejor crecieron en fenantreno fueron *Aneirinibacillus* sp. (T1-1), *Lys fusiformis* (T3-1) y *P. aeruginosa* (T3-3v). Las cepas pudieron mineralizar el tolueno y fenantreno, aunque la que mayor capacidad tuvo para hacerlo en ambos casos fue *Aneirinibacillus* sp (T1-1, 1.71% para tolueno y 5.59% para fenantreno). Al amplificar los genes *tod C1*, D, E, G y H sólo se observó una banda que pudiese corresponder para el gen *todC1* en la cepa *Pseudomonas* sp. (Pseudo LEC), que fue la que menor capacidad de mineralización tuvo, por lo que la presencia de estos genes no está relacionada con la capacidad de mineralización de tolueno y fenantreno.

---

Dr. Edgar Allan Blanco Gámez

## **Agradecimientos**

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de manutención y la beca mixta otorgadas para realizar mis estudios de maestría y el intercambio académico.

Un agradecimiento a la Universidad Autónoma de Nuevo León y a la Facultad de Ciencias Químicas por los recursos, las instalaciones y por ser -como dice su himno- “Fuente inagotable del saber”.

Quiero agradecer a mis asesores, los doctores Edgar Allan Blanco y Ulrico Javier López Chuken, por el apoyo brindado para la realización de este trabajo, por la oportunidad de permitirme trabajar con ellos y permitirme conocer un poco más del mundo.

Le doy las gracias a los doctores María Teresa Garza González, Melissa Marlene Rodríguez Delgado y Xristo Zárate Kalfópulos, miembros del comité tutorial, por el tiempo, las correcciones y el apoyo, en ocasiones, con reactivos.

Un especial agradecimiento al Dr. Jesús Alberto Gómez Treviño, por dejarme ser un miembro agregado de su laboratorio, y con ello poder robarle su tiempo, reactivos, usar su equipo y siempre aportar algo bueno tanto a mi trabajo como a mi persona.

Agradezco también al Profesor Kirk T. Semple, al Dr, Alfonso José Lag Brotons y a la Dra. Gabriela Marisol Vázquez Cuevas por la oportunidad de realizar la estancia en la Universidad de Lancaster, experiencia que hasta ahora no puedo comparar con ninguna otra, me quedaría corto si lo intentase describir aquí con palabras, en verdad muchísimas gracias.

A mis profes que conozco desde que nací -mis papás- que soy lo que soy por ellos; a mi hermana y a mi cuñado, por recibirme y apoyarme cuando llegue sin poner pero alguno; a mis amigos que, sin importar la distancia o el apenas habernos conocido, siempre estuvieron ahí para escucharme y dejarme hacer catarsis con ellos; y a mi novia, Silvia, por sacar lo poco químico que hay en mí y estar a mi lado.

## Dedicatoria

Esta parte me gustaría empezarla con una cita del libro "Sobre la agresión: el pretendido mal" de Konrad Lorenz, etólogo austriaco ganador del Premio Nobel en 1973 por sus trabajos sobre los instintos maternos, la cual dice así:

"Son muchos, aún entre quienes por lo demás dan muestras de comprender la naturaleza, los que consideran exagerada y rara esta manía del biólogo de preguntarse ante cada mancha de color de un animal cuál es su posible función para la conservación de la especie y que proceso de selección natural pudo haberla producido. Muchas veces hemos comprobado que algunos nos condenan por ello y nos califican de materialistas insensibles a los valores. Pero siempre que pueda obtenerse una respuesta razonable hay derecho de hacer la pregunta, y de ningún modo disminuyen el valor y la belleza de un fenómeno natural por averiguar el porqué está hecho así y no de otro modo..."

Es por ello por lo que quiero dedicar este sencillo trabajo en primera, a aquellos que ven la belleza en responder esas cuestiones que siempre están en nuestro alrededor, y en vez de verlo como onerosa empresa, se desviven y deleitan haciéndolo. También lo dedico a esas dos personas que me explicaban el contenido de las enciclopedias Fauna, de la Salvat y a quien me enseñó que el capital se puede administrar bien en el pueblo si hay un buen gobierno. Yo sé que estas segundas personas a veces me califican de "materialista insensible a los valores", pero sin ellas no estaría escribiendo este trabajo... gracias papás.

# Índice

1.- Introducción.....	1
1.1.-Hidrocarburos y su importancia en la actualidad .....	1
1.2.-Legislacion en uso y disposición de hidrocarburos y sus residuos .....	2
1.3.- Problemas asociados al uso de hidrocarburos .....	3
1.4.- Remediación de zonas contaminadas con hidrocarburos .....	4
2.- Antecedentes .....	8
2.1.- Potencial de las bacterias para biorremediación de suelos .....	8
2.2.- Vías metabólicas bacterianas para la degradación de hidrocarburos .....	9
2.3.- Genes <i>tod</i> y su relación con la degradación de hidrocarburos.....	12
2.3.1.-Tolueno dioxigenasa (genes <i>todABC1C2</i> ).....	15
2.3.2.-Cis-tolueno dihidrol deshidrogenasa ( <i>todD</i> ).....	16
2.3.3.-Catecol 2, 3 dioxigenasa ( <i>todE</i> ) .....	17
2.3.4.-2-hidroxi 6-oxo 2,4-heptadienoato hidrolasa ( <i>todF</i> ) .....	18
2.3.5.-2-ceto 4-pentenoato hidratasa ( <i>todG</i> ).....	19
2.3.6.-4-hidroxi 2-cetovalerato aldolasa ( <i>todH</i> ) .....	19
2.3.7.-Acetaldehído deshidrogenasa ( <i>todI</i> ).....	20
3.- Aportación científica .....	22
4.- Hipótesis.....	23
5.- Objetivo general .....	24
5.1.- Objetivos específicos.....	24
6.- Metodología.....	25
6.1.-Reactivación de las cepas aisladas de suelo contaminado con petróleo. .....	25
6.2.- Determinación de las cepas hasta género y especie. ....	26
6.2.1.- Tinción Gram y pruebas bioquímicas .....	26
6.2.2 Determinación por medio del gen 16S del rRNA .....	27
6.3 Análisis de la capacidad de mineralización.....	28
6.3.1 Crecimiento de las cepas en fenantreno.....	28
6.3.2 Ensayos de mineralización con compuestos marcados con <sup>14</sup> C.....	29

6.4	Diseño de los oligonucleótidos para la amplificación de los genes <i>tod</i> ....	30
6.5.-	Detección de los genes por PCR.....	32
6.6.-	Disposición de residuos.....	33
7.-	Resultados .....	34
7.1.-	Reactivación de las cepas .....	34
7.2	Determinación hasta género y especie.....	37
7.2.1	Pruebas bioquímicas y API-20E .....	37
7.2.2	Extracción de DNA genómico y análisis del gen 16S rRNA. ....	39
7.3	Determinación de la capacidad de mineralización .....	42
7.3.1	Curvas de crecimiento .....	42
7.3.2	Ensayos de mineralización .....	44
7.4.-	Diseño de los oligonucleótidos para amplificar los genes <i>tod</i> .....	48
7.5.-	Amplificación de los genes <i>tod</i> por PCR.....	51
7.6.-	Disposición de los residuos generados .....	53
8.-	Discusión.....	54
9.-	Conclusiones .....	59
10.-	Referencias .....	61
11.-	Anexos .....	64
11.1.-	Resultados de la secuenciación de los fragmentos amplificado por PCR .....	64
11.2.-	Curvas de crecimiento de las cepas en fenantreno y glucosa .....	72
11.3.-	Filogramas de los genes <i>tod</i> .....	73
11.4.-	Geles de la amplificación de los genes <i>tod</i> .....	77



## Tablas

Tabla 1.-Límites máximos permisibles para hidrocarburos específicos en suelo	3
Tabla 2- Descripción de los genes <i>tod</i> .....	14
Tabla 3.-Especificaciones consideradas al diseñar los oligonucleótidos .....	31
Tabla 4-Morfología macroscópica y microscópica de las cepas aisladas .....	35
Tabla 5.-Pruebas bioquímicas realizadas en bacterias Gram + .....	38
Tabla 6.-Resultados de las pruebas API-20E hechas en bacterias Gram - .....	39
Tabla 7. Oligonucleótidos para amplificar los genes <i>Tod</i> .....	50

## Figuras

Figura 1.-Vías por las cuales las bacterias pueden degradar hidrocarburos. ...	11
Figura 2.-Vías por las cuales Pseudomonas putida MT2 lleva a cabo la degradación de tolueno. ....	12
Figura 3.-Reacción catalizada por la tolueno dioxigenasa .....	15
Figura 4.-Reacción catalizada por la cis-tolueno dihidrodiol deshidrogenasa ...	16
Figura 5.-Reacción catalizada por la catecol 2,3 dioxigenasa.....	17
Figura 6.-Reacción catalizada por la 2-hidroxi 6-oxo 2,4-heptadienoato hidrolasa .....	18
Figura 7.-Reacción catalizada por la 2-ceto 4-pentenoato hidratasa.....	19
Figura 8.- Reacción catalizada por la 4-hidroxi 2-cetovalerato aldolasa.....	20
Figura 9.-Reacción catalizada por la aldehído deshidrogenasa .....	21
Figura 10.-Ensayos de mineralización. ....	30
Figura 11.-Cultivos axénicos y tinción Gram.. ....	36
Figura 12.- Pruebas bioquímicas para cepas Gram positivo. ....	38
Figura 13.-Resultados de pruebas API-20E.....	39
Figura 14.-DNA genómico y amplificación del gen 16S rRNA.....	40
Figura 15.-Filograma de las cepas.....	41
Figura 16.- Crecimiento en fenantreno y glucosa.....	43
Figura 17.- Porcentaje de mineralización de tolueno. ....	45
Figura 18.-Porcentaje de mineralización de fenantreno. ....	46
Figura 19.- Comparación de la mineralización por parte de las diferentes cepas de tolueno y fenantreno en el día 7.....	47

Figura 20 .-Filogramas de alineamiento de secuencias y presencia de genes tod. ....	49
Figura 21.- Amplificación de los genes tod. ....	52

## **Abreviaturas**

AN. Agar nutritivo.

ARDH. Dioxigenasa hidroxilantes de anillo aromático (del inglés Aromatic-Ring-Hydroxylating Dioxigenase).

BTX. Benceno, tolueno y xileno

CN. Caldo nutritivo.

CoA. Coenzima A.

Da. Dalton

DNA. Ácido desoxirribonucleico (del inglés Deoxyribonucleic acid).

DO. Densidad óptica.

INEGI. Instituto Nacional de Estadística y Geografía.

Kg. Kilogramo

l. Litro

LSC. Líquido para medir sincilación (del inglés Liquid Sincilation Counter).

MBS. Sales basales mínimas (del inglés Minimal Basal Salts).

Mbd. Miles de barriles diarios.

Min. Minuto

MMb. Millones de barriles.

MMpcd. Millones de pies cúbicos diarios.

Mt. Miles de toneladas

NAD<sup>+</sup>. Dinucleótido de nicotinamida y adenina

NADH. NAD<sup>+</sup> reducido

NCBI. Centro Nacional para Información Biotecnológica (del inglés National Center for Biotechnology Information)

nm. Nanómetro.

PCA. Agar cuenta en placa (del inglés Plate Count Agar).

PCR. Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés Polymerase Chain Reaction)

PM. Peso molecular.

rpm. Revoluciones por minuto.

SEMARNAT. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.

T<sub>m</sub>. Temperatura de fusión (del inglés Melting Temperature)

UPGMA. Agrupación de medias aritméticas no ponderadas (del inglés Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean).

V. Voltio.

WEC. Consejo Mundial de Energía (del inglés World Energy Council)

## **1.- Introducción**

### **1.1.-Hidrocarburos y su importancia en la actualidad**

Los hidrocarburos son combinaciones de carbono e hidrógeno los cuales son considerados los esqueletos fundamentales de las moléculas orgánicas. Los hidrocarburos se pueden clasificar en alifáticos -de cadena abierta-, cíclicos – alicíclicos- y aromáticos -hidrocarburos bencénicos-. La industria actualmente obtiene estos del petróleo, gas natural y carbón (Yúfera 1994). La composición del petróleo puede variar según el lugar del cual se extrae, pero en general tiene tres fracciones. La parafina, que es la fracción más abundante, contiene hidrocarburos alifáticos lineales y ramificados. Los naftos son hidrocarburos alicíclicos con uno o más anillos saturados con o sin ramas alifáticas laterales. Mientras que la fracción aromática está compuesta por hidrocarburos con al menos un anillo aromático (Fuentes, Méndez et al. 2014).

En la actualidad el petróleo es indispensable para para suministrar energía a los diversos medios de transporte, la industria y el hogar; además de ser moneda de cambio en la economía global y poderse transportar fácilmente. Para el año 2013 las reservas de petróleo son un 60% más grande y la producción de este aumentó un 25% comparado con los últimos 20 años. Se estima que las reservas de petróleo son de 223,454 Mt. Para el año 2011 se registró una

producción anual total de 3,973 Mt de petróleo, siendo los principales productores los países de Venezuela, Arabia Saudita, Canadá, Irán e Iraq (WEC, 2013). Para el caso de México, en el año 2011 se registró una producción de 2,553 Mdb de petróleo crudo y 6,594 MMpcd de gas natural y las reservas para el caso del petróleo se estiman en 30,613 MMb (INEGI, 2014).

## **1.2.-Legislacion en uso y disposición de hidrocarburos y sus residuos**

En la actualidad existen diferentes dependencias a nivel nacional involucradas en la legislación para la producción, manejo, uso y disposición de desechos relacionados con hidrocarburos por ejemplo las normas NOM-016-CRE-2016 y NOM-138-SEMARNAT/SS-2003 (Federación 2005, Federación 2016). La Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) en la norma (Federación 2005) menciona las cantidades permisibles de diferentes hidrocarburos en suelo remediado para su posterior uso (Tabla 1).

**Tabla 1.-Límites máximos permisibles para hidrocarburos específicos en suelo**

HIDROCARBUROS ESPECÍFICOS	USO DE SUELO PREDOMINANTE (mg/kg BASE SECA)		
	Agrícola, forestal, pecuario y de conservación	Residencial y recreativo	Industrial y comercial
Benceno	6	6	15
Tolueno	40	40	100
Etilbenceno	10	10	25
Xilenos (suma de isómeros)	40	40	100
Benzo[a]pireno	2	2	10
Dibenzo[a,h] ]antraceno	2	2	10
Benzo[ a ]antraceno	2	2	10
Benzo[b]fluoranteno	2	2	10
Benzo[k]fluoranteno	8	8	80
Indeno (1,2,3-cd) pireno	2	2	10

### 1.3.- Problemas asociados al uso de hidrocarburos

El manejo inadecuado de los hidrocarburos o las actividades asociadas con su uso en la actualidad generan un gran número de contaminantes que son liberados constantemente en el entorno. Un ejemplo de ello fue el derrame ocurrido en marzo de 1989 en el estrecho de Prince Williams, Alaska, donde el buque cisterna EXXON Valdez derramó 41 millones de litros de petróleo crudo afectando 2000 km de la línea costera del Golfo de Alaska y el estrecho de Prince Williams (Bragg, Prince et al. 1994). Un caso más reciente, y el segundo más grave registrado hasta ahora, se presentó en el año de 2010, cuando una



accidente en la plataforma petrolera Deepwater Horizon derramo un aproximado de 4.9 millones de barriles de petróleo en el Golfo de México (Barron 2012, Kimes, Callaghan et al. 2014). En México, en el año 2015, se reportaron más de 1200 llamadas de emergencia a la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente (PROFEPA) por derrames de hidrocarburos.

El daño causado por los hidrocarburos en el entorno puede ser de distintos tipos. El primer efecto es el impedir el paso del agua, oxígeno y luz. En el caso de organismos como las aves, el contacto con el petróleo reduce la capacidad impermeable y aislante de las plumas, por lo que estas mueren de hipotermia o por la ingesta, en el caso de algunos peces reduce la tasa de éxito reproductivo (Peterson, Rice et al. 2003, Fuentes, Méndez et al. 2014).

Pueden ser varios los efectos de los hidrocarburos en el organismo, ya que estos compuestos pueden ingresar en el cuerpo por los alimentos, el agua o el aire y están relacionados con la formación de tumores, problemas reproductivos –como la endometriosis-, alteraciones en el sistema inmune y neurológico (Mandal 2005).

#### **1.4.- Remediación de zonas contaminadas con hidrocarburos**

En la actualidad existen diversos métodos por los cuales se puede remediar los suelos contaminados por hidrocarburos que van desde fisicoquímicos,

oxidación por químicos, incineración y por bioremediación (Gan, Lau et al. 2009).

En los métodos fisicoquímicos los dos principales pasos son la desorción desde el sitio en una matriz sólida y la elusión del sólido en el fluido de extracción. En el caso de los métodos donde se hace uso de un agente oxidante uno de los más comunes son aquellos que hacen uso de la reacción de fotofenton y ozono ( $O_3$ ), aunque también se puede usar peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y permanganato de potasio ( $KMnO_4$ ) (Mihelcic and Luthy 1988). También se ha reportado que por fotocatalisis usando dióxido de titanio ( $TiO_2$ ) se ha podido tratar suelos contaminados por fluoroeteno y benzopirano (Gan, Lau et al. 2009). En el caso de las metodologías térmicas –las cuales emplean calor para degradar o volatilizar los compuestos- están la desorción térmica y la incineración. Estas han sido ampliamente usadas, como se pudo observar en un proyecto encabezado por la Agencia de Protección al Ambiente de Estados Unidos (USEPA, United States Environmental Protection Agency), en el cual, de un sitio en Louisiana se trataron 157000 toneladas de suelo el cual contenía arriba de 1000 mg/kg de hidrocarburos y después del tratamiento la concentración fue de menos de 100 mg/kg (Gan, Lau et al. 2009).

Los métodos químicos, consisten en el uso de solventes o mezclas de estos (etanol, propanol, acetona y pentanol, agentes surfactantes, ciclodextrinas e incluso aceites vegetales). Procesos conjuntos, como la bioventilación, la cual consiste en bombear aire al suelo con el fin de estimular la acción de la microbiota presente en este con el fin de que los mismos microorganismos del

suelo los degraden pueden aumentar más los resultados (Shewfelt, Lee et al. 2005).

Todas las estrategias mencionadas con anterioridad son efectivas, aunque pueden llegar a ser costosas, o generar nuevos contaminantes, como el caso de los óxidos de nitrógeno ( $\text{NO}_x$ ) y de azufre ( $\text{SO}_x$ ) producidos durante la incineración, los cuales son causantes de la lluvia ácida. O en el caso de cuando se añade algún compuesto, puede que este se tarde en desaparecer del entorno en el cual se aplicó como es el caso del permanganato (Shewfelt, Lee et al. 2005, Gan, Lau et al. 2009). Además, estas estrategias para remediar suelos pueden llegar a ser costosas, llegando a precios de 1485 dólares por metro cúbico (US  $\$/\text{m}^3$ ), mientras que estrategias biológicas pueden tener costos solo de 757 US  $\$/\text{m}^3$  (Fuentes, Méndez et al. 2014).

En la actualidad también se ha optado por el uso de organismos en la remediación -biorremediación- de suelos contaminados por hidrocarburos y desde finales del siglo XX ha sido considerado un método importante para la descontaminación in situ (Bragg, Prince et al. 1994, Shewfelt, Lee et al. 2005, Gan, Lau et al. 2009, Kimes, Callaghan et al. 2014, Ledezma-Villanueva, Adame-Rodríguez et al. 2016). La biorremediación con plantas – fitorremediación- ha sido recientemente estudiada. En Corea del Sur se encontraron dos especies nativas de pastos *Panicum bisulcatum* y *Echinogaluscrus galli* que pueden degradar entre un 70 y 94% de pireno presente en el suelo, además de tener un buen crecimiento (Gan, Lau et al. 2009). El gran problema de la fitorremediación son los largos periodos que

tienen que transcurrir para comenzar a observar resultados, además de que no son tan efectivos como los métodos anteriores (Meagher 2000, Gan, Lau et al. 2009).

## **2.- Antecedentes**

### **2.1.- Potencial de las bacterias para biorremediación de suelos**

Se ha observado que también los microorganismos pueden degradar hidrocarburos, están presentes en diversos entornos, ya que se han logrado aislar y caracterizar en diversas partes afectadas por la contaminación con hidrocarburos (Röling, Milner et al. 2002, Barron 2012). Un estudio realizado en Liaoning, China se analizó la capacidad de consorcios microbianos para degradar diversos tipos de hidrocarburos. En este estudio se analizó la capacidad por separado de bacterias, hongos y un agregado de ambos para realizar esta función, y se observó que aunque no hubo diferencia entre estos tres grupos, si la hubo para aquellos tratamientos en los cuales no se inoculó con ningún microorganismo, siendo mayor la concentración de hidrocarburos en este último caso (Li, Li et al. 2008). Se ha reportado que consorcios bacterianos aislados de suelos contaminados pueden reducir la total de diésel de 3000 ppm a menos de 500 ppm después de treinta días de tratamiento, esto además se complementó con un ensayo de toxicidad en suelos, en donde el tratamiento con el consorcio CMic4 sobrevivió el 75% de los individuos de *Eisenia fétida* expuestos a 1000 mg de diésel después de 14 días (Ledezma-Villanueva et al., 2016). También se sabe que existen consorcios que han sido aislados de

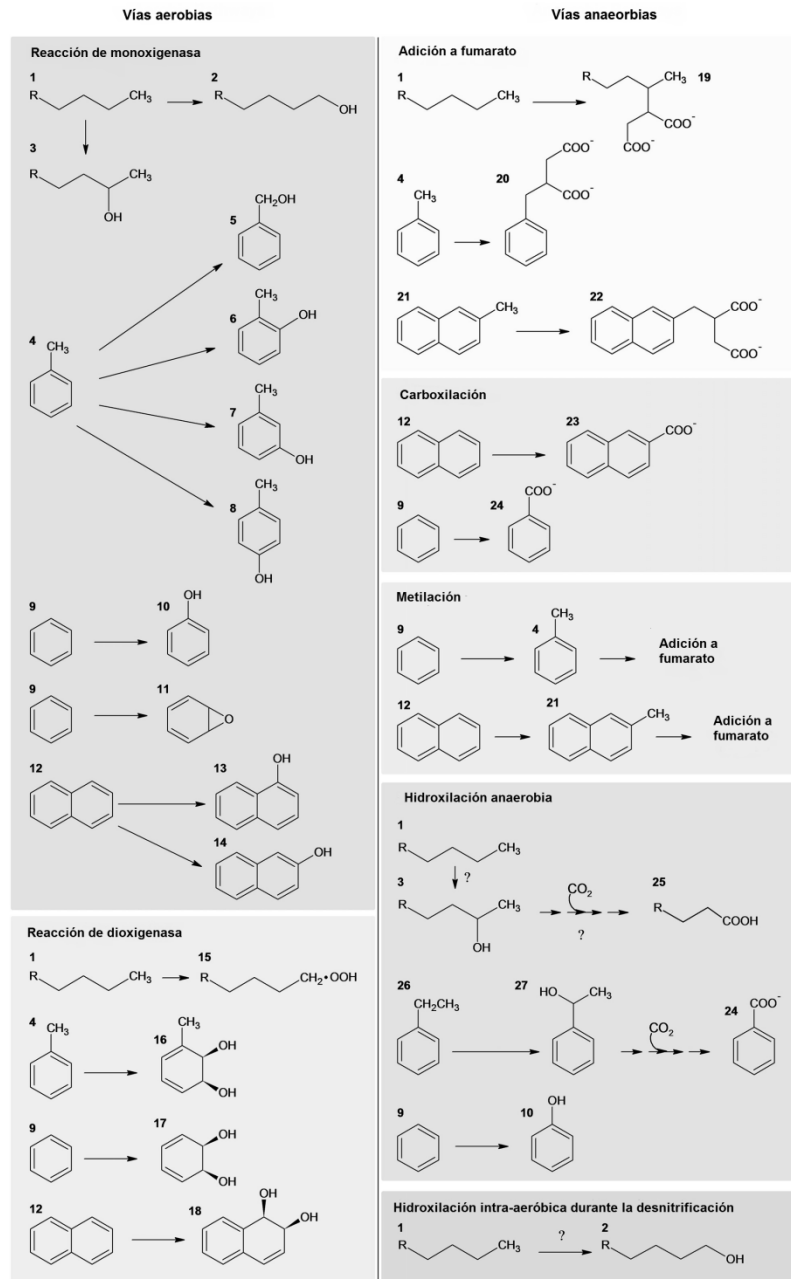
climas fríos que pueden llevar a mineralización hidrocarburos, los cuales fueron a una concentración de 50 mg/kg de fenantreno por 150 días, para después observar que uno de los consocios pudo mineralizar hasta 42% del fenantreno marcado con  $^{14}\text{C}$  en un periodo de 20 días (Okere et al., 2017). Para especies aisladas, las más reportadas son del *phylum* Proteobacteria como *P. putida*, *P. stutzeri*, *Bordetella* sp.o *Burkholderia* sp., las cuales se han reportado que pueden degradar benceno, tolueno y xileno en concentraciones que van de 30 a 100 mg/l en periodos que van de 5 horas a 14 días (Lee, Jung et al. 1995, Morimoto, Kuwano et al. 2013, Ortega-González, Zaragoza et al. 2013). Existen también especies de los géneros *Bacillus*, *Comamonas* y *Cellulomonas* que degradan BTX (Gan, Lau et al. 2009, Ortega-González, Zaragoza et al. 2013, Jiang, Zhou et al. 2015).

## **2.2.- Vías metabólicas bacterianas para la degradación de hidrocarburos**

Existen diversas especies de bacterias que se han aislado de sitios contaminados con hidrocarburos como *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus cepacia*, *Acinetobacter* sp, *Rhodococcus* sp.(Duffner, Kirchner et al. 2000) de las cuales se han caracterizado varias vías para degradar hidrocarburos (Figura 1) (Kimes, Callaghan et al. 2014). En un estudio donde se realizó pirosecuenciación para la determinación de los microorganismos presentes en un sitio contaminado con hidrocarburos se pudo observar que el taxón predominante fue Proteobacteria y la vía por la cual

degradan hidrocarburos que se encontró principalmente en este grupo fue la adición de fumarato (An, Brown et al. 2013). Previamente ya se habían reportado especies del género *Bacillus* con la capacidad de degradar fenoles, y en un estudio se observó la capacidad de *G. thermoglucosidasius* para degradar fenol/cresol por la acción de una fenol hidroxilasa que solo se ha reportado en esta especie (Duffner, Kirchner et al. 2000).

En el caso de *Desulfobacterium cetonicum* se ha observado evidencia de la actividad de la enzima 3-hidroxibencilsucsinato sintasa, la cual transforma m-cresol en 3-hidrobencilsucsinato, el cual es un compuesto inicial de la degradación de diversos cresoles (Müller, Galushko et al. 1999).

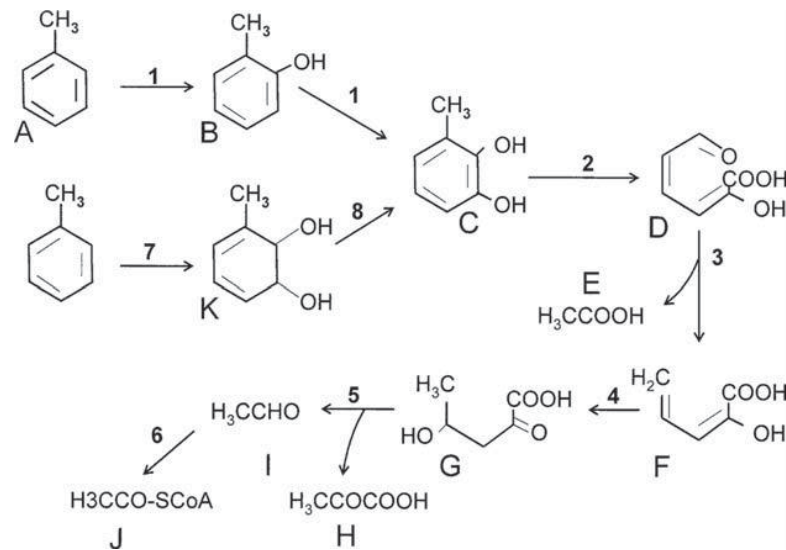


**Figura 1.-Vías por las cuales las bacterias pueden degradar hidrocarburos.** Nomenclatura de los compuestos: 1 , n - alcano ; 2 , 1 - alcohol ; 3,2- alcohol ; 4 , tolueno ; 5 , alcohol bencílico ; 6 , o- cresol ; 7 , m -cresol ; 8 , p- cresol ; 9 , el benceno , el 10, fenol; 11 , epóxido benceno ; 12 , naftaleno ; 13 , 1 - naftol ; 14,2 - naftol ; 15 , hidroperóxido de alquilo ; 16 , cis- 1,2- tolueno dihidrodil ; 17 , cis-1,2-dihidroxi-ciclohexadieno ; 18 , cis -1,2 -dihidroxi- 1,2-dihidronaftaleno ; 19-2 - metilalquilsuccinato ; 20 , bencilsuccinato ; 21,2-metilnaftaleno ; 22 , naftil - 2 - metilsuccinato ; 23,2 - naftoato ; 24 , benzoato ; 25 , n – ácido graso ; 26 , etilbenceno ; y 27,1 - feniletanol ; Los signos de interrogación designan los últimos vías hipotéticas de alcano anaeróbico (Adaptado de Kimes et al., 2014).



### 2.3.- Genes *tod* y su relación con la degradación de hidrocarburos

Desde hace tiempo se ha caracterizado la capacidad de algunas especies bacterianas para degradar hidrocarburos, siendo uno de los géneros principales *Pseudomonas* (Zylstra and Gibson 1989). Se estudió *Pseudomonas sp.* P22 con capacidad para degradar hidrocarburos y se observó que en el proceso estaban involucradas principalmente enzimas como las mono y dioxigenasas (Figura 2) (Prabhu and Phale 2003).



**Figura 2.-Vías por las cuales *Pseudomonas putida* MT2 lleva a cabo la degradación de tolueno.** Las estructuras son las siguientes: (A) tolueno, (B) o- cresol, (C) 3-metilcatecol, (D) ácido 2-hidroxi-6-oxohepta-2,4-dienoico; (E) ácido acético; (F) ácido 2-hidroxi-5-oxopentanoico; (G) ácido 4-hidroxi-2-oxovalérico, (H) ácido pirúvico; (I) acetaldehído; (J) acetil -CoA; (K) tolueno cis-dihidrodiol. Las enzimas son: (1) tolueno-2 monoxigenasa; (2) catecol-2,3 dioxigenasa; (3) dienoato 2-hidroxi-6-oxohepta-2,4 hidrolasa; (4) 2-hidroxi-5-oxopentanoico hidratasa; (5) ácido 4-hidroxi-2-oxovalérico liasa; (6) acetaldehído deshidrogenasa; (7) tolueno 2,3-dioxigenasa; (8) tolueno cis- dihidrodiol deshidrogenasa. (Adaptado de Larry L. Barton, 2011).

Las dioxigenasas hidroxilantes de anillo aromático (ARHD, del inglés Aromatic-Ring-Hydroxylating Dioxygenases), son enzimas compuestas de varias subunidades que son responsables del paso inicial en la degradación de hidrocarburos aromáticos. Los genes que codifican para las ARHD están ampliamente distribuidos en bacterias del *phylum* Proteobacteria de todo el mundo, siendo los géneros *Pseudomonas*, *Polyciclovorans*, *Serratia*, *Bordetella* o *Burkholderia* algunos de los casos más representativos. También se han reportado en bacterias de los *phyla* Firmicutes y Actinobacteria (Sousa, Cabral et al. 2017). Los genes de las ARHD están presentes en operones que, además de tener más de una ARHD, tienen otros genes que codifican a enzimas con la capacidad de degradar hidrocarburos aromáticos y convertirlos en intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (Barton and Northup 2011, Abbasian, Lockington et al. 2016).

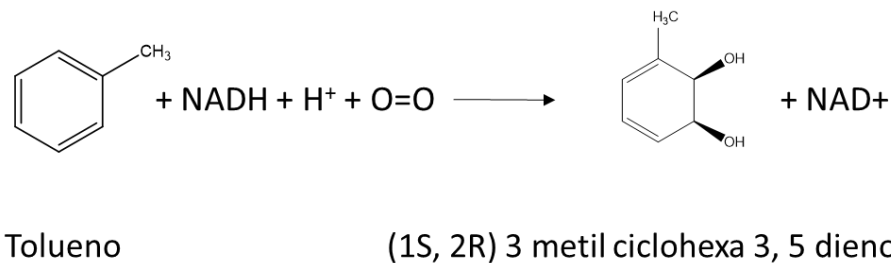
Agregado a lo anterior, enzimas, como las codificadas en los genes *tod* (Tabla 2) han sido descritas con anterioridad en cepas de *Pseudomonas putida*. Estas enzimas están asociadas principalmente en la vía de biotransformación del tolueno, etilbenceno y otros hidrocarburos aromáticos, ya que se ha observado que al transformar *Escherichia coli*, la cual carece de la capacidad para biotransformar hidrocarburos, le confirió esta cualidad. Además se ha observado un aumento en el perfil de expresión de estos genes en la cepa MT1 de *P. putida* en ensayos realizados con benceno y etilbenceno (Zylstra and Gibson 1989, Morimoto, Kuwano et al. 2013).

Tabla 2- Descripción de los genes <i>tod</i>		
Gen	Enzima	Secuencia de aminoácidos
<i>todA</i> (Pput_2878)	Nucleótido-disulfuro oxidoreductasa dependiente de FAD	Enzima multimérica tolueno
<i>todB</i> (Pput_2879)	Subunidad ferroxidina de la tolueno 1,2-dioxigenasa	dioxigenasa: oxida hidrocarburos aromáticos (benceno, etilbenceno, tolueno, xileno)
<i>todC1</i> (Pput_2881)	Subunidad hidroxilante de la dioxigenasa del anillo alfa	
<i>todC2</i> (Pput_2880)	Tolueno dioxigenasa	
<i>todD</i> (Pput_2877)	2,3-dihidroxi-2,3-dihidrofenoilpropionato deshidrogenasa	Oxida el dihidrodiol para formar 3-metil catecol
<i>todE</i> (Pput_2876)	Catecol 2, 3 dioxigenasa	Escinde el 3-metil catecol para formar 2-hidroxi 6-oxo 2,4-heptadienoato
<i>todF</i> (Pput_2882)	2-hidroxi 6-oxohepta 2,4-dienoato hidrolasa	Hidroliza el 2-hidroxi 6-oxo 2,4-heptadienoato y forma 2-hidroxipenta 2,4 dienoato y acetato
<i>todG</i> (Pput_2875)	2- ceto 4-pentenoato hidratasa	Forma 4-hidroxi 2-oxoalderato el hidroxipenta 2,4 dienoato
<i>todH</i> (Pput_2873)	4-hidroxi 2-cetoalderato aldolasa	Forma acetaldehído y piruvato
<i>todI</i> (Pput_2874)	Acetaldehido deshidrogenasa	Forma Acetil-CoA

Se han observado diferencias entre la capacidad de tolerar hidrocarburos entre una cepa y otra de la misma especie. El caso de *P. putida* DOT-T1E se observó que la forma en que estaba estructurado el operón, y el hecho de encontrarse también el operón *ttgDEF* le confirieron una mayor tolerancia a tolueno (Mosqueda and Ramos 2000). Por otra parte, algunas bacterias presentan en su genoma enzimas homólogas a pesar de pertenecer a taxones distantes, esto es debido a la presencia de genes *tnp*, que codifican para una transposasa y con ello estos genes pueden transferirse de forma horizontal, y así proporcionarle una ventaja a los organismos involucrados y variar de forma independiente (Kube, Chernikova et al. 2013).

### 2.3.1.-Tolueno dioxigenasa (genes *todABC1C2*)

Los genes *todABC1C2* codifican para una enzima multimérica, la tolueno dioxigenasa, que pertenece a la familia de las dioxigenasa de tolueno/benceno (Gibson and Parales 2000). La enzima está formada por una reductasa (*todA*), una ferridoxina (*todB*) y un complejo hierro-azufre (*todC1C2*) y por medio de la oxidación de NADH, añade dos átomos de oxígeno al tolueno y otros compuestos aromáticos (Figura 3) Este paso es un requisito inicial para la degradación de compuestos aromáticos (Schomburg, Chang et al. 2004, Abbasian, Lockington et al. 2016). El PM de la reductasa de la enzima funcional es de 46000 Da, el de la ferridoxina es 15300 y la del complejo 151000 Da (Wackett 1990).



**Figura 3.-Reacción catalizada por la tolueno dioxigenasa**

La tolueno dioxigenasa se ha encontrado en *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. stutzeri*, *Comamonas* sp., *Arhtrobacter* sp., *Aeromonas* sp. y *Ralstonia insidiosa*, *Cellulomonas hominis* y *Serratia marcescens* (Morimoto, Kuwano et al. 2013, Ortega-González, Zaragoza et al. 2013). Los sustratos a los cuales tiene

afinidad son xileno, benceno, etilbenceno y tolueno. Aunque se ha reportado que puede actuar en otros compuestos como trifluorometilbenceno, tricloroetileno y cloropropilbenceno (Schomburg, Chang et al. 2004, Morimoto, Kuwano et al. 2013)

### 2.3.2.-Cis-tolueno dihidrol deshidrogenasa (*todD*)

La cis-tolueno dihidrodiol deshidrogenasa dependiente de NAD<sup>+</sup> (EC 1.3.1.19, gen *todD*), es una enzima de un PM de 440000 Da, formada por cuatro subunidades de 110000 Da. Esta oxida el dihidrodiol para formar 3-metil catecol y NADH (Figura 4) (Artymiuk, Blake et al. 1977, Schomburg, Chang et al. 2004).

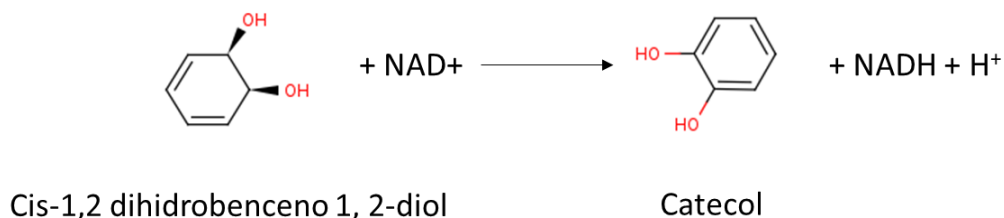


Figura 4.-Reacción catalizada por la cis-tolueno dihidrodiol deshidrogenasa

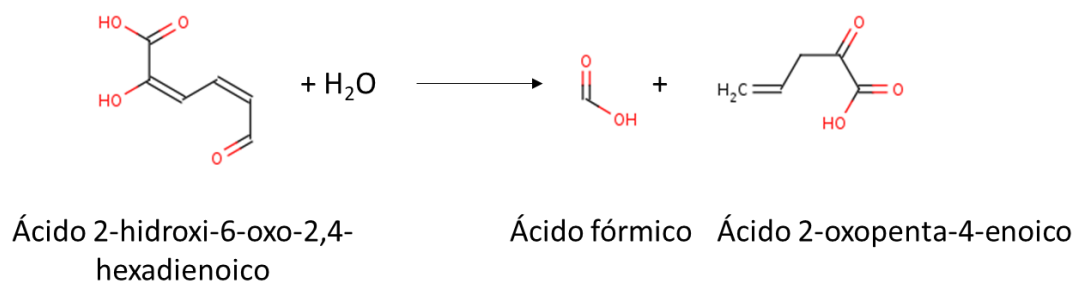
Los organismos en los que se ha encontrado son principalmente del género *Pseudomonas*, como son los casos de *P. fluorescens* y *P. putida*. Se ha relacionado esta enzima a rutas de degradación de benceno, benzoato, clorobenceno, clorociclohexano, estireno e hidrocarburos poliaromáticos (Schomburg, Chang et al. 2004)



metilcatecol, alquilatecol, fenol, metilfenol, alquilfenol y diclorofenol (Schomburg, Chang et al. 2004).

### 2.3.4.-2-hidroxi 6-oxo 2,4-heptadienoato hidrolasa (*todF*)

La enzima 2-hidroxi 6-oxo 2,4-heptadienoato hidrolasa (EC 3.7.1.9, *todF*) tiene un PM de 31323 Da y cataliza la reacción en la cual el 2-hidroxi 6-oxo 2,4 hexadienoato a 2-hidroxipenta 2,4 dienoato y acetato (Figura 6) (Bertini, Cafaro et al. 2013, Abbasian, Lockington et al. 2016).



**Figura 6.-Reacción catalizada por la 2-hidroxi 6-oxo 2,4-heptadienoato hidrolasa**

Bacterias de las especies *Arthrobacter* sp., *Acetobacter vinelandii*, *Cupriavidus necátor*, *Flavobacterium* sp., *Pseudomonas fluorecens*, *P. putida* y *P. stutzeri* han sido reportadas con la presencia de esta enzima. Mientras que algunos de los sustratos que esta enzima puede reconocer son el semialdehído 2-hidroxi 5-metilmuconico, 2-hidrorxi 6-oxohepta 2,4-dienoato o el 2-hidroxi 6-oxo 7-metilocta 2, 4-dienoato (Schomburg, Chang et al. 2004, Bertini, Cafaro et al. 2013).

### 2.3.5.-2-ceto 4-pentenoato hidratasa (*todG*)

En el caso de la degradación del benceno la 2-oxopenta 4-enoato hidratasa (EC 4.2.1.80, *todG*) transforma el 2-hidroxi 2,4-pentadienoato a ácido 4-hidroxi 2-oxo-pentanoico (Figura 7) (Harayama, Rejik et al. 1989, Schomburg, Chang et al. 2004).

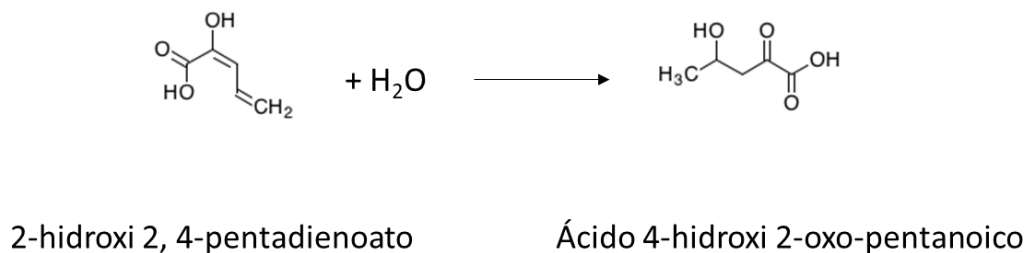


Figura 7.-Reacción catalizada por la 2-ceto 4-pentenoato hidratasa

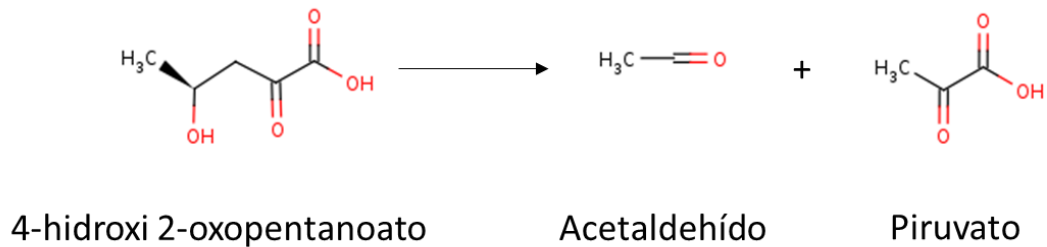
Esta enzima de 27400 Da se ha encontrado en *Bordetella* sp., *Paraburkholderia xenovorans* y *Pseudomonas putida*. Los sustratos que reconoce esta enzima son 4-hidroxi 2-oxovalerato, ácido 2-hidroxipentadienóico y el 2-hidroxi 2,4-hexadienoato (Schomburg, Chang et al. 2004)

### 2.3.6.-4-hidroxi 2-cetovalerato aldolasa (*todH*)

La 4-hidroxi 2-cetovalerato aldolasa (EC 4.1.3.39, *todH*) está relacionada a rutas de degradación de benzoato, fenilalanina, xileno y 3-fenilpropanoato. Esta enzima convierte el 4-hidroxi 2-oxovalerato en acetaldehído y piruvato



(Figura 8). Es un tetrámero formado por dos heterodímeros, uno de 32500 Da y el otro de 37500 Da (Manjasetty, Powlowski et al. 2003, Schomburg, Chang et al. 2004).



**Figura 8.- Reacción catalizada por la 4-hidroxi 2-cetovaleato aldolasa**

Se ha encontrado en especies de bacterias como *Mycobacterium tuberculosis*, *Paraburkholderia xenovorans* y *Pseudomonas aeruginosa*, con la capacidad de actuar sobre sustratos como 4-hidroxi 2-oxovaleato, 4-hidroxi 2-oxo 4-bencilbutanoato, hexaldehído o pentaldehído, por mencionar algunos (Schomburg, Chang et al. 2004).

### **2.3.7.-Acetaldehído deshidrogenasa (*todI*)**

La acetaldéhid deshidrogenasa (EC 1.2.1.10, gen *todI*) es una enzima de 140000 Da que genera acetil-CoA y NADH a partir de coenzima A (CoA) y acetaldéhid, mediante la reducción de una molécula de NAD<sup>+</sup> (Figura 9) (Powlowski, Sahlman et al. 1993, Morimoto, Kuwano et al. 2013).



## Acetaldehído

### Figura 9.-Reacción catalizada por la aldehído deshidrogenasa

Ha sido reportada la presencia de esta enzima en organismos como *Acinetobacter* sp., *Citrobacter* sp., *Clostridium beijerinckii*, *C. kluyveri*, *Paraburkholderia xenovorans*, *Propionibacterium freudenreichii*, *Pseudomonas* sp. y *Thermus thermophilus* (Schomburg, Chang et al. 2004).

Algunos de los sustratos en los cuales se ha observado que puede actuar esta enzima son acetaldehído, butiraldehído, formaldehído, glutaraldehído, heptilaldehído y propanal, solo por mencionar algunos (Schomburg, Chang et al. 2004).

### **3.- Aportación científica**

El presente trabajo describirá una de las principales rutas involucrada en la biotransformación de hidrocarburos en microorganismos del cepario de la Facultad de Ciencias Químicas aislados de pozos petroleros de Veracruz, lo cual dará continuidad a trabajos previamente realizados en la facultad; sentará las bases para comprensión de los mecanismos por los cuales las bacterias pueden degradar hidrocarburos, la relación entre la presencia de los genes *tod* y la capacidad de estas bacterias para degradar hidrocarburos, y en estudios futuros aplicarlo u optimizarlo en procesos de bioremediación.

#### **4.- Hipótesis**

La presencia o ausencia de los genes *tod* en las cepas aisladas de pozos petroleros está relacionado con la capacidad de cada una para mineralizar hidrocarburos.

## **5.- Objetivo general**

Caracterizar la presencia de los genes *tod* en cepas aisladas de pozos petroleros del estado de Veracruz y capacidad para mineralizar hidrocarburos.

.

### **5.1.- Objetivos específicos**

1. Reactivar las cepas aisladas previamente de pozos petroleros del estado de Veracruz.
2. Determinar hasta género y especie las cepas.
3. Analizar la capacidad de las cepas para mineralizar tolueno y fenantreno.
4. Realizar el diseño de los oligonucleótidos
5. Confirmar por PCR la presencia de los genes *tod*.

## **6.- Metodología**

### **6.1.-Reactivación de las cepas aisladas de suelo contaminado con petróleo.**

Las cepas bacterianas usadas en este trabajo son parte de la colección del cepario de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL y fueron proporcionadas por el Laboratorio de Investigación de Ciencias Ambientales.

Inicialmente se inoculó de la caja en un tubo con caldo nutritivo (CN) y se dejó incubando por un periodo de 36 horas a 37° C. Después se inoculó por estriado en una caja Petri con agar nutritivo (AN) y se incubó por 24 horas a 37° C. Una vez transcurrido el tiempo, se tomó con el asa un inoculó de una colonia aislada, para obtener un cultivo axénico y se colocó en un tubo con CN y se incubó por 24 horas a 37° C. Para usarse en ensayos posteriores, las cepas se preservaron en tiras de papel filtro, las cuales se colocaron en microtubos de 1.5 ml a una temperatura de -20° C.

## **6.2.- Determinación de las cepas hasta género y especie.**

### **6.2.1.- Tinción Gram y pruebas bioquímicas**

Se reactivaron las cepas como se mencionó anteriormente y se realizaron tinciones Gram. Para determinar las cepas Gram negativo se usaron pruebas API-20E (bioMérieux®). Las cepas se inocularon por estriado en AN bajo las condiciones anteriormente mencionadas. Después se tomó una colonia aislada y se inoculó un tubo con solución fisiológica (NaCl al 0.09%) y se agitó para homogenizarlo. Se inocularon los pocillos según lo indicado en el manual del fabricante y se dejó incubando en las condiciones ya mencionadas por un periodo de 18 a 24 horas. Después se observaron las tiras y se añadieron los reactivos TDA ( $\text{FeCl}_3$ ), VP1(KOH), VP2( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ) y Kovacks para las pruebas triptófano desminasa, producción de acetoína (Voges Proskauer) y producción de indol. Se analizaron los resultados usando el índice de perfil analítico de bioMérieux® ref 20190.

En el caso de los organismos Gram positivo, se realizaron las pruebas de uso de citratos, catalasa, amilasa, tinción de endosporas, oxidación y fermentación de azúcares con agar citrato de Simmons,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , agar almidón, tinción Shaeffer-

Ffulton y caldo glucosado rojo fenol respectivamente. Se tomaron los datos después de incubarse por 24 horas.

## **6.2.2 Determinación por medio del gen 16S del rRNA**

### **6.2.2.1 Extracción del DNA genómico**

Para la extracción del DNA genómico de las cepas de interés se usó el kit PrepEase™ USB® siguiendo las indicaciones del fabricante. Después de realizar la extracción se corroboró la integridad del DNA haciendo una electroforesis en gel de agarosa al 1% a 70 V por 35 min.

### **6.2.2.2 Amplificación y secuenciación del fragmento del gen 16S rRNA**

Para la amplificación del fragmento del gen 16S rRNA se utilizó el kit GoTaq® Green Master Mix Promega© según las indicaciones del fabricante. Los primers usados fueron el 27F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) y 1392R (GGTACCTTGTTACGACTT). Las condiciones de la PCR fueron las siguientes:

1. 95°C por 5 min.



2. 95°C por 1min (X 30).
3. 55°C por 1min (X 30).
4. 72°C por 1.5min (X 30).
5. 72°C por 5 min.

Una vez finalizada la PCR, se corroboró la integridad de los productos en un gel de agarosa al 1% a 70 V por 35 min, y estos se mandaron a secuenciar a MacroGen ©. Los resultados de la secuenciación se analizaron usando la base de datos del NCBI (Acland, Agarwala et al. 2014). Estas secuencias se alinearon y se construyó el árbol filogenético por el método de UPGMA usando el software MEGA v. 7.0.26 (Kumar, Stecher et al. 2016).

### **6.3 Análisis de la capacidad de mineralización**

#### **6.3.1 Crecimiento de las cepas en fenantreno**

Las 14 cepas se incubaron a 20° C y a 100 rpm en 30 ml de medio de sales basales mínimas (MBS, de inglés Minimum Basal Salts) con la siguiente composición (g/l): 0.3 de NaCl, 0.6 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.6 de KNO<sub>3</sub>, 0.25 de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.75 de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.15 de MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 1 ml de solución de elementos traza y la fuente de carbono (glucosa o fenantreno) a una concentración de 50 mg/l. La

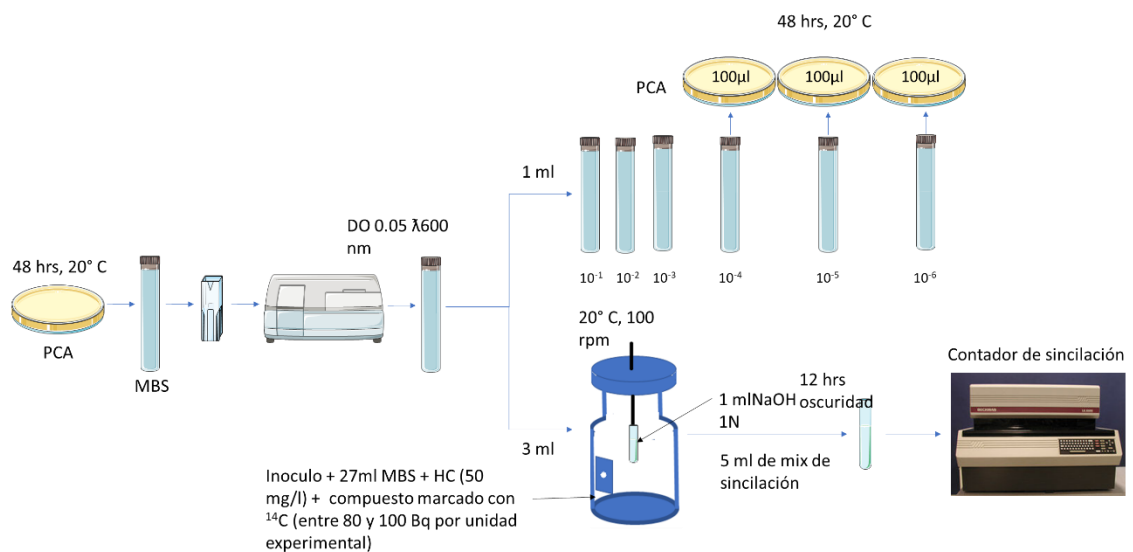
solución de elementos traza contenía ( $\mu\text{g/l}$ ): 20 de  $\text{LiCl}$ , 80 de  $\text{CaSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 100 de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 100 de  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 16\text{H}_2\text{O}$ , 100 de  $\text{NiCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 100 de  $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 30 de  $\text{KBr}$ , 30 de  $\text{KI}$ , 600 de  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 40 de  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 300 de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Se tomó 1 ml del cultivo cada 24 horas y se centrifugó a 4700 rpm por 10 minutos, se decantó el sobrenadante y se añadió 1 ml de medio MBS, se agitó para lavar y se centrifugó a 4700 rpm por 10 minutos. Lo anterior se hizo dos veces. La pastilla se resuspendió en medio MBS y se midió la densidad óptica (DO) a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 546 nm.

### **6.3.2 Ensayos de mineralización con compuestos marcados con $^{14}\text{C}$**

Se inocularon cajas con agar cuenta en placa (PCA, del inglés Plate Count Agar) por 36 horas a  $20^\circ \text{C}$ . Las colonias se resuspendieron en MBS y se ajustó a una DO de 0.5 a  $\lambda 600\text{nm}$ . Se tomaron 3 ml del inóculo y se colocaron en un frasco de borosilicato con 27 ml de medio MBS, fenantreno o tolueno marcado con  $^{14}\text{C}$  a una actividad de 107.043 Bq (Becquerel) y 84.011 Bq respectivamente y fenantreno y tolueno a una concentración de 50 mg. El frasco de borosilicato tenía un vial con 1 ml de  $\text{NaOH}$  1N, el cual se cambió cada 24 horas por un periodo de 7 días. Se agregaron 5 ml de líquido para medir sincilación Goldstar de Meridian®, UK (LSC del inglés Liquid Sincilation Counter) al vial y se dejaron reposando en un cuarto oscuro por 12 horas. El

$^{14}\text{C}$  capturado en el vial se midió con analizador de sincilación líquida Canberra Packard Tricarb 2250CA (Figura 10).

A la par, se analizó el número de unidades formadoras de colonia (UFC) por cuenta en placa, haciendo diluciones seriadas e inoculando 100  $\mu\text{l}$  en PCA las diluciones del 4to, 5to y 6to orden y se dejaron incubando a 20° C. El conteo de las UFC se realizó a las 24 horas después de que fueron inoculados (Figura 10).



**Figura 10.-Ensayos de mineralización.** En estos ensayos se tomó el inóculo de una caja con medio PCA, al cual se ajustó la DO, para después hacer los ensayos de mineralización y de cuenta en placa a la par. n=3.

## 6.4 Diseño de los oligonucleótidos para la amplificación de los genes *tod*

Para diseñar los oligonucleótidos que amplificaron las secuencias de los genes *tod* se realizó la búsqueda de las secuencias de cada uno de los genes en la

base de datos del NCBI, usando como referencia inicial las secuencias reportadas en el genoma de *P. putida* F1 (referencia de la secuencia en NCBI: NC\_009512.1). Estas secuencias se alinearon (considerando las secuencias con una cobertura mayor al 80% y con un valor de  $E < -100$ ), se determinó el grado de divergencia entre ellas, se buscaron regiones conservadas y se creó una secuencia consenso usando los software Bioedit Alignment Secuencie Editor © y MEGA v. 7.0.26 (Kumar, Stecher et al. 2016).

Después, los oligonucleótidos fueron generados considerando la secuencia consenso y las regiones conservadas usando la versión en línea del software Primer3Pus© (Untergasser, Nijveen et al. 2007) considerando los siguientes criterios de la tabla 3.

Tabla 3.-Especificaciones consideradas al diseñar los oligonucleótidos			
Longitud de los productos	150-250, 100-300, 301-400, 401-500, 501-600, 601-700, 701-850, 851-1000		
	Mínimo	Óptimo	Máximo
Longitud de los oligonucleótidos	18	20	27
$T_m^*$	57	60	63
Porcentaje de GC	20	50	80
Concentración de cationes monovalentes	50 mg		
Concentración de oligonucleótidos	50 mg		

\* $T_m$ . Temperatura de fusión.

Una vez obtenida la secuencia de los oligonucleótidos, se usó la herramienta BLAST (Herramienta de búsqueda de alineamiento local básico, del inglés Basic Local Alignment Search Tool) para corroborar que hibridaran en las regiones predichas y en los genes de interés. Estos oligonucleótidos fueron sintetizados por la empresa T4-Oligo.

### **6.5.-Detección de los genes por PCR.**

Se realizó la extracción de DNA genómico bajo las condiciones mencionadas en la sección 6.2.2.1 y a continuación se hizo la PCR usando el kit GoTaq® Green Master Mix Promega® según las indicaciones del fabricante y los oligonucleótidos específicos para cada uno de los genes bajo las condiciones siguientes:

1. 95°C por 5 min.
2. 95°C por 1min (X 30).
3. Temperatura variable según el gen por 1min (X 30).
4. 72°C por 1.5min (X 30)
5. 72°C por 5 min

En el caso de la temperatura variable estas fueron según el gen:

- *tod C1* 60.2° C

- *tod* D 59.9° C
- *tod* E 60° C
- *tod* G 60.8° C
- *tod* H 60° C

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1 % a 70 V por 30 min para corroborar la integridad de los productos de la PCR y ver la posible ausencia o presencia de los genes, considerando la longitud predicha en el diseño de los oligonucleótidos.

#### **6.6.-Disposición de residuos**

Los residuos generados en este trabajo se dispusieron de acuerdo a lo establecido el “Procedimiento para la disposición final de residuos peligrosos” (PR-CLB-SRR/002) del reglamento de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL y al reglamento del Centro Ambiental de la Universidad de Lancaster (Lancaster Environment Centre).

## **7.-Resultados**

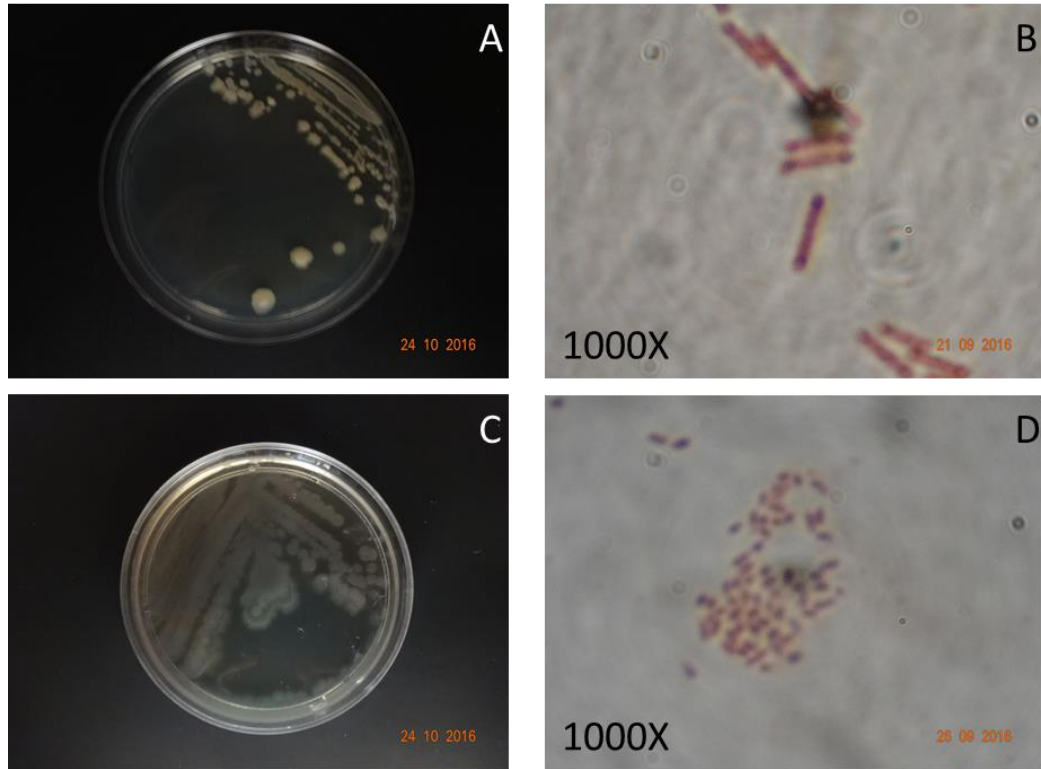
### **7.1.-Reactivación de las cepas**

Se reactivaron y aislaron 14 cepas y se utilizó una cepa de *Escherichia coli* ATCC ® CRM-11229™, de las cuales se tomó nota de sus características y de la morfología de las colonias (Tabla 4). También se hizo tinción Gram para asegurar que el cultivo no estuviera contaminado (Figura 11). Se preservaron en tiras de papel filtro a -10° C para su posterior uso. De las 14 cepas, 5 fueron Gram negativo y 9 Gram positivo. Las cepas T3-2v, T3-3 y T3-3v cambiaron de color el medio en el cual fueron cultivados.

**Tabla 4-Morfología macroscópica y microscópica de las cepas aisladas**

Clave	Forma	Borde	Elevación	Color	Observaciones	Morfología	Tinción Gram
Chap 4	Irregular	Ondulado	Elevado	Crema	ND	Bacilo	Positivo
Chap 2						Bacilo	Positivo
T1-1	Puntiforme	Ondulado	Plano	Crema	ND	Bacilo	Positivo
CP-1	Irregular	Lobulado	Umbonado	Crema	ND	Bacilo	Positivo
T3-3	Irregular	Eroso	Elevado	Crema	Oscurece el medio y lo pone verde	Bacilo	Negativo
T3-2viejo	Irregular	Eroso	Convexo	Crema	Oscurece el medio y lo hace verde	Bacilo	Negativo
T3-4	Irregular	Ondulado	Elevado	Crema	ND	Coco	Negativo
T3-2	Irregular	Ondulado	Elevado	Crema	ND	Bacilo	Negativo
Chap 1	Circular	Entero	Convexo	Crema	ND	Coco	Positivo
T3-1	Irregular	Ondulado	Elevado	Crema oscuro	ND	Bacilo	Positivo
SC-1	Irregular	Ondulado	Plano	Crema translucido	ND	Bacilo	Positivo
T2-2	Circular	Ondulado	Elevado	Crema	ND	Bacilo	Positivo
T2-1	Irregular	Ondulado	Elevado	Crema	ND	Bacilo	Positivo
T1-2	Irregular	Ondulado	Plano	Crema	ND	Bacilo	Positivo
T3-3viejo	Circular	Eroso	Convexo	Crema	ND	Coco/Bacilo	Negativo



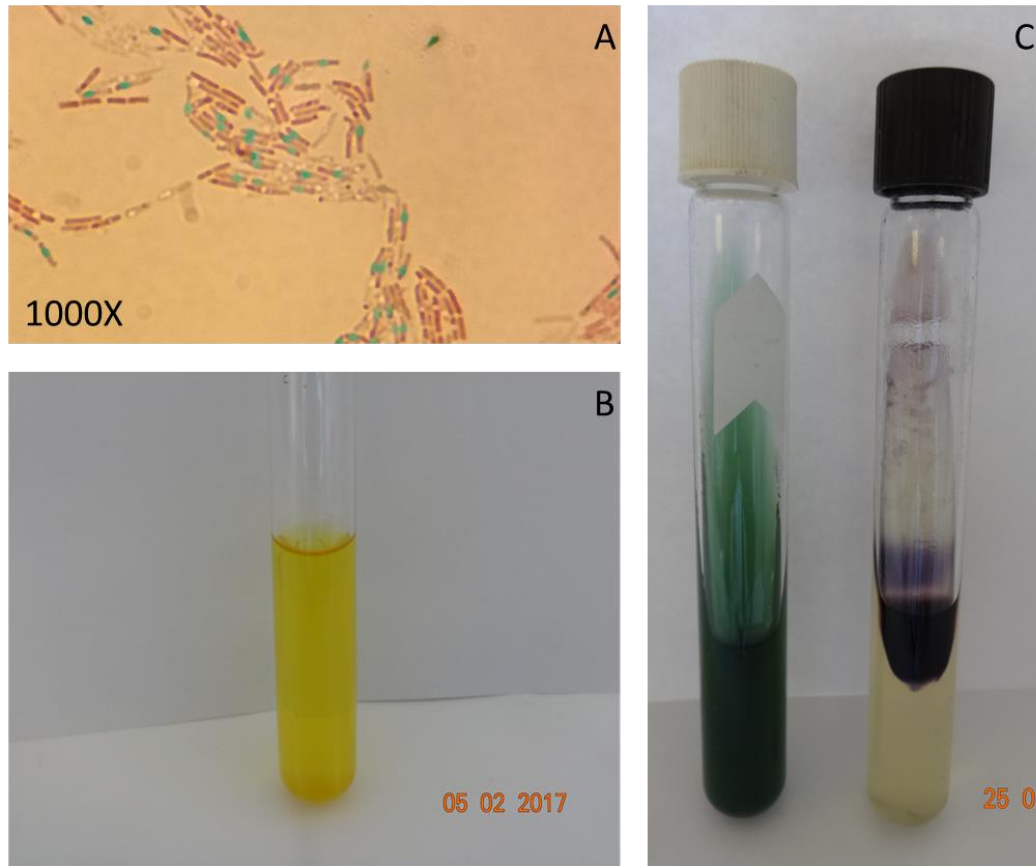


**Figura 11.-Cultivos axénicos y tinción Gram.** Se obtuvieron cultivos axénicos inoculando por estriado en AN y se realizó tinción Gram para corroborar la pureza de los cultivos. Las imágenes muestran las cepas T1-1 (A y B) y T3-3v (C y D).

## **7.2 Determinación hasta género y especie**

### **7.2.1 Pruebas bioquímicas y API-20E**

Para las 10 cepas Gram positivo se hicieron las pruebas de catalasa, amilasa, tinción de endosporas, fermentación y oxidación de azúcares (Figura 12). La determinación con estas pruebas fue hasta género, siendo todas *Bacillus* (Tabla 5). Las cepas Chap 1, Chap 2 y SC-1 no arrojaron algún perfil con el cual se pudieran determinar pruebas bioquímicas.



**Figura 12.- Pruebas bioquímicas para cepas Gram positivo.** Se realizaron pruebas de tinción de endosporas (A), oxidación y fermentación de azúcares (B), citratos y amilasa (C). Las imágenes corresponden a los resultados de la cepa Chap 4.

**Tabla 5.-Pruebas bioquímicas realizadas en bacterias Gram +**

Cepa	Cat <sup>1</sup>	Cit <sup>2</sup>	Oxi <sup>3</sup>	Fer <sup>4</sup>	Ami <sup>5</sup>	Endo <sup>6</sup>	Género
Chap 4	+	-	+	-	-	+	<i>Bacillus</i>
CP-1	+	-	+	-	-	+	<i>Bacillus</i>
T3-1	+	-	-	-	-	+	<i>Bacillus</i>
T2-5	+	-	+	-	-	+	<i>Bacillus</i>
T2-2	+	-	-	-	-	+	<i>Bacillus</i>
T2-1	+	-	-	-	-	+	<i>Bacillus</i>

Cat<sup>1</sup>: catalasa; Cit<sup>2</sup>: citratos; Oxi<sup>3</sup>: oxidación de azúcares; Fer<sup>4</sup>: fermentación; Ami<sup>5</sup>: amilasa; Endo<sup>6</sup>: endosporas.

En el caso de las 5 cepas que fueron Gram negativo se realizaron pruebas API-20E. Con base en los cambios observados en cada una de las cámaras se obtuvo un perfil numérico, el cual se cotejó con la guía (Figura 13). De lo anterior se obtuvieron resultados hasta género, siendo todas del género *Pseudomonas* (Tabla 6).



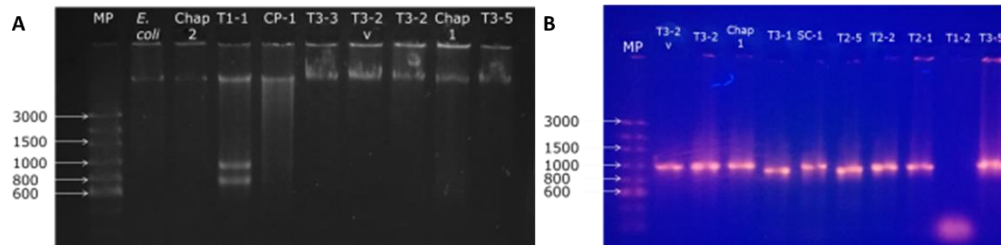
**Figura 13.-Resultados de pruebas API-20E.** La imagen muestra los resultados de la prueba realizada a la cepa T3-3v, la cual resultado ser del género *Pseudomonas*.

**Tabla 6.-Resultados de las pruebas API-20E hechas en bacterias Gram -**

Cepa	Perfil numérico6	Género
T3-2	2202000	<i>Pseudomonas</i>
T3-2v	2202000	<i>Pseudomonas</i>
T3-3	2202000	<i>Pseudomonas</i>
T3-3v	2202000	<i>Pseudomonas</i>
T3-4	2202000	<i>Pseudomonas</i>

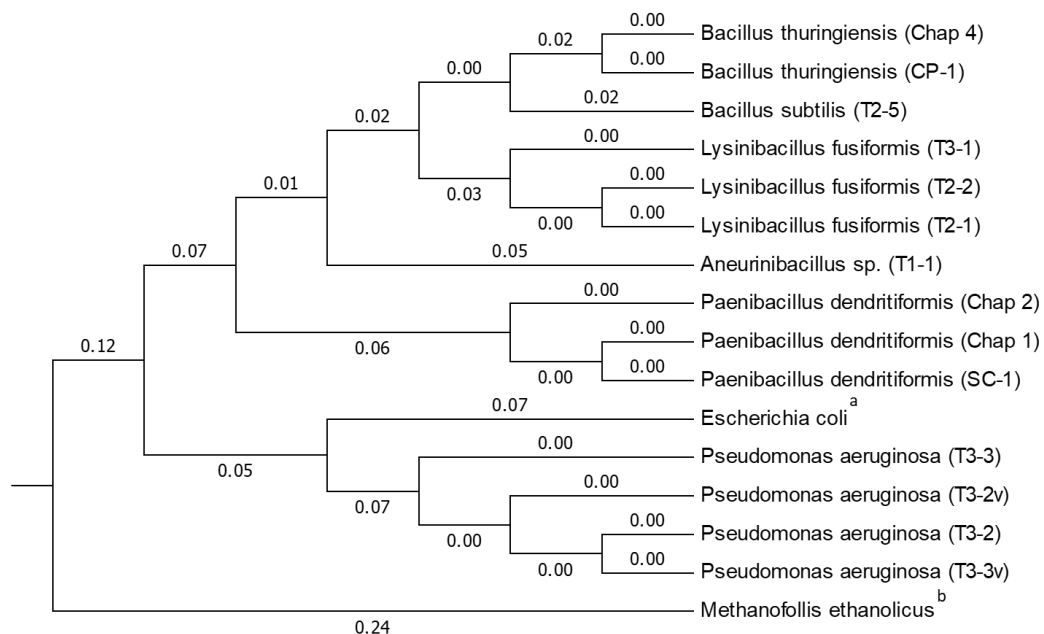
### 7.2.2 Extracción de DNA genómico y análisis del gen 16S rRNA.

Se extrajo el DNA genómico de las cepas y se corroboró la integridad de este en un gel de agarosa al 1% (Figura 14A). Este se preservó a -20° C para su uso posterior. Con el DNA extraído de cada una de las cepas se hizo la PCR y se corroboró la integridad de los productos de esta PCR en un gel de agarosa al 1% (Figura 14B).



**Figura 14.-DNA genómico y amplificación del gen 16S rRNA.** Se hizo la electroforesis en un gel de agarosa de la extracción de DNA genómico (A) y la amplificación del gen 16S rRNA (B). El carril MP es el marcador de peso molecular.

Se determinaron 6 especies diferentes ,todas con una identidad >97% (Figura 15), pertenecientes a los *phyla* Firmicutes Y Proteobacteria, que fueron: *Bacillus thurigiensis* (Chap 4 y CP-1), *Bacillus subtilis* (T2-5), *Lysinibacillus fusiformis* (T3-1, T2-2 y T2-1), *Aneirinibacillus* sp. (T1-1), *Paenibacillus dendritiformis* (Chap 2, Chap 1 y SC-1) y *Pseudomonas aeruginosa* (T3-3, T3-3v, T3-2, T3-2v y T3-4).

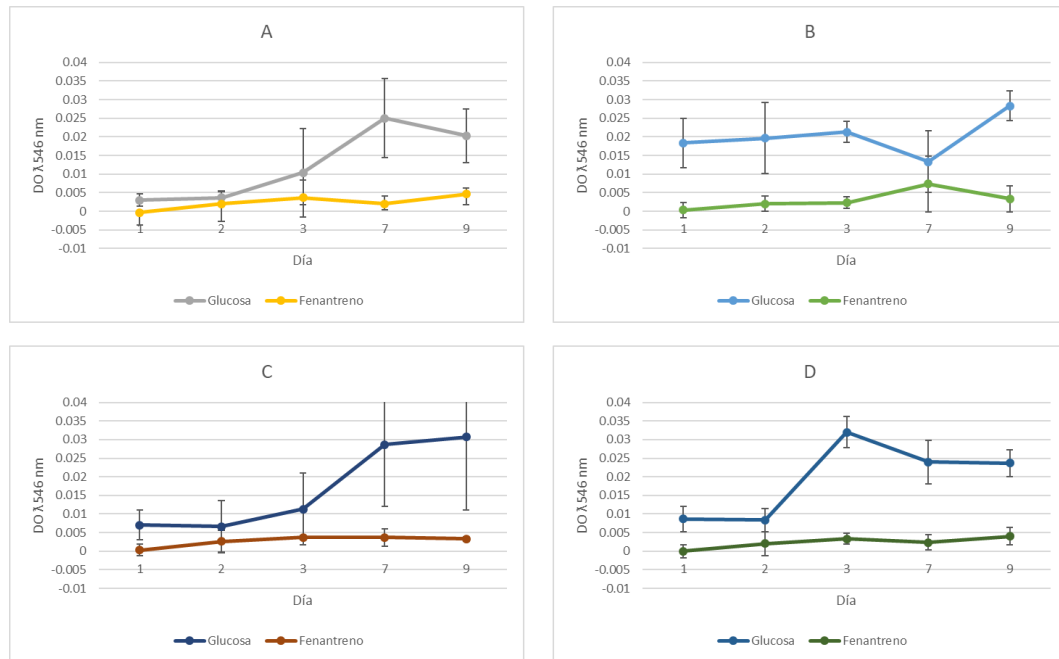


**Figura 15.-Filograma de las cepas.** Las relaciones evolutivas se hicieron utilizando el método UPGMA. Se muestra el árbol óptimo con la suma de la longitud de la rama = 0.83027097. (al lado de las ramas). Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de probabilidad máxima compuesta y están en las unidades de la cantidad de sustituciones de base por sitio. El análisis implicó 16 secuencias de nucleótidos. Se eliminaron todas las posiciones que contenían lagunas y datos faltantes. Hubo un total de 785 posiciones en el conjunto de datos final. Se realizaron análisis evolutivos en MEGA v7.0.26. <sup>a</sup> Cepa de *E. coli* usada como control. <sup>b</sup> Secuencia de gen 16S rRNA usada para la construcción del filograma.

## 7.3 Determinación de la capacidad de mineralización

### 7.3.1 Curvas de crecimiento

De las curvas de crecimiento que se hicieron en medio MBS con fenantreno y glucosa como única fuente de carbono las cepas que crecieron mejor en fenantreno fueron *Aneurinibacillus* sp. (T1-1), *Pseudomonas aeruginosa* (T3-3v) y *Lysinibacillus fusiformis* (T3-1), aunque fue mucho menor que el crecimiento en glucosa como fuente de carbono (Figura 16). En glucosa, la fase exponencial comenzó entre el día 2 y tres, aunque en algunos casos fue hasta el día 9 (Figura 16B), mientras que en fenantreno no se observó la fase exponencial en ninguna de las cepas. Las cepas anteriormente mencionadas se seleccionaron para las pruebas con los hidrocarburos marcados con  $^{14}\text{C}$ .



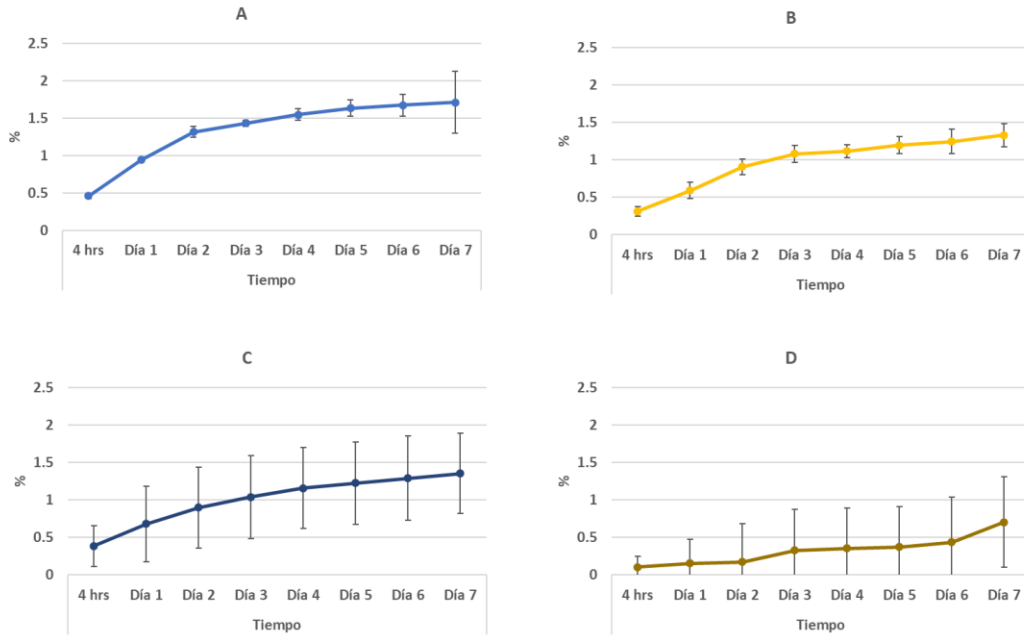
**Figura 16.- Crecimiento en fenantreno y glucosa.** Las cepas se inocularon en medio MBS con glucosa y fenantreno a una concentración de 50 mg/l, y se tomaron muestras a los días 1, 2, 3, 7 y nueve. Se seleccionaron las cepas *Aneurinibacillus* sp. (T1-1, A), *Pseudomonas aeruginosa* (T3-3v, B) y *Lysinibacillus fusiformis* (T3-1, C y D), n=3.



### 7.3.2 Ensayos de mineralización

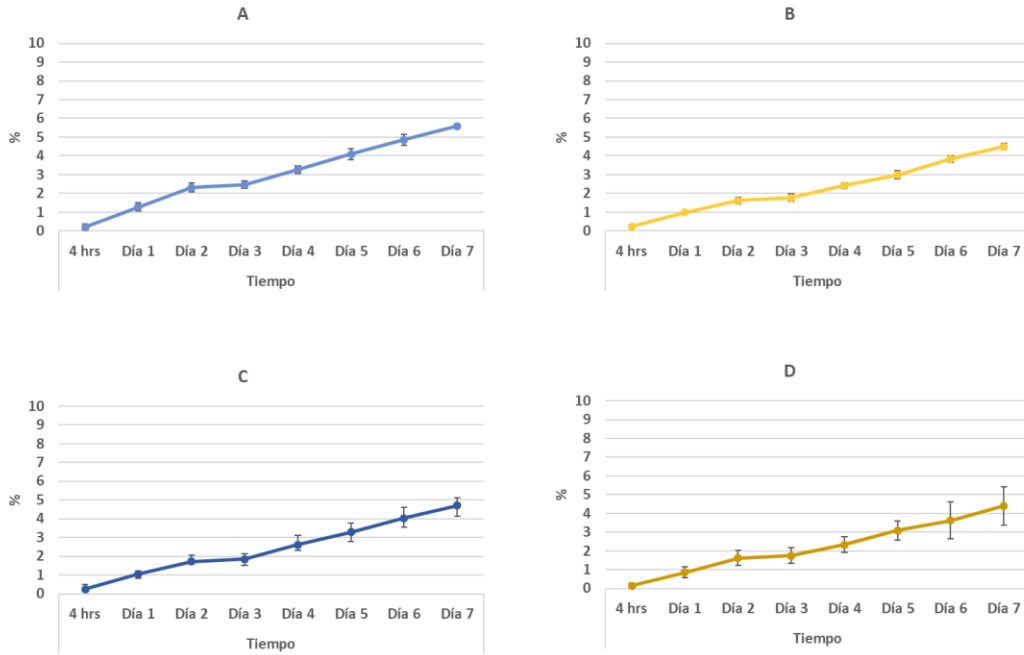
Para estos ensayos se consideraron las cepas de *Aneurinibacillus sp.* (T1-1), *Pseudomonas aeruginosa* (T3-3v), *Lysinibacillus fusiformis* (T3-1) y *Pseudomonas sp.* (Pseudo LEC), y los hidrocarburos con los que se hicieron las pruebas fueron tolueno y fenantreno. De estas se hizo la cuenta de células viables en placa para saber cuántas células se inocularon al realizar los ensayos de  $^{14}\text{C}$  al ajustar la DO a 0.05, siendo para *Aneurinibacillus sp.* de  $6.6 \times 10^4$  UFC *Pseudomonas aeruginosa* de  $1.13 \times 10^8$  UFC, *Lysinibacillus fusiformis* de  $1.33 \times 10^5$  UFC y *Pseudomonas sp.*  $7.33 \times 10^5$  UFC.

En los ensayos con tolueno marcado con  $^{14}\text{C}$ , no hubo diferencia significativa en la capacidad para mineralizar este compuesto entre las cepas usadas, sin embargo, la cepa de *Aneurinibacillus sp.* (T1-1) fue la que tuvo mayor capacidad de mineralización (1.71%), mientras que la menor fue la de la cepa de *Pseudomonas sp.* (Pseudo LEC, Figura 17 y 19).



**Figura 17.- Porcentaje de mineralización de tolueno.** Las cepas con las cuales se realizaron estos ensayos fueron *Aneurinibacillus* sp. (T1-1, A), *Pseudomonas aeruginosa* (T3-3v, B), *Lysinibacillus fusiformis* (T3-1, C) y *Pseudomonas* sp. (Pseudo LEC, D). Los datos se tomaron a las 4 hrs, día 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7. n=3.

La capacidad para mineralizar fenantreno marcado con  $^{14}\text{C}$  fue mayor que en el caso del tolueno. En estos ensayos la cepa con mayor capacidad de mineralización fue, al igual que en el caso del tolueno, *Aneurinibacillus* sp. (T1-1) con un 5.59 %. La que menor capacidad de mineralización tuvo fue la cepa de *Pseudomonas* sp. (Pseudo LEC) con un 4.39 % (Figura 18 y 19).



**Figura 18.-Porcentaje de mineralización de fenantreno.** Las cepas con las cuales se realizaron estos ensayos fueron *Aneurinibacillus* sp. (T1-1, A), *Pseudomonas aeruginosa* (T3-3v, B), *Lysinibacillus fusiformis* (T3-1, C) y *Pseudomonas* sp. (Pseudo LEC, D). Los datos se tomaron a las 4 hrs, día 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7. n=3.

Design-Expert® Software

Mineralización

● Design Points

■ C1 Tolueno

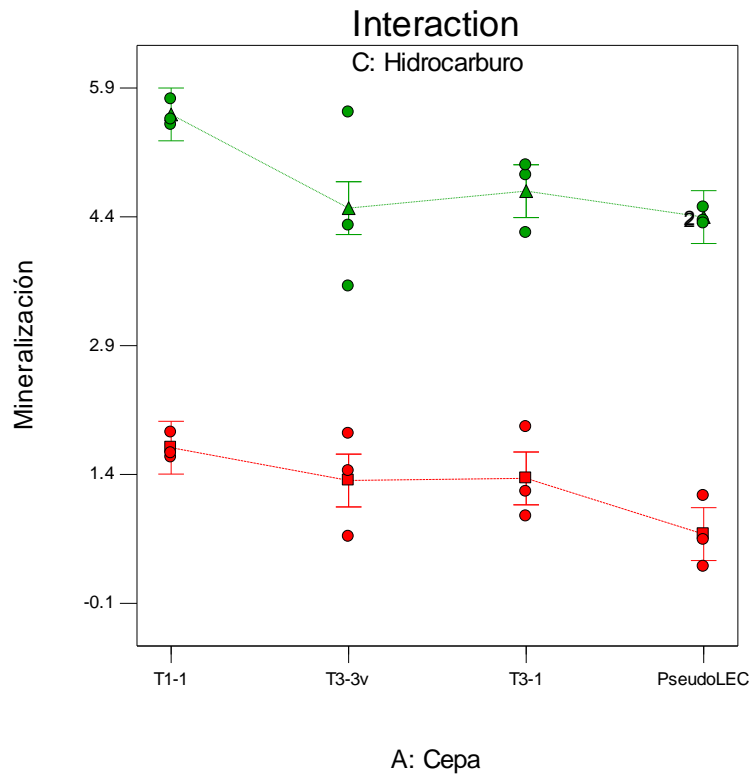
▲ C2 Fenantreno

X1 = A: Cepa

X2 = C: Hidrocarburo

Actual Factor

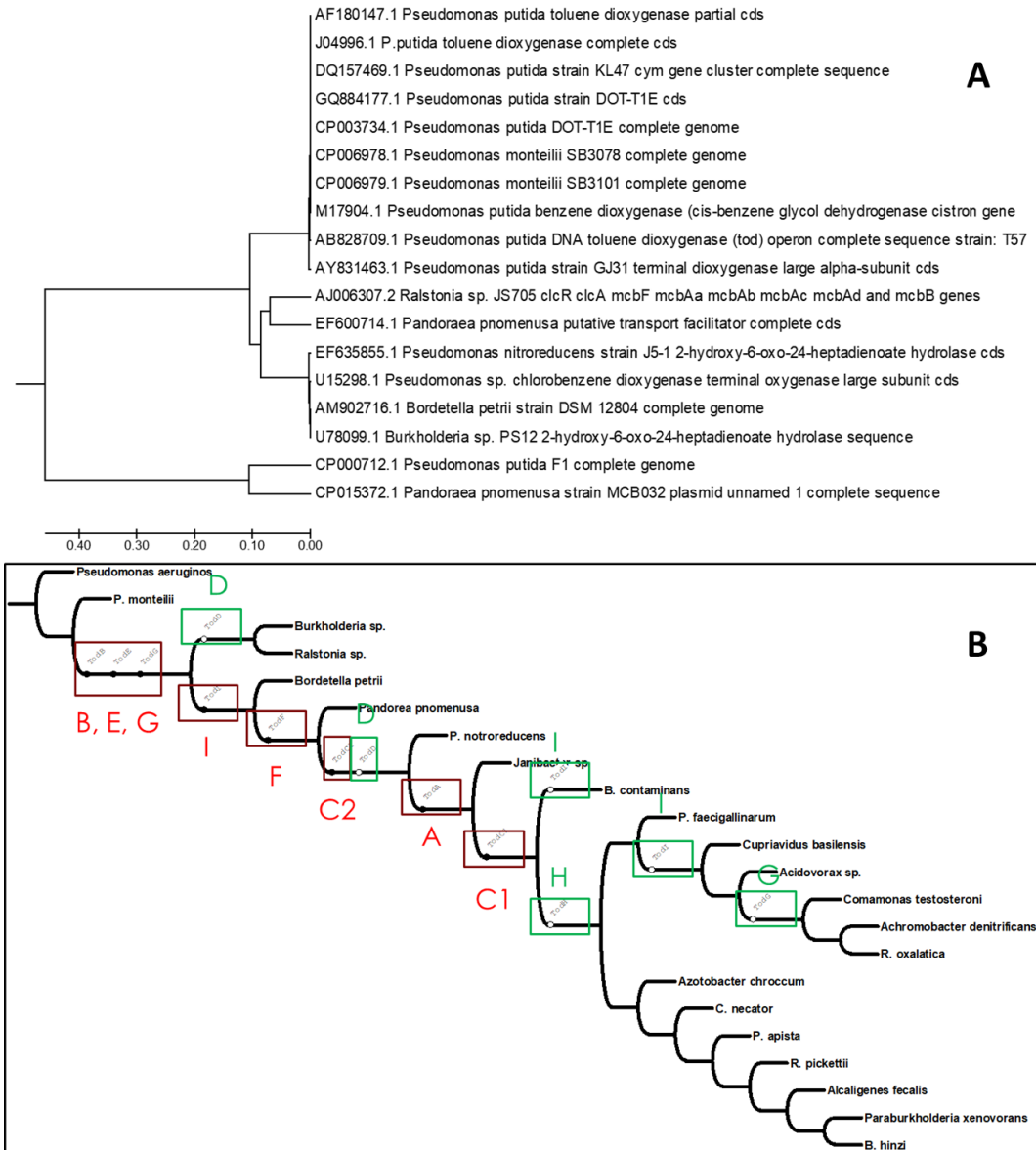
B: Tiempo = 168



**Figura 19.- Comparación de la mineralización por parte de las diferentes cepas de tolueno y fenantreno en el día 7.** Las cepas con las cuales se realizaron estos ensayos fueron *Aneurinibacillus* sp. (T1-1, A), *Pseudomonas aeruginosa* (T3-3v, B), *Lysinibacillus fusiformis* (T3-1, C) y *Pseudomonas* sp. (Pseudo LEC, D). La línea verde representa los experimentos realizados con fenantreno, la roja los experimentos realizados con tolueno. n=3.

#### 7.4.- Diseño de los oligonucleótidos para amplificar los genes *tod*

Se realizó la búsqueda de las secuencias de cada uno de los genes y se consideraron para ello secuencias de *P. putida*, *P. montellii*, *P. nitroreducens*, *Ralstonia* sp., *R. pickettii*, *R. eutropha*, *Pandoraea pnomenusa*, *P. faecigallinarum*, *Bordetella petrii*, *Burkholderia* sp., *Janibacter* sp., *Comamonas testosteroni*, *Achromobacter denitrificans*, *Cupriavidus basilensis*, *Acidovorax* sp, *Azotobacter vinelandii*, *A. chroococcum* y *Variovorax* sp.(Figura 20a y anexo 11.3) La mayoría de estas especies pertenecen a las clases Betaproteobacteria y Gammaproteobacteria, excepto la del género *Janibacter* (Actinomycetales), además se observó una tendencia a que los genes desaparecieran en las distintas especies, estando presentes todos ellos solo en el género *Pseudomonas* (Figura 20b).



**Figura 20 .-Filogramas de alineamiento de secuencias y presencia de genes *tod*.** Las secuencias se obtuvieron de la base de datos del NCBI y corresponden al gen *todA*. Las relaciones evolutivas se hicieron utilizando el método UPGMA. Se muestra el árbol óptimo con la suma de la longitud de la rama = 0.83027097. (al lado de las ramas). Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de probabilidad máxima compuesta y están en las unidades de la cantidad de sustituciones de base por sitio. El análisis implicó 16 secuencias de nucleótidos. Se eliminaron todas las posiciones que contenían lagunas y datos faltantes. Hubo un total de 785 posiciones en el conjunto de datos final. Se realizaron análisis evolutivos en MEGA v7.0.26 (A). La imagen inferior muestra un filograma realizado a partir de una matriz de presencia-ausencia, donde los recuadros señalan donde están presentes (verde) o no (rojo) los genes en las distintas especies de bacterias. Las letras representan a cada uno de los genes (A para *todA*, B para *todB*, C1 para *todC1*, C2 para *todC2*, D para *todD*, E para *todE*, F para *todF*, G para *todG*, H para *todH* e I para *todI*; B).

Se diseñaron 5 pares de oligonucleótidos de detección para los genes *todC1*, *todD*, *todE*, *todG* y *todH* bajo las condiciones ya mencionadas en la metodología. En la tabla 7 se muestran las secuencias que fueron sintetizadas y el producto predicho de PCR para cada par de oligonucleótidos.

**Tabla 7. Oligonucleótidos para amplificar los genes *Tod***

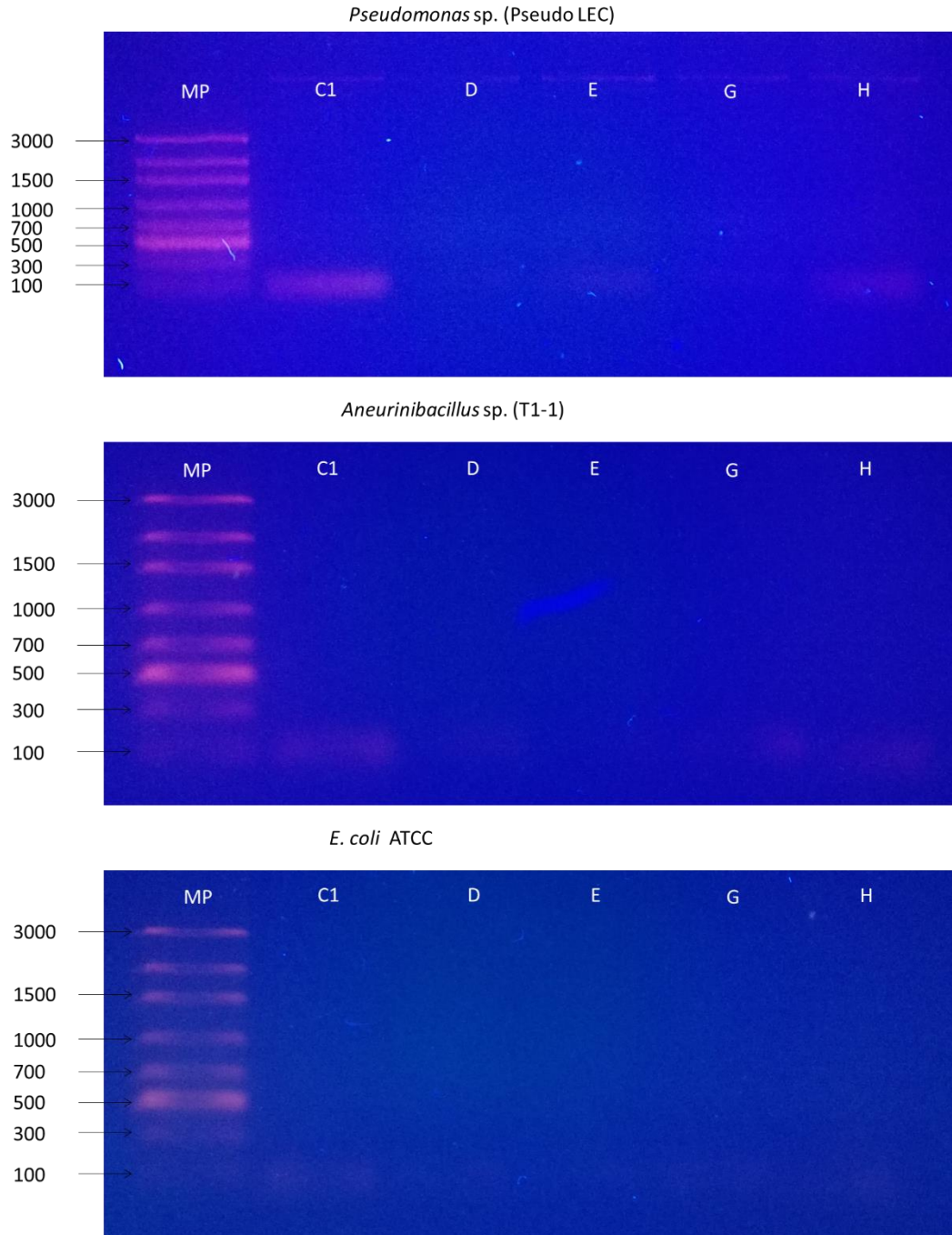
Gen	Sentido	Secuencia (5' a 3')	Tm (°C)	% GC	Unión	Producto de PCR (Pb)
<b>todC1</b>	F	CACCAGCTACTGGA CCGAAG	60.8	60	880	297
	R	AGTTCTCCCCGTCTG TCCT	59.6	61.1	1176	
<b>todD</b>	F	CAGCGCGATATTCA CTGTGT	59.9	50	413	230
	R	GTCCAATGGAAAGG TCGAAA	59.9	45	642	
<b>todE</b>	F	TTCATGCTGCAAGC TAATGG	60	45	665	226
	R	TGTGTCCCCAGATG CTGATA	60.1	50	890	
<b>todG</b>	F	ACAGAGAGCATTGG TTGCCG	60.9	55	156	602
	R	CATCGAATACATCT CCTCCTGCC	60.6	52.1	757	
<b>todH</b>	F	GCATGACCTCAAGG CAGTCT	60	55	279	321
	R	TGGTGAGCATGCAT TCCTGT	59.9	50	599	

## 7.5.-Amplificación de los genes *tod* por PCR

Se amplificaron por PCR los genes *todC1*, *todD*, *todE*, *todG* y *todH* con los oligonucleótidos diseñados previamente. Para ello se usó como templado el DNA genómico de las cepas *E. coli* ATCC ® CRM-11229<sup>TM</sup>, *Aneurinibacillus* sp. (T1-1), *P. aeruginosa* (T3-3v), *L. fusiformis* (T3-1) y *Pseudomonas* sp. (Pseudo LEC).

De todas las cepas usadas, solo la cepa de *Pseudomonas* sp. (Pseudo LEC) se pudo observar una banda el gel de agarosa entre los 300 y 100 pares de bases, mientras que en el resto de las cepas no se observó ninguna banda (Figura 21). En las restantes se pudieron observar algunas bandas tenues, que corresponden a los oligonucleótidos de la PCR ya que están a la par o más debajo de la banda de 100 pares de bases del marcador de peso molecular (Anexo 11.4).





**Figura 21.- Amplificación de los genes tod.** Se realizó una electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos de los genes amplificados por PCR. Las imágenes corresponden a los ensayos hechos con las cepas *Pseudomonas* sp. (Pseudo LEC, imagen superior) *Aneurinibacillus* sp. (T1-1, imagen del medio) y *E. coli* ATCC® CRM-11229™ (*E. coli* ATCC, imagen inferior). Los genes que fueron amplificados son todC1 (C1), todD, todE (E), todG (G) y todH (H).

## 7.6.-Disposición de los residuos generados

Los residuos se dispusieron de acuerdo con el “Procedimiento para la disposición final de residuos peligrosos” (PR-CLB-SRR/002) según el reglamento de la FCQ de la UANL de la siguiente manera:

- Colector A: Soluciones salinas de pH 6-8, sales, ácidos y bases orgánicas.
- Colector B: Sólidos inorgánicos, sales inorgánicas.
- Colector C: Tóxicos e inflamables, aminas, solventes orgánicos no halogenados.
- Colector D: Tóxicos e inflamables, aminas, solventes orgánicos halogenados.
- Colector E Orgánico: Muy tóxico, cancerígeno, orgánico.
- Colector E Inorgánico: Muy tóxico, cancerígeno, inorgánico.
- Colector F: Reciclo de sales de metales preciosos.
- Colector G: Combinaciones orgánicas sólidas.
- Colector H: Oxidantes.
- Colector de residuos de cianuro.
- Colector de colorantes y lugol.
- Colector de desechos biológico-infecciosos.

Mientras que la disposición del material usado en las pruebas de mineralización se lavó con Decon™ NoCount™ Radioactive Decontaminants, y el agua se dispuso en las tarjas marcadas para hacerlo, y los desechos biológico

infecciosos en los contenedores amarillos, según lo marcado en el reglamento de la Universidad de Lancaster (Lancashire, Inglaterra) .

## 8.-Discusión

Con base en los resultados obtenidos tanto de las pruebas bioquímicas y las pruebas moleculares se determinaron 6 especies diferentes de bacterias pertenecientes a los *phyla* Proteobacteria y Firmicutes. Para el primer *phylum*, los resultados de las pruebas bioquímicas y moleculares los géneros coincidieron y solo hubo una especie, que fue *P. aeruginosa*. Para el caso del segundo *phylum* las especies determinadas fueron *B. thuringensis*, *B. subtilis*, *L. fusiformis*, *Aneurinibacillus* sp. y *P. dendritiformis*, que las últimas tres especies mencionadas no coinciden con los resultados de género con el de las pruebas bioquímicas, por el hecho de que no estaban reportados los perfiles bioquímicos o las especies fueron renombradas (Vos, Garrity et al. 2011, Madigan 2012). Considerando los datos presentados se pudo observar que el taxón dominante es *P. aeruginosa*, siendo cuatro cepas de esta especie, aunque a nivel *phylum* el taxón dominante fue Firmicutes, lo cual contradice lo previamente reportado, que menciona que Proteobacteria es el taxón dominante en sitios contaminados, pero considerando la metodología utilizada para aislar las bacterias de las muestras, no se puede afirmar que estas cepas representen íntegramente la microbiota del suelo (Saul, Aislabie et al. 2005,

Kimes, Callaghan et al. 2014, Ledezma-Villanueva, Adame-Rodríguez et al. 2016).

Las bacterias determinadas ya han sido aisladas de otros sitios contaminados con hidrocarburos y se ha confirmado que tienen la capacidad de degradarlos o de producir biosurfactantes (Li, Li et al. 2008, Ortega-González, Zaragoza et al. 2013, Bezza and Chirwa 2015). *P. aeruginosa* junto con otras especies de este género se han aislado de suelo y ambientes marinos contaminados con petróleo, diésel y otros hidrocarburos (Zylstra and Gibson 1989, Prabhu and Phale 2003, Ortega-González, Zaragoza et al. 2013), además de que puede degradar hidrocarburos como xileno, benceno, tolueno, fenantreno en rangos entre el 30 y 100% a concentraciones que van de 20 a 100 mg/l de los diferentes hidrocarburos (Zylstra and Gibson 1989, Prabhu and Phale 2003, Ortega-González, Zaragoza et al. 2013). Para el caso de las especies *B. thuringensis*, *B. subtilis*, *Aneurinibacillus* sp, *P. dendritiformis*. y *L. fusiformis* también se han aislado de suelo con hidrocarburos. Para el caso *P. dendritiformis* no ha sido reportada con la capacidad de degradar hidrocarburos, sin embargo, si para la producción de biosurfactantes, que pueden ser un paso inicial para que otros organismos del entorno puedan tomarlos y degradarlos (Thamer, Al-Kubaisi et al. 2013, Bezza and Chirwa 2015).

Después de conocer las distintas especies a las que pertenecieron las cepas se realizaron ensayos para ver su crecimiento y cuanto del hidrocarburo pueden mineralizar. La capacidad para medir y cuantificar la capacidad de degradar hidrocarburos por parte de las diferentes especies de bacterias en la actualidad

son diversas (An, Brown et al. 2013). Las técnicas con  $^{14}\text{C}$  has sido usadas ya desde hace tiempo con éxito para observar y medir la capacidad de algunos microorganismos de mineralizar distintos compuestos orgánicos como glucosa e hidrocarburos y la biodisponibilidad de estos compuestos, razón por la cual esa técnica fue considerada en este trabajo (Stewart and Hawcroft 1977, Bauer and Capone 1985, Oyelami and Semple 2015, Vázquez-Cuevas and Semple 2016). El crecimiento de las cepas reactivadas y la degradación/mineralización fueron bajos comparado (1.7% de mineralización para tolueno y un 5.59% para fenantreno) con los observados en otros trabajos donde se degrado hasta el 90% del tolueno, benceno, xileno o la mezcla de los tres (Lee, Jung et al. 1995, Mazzeo, Levy et al. 2010, Ortega-González, Zaragoza et al. 2013), esto pudo haber ocurrido por que las condiciones en las cuales fueron realizados los experimentos no fueran las idóneas o por el cambio del micro ambiente: Por ejemplo, la temperatura fue menor ( $20^{\circ}\text{C}$ ) comparada con otros ensayos de degradación de hidrocarburos ( $28\text{-}30^{\circ}\text{C}$ ) (Ortega-González, Zaragoza et al. 2013, Thamer, Al-Kubaisi et al. 2013), además de que la matriz en la cual se realizaron los ensayos no fue similar a la del entorno del cual fueron aisladas, lo que pudo haber influido en la disponibilidad, y por ende, en la capacidad de mineralización de los microorganismos con los cuales se realizaron estos ensayos (Flemming and Wingender 2010, Riding, Doick et al. 2013, Tortella, Salgado et al. 2014). Pero comparando los resultados obtenidos con un trabajo realizado con un consorcio obtenido de una región de la Antártico, bajo las mismas condiciones del medio y la temperatura, solo que se expusieron a fenantreno en distintos periodos de tiempo y una concentración de 10 mg/kg, en

el día 7 el consorcio con mayor capacidad de mineralización presentó un 5.2%, mientras que la capacidad de mineralización de la cepa *Aneurinibacillus* sp. (T1-1) de este trabajo fue de 5.59%, por lo que pudiere considerarse que esta cepa tiene un futuro potencial para seguir siendo estudiada y analizar su capacidad de mineralizar otros hidrocarburos (Okere, Cabrerizo et al. 2012).

Al realizar la búsqueda de las secuencias de los genes en las distintas bases de datos fue notorio que estaban principalmente en los géneros *Pseudomonas*, *Bordetella* y *Burkholderia*, por lo que se puede considerar a estos genes como un carácter sinapomórfico de las clases Betaproteobacteria y Gammaproteobacteria (Schomburg, Chang et al. 2004, An, Brown et al. 2013, Acland, Agarwala et al. 2014). Sin embargo, además que las ARHD, familia a la que pertenecen la tolueno dioxigenasa y la catecol doixigenasa, también están presentes en géneros como *Bacillus* y *Mycobacterium* y se han encontrado los genes *todC1* y *todF* en géneros como *Janibacter* y *Cellulomonas*, por lo que estos genes pudieron haberse transferido de forma horizontal (Ortega-González, Zaragoza et al. 2013, Abbasian, Lockington et al. 2016, Kumar, Stecher et al. 2016).

Al hacer la amplificación por PCR de los genes *todC1*, E, F, G y H la banda que se observó fue en la cepa de *Pseudomonas* sp. (Pseudo LEC), gen altamente asociado a este género de bacteria, mientras que en las otras cuatro cepas con las que se hicieron los ensayos de mineralización no presentaron alguno de los genes, incluyendo a la cepa de *P. aeruginosa* (T3-3v) que también pertenece al género mencionado, mientras que en las cepas de *Aneurinibacillus* sp. (T1-1) y

*L. fusiformis* (T3-1) no se han reportado estos genes lo cual corresponde a los resultados de la PCR (Zylstra and Gibson 1989, Gibson and Parales 2000, Morimoto, Kuwano et al. 2013, Abbasian, Lockington et al. 2016).

Con respecto a la capacidad de mineralizar o degradar hidrocarburos, los genes *tod*, fueron descritos transformando una cepa de *E. coli* con un plásmido que portaba estos genes, los cuales le dieron la capacidad de degradarlos (Zylstra and Gibson 1989). En el caso de cepas de este estudio, se observó que *Aneurinibacillus* sp. (T1-1) fue la que presentó mayor capacidad de mineralizar fenantreno y tolueno (aunque no hubo diferencia significativa en el segundo con respecto a las otras cepas) y no presentó ninguno de los genes, mientras que *Pseudomonas* sp. (T3-3v), que fue la que presentó la banda que posiblemente corresponda a *todC1* fue la que menor capacidad de mineralización tuvo en ambos hidrocarburos y con ello, no considerar estos genes como la vía metabólica idónea para la degradación de hidrocarburos y por consiguiente considerar como mejor opción para estudios futuros la capacidad de mineralización bajo condiciones óptimas, la caracterización genética y de los perfiles de transcripción de *Aneurinibacillus* sp. (T1-1)(Zylstra and Gibson 1989, Wackett 1990, Kube, Chernikova et al. 2013, Morimoto, Kuwano et al. 2013).

## 9.-Conclusiones

- Se reactivaron 13 cepas que fueron aisladas anteriormente de una chapopotera del estado de Veracruz, Mex., además de una cepa de ATCC *E. coli* ATCC ® CRM-11229™ y una de *Pseudomonas* sp. del cepario del Lancaster Environmental Center.
- Se determinaron las 13 cepas hasta género y especie, siendo *Bacillus thurigiensis* (Chap 4 y CP-1), *Bacillus subtilis* (T2-5), *Lysinibacillus fusiformis* (T3-1, T2-2 y T2-1), *Aneirinibacillus* sp. (T1-1), *Paenibacillus dendritiformis* (Chap 2, Chap 1 y SC-1) y *Pseudomonas aeruginosa* (T3-3, T3-3v, T3-2, T3-2v y T3-4).
- Las cepas *Aneirinibacillus* sp. (T1-1), *P. aeruginosa* (T3-3v), *L. fusiformis* (T3-1) fueron las que tuvieron mayor crecimiento en medio MBS con 50 mg/l de fenantreno.
- Las cuatro cepas pudieron mineralizar tolueno y fenantreno. *Aneirinibacillus* sp. (T1-1) tuvo una mayor capacidad de mineralizar con un 5.59% de fenantreno y un 1.71% de tolueno. Y *Pseudomonas* sp. (Pseudo LEC) fue la cepa que menos mineralizó, con un 4.39% de fenantreno y 0.7% de tolueno. Las cepas *P. aeruginosa* (T3-3v) y *L. fusiformis* (T3-1) tuvieron una capacidad ligeramente mayor para mineralizar ambos hidrocarburos, pero no hubo diferencia significativa con respecto a *Pseudomonas* sp. (Pseudo LEC).



- Se diseñaron 5 pares de oligonucleótidos para amplificar los genes *TodC1*, *TodD*, *TodE*, *TodG* y *TodH*.
- La presencia de estos genes es un carácter sinapomórfico de las clases Gammaroteobacteria y Betaproteobacteria, y su presencia en otros *taxa* puede ser causa de transferencia horizontal de genes.
- La amplificación por PCR solo mostró una banda en el caso de *Pseudomonas* sp. (Pseudo LEC) en el gen *todC1*, mientras que en el resto de las cepas con las que se hicieron los ensayos de mineralización no se observó en ninguno de los casos. Por lo cual, la capacidad de mineralización de estas cepas no está relacionada con la presencia de estos genes y pueden hacerlo por otras vías metabólicas presentes en estas bacterias.

## 10.- Referencias

- Abbasian, F., R. Lockington, M. Megharaj and R. Naidu (2016). "A review on the genetics of aliphatic and aromatic hydrocarbon degradation." Applied biochemistry and biotechnology **178**(2): 224-250.
- Acland, A., R. Agarwala, T. Barrett, J. Beck, D. A. Benson, C. Bollin, E. Bolton, S. H. Bryant, K. Canese and D. M. Church (2014). Database resources of the national center for biotechnology information. Nucleic acids research. **42**: D7.
- An, D., D. Brown, I. Chatterjee, X. Dong, E. Ramos-Padron, S. Wilson, S. Bordenave, S. M. Caffrey, L. M. Gieg and C. W. Sensen (2013). "Microbial community and potential functional gene diversity involved in anaerobic hydrocarbon degradation and methanogenesis in an oil sands tailings pond 1." Genome **56**(10): 612-618.
- Artymiuk, P., C. Blake and P. Geary (1977). "Crystalline cis-Benzene glycol dehydrogenase from *Pseudomonas putida*." Journal of molecular biology **111**(2): 203-205.
- Barron, M. G. (2012). "Ecological impacts of the Deepwater Horizon oil spill: implications for immunotoxicity." Toxicologic pathology **40**(2): 315-320.
- Barton, L. L. and D. E. Northup (2011). Microbial Ecology.
- Bauer, J. E. and D. G. Capone (1985). "Degradation and mineralization of the polycyclic aromatic hydrocarbons anthracene and naphthalene in intertidal marine sediments." Applied and Environmental Microbiology **50**(1): 81-90.
- Bertini, L., V. Cafaro, S. Proietti, C. Caporale, P. Capasso, C. Caruso and A. Di Donato (2013). "Deepening TOL and TOU catabolic pathways of *Pseudomonas* sp. OX1: cloning, sequencing and characterization of the lower pathways." Biochimie **95**(2): 241-250.
- Bezza, F. A. and E. M. N. Chirwa (2015). "Biosurfactant from *Paenibacillus dendritiformis* and its application in assisting polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) and motor oil sludge removal from contaminated soil and sand media." Process Safety and Environmental Protection **98**: 354-364.
- Bragg, J. R., R. C. Prince, E. J. Harner and R. M. Atlas (1994). "Effectiveness of bioremediation for the Exxon Valdez oil spill." Nature **368**: 413-418.
- Duffner, F. M., U. Kirchner, M. P. Bauer and R. Müller (2000). "Phenol/cresol degradation by the thermophilic *Bacillus thermoglucosidasius* A7: cloning and sequence analysis of five genes involved in the pathway." Gene **256**(1): 215-221.
- Federación, D. O. d. I. (2005). NOM-138-SEMARNAT/SS-2003. Norma Oficial Mexicana, que establece los límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y las especificaciones para su caracterización y remediación. Diario Oficial de la Federación. SEMARNAT. Ciudad de México, México. **29**.
- Federación, D. O. d. I. (2016). Acuerdo por el que la Comisión Reguladora de Energía expide la Norma Oficial Mexicana NOM-016-CRE-2016, Especificaciones de calidad de los petrolíferos. C. R. d. Energía. Ciudad de México, México: 45.
- Flemming, H.-C. and J. Wingender (2010). "The biofilm matrix." Nature reviews microbiology **8**(9).
- Fuentes, S., V. Méndez, P. Aguila and M. Seeger (2014). "Bioremediation of petroleum hydrocarbons: catabolic genes, microbial communities, and applications." Applied microbiology and biotechnology **98**(11): 4781-4794.
- Gan, S., E. Lau and H. Ng (2009). "Remediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)." Journal of Hazardous Materials **172**(2): 532-549.
- Gibson, D. T. and R. E. Parales (2000). "Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology." Current opinion in biotechnology **11**(3): 236-243.

Harayama, S., M. Rejik, K.-L. Ngai and L. Ornston (1989). "Physically associated enzymes produce and metabolize 2-hydroxy-2, 4-dienoate, a chemically unstable intermediate formed in catechol metabolism via meta cleavage in *Pseudomonas putida*." Journal of bacteriology **171**(11): 6251-6258.

Jiang, B., Z. Zhou, Y. Dong, W. Tao, B. Wang, J. Jiang and X. Guan (2015). "Biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and o-, m-, and p-xylenes by the newly isolated bacterium *Comamonas* sp. JB." Applied biochemistry and biotechnology **176**(6): 1700-1708.

Kimes, N. E., A. V. Callaghan, J. M. Suflita and P. J. Morris (2014). "Microbial transformation of the Deepwater Horizon oil spill—past, present, and future perspectives." Frontiers in microbiology **5**.

Kube, M., T. N. Chernikova, Y. Al-Ramahi, A. Beloqui, N. Lopez-Cortez, M.-E. Guazzaroni, H. J. Heipieper, S. Klages, O. R. Kotsyurbenko and I. Langer (2013). "Genome sequence and functional genomic analysis of the oil-degrading bacterium *Oleispira antarctica*." Nature communications **4**.

Kumar, S., G. Stecher and K. Tamura (2016). "MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets." Molecular biology and evolution **33**(7): 1870-1874.

Ledezma-Villanueva, A., J. M. Adame-Rodríguez, I. A. O'Connor-Sánchez, J. F. Villarreal-Chiu and E. T. Aréchiga-Carvajal (2016). "Biodegradation kinetic rates of diesel-contaminated sandy soil samples by two different microbial consortia." Annals of microbiology **66**(1): 197-206.

Lee, J.-Y., K.-H. Jung, S. H. Choi and H.-S. Kim (1995). "Combination of the tod and the tol pathways in redesigning a metabolic route of *Pseudomonas putida* for the mineralization of a benzene, toluene, and p-xylene mixture." Applied and environmental microbiology **61**(6): 2211-2217.

Li, X., P. Li, X. Lin, C. Zhang, Q. Li and Z. Gong (2008). "Biodegradation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by microbial consortia in soil and slurry phases." Journal of hazardous materials **150**(1): 21-26.

Madigan, M. T. (2012). Brock Biology of Microorganisms, Benjamin Cummings.

Mandal, P. K. (2005). "Dioxin: a review of its environmental effects and its aryl hydrocarbon receptor biology." Journal of Comparative Physiology B **175**(4): 221-230.

Manjasetty, B. A., J. Powlowski and A. Vrielink (2003). "Crystal structure of a bifunctional aldolase–dehydrogenase: Sequestering a reactive and volatile intermediate." Proceedings of the National Academy of Sciences **100**(12): 6992-6997.

Mazzeo, D. E. C., C. E. Levy, D. d. F. de Angelis and M. A. Marin-Morales (2010). "BTEX biodegradation by bacteria from effluents of petroleum refinery." Science of the Total Environment **408**(20): 4334-4340.

Meagher, R. B. (2000). "Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants." Current opinion in plant biology **3**(2): 153-162.

Mihelcic, J. R. and R. G. Luthy (1988). "Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon compounds under various redox conditions in soil-water systems." Applied and Environmental Microbiology **54**(5): 1182-1187.

Morimoto, H., M. Kuwano and Y. Kasahara (2013). "Gene expression profiling of *Pseudomonas putida* F1 after exposure to aromatic hydrocarbon in soil by using proteome analysis." Archives of microbiology **195**(12): 805-813.

Mosqueda, G. and J.-L. Ramos (2000). "A set of genes encoding a second toluene efflux system in *Pseudomonas putida* DOT-T1E is linked to the tod genes for toluene metabolism." Journal of bacteriology **182**(4): 937-943.

Müller, J. A., A. S. Galushko, A. Kappler and B. Schink (1999). "Anaerobic degradation of m-cresol by *Desulfobacterium cetonicum* is initiated by formation of 3-hydroxybenzylsuccinate." Archives of microbiology **172**(5): 287-294.

Okere, U. V., A. Cabrerizo, J. Dachs, K. C. Jones and K. T. Semple (2012). "Biodegradation of phenanthrene by indigenous microorganisms in soils from Livingstone Island, Antarctica." FEMS microbiology letters **329**(1): 69-77.

Okuta, A., K. Ohnishi, S. Yagame and S. Harayama (2003). "Intersubunit interaction and catalytic activity of catechol 2, 3-dioxygenases." Biochemical Journal **371**(2): 557-564.

Ortega-González, D. K., D. Zaragoza, J. Aguirre-Garrido, H. Ramírez-Saad, C. Hernández-Rodríguez and J. Jan-Roblero (2013). "Degradation of benzene, toluene, and xylene isomers by a bacterial consortium obtained from rhizosphere soil of *Cyperus* sp. grown in a petroleum-contaminated area." Folia microbiologica **58**(6): 569-577.

Oyelami, A. O. and K. T. Semple (2015). "Impact of carbon nanomaterials on microbial activity in soil." Soil Biology and Biochemistry **86**: 172-180.

Peterson, C. H., S. D. Rice, J. W. Short, D. Esler, J. L. Bodkin, B. E. Ballachey and D. B. Irons (2003). "Long-term ecosystem response to the Exxon Valdez oil spill." Science **302**(5653): 2082-2086.

Powlowski, J., L. Sahlman and V. Shingler (1993). "Purification and properties of the physically associated meta-cleavage pathway enzymes 4-hydroxy-2-ketovalerate aldolase and aldehyde dehydrogenase (acylating) from *Pseudomonas* sp. strain CF600." Journal of bacteriology **175**(2): 377-385.

Prabhu, Y. and P. Phale (2003). "Biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas* sp. strain PP2: novel metabolic pathway, role of biosurfactant and cell surface hydrophobicity in hydrocarbon assimilation." Applied microbiology and biotechnology **61**(4): 342-351.

Riding, M. J., K. J. Doick, F. L. Martin, K. C. Jones and K. T. Semple (2013). "Chemical measures of bioavailability/bioaccessibility of PAHs in soil: fundamentals to application." Journal of hazardous materials **261**: 687-700.

Röling, W. F., M. G. Milner, D. M. Jones, K. Lee, F. Daniel, R. J. Swannell and I. M. Head (2002). "Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation." Applied and environmental microbiology **68**(11): 5537-5548.

Saul, D. J., J. M. Aislabie, C. E. Brown, L. Harris and J. M. Foght (2005). "Hydrocarbon contamination changes the bacterial diversity of soil from around Scott Base, Antarctica." FEMS Microbiology Ecology **53**(1): 141-155.

Schomburg, I., A. Chang, C. Ebeling, M. Gremse, C. Heldt, G. Huhn and D. Schomburg (2004). "BRENDA, the enzyme database: updates and major new developments." Nucleic acids research **32**(suppl\_1): D431-D433.

Shewfelt, K., H. Lee and R. G. Zytner (2005). "Optimization of nitrogen for bioventing of gasoline contaminated soil." Journal of Environmental Engineering and Science **4**(1): 29-42.

Sousa, S. T., L. Cabral, L. Júnior, G. Vieira and V. M. Oliveira (2017). "Diversity of aromatic hydroxylating dioxygenase genes in mangrove microbiome and their biogeographic patterns across global sites." MicrobiologyOpen.

Stewart, J. C. and D. M. Hawcroft (1977). A manual of radiobiology.

Thamer, M., A. R. Al-Kubaisi, Z. Zahraw, H. A. Abdullah, I. Hindy and A. A. Khadium (2013). "Biodegradation of Kirkuk light crude oil by *Bacillus thuringiensis*, Northern of Iraq."

Tortella, G., E. Salgado, S. A. Cuzzo, R. Mella-Herrera, L. Parra, M. Diez and O. Rubilar (2014). "Combined microbiological test to assess changes in an organic matrix used to avoid

agricultural soil contamination, exposed to an insecticide." Journal of soil science and plant nutrition **14**(4): 869-880.

Untergasser, A., H. Nijveen, X. Rao, T. Bisseling, R. Geurts and J. A. Leunissen. (2007). "Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3." Nucleic acids research Retrieved suppl\_2, 35.

Vázquez-Cuevas, G. M. and K. T. Semple (2016). Measurement of hydrocarbon bioavailability in soil. Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols, Springer: 231-246.

Vos, P., G. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, F. A. Rainey, K. H. Schleifer and W. B. Whitman (2011). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes, Springer New York.

Wackett, L. P. (1990). "[8] Toluene dioxygenase from *Pseudomonas putida* F1." Methods in enzymology **188**: 39-45.

Yúfera, E. P. (1994). Química orgánica básica y aplicada: de la molécula a la industria, Reverté.

Zylstra, G. J. and D. T. Gibson (1989). "Toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1. Nucleotide sequence of the todC1C2BADE genes and their expression in *Escherichia coli*." Journal of Biological Chemistry **264**(25): 14940-14946.

## 11.-Anexos

### 11.1.-Resultados de la secuenciación de los fragmentos amplificado por PCR

>1Escherichia coli strain Ecol\_316

```
CAGCTTGCTGTTTTGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCTGATGGAGGGG
GATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCC
TCTTGCCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGAT
CCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTACGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGG
CAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCC
TTCGGGTTGTAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTACTCATTGACGTTAC
CCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATC
GGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACC
TGGGAACTGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGT
GAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACGAAGACTGACGCTCA
GGTGCAGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTGCGACT
TGGAGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGGAGTACG
GCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGANATTGACGGGGNGCCCGCACAAGCGGTGNGAGCATG
```

>2Bacillus thuringiensis gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: C17

```
ACATGCAAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACA
CGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTG
AACCAGTGGTTGAAAATTGAAAGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCGCGTCGCATTAGCT
```

AGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACT  
GGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAG  
TCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAA  
CAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCA  
GCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGG  
TTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGT  
GCAGAAGAGGAAAGTGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTG  
GCGAAGGCGACTTCTGGTCTGTAAGTACTGACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG  
ATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGA  
AGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGG  
GGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGAC  
ATCCTCTGAAAACCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCG  
TCAGCTCGTGTGAGATGTTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCA  
TTAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGA

>3Paenibacillus dendritiformis strain IARI-IIWP-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GTCGAGCGGACTTGATGAGGAGCTTGCTCCTCTGAGAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAATACGTAGG  
TAACCTGCCCTTAAGACCGGGATAACTCACGGAACGTGGGCTAATACCGGATAGGCGATTTCTCGCA  
TGAGGGAATCGGGAAAGGCGGAGCAATCTGCCACTTATGGATGGACCTACGGCGCATTAGCTAGTTGG  
TGGGGTAACGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGAC  
TGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGCAAGTCTGAC  
GGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGCCAGGGAAGAACGCTAT  
GGAGAGTAACTGTTCCATAGGTGACGGTACCTGAGAAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC  
GCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCATG  
TAAGTCTGGTGTTTAAACCCGGGGCTCAACTCCGGGTGCGATCGGAAACTGTGTGACTTGAGTGCAGAA  
GAGGAAAGTGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAG  
GCGACTTTCTGGGCTGTAAGTACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT  
GGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTTAGGGGTTTCGATACCCTTGGTGCCGAAGTTAAC  
ACATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGC  
ACAAGCAGTGGAGTATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCTCT  
GACCGTCTAGAGATAGGGCTTCCCTTCGGGGCAGAGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTC  
GTGTCGTGAGATGTTGGGNTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTAACTTTAGTTGCCAGCATTAAAGT  
TGGGCACTCTAGAGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAAGG

>4Aneurinibacillus sp. YR247 gene for 16S ribosomal RNA

AAGTCGAGCGGACCAATGAAGAGCTTGCTCTTCGGCGGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAG  
GCAACCTGCCTGTACGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATACTTCTTTCAGACCG  
CATGGTCTGAAAGGGAAAGACCTTTGGTCACGTACAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGG  
GGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGA  
GACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGA  
GCAACGCCGCGTGAACGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGTTCTGTTGTTAGGGAAGAACC GCCGGGA

TGACCTCCCGGTCTGACGGTACCTAACGAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA  
CGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCCGGCTTCTTAAGTCAGGT  
GTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGCCACTTGAAACTGGGAAGCTTGAGTGCAGGAGAGGAGA  
GCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCCGTGGCGAAGGCCGGCTC  
TCTGGCCTGTAAGTACGCTGAGGCCGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC  
CACGCCGTAAACGTTGAGTGCTAGGTGTTGGGGACTCCAATCCTCAGTGCCGCAGCTAACGCAATAAGC  
ACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGG  
TGGAGCATGTGGTTTAATTGAAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGCTTGACATCCCGCTGACCCTCC  
TAGAGATAGGAGCTCTCTCGGAGCAGCGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTC

>5*Bacillus thuringiensis* strain VKK-1.9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

TGCAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTG  
GGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACC  
GCATGGTTGCAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTT  
GGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGG  
ACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTG  
ACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGCTTCGGGTCGTAAGACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAG  
TGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAG  
CCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTC  
TTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCA  
GAAGAGGAAAGTGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCG  
AAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACACTGAGGCCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAC  
CCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTT  
AACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC  
CGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGAAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCT  
CTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAG  
CTCGTGTCGTGAGATGTTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTTA  
GTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGAAA

>6*Pseudomonas aeruginosa* strain IR-TUMS/BPG11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

CATGGCAGTCGAGCGGATGAAGGGAGCTTGCTCCTGGATTACGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTA  
GGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTCCGGAAACGGGCGCTAATACCGCATACGTCCTGAGGGAG  
AAAGTGGGGGATCTTCGGACCTCACGCTATCAGATGAGCCTAGGTTCGATTAGCTAGTTGGTGGGGTA  
AAGGCCTACCAAGGCGACGATCCGTAAGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTACGAGACAC  
GGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCAT  
GCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAA  
TACCTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC  
GAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTCAGCAAGTTGGATG  
TGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCCAAAATACTGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGN  
TGGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGGCAGCCACC  
TGGACTGATACTGACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA

CGCCGTAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGCGCAGCTAACGCGATAAGTC  
GACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGT  
GGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGAACTTTCCA  
GAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCAGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGCCTGA  
GATGTTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACC

>7Pseudomonas aeruginosa strain R873 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

CTACACATGCAGTCGAGCGGATGAAGGGAGCTTGCTCCTGGATTGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGC  
CTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTCCGGAAACGGGCGCTAATACCGCATAACGTCCTGAGG  
GAGAAAGTGGGGGATCTTCGGACCTCACGCTATCAGATGAGCCTAGGTTCGGATTAGCTAGTTGGTGGG  
GTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGA  
CACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGC  
CATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGT  
TAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAA  
TACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTCAGCAAGTTGG  
ATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAACCTACTGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGT  
GGNTGGAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGAC  
CACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG  
TCCACGCCGTAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGCGCAGCTAACGCGATA  
AGTCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGC  
GGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGAACTTT  
CCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCAGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGCCT  
GAGATGTTGGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGCCTTAGTTACCAG

>8Pseudomonas aeruginosa strain IR-TUMS/BPG11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

ACACATGCAGTCGAGCGGATGGAAGNGAGCTTGCTCCTGGATTGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATG  
CCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTCCGGAAACGGGCGCTAATACCGCATAACGTCCTGAG  
GGAGAAAGTGGGGGATCTTCGGACCTCACGCTATCAGATGAGCCTAGGTTCGGATTAGCTAGTTGGTGG  
GGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGA  
ACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCA  
GCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAA  
GTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGT  
AATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTCAGCAAGTT  
GGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAACCTACTGAGCTAGAGTACGGTAGAGG  
GTGGGTGGAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCG  
ACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGT  
AGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGCGCAGCTAACGCGA  
TAAGTCGACCGCTGGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACA  
AGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGAA  
CTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCAGACACAGGTGCTGCATG



>9Paenibacillus dendritiformis strain IARI-IIWP-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

AGTCGAGCGGACTTGATAGAGGAGCTTGCTCCTCTGAGAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAATACGTA  
GGTAACCTGCCCTTAAGACCGGGATAACTCACGGAACGTGGGCTAATACCGGATAGGCGATTTCTCG  
CATGAGGGAATCGGGAAAGGCGGAGCAATCTGCCACTTATGGATGGACCTACGGCGCATTAGCTAGTT  
GGTGGGGTAACGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGG  
ACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGCAAGTCTG  
ACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGCCAGGGAAGAACGCT  
ATGGAGAGTAACTGTTCCATAGGTGACGGTACCTGAGAAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAG  
CCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCAT  
GTAAGTCTGGTGTAAACCCGGGGCTCAACTCCGGGTGCGATCGGAACTGTGTGACTTGAGTGCAGA  
AGAGGAAAGTGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAA  
GGCGACTTTCTGGGCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCC  
TGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAATGCTAGGTGTTAGGGGTTTCGATACCCTTGGTGCCGAAGTTAA  
CACATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGTGCAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCG  
CACAAGCAGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCTC  
TGACCGTCTAGAGATAGGGCTCCCTTCGGGGCAGAGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTC

>10Lysinibacillus fusiformis strain RB-21, complete genome

AGGAGCTTGCTCCTTCGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTACCTTATAGTTTG  
GGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAATAATCTGTTTACCTCATGGTGAAACACTGAAAGAC  
GGTTTTCGGCTGTGCTATAGGATGGGCCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAA  
GGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTC  
CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAG  
TGAAGAAGGATTTGCGTTCGTAACACTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAGTACAGTAGTAACTGGCTGTAC  
CTTGACGGTACCTTATTAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCA  
AGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTAAAGCCCAC  
GGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGATAGTGGAAATCCAA  
GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTATCTGGTCTGTAAC  
TGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACG  
ATGAGTGCTAAGTGTAGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTG  
GGGAGTACGGTGCAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGCATGT  
GGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCGTTGACCACTGTAGAGATATG  
GTTTCCCCTTCGGGGCAACGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGG

>11Paenibacillus dendritiformis strain IARI-IIWP-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

CAGAGGAGCTTGCTCCTCTGAGAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAATACGTAGGTAACCTGCCCTTAA  
GACCGGGATAACTCACGGAACGTGGGCTAATACCGGATAGGCGATTTCTCGCATGAGGGAATCGGG  
AAAGGCGGAGCAATCTGCCACTTATGGATGGACCTACGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCT  
ACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCC  
AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGCAAGTCTGACGGAGCAACGCCGC

GTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGCCAGGGAAGAACGCTATGGAGAGTAACTGT  
TCCATAGGTGACGGTACCTGAGAAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTA  
GGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCATGTAAGTCTGGTGTTT  
AAACCCGGGGCTCAACTCCGGGTGCGATCGGAAACTGTGTGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAA  
ATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGGCGACTTTCTGGG  
CTGTAAGTACGCTGAGGCGGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCC  
GTAAACGATGAATGCTAGGTGTTAGGGGTTTCGATACCCTGGTGCCGAAGTTAACACATTAAGCATT  
CGCCTGGGGAGTACGGTGCAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCAGTGGAA  
GTATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCTCTGACCGTCTAGAG  
ATAGGGCTTCCCTTCGGGGCAGAGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGANG  
TT

>12Bacillus subtilis strain KL1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GCTTGCTTTTTAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATA  
ACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAATCCTTTTCTACTCATGTAGAAAAGCTGAAAGACGGTTT  
ACGCTGTCACTTACAGATGGGCCCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCGA  
CGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGG  
GAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGA  
AGGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACGAGAGTAACTGCTCGTACCTTGAC  
GGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGT  
TGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTC  
AACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGACTTGAGTGCAGAAGAGAAGAGTGGAAATCCACGTGTA  
GCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGGCGACTCTTTGGTCTGTAAGTACG  
CTGAGGCGGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGA  
GTGCTAAGTGTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAG  
TACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTT  
AATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTCCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTT  
CCCTTCGGGGGACAGGATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTA  
AGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCC  
GGTGACAAACCGGAGAAA

>13Lysinibacillus fusiformis strain G15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

AAGGAGCTTGCTCCTTCGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTACCTTATAGTTT  
GGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAATAATCTGTTTCACTCATGGTGAAACTGAAAGA  
CGGTTTCGGCTGTCGCTATAGGATGGGCCCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCA  
AGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACT  
CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGA  
GTGAAGAAGGATTTTCGGTTCGTAAACTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAGTACAGTAGTAACTGGCTGT  
ACCTTGACGGTACCTTATTAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG  
CAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCC  
ACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGATAGTGGAAATTC

AAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCCACTATCTGGTCTGTA  
ACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA  
CGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCT  
GGNGAGTACGGTCGCAAGACTGAACTCAAAGGAATTGACGGNGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATG  
TGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTACCAGGTCTTGACATCCCGTTGACCACTGTAGAGATAT  
GGTTTCCCCTTCGGGGCAACGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTG  
GGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGTGAC  
TGCCGGTGACAAACCGGAAGAA

>14Lysinibacillus fusiformis strain T7.20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

CGAGAGCAAGGAGCTTGCTCCTTCGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTACCT  
TATAGTTTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAATAATCTGTTTCACCTCATGGTGAAACA  
CTGAAAGACGGTTTCGGCTGTGCTATAGGATGGGCCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACG  
GCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGG  
CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGC  
CGCGTGAGTGAAGAAGGATTTCCGTTTCGTA  
AACTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAGTACAGTAGTAAC  
TGGCTGTACCTTGACGGTACCTTATTAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG  
TAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGT  
GAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGATAGT  
GGAATCCAAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCCACTATCT  
GGTCTGTA  
ACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC  
GCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCA  
CTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGT  
GGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTACCAGGTCTTGACATCCCGTTGACCACTGT  
AGAGATATGTTTCCCCTTCGGGGGCAACGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTG  
GAGATGTTGGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCAC  
TCTAAGGTGACTGCCGGTGACAA

>15Pseudomonas aeruginosa strain IR-TUMS/BPG11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

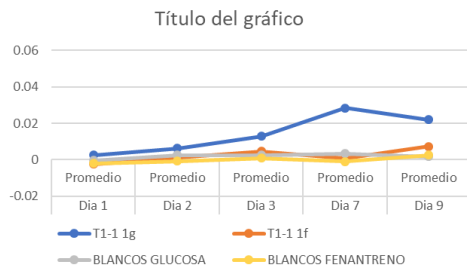
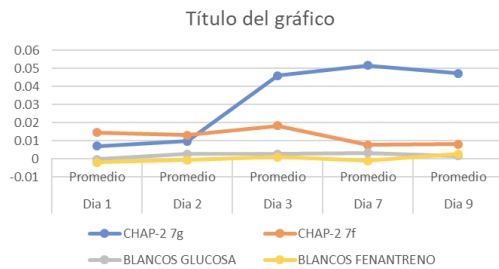
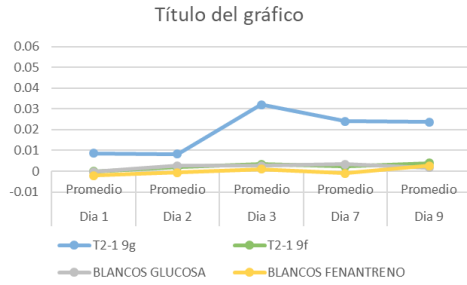
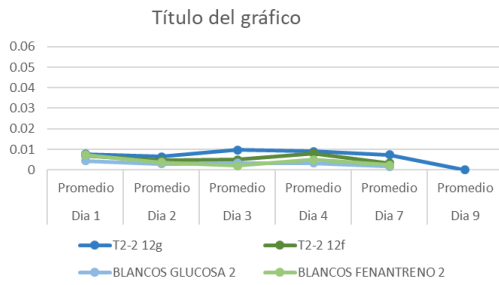
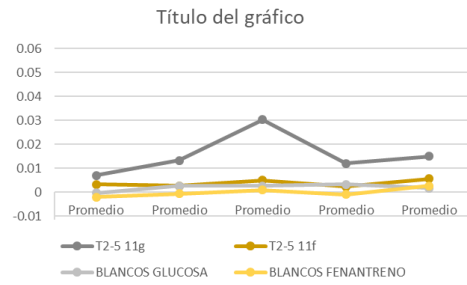
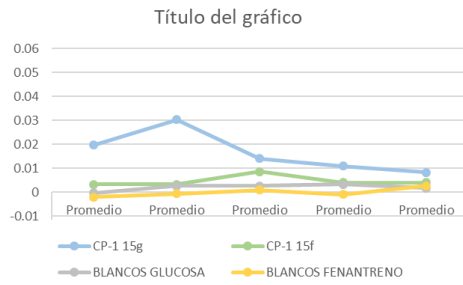
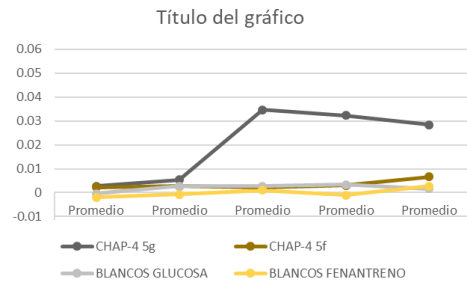
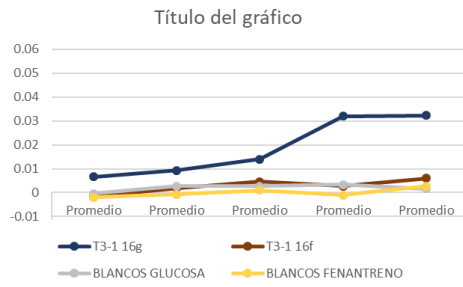
GAGCTTGCTCCTGGATTGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGAT  
AACGTCCGGAAACGGGCGCTAATACCGCATAACGTCCTGAGGGAGAAAGTGGGGGATCTTCGGACCTCA  
CGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCG  
TAACTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGA  
ACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAG  
CAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTC  
GGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCAA  
CAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGAAGCGTTAATCGGA  
ATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTCAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGG  
GAACTGCATCCAAA  
ACTACTGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGGTGGAATTTCTGTGTAGCGGTGA  
AATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGT  
GCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTAGC  
CGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCG

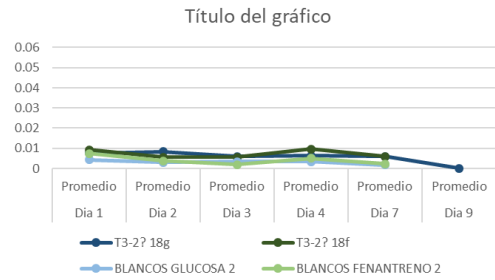
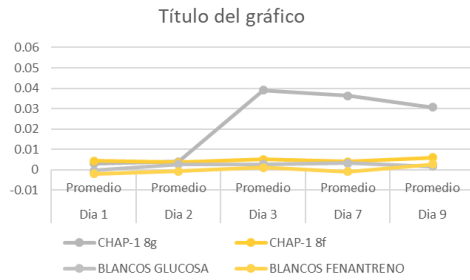
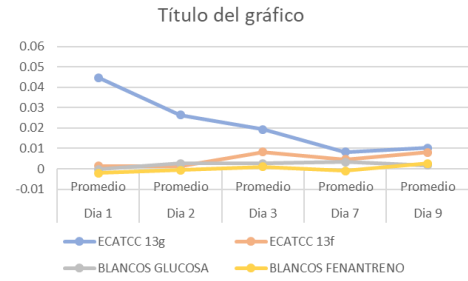
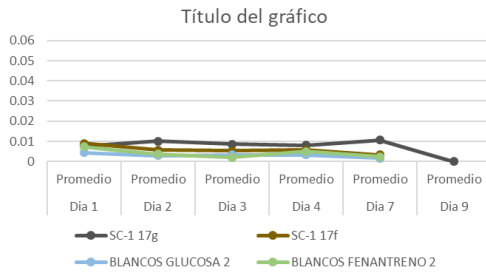
CAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAG  
CAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGAAGCTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGA  
ACTCAGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGA

>Methanofollis ethanolicus gene for 16S rRNA, partial sequence

GTCAGTCTATCGGGTTCGATTAAGCCATGCGAGTCGAGAGGGTTCGGCCCTCGGCGCATTGCTCAGT  
AACACGTGGACAACCTGCCCTGAGGAGGGGGATAACTCCGGAAAACCTGGAGATAATACCCCATAGCCT  
ATGAATGCTGGAATGCTTTGTAGGTAAGGTCCGCCGCTCAGGATGGGTCTGCGGCCGATTAGGTT  
GTTGTTGGGGTAACGGCCCAACAAGCCTGTAATCGGTACGGGTTGTGGGAGCAAGAGCCCGGAGATG  
GATTCTGAGACACGAATCCAGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCCGCGAAAACCTTACAATGCAGGAAACT  
GTGATAAGGGAACCCCGAGTGCCTGTATGGACAGGCTGTTGAGGTGCGCAAAAAACACTTGGAGAAAG  
GGCCGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGTAATACCGGCGGCTCGAGTGGTGGCCACTATTACTGG  
GCTTAAAGCGTCCGTAGCTGGGTAGTTAAGTCTCTGGGGAAATCTTCCGGCTCAACCGGAAGGCGTCTC  
AGGGATACTGGTTACCTTGGGATCGGGAGAGGTGAGAGGTAAGTCTGGGGGTAGGAGTGAAATCCTGT  
TATCCTCAGGGGACCACCTGTGGCGAAGGCGTCTCACCAGAACGACTCCGACAGTGAGGGACGAAAGC  
TGGGGGAGCAAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCCCAGCCGTAAACTATGCGCGTTAGGTGTATCAG  
TGGCCACGAGCTACTGAGGTGCCGAAGGAAACCGTGAAACGCGCCGCTGGGAAGTACGGTTCGCAA  
GGCTGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGAGCACCACAACGGGTGGAGCCTGCGGTTTAATTGGACTCA  
ACGCCGGACAGCTACCCGGGTAGGACAGCGATATGATAGCCGGGCTGAAGACCTTGCTTGATCAGCTG  
AGAGGAGGTGCATGGCCGTCGTCAGTTTCGTAAGTCTGTAAGCATCCTGTTAAGTCAAGCAACGAGCGAGA  
CCCACGCCAACAGTTGCCAGCATGTTCTCTGGAATGATGGGGACTGTTGGGACCGCCTCTGCTAAAG  
AGGAGGAAGGAATGGGCAACGGTAGGTCAGCATGCCCCGAATTACCCGGGCTACACGCGGGCTACAA  
TGGACAGGACAATGGGTATCGACACCGAAAGGTGAAGGCAATCTCCTAAACCTGCCCTTAGTTCGGATT  
GTGGGCTGTAAGTCCGACATGAAGCTGGAATCCGTAGTAATCGCGTTTCAAATAGCGCGGTGAATC  
TGTCCTGCTCCTTGACACACCGCCCGTCAAACACCCGAGTGGGGTTTGGATGAGGCTGCGGTTGTT  
GCCGTAGTCGAATCTAGGTTCCGCAAGGGGGTT

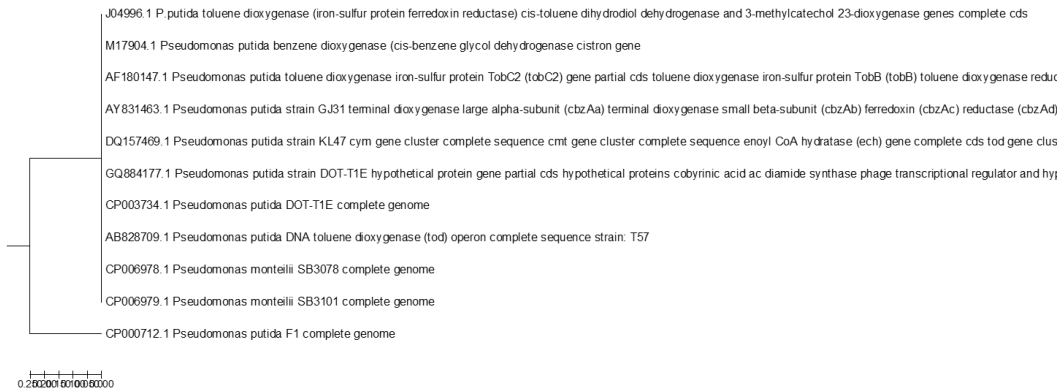
## 11.2.-Curvas de crecimiento de las cepas en fenantreno y glucosa



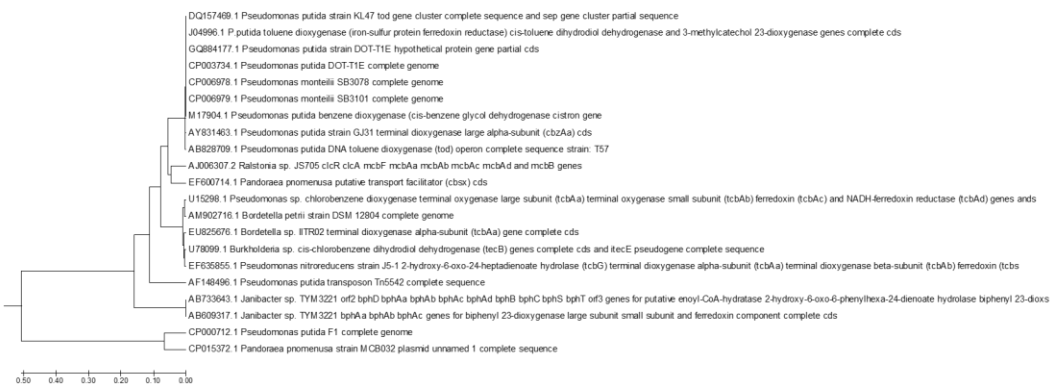


### 11.3.-Filogramas de los genes *tod*

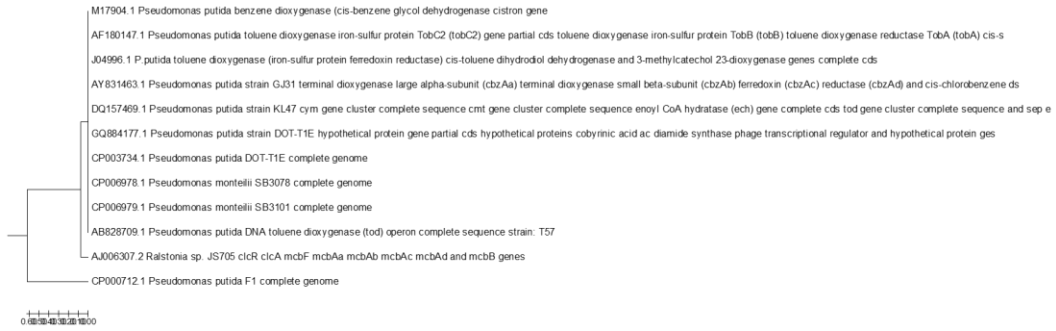
*todB*



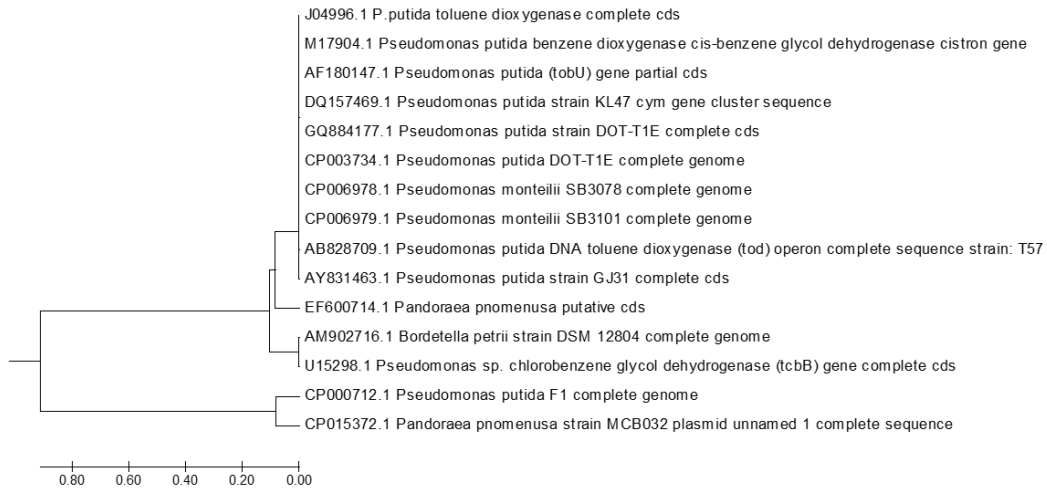
*todC1*



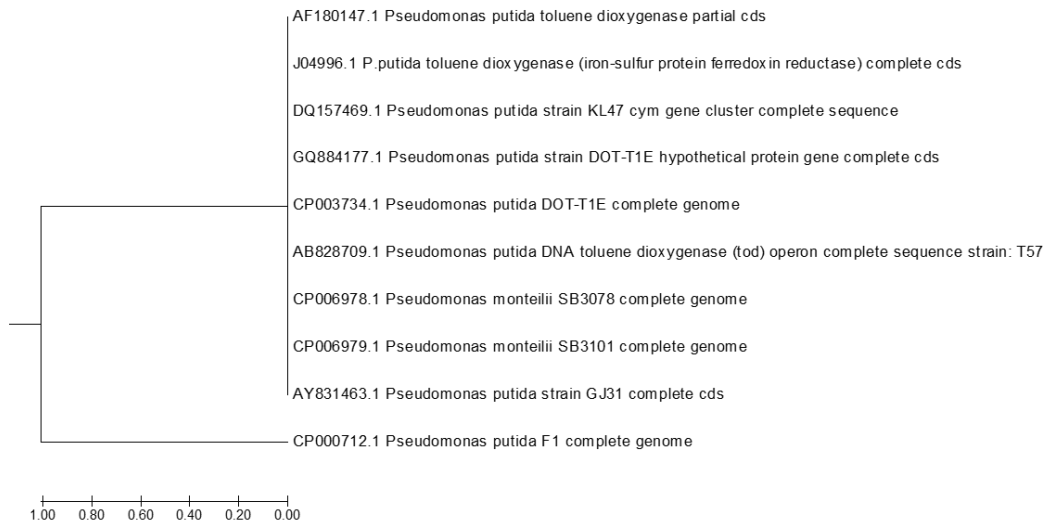
### *todC2*



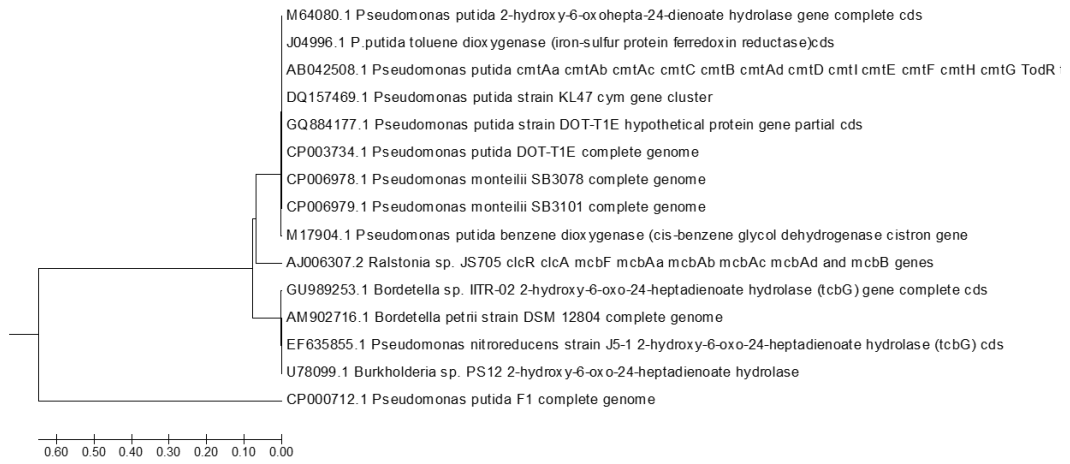
### *todD*



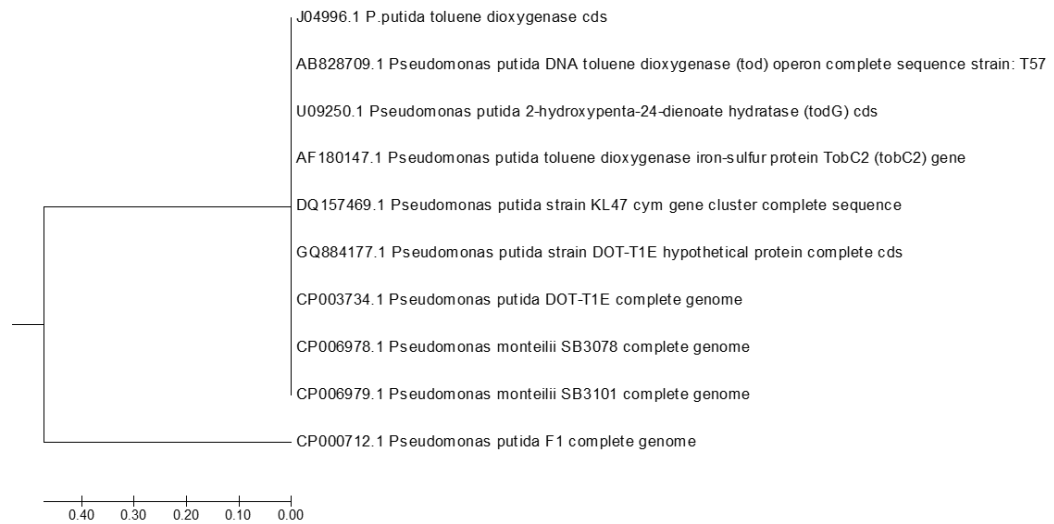
### *todE*



### *todF*

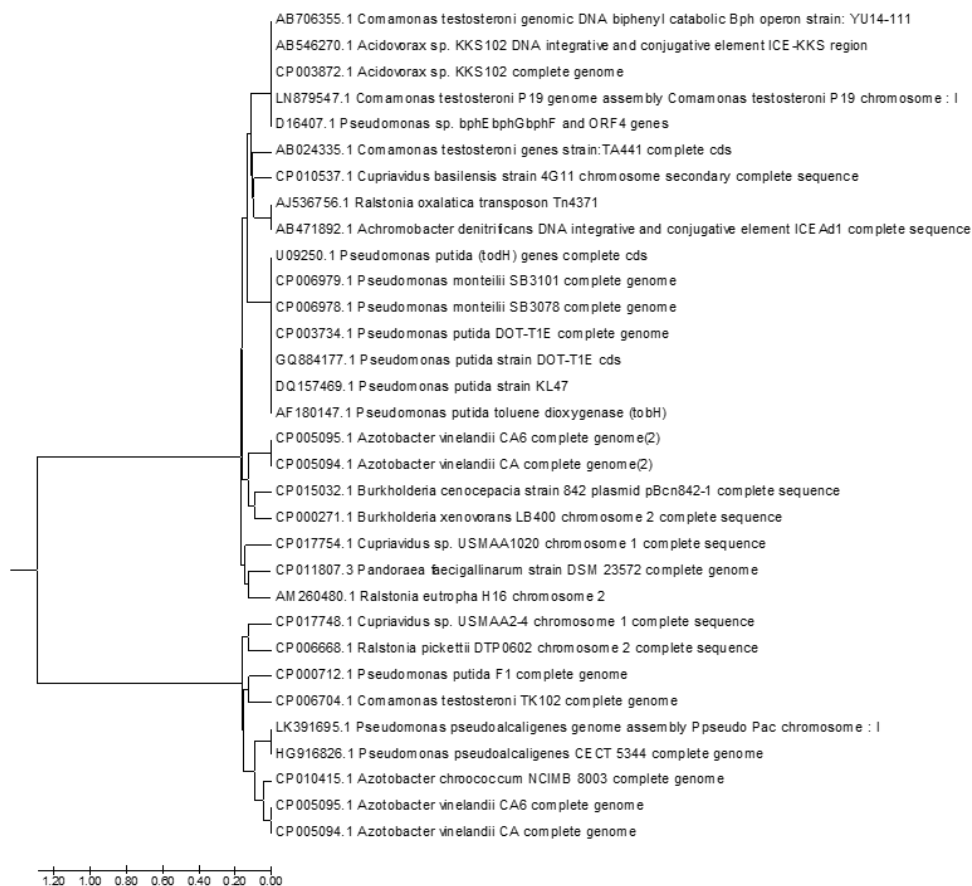


### *todG*

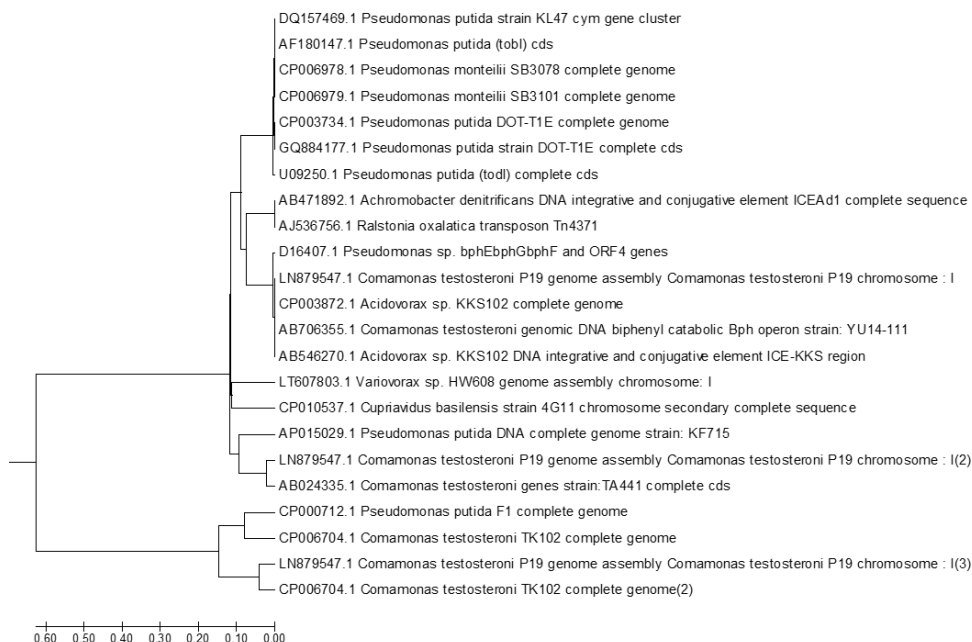




## *todH*

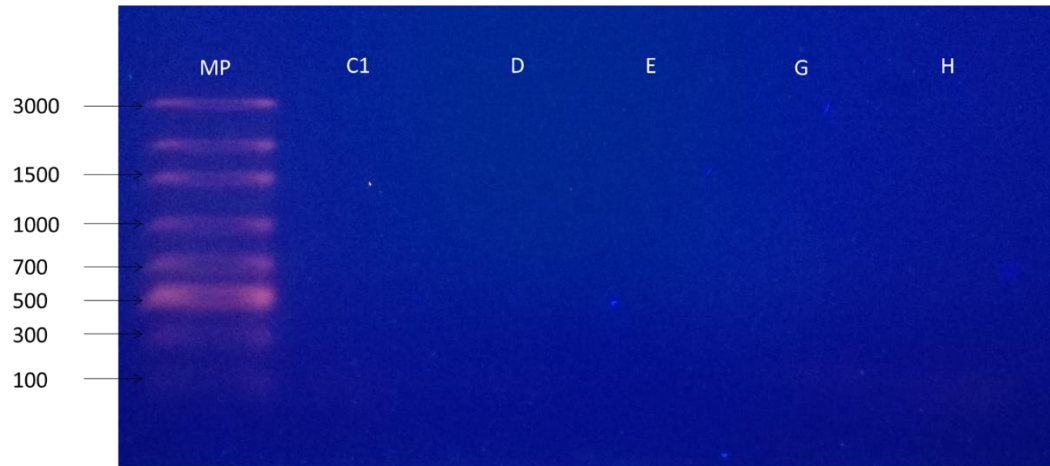


## *todI*



#### 11.4.-Geles de la amplificación de los genes *tod*

*L. Fusiformis* (T3-1)



*P. aeruginosa* (T3-3v)

