

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



“Caracterización genómica y funcional del catabolismo de hidrocarburos aromáticos en la bacteria marina *Alcaligenes aquatilis* QD168 y estudio de la respuesta adaptativa a estrés oxidativo durante la degradación de benceno”

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Magíster en Bioquímica área de Especialización en Bioquímica Ambiental y Memoria para optar al Título de Bioquímico por:

ROBERTO EDUARDO DURÁN VARGAS

Director de Tesis: Prof. Dr. Michael Seeger Pfeiffer

Co-director de Tesis: Prof. Dr. Davor Cotoras Tadic

SANTIAGO-CHILE

Junio 2019

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

ROBERTO EDUARDO DURÁN VARGAS

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: Bioquímica Ambiental y Título de Bioquímica, en el examen público rendido el día

Director de Tesis:

Prof. Dr. Michael Seeger Pfeiffer

Co-Director de Tesis:

Prof. Dr. Davor Cotoras Tadic

Comisión Evaluadora de Tesis:

Prof. Dr. Carlos Santiviago Cid

Prof. Dra. Lorena García Nannig

Prof. Dr. Bernardo González Ojeda

Financiamiento

Esta Tesis fue desarrollada en el Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología Ambiental (LMMBA) del Departamento de Química de la Universidad Técnica Federico Santa María (UTFSM), Valparaíso, Chile. Este proyecto fue financiado por la Beca CONICYT de Magíster Nacional 2016-22162307 y los proyectos FONDECYT 1151174 y ANILLO GAMBIO ACT 172128.

Publicaciones

Durán, R. E., Méndez, V., Rodríguez-Castro, L., Barra-Sanhueza, B., Salvà-Serra, F., Moore, E. R. M, Castro-Nallar, E., Seeger, M. (2019) Genomic and physiological traits of the marine bacterium *Alcaligenes aquatilis* QD168 isolated from Quintero Bay, Central Chile, Reveal a Robust Adaptive Response to Environmental Stressors. *Frontiers in Microbiology*. doi: 10.3389/fmicb.2019.00528

Durán, R. E., Barra-Sanhueza, B., Salvà-Serra, F., Méndez, V., Jaén-Luchoro, D., Moore, E. R. M., Seeger, M. (2019) Complete genome sequence of the marine hydrocarbon-degrader *Alcaligenes aquatilis* QD168, isolated from a crude oil-polluted sediment of Quintero Bay, Central Chile. *Microbial Resource Announcements*. 8:e01664-18. doi: 10.1128/MRA.01664-18

Congresos Nacionales e Internacionales

Durán, R. E., Méndez V., Castro-Nallar E., Moore E. R. B., Seeger M. (2019) Phylogenomic analysis of *Alcaligenes* spp. indicates five genomic clusters, revealing *A. faecalis* subsp. *phenolicus* reclassification to *A. phenolicus* sp. nov. 8th Congress of European Microbiologists (FEMS 2019). Glasgow, Escocia. 7-11 de julio del 2019. (Aceptado)

Durán, R., Rodríguez, L., Méndez, V., Seeger, M. (2018) Respuesta fisiológica a estrés oxidativo en la bacteria marina *Alcaligenes aquatilis* QD168 durante la degradación de benceno. XXIV Congreso Latinoamericano de Microbiología (ALAM XXIV) y XL Congreso Chileno de Microbiología. Santiago, Chile. 13-16 de noviembre de 2018.

Seeger, M., Méndez, V., Villegas, P., Orellana, R., Barra, B., Vega-Celedón, P., **Durán, R.**, Hernández, L., Álvarez-Santullano, N., González, A., Macaya, C., González, M., Rojas, M.M., Carballo, M.E. Extremophiles and their Potential for Bioremediation and the Production of Bioplastics. XXXIII Congreso Latinoamericano de Química y X Congreso de Ciencias, Tecnología e Innovación Química. 09 al 12 de octubre de 2018, La Habana, Cuba.

Durán, R., Méndez, V., Salvà-Serra, F., Barra, B., Moore, E., González, M., Seeger, M. (2018) Genome-scale aromatic reconstruction of the marine benzene-degrading bacterium *Alcaligenes aquatilis* QD168 as a biodegradation prospecting model. 17th International Symposium of Microbial Ecology (ISME17). Leipzig, Alemania. 12-17 de agosto de 2018.

Durán, R., Méndez, V., Salvà-Serra, F., Barra, B., Moore, E., Seeger, M. (2017). Unravelling the aromatic catabolism potential of the hydrocarbonoclastic marine bacterium *Alcaligenes* sp. QD168. 13th International Society for Computational Biology Student Council Symposium (ISCB-SCS). Praga, República Checa. 21 de julio del 2017. 28p.

Durán, R., Salvà-Serra, F., Barra, B., Moore, E., Seeger, M. (2017). Aromatic ring-hydroxylating oxygenase encoding genes of the hydrocarbonoclastic marine bacterium *Alcaligenes* sp. QD168. 7th Congress of European Microbiologists (FEMS 2017). Valencia, España. 9-13 de julio del 2017.

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario

ADNg: Ácido desoxirribonucleico genómico

ANI: Análisis de identidad nucleotídica

ANIB: Análisis de identidad nucleotídica basado en BLAST

ANOVA (inglés): Análisis de varianza

API20NE (inglés): Índice de perfil analítico para bacterias no entéricas

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ARNr: Ácido ribonucleico ribosomal

ARNt: Ácido ribonucleico de transferencia

ASW (inglés): Agua de mar artificial

BHT (inglés): Hidroxitolueno butilado

BLAST (inglés): Herramienta de alineamiento básico local de secuencias

BTEX: Benceno, tolueno, etilbenceno y xileno

C120: Catecol 1,2-dioxigenasa

C230: Catecol 2,3-dioxigenasa

CDS (inglés): Secuencia codificante

COGs (inglés): Clúster de grupos ortólogos

DE: Desviación estándar

DNPH (inglés): 2,4-dinitrofenilhidrazina

EDTA (inglés): Ácido etilendiaminotetraacético

EROs: Especies reactivas de oxígeno

HAMs: Hidrocarburos aromáticos monocíclicos

HAPs: Hidrocarburos aromáticos policíclicos

HPLC-DAD (inglés): Cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a un detector de arreglo de diodos

HGAP (inglés): Proceso de ensamblaje jerárquico del genoma

LB: Luria Bertani

LOOH: Lipoperóxidos

MDA: Malondialdehído

MLSA (inglés): Análisis de secuencias multilocus

ORF (inglés): Marco abierto de lectura

PGAP (inglés): Sistema de anotación genómica procariótica

PQ: Paraquat

RAST (inglés): Anotación rápida utilizando tecnología de subsistemas

RT-qPCR (inglés): Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción inversa

SOD: Superóxido dismutasa

TBARS (inglés): Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

UFC: Unidades formadores de colonias

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS.....	v
ÍNDICE GENERAL	vi
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	x
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Petróleo crudo: composición y situación en la Región de Valparaíso.....	1
1.2. Bacterias en ambientes contaminados con petróleo crudo y derivados	2
1.3. Degradación bacteriana de hidrocarburos aromáticos.....	3
1.4. Estrés oxidativo: Especies reactivas de oxígeno (ERO), regulación y sistemas antioxidantes.....	6
1.5. Respuesta adaptativa a estrés oxidativo durante la degradación bacteriana de compuestos aromáticos.....	8
1.6. <i>Alcaligenes</i> sp. QD168: bacteria marina de la bahía de Quintero	9
1.7. HIPÓTESIS.....	11
1.8. OBJETIVO GENERAL.....	11
1.9. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
2. MATERIALES Y MÉTODOS	12
2.1. Reactivos	12
2.2. Cepa bacteriana.....	12
2.3. Medios y condiciones de cultivo	12
2.4. Extracción de ADN genómico de <i>Alcaligenes</i> sp. QD168.....	13
2.5. Secuenciación y ensamblaje del genoma de <i>Alcaligenes</i> sp. QD168	13
2.6. Anotación del genoma de <i>Alcaligenes</i> sp. QD168.....	14
2.7. Representación circular del genoma de <i>Alcaligenes</i> sp. QD168.....	14
2.8. Identificación filogenética de <i>Alcaligenes</i> sp. QD168.....	14
2.9. Datos genómicos de <i>Alcaligenes</i> spp.	15
2.10. Análisis de identidad nucleotídica promedio (ANIb)	15
2.11. Análisis de secuencias multi-locus (MLSA)	15
2.12. Clasificación de las categorías de Clusters de Grupos Ortólogos (COGs).....	16
2.13. Identificación <i>in silico</i> de genes que codifican monooxigenasas, hidroxilasas, dioxigenasas, y de genes asociados a la respuesta adaptativa a estrés oxidativo	16
2.14. Identificación y clasificación filogenética de las subunidades α de oxigenasas hidroxilantes.....	16
2.15. Reconstrucción del catabolismo aromático de <i>Alcaligenes</i> sp. QD168 y análisis del contexto genómico	17
2.16. Efecto de la salinidad y temperatura en el crecimiento de <i>Alcaligenes</i> sp. QD168	17
2.17. Caracterización bioquímica de <i>Alcaligenes</i> sp. QD168.....	18

2.18.	Crecimiento de <i>Alcaligenes</i> sp. QD168 en compuestos aromáticos como única fuente de carbono	18
2.19.	Crecimiento de <i>Alcaligenes</i> sp. QD168 en compuestos aromáticos como única fuente de carbono y nitrógeno	19
2.20.	Crecimiento de <i>Alcaligenes</i> sp. QD168 en compuestos aromáticos volátiles.....	19
2.21.	Curva de crecimiento de <i>Alcaligenes</i> sp. QD168 en benceno como única fuente de carbono.....	19
2.22.	Ensayo de células en reposo de <i>Alcaligenes</i> sp. QD68 en benceno	20
2.23.	Cuantificación de benceno y fenol mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) acoplado a un detector de arreglo de diodos (DAD).....	20
2.24.	Susceptibilidad de <i>Alcaligenes</i> sp. QD168 a agentes oxidantes.....	21
2.25.	Efecto de la exposición a agentes oxidantes sobre la viabilidad celular	21
2.26.	Determinación de daño a macromoléculas	22
2.26.1.	Preparación del extracto crudo	22
2.26.2.	Cuantificación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	22
2.26.3.	Determinación de carbonilación de proteínas	22
2.27.	Análisis de datos.....	23
2.28.	Análisis cuantitativo de la expresión de genes por RT-qPCR	23
2.28.1.	Diseño de partidores.....	23
2.28.2.	Curvas de disociación y determinación de eficiencias de los partidores	25
2.28.3.	Extracción y purificación de ARN	25
2.28.4.	Síntesis de ADN complementario (ADNc) y cuantificación de la expresión génica	26
3.	RESULTADOS	28
3.1.	Caracterización genómica, taxonómica y bioquímica de la bacteria marina <i>Alcaligenes</i> sp. QD168..	28
3.1.1.	Caracterización del genoma de <i>Alcaligenes</i> sp. QD168.....	28
3.1.2.	Identificación filogenética mediante ARNr 16S de <i>Alcaligenes</i> sp. QD168	30
3.1.3.	Análisis filogenómico del género <i>Alcaligenes</i>	31
3.1.4.	Comparación de clusters de grupos ortólogos (COGs) entre <i>Alcaligenes</i> spp.	34
3.1.5.	Efecto de la salinidad en el crecimiento de <i>A. aquatilis</i> QD168.....	35
3.1.6.	Efecto de la temperatura en el crecimiento de <i>A. aquatilis</i> QD168	36
3.1.7.	Caracterización bioquímica de la bacteria <i>A. aquatilis</i> QD168.....	36
3.2.	Identificación de genes de rutas catabólicas de compuestos aromáticos en <i>A. aquatilis</i> QD168..	38
3.2.1.	Análisis de las rutas centrales del catabolismo de compuestos aromáticos de <i>A. aquatilis</i> QD168	38
Ruta central del β -cetoadipato: rama del catecol.....	39	
Ruta central del protocatecuato	40	
Ruta central del 3-(2,3-dihidroxifenil)-propionato y 2,3-dihidroxicinamato	42	
Ruta central del fenilacetil-CoA	43	
Ruta central del homogentisato.....	43	

Ruta central del 2,5-dihidroxiniconato.....	44
Ruta central del gentisato	44
3.2.2. Análisis de las rutas periféricas del catabolismo de compuestos aromáticos de <i>A. aquatilis</i> QD168	45
Rutas periféricas que convergen en la ruta central del β -cetoadipato: rama del catecol	46
Rutas y reacciones periféricas que convergen en la ruta central del protocatecuato	48
Rutas periféricas que convergen en la ruta central del 3-(2,3-dihidroxifenil)-propionato y 2,3-dihidroxicinamato.....	50
Rutas y reacciones periféricas que convergen en la ruta central del fenilacetil-CoA.....	50
Rutas y reacciones periféricas que convergen en la ruta central del homogentisato.....	51
Rutas periféricas que convergen en la ruta central del 2,5-dihidroxinicotinato.....	51
Reacciones periféricas que convergen en la ruta central del gentisato.....	52
3.2.3. Clasificación de dioxigenasas hidroxilantes del anillo aromático (ARHDO) de la bacteria <i>A. aquatilis</i> QD168.....	54
3.3. Análisis funcional de rutas catabólicas de <i>A. aquatilis</i> QD168	56
3.3.1. Crecimiento de <i>A. aquatilis</i> QD168 en compuestos aromáticos como única fuente de carbono	56
3.3.2. Crecimiento de <i>A. aquatilis</i> QD168 en compuestos aromáticos como única fuente de carbono y nitrógeno	57
3.3.3. Crecimiento de <i>A. aquatilis</i> QD168 en compuestos aromáticos volátiles.....	58
3.4. Estudio funcional de la ruta periférica del benceno en <i>A. aquatilis</i> QD168	59
3.4.1. Crecimiento de <i>A. aquatilis</i> QD168 en benceno	59
3.4.2. Ensayo de degradación de benceno por células en reposo	60
3.4.3. Análisis transcripcional de las rutas catabólicas de benceno en <i>A. aquatilis</i> QD168	61
3.5. Análisis de los genes asociados a la respuesta adaptativa a estrés oxidativo en <i>A. aquatilis</i> QD168.....	63
3.5.1. Identificación de enzimas antioxidantes y sistemas de reparación a daño por estrés oxidativo en <i>A. aquatilis</i> QD168.....	63
3.5.1. Identificación de los reguladores transcripcionales OxyR, SoxR, PerR y OhrR en <i>A. aquatilis</i> QD168	64
3.5.2. Identificación de isoenzimas resistentes a estrés oxidativo en <i>A. aquatilis</i> QD168.....	66
3.6. Estudio de la respuesta adaptativa a estrés oxidativo de <i>A. aquatilis</i> QD168 durante la degradación de benceno.....	68
3.6.1. Efecto de la exposición a agentes oxidantes en la respuesta a estrés oxidativo de <i>A. aquatilis</i> QD168	68
Susceptibilidad de <i>A. aquatilis</i> QD168 durante la exposición a agentes oxidantes.....	69
Viabilidad de <i>A. aquatilis</i> QD168 durante la exposición a agentes oxidantes	69
Daño a macromoléculas frente a la exposición a agentes oxidantes en <i>A. aquatilis</i> QD168	70
Daño de membranas durante la exposición de agentes oxidantes en <i>A. aquatilis</i> QD168.....	71
Carbonilación de proteínas durante la exposición a agentes oxidantes en <i>A. aquatilis</i> QD168	71
Análisis transcripcional de genes asociados a la respuesta adaptativa a estrés oxidativo en <i>A. aquatilis</i> QD168 durante la exposición a agentes oxidantes	71

3.6.2. Efecto de la degradación de benceno en la respuesta adaptativa a estrés oxidativo de <i>A. aquatilis</i> QD168	72
Daño de la membrana celular en <i>A. aquatilis</i> QD168 durante la degradación de benceno ..	72
Análisis de la expresión de genes asociados a la respuesta adaptativa a estrés oxidativo de <i>A. aquatilis</i> QD168 durante la degradación de benceno	74
4. DISCUSIÓN	77
Caracterización fisiológica y bioquímica de <i>A. aquatilis</i> QD168.....	78
Identificación taxonómica y posicionamiento filogenómico de la cepa QD168	79
Identificación de genes del catabolismo aromático en la cepa QD168.....	80
Estudio funcional de la vía del benceno en <i>A. aquatilis</i> QD168.....	82
Identificación de genes de la respuesta adaptativa a estrés oxidativo en la <i>A. aquatilis</i> QD168	84
Respuesta a estrés oxidativo frente a agentes oxidantes de <i>A. aquatilis</i> QD168.....	85
Respuesta a estrés oxidativo durante el crecimiento en benceno por <i>A. aquatilis</i> QD168	87
5. CONCLUSIONES	92
6. PROYECCIONES	94
7. BIBLIOGRAFÍA.....	95
8. ANEXOS	106

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tablas

Tabla 1. Resumen secuenciación y ensamblaje del genoma de <i>Alcaligenes</i> sp. QD168.....	13
Tabla 2. Resumen anotación automática del genoma de <i>Alcaligenes</i> sp. QD168	14
Tabla 3. Parámetros de las curvas de calibrado de los compuestos benceno y fenol.....	21
Tabla 4. Partidores diseñados y utilizados en esta tesis	24
Tabla 5. Perfil bioquímico de <i>A. aquatilis</i> QD168 mediante API20NE y crecimiento en succinato, fructosa y glucosa como única fuente de carbono.....	37
Tabla 6. Ruta central del catecol de <i>A. aquatilis</i> QD168	40
Tabla 7. Ruta central del protocatecuato de <i>A. aquatilis</i> QD168.....	41
Tabla 8. Ruta central del 3-(2,3-dihidroxifenil)-propionato/2,3-dihidroxicinamato de <i>A. aquatilis</i> QD168.....	42
Tabla 9. Ruta central del fenilacetil-CoA de <i>A. aquatilis</i> QD168.....	43
Tabla 10. Ruta central del homogentisato de <i>A. aquatilis</i> QD168.....	43
Tabla 11. Ruta central del 2,5-dihidroxiniconato de <i>A. aquatilis</i> QD168.....	44
Tabla 12. Ruta central del gentisato de <i>A. aquatilis</i> QD168.....	45
Tabla 13. Rutas periféricas de la ruta del catecol de <i>A. aquatilis</i> QD168.....	48
Tabla 14. Rutas/reacciones periféricas de la ruta del protocatecuato de <i>A. aquatilis</i> QD168 ...	49
Tabla 15. Rutas del 3-fenilpropionato y del cinamato de <i>A. aquatilis</i> QD168.....	50
Tabla 16. Rutas/reacciones periféricas de la ruta del fenilacetil-CoA de <i>A. aquatilis</i> QD168....	51
Tabla 17. Rutas/reacciones periféricas de la ruta del homogentisato de <i>A. aquatilis</i> QD168....	51
Tabla 18. Ruta del nicotinato de <i>A. aquatilis</i> QD168	52
Tabla 19. Reacción periférica del salicilil-CoA de <i>A. aquatilis</i> QD168	52
Tabla 20. Comparación de rutas centrales y periféricas del catabolismo de compuestos aromáticos de <i>A. aquatilis</i> QD168 y otras bacterias.....	54
Tabla 21. Crecimiento de <i>A. aquatilis</i> QD168 en compuestos aromáticos como única fuente de carbono.....	57
Tabla 22. Crecimiento de <i>A. aquatilis</i> QD168 en compuestos nitrogenados.....	58
Tabla 23. Enzimas antioxidantes de <i>A. aquatilis</i> QD168.....	65
Tabla 24. Reguladores transcripcionales de estrés oxidativo de <i>A. aquatilis</i> QD168	66
Tabla 25. Isoenzimas resistentes a estrés oxidativo de <i>A. aquatilis</i> QD168	67
Tabla 26. Conjunto de datos genómicos de <i>Alcaligenes</i> spp.....	110
Tabla 27. Categorías COGs de <i>Alcaligenes</i> spp.	112
Tabla 28. Rutas centrales de compuestos aromáticos predichas en <i>A. aquatilis</i> QD168	113
Tabla 29. Rutas y reacciones periféricas de compuesto aromáticos predichas en <i>A. aquatilis</i> QD168.....	115
Tabla 30. Genes de respuesta a estrés oxidativo en <i>A. aquatilis</i> QD168	117

Figuras

Figura 1. Estructura química de hidrocarburos aromáticos presentes en el petróleo crudo. ...	1
Figura 2. Rutas catabólicas de los hidrocarburos aromáticos benceno, tolueno y naftaleno reportadas en <i>Pseudomonas</i> spp.	5
Figura 3. Formación de especies reactivas de oxígeno a partir de la reducción de la molécula de oxígeno.....	6
Figura 4. Mecanismos enzimáticos de detoxificación de EROs y de hidroperóxidos orgánicos.	7
Figura 5. Integridad de ARN total extraído de cultivos de <i>Alcaligenes</i> sp. QD168.	26
Figura 6. Representación circular del genoma de <i>Alcaligenes</i> sp. QD168.....	29
Figura 7. Árbol filogenético de ML ARNr 16S de la bacteria <i>Alcaligenes</i> sp. QD168 y otras bacterias de la familia <i>Alcaligenaceae</i>	31
Figura 8. Análisis filogenómico de 26 cepas de <i>Alcaligenes</i> spp.....	33
Figura 9. Comparación de Clusters de Grupos Ortólogos (COGs) de <i>A. aquatilis</i> QD168.....	35
Figura 10. Efecto de la salinidad y la temperatura en el crecimiento de <i>A. aquatilis</i> QD168. ..	36
Figura 11. Representación de rutas centrales del catabolismo aerobio de compuestos aromáticos en la bacteria marina <i>A. aquatilis</i> QD168.....	39
Figura 12. Organización de los genes <i>cat</i> que codifican la ruta catabólica central del catecol en <i>A. aquatilis</i> QD168.	40
Figura 13. Organización de los genes <i>lig</i> que codifican la ruta catabólica central del protocatecuato en <i>A. aquatilis</i> QD168.....	41
Figura 14. Organización de los genes <i>hca</i> y <i>mhp</i> que codifican las rutas catabólicas periféricas y centrales del 3-fenilpropionato y del cinamato en <i>A. aquatilis</i> QD168.	42
Figura 15. Representación de rutas periféricas y centrales para el catabolismo aerobio de compuesto aromáticos en <i>A. aquatilis</i> QD168.	46
Figura 16. Organización de los genes <i>ben</i> y <i>dmp</i> que codifican las rutas catabólicas periféricas del benzoato y del fenol en <i>A. aquatilis</i> QD168.....	47
Figura 17. Localización genómica de las rutas catabólicas de compuesto aromáticos de la bacteria <i>A. aquatilis</i> QD168.	53
Figura 18. Árbol filogenético de subunidades α de dioxigenasas hidroxilantes de anillo aromático (ARHDO) de <i>A. aquatilis</i> QD168.....	55
Figura 19. Crecimiento de <i>A. aquatilis</i> QD168 utilizando benceno como fuente de carbono. .	59
Figura 20. Degradación de benceno por células en reposo de <i>A. aquatilis</i> QD168.....	60
Figura 21. Esquema de las rutas periféricas y centrales del catabolismo de benceno codificadas en el genoma de <i>A. aquatilis</i> QD168.	61
Figura 22. Niveles de expresión de genes de la ruta catabólica de benceno en <i>A. aquatilis</i> QD168 durante la degradación de benceno.....	62
Figura 23. Determinantes genéticos asociados a la respuesta adaptativa a estrés oxidativo de <i>A. aquatilis</i> QD168.....	64
Figura 24. Localización genómica de los genes asociados a la respuesta adaptativa a estrés oxidativo de la bacteria <i>A. aquatilis</i> QD168.	67
Figura 25. Susceptibilidad de <i>A. aquatilis</i> QD168 a agentes oxidantes.....	68
Figura 26. Supervivencia de <i>A. aquatilis</i> QD168 a agentes oxidantes.....	69
Figura 27. Daño a macromoléculas en <i>A. aquatilis</i> QD168 frente a la exposición a agentes oxidantes.....	70
Figura 28. Niveles de expresión de genes asociados a la respuesta adaptativa a estrés oxidativo en <i>A. aquatilis</i> QD168 frente a la exposición a H ₂ O ₂ y PQ.	73

Figura 29. Daño a macromoléculas en <i>A. aquatilis</i> QD168 durante la degradación de benceno.	74
Figura 30. Niveles de expresión de genes asociados a la respuesta adaptativa a estrés oxidativo en <i>A. aquatilis</i> QD168 durante la degradación de benceno.	76
Figura 31. Ruta catabólica de benceno propuesta en <i>A. aquatilis</i> QD168.	83
Figura 32. Representación gráfica de la respuesta adaptativa a estrés oxidativo de <i>A. aquatilis</i> QD168 frente a la exposición a H ₂ O ₂ y PQ.	86
Figura 33. Representación gráfica de la respuesta adaptativa a estrés oxidativo de <i>A. aquatilis</i> QD168 durante la degradación de benceno.	89
Figura 34. Crecimiento de <i>A. aquatilis</i> QD168 sin fuente de carbono.	106
Figura 35. Adaptación del cultivo de <i>A. aquatilis</i> QD168 en benceno.	106
Figura 36. Árbol filogenético de los reguladores transcripcionales SoxR de <i>A. aquatilis</i> QD168 y otras bacterias.	107
Figura 37. Crecimiento en medio líquido de la bacteria <i>A. aquatilis</i> QD168 en distintos hidrocarburos aromáticos.	108
Figura 38. Crecimiento en medio sólido de <i>A. aquatilis</i> QD168 en hidrocarburos aromáticos volátiles.	109
Figura 39. Cromatograma de HPLC durante el crecimiento de <i>A. aquatilis</i> QD168 en benceno.	109

RESUMEN

El empleo masivo de derivados del petróleo ha causado eventos de contaminación a nivel mundial, impactando suelos, sedimentos, aguas y sus ecosistemas cercanos. Dentro de los componentes del petróleo, la fracción aromáticos es la más tóxica y recalcitrante de sus componentes. Sedimentos marinos contaminados con petróleo y sus derivados son nichos de bacterias capaces de degradar hidrocarburos aromáticos. El catabolismo aerobio de estos compuestos es realizado mediante reacciones de oxigenación que permiten la activación y apertura del anillo aromático. Durante la degradación de compuestos aromáticos, se ha observado una respuesta adaptativa a estrés oxidativo. Sin embargo, la respuesta bacteriana de estrés oxidativo durante la degradación de compuestos aromáticos ha sido poco caracterizada. *Alcaligenes* sp. QD168 es una bacteria hidrocarbonoclástica aislada desde sedimentos marinos contaminados con petróleo de la Bahía de Quintero, Región de Valparaíso. En esta tesis, se identificaron los genes que codifican proteínas asociadas a rutas catabólicas de compuestos aromáticos y a la respuesta adaptativa a estrés oxidativo en *Alcaligenes* sp. QD168, como también se estudió la respuesta a estrés oxidativo durante la degradación del hidrocarburo aromático benceno.

Se secuenció el genoma de *Alcaligenes* sp. QD168 obteniendo un cromosoma de 4,32 Mb con un contenido GC de 56.4%. La identificación taxonómica mediante ARNr 16S, MLSA y análisis de identidad nucleotídica promedio (ANI) permitió clasificar a la cepa QD168 como *Alcaligenes aquatilis*, perteneciendo esta especie al grupo filogenómico III luego de comparar 26 genomas del género *Alcaligenes*. Al analizar el genoma de la cepa QD168 se identificaron 7 rutas centrales (*e.g.*, ruta del catecol) y 16 rutas/reacciones periféricas (*e.g.*, ruta del benceno) para la degradación de compuestos aromáticos, además de 30 genes que participan en la respuesta a estrés oxidativo, incluyendo reguladores transcripcionales (*oxyR*, *soxR*, *perR*), enzimas antioxidantes (*ahpC*, *katE*, *sodC*) e isoenzimas resistentes a estrés oxidativo (*fumC*). Se observó crecimiento en 14 compuestos (*e.g.*, benceno, nicotinato, cinamato), corroborando algunas rutas predichas *in silico*. Para estudiar la respuesta a estrés oxidativo en la cepa QD168, se seleccionó el compuesto modelo benceno. Se determinó la cinética de crecimiento y la degradación de benceno por la bacteria *A. aquatilis* QD168, identificando la aparición del intermediario metabólico fenol. Análisis de la expresión génica durante el crecimiento de la cepa QD168 en benceno reveló un alto aumento en los transcritos de los genes que codifican las enzimas fenol hidroxilasa (*dmpP*) y catecol 1,2-dioxigenasa (*catA*). Ensayos de TBARS y carbonilación revelaron daño a membrana y proteínas frente a la exposición a H₂O₂ y paraquat. Durante la degradación de benceno por la cepa QD168 se observó daño a membrana y proteínas, y un aumento de los niveles transcripcionales de los genes asociados a la respuesta adaptativa a estrés oxidativo *ahpC1*, *ahpC2*, *fumC*, *oxyR*, *soxR2*. Estos resultados indican que el crecimiento en benceno provoca daño a macromoléculas y una respuesta adaptativa a estrés oxidativo en *A. aquatilis* QD168. Esta tesis revela el potencial de *A. aquatilis* QD168 para sobrevivir ambientes contaminados, identificando un gran repertorio enzimático para la degradación de compuestos aromáticos y una amplia respuesta adaptativa ante el catabolismo aerobio de estos compuestos, convirtiéndola en una buena candidata para la biorremediación de ambientes marinos y salinos contaminados con hidrocarburos aromáticos.

ABSTRACT

Genomic and functional characterization of the aromatic hydrocarbon catabolism of the marine bacterium *Alcaligenes aquatilis* QD168, and the study of the oxidative stress response during benzene degradation

High demand of crude-oil has caused pollution events worldwide, impacting soil, sediments and water matrices, as well as their surrounding environments. Petroleum aromatic hydrocarbons are the most toxic and recalcitrant fraction found in crude-oil. Crude oil-polluted marine sediments are niches of bacteria capable of degrading aromatic hydrocarbons. Aerobic catabolism of aromatic compounds is carried out through oxygenation reactions allowing the activation and cleavage of the aromatic ring. During aromatic compounds degradation, the induction of an oxidative stress response has been detected. However, the bacterial response of oxidative stress observed during the degradation of aromatic compounds has been poorly characterized. *Alcaligenes* sp. QD168 is a hydrocarbonoclastic bacterium isolated from marine sediments polluted with crude-oil from the Quintero Bay, Valparaíso Region. In this thesis, the genes encoding catabolic pathways of aromatic compounds and oxidative stress response were identified in the marine bacterium *Alcaligenes* sp. QD168, as well as the study of the oxidative stress response during degradation of the aromatic hydrocarbon benzene.

The complete genome of *Alcaligenes* sp. QD168 was sequenced, obtaining a chromosome of 4.32 Mb with a GC content of 56.4%. The taxonomic identification by 16S rRNA, MLSA and analysis of average nucleotide identity (ANI) allowed classification of the strain QD168 as *Alcaligenes aquatilis*, belonging to the phylogenomic group III after analysing 26 genomes of the genus *Alcaligenes*. Genome mining of strain QD168 identified 7 central pathways (*e.g.*, catechol route) and 16 pathways/peripheral reactions (*e.g.*, benzene pathway) for the degradation of aromatic compounds, in addition to 30 genes involved in the oxidative stress response: including transcriptional regulators (*oxyR*, *soxR*, *perR*); antioxidant enzymes (*ahpC*, *katE*, *sodC*) and isoenzymes resistant to oxidative stress (*fumC*). Strain QD168 growth was observed on 13 compounds, corroborating some of the predicted pathways *in silico*. To study the oxidative stress response in strain QD168, benzene was chosen as the model aromatic compound. Growth kinetics and degradation of benzene by *A. aquatilis* QD168 were determined, identifying the metabolic intermediate phenol by high-performance liquid chromatography. Analysis of gene expression during strain QD168 growth on benzene, showed a large increase in the transcripts of genes encoding the enzymes phenol hydroxylase (*dmpP*) and catechol 1,2-dioxygenase (*catA*). TBARS and carbonylation assays revealed membrane and protein damage, respectively, during exposure to H₂O₂ and PQ. During benzene degradation by strain QD168, membrane and protein damage was observed, as well as an increase in transcriptional levels of the oxidative stress genes: *ahpC1*, *ahpC2*, *fumC*, *oxyR* and *soxR2*. These results indicate that strain QD168 growth on benzene causes macromolecule damage and an increase in oxidative stress response. These results emphasised *A. aquatilis* QD168 potential to overcome polluted environments, identifying a large enzymatic repertoire for the degradation of aromatic compounds and a broad adaptive response to aerobic catabolism of these compounds, which can be suitable for the bioremediation of marine and saline environments polluted with aromatic hydrocarbons.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Petróleo crudo: composición y situación en la Región de Valparaíso

El petróleo crudo es una mezcla compleja de compuestos orgánicos que se presentan en forma natural en depósitos de roca sedimentaria. La composición y características del petróleo crudo varía dependiendo de su origen (Chandra *et al.*, 2013). De acuerdo con su estructura química, los componentes del petróleo son clasificados en cuatro amplias fracciones: hidrocarburos alifáticos (parafinas), aromáticos, resinas y asfaltenos. La fracción aromática del petróleo se compone de hidrocarburos aromáticos monocíclicos (HAMs) y de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs). Esta fracción es una de las más contaminantes debido a su carácter recalcitrante y propiedades carcinogénicas de sus congéneres (Albers, 2003). Benceno, tolueno, etilbenceno y los tres isómeros de xileno, comúnmente llamados BTEX, son parte de los HAMs (**Figura 1A**). El benceno es el más tóxico y peligroso compuesto BTEX, siendo el único contaminante carcinogénico de este grupo. Los HAPs corresponden a compuestos hidrocarbonados conformados por dos o más anillos aromáticos en su estructura fusionados en distintas posiciones, caracterizados por su poca solubilidad en agua, baja presión de vapor y ser altamente recalcitrantes (**Figura 1B**) (Albers, 2003).

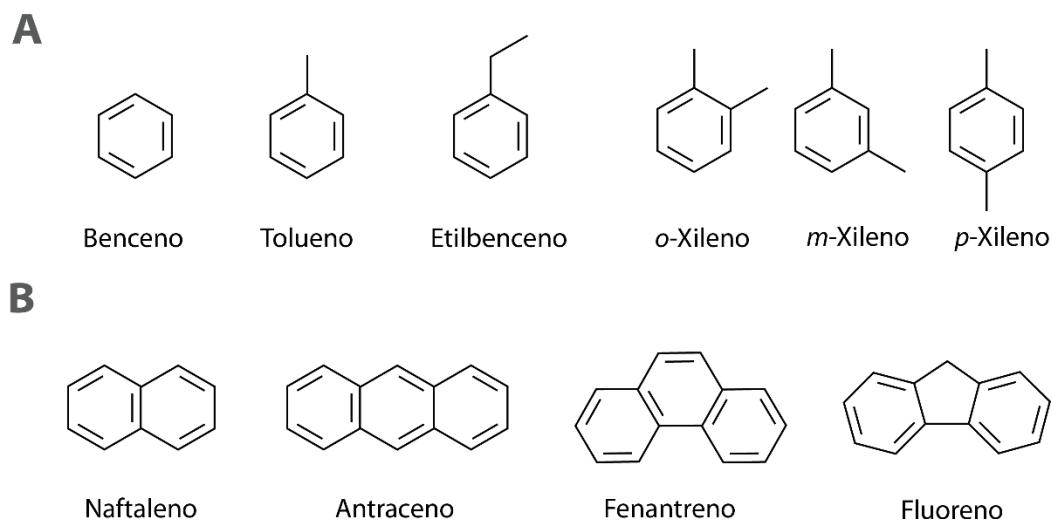


Figura 1. Estructura química de hidrocarburos aromáticos presentes en el petróleo crudo. Hidrocarburos aromáticos monocíclicos pertenecientes al grupo BTEX (**A**) e hidrocarburos aromáticos policíclicos usados en este trabajo (**B**).

Actualmente, el petróleo crudo es utilizado como una de las principales fuentes de energía y materia prima para la fabricación de múltiples productos,

con una demanda a nivel mundial de 97,2 millones de barriles por día (<https://asb.opec.org/index.php/interactive-charts/oil-data-downstream>). Debido a su uso masivo, derrames y filtraciones de petróleo han sido reportados durante la exploración, producción, refinamiento, transporte y almacenamiento de este recurso. Esto ha llevado a la contaminación de matrices ambientales causando impactos severos en ecosistemas terrestres y marinos (Palma-Fleming *et al.*, 2008). Casos emblemáticos a nivel mundial son los reportados durante la guerra del Golfo (1991), liberando más de 240 millones de galones de petróleo crudo y catalogado como el derrame más grande de la historia; el derrame de Exxon Valdez (1989;) afectando las costas de Alaska; y el desastre de Deepwater Horizon (2010) liberando en el Golfo de México más de 200 millones de galones, afectando a todo el ecosistema presente en la zona (Michel *et al.*, 2013).

En Chile, la contaminación ambiental causada por derrames de petróleo ha sido reportada a nivel terrestre y costero en sectores aledaños a zonas industriales, siendo las regiones más afectadas la Región de Antofagasta, la Región de Valparaíso y la Región del Biobío (Fuenzalida & Quiroz, 2012; Godoy-Faúndez *et al.*, 2008; Mudge & Seguel, 1999; Piraino *et al.*, 2017). La bahía de Quintero es una zona costera industrial localizada en la Región de Valparaíso, Chile Central (32°45'49.5"S 71°29'13.5"W), la cual ha sido sujeta a contaminación crónica por fuentes antropogénicas. Considerada una zona altamente industrializada por su pequeña población (26.189 habitantes, Saravia *et al.*, 2016), se encuentran presentes en el sector industrias de cemento, de gas licuado, químicas, una fundición de cobre; como también industrias encargadas de la recepción, descarga, almacenamiento y distribución de petróleo crudo. Derrames de petróleo han sido documentados en esta bahía durante las últimas dos décadas (Piraino *et al.*, 2017). La concentración de algunos metales pesados ha sido determinada desde sedimentos marinos de la bahía de Quintero, identificando concentraciones elevadas de los metales As, Cr, Co, Cu, Pb, Mn, Mo, Ni, Se, V y Zn. Concentraciones similares han sido determinadas en otros estudios de sedimentos contaminados por actividad industrial (Parra *et al.*, 2015).

1.2. Bacterias en ambientes contaminados con petróleo crudo y derivados

A pesar de las condiciones adversas encontradas en ambientes contaminados con petróleo crudo, las comunidades bacterianas son capaces de prosperar en hábitats contaminados con petróleo y sus derivados (Michas *et al.*, 2017; Ahmed

et al., 2018). Asimismo, se han descrito géneros bacterianos capaces de degradar una gran variedad de contaminantes ambientales tóxicos, incluyendo aquellos presentes en el petróleo, tales como los compuestos monoaromáticos BTEX (**Figura 1A**; Harayama *et al.*, 2004; Head *et al.*, 2006), y los compuestos policíclicos naftaleno, antraceno, fluoreno y fenantreno (**Figura 1B**; Pagnout *et al.*, 2007; Seo *et al.*, 2009; Vojtková *et al.*, 2015).

La obtención de cepas bacterianas capaces de degradar contaminantes ambientales permite su uso en procesos de descontaminación y de biorremediación. La biorremediación, consiste en el uso de agentes biológicos para la remoción de contaminantes ambientales, utilizando microorganismos, plantas o nutrientes para mejorar las tasas de degradación de la comunidad afectada y restaurar los medioambientes perturbados (Atlas & Philp, 2005). El uso de microorganismos en procesos de remediación resalta por ser más económico que los métodos fisicoquímicos, además de permitir la mineralización completa de los contaminantes. No obstante, las características fisicoquímicas de las matrices afectadas (*e.g.*, salinidad, pH, temperatura, presencia de otros contaminantes, etc.) juegan un rol importante y pueden afectar las tasas de degradación bacteriana del compuesto de interés (Fuentes *et al.*, 2015).

Los ecosistemas marinos son medioambientes fluctuantes debido a la acción de múltiples estresores, tales como pH, salinidad, hipoxia, temperatura, radiación ultravioleta, contaminación química y escasez de nutrientes. Microorganismos aislados desde estos ambientes se encuentran bien adaptados a condiciones adversas, convirtiéndose en una preciada fuente de cepas degradadoras de compuestos xenobióticos y resistentes a estrés abiótico (Dash *et al.*, 2013). Cepas bacterianas marinas pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Comamonas*, *Exiguobacterium*, *Marinobacterium*, *Pseudomonas* y *Rhodococcus* capaces de degradar hidrocarburos BTEX han sido reportadas previamente (Wang *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 2015; Baek *et al.*, 2018).

1.3. Degradación bacteriana de hidrocarburos aromáticos

Los hidrocarburos aromáticos son compuestos recalcitrantes debido a la estabilidad de sus enlaces C-H, siendo crucial la funcionalización de su estructura para canalizar estos compuestos a vías catabólicas centrales. En el caso del catabolismo aerobio bacteriano, los compuestos aromáticos son activados mediante reacciones de oxigenación (*e.g.*, mono- o di-oxigenación), incorporando

oxígeno molecular (O_2) al anillo aromático para permitir su posterior apertura (Pérez-Pantoja *et al.*, 2012). Oxidaciones sucesivas mediante hidroxilasas, monooxigenasas o dioxigenasas permiten la conversión de hidrocarburos aromáticos periféricos (BTEX o HAPs) a intermediarios dihidroxilados que pueden converger en alguna ruta catabólica central (**Figura 2**). Monooxigenasas e hidroxilasas permiten la incorporación de un grupo hidroxilo, mientras que las dioxigenasas tipo Rieske catalizan la adición de dos grupos hidroxilos. La dioxigenación de hidrocarburos aromáticos es el primer paso para la activación del anillo aromático durante la degradación aerobia (Seo *et al.*, 2009). Los compuestos dihidroxilados pueden ser atacados por dioxigenasas intra- (ruptura *orto*) o extradiol (ruptura *meta*), las que permiten la apertura del anillo aromático mediante la incorporación de otra molécula de O_2 a las vías centrales de degradación (Fuentes *et al.*, 2014). Catecol, protocatecuato y gentisato son intermediarios aromáticos comunes producto de la degradación de hidrocarburos aromáticos (**Figura 2**).

Las dioxigenasas tipo Rieske, intradiol y extradiol se basan en la activación de O_2 para la incorporación de grupos hidroxilo en la molécula blanco. Las dioxigenasas tipo Rieske dependientes de hierro poseen tres componentes: una oxigenasa terminal; una ferredoxina y una reductasa, como también por una subunidad oxigenasa y una subunidad bifuncional ferredoxina/reductasa (Gibson y Parales, 2000). El componente oxigenasa cataliza la activación del O_2 y la posterior *cis*-hidroxilación del anillo aromático, mientras que las subunidades ferredoxina y reductasa son encargadas de la transferencia de electrones hacia el centro catalítico. La oxigenasa terminal normalmente se compone de una subunidad alfa o mayor, la cual posee el sitio catalítico conformado por un centro hierro azufre [2Fe-2S] y un átomo de hierro, y una subunidad beta o menor (Wang *et al.*, 2017). El análisis de las secuencias aminoacídicas de subunidades alfa de dioxigenasas tipo Rieske no hemo, ha permitido su clasificación filogenética, agrupándolas en clados distintivos. Existen algunas rutas modelo para la degradación aerobia de hidrocarburos aromáticos; como la ruta de degradación de benceno codificada en los genes *bnz* (Irie *et al.*, 1987) identificadas en cepas de la especie *Pseudomonas putida*; el catabolismo de tolueno y xileno codificada por los genes *xyl* en la plásmido TOL (pWW0) en cepas del género *Pseudomonas* (Burlage *et al.*, 1989); y la degradación de naftaleno codificada en los genes *nah* (Simon *et al.*, 1993) descrita en cepas de la especie *P. putida* (**Figura 2**). En este caso, las tres rutas catabólicas convergen en

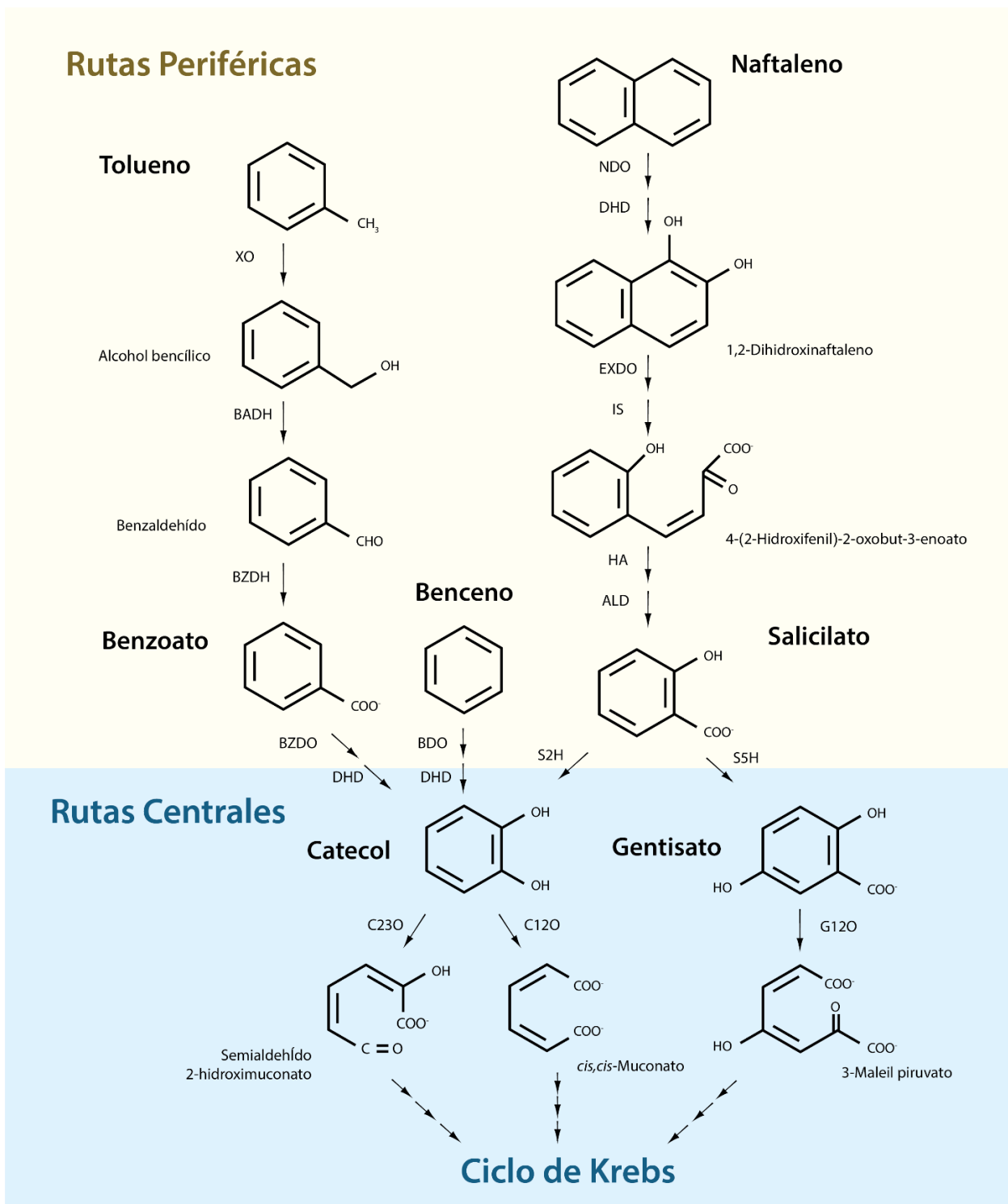


Figura 2. Rutas catabólicas de los hidrocarburos aromáticos benceno, tolueno y naftaleno reportadas en *Pseudomonas* spp. Se indican los intermediarios metabólicos centrales y las enzimas involucradas: naftaleno 1,2-dioxigenasa (NDO); dihidrodiol deshidrogenasa (DHD); extradiol dioxigenasa (EXDO); isomerasa (IS); hidratasa-aldehído (HA); aldehído deshidrogenasa (ALD); xileno monooxigenasa (XO); Alcohol bencílico deshidrogenasa (BADH); benzaldehído deshidrogenasa (BZDH); benzoato 1,2-dioxigenasa (BZDO); benceno 1,2-dioxigenasa (BDO); salicilato 2-hidroxilasa (S2H); salicilato 5-hidroxilasa (S5H); catecol 2,3-dioxigenasa (C23O); catecol 1,2-dioxigenasa (C12O) y gentisato 1,2-dioxigenasa (G12O). Tres flechas contiguas representan múltiples reacciones catabólicas.

la producción del intermediario dihidroxilado catecol, existiendo dos rutas de degradación de este compuesto. La apertura del anillo aromático del catecol puede ser realizada mediante la catecol 1,2-dioxigenasa (C12O; dioxigenasa intradiol) produciendo una ruptura en posición *orto*, o mediante la catecol 2,3-dioxigenasa (C23O; dioxigenasa extradiol) causando la apertura del anillo aromático en posición *meta* (Harwood y Parales, 1996). En ambos casos, oxidaciones sucesivas permiten la obtención de moléculas simples que pueden entrar al ciclo de Krebs (**Figura 2**). Además de estas rutas periféricas, existen vías alternativas a las rutas clásicas de degradación de hidrocarburos aromáticos y más de una ruta puede estar presente en la misma cepa bacteriana.

1.4. Estrés oxidativo: Especies reactivas de oxígeno (ERO), regulación y sistemas antioxidantes

El estrés oxidativo se produce durante el desbalance entre la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) y los componentes/sistemas antioxidantes de la célula. La transferencia de electrones desde enzimas redox a oxígeno molecular (O_2) provoca la formación de las EROs: anión superóxido (O_2^-); peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($HO\cdot$) (**Figura 3**). Además, la reacción de Fenton aumenta la producción de $HO\cdot$, causado por la oxidación directa de hierro ferroso (Fe^{2+}) intracelular por el agente oxidante H_2O_2 . (Imlay, 2008). En un estado de estrés oxidativo, las EROs se consideran dañinas para sistemas biológicos debido a su alta reactividad con macromoléculas biológicas. La membrana celular puede sufrir daño debido a la peroxidación lipídica (grupos LOOH), produciendo malondialdehído (MDA) como producto secundario. La carbonilación de proteínas es una de las modificaciones proteicas irreversibles más dañinas, considerada

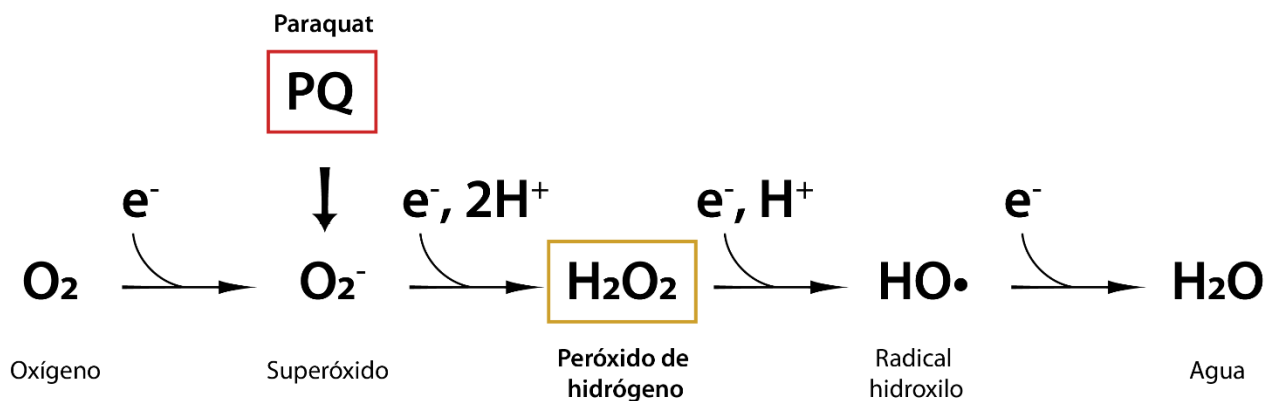


Figura 3. Formación de especies reactivas de oxígeno a partir de la reducción de la molécula de oxígeno. Se indican en un cuadrado los inductores clásicos de estrés oxidativo utilizados en esta tesis, paraquat (PQ) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

como un indicador característico de daño por estrés oxidativo (Luo y Wehr, 2009). Los ácidos nucleicos se ven afectados mediante la oxidación de nucleótidos, aumentando la tasa de mutagénesis en concentraciones tan bajas como 1 μM de H_2O_2 en *E. coli* (Imlay, 2008). La oxidación de enzimas mononucleares de hierro, cisteínas sensibles y centros de [4Fe-4S] también se ha reportado, afectando los centros hierro-azufre de deshidratatas y otras enzimas metabólicas (Jang & Imlay, 2007).

La respuesta celular ante un estado de estrés oxidativo incluye mecanismos enzimáticos y no enzimáticos para disminuir la presencia de radicales libres y evitar el daño a componentes celulares. Existen dos tipos de mecanismos enzimáticos descritos en bacterias: sistemas directos que estabilizan a las EROs convirtiéndolas en moléculas inocuas; y los sistemas indirectos que restauran biomoléculas dañadas durante el estado de estrés oxidativo (**Figura 4**). Dentro del primer grupo se encuentran las superóxido dismutasas (SOD), catalasas y alquil hidroperóxido reductasas, encargadas de la transformación directa de O_2^- y H_2O_2 (Imlay, 2013). La enzima SOD protege a las células del ion superóxido, produciendo oxígeno molecular y H_2O_2 . La enzima catalasa cataliza la formación de H_2O y O_2 a partir de H_2O_2 . La enzima alquil hidroperóxido reductasa posee la capacidad de reducir hidroperóxidos orgánicos (**Figura 4A**). Las enzimas de los sistemas tiorredoxina/tiorredoxina reductasas y peroxirredoxina/peroxirredoxina

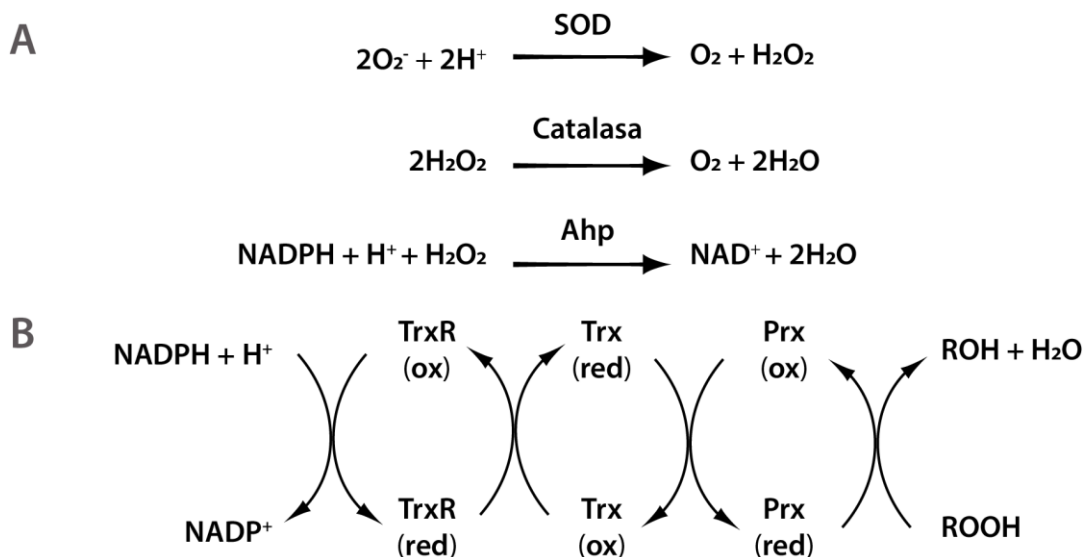


Figura 4. Mecanismos enzimáticos de detoxificación de EROs y de hidroperóxidos orgánicos. Mecanismos enzimáticos de detoxificación de las especies de oxígeno O_2^- y H_2O_2 mediante superóxido dismutasas (SOD), catalasas y alquil hidroperóxido reductasas (Ahp) (**A**). Mecanismos de detoxificación de hidroperóxidos orgánicos mediante los sistemas tiorredoxinas (Trx)/tiorredoxina reductasas (TrxR) y peroxirredoxinas (Prx) (**B**).

reductasas permiten la detoxificación de radicales libres que han afectado a macromoléculas dañadas por estrés oxidativo mediante reacciones redox (**Figura 4B**). Las deshidratasas fumarato hidratasa A y aconitato hidratasa B, ambas implicadas en el ciclo de Krebs, son rápidamente dañadas por compuestos oxidantes. Isoenzimas resistentes a inactivación por estrés oxidativo han sido descritas, encontrando las isoenzimas fumarato hidratasa clase II (FumC) y aconitato hidratasa A (AcnA) como parte de la respuesta a estrés oxidativo (Imlay, 2008).

La respuesta transcripcional ante un estado de estrés oxidativo en bacterias es controlada por reguladores transcripcionales sensibles a cambios del estado redox intracelular. OxyR es un regulador transcripcional de la familia LysR, que directamente detecta H_2O_2 vía oxidación de dos cisteínas sensibles que desencadenan su activación. En *E. coli*, el regulón OxyR controla la transcripción de genes inducibles por peróxido de hidrógeno como los genes *katG* (catalasa G), *ahpCF* (alquil hidroperóxido reductasa), *trxC* (tiorredoxina reductasa), *gorA* (glutación reductasa) y *grxA* (glutaredoxina), en un esfuerzo de disminuir la concentración de H_2O_2 a niveles inocuos (Zheng *et al.*, 2001). En bacterias Gram positivo, como *Bacillus subtilis*, el represor PerR posee un rol similar al ser inactivado en presencia de H_2O_2 (Imlay, 2013). El regulador transcripcional sensible a redox, SoxR, es activado luego de la exposición a compuestos que presentan “ciclaje redox” (e.g., paraquat). Estos compuestos se reducen al obtener electrones del medio intracelular, para luego oxidarse y generar anión superóxido en el proceso (Imlay, 2013). SoxR posee un centro [2Fe-2S] sensible, el cual se oxida en presencia de los compuestos oxidantes y activa la transcripción de un segundo factor de transcripción, SoxS. SoxS aumenta la transcripción de varios genes que codifican enzimas que catalizan la detoxificación de O_2^- , bombas de expulsión para expulsar los compuestos generadores de redox, además de otras enzimas relacionadas al control intracelular del estado redox (Imlay, 2008). Se ha reportado la activación mediante el sistema SoxRS de los genes *sodA* (superóxido dismutasa A), *fumC* (fumarato hidratasa II), *acnA* (aconitato hidratasa A) y *acrAB* (bomba de expulsión multidrogas) durante la exposición a agentes redox en *E. coli* (Pomposiello y Demple, 2001).

1.5. Respuesta adaptativa a estrés oxidativo durante la degradación bacteriana de compuestos aromáticos

Durante la exposición y la degradación de compuestos aromáticos se ha observado un aumento en la respuesta a estrés oxidativo en bacterias (Agulló *et al.*,

2007; Lee *et al.*, 2007; Ponce *et al.*, 2011). Durante el crecimiento de *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 en pireno como única fuente de carbono (Wang *et al.*, 2000), y luego durante el crecimiento en los HAPs pireno, pireno-4,5-quinona, fenantreno, antraceno y fluoranteno (Kim *et al.*, 2004) se identificó la inducción de una catalasa-peroxidasa, KatG. Los autores proponen que la expresión de esta enzima durante el crecimiento en HAPs permite el óptimo catabolismo de estos compuestos, además de mantener la viabilidad celular. En este estudio se propuso que el control de EROs producidos podría proteger a la dioxigenasa de inactivación por oxidantes exógenos, además de eliminar H₂O₂ generado como posible intermediario del metabolismo de HAPs. Exposición al compuesto catecol en la bacteria Gram negativo *Bacillus subtilis* 168 mostró una respuesta general de estrés, además de la inducción de los genes *ahp* pertenecientes al regulón PerR (Le *et al.*, 2006). Se identificó en la bacteria *Mycobacterium* sp. JS14 la inducción de las proteínas catalasa y superóxido dismutasa durante el catabolismo de fluoranteno. Los investigadores asociaron la inducción de estas enzimas como respuesta a estrés oxidativo durante el metabolismo de fluoranteno (Lee *et al.*, 2007). Asimismo, se ha reportado un aumento en proteínas relacionadas al control de estrés oxidativo en *Rhodococcus jostii* RHA1 y *Paraburkholderia xenovorans* LB400 durante el crecimiento en fenilacetato (Navarro-Llorens *et al.*, 2005; Patrauchan *et al.*, 2011), sugiriendo un estado de estrés oxidativo durante la degradación de compuestos aromáticos.

1.6. *Alcaligenes* sp. QD168: bacteria marina de la bahía de Quintero

Durante el derrame de 34.000 L de petróleo registrado en septiembre de 2014 en la bahía de Quintero (Valparaíso, Chile), se obtuvieron aislados bacterianos tolerantes a agua de mar artificial y diesel al 1% v/v desde sedimentos marinos aledaños al evento de contaminación. Entre las cepas obtenidas, se identificó a la cepa *Alcaligenes* sp. QD168, capaz de utilizar el hidrocarburo alifático *n*-hexadecano y la mezcla diésel como única fuente de carbono en medio mineral BHB. La obtención de un aislado marino desde sitios contaminados con petróleo permite realizar estudios de su catabolismo aromático a nivel genómico y funcional en una bacteria más tolerante a estrés ambiental que bacterias de suelo. Además, la cepa QD168 se presenta como un buen candidato en biorremediación de sedimentos y agua marina contaminados con derivados del petróleo.

Cepas bacterianas pertenecientes al género *Alcaligenes* han sido descritas por su capacidad de degradar contaminantes, incluyendo HAPs (Kiyohara *et al.*, 1982;

Singha *et al.*, 2017), pesticidas (Sagarkar *et al.*, 2014), tintes (Basharat *et al.*, 2018), y fenoles (Rehfuss y Urban, 2005; Kumar *et al.*, 2013). *Alcaligenes* sp. 4HAP ha sido caracterizada por su habilidad para degradar 4-hidroxiacetofenona (Hopper y Kaderbhai, 1999). *A. faecalis* subsp. *phenolicus* DSM 16503^T y *A. faecalis* JF339228 han sido caracterizadas como bacterias degradadoras de fenol (Rehfuss y Urban, 2005; Kumar *et al.*, 2013). *Alcaligenes* sp. EGD-AK7, aislada desde suelo agrícola en India posee el potencial de degradar el herbicida atrazina (Sagarkar *et al.*, 2014). *A. faecalis* BDB4, ha sido caracterizada como una bacteria capaz de utilizar los HAPs: pireno, criseno y benzo[*a*]pireno como única fuente de carbono y energía (Singha *et al.*, 2017). Cabe destacar que, aunque existen varios reportes del potencial catabólico de cepas de *Alcaligenes* spp., los determinantes genéticos y funcionales implicados en el catabolismo de compuestos aromáticos, además de la respuesta a estrés abiótico no han sido reportados previamente, como tampoco las capacidades catabólicas de aislados marinos.

1.7. HIPÓTESIS

Dado que:

1. La bacteria marina *Alcaligenes* sp. QD168 fue aislada desde una zona con historial crónico de contaminación con hidrocarburos y es capaz de crecer en presencia de *n*-hexadecano y diésel.
2. Las reacciones de oxigenación (mono- o di-oxigenación) que permiten la activación y apertura del anillo aromático, son las enzimas clave en el catabolismo de compuestos aromáticos,
3. El catabolismo aerobio de compuestos aromáticos induce la expresión de enzimas antioxidantes asociadas a la respuesta adaptativa a estrés oxidativo (e.g. catalasas, superóxido dismutasas, alquil hidroperóxido reductasas)

Se postula que:

“La degradación aerobia de un hidrocarburo aromático en la bacteria marina *Alcaligenes* sp. QD168 provoca daño oxidativo e induce cambios en la expresión de genes identificados en el genoma que codifican oxigenasas del catabolismo aromático y proteínas de la respuesta adaptativa a estrés oxidativo”

1.8. OBJETIVO GENERAL

Estudiar el catabolismo aerobio de compuestos aromáticos y la respuesta adaptativa a estrés oxidativo de la bacteria marina *Alcaligenes* sp. QD168

1.9. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar el genoma y la posición taxonómica de la bacteria *Alcaligenes* sp. QD168
2. Determinar los genes que codifican rutas catabólicas de compuestos aromáticos y genes asociados a la respuesta adaptativa a estrés oxidativo en el genoma de *Alcaligenes* sp. QD168.
3. Evaluar la funcionalidad de rutas catabólicas de compuestos aromáticos en *Alcaligenes* sp. QD168.
4. Estudiar el efecto de la degradación de un hidrocarburo aromático (e.g. benceno) en el daño macromolecular y la respuesta adaptativa a estrés oxidativo de *Alcaligenes* sp. QD168.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Reactivos

Los compuestos aromáticos: benzoato, 3-hidroxibenzoato (3-HB), 4-hidroxibenzoato (4-HB), cinamato, 3-hidroxicinamato (3-HC), salicilato, nicotinato, antranilato, 4-aminobenzoato (*p*ABA), 2-aminofenol, triptófano, benzamida, simazina, y dicloruro de metil viológeno hidratado (paraquat, PQ) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Benceno (> 99.7% de pureza), tolueno, bifenilo, naftaleno, fenantreno, antraceno, fluoreno, fenol y el agua oxigenada (H₂O₂) al 30% w/v fueron obtenidos de Merck & Co. (Kenilworth, NJ, USA).

2.2. Ceba bacteriana

La cepa *Alcaligenes* sp. QD168 fue obtenida desde sedimento marino contaminado con petróleo crudo de la bahía de Quintero, Región de Valparaíso, Chile (coordenadas geográficas: 32°45'49.5"S 71°29'13.5"W) durante el derrame petrolero reportado el 24 de septiembre de 2014.

2.3. Medios y condiciones de cultivo

Para el cultivo de *Alcaligenes* sp. QD168 se utilizó el medio Luria-Bertani (LB) que contiene 10 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levadura y 10 g/l de NaCl. Para el crecimiento óptimo de la cepa QD168 se modificó la concentración de NaCl a 17,5 g/l.

Para estudiar el crecimiento de la cepa QD168 en distintas concentraciones de NaCl se utilizó el medio sólido Reasoner's 2A (R2A), que contiene 0,5 g/l de peptona, 0,5 g/l de glucosa, 0,5 g/l de almidón soluble, 0,5 g/l de extracto de levadura, 0,3 g/l de K₂HPO₄, 0,3 g/l de piruvato de sodio, 0,05 g/l de MgSO₄ × 7H₂O y 15 g/l de agar (Reasoner y Geldreich, 1985).

Para el cultivo de la cepa QD168 utilizando un compuesto como única fuente de carbono se utilizó el medio mineral M9 que contiene: Na₂HPO₄ 50 mM, KH₂PO₄ 22 mM, NH₄Cl 7,5 mM. Soluciones trazas: Solución A [800X, 100 ml]: 1,075 g MgCl₂ × 6H₂O, 0,200 g CaCO₃, 0,450 g FeSO₄ × 7H₂O, 0,144 g ZnSO₄ × 7H₂O, 0,112 g MnSO₄ × 4H₂O, 0,025 g CuSO₄ × 5H₂O, 0,028 g CoCl₂ × 6H₂O, 0,006 g H₃BO₃, 5,130 ml HCl. Solución B [1600X]: MgSO₄ × 7H₂O 1 M. Solución C [1600X]: FeSO₄ × 7H₂O 36 mM modificado con 1,75% p/v de NaCl (Sambrook y Russell, 2001). Para evaluar el crecimiento de *Alcaligenes* sp. QD168 utilizando un compuesto como única fuente de carbono y nitrógeno, se utilizó el medio mineral M8, el cual posee la misma composición que el medio mineral M9 sin NH₄Cl (sin fuente de nitrógeno).

2.4. Extracción de ADN genómico de *Alcaligenes* sp. QD168

Se realizó una extracción de ADN genómico (ADNg) mediante el sistema comercial Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, WI, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se determinó su pureza midiendo la absorbancia a 260/280 nm, y se cuantificó mediante fluorometría utilizando el sistema comercial Quant-it™ DNA BR Assay (Invitrogen, OR, USA). Se comprobó la integridad del ADN en un gel de agarosa al 0.7% p/v.

2.5. Secuenciación y ensamblaje del genoma de *Alcaligenes* sp. QD168

El ADNg de *Alcaligenes* sp. QD168 fue enviado a la Colección de Cultivos de la Universidad de Gotemburgo (CCUG), Suecia, para su secuenciación mediante la plataforma MiSeq de Illumina (San Diego, CA, USA) y la plataforma RS II de Pacific Biosciences (Menlo Park, CA, USA). Las secuencias obtenidas en cada secuenciación fueron editadas y filtradas, para posteriormente ser ensambladas utilizando el programa SPAdes Genome Assembler (Bankevich *et al.*, 2012) en el caso de la secuenciación MiSeq, y usando el Hierarchical Genome Assembly Process (HGAP, Chin *et al.* 2013) en el caso de la secuenciación SMRT (**Tabla 1**). Un análisis de “*dot plot*” fue realizado mediante el software Gepard v.1.4 (Krumstiek *et al.*, 2007) para identificar auto-alineamiento entre las secuencias y superposición de extremos. El extremo repetido fue recortado y la secuencia reorientada. Se ordenó el cromosoma identificando un posible origen de replicación (*oriC*) mediante el perfil de zonas con asimetría GC y la posición del gen *dnaA*.

Tabla 1. Resumen secuenciación y ensamblaje del genoma de *Alcaligenes* sp. QD168

Método de secuenciación	MiSeq Illumina (paired-end)	SMRT Sequencing RS II (PacBio)
Plataforma	Illumina	Pacific Biosciences
Secuencias totales	1.315.432	112.163
Ensamblador	CLC Workbench Genomics	Hierarchical Genome Assembly Process (HGAP)
Tamaño	4,28 Mb	4,38 Mb
Contenido-GC (%)	56,3	56,3
Cobertura	72,6 X	167 X
Nº de Contigs	39	3
N50	231.323 pb	4.335.427 pb
Contig menor	693 pb	8.626 pb
Contig mayor	568.296 pb	4.335.427 pb

2.6. Anotación del genoma de *Alcaligenes* sp. QD168

El genoma cerrado fue anotado utilizando el servidor Rapid Annotation Subsystem Technology (RAST, Overbeek *et al.* 2014), el programa PROKKA (Seemann, 2014) y el NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline ver. 4.6 (Tatusova *et al.*, 2016) (Tabla 2). El metabolismo primario y secundario fue identificado mediante la base de datos de Biocatálisis/Biodegradación de la Universidad de Minnesota (EAWAG-BBD) y la base de datos de Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (Tanabe y Kanehisa 2012).

Tabla 2. Resumen anotación automática del genoma de *Alcaligenes* sp. QD168

Herramienta	PROKKA	RAST	PGAP
Elementos totales	4000	4134	3963
Secuencias codificantes (CDS)	3928	4066	3892
ARNr	9	9	9
ARNt	60	57	58
ARNtm	1	-	-
Regiones repetidas (CRISPR)	2	2	2

2.7. Representación circular del genoma de *Alcaligenes* sp. QD168

CGview ver. 2 fue utilizado para generar el mapa circular del genoma de *Alcaligenes* sp. QD168 (Stothard y Wishart, 2005). Las secuencias aminoacídicas fueron clasificadas de acuerdo con la nomenclatura de los clusters de grupos ortólogos (COGs) obtenidos utilizando el software eggNOG ver. 4.5.1. (Huerta-Cepas *et al.*, 2016).

2.8. Identificación filogenética de *Alcaligenes* sp. QD168

Para la identificación filogenética de la cepa QD168 se realizó un análisis del gen ARN ribosomal (ARNr 16S) y un análisis de secuencias multi-locus (MLSA) utilizando los genes marcadores *gyrB*, *nirK* y ARNr 16S para el género *Alcaligenes* (Abbas *et al.*, 2015). Para el análisis basado en el gen ARNr 16S y el MLSA se obtuvieron las secuencias nucleotídicas de las cepas tipo de la familia *Alcaligenaceae* y del género *Alcaligenes*, respectivamente. Las secuencias fueron alineadas utilizando MAFFT ver. 7.407 (Kato y Standley, 2013). Los alineamientos fueron manualmente recortados usando el software AliView ver. 1.24 (Larsson, 2014) y concatenados utilizando el módulo Bio.Nexus tal como se encuentra implementado en Biopython ver. 1.72 (Cock *et al.*, 2009). El mejor modelo evolutivo fue identificado mediante el programa PartitionFinder ver. 2.1.1 (Lanfear *et al.*, 2017). Una distribución de árboles probables utilizando el método de inferencia Bayesiana fue obtenida mediante el software MrBayes ver. 3.2.6. (Ronquist *et al.*

2012). La visualización y edición del árbol filogenético obtenido fueron realizadas utilizando el software FigTree ver. 1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

2.9. Datos genómicos de *Alcaligenes* spp.

Todas las secuencias genómicas utilizadas en los análisis filogenómicos realizados en esta tesis fueron obtenidas desde GenBank (septiembre 2018) (**Tabla 26**), incluyendo su estado de secuenciación (completo, scaffolds, o contigs). Los 26 genomas de cepas de *Alcaligenes* spp. fueron organizados en 24 especies descritas más dos cepas no clasificadas al nivel de especies. Todas las secuencias genómicas fueron re-annotadas utilizando una combinación de métodos *ab initio* y de similitud implementados en Prokka version 1.10 (Seemann, 2014).

2.10. Análisis de identidad nucleotídica promedio (ANIb)

La identidad nucleotídica a nivel genómico fue explorada estimando la identidad nucleotídica promedio (ANI) de todos los genomas de *Alcaligenes* spp. contra los mismos. El valor ANI fue calculado mediante el método que utiliza BLAST (ANIb) para alinear las secuencias analizadas utilizando JspeciesWS v.3.0.2 (Richter *et al.*, 2016). Mapas de calor fueron generados utilizando el paquete de R pheatmap V 1.0.8 (Kolde, 2012). Las agrupaciones genómicas fueron definidas utilizando un agrupamiento jerárquico (método: promedio) basado en un 95% ANI, el cual representa un valor de corte estándar para la clasificación a nivel de especies (Richter y Rosselló-Móra, 2009).

2.11. Análisis de secuencias multi-locus (MLSA)

Para comprobar la identificación filogenética del conjunto de datos genómicos del género *Alcaligenes*, se realizó un MLSA utilizando 36 marcadores genéticos. Se utilizaron 29 marcadores genéticos (*dnaG*, *frr*, *infC*, *nusA*, *pgk*, *pyrG*, *rplB*, *rplC*, *rplD*, *rplE*, *rplF*, *rplM*, *rplN*, *rplP*, *rplS*, *rplT*, *rpmA*, *rpsB*, *rpsC*, *rpsE*, *rpsI*, *rpsJ*, *rpsK*, *rpsM*, *rpsS*, *smpB*, y *tsf*) identificados mediante el software AMPHORA2 (Wu y Scott, 2012), además de otros 7 marcadores genéticos (*atpD*, *glta*, *gyrB*, *nirK*, *pnp*, *recA* y *thrC*). Todas las secuencias nucleotídicas fueron alineadas utilizando MAFFT ver. 7.407 (Kato y Standley, 2013). Los alineamientos fueron manualmente editados utilizando el software AliView ver. 1.24 (Larsson, 2014) y concatenados utilizando el módulo Bio.Nexus tal como se encuentra implementado en Biopython ver. 1.72 (Cock *et al.*, 2009). El mejor esquema de partición fue identificado utilizando el programa PartitionFinder ver. 2.1.1 (Lanfear *et al.*, 2017). Una distribución de árboles probables utilizando el método de Inferencia Bayesiana fue obtenida

mediante el software MrBayes ver. 3.2.6 (Ronquist *et al.* 2012). La visualización y edición del árbol filogenético obtenido fueron realizadas utilizando el software FigTree ver. 1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

2.12. Clasificación de las categorías de Clusters de Grupos Ortólogos (COGs)

Las secuencias aminoacídicas de cada genoma fueron clasificadas de acuerdo a las categorías de clusters de grupos ortólogos (COGs) mediante el software eggNOG ver. 4.5.1. (Huerta-Cepas *et al.*, 2016) utilizando los parámetros: identificación en base a HMMER y foco del grupo *bacteria*. Se utilizó como archivo de entrada las secuencias aminoacídicas obtenidas de la anotación por PROKKA de cada genoma. Todas las secuencias aminoacídicas descartadas por el software eggNOG fueron consideradas en el grupo “No Clasificado”. Se calculó el promedio de cada categoría COG utilizando la información de los 26 genomas analizados.

2.13. Identificación *in silico* de genes que codifican monooxigenasas, hidroxilasas, dioxigenasas, y de genes asociados a la respuesta adaptativa a estrés oxidativo

Las secuencias codificantes identificadas mediante PROKKA fueron sometidas a un alineamiento local utilizando las herramientas blastp y tblastn del programa BLAST+ (Camacho *et al.*, 2009) contra una base de datos de dioxigenasas, monooxigenasas e hidroxilasas, además de reguladores transcripcionales asociados al control de estrés oxidativo (reguladores OxyR, SoxR, PerR y OhrR), isoformas de proteínas resistentes a estrés oxidativo (FumC y AcnA) y proteínas asociadas al control de estrés oxidativo (catalasas, superóxido dismutasas, reductasas y peroxidasas) reportadas en UniProtKB-Swissprot utilizando como valor de corte un e-value $< 10^{-10}$, identidad $> 30\%$ y cobertura $> 50\%$. Asimismo, dominios o residuos importantes en la función de cada producto génico fueron identificados mediante el algoritmo DELTA-BLAST de la plataforma BLAST y alineamientos de secuencias mediante ClustalW v.2.1 (Larkin *et al.*, 2007).

2.14. Identificación y clasificación filogenética de las subunidades α de oxigenasas hidroxilantes

Se realizó una clasificación de subunidades alfa de oxigenasas hidroxilantes del anillo aromático según Nam *et al.* 2001 mediante alineamientos múltiples de secuencias (MSA, Multiple Sequence Alignment) utilizando el software ClustalW v.2.1. Los alineamientos fueron editados y curados a mano, para luego crear un

perfil de modelo oculto de Markov (HMMs, Hidden Markov Models) mediante la herramienta hmmbuild del programa HMMER v.3.1 (Eddy, 2011). Cada perfil HMM fue utilizado en la búsqueda de subunidades alfa de oxigenasas hidroxilantes del anillo aromático en el genoma de *Alcaligenes* sp. QD168 mediante la herramienta hmmsearch del programa HMMER v.3.1. Las secuencias de aminoácidos obtenidas del genoma de *Alcaligenes* sp. QD168 fueron alineadas (ClustalW v2.1) con secuencias de subunidades α de cepas de referencia de cada grupo para generar un alineamiento múltiple. El alineamiento múltiple permitió construir un árbol filogenético de inferencia Bayesiana utilizando el software MrBayes v.3.2 (1.000.000 generaciones, Ronquist *et al.* 2012). La visualización y edición del árbol filogenético obtenido fueron realizadas utilizando el software FigTree ver. 1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

2.15. Reconstrucción del catabolismo aromático de *Alcaligenes* sp. QD168 y análisis del contexto genómico

Se analizó el contexto genómico observando manualmente 5 secuencias codificantes río arriba y 5 secuencias codificantes río abajo de los genes marcadores identificados. Se realizó la búsqueda de los genes que codifican la ruta catabólica completa asociada a cada compuesto aromático. En el caso en que no se encontrara la ruta completa en su contexto genómico, se realizó una búsqueda manual de las enzimas faltantes de la ruta en estudio utilizando BLAST+. Finalmente, se realizó una representación circular del genoma completo de *Alcaligenes* sp. QD168 ilustrando la distribución de las secuencias codificantes que codifican el metabolismo aromático y proteínas relacionadas al control de estrés oxidativo utilizando el programa DNAPlotter v.10.2 (Carver *et al.*, 2009).

2.16. Efecto de la salinidad y temperatura en el crecimiento de *Alcaligenes* sp. QD168

Se creció la cepa QD168 en medio sólido R2A modificando la concentración de NaCl desde 0% a 10% p/v. Se sembraron 30 μ l de un inóculo de la cepa QD168 a una turbidez ($\lambda = 600\text{nm}$) de 0,6 en cada placa. Se monitoreó el crecimiento de los cultivos a 30°C por 5 d cada 24 h. Se creció la cepa QD168 en tubos de ensayo de 3 ml, utilizando medio líquido LB modificando la concentración de NaCl en 1%, 2%, 3,5% y 4% p/v de NaCl total y se monitoreó la turbidez ($\lambda = 600\text{nm}$) hasta las 30 h. Para determinar el efecto de la temperatura en el crecimiento de la cepa QD168, se cultivó en medio LB modificado con 1,75% p/v de NaCl a 20, 30 y 40°C en un agitador

orbital a 180 RPM. Los tubos fueron inóculados al 1% v/v de una resuspensión celular de la cepa QD168 ($turbidez_{600nm} = 0,6$) y se monitoreó la turbidez ($\lambda = 600nm$) a las 12, 21 y 24 h. Los valores fueron calculados como el promedio \pm DE de al menos tres réplicas biológicas.

2.17. Caracterización bioquímica de *Alcaligenes* sp. QD168

Se caracterizó la cepa QD168 mediante la utilización de API20NE (Marcy-l'Étoile, Francia) siguiendo las instrucciones del fabricante y se probó el crecimiento en distintas fuentes de carbono. Además, se determinó el crecimiento en glucosa, fructosa y succinato en medio mínimo M9 como única fuente de carbono. Se monitoreó la turbidez ($\lambda = 600nm$) de los cultivos a 30°C por 120 h con un lector de turbidez de microplaca (TECAN, Tecan Trading AG, Suecia). Los valores fueron calculados como el promedio \pm DE de al menos tres réplicas biológicas.

2.18. Crecimiento de *Alcaligenes* sp. QD168 en compuestos aromáticos como única fuente de carbono

Se evaluó el crecimiento de *Alcaligenes* sp. QD168 en los compuestos aromáticos catecol, protocatecuato, gentisato, salicilato, benzoato, fenol, 3-hidroxibenzoato, 4-hidroxibenzoato, 3-toluato, cinamato, 3-hidroxicinamato, benceno, fenantreno, fluoreno y antraceno como única fuente de carbono. Para esto se realizó un preinóculo de la cepa QD168 en medio LB modificado con 1,75 % p/v de NaCl hasta fase exponencial ($turbidez_{\lambda=600nm} \sim 0,8$), luego éste se inóculo al 1% v/v en medio mínimo M9 utilizando succinato 2 mM como única fuente de carbono. La cepa se creció hasta fase exponencial ($turbidez_{\lambda=600nm} \sim 0,6$) para ser utilizada como inóculo al 1% v/v en medio mínimo M9 sin fuente de carbono por 18 h. Este último cultivo se utilizó como inóculo al 1% v/v en medio mineral M9 utilizando como única fuente de carbono los compuestos correspondientes. Esto se realizó para minimizar el crecimiento aparente de la cepa QD168 en ausencia de fuentes de carbono (Anexos, **Figura 34**). Se utilizó como control positivo de crecimiento en succinato 2 mM en las mismas condiciones. Se tomaron alícuotas y se midió turbidez ($\lambda = 600nm$) cada 2,5 d durante 10 d. Además, se realizó un ensayo en tubos de 20 ml realizando el mismo procedimiento. Se tomaron alícuotas a las 0 h, 24 h, 70 h y 120 h para medir unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml). Los valores fueron calculados como el promedio \pm DE de al menos tres réplicas biológicas.

2.19. Crecimiento de *Alcaligenes* sp. QD168 en compuestos aromáticos como única fuente de carbono y nitrógeno

Se evaluó el crecimiento de *Alcaligenes* sp. QD168 en los compuestos aromáticos nicotinato, 2-aminofenol, 4-aminobenzoato, benzamida, simazina, antranilato y triptófano como única fuente de carbono y nitrógeno. Para esto se realizó un preinóculo de la cepa QD168 en medio LB modificado con 1,75 % p/v de NaCl hasta fase exponencial (turbidez $\lambda=600\text{nm} \sim 0,8$), luego éste se inóculo al 1% v/v en medio mínimo M9 utilizando succinato 2 mM como única fuente de carbono. La cepa se creció hasta fase exponencial (turbidez $\lambda=600\text{nm} \sim 0,6$) para ser utilizada como inóculo al 1% v/v en medio mínimo M9 sin fuente de carbono por 18 h. Este último cultivo se utilizó como inóculo al 1% v/v en medio mineral M8 (sin fuente de nitrógeno) utilizando los compuestos descritos como única fuente de carbono y nitrógeno. Se tomaron alícuotas a las 0, 12, 24, 38, 70 y 120 h y se determinó UFC/ml. Los valores fueron calculados como el promedio \pm DE de al menos tres réplicas biológicas.

2.20. Crecimiento de *Alcaligenes* sp. QD168 en compuestos aromáticos volátiles

Se evaluó el crecimiento de *Alcaligenes* sp. QD168 en los compuestos aromáticos volátiles benceno, tolueno, naftaleno y bifenilo como única fuente de carbono. Para esto se realizó un preinóculo de la cepa QD168 en medio LB modificado con 1,75 % p/v de NaCl hasta fase exponencial (turbidez $\lambda=600\text{nm} \sim 0,8$), luego éste se inóculo al 1% v/v en medio mínimo M9 utilizando succinato 2 mM como única fuente de carbono. La cepa se creció hasta fase exponencial (turbidez $\lambda=600\text{nm} \sim 0,6$) para ser utilizada como inóculo al 1% v/v en medio mínimo M9 sin fuente de carbono por 18 h. Se utilizaron 20 μl de este cultivo para sembrar placas de medio mínimo M9. Se probó el compuesto aromático en fase gaseosa de la placa Petri. En el caso de naftaleno y bifenilo, éstos fueron agregados en forma de cristal, y en el caso de benceno y tolueno, éstos fueron agregados en papel filtro estéril depositado en la tapa de la placa. Los cultivos se incubaron a 30°C por 10 d. Se realizaron al menos tres réplicas biológicas por condición experimental.

2.21. Curva de crecimiento de *Alcaligenes* sp. QD168 en benceno como única fuente de carbono

Para evaluar el crecimiento en benceno de *Alcaligenes* sp. QD168 se realizó una pre-adaptación en medio mineral M9 utilizando las concentraciones 0,5, 2 y 5 mM de benceno como única fuente de carbono a 30°C y 200 RPM. Debido a la limitación

de oxígeno por utilizar un matraz para compuestos volátiles se utilizó una razón de 1:10 entre volumen de cultivo y volumen total del matraz. Se creció un preinóculo de *Alcaligenes* sp. QD168 en medio LB modificado con 1,75% p/v de NaCl, las células se lavaron con una solución de NaCl al 1,75% p/v y se inoculó al 1% v/v en medio mineral M9 con succinato 2 mM como fuente de carbono. La cepa se creció hasta fase exponencial (turbidez $\lambda=600\text{nm} \sim 0,6$) para ser utilizada como inóculo del primer cultivo en benceno. Se realizaron trasposos sucesivos reinoculando al 5% v/v en medio mineral M9 fresco con una concentración creciente de benceno, pasando desde 0,5 mM, 2 mM hasta una concentración final de 5 mM como única fuente de carbono (Anexos, **Figura 35**). Se tomaron alícuotas cada 12 h para monitorear el crecimiento de la cepa QD168 en benceno 5mM mediante turbidez ($\lambda= 600\text{nm}$) y UFC/ml. Los valores fueron calculados como el promedio \pm DE de al menos tres réplicas biológicas.

2.22. Ensayo de células en reposo de *Alcaligenes* sp. QD68 en benceno

Para evaluar la degradación de benceno se cosechó la cepa QD168 en fase exponencial (turbidez $\lambda=600\text{nm} \sim 0,2$) crecida en medio mineral M9 modificado con 1,75% p/v de NaCl utilizando una concentración de benceno 2mM para ser utilizada como inóculo en el siguiente cultivo. Se realizó un cultivo de 250 ml a una concentración de benceno 5 mM con succinato 2 mM en un matraz de 2 l. Al llegar a fase exponencial (turbidez $\lambda=600\text{nm} \sim 0,8$) se concentró el cultivo 20 veces. Se realizó un ensayo en tubos de 20 ml con tapa de teflón para evitar la volatilización de benceno. 1 ml de suspensión celular fue expuesto a 5 mM de benceno y se recolectaron muestras a los 0, 30 y 60 min. Se utilizó un control de células hervidas y control abiótico de degradación de benceno. Los valores fueron calculados como el promedio \pm DE de al menos tres réplicas biológicas.

2.23. Cuantificación de benceno y fenol mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) acoplado a un detector de arreglo de diodos (DAD)

Se realizó una extracción orgánica a las muestras obtenidas con acetato de etilo (1:1), para luego centrifugar a $10.000 \times g \times 5$ min. La fracción orgánica (superior) fue recuperada y analizada mediante HPLC-DAD. Se utilizó una fase móvil de metanol: acetonitrilo (30:70) con un flujo de 1 ml/min. Se realizaron curvas estándar para los compuestos benceno y fenol (**Tabla 3**).

Tabla 3. Parámetros de las curvas de calibrado de los compuestos benceno y fenol

Compuesto	T retención	λ max	Rango (mM)	Pendiente (b)	Intersecto (a)	R
Benceno	2,4	200	0,1 – 20	15075,72893	2883,30454	0,9990
Fenol	2,613	270	0,1 – 10	9658,28	0	0,9956

2.24. Susceptibilidad de *Alcaligenes* sp. QD168 a agentes oxidantes

Se creció un preinóculo de la cepa QD168 en medio LB modificado con 1,75% NaCl, las células se lavaron con una solución de NaCl al 1,75% y se inoculó al 1% v/v en medio mineral M9 con succinato 2 mM como fuente de carbono. La cepa se creció hasta fase exponencial (turbidez_{600nm} ~ 0,6). 100 μ l de cultivo se adicionaron a 4 ml de agar suave (triptona 1% p/v, agar 0,5% p/v) y se vertieron en placas de agar triptona (1% p/v). Los agentes oxidantes paraquat (PQ) y H₂O₂ (15 μ l) se depositaron en solución a discos de difusión a la concentración deseada (Whatman, 6 mm) (Dietrich *et al.*, 2006). Las células se incubaron por 24 h a 30°C y posteriormente se midió la zona de inhibición del crecimiento con el software ImageJ (Schneider *et al.*, 2012). Se estableció como referencia el diámetro del disco de difusión (6 mm). Los valores fueron calculados como el promedio \pm DE de al menos tres réplicas biológicas.

2.25. Efecto de la exposición a agentes oxidantes sobre la viabilidad celular

Se creció un preinóculo de *Alcaligenes* sp. QD168 en medio LB modificado con 1,75% NaCl. Las células de QD168 se lavaron con una solución de NaCl al 1,75% p/v y se inoculó al 1% v/v en medio mineral M9 con succinato 2 mM como única fuente de carbono. La cepa se creció hasta fase exponencial (turbidez_{600nm} ~ 0,6). Las células se expusieron a los agentes oxidantes PQ, H₂O₂ o a una solución de 1,75% NaCl (control de células no expuestas). Después de 1 h de incubación, se tomaron alícuotas y se diluyó seriadamente en medio LB modificado con 1,75% NaCl. Se sembraron alícuotas de 10 μ l en agar LB modificado con 1,75% NaCl. Las células se incubaron por 24 h a 30°C y se determinó UFC/ml. Se calculó el % de supervivencia como la razón entre las células expuestas y las células no expuestas (Ec. 1). Los valores fueron calculados como el promedio \pm DE de al menos tres réplicas biológicas.

$$\% \text{ Supervivencia} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de células tratadas}}{\text{N}^\circ \text{ de células no tratadas}} \times 100 \quad \text{Ec. 1}$$

2.26. Determinación de daño a macromoléculas

2.26.1. Preparación del extracto crudo

Para la preparación del extracto crudo de muestras de *Alcaligenes* sp. QD168 expuestas a agentes oxidantes y crecidas en benceno 5 mM, se tomaron alícuotas de cada condición experimental y se adicionaron 100 μ l de tampón de muestra (fosfato de sodio 20 mM a pH 7,2, 1 mM de EDTA, inhibidor de proteasas y 0,1 mM BHT) por cada 5 mg de bacteria (peso húmedo). Las muestras se sonicaron utilizando 5 pulsos de 30 s en hielo. Se eliminó el debris celular centrifugando a $10.000 \times g$ por 10 min a 4°C. Luego de recuperar cuidadosamente los sobrenadantes, se tomó una alícuota para la cuantificación de proteínas mediante fluorometría utilizando el sistema comercial Quant-it™ Protein Assay (Invitrogen, OR, USA.). Los sobrenadantes fueron separados en dos alícuotas para la determinación de daño oxidativo a membrana celular (cuantificación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico) y a proteínas (determinación de carbonilación de proteínas totales).

2.26.2. Cuantificación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

La determinación de daño a membrana celular se realizó mediante el método de determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). Este método está basado en la reacción del ácido 2-tiobarbitúrico con el grupo aldehído del compuesto malondialdehído (MDA), formando un aducto cromóforo de color rosado (TBA-MDA) con un máximo de absorción a 535 nm.

Los sobrenadantes de cada muestra obtenida se mezclaron con una solución saturada de ácido 2-tiobarbitúrico al 0,67% p/v (disuelto en HCl 0,1 M y BHT 10 mM) en una relación 1:1. Se incubó a 100°C por 60 min y se enfriaron a temperatura ambiente, para luego registrar los valores de $A_{535\text{nm}}$ y $A_{600\text{nm}}$. Se calculó la concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico utilizando su coeficiente de extinción molar ($\epsilon = 156.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Los valores fueron calculados como el promedio \pm DE de al menos tres réplicas biológicas.

2.26.3. Determinación de carbonilación de proteínas

Se determinó la carbonilación de proteínas utilizando el método espectrofotométrico alcalino del ensayo de la 2,4-dinitrofenilhidrazona (DNPH) (Mesquita *et al.*, 2014). Este método se basa en la reacción entre la 2,4-dinitrofenilhidrazona y los grupos carbonilos presentes en la muestra. Los productos derivados de la hidrazona poseen un máximo de absorción a 370 nm, los

cuales luego de ser expuestos a una solución alcalina cambian su máximo de absorción a una longitud de onda más alta (450 nm).

El sobrenadante obtenido de cada muestra fue tratado con sulfato de estreptomycin al 1% p/v para precipitar ácidos nucleicos presentes en la muestra. Las muestras se incubaron por 15 min en hielo para luego ser centrifugada a $16.000 \times g$ por 5 min a 4°C . Las muestras se trataron con ácido tricloroacético 20% frío disuelto en acetona (a -20°C) para precipitar proteínas totales. Se incubaron a -20°C por 15 min, y fueron centrifugadas a $2.000 \times g$ por 2 min a 4°C . El precipitado proteico se resuspendió en $400 \mu\text{l}$ de tampón de muestra y se mezcló con $400 \mu\text{l}$ de una solución de 2,4-dinitrofenilhidrazona 10 mM (DNPH, preparado en una solución de HCl 2 M). Se agitó constantemente por 10 min a temperatura ambiente y se agregaron $200 \mu\text{l}$ de solución de NaOH 6 M. Las muestras se incubaron por 10 min a temperatura ambiente para luego registrar los valores de $A_{450\text{nm}}$. Se utilizó como blanco una solución sin proteínas. Se calculó la concentración de grupos carbonilos totales utilizando su coeficiente de extinción molar en medio alcalino ($\epsilon = 22.308 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Los valores fueron calculados como el promedio \pm DE de al menos tres réplicas biológicas.

2.27. Análisis de datos

El análisis estadístico de las varianzas de una vía (One-way ANOVA) de datos en triplicado se realizó utilizando el programa de análisis estadístico InfoStat. En el caso de obtener alguna diferencia entre los grupos, se realizó un test de LSD Fisher con un 95% o 99% de confianza ($\alpha = 0,05$ o $0,001$, respectivamente).

2.28. Análisis cuantitativo de la expresión de genes por RT-qPCR

Se evaluó la funcionalidad de los genes identificados cuantificando su expresión génica relativa mediante ensayos de RT-qPCR luego de la exposición por 60 min a H_2O_2 (0,5 mM), PQ (50 mM) o una solución de 1,75% de NaCl como control de células no expuestas. Para estudiar el efecto durante la degradación de benceno en la expresión génica se cuantificó mediante RT-qPCR durante fase exponencial del crecimiento de *Alcaligenes* sp. QD168 en benceno 5 mM. Se empleó el crecimiento durante fase exponencial de la cepa QD168 en succinato 2 mM como grupo control.

2.28.1. Diseño de partidores

Se diseñaron partidores específicos a partir de las secuencias nucleotídicas de genes de interés. Los partidores se diseñaron utilizando los programas primer-blast (Primer-blast, NCBI) para obtener partidores con una temperatura de alineamiento

similar y un amplicón entre 72 y 200 pb, comprobando formación de dímeros o de horquillas con la herramienta online de IDT y el programa AmplifX (ver. 1.5.4.). En la **Tabla 4** se muestran los partidores diseñados.

Tabla 4. Partidores diseñados y utilizados en esta tesis

Oligonucleótido	ADN blanco	Secuencia (5'-3')	Referencia
QD168_16SrRNA Fw	Gen ARNr 16S de	GCTAGTAATCGCGGATCAGAAT	Esta Tesis
QD168_16SrRNA Rv	la cepa QD168	GGCTACCTACTTCTGGTGAAAC	Esta Tesis
QD168_ftsZ Fw	Gen <i>ftsZ</i> de la	CGTTCACTCTCTGATCGTTGTA	Esta Tesis
QD168_ftsZ Rv	cepa QD168	CAGGCATTGTGCAAGACATC	Esta Tesis
QD168_benC1_1 Fw	Gen <i>bedC1_1</i> de	ACTTGGACGGCAAGCTTAAA	Esta Tesis
QD168_benC1_1 Rv	la cepa QD168	AGCCAAGAAAGTGGTCCAGA	Esta Tesis
QD168_benC1_2 Fw	Gen <i>bedC1_2</i> de	CTCGTGAAGGTGGCATCAAT	Esta Tesis
QD168_benC1_2 Rv	la cepa QD168	ACTGATACGGCGCACATTAC	Esta Tesis
QD168_dmpP Fw	Gen <i>dmpP</i> de la	GCACGTACGCAAGGTAGAA	Esta Tesis
QD168_dmpP Rv	cepa QD168	GCACAAAGAAGTCCATAAG	Esta Tesis
QD168_catA Fw	Gen <i>catA</i> de la	GATGGTCCGTTTGCAGAGAT	Esta Tesis
QD168_catA Rv	cepa QD168	GGACGATTCACGATCTGGTT	Esta Tesis
QD168_catE Fw	Gen <i>catE</i> de la	GTCCAGGATCTGGAACAAACA	Esta Tesis
QD168_catE Rv	cepa QD168	CGGGATCACGCAAGAAGAA	Esta Tesis
QD168_ahpC_1 Fw	Gen <i>ahpC_1</i> de	GTAATAGCTGGGGCGTCTTG	Esta Tesis
QD168_ahpC_1 Rv	la cepa QD168	TTGGCGGTATAACCCAGTTC	Esta Tesis
QD168_ahpC_2 Fw	Gen <i>ahpC_2</i> de	CCATGATCGGTGACCCTACT	Esta Tesis
QD168_ahpC_2 Rv	la cepa QD168	CGAAAGCGATACCTTCTTC	Esta Tesis
QD168_katE Fw	Gen <i>katE</i> de la	ATTTGACCACGAGCGTATC	Esta Tesis
QD168_katE Rv	cepa QD168	GGCCTGCGTACATTCAAAT	Esta Tesis
QD168_sodC1 Fw	Gen <i>sodC_1</i> de la	ACTGGCGGACGTCATTATTC	Esta Tesis
QD168_sodC1 Rv	cepa QD168	CATGTACACCGGGTTTGAGA	Esta Tesis
QD168_oxyR Fw	Gen <i>oxyR</i> de la	TGACATTGACCGAGCTGAAG	Esta Tesis
QD168_oxyR Rv	cepa QD168	CGAAGATGACCACGCCTAAT	Esta Tesis
QD168_perR Fw	Gen <i>perR</i> de la	TGGCTACGAGCCTTTGAATC	Esta Tesis
QD168_perR Rv	cepa QD168	TTCCAGGCTCTTGACCTGAT	Esta Tesis
QD168_soxR_1 Fw	Gen <i>soxR_1</i> de la	ATAGGCTGTGGATGCTTGTC	Esta Tesis
QD168_soxR_1 Rv	cepa QD168	GGTGCTCTTCTGCTTCAGTAA	Esta Tesis
QD168_soxR_2 Fw	Gen <i>soxR_2</i> de la	TCCTTTGGAGGAAATTCACG	Esta Tesis
QD168_soxR_2 Rv	cepa QD168	CTGCTCAATCCGATCATTCA	Esta Tesis
QD168_fumC Fw	Gen <i>fumC</i> de la	CTGGAACCTGTCATGGAGAAA	Esta Tesis
QD168_fumC Rv	cepa QD168	GCCTTGTCGTAACCGATGT	Esta Tesis

2.28.2. Curvas de disociación y determinación de eficiencias de los partidores

Para determinar las curvas de disociación y las eficiencias de partidores se utilizó ADN_g de *Alcaligenes* sp. QD168 extraído y cuantificado utilizando la metodología descrita en la actividad 2.4. Para determinar las eficiencias de los partidores y la curva de disociación de los partidores, se realizaron 7 diluciones seriadas del ADN_g diluyendo en una razón de 1:10 en agua libre de nucleasas. Estas diluciones se utilizaron como templado para una curva estándar de cada par de partidores diseñados. Para realizar la reacción de PCR cuantitativo se utilizó el sistema comercial KAPA™ SYBR qPCR Master Mix (Kapa Biosystems, Boston, USA). Se utilizó como templado 1 µl de ADN_g (< 20 ng), 10 µM de cada partidor, 5 µl de Master Mix (2X), 0,4 µl de ROX y agua libre de nucleasas (volumen final de 10 µl). Las reacciones se realizaron por triplicado y se analizó la fluorescencia en el equipo Stratagene Mx3000p™ (Agilent Technologies). Se realizó una etapa inicial de activación (95°C, 1 min), una etapa de 95° por 5 s, 40 ciclos de amplificación (desnaturalización, 95°C, 30 s, hibridación, 59°C, 20 s, elongación 72°C, 15 s), y una etapa final de 30 min con un gradiente de temperatura para realizar la curva de disociación.

2.28.3. Extracción y purificación de ARN

Las alícuotas tomadas de cada condición experimental fueron conservadas con RNA protect Bacteria (QIAGEN, Alemania) a -20°C. Al momento de la extracción de ARN, las células fueron tratadas con buffer TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8.0) y 3 µg ml⁻¹ de lisozima (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Se transfirieron 700 µl del lisado a una columna del sistema comercial RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Alemania). Se centrifugó por 15 s a 10.000 × g, eliminando el eluido. Se adicionaron 700 µl de tampón RW1 a la columna y se lavó la membrana centrifugando a 10.000 × g por 15 s. Se eliminó el eluido y el tubo recolector. Se transfirió la columna en un nuevo tubo de 2 ml y se agregó 500 µl de tampón RPE. Se lavó centrifugando nuevamente, eliminando el eluido y utilizando el mismo tubo recolector. Posteriormente, se adicionaron 500 µl de tampón RPE y se centrifugó a 10.000 × g por 15 s. En un nuevo tubo recolector de 1,5 ml se transfirió la columna y se agregó 30 µl de agua libre de ribonucleasas directamente a la membrana. Se centrifugó a 10.000 × g por 1 min para eluir el ARN. Se repitió el paso anterior para obtener 60 µl totales. Se cuantificó el ARN total mediante fluorometría utilizando el sistema comercial Quant-it™ RNA HS Assay (Invitrogen, OR, USA). Se verificó la pureza de

las muestras mediante la razón 260/280 nm y 230/260 nm, además de una reacción de qPCR utilizando partidores específicos de la cepa QD168 para verificar contaminación con ADN. Se comprobó la integridad del ARN total por geles de agarosa 1% en condiciones libres de nucleasas utilizando como patrón de peso molecular RiboRuler High Range RNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Las muestras fueron calentadas a 70°C por 5 min previo a cargar el gel (**Figura 5**).

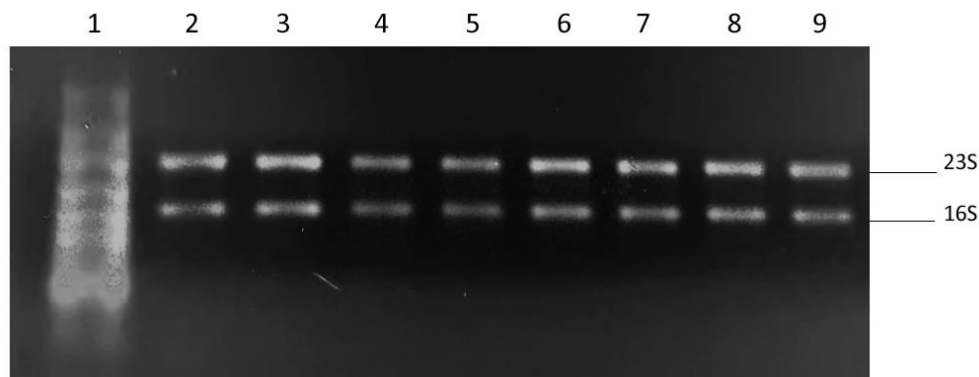


Figura 5. Integridad de ARN total extraído de cultivos de *Alcaligenes* sp. QD168. Se obtuvieron las muestras luego de la exposición a los agentes oxidantes H₂O₂ (carriles 2 y 3), PQ (carriles 4 y 5) y en fase exponencial de crecimiento en succinato 2 mM (carriles 6 y 7) y fase exponencial en benceno 5 mM (carriles 8 y 9). En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular RiboRuler High Range RNA Ladder.

2.28.4. Síntesis de ADN complementario (ADNc) y cuantificación de la expresión génica

Para la síntesis de ADN complementario (ADNc) a partir del ARN se utilizó el sistema comercial First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) siguiendo las recomendaciones del fabricante. El producto de la reacción (ADNc) se almacenó a -20°C (por una semana). El análisis de la expresión cuantitativa de genes se realizó utilizando el sistema comercial KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (Kapa Biosystems, Boston, USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se utilizó como templado 2 µl de ADNc (< 20 ng), 10 µM de cada partidor, 10 µl de Master Mix (2 x) y agua libre de nucleasas (volumen final 20 µl). Se realizaron las reacciones por duplicado y se analizó la fluorescencia en el equipo Stratagene Mx3000pTM (Agilent Technologies, CA, USA). Se realizó una etapa inicial de activación (25°C, 1 s), una etapa de 95°C por 5 s y 40 ciclos de amplificación (desnaturalización, 95°C, 30 s; hibridación 59°C, 20 s; elongación, 72°C, 15 s). Para realizar el cálculo de la expresión relativa se utilizó el método de Hellemans *et al.* 2007, el cual incorpora la eficiencia de cada partidor y la integración de más de un gen normalizador en el cambio relativo obtenido. Para esto se utilizaron las ecuaciones de corrección por eficiencia de partidor (Ec. 2, Pfaffl 2001) y la integración de dos genes

normalizadores ARNr 16S y *ftsZ* (Ec. 3). Se obtuvo una cantidad relativa normalizada de al menos tres replicas biológicas independientes y dos réplicas técnicas para evaluar reproducibilidad. Se consideró significativo un aumento mayor a dos veces en la expresión del transcrito con respecto al grupo control. Para determinar diferencias entre dos condiciones analizadas se realizó un t-test.

$$\text{Cantidad Relativa Normalizada (NRQ)} = \frac{E_{goi}^{\Delta Ct, goi}}{E_{ref}^{\Delta Ct, ref}} \quad \text{Ec. 2}$$

$$\text{Cantidad Relativa Normalizada (NRQ)} = \frac{E_{goi}^{\Delta Ct, goi}}{\sqrt[f]{\prod_0^f E_{ref}^{\Delta Ct, ref_0}}} \quad \text{Ec. 3}$$

3. RESULTADOS

3.1. Caracterización genómica, taxonómica y bioquímica de la bacteria marina *Alcaligenes* sp. QD168

La bacteria *Alcaligenes* sp. QD168 fue aislada desde sedimento marino contaminado con hidrocarburos de la bahía de Quintero, Valparaíso, Chile, mediante cultivos sucesivos en medio mínimo BHB complementado con agua de mar artificial (ASW, “*artificial sea water*”) y diésel al 1% v/v. Una identificación taxonómica previa mediante secuenciación parcial del gen ARNr 16S permitió su clasificación dentro del género *Alcaligenes* (100% de identidad con *Alcaligenes aquatilis* LMG 22996^T). En esta tesis, se secuenció el genoma completo de la bacteria marina *Alcaligenes* sp. QD168, permitiendo obtener parámetros genómicos, como también realizar análisis filogenéticos y filogenómicos, los cuales dilucidaron su posición taxonómica dentro del género *Alcaligenes*. Además, se determinaron los rangos de salinidad y temperatura de crecimiento para la cepa QD168, y se realizó una caracterización bioquímica mediante el sistema API20NE.

3.1.1. Caracterización del genoma de *Alcaligenes* sp. QD168

Para estudiar en más profundidad la posición taxonómica, los determinantes genéticos y las características genómicas de *Alcaligenes* sp. QD168, se secuenció su genoma completo mediante las plataformas MiSeq y RSII. Primero se realizó una secuenciación mediante el sistema de secuenciación MiSeq (Illumina), obteniendo un genoma en borrador en 39 contigs (**Tabla 1**), mientras que la secuenciación de tercera generación mediante la plataforma RSII (PacBio) permitió obtener el genoma completo de la cepa QD168. El genoma completo de *Alcaligenes* sp. QD168 fue depositado en GenBank el 22 de octubre del 2018 (N° de acceso GCA_003671915.1) y consistió en un cromosoma circular de 4.323.879 pb con un contenido GC de 56,3%. El genoma se anotó mediante el NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP) y se determinó que contiene 3.892 secuencias codificantes (CDS), incluyendo 9 ARN ribosomales (ARNr) y 58 ARN de transferencia (ARNt). Se determinaron los grupos COG para la anotación funcional de genes (**Figura 6**).

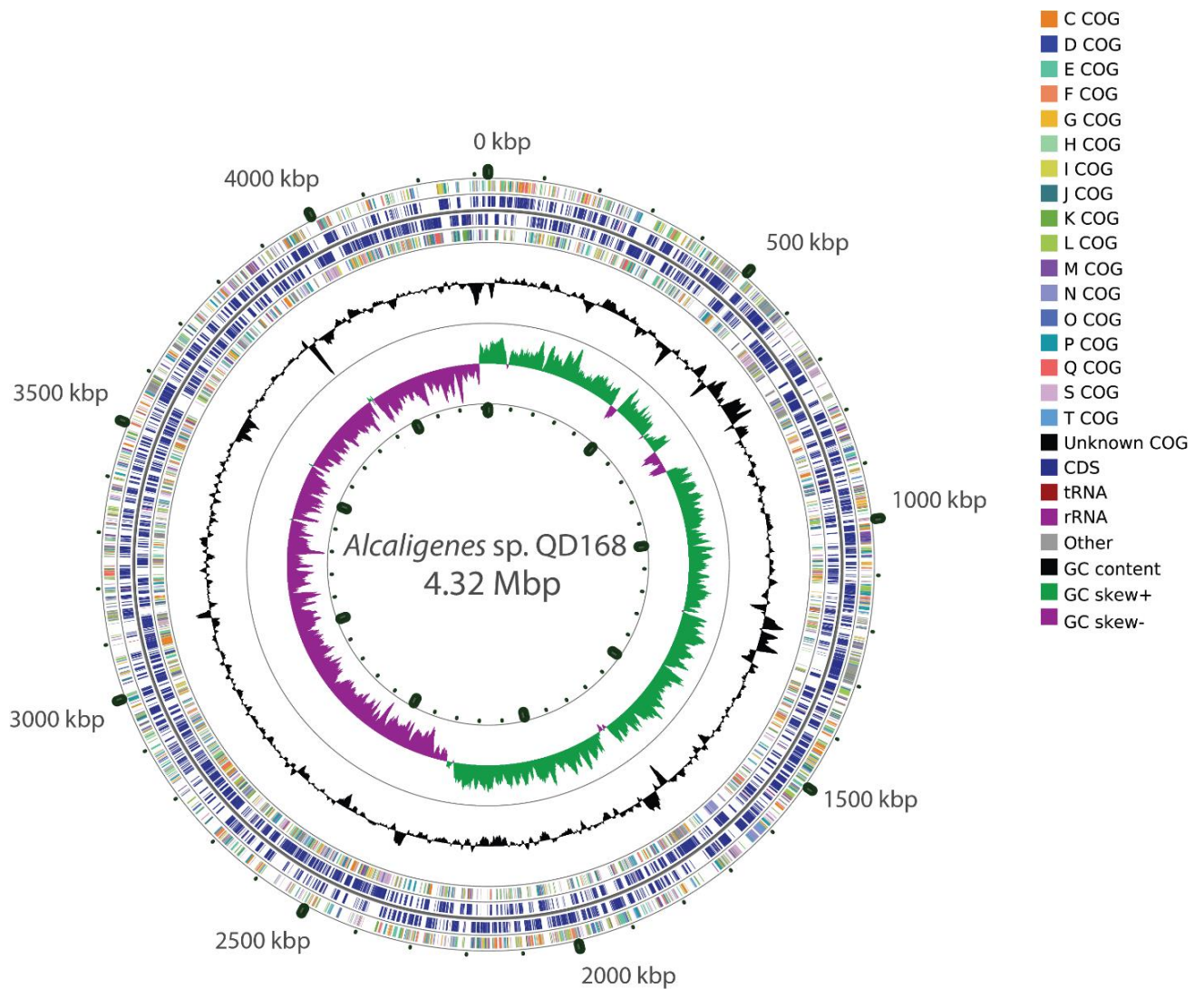


Figura 6. Representación circular del genoma de *Alcaligenes* sp. QD168. El genoma completo de *Alcaligenes* sp. QD168 (4,323,879 pb, 3,892 secuencias codificantes, 9 ARNr y 58 ARNt). Círculos desde adentro hacia afuera: (1) asimetría-GC; (2) contenido-GC; (3) Anotación de COG en la hebra templado; (4) CDS predichas en la hebra templado; (5) CDS predichas en la hebra no templado; (6) Anotación de COG en la hebra no templado. La función génica fue anotada mediante categorías COG. La representación circular fue generada usando la herramienta CGView.

Se evaluaron parámetros genómicos generales entre 26 cepas pertenecientes al género *Alcaligenes*, incluyendo a la bacteria *Alcaligenes* sp. QD168. Una comparación general del tamaño de genoma y contenido GC indicó que la cepa QD168 posee un genoma más grande que el promedio descrito dentro de su género (4,14 Mb, rango del género 3,68 - 4,44 Mb; Anexos, **Tabla 26**) y un % GC cercano al promedio de sus miembros (56,5%, rango total 55,9% - 57,6%; Anexos, **Tabla 26**). A la fecha (diciembre 2018) se han descrito 5 genomas completos dentro del género *Alcaligenes*, correspondiendo todos a la especie *A. faecalis*.

3.1.2. Identificación filogenética mediante ARNr 16S de *Alcaligenes* sp. QD168

La identificación filogenética de la bacteria *Alcaligenes* sp. QD168 fue realizada mediante un análisis de homología del gen ARNr 16S completo. Al realizar una búsqueda de homología por secuencias utilizando sólo la base de datos de secuencias de la subunidad 16S ribosomal mediante la herramienta blastn (BLAST, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), se obtuvieron cuatro secuencias del género *Alcaligenes*, con una identidad mayor al 98% (junio 2018, datos no mostrados). Para comprobar la posición de *Alcaligenes* sp. QD168 dentro del género *Alcaligenes* se realizó un análisis filogenético utilizando las secuencias nucleotídicas del gen ARNr 16S de las cepas tipo de la familia *Alcaligenaceae* obtenidas desde la base de datos de GenBank (NCBI). La cepa QD168 agrupó en el clado conformado por *Alcaligenes* spp., específicamente en un clado conformado por *A. aquatilis* LMG 22996^T (**Figura 7**) visualizando de mejor manera su cercanía filogenética utilizando el marcador ARNr 16S. Además, se comparó la secuencia del gen ARNr 16S de la cepa QD168 con la de las cuatro cepas tipo de cada especie válidamente publicada del género *Alcaligenes* obteniendo los siguientes resultados: *A. aquatilis* LMG 22996^T (Identidad: 99,9%); *A. endophyticus* AER10^T (Identidad: 97,7%); *A. faecalis* DSM 30030^T (Identidad: 98,3%) y *A. pakistanensis* NCCP-650^T (Identidad: 98,2%). La similitud más alta entre las secuencias de ARNr 16S analizadas se obtuvo con la cepa *A. aquatilis* LMG 22996^T. Utilizando los parámetros definidos para delineación de especies mediante secuenciación completa del gen ARNr 16S (> 98,65% de identidad; Kim *et al.*, 2014), se corroboró que la cepa QD168 pertenece a la especie *A. aquatilis* y no a otras especies del género *Alcaligenes*.

Para corroborar la identificación taxonómica a nivel de especie de la cepa QD168 mediante análisis filogenéticos, se realizó un análisis de secuencias multilocus (MLSA, *multi-locus sequence analysis*) utilizando los genes ARNr 16S, *gyrB* y *nirK*, los cuales constituyen marcadores filogenéticos importantes dentro del género *Alcaligenes* (Abbas *et al.*, 2015). Se obtuvo una identidad de un 97,5% con *A. aquatilis* LMG 22996^T, seguido de un 94,5% a la cepa *A. faecalis* DSM 30030^T. Nuevamente, la identidad más alta utilizando los genes marcadores ARNr 16S, *gyrB* y *nirK* se obtuvo con *A. aquatilis* LMG 22996^T. En base a ambos análisis, la cepa QD168 fue clasificada como miembro de la especie *A. aquatilis*.

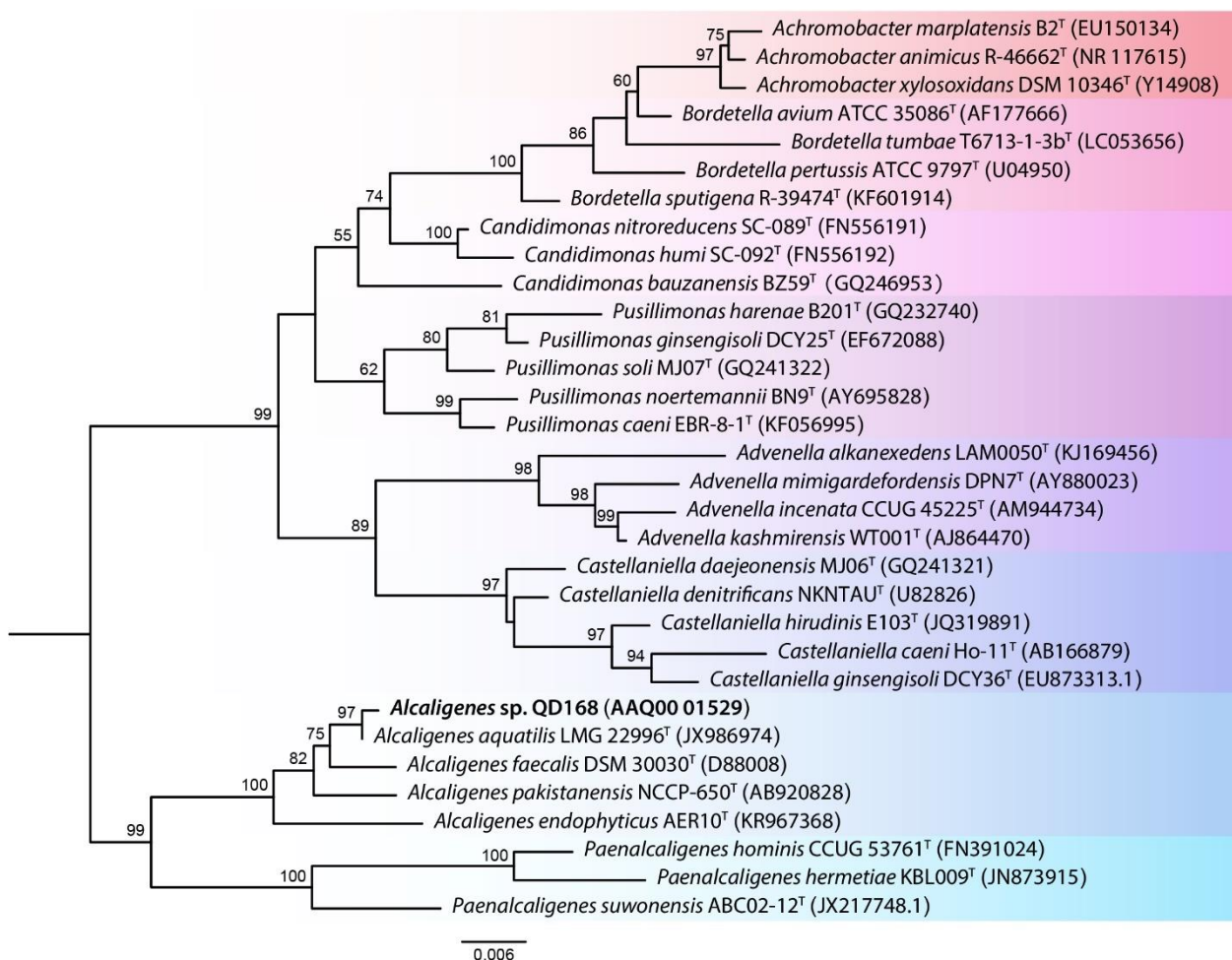


Figura 7. Árbol filogenético de ML ARNr 16S de la bacteria *Alcaligenes sp.* QD168 y otras bacterias de la familia *Alcaligenaceae*. El árbol filogenético se construyó en base a secuencias nucleotídicas del gen ARNr 16S obtenidas desde Genbank (NCBI). Se construyó un árbol filogenético mediante el método “Maximum-likelihood” utilizando el software MEGA7 y un “bootstrap” de 5000 veces. El árbol obtenido fue enraizado en un punto medio (“mid-point rooted”) obteniendo clados específicos para cada género en estudio.

3.1.3. Análisis filogenómico del género *Alcaligenes*

Para profundizar y entender el posicionamiento filogenómico de *A. aquatilis* QD168 dentro del género *Alcaligenes*, un set de 35 genes marcadores fue obtenido de la cepa QD168 y otros 25 genomas de *Alcaligenes* spp. disponibles públicamente para realizar un análisis de secuencias multi-locus (MLSA). La herramienta AMPHORA 2 fue utilizada para evaluar la presencia de genes de una copia que codifican proteínas ribosomales, además de otros genes marcadores clásicos utilizados en bacterias. Este análisis reveló 28 genes marcadores, además de incluir manualmente otros 7 marcadores genéticos (*atpD*, *gltA*, *gyrB*, *nirK*, *pnp*, *recA* y *thrC*) aumentando el poder resolutivo para determinar la filogenia entre las cepas a analizar, y obteniendo un total de 35 genes “housekeeping”. Los siguientes genomas disponibles en GenBank no fueron incluidos en este análisis: *A. faecalis* GZAF2

(GCA_002119985) y *A. faecalis* GZAF4 (GCA_002120025) debido a la ausencia de marcadores genéticos importantes elegidos para este estudio. La **Figura 8A** muestra la relación filogenética entre los genomas de *Alcaligenes* spp. Las cepas de *Alcaligenes* spp. se agrupan en cinco clados distintivos, identificando al menos un genoma de la especie *A. faecalis* en cada clado y no correlacionándose con su identificación previa. *A. aquatilis* QD168 agrupa con otras 4 cepas de *Alcaligenes*: *A. aquatilis* BU33N, siendo el único otro genoma disponible de *A. aquatilis* (GCA_003076515); *A. faecalis* JQ135, una cepa degradadora de derivados de piridina (Qui *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2018); y los genomas de *A. faecalis* UBA3227 y *A. faecalis* UBA7629, obtenidos luego de una reconstrucción de genoma completo desde metagenomas de metros subterráneos (**Figura 8A**).

Para identificar la relación genómica entre las cepas de *Alcaligenes* spp. estudiadas, un análisis de identidad nucleotídica promedio basado en BLAST (ANIb) fue realizado entre todos los genomas (**Figura 8B**). La cepa más cercana a *A. aquatilis* QD168 es *A. aquatilis* BU33N (96,8% de similitud), sugiriendo que ambas cepas son parte de la misma especie. *A. aquatilis* BU33N fue aislada desde sedimento contaminado con petróleo crudo proveniente de Túnez (N° de acceso: GCA_003076515). Utilizando el límite propuesto para la delineación de especies (valor de agrupamiento de ANI > 95%, Ritcher *et al.*, 2009), las 26 cepas fueron agrupadas en cinco grupos filogenómicos, correlacionando con la información obtenida mediante el análisis de MLSA (**Figura 8B**). El grupo I incluyó 8 cepas (*A. faecalis* P156, *A. faecalis* DSM 30030^T, *A. faecalis* GZAF1, *A. faecalis* UBA7622, *A. faecalis* GZAF3, *A. faecalis* GZAF5, *A. faecalis* ZD02 y *A. faecalis* YBY) y contiene a la cepa tipo de la especie *A. faecalis* (DSM 30030^T). La mayoría de los aislados clínicos de las cepas de *Alcaligenes* spp. se encontraron en este grupo. El grupo II constó de 9 cepas (*A. faecalis* BDB4, *A. faecalis* NBIB-017, *A. faecalis* subsp. *phenolicus* MB207, *A. faecalis* MOR02, *A. faecalis* subsp. *phenolicus* 10388, *Alcaligenes* sp. HPC1271, *Alcaligenes* sp. EGD-AK7, *A. faecalis* UBA7605 y *A. faecalis* subsp. *phenolicus* DSM 16503^T) y contiene a la cepa tipo de la subespecie *A. faecalis* subsp. *phenolicus* (DSM 16503^T). El grupo III comprendió a *A. aquatilis* QD168 y otras 4 cepas (*A. aquatilis* BU33N, *A. faecalis* JQ135, *A. faecalis* UBA7629 y *A. faecalis* UBA3227). El grupo IV incluyó 3 cepas (*A. faecalis* subsp. *phenolicus* IITR89, *A. faecalis* UBA3878 y *A. faecalis* subsp. *faecalis* NCIB 8687), siendo dos de sus miembros aislados desde suelo o agua sin antecedentes reportados de contaminación xenobiótica. Finalmente, el grupo V consistió en una cepa única que

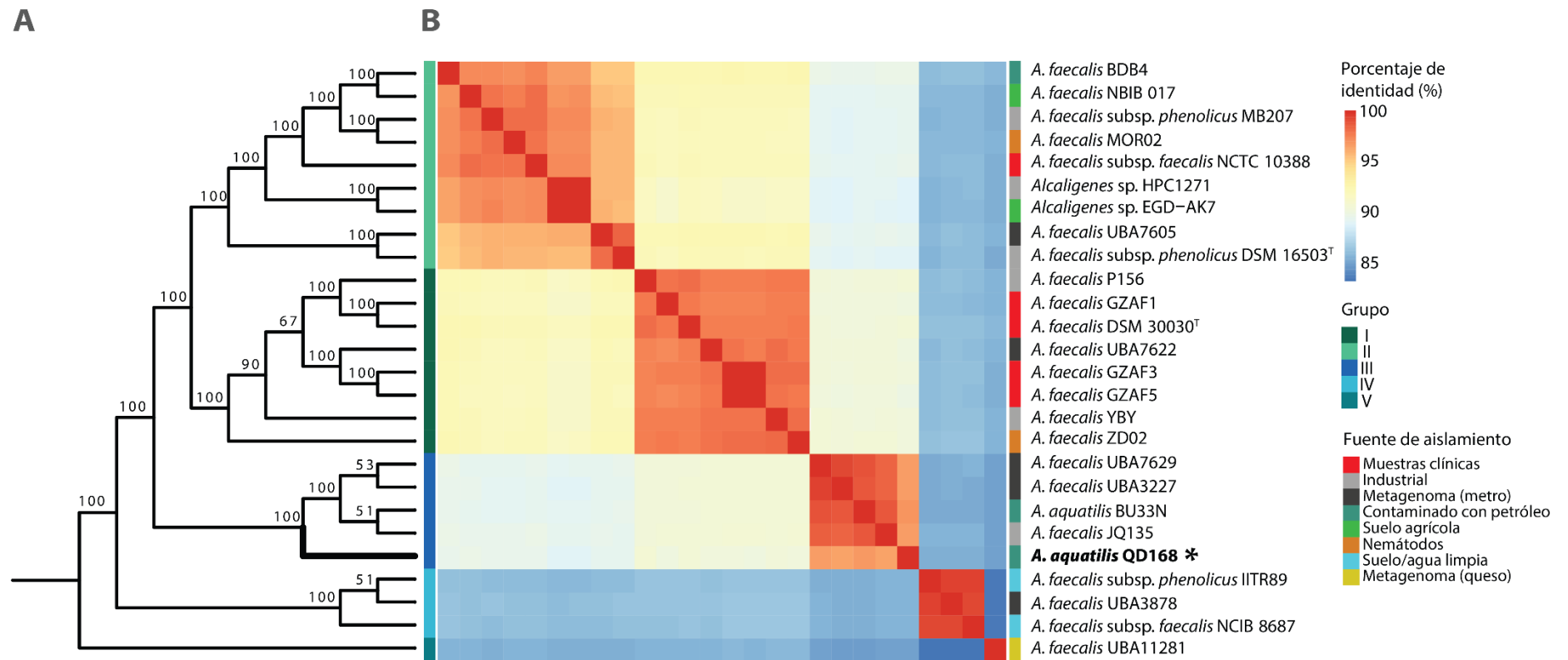


Figura 8. Análisis filogenómico de 26 cepas de *Alcaligenes* spp. (A) MLSA de 26 cepas de *Alcaligenes* spp. basado en 35 marcadores genéticos. Árbol filogenético: filogenia enraizada en un punto medio (mid-rooted phylogeny) muestra cinco clados distintivos. (B) Análisis de ANI de 26 cepas del género *Alcaligenes*. La primera columna indica un agrupamiento mayor al 95% de valor de ANI (mínimo de alineamiento de un 75%). La última columna representa la fuente de aislamiento. *A. aquatilis* QD168 es parte del grupo filogenómico III.

corresponde a *A. faecalis* UBA11281 (**Figura 8B**). El genoma de la cepa UBA11281 fue recuperado desde datos metagenómicos de una muestra de queso.

Los análisis filogenómicos realizados en esta Tesis permitieron clasificar a la cepa *A. aquatilis* QD168 dentro del grupo filogenómico III junto con las cepas BU33N, JQ135, UBA3227 y UBA7629.

3.1.4. Comparación de clusters de grupos ortólogos (COGs) entre *Alcaligenes* spp.

Se realizó una comparación general de COGs de cada proteoma deducido a partir de la secuencia genómica de las 26 cepas de *Alcaligenes* spp. Las funciones de 3.557 genes de *A. aquatilis* QD168 fueron anotadas basadas en categorías COGs (Marchler-Bauer *et al.*, 2003), correspondiendo al 91,4% de los CDS totales (**Figura 6**). Las tres categorías más abundantes de la cepa QD168 fueron: función desconocida (S; 23.67%), transcripción (K; 7.95%) y transporte y metabolismo de aminoácidos (E; 7.40%). La **Figura 9** ilustra la distribución de cada categoría COG del proteoma de nueve cepas del género *Alcaligenes* (Anexos, **Tabla 27**). Desde el círculo exterior al interior: *A. aquatilis* QD168; *A. aquatilis* BU33N; el genoma de referencia para la especie *A. faecalis*, *A. faecalis* ZD02; la cepa tipo de la especie *A. faecalis*, *A. faecalis* DSM 30030^T; la cepa tipo *A. faecalis* subsp. *phenolicus* DSM 16503^T; la cepa degradadora de ácido nicotínico *A. faecalis* JQ135; *A. faecalis* subsp. *phenolicus* MB207; el aislado clínico humano *A. faecalis* GZAF5 y la cepa degradadora de atrazina, *Alcaligenes* EGD-AK7. En general, la distribución de categorías COG en el género *Alcaligenes* es similar, obteniendo los porcentajes promedios más altos para las categorías: (S) función desconocida (21.6%), (K) transcripción (8.1%) y (E) transporte y metabolismo de aminoácidos (8.0%) (**Figura 9**, líneas punteadas). *A. aquatilis* QD168 obtuvo un porcentaje más alto de genes ortólogos comparado con el promedio de todos los genomas de las cepas *Alcaligenes* spp. analizadas en este estudio en las categorías: (S) función desconocida (S: 23.27%) en comparación al 21.6±1.20%; (U) tráfico intracelular, secreción y transporte vesicular (U: 2.68%) en comparación al 2.02±0.36% y la categoría (L) replicación, recombinación y reparación (L: 5.11%) en comparación al 3.62±0.47% (**Figura 9**).

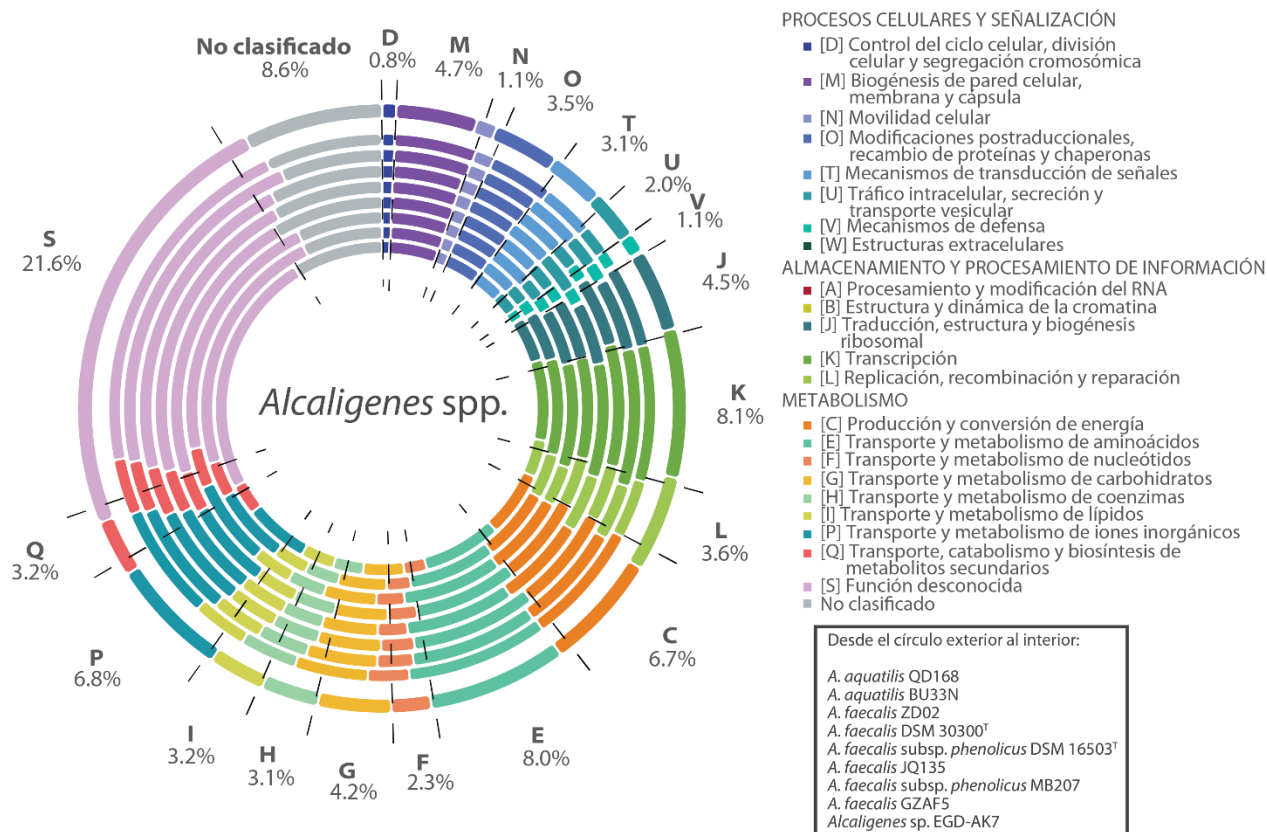


Figura 9. Comparación de Clusters de Grupos Ortólogos (COGs) de *A. aquatilis* QD168. Clasificación de COGs de nueve cepas de *Alcaligenes* spp. Por cada entrada de COG, el porcentaje promedio entre las 26 cepas de *Alcaligenes* spp. ha sido indicado con valores y líneas punteadas. Desde el círculo exterior al interior: *A. aquatilis* QD168, *A. aquatilis* BU33N, *A. faecalis* ZD02, *A. faecalis* DSM 30300, *A. faecalis* subsp. *phenolicus* DSM 16503, *A. faecalis* JQ135, *A. faecalis* subsp. *phenolicus* MB207, *A. faecalis* GZAF5, *Alcaligenes* sp. EGD-AK7.

3.1.5. Efecto de la salinidad en el crecimiento de *A. aquatilis* QD168

Experimentos previos realizados en nuestro laboratorio demostraron un crecimiento de la cepa QD168 en medio líquido LB modificando la concentración de NaCl desde 1% hasta 8% p/v en microplacas de 96 pocillos (datos no publicados). En esta tesis, se estudió el rango de crecimiento en medio sólido R2A a distintas concentraciones de NaCl (0, 2, 4, 6, 8 y 10% p/v) para determinar su rango de crecimiento. Se observó que la cepa QD168 toleró hasta 10% p/v de NaCl y posee un rango de crecimiento óptimo entre 0 y 4% p/v de NaCl (**Figura 10A**). Además, se evaluó el crecimiento de *A. aquatilis* QD168 en el rango de salinidad óptimo en medio líquido LB (modificando la concentración de NaCl desde 1 a 4% p/v). Se observó un mayor crecimiento entre las concentraciones 1 y 2 % de NaCl a las 21 h de crecimiento (**Figura 10B**).

3.1.6. Efecto de la temperatura en el crecimiento de *A. aquatilis* QD168

Se determinó el crecimiento a los 20, 30 y 40°C utilizando medio líquido LB a una concentración de NaCl 1,75% p/v. *A. aquatilis* QD168 presentó un crecimiento óptimo a los 30°C. A los 40°C se observó muerte celular de la cepa QD168 (Figura 10C).

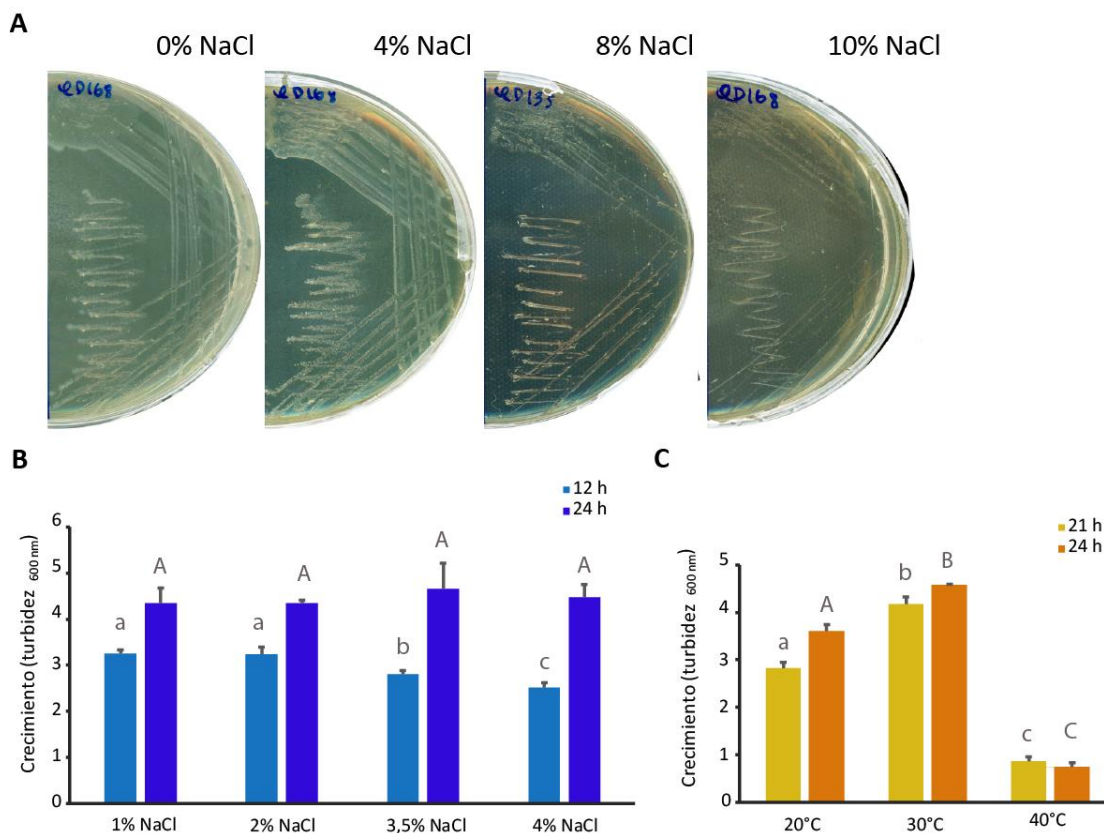


Figura 10. Efecto de la salinidad y la temperatura en el crecimiento de *A. aquatilis* QD168. La cepa QD168 se creció en medio LB modificado con diferentes concentraciones de NaCl (A y B) y a diferentes temperaturas en NaCl 1,75% p/v(C). Se muestran los tiempos 21 y 24 h de la curva de crecimiento. Las barras de error corresponden a la DE de triplicados independientes. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido del test de Fisher LSD para identificar diferencias entre las condiciones analizadas (* = $p < 0,05$).

3.1.7. Caracterización bioquímica de la bacteria *A. aquatilis* QD168

Para estudiar las capacidades metabólicas y bioquímicas de la cepa QD168 se realizó una prueba de índice de perfil analítico para bacterias Gram-negativas no *Enterobacteriaceae* (API 20NE). Este ensayo brinda información sobre las siguientes pruebas bioquímicas: reducción de nitratos (NO_3), formación de indol (TRP), fermentación de glucosa (GLU), actividad arginina dihidrolasa (ADH), ureasa (URE), β -glucosidasa (ESC), gelatinasa (GEL), β -galactosidasa (PNG), asimilación de glucosa (GLU), arabinosa (ARA), manosa (MNE), manitol (MAN), *N*-acetilglucosamina

(NAG), maltosa (MAL), gluconato (GNT), caprato (CAP), adipato (ADI), malato (MLT), citrato (CIT) y fenilacetato (PAC).

Tabla 5. Perfil bioquímico de *A. aquatilis* QD168 mediante API20NE y crecimiento en succinato, fructosa y glucosa como única fuente de carbono.

Pruebas bioquímicas	24 h	48 h	Pruebas bioquímicas	24 h	48 h
<u>Desnitrificación</u>			<u>Asimilación</u>		
Reducción de nitrato a nitrito (NO ₂)		±	<u>Carbohidratos y derivados</u>		
Reducción de nitrato a nitrógeno (N ₂)		+	Maltosa (MAL)	+	+
Formación de indol (TRP)		±	Glucosa (GLU)	-	-
Fermentación de glucosa (GLU)		-	Fructosa (FRU)	-	-
			Manosa (MNE)	+	+
			Gluconato (GNT)	±	±
<u>Actividad enzimática</u>					
Ureasa (URE)	-	-	Arabinosa (ARA)	+	+
Arginina dihidrolasa (ADH)	-	-	Manitol (MAN)	+	+
β-glicosidasa (ESC)	-	+	N-acetilglucosamina (NAG)	+	+
β-galactosidasa (PNG)	-	-	<u>Ácidos grasos</u>		
Gelatinasa (GEL)	-	-	Caprato (CAP)	-	±
<u>Asimilación</u>			Adipato (ADI)	+	+
<u>Ácidos orgánicos</u>			<u>Otros</u>		
Malato (MLT)	+	+	Fenilacetato (PAC)	+	+
Succinato (SUC)	+	+			
Citrato (CIT)	+	+			

Ensayo positivo +, Ensayo negativo -, según instrucciones del fabricante

Las pruebas bioquímicas de *A. aquatilis* QD168 fueron positivas para la reducción de nitratos, formación de indol, asimilación de glucosa, arabinosa, manosa, manitol, N-acetilglucosamina, maltosa, gluconato, adipato, malato, citrato y fenilacetato (24 h). A las 48 h, se observó actividad β-glicosidasa y asimilación de caprato (**Tabla 5**). Las primeras pruebas de este sistema comercial (Reducción de nitrato a nitrito (NO₂⁻), reducción de nitrato a nitrógeno (N₂), fermentación de indol y fermentación de glucosa) sólo son evaluados a las 24 h por indicaciones del fabricante. Esta prueba arrojó los códigos de identificación 3047763 a las 24 h y 3447773 a las 48 h. Al ingresar estos valores a la base de datos de API (APIweb, <https://apiweb.biomerieux.com>) la clasificación bioquímica mediante API 20NE entregó como resultado *Burkholderia gladioli*. Además, se analizó el crecimiento de la cepa *A. aquatilis* QD168 en medio mínimo M9 modificado con NaCl 1,75% p/v y utilizando succinato 2 mM, glucosa 1,33 mM y fructosa 1,33 mM como fuentes de

carbono. *A. aquatilis* QD168 presentó crecimiento en succinato, pero no en los monosacáridos fructosa y glucosa (Tabla 5).

3.2. Identificación de genes de rutas catabólicas de compuestos aromáticos en *A. aquatilis* QD168

A partir del genoma completo de *A. aquatilis* QD168 se realizó una caracterización de las rutas catabólicas de compuesto aromáticos. Con el objetivo de determinar el potencial catabólico de la cepa QD168 se identificaron los genes codificantes para hidroxilasas, monooxigenasas y dioxigenasas de compuestos aromáticos. Para la identificación de los genes en la cepa QD168, se realizó un análisis de similitud de secuencias utilizando como modelo las secuencias aminoacídicas de hidroxilasas, monooxigenasas y dioxigenasas con evidencia experimental desde la base de datos UniProtKB/SwissProt.

3.2.1. Análisis de las rutas centrales del catabolismo de compuestos aromáticos de *A. aquatilis* QD168

El análisis genómico de *A. aquatilis* QD168 basado en homología de secuencias, identificó en total 7 rutas centrales del catabolismo de compuestos aromáticos (Figura 11). Los genes de las 7 rutas centrales identificadas en esta Tesis (genes *cat*, *lig*, *mhp*, *paa*, *hmg*, *nic*, *sgs*) han sido descritas y caracterizadas en otras bacterias (Tabla 28). Se identificaron en *A. aquatilis* QD168 los genes ortólogos de los genes *cat* de cepas pertenecientes a los géneros *Acinetobacter* y *Pseudomonas* (Barbe, 2004; Jimenez *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 1998); los genes *lig* y *pca* de cepas pertenecientes a los géneros *Acidovorax*, *Comamonas*, *Escherichia*, *Pseudomonas* y *Sphingomonas* (Maruyama *et al.*, 2001; Noda *et al.*, 1990; Nogales *et al.*, 2011; Providenti *et al.*, 2001); los genes *mhp* de cepas pertenecientes a los géneros *Cupriavidus*, *Dechloromonas*, *Escherichia*, *Klebsiella* y *Pseudomonas* (Ferrández *et al.*, 1997; Pohlmann *et al.*, 2006; Salinero *et al.*, 2009); los genes *paa* de la bacteria *E. coli* K-12 (Ferrández *et al.*, 1998); los genes *hmg* de cepas pertenecientes a los géneros *Bordetella* y *Pseudomonas* (Sebahia *et al.*, 2006; Stover *et al.*, 2000); los genes *nic* de la bacteria *P. putida* KT2440 (Jimenez *et al.*, 2002) y los genes *sgd/nag* de las bacterias *Ralstonia* sp., *Streptomyces* sp. y *Vibrio cholerae* N16961 (Heidelberg *et al.*, 2000; Ishiyama *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2001). En general, los genes identificados en *A. aquatilis* QD168 de las rutas centrales del catabolismo de compuestos aromáticos se presentaron como una copia única de cada gen.

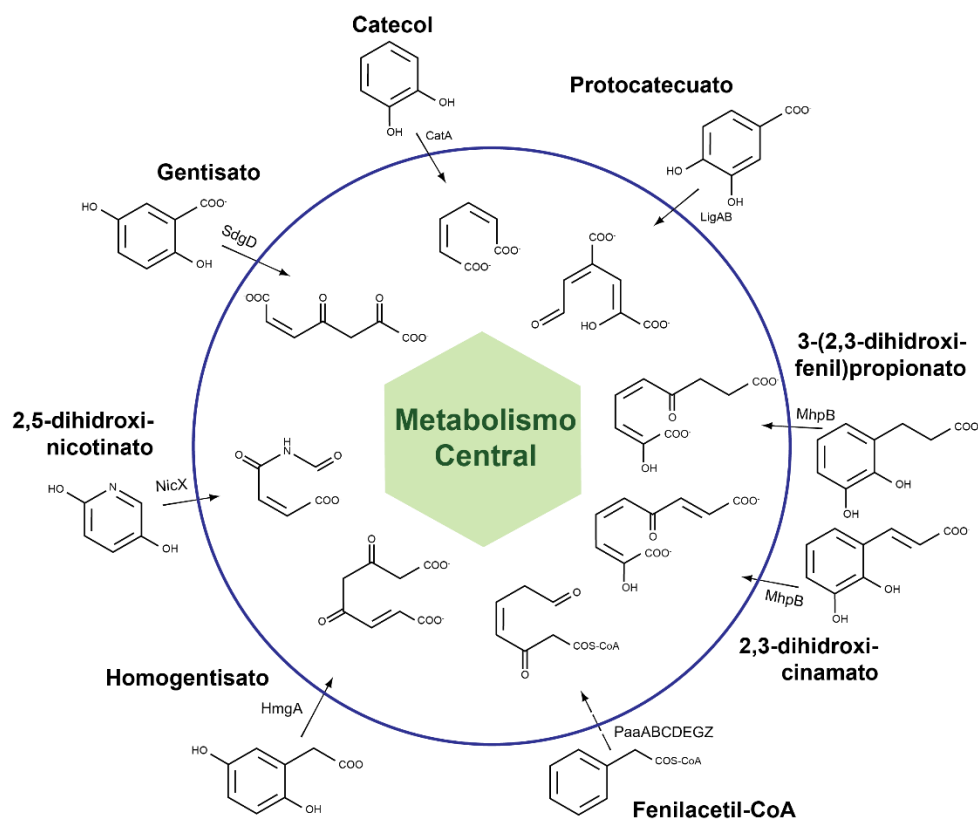


Figura 11. Representación de rutas centrales del catabolismo aerobio de compuestos aromáticos en la bacteria marina *A. aquatilis* QD168. El círculo interior (azul) incluye productos de la apertura del anillo aromático de cada ruta catabólica central de compuestos aromáticos periféricos.

Ruta central del β -cetoadipato: rama del catecol

La ruta central del β -cetoadipato se compone de dos rutas que convergen en el metabolito intermediario β -cetoadipato. La apertura del anillo aromático del catecol (1,2-dihidroxibenceno) en posición *orto* por la enzima catecol 1,2-dioxigenasa, y la apertura del anillo aromático de protocatecuato (3,4-dihidroxibenzoato) en posición *orto* por la enzima protocatecuato 3,4-dioxigenasa. Ambas reacciones convergen en la síntesis de β -cetoadipato enol-lactona como intermediario metabólico, para luego continuar una ruta catabólica común. En la cepa QD168 se encontró sólo la rama del catecol, sin presencia de la rama del protocatecuato (genes *pcaHGBC*). Los genes *cat* identificados en la cepa QD168 se encontraron organizados en una única agrupación génica (*catRBAIJDC*, **Figura 12**).

Esta agrupación codifica todos los pasos enzimáticos desde la apertura del anillo aromático de catecol hasta β -cetoadipato enol-lactona (*catABC*). Este intermediario es metabolizado hasta succinato y acetil-CoA (*catIJD*) convergiendo en el ciclo de Krebs. Se identificó un gen (*catR*) que codifica el regulador transcripcional CatR,

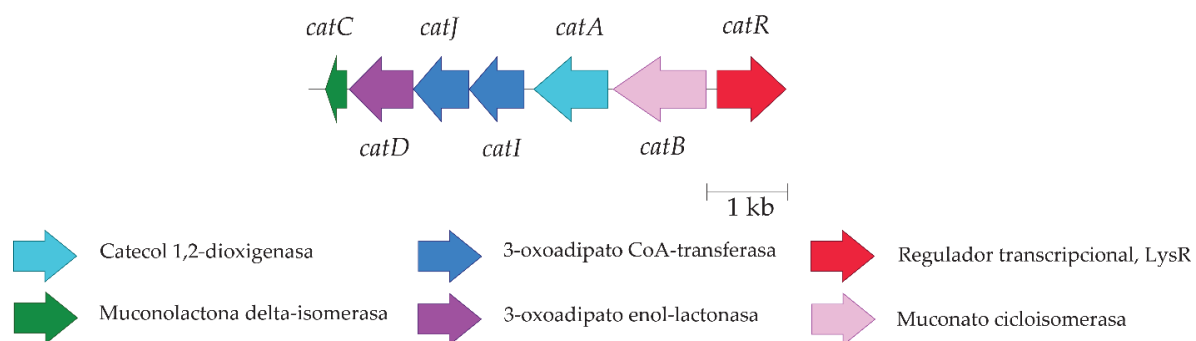


Figura 12. Organización de los genes *cat* que codifican la ruta catabólica central del catecol en *A. aquatilis* QD168. La orientación de los marcos de lectura (ORFs) están representados con flechas. Las regiones codificantes e intergénicas están a escala.

miembro de la familia LysR. En la **Tabla 6** se presentan los resultados de la búsqueda *in silico* de los genes *cat*. La mayoría de los productos génicos de esta agrupación presentó una alta identidad con *Acinetobacter iwoffii* K24 (> 60%; Kim *et al.*, 1998) y con *Acinetobacter* sp. ADP-1 (> 53%; Barbe, 2004).

Tabla 6. Ruta central del catecol de *A. aquatilis* QD168

Gen	ORF	CDS	Función	Organismo (identidad % /similitud %)	Nº de acceso
<i>catR</i>	D3M96_09450	CatR	Regulador transcripcional, (Familia LysR)	<i>A. iwoffii</i> K24 (60/79)	O33945.1
<i>catB</i>	D3M96_09455	CatB	Muconato cicloisomerasa	<i>A. iwoffii</i> K24 (64/78)	O33946.1
<i>catA</i>	D3M96_09460	CatA	Catecol 1,2-dioxigenasa	<i>Acinetobacter baylyi</i> ADP1 (73/85)	P07773.1
<i>catI</i>	D3M96_09465	CatI	3-Oxoadipato CoA-transferasa subunidad A	<i>P. putida</i> (71/86)	Q01103.2
<i>catJ</i>	D3M96_09470	CatJ	3-Oxoadipato CoA-transferasa subunidad B	<i>P. putida</i> KT2440 (68/81)	P0A101.2
<i>catD</i>	D3M96_09475	CatD	3-Oxoadipato enol-lactonasa	<i>A. baylyi</i> ADP1 (53/67)	P00632.3
<i>catC</i>	D3M96_09480	CatC	Muconolactona delta-isomerasa	<i>A. iwoffii</i> K24 (69/81)	O33947.1

Ruta central del protocatecuato

La apertura del anillo aromático de protocatecuato en posición *meta* es otra ruta de degradación de este compuesto, convergiendo las rutas de degradación de los compuestos *p*-cresol, *p*-hidroxibenzoato y 4-dicarboxifenil éter. Los genes que codifican el catabolismo de protocatecuato en *A. aquatilis* QD168 se encontraron agrupados los genes *lig* (*ligCBAIKJ*), el gen *galD* que codifica una 4-oxalomesaconato tautomerasa, los genes *pca* (*pcaKQ*) y genes de algunas rutas de degradación periféricas que convergen en este compuesto (**Figura 13**).

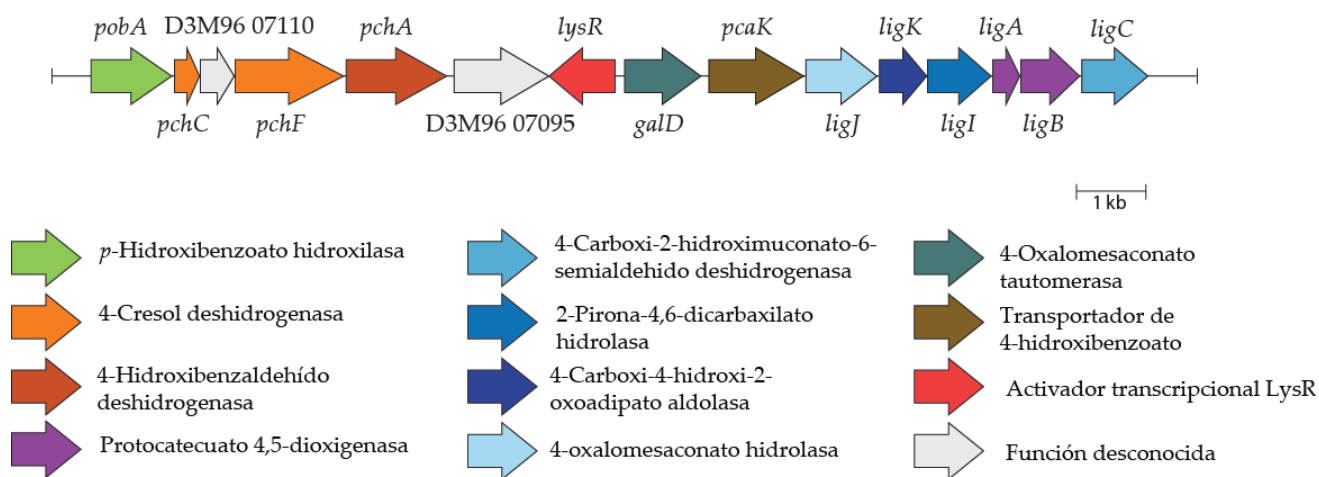


Figura 13. Organización de los genes *lig* que codifican la ruta catabólica central del protocatecuato en *A. aquatilis* QD168. La orientación de los marcos de lectura (ORFs) están representados con flechas. Las regiones codificantes e intergénicas están a escala.

Los productos génicos de los genes *ligCBA* identificados en *A. aquatilis* QD168 poseen una alta identidad (> 58%; Noda *et al.*, 1990) con las proteínas correspondientes a *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6 (Tabla 7). Las proteínas codificadas por los genes *ligIKJ* poseen una alta identidad con proteínas descritas en las cepas *Comamonas* sp. E6 (75%; Providenti *et al.*, 2001), *Pseudomonas straminea* (92%; Maruyama *et al.*, 2001) y *Acidovorax* sp. T1 (94%), respectivamente. El transportador de 4-hidroxibenzoato, PcaK posee una alta identidad con la proteína descrita en la cepa de *P. putida* KT2240 (49%; Nogales *et al.*, 2011) (Tabla 7).

Tabla 7. Ruta central del protocatecuato de *A. aquatilis* QD168

Gen	ORF	CDS	Función	Organismo (identidad %/ similitud %)	Nº de acceso
<i>ligC</i>	D3M96_07050	LigC	4-Carboxi-2-hidroxi-6-semialdehído deshidrogenasa	<i>S. paucimobilis</i> SYK6 (73/82)	Q9KWL3.1
<i>ligB</i>	D3M96_07055	LigB	Protocatecuato 4,5-dioxigenasa subunidad beta	<i>S. paucimobilis</i> SYK6 (58/78)	P22636.1
<i>ligA</i>	D3M96_07060	LigA	Protocatecuato 4,5-dioxigenasa subunidad alfa	<i>S. paucimobilis</i> SYK6 (61/79)	P22635.1
<i>ligI</i>	D3M96_07065	LigI	2-Pirona-4,6-dicarboxilato hidrolasa	<i>Comamonas</i> sp. E6 (75/87)	Q93PS7.1
<i>ligK</i>	D3M96_07070	LigK	4-Carboxi-4-hidroxi-2-oxoadipato aldolasa	<i>P. straminea</i> (92/95)	Q9AQI0.1
<i>ligJ</i>	D3M96_07075	LigJ	4-Oxalomesaconato hidrolasa	<i>Acidovorax</i> sp. T1 (94/97)	WP_08774320
<i>pcaK</i>	D3M96_07080	PcaK	4-Hidroxibenzoato transportador	<i>P. putida</i> KT2440 (49/67)	Q51955.1
<i>galD</i>	D3M96_07085	GalD	4-Oxalomesaconato tautomerasa	<i>P. putida</i> KT2440 (49/64)	Q88JY0.1
<i>pcaQ</i>	D3M96_07090	LysR	Regulador transcripcional (Familia LysR)	<i>E. coli</i> K-12 (35/57)	Q47005.1

Ruta central del 3-(2,3-dihidroxifenil)-propionato y 2,3-dihidroxicinamato

En *A. aquatilis* QD168 los genes de la agrupación génica *mhpBCDFE* codifican las enzimas involucradas en la degradación de los intermediarios dihidroxilados de los compuestos 3-fenilpropionato y cinamato (**Figura 14**). Los genes que codifican el catabolismo de estos intermediarios se encuentran organizados en una agrupación génica junto a una ruta periférica (genes *hca*). Se identificó el gen *mhpT*, que codifica el transportador de 3-hidroxifenil-propionato (D3M96_14825; **Tabla 8**) de la superfamilia de facilitadores principales (Xu *et al.*, 2013). Río abajo de la agrupación *mhp* se encuentran en la misma dirección de transcripción dos proteínas sin función identificada.

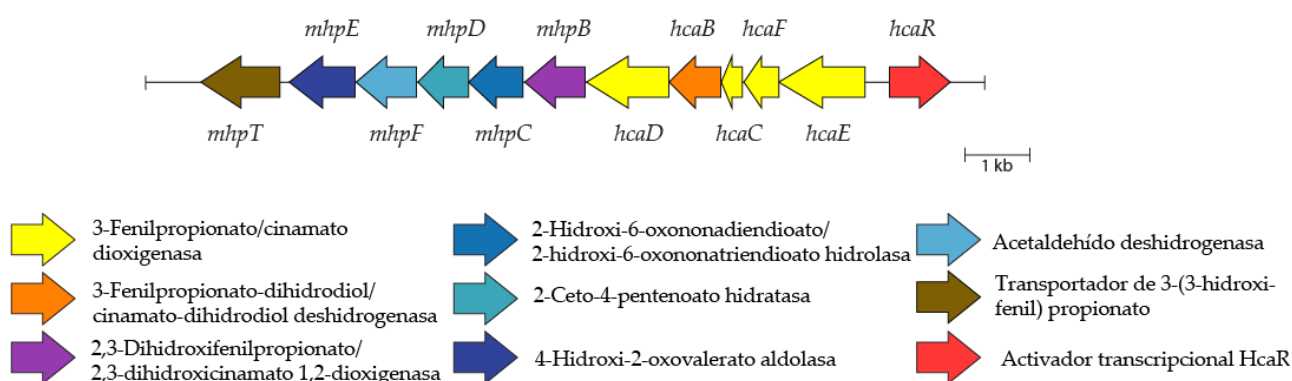


Figura 14. Organización de los genes *hca* y *mhp* que codifican las rutas catabólicas periféricas y centrales del 3-fenilpropionato y del cinamato en *A. aquatilis* QD168. La orientación de los marcos de lectura (ORFs) están representados con flechas. Las regiones codificantes e intergénicas están a escala.

Tabla 8. Ruta central del 3-(2,3-dihidroxifenil)-propionato/2,3-dihidroxicinamato de *A. aquatilis* QD168

Gen	ORF	CDS	Función	Organismo (identidad %/ similitud %)	N° de acceso
<i>mhpB</i>	D3M96_14800	MhpB	2,3-Dihidroxifenilpropionato/2,3-dihidroxicinamato 1,2-dioxigenasa	<i>P. putida</i> (59/74)	Q9F9U5.1
<i>mhpC</i>	D3M96_14805	MhpC	2-Hidroxi-6-oxononadiendioato/2-hidroxi-6-oxononatriendioato hidrolasa	<i>K. pneumoniae</i> MGH 78578 (76/87)	A6TAC7.1
<i>mhpD</i>	D3M96_14810	MhpD	2-Ceto-4-pentenoato hidratasa	<i>P. putida</i> (69/81)	Q49KF9.1
<i>mhpF</i>	D3M96_14815	MhpF	Acetaldehido deshidrogenasa	<i>C. necator</i> H16 (78/88)	Q0K3S6.1
<i>mhpE</i>	D3M96_14820	MhpE	4-Hidroxi-2-oxoalderato aldolasa	<i>D. aromatica</i> RCB (90/96)	Q47B13.1
<i>mhpT</i>	D3M96_14825	MhpT	3-(3-Hidroxifenil) propionato transportador	<i>E. coli</i> K-12 (44/64)	P77589.2

Ruta central del fenilacetil-CoA

El catabolismo del fenilacetato converge en la síntesis del compuesto intermediario fenilacetil-CoA, ruta central codificada por los genes *paa*. En *A. aquatilis* QD68 los genes de la ruta central del fenilacetil-CoA se encuentran organizados como una sola agrupación génica (*paaABCDEZGI*) junto a la ruta de degradación de fenilacetato. Los genes *paa* identificados en la cepa QD168 pertenecientes a la ruta central son ortólogos a los genes descritos en *E. coli* K-12 (Tabla 9; Ferrández *et al.*, 1998).

Tabla 9. Ruta central del fenilacetil-CoA de *A. aquatilis* QD168

Gen	ORF	CDS	Función	Organismo (identidad % /similitud %)	Nº de acceso
<i>paaA</i>	D3M96_12710	PaaA	1,2-Fenilacetil-CoA epoxidasa, subunidad A	<i>E. coli</i> K-12 (68/82)	P76077.1
<i>paaB</i>	D3M96_12705	PaaB	1,2-Fenilacetil-CoA epoxidasa, subunidad B	<i>E. coli</i> K-12 (63/80)	P76078.1
<i>paaC</i>	D3M96_12700	PaaC	1,2-Fenilacetil-CoA epoxidasa, subunidad C	<i>E. coli</i> K-12 (48/63)	P76079.1
<i>paaD</i>	D3M96_12695	PaaD	1,2-Fenilacetil-CoA epoxidasa, subunidad D	<i>E. coli</i> K-12 (49/65)	P76080.2
<i>paaE</i>	D3M96_12690	PaaE	1,2-Fenilacetil-CoA epoxidasa, subunidad E	<i>E. coli</i> K-12 (46/64)	P76081.1
<i>paaZ</i>	D3M96_12685	PaaZ	Oxepina-CoA hidrolasa	<i>E. coli</i> K-12 (27/45)	P77455.1
<i>paaG</i>	D3M96_12680	PaaG	1,2-Epoxifenilacetil-CoA isomerasa	<i>E. coli</i> K-12 (58/73)	P77467.1
<i>paaI</i>	D3M96_12675	PaaI	Acil-coenzima A tioesterasa	<i>E. coli</i> K-12 (53/70)	P76084.1

Ruta central del homogentisato

Los genes *hmg* codifican la ruta central de degradación de homogentisato (2,5-dihidroxifenilacetato), a la que se asocian las rutas periféricas de degradación de tirosina, fenilpiruvato y 4-hidroxifenilpiruvato. En el genoma de *A. aquatilis* QD168, los genes *hmg* se encontraron distribuidos como *hmgC* (D3M96_13400) y *hmgAB* (D3M96_03780, D3M96_03775). Las enzimas codificadas por los genes *hmgAB* poseen una alta identidad con las descritas en el género *Bordetella* (65%; Sebahia *et al.*, 2006), mientras que la proteína HmgC posee 47% de identidad con su ortólogo en *P. aeruginosa* PAO1 (Tabla 10; Stover *et al.*, 2000).

Tabla 10. Ruta central del homogentisato de *A. aquatilis* QD168

Gen	ORF	CDS	Función	Organismo (identidad % /similitud %)	Nº de acceso
<i>hmgC</i>	D3M96_13400	HmgC	Maleilacetoacetato isomerasa	<i>P. aeruginosa</i> PAO1 (47/64)	P57109.1
<i>hmgA</i>	D3M96_03780	HmgA	Homogentisato 1,2-dioxigenasa	<i>B. avium</i> 197N (77/84)	Q2KYC8.1
<i>hmgB</i>	D3M96_03775	HmgB	Fumarilacetoacetasa	<i>B. pertussis</i> Tohama I (65/78)	Q7VUG1

Ruta central del 2,5-dihidroxicinonato

La ruta de degradación del nicotinato converge en el intermediario central 2,5-dihidroxicinonato *P. putida* KT2240 (Jimenez *et al.*, 2002). Los genes *nic* codifican la ruta central y periférica de este compuesto, catalizando la apertura del anillo aromático y produciendo *N*-formil maleamato. En *A. aquatilis* QD168 los genes *nicDXF*, que codifican las enzimas responsables de la conversión de 2,5-dihidroxicinonato a maleato, se encontraron en dos copias localizadas a 50 kb de distancia. Se identificó el gen *nicE* (D3M96_17640), que codifica una maleato isomerasa involucrada en el último paso de la degradación de 2,5-dihidroxicinonato. Los genes identificados como *nicD2X2F2*, se encontraron en el vecindario de la ruta periférica de nicotinato.

En la **Tabla 11** se presentan los genes de la ruta central de 2,5-dihidroxicinonato. Las enzimas codificadas por los genes *nic* encontrados en *A. aquatilis* QD168 presentan alta identidad con las proteínas de *P. putida* KT2240 (> 43%; Jimenez *et al.*, 2002)

Tabla 11. Ruta central del 2,5-dihidroxicinonato de *A. aquatilis* QD168

Gen	ORF	CDS	Función	Organismo (identidad %/similitud %)	N° de acceso
<i>nicE</i>	D3M96_17640	NicE	Maleato isomerasa	<i>A. faecalis</i> (98/98)	O24766.1
<i>nicD</i>	D3M96_16080	NicD	<i>N</i> -formilmaleamato deformilasa	<i>P. putida</i> KT2440 (59/73)	Q88FY3.1
<i>nicX</i>	D3M96_16075	NicX	2,5-Dihidroxicinonato 5,6-dioxigenasa	<i>P. putida</i> KT2440 (55/70)	Q88FY1.1
<i>nicF</i>	D3M96_16070	NicF	Maleamato amidohidrolasa	<i>P. putida</i> KT2440 (43/56)	Q88FY5.1
<i>nicD2</i>	D3M96_15900	NicD2	<i>N</i> -formilmaleamato deformilasa	<i>P. putida</i> KT2440 (60/73)	Q88FY3.1
<i>nicX2</i>	D3M96_15895	NicX2	2,5-dihidroxicinonato 5,6-dioxigenasa	<i>P. putida</i> KT2440 (55/70)	Q88FY1.1
<i>nicF2</i>	D3M96_15890	NicF2	Maleamato amidohidrolasa	<i>P. putida</i> KT2440 (43/53)	Q88FY5.1

Ruta central del gentisato

La ruta periférica del salicilil-CoA y del salicilato (2-hidroxicinonato) convergen en la formación de gentisato (2,5-dihidroxicinonato), para luego continuar con la apertura del anillo aromático mediante la enzima gentisato 1,2-dioxigenasa. En la cepa QD168 se identificó el gen *sdgD* que codifica una gentisato 1,2-dioxigenasa y los genes *nagLK* que codifican los pasos enzimáticos para formar piruvato y maleato. Los genes se encontraron distribuidos en el cromosoma de *A. aquatilis* QD168. Los productos génicos de la ruta del gentisato en la cepa QD168 poseen una

moderada identidad (> 37%, **Tabla 12**) con bacterias de los géneros *Ralstonia*, *Streptomyces* y *Vibrio* (Heidelberg *et al.*, 2000; Ishiyama *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2001).

Tabla 12. Ruta central del gentisato de *A. aquatilis* QD168

Gen	ORF	CDS	Función	Organismo (identidad %/similitud %)	Nº de acceso
<i>sdgD</i>	D3M96_00260	SdgD	Gentisato 1,2-dioxigenasa	<i>Streptomyces</i> sp. (37/51)	Q7X284.1
<i>nagL</i>	D3M96_13400	NagL1	Maleilpiruvato isomerasa	<i>V. cholerae</i> N16961 (46/69)	Q9KSB2.1
<i>nagK</i>	D3M96_11765	NagK	Fumarilpiruvato hidrolasa	<i>Ralstonia</i> sp. (42/64)	O86042.1

3.2.2. Análisis de las rutas periféricas del catabolismo de compuestos aromáticos de *A. aquatilis* QD168

El análisis genómico del catabolismo de compuestos aromáticos en *A. aquatilis* QD168 basado en homología de secuencias permitió identificar un total de 16 rutas y reacciones periféricas del catabolismo de compuestos aromáticos (**Figura 15**). Los genes de las 16 rutas y reacciones periféricas identificadas en esta Tesis han sido descritas y caracterizadas en otras bacterias. Se identificaron en *A. aquatilis* QD168 los genes ortólogos de los genes *ben* de cepas pertenecientes a los géneros *Acinetobacter* y *Pseudomonas* (Barbe, 2004); los genes *dmp* de cepas pertenecientes a los géneros *Acinetobacter* y *Pseudomonas* (Nordlund *et al.*, 1990; Xu *et al.*, 2003); los genes *and* de cepas pertenecientes al género *Burkholderia* (Chang *et al.*, 2003); los genes *kyn* de cepas pertenecientes a los géneros *Deinococcus*, *Polaromonas*, *Pseudomonas* y *Salinibacter* (Momany *et al.*, 2004; Mongodin *et al.*, 2005; White *et al.*, 1999; Yagi *et al.*, 2009); los genes *pch* de la bacteria *P. putida* NCIMB 9869 (Cronin *et al.*, 1999); el gen *phbA* de la bacteria *P. aeruginosa* PAO1 (Entsch *et al.*, 1988); los genes *pob* de la bacteria *P. pseudoalcaligenes* POB310 (Dehmel *et al.*, 1995); los genes *hca* de cepas pertenecientes a los géneros *Photorhabdus* y *Escherichia* (Díaz *et al.*, 1998; Duchaud *et al.*, 2003; Hayashi *et al.*, 2001; Touchon *et al.*, 2009); los genes *sty* de cepas pertenecientes al género *Pseudomonas* (Beltrametti *et al.*, 1997); el gen *paaK* de la bacteria *Azoarcus evansii* KB740 (Rost *et al.*, 2002); los genes *tyr* de las cepas pertenecientes a los géneros *Escherichia* y *Pseudomonas* (Kuramitsu *et al.*, 1985; Stover *et al.*, 2000); el gen *hpd* de la bacteria *Pseudomonas* sp. J.P (Rüetschi *et al.*, 1992); los genes *nic* de la bacteria *P. putida* KT2240 (Jimenez *et al.*, 2002) y el gen *sgdC* de la bacteria *Streptomyces* sp. WA46 (Ishiyama *et al.*, 2004) (**Tabla 29**). De la misma manera en que lo observado en la identificación de rutas centrales, la

mayoría de los genes identificados en *A. aquatilis* QD168 asociados a las rutas y reacciones periféricas del catabolismo de compuestos aromáticos se presentaron como una copia única de cada gen.

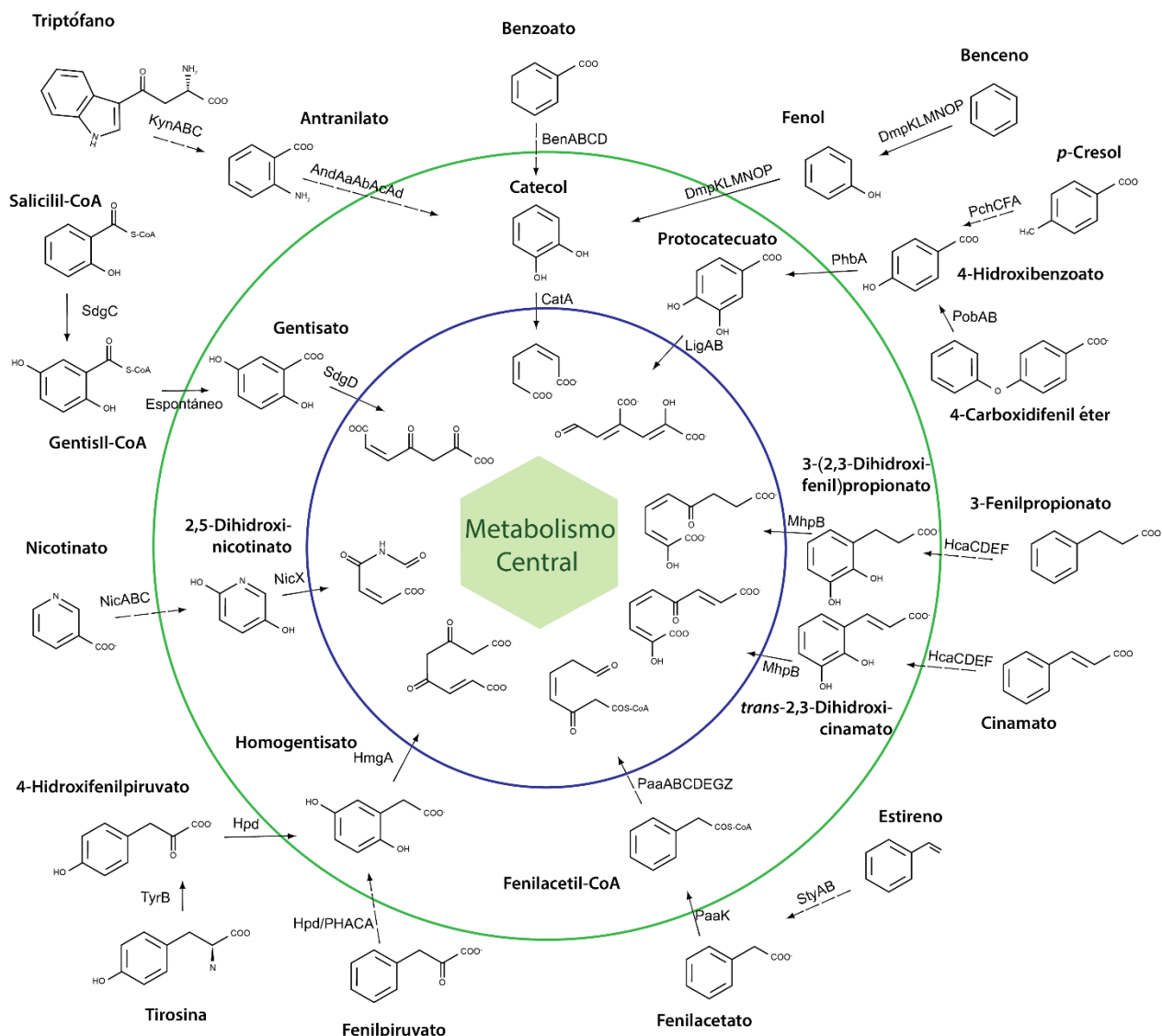


Figura 15. Representación de rutas periféricas y centrales para el catabolismo aerobio de compuesto aromáticos en *A. aquatilis* QD168. El círculo interior (azul) incluye productos de la apertura del anillo aromático de cada ruta catabólica central de compuestos aromáticos. El círculo exterior (verde) incluye la estructura de compuestos aril-CoA e intermediarios dihidroxilados.

Rutas periféricas que convergen en la ruta central del β-cetoacido: rama del catecol

El compuesto benzoato es un compuesto aromático ubicuo que converge en la degradación de catecol. En la cepa QD168 se identificaron los genes *ben* (*benMABCDE*) en una agrupación génica cercana a la ruta periférica de fenol (Figura 16). Los genes *benABC* codifican la enzima multicomponente

benceno 1,2-dioxigenasa y el gen *benD* que codifica una *cis*-diol deshidrogenasa. Se identificó el gen *benM* (D3M96_09775) que codifica el regulador transcripcional de la familia LysR, y gen *benE* (D3M96_09800) que codifica el transportador de benzoato en *Acinetobacter baylyi* ADP-1.

En *A. aquatilis* QD168 se identificaron los genes *dmp* (*dmpRKLMNOP*), que codifican la enzima multicomponente fenol hidroxilasa. Éstos se encuentran en el vecindario de la ruta periférica de benzoato (**Figura 16**). Entre ambas rutas periféricas se encuentran dos secuencias codificantes, una codifica la subunidad α de la benceno 1,2-dioxigenasa (**Figura 16**). Los productos génicos de los genes *dmp* presentan alta identidad con los enzimas descritas en las bacterias *Acinetobacter pittii* PHEA-2 (> 60%; Xu *et al.*, 2003) y *Pseudomonas* sp. CF600 (> 40%; Nordlund *et al.*, 1990) (**Tabla 13**).

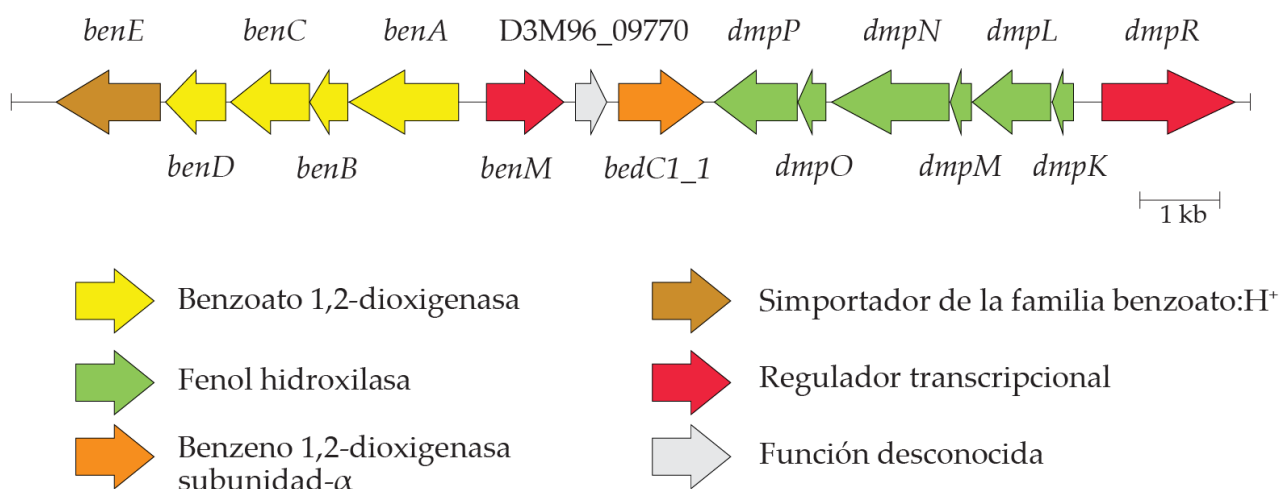


Figura 16. Organización de los genes *ben* y *dmp* que codifican las rutas catabólicas periféricas del benzoato y del fenol en *A. aquatilis* QD168. La orientación de los marcos de lectura (ORFs) están representados con flechas. Las regiones codificantes e intergénicas están a escala.

La ruta de degradación del aminoácido triptófano se encuentra codificada por los genes *kyn*. La degradación de triptófano mediante esta ruta converge en el compuesto aromático antranilato. En *A. aquatilis* QD168 se identificó una copia del gen *kynA*, que codifica una triptófano 2,3-dioxigenasa, una copia del gen *kynB*, que codifica una quinurenina formamidasa, y dos copias de los genes *kynU*, que codifican una quinureninasa. Los genes *kyn* de la cepa QD168 están distribuidos en el genoma (**Tabla 13**).

Los genes *and* codifican la ruta periférica de antranilato (2-aminobenzoato) en la cepa QD168. Se identificaron los genes *andAaAbAcAd* que codifican la enzima antranilato 1,2-dioxigenasa. Los productos génicos de los genes *and* de la cepa

QD168 presentan moderada identidad con las enzimas de *B. cepacia* BD01 (> 33%; Chang *et al.*, 2003).

Tabla 13. Rutas periféricas de la ruta del catecol de *A. aquatilis* QD168

Rutas Periféricas	Gen	ORF	Función	Organismo (identidad % /similitud %)	N° de acceso
Benzoato	<i>benE</i>	D3M96_09800	Benzoato transportador	<i>A. baylyi</i> ADP1 (46/68)	O30513.2
	<i>benD</i>	D3M96_09795	1,2-dihidroxi-3,4-ciclohexadieno-1-carboxilato deshidrogenasa	<i>P. putida</i> (66/76)	P23102.1
	<i>benC</i>	D3M96_09790	Benzoato 1,2-dioxigenasa oxidoreductasa	<i>A. baylyi</i> ADP1 (51/67)	P07771.2
	<i>benB</i>	D3M96_09785	Benzoato 1,2-dioxigenasa subunidad beta	<i>A. baylyi</i> ADP1 (58/73)	P07770.1
	<i>benA</i>	D3M96_09780	Benzoato 1,2-dioxigenasa subunidad alfa	<i>A. baylyi</i> ADP1 (63/77)	P07769.2
	<i>benM</i>	D3M96_09775	Regulador transcripcional, Familia LysR	<i>A. baylyi</i> ADP1 (41/64)	O68014.2
Fenol/ Benceno	<i>dmpP</i>	D3M96_09760	Fenol hidroxilasa proteína P5	<i>A. pittii</i> PHEA-2 (73/84)	Q7WTJ2.3
	<i>dmpO</i>	D3M96_09755	Fenol hidroxilasa proteína P4	<i>Pseudomonas</i> sp. CF600 (40/61)	P19733.1
	<i>dmpN</i>	D3M96_09750	Fenol hidroxilasa proteína P3	<i>Pseudomonas</i> sp. CF600 (72/83)	P19732.1
	<i>dmpM</i>	D3M96_09745	Fenol hidroxilasa proteína P2	<i>Pseudomonas</i> sp. CF600 (59/76)	P19731.1
	<i>dmpL</i>	D3M96_09740	Fenol hidroxilasa proteína P1	<i>A. pittii</i> PHEA-2 (60/75)	Q7WTJ6.3
	<i>dmpK</i>	D3M96_09735	Fenol hidroxilasa proteína P0	<i>Pseudomonas</i> sp. CF600 (53/66)	P19729.1
	<i>dmpR</i>	D3M96_09730	Regulador transcripcional (Fenol)	<i>A. guillouiae</i> NCIB 8250 (56/72)	Q43965.1
Antranilato	<i>andAd</i>	D3M96_16060	Antranilato 1,2-dioxigenasa subunidad menor	<i>B. cepacia</i> BD01 (35/57)	Q84BZ2.1
	<i>andAc</i>	D3M96_16055	Antranilato 1,2-dioxigenasa subunidad mayor	<i>B. cepacia</i> BD01 (42/63)	Q84BZ3.1
	<i>andAb</i>	D3M96_16050	Antranilato 1,2-dioxigenasa componente reductasa	<i>B. cepacia</i> BD01 (33/49)	Q84BZ0.1
	<i>andAa</i>	D3M96_16045	Antranilato 1,2-dioxigenasa subunidad ferredoxina	<i>B. cepacia</i> BD01 (58/72)	Q84BZ1.1
Triptófano	<i>kynA</i>	D3M96_18575	Triptófano 2,3-dioxigenasa	<i>P. naphthalenivorans</i> CJ2 (81/88)	A1VRP1.1
	<i>kynB</i>	D3M96_00275	Quinurenina formamidasa	<i>S. ruber</i> DSM 13855 (25/37)	Q2S2F5.1
	<i>kynU1</i>	D3M96_08330	Quinureninasa	<i>D. radiodurans</i> R1 (31/47)	Q9RYH5.2
	<i>kynU2</i>	D3M96_02255	Quinureninasa	<i>P. fluorescens</i> (57/71)	P83788.1

Rutas y reacciones periféricas que convergen en la ruta central del protocatecuato

La ruta de degradación del compuesto *p*-cresol (4-metilfenol) es catalizada por la enzima 4-cresol deshidrogenasa, que es codificada por los genes *pchCF*. La degradación de *p*-cresol por esta ruta converge en el compuesto aromático

4-hidroxibenzoato. En la cepa QD168 se identificaron los genes *pchCFA*. Las proteínas PchC, PchF y PchA poseen moderada identidad con las proteínas de la bacteria *Pseudomonas putida* NCIMB 9869 (> 44%; Cronin *et al.*, 1999).

La degradación del compuesto aromático 4-hidroxibenzoato es catalizada por la *p*-hidroxibenzoato hidroxilasa, la cual monooxigena en posición *meta* para producir el intermediario central protocatecuato. En la cepa QD168 se identificó el gen *phbA* que codifica la enzima *p*-hidroxibenzoato hidroxilasa y presentó > 65% de identidad con la enzima de *P. aeruginosa* PAO1 (Entsch *et al.*, 1988; **Tabla 14**).

Los genes *pchAFC* y el gen *phbA* se encontraron organizados en una gran agrupación génica junto a la ruta central de protocatecuato (**Figura 13**). Río abajo de esta agrupación génica se encontró un conjunto de proteínas sin función identificada y secuencias que codifican los ARNt asparagina (ARNt^{Asn}) y treonina (ARNt^{Thr}). Río arriba se localizan genes que codifican una glicolato oxidasa (*glcCDEF*), otras proteínas sin función identificada, una agrupación de ARNr y los ARNt de alanina (ARNt^{Ala}) e isoleucina (ARNt^{Ile}).

En el cromosoma de *A. aquatilis* QD168 se identificaron los genes *pobAB* que codifican proteínas responsables de la degradación del compuesto aromático 4-carboxidifenil éter. Estos genes se encontraron en tándem y son homólogos a los genes que codifican la enzima fenoxibenzoato dioxigenasa de *P. pseudoalcaligenes* POB310 (> 30%; Dehmel *et al.*, 1995).

Tabla 14. Rutas/reacciones periféricas de la ruta del protocatecuato de *A. aquatilis* QD168

Rutas/Reacciones Periféricas	Gen	ORF	Función	Organismo (identidad %/similitud %)	Nº de acceso
4-Hidroxibenzoato	<i>phbA</i>	D3M96_07120	4-Hidroxibenzoato hidroxilasa	<i>P. aeruginosa</i> PAO1 (65/76)	P20586.1
4-cresol	<i>pchC</i>	D3M96_07105	4-cresol deshidrogenasa subunidad citocromo c	<i>P. putida</i> NCIMB 9869 (44/63)	P09787.2
	<i>pchF</i>	D3M96_07115	4-cresol deshidrogenasa subunidad flavoproteína	<i>P. putida</i> NCIMB 9869 (77/88)	P09788.3
	<i>pchA</i>	D3M96_07100	4-hidroxibenzaldehido deshidrogenasa	<i>P. putida</i> NCIMB 9869 (37/57)	Q59702.2
4-carboxidifenil éter	<i>pobA</i>	D3M96_00065	Fenoxibenzoato dioxigenasa subunidad alfa	<i>P. pseudoalcaligenes</i> POB310 (30/46)	Q52185.1
	<i>pobB</i>	D3M96_00060	Fenoxibenzoato dioxigenasa subunidad beta	<i>P. pseudoalcaligenes</i> POB310 (40/54)	Q52186.1

Rutas periféricas que convergen en la ruta central del 3-(2,3-dihidroxifenil)-propionato y 2,3-dihidroxicinamato

Los genes *hca* codifican la ruta periférica de 3-fenilpropionato y cinamato (3-fenil-2-propenoato). En *A. aquatilis* QD168 se encontró la agrupación génica *hcaREFCBC*, que codifica la ruta periférica de estos compuestos junto a la ruta central codificada por los genes *mhpBCDFE* (Figura 14). Se identificaron los genes *hcaEF*, que codifican la 3-fenilpropionato/cinamato 1,2-dioxigenasa (identidad > 66%), además del gen *hcaR* que codifica el regulador transcripcional HcaR (identidad > 46%; Tabla 15)

Tabla 15. Rutas del 3-fenilpropionato y del cinamato de *A. aquatilis* QD168

Gen	ORF	CDS	Función	Organismo (identidad %/similitud %)	N° de acceso
<i>hcaD</i>	D3M96_14795	HcaD	3-Fenilpropionato/cinamato dioxigenasa ferredoxina	<i>P. luminicens</i> TTO1 (45/63)	Q7N4V5.1
<i>hcaB</i>	D3M96_14790	HcaB	3-Fenilpropionato-dihidrodiol/cinamato-dihidrodiol deshidrogenasa	<i>E. coli</i> IAI1 (70/80)	B7M7P4.1
<i>hcaC</i>	D3M96_14785	HcaC	3-Fenilpropionato/cinamato dioxigenasa ferredoxina	<i>E. coli</i> O157:H7 (66/76)	P0ABW1.1
<i>hcaF</i>	D3M96_14780	HcaF	3-Fenilpropionato/cinamato dioxigenasa subunidad beta	<i>P. luminicens</i> TTO1 (66/79)	Q7N4V9.1
<i>hcaE</i>	D3M96_14775	HcaE	3-fenilpropionato/cinamato dioxigenasa subunidad alfa	<i>P. luminicens</i> TTO1 (78/87)	Q7N4W0.1
<i>hcaR</i>	D3M96_14770	HcaR	Activador transcripcional HcaR	<i>E. coli</i> K-12 (46/59)	Q47141.2

Rutas y reacciones periféricas que convergen en la ruta central del fenilacetil-CoA

El compuesto aromático estireno (vinilbenceno) puede ser degradado a fenilacetato mediante la acción de la enzima estireno monooxigenasa (StyAB). La búsqueda de genes ortólogos en la cepa QD168 reveló una región, que codifica los genes *styAB*. Se observó > 30% de identidad con las enzimas de *P. fluorescens* (Beltrametti *et al.*, 1997). La ruta de degradación de estireno produce fenilacetato. El gen *paaK* que forma parte de la agrupación génica *paaABCDEZGIK* en la cepa QD168 codifica una proteína que participa en la degradación de fenilacetato a fenilacetil-CoA. La proteína PaaK presenta alta identidad con la fenilacetato-CoA ligasa descrita en *Azoarcus evansii* KB740 (> 71%; Rost *et al.*, 2002) (Tabla 16).

Tabla 16. Rutas/reacciones periféricas de la ruta del fenilacetil-CoA de *A. aquatilis* QD168

Rutas/Reacciones Periféricas	Gen	ORF	Función	Organismo (identidad %/similitud %)	N° de acceso
Fenilacetato	<i>paaK</i>	D3M96_12670	Fenilacetato-CoA ligasa	<i>A. evansii</i> KB 740 (71/84)	Q9L9C1.1
Estireno	<i>styB</i>	D3M96_00350	Flavina reductasa dependiente de NADH	<i>P. fluorescens</i> (36/55)	O06835.1
	<i>styA</i>	D3M96_00345	Estireno monooxigenasa	<i>P. fluorescens</i> (30/47)	O06834.1

Rutas y reacciones periféricas que convergen en la ruta central del homogentisato

La ruta de degradación del aminoácido aromático tirosina es catalizada por una aminotransferasa, produciendo 4-hidroxifenilpiruvato. En el genoma de QD168 se localizan dos copias del gen *tyrB* (*tyrB1* y *tyrB2*; **Tabla 17**). Los compuestos 4-hidroxifenilpiruvato y fenilpiruvato pueden ser degradados mediante la acción de la enzima 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa (Hpd). En *A. aquatilis* QD168, el producto génico del gen *hpd* presenta alta identidad con la enzima Hpd de *Pseudomonas* sp. P.J. (> 85%; Rüetschi *et al.*, 1992)

Tabla 17. Rutas/reacciones periféricas de la ruta del homogentisato de *A. aquatilis* QD168

Rutas/Reacciones Periféricas	Gen	ORF	Función	Organismo (identidad %/similitud %)	N° de acceso
4-Hidroxifenil piruvato	<i>hpd</i>	D3M96_15170	4-Hidroxifenilpiruvato dioxigenasa	<i>Pseudomonas</i> sp. P.J. 874 (85/90)	P80064.1
Fenilpiruvato	<i>hpd</i>	D3M96_15170	4-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa	<i>Pseudomonas</i> sp. P.J. 874 (85/90)	P80064.1
Tirosina	<i>tyrB1</i>	D3M96_08960	Aminoácido aromático aminotransferasa	<i>P. aeruginosa</i> PAO1 (67/80)	P72173.2
	<i>tyrB2</i>	D3M96_19035	Aminoácido aromático aminotransferasa	<i>E. coli</i> K-12 (55/71)	P04693.1

Rutas periféricas que convergen en la ruta central del 2,5-dihidroxinicotinato

El nicotinato es un compuesto ampliamente distribuido en la naturaleza como parte de los cofactores de piridina (*e.g.*, NAD y NADP) y compuestos alcaloides (*i.e.*, nicotina). Los genes *nicABC* que codifican las enzimas involucradas en la conversión de nicotinato a 2,5-dihidroxinicotinato se localizaron en dos agrupaciones génicas en la cepa QD168. Los genes *nicAB* se localizaron junto a una copia de la ruta central (*nicDXF*), mientras que el gen *nicC* se localizó junto a genes que codifican el regulador transcripcional tipo MarR (*nicR*) y una proteína de transporte (*nicT*). El gen *nicB* esta presente en dos copias (*nicB1* y *nicB2*) separadas por el gen *nicA*, que codifican las subunidades B y A de la enzima nicotinato

deshidrogenasa (**Tabla 18**). Los productos génicos de los genes *nic* de *A. aquatilis* QD168 presentan alta identidad con las proteínas de la bacteria *P. putida* KT2240 (> 41%; Jimenez *et al.*, 2002).

Tabla 18. Ruta del nicotinato de *A. aquatilis* QD168

Gen	ORF	CDS	Función	Organismo (identidad %/similitud %)	Nº de acceso
<i>nicT</i>	D3M96_09560	NicT	Proteína de Transporte NicT	<i>P. putida</i> KT2440 (77/87)	Q88FY6.1
<i>nicC</i>	D3M96_09555	NicC	6-Hidroxinicotinato 3-monooxigenasa	<i>P. putida</i> KT2440 (84/91)	Q88FY2.1
<i>nicR</i>	D3M96_09550	NicR	Represor transcriptional tipo HTH, NicR	<i>P. putida</i> KT2440 (71/82)	Q88FY0.1
<i>nicB1</i>	D3M96_15915	NicB1	Nicotinato deshidrogenasa subunidad B	<i>P. putida</i> KT2440 (41/56)	Q88FX8.1
<i>nicA</i>	D3M96_15910	NicA	Nicotinato deshidrogenasa subunidad A	<i>P. putida</i> KT2440 (63/80)	Q88FX9.1
<i>nicB2</i>	D3M96_15905	NicB2	Nicotinato deshidrogenasa subunidad B	<i>P. putida</i> KT2440 (58/70)	Q88FX8.1

Reacciones periféricas que convergen en la ruta central del gentisato

El salicilato (2-hidroxibenzoato) es un intermediario clave en la degradación de varios compuestos aromáticos de mayor masa molecular (*e.g.*, naftaleno, fluoreno, fenantreno). En *A. aquatilis* QD168 se identificó el gen *sdgC* (D3M96_00255), que codifica una salicilil-CoA 5-hidroxilasa (**Tabla 19**).

Tabla 19. Reacción periférica del salicilil-CoA de *A. aquatilis* QD168

Gen	ORF	CDS	Función	Organismo (identidad %/similitud %)	Nº de acceso
<i>sdgC</i>	D3M96_00255	SdgC	Salicilil-CoA 5-hidroxilasa	<i>Streptomyces</i> sp. WA46 (40/54)	Q7X281.1

Al analizar la localización genómica de los agrupamientos génicos que codifican rutas del catabolismo aromático identificados en la cepa QD168 se observaron cinco zonas que poseen más de dos rutas catabólicas codificadas (**Figura 17**). Cuatro zonas en el genoma de QD168 codifican una ruta catabólica de intermediarios centrales (genes *cat*, *lig*, *mhp* y *nic*) inmediatamente aledaña o cercana a las rutas periféricas que convergen en la respectiva ruta (**Figura 17**). La otra zona se encuentra conformada por los genes *pob*, *sdg* y *sty* encontrándose en los primeros 100 kb del genoma de QD168 (**Figura 17**).

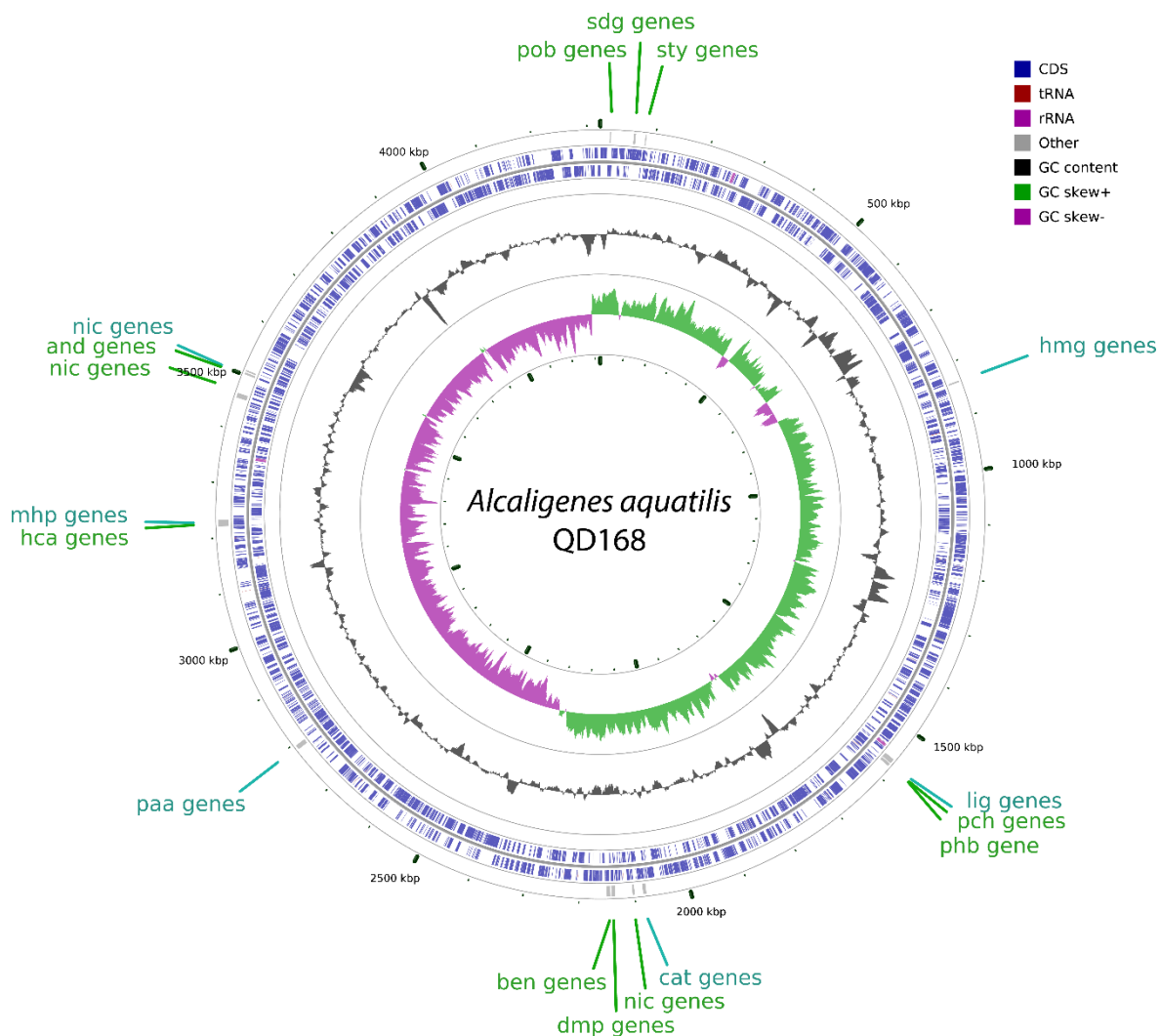


Figura 17. Localización genómica de las rutas catabólicas de compuesto aromáticos de la bacteria *A. aquatilis* QD168. Se indica desde los círculos internos a externos: Círculo 1, asimetría GC (G-C)/(G+C); Círculo 2, contenido GC; Círculos 3 y 4 las secuencias codificantes en las hebras templado y codificante, respectivamente; y Círculo 5, las secuencias codificantes de enzimas identificadas de rutas catabólicas de compuestos aromáticos. Las agrupaciones genéticas de rutas centrales y rutas/reacciones periféricas de degradación de compuestos aromáticos están indicados con letras azules y letras verdes, respectivamente. La representación fue obtenida mediante CGview.

Además, se identificaron 18 genes que codifican monooxigenasas, hidroxilasas y subunidades α y β de dioxigenasas hidroxilantes del anillo aromático, que no fueron asociadas a ninguna ruta catabólica. Ésto se debió a una baja identidad contra proteínas con una función estudiada, por no poseer todos los genes pertenecientes a esa ruta o por no encontrar las rutas centrales relacionadas a la degradación del compuesto aromático.

Para comprender el potencial catabólico de *A. aquatilis* QD168 en comparación a otras bacterias, se realizó un análisis comparativo de la cantidad total de rutas

centrales y periféricas previamente identificadas *in silico* en el genoma de bacterias degradadoras. En cada bacteria, se tomó en cuenta el número total de rutas completas de vías centrales de degradación de compuestos aromáticos que poseen rutas periféricas que convergen a ellas, y el número total de rutas y reacciones periféricas con una ruta central identificada (**Tabla 20**). De las 8 bacterias analizadas, sólo las bacterias *Cuprivadidus pinatubonensis* JMP134, *Rhodococcus jostii* RHA-1 y *Paraburkholderia xenovorans* LB400, bacterias modelos en degradación de compuestos xenobióticos, poseen más rutas catabólicas de compuestos aromáticos que la cepa QD168. De todas formas, al normalizar por el tamaño del genoma de cada bacteria, *A. aquatilis* QD168 posee un número mayor de rutas catabólicas de compuestos aromáticos por megabase de cada genoma analizado (**Tabla 20**).

Tabla 20. Comparación de rutas centrales y periféricas del catabolismo de compuestos aromáticos de *A. aquatilis* QD168 y otras bacterias

Bacteria	Cepa	Tamaño (Mb)	Rutas centrales	Rutas/reacciones periféricas	Rutas/ Mb	Referencia
<i>A. aquatilis</i>	QD168	4,32	7	16	5,32	Esta tesis
<i>A. oleivorans</i>	DR1	4,15	3	7	2,41	Jung et al., 2011
<i>E. coli</i>	W	5,00	3	5	1,60	Díaz et al., 2001
<i>P. putida</i>	KT2440	6,18	6	13	3,07	Jiménez et al., 2002
<i>C. pinatubonensis</i>	JMP134	7,26	12	23	5,09	Pérez-Pantoja et al., 2008
<i>C. basilensis</i>	B-8	8,55	6	8	1,64	Shi et al., 2013
<i>R. jostii</i>	RHA-1	9,70	8	26	3,51	McLeod et al., 2006
<i>P. xenovorans</i>	LB400	9,73	11	20	3,18	Chain et al., 2006

3.2.3. Clasificación de dioxigenasas hidroxilantes del anillo aromático (ARHDO) de la bacteria *A. aquatilis* QD168

Para estudiar la funcionalidad de las enzimas ARHDO presentes en la cepa QD168, estas fueron analizadas filogenéticamente mediante el método de la clasificación de las secuencias de aminoácidos de las subunidades α descrita por Nam *et al.* (2001). Se realizó un perfil de modelo oculto de Markov (HMM profiles) para cada uno de los 4 grupos identificados por Nam *et al.* (2001). Estos perfiles fueron utilizados para identificar genes homólogos a cada grupo, identificándose 10 ARHDO en el genoma de *A. aquatilis* QD168. Los genes D3M96_04590, D3M96_00285 y D3M96_08265 fueron identificados como subunidades α de ARHDO en la cepa QD168. Además, se identificaron los genes que codifican las subunidades α de la fenoxibenzoato dioxigenasa (PobA; D3M96_00065), la antranilato 1,2-dioxigenasa (AndAc; D3M96_16055), la benceno 1,2-dioxigenasa

(BedC1_1; D3M96_09765, y BedC1_2; D3M96_04330), la 3-fenilpropionato/cinamato dioxigenasa (HcaE; D3M96_14775), la tolueno-4-sulfonato monooxigenasa (TsaM1; D3M96_19025) y la benzoato 1,2-dioxigenasa (BenA; D3M96_09780). Estas secuencias fueron utilizadas para construir un árbol filogenético basado en inferencia Bayesiana con las secuencias aminoacídicas de las ARHDO de bacterias de referencia de cada grupo.

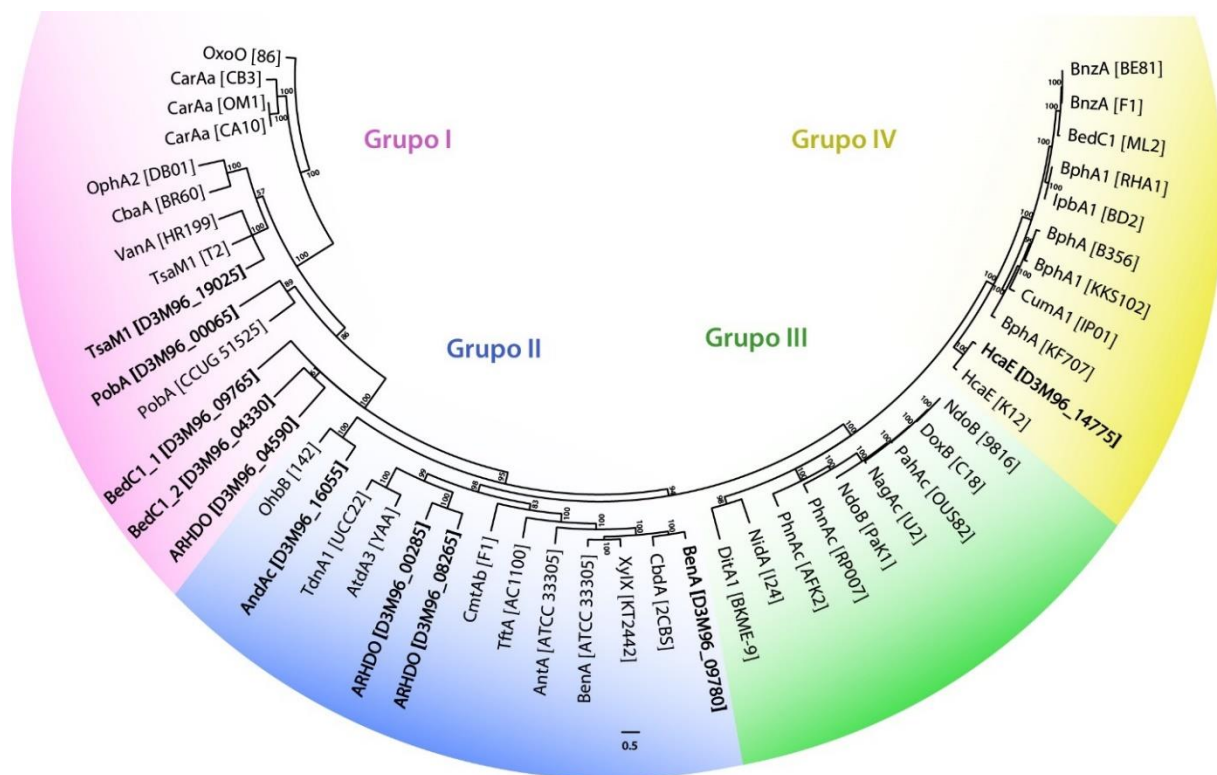


Figura 18. Árbol filogenético de subunidades α de dioxigenasas hidroxilantes de anillo aromático (ARHDO) de *A. aquatilis* QD168. El árbol filogenético fue construido utilizando el método de inferencia Bayesiana usando el programa MrBayes v3.1 (600.000 generaciones). Para la comparación, se utilizaron cepas de referencia de cada grupo de la clasificación según Nam *et al.* (2001). Las abreviaciones de cada secuencias son las siguientes: VanA, subunidad oxigenasa de la vanilato O-demetilasa; TsaM1, subunidad Fe-S del sistema monooxigenasa tolueno-4-sulfonato; ARHD, subunidad α de la dioxigenasa hidroxilante de anillo aromático; PobA, subunidad α de la fenoxibenzoato dioxigenasa; CarAa, carbazole 1,9a-dioxigenasa, dioxigenasa terminal; AndAc, subunidad α de la antranilato 1,2-dioxigenasa; BedC, subunidad α de la benceno 1,2-dioxigenasa; HcaE, subunidad α de la 3-fenilpropionato/cinamato dioxigenasa; PbhA, subunidad α de la bifenilo 2,3-dioxigenasa; NagAc, subunidad α de la naftaleno 1,2-dioxigenasa; DoxB, subunidad α de la naftaleno 1,2-dioxigenasa; PhnAc, subunidad grande de dioxigenasa; Atd3, subunidad α de la anilina dioxigenasa; TdnA, subunidad grande de dioxigenasa terminal; BenA, subunidad α de la benzoato 1,2-dioxigenasa; AtdA, subunidad α de la anilina dioxigenasa.

Dentro del grupo I se clasificaron las subunidades α de la fenoxibenzoato dioxigenasa (PobA), la tolueno-4-sulfonato monooxigenasa (TsaM1), las benceno 1,2-dioxigenasas (BedC1_1 y BedC1_2) y la ARHDO_04590. En el grupo II fueron agrupadas las subunidades α de la de la antranilato 1,2-dioxigenasa (AntAc), la

benzoato 1,2-dioxigenasa (BenA), la ARHDO_00285 y la ARHDO_08265. En el grupo IV se localizó la subunidad α de la 3-fenilpropionato/cinamato dioxigenasa (HcaE). Ninguna ARHDO de la cepa QD168 fue clasificada dentro del grupo que comprende a naftaleno dioxigenasas y dioxigenasas de aromáticos policíclicos (Grupo III; **Figura 18**).

En esta tesis se estudió el potencial catabólico de compuestos aromáticos en el genoma de la bacteria *A. aquatilis* QD168. La bacteria marina *A. aquatilis* QD168 posee genes que codifican al menos 7 rutas catabólicas centrales y 15 rutas/reacciones periféricas de compuestos aromáticos. Se identificaron los genes correspondientes a las rutas centrales para la degradación de los siguientes compuestos: catecol (genes *cat*), protocatecuato (genes *lig* y *pca*), fenilacetil-CoA (genes *paa*), 3-(2,3-dihidroxi)fenil-propionato/2,3-dihidroxicinamato (genes *mhp*), homogentisato (*hmg*), 2,5-dihidroxinicotinato (genes *nic*) y gentisato (genes *sgd* y *nag*) (**Figura 11**). Asimismo, en esta tesis se identificaron genes que codifican 16 rutas/reacciones periféricas de degradación de compuestos aromáticos: benzoato (genes *ben*), fenol (genes *dmp*), antranilato (genes *and*), triptófano (genes *kyn*), 4-hidroxibenzoato (*phbA*), *p*-cresol (genes *phc*), 4-carboxidifenil éter (genes *pob*), 3-fenilpropionato/cinamato (genes *hca*), estireno (*styAB*), fenilacetato (*paaK*), 4-hidroxifenilpiruvato (*hpd*), tirosina (*tyrB*), nicotinato (genes *nic*) y saliciloil-CoA (*sdgC*) (**Figura 15**).

3.3. Análisis funcional de rutas catabólicas de *A. aquatilis* QD168

Para estudiar el potencial catabólico de la cepa QD168 y la funcionalidad de rutas catabólicas aromáticas identificadas en su genoma, se realizaron ensayos de crecimiento usando 22 compuestos aromáticos como única fuente de carbono o nitrógeno en concentraciones de 0,5 a 2 mM.

Debido a un aumento en la viabilidad celular (UFC/ml) durante el crecimiento de *A. aquatilis* QD168 en medio mínimo M9 sin fuente de carbono, se realizó un inóculo alternativo para minimizar falsos positivos de crecimiento en compuestos aromáticos (Anexos, **Figura 34**).

3.3.1. Crecimiento de *A. aquatilis* QD168 en compuestos aromáticos como única fuente de carbono

El crecimiento de la cepa QD168 se siguió por medición de turbidez ($\lambda = 600\text{nm}$). La cepa QD168 se cultivó en medio mínimo M9 modificado con NaCl 1,75% p/v utilizando los compuestos succinato (2 mM), benzoato (1,17 mM),

3-hidroxibenzoato (3-HBA) (1,17 mM), 4-hidroxibenzoato (4-HBA) (1,17 mM), nicotinato (1,33 mM), antranilato (1 mM) y 3-hidroxicinamato (3-HCA) (1 mM). El crecimiento en succinato se utilizó como control positivo de crecimiento y un medio sin fuente de carbono como control negativo. La bacteria *A. aquatilis* QD168 creció en benzoato, 4-HBA y nicotinato (Anexos, **Figura 37A**). La cepa QD168 presentó crecimiento leve (< 0.1 turbidez_{600nm}) en los compuestos antranilato y 3-HCA a las 120 y 180 h, respectivamente (Anexos, **Figura 37A; Tabla 21**).

Se evaluó el crecimiento de *A. aquatilis* QD168 mediante conteo de UFC/ml. Se cultivó la cepa QD168 en medio mínimo M9 modificado con NaCl 1,75% p/v utilizando succinato (2 mM), fluoreno (0,62 mM), fenantreno (0,52 mM), antraceno (0,52 mM), benceno (1,33 mM) y cinamato (0,89 mM) como única fuente de carbono. El crecimiento de la cepa QD168 en medio mínimo M9 con succinato se utilizó como control positivo de crecimiento. Un medio de cultivo sin fuente de carbono se utilizó como control negativo. Se observó sólo crecimiento en el compuesto cinamato en determinadas condiciones a las 120 h (Anexos, **Figura 37B; Tabla 21**).

Tabla 21. Crecimiento de *A. aquatilis* QD168 en compuestos aromáticos como única fuente de carbono

Compuestos	Crecimiento
Hidrocarburos Aromáticos Monocíclicos (HAMs)	
Benceno	+++
Tolueno	++
Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs)	
Naftaleno	-
Fenantreno	-
Antraceno	-
Fluoreno	-
Bifenilo	+
Fenoles y Benzoatos	
Fenol	++
Benzoato	+++
2-Hidroxibenzoato (Salicilato)	-
3-Hidroxibenzoato	+
4-Hidroxibenzoato	+++
3-Metilbenzoato (3-tolueno)	-
Otros	
Cinamato	+++
3-Hidroxicinamato	+

Nivel de crecimiento: leve (+), moderado (++), alto (+++), sin crecimiento (-)

3.3.2. Crecimiento de *A. aquatilis* QD168 en compuestos aromáticos como única fuente de carbono y nitrógeno

Se estudió el crecimiento de la cepa QD168 en compuestos aromáticos que contienen nitrógeno en su estructura. Para esto se utilizó medio mineral M8, el que

no posee fuente de nitrógeno. Se evaluó el crecimiento de la cepa QD168 en los compuestos nicotinato (1,33 mM), antranilato (1 mM), triptófano (0,73 mM), 4-aminobenzoato (*p*ABA) (1,14 mM), benzamida (1,14 mM) y simazina (1,14 mM). El medio mínimo M8 sin fuente de carbono se utilizó como el control negativo. Se determinó el crecimiento en nicotinato, triptófano, benzamida y *p*ABA como única fuente de carbono y nitrógeno (Anexos, **Figura 37C**; **Tabla 22**).

Tabla 22. Crecimiento de *A. aquatilis* QD168 en compuestos nitrogenados

Compuestos	Fuente de carbono (medio mínimo M9)	Fuente de carbono y nitrógeno (medio mínimo M8)
Fenoles y Benzoatos		
2-Aminofenol	-	-
4-Aminobenzoato	+	+
Otros		
Benzamida	ND*	+++
Antranilato	ND*	+
Triptófano	+	+++
Nicotinato	ND*	+++
Simazina	ND*	-

Nivel de crecimiento: leve (+), moderado (++) , alto (+++) , sin crecimiento (-)

ND, * No determinado

3.3.3. Crecimiento de *A. aquatilis* QD168 en compuestos aromáticos volátiles

Se evaluó el crecimiento de la cepa QD168 en placa utilizando compuestos aromáticos volátiles como única fuente de carbono en medio mínimo M9 agar modificado con 1,75 % p/v de NaCl. Se estudió el crecimiento de *A. aquatilis* QD168 en los compuestos benceno, tolueno, naftaleno y bifenilo en fase gaseosa (placas de Petri). Se identificó un crecimiento alto (> 50% del crecimiento de la placa) en benceno (Anexos, **Figura 38B**), un crecimiento moderado en tolueno (entre un 25 y 50% del crecimiento de la placa, Anexos, **Figura 38C**) y un crecimiento bajo en bifenilo (< 25% del crecimiento de la placa). Se realizó un cultivo en succinato 2 mM (control positivo) y un cultivo sin fuente de carbono (control negativo), observando un crecimiento cercano al 100% y al 0% de la placa, respectivamente.

De los 22 compuestos aromáticos examinados se corroboró un crecimiento de 14 compuestos (**Tabla 23** y **Tabla 24**); 11 compuestos fueron utilizados por la cepa QD168 como única fuente de carbono y 5 compuestos fueron utilizados como única fuente de carbono y nitrógeno.

3.4. Estudio funcional de la ruta periférica del benceno en *A. aquatilis* QD168

Se caracterizó la funcionalidad de la ruta periférica del hidrocarburo aromático benceno como modelo de estudio del metabolismo aromático en *A. aquatilis* QD168. La funcionalidad de la ruta periférica del benceno se estudió mediante crecimiento (turbidez_{600nm} y UFC/ml), degradación (ensayos de células en reposo), identificación de metabolitos intermediarios y cuantificación de la expresión de los genes catabólicos del benceno.

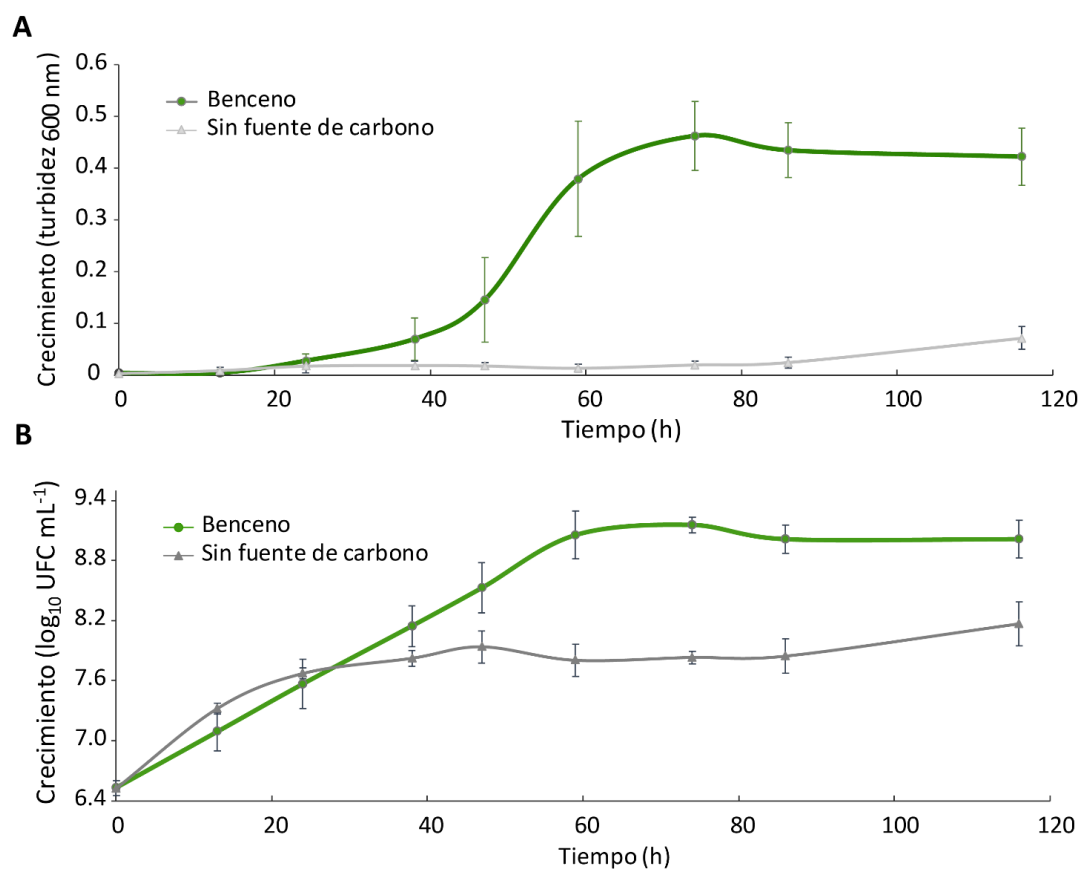


Figura 19. Crecimiento de *A. aquatilis* QD168 utilizando benceno como fuente de carbono. Para estudiar el crecimiento en benceno (5 mM) de la cepa QD168 se monitoreó la turbidez_{600nm} (A) y log (UFC/ml) (B) en medio mínimo M9. Se utilizó un control sin fuente de carbono como control de crecimiento. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas independientes.

3.4.1. Crecimiento de *A. aquatilis* QD168 en benceno

Se realizó una curva de crecimiento de la cepa Q168 en presencia de benceno (5 mM) en medio mínimo M9 modificado con NaCl 1,75% p/v. Se observó un máximo crecimiento de *A. aquatilis* QD168 en benceno a las 74 h con una turbidez_{600nm} = 0,463 y log (UFC/ml) = 9,2 (**Figura 19**). Se definió el comienzo de la fase exponencial a las 38 h (turbidez_{600nm} = 0,146; log (UFC/ml) = 8,1) (**Figura 19**) y el final de esta fase a las 68 h (turbidez_{600nm} = 0,420; log (UFC/ml) = 9,1) (**Figura 19**).

Se calculó una velocidad específica de crecimiento de la cepa QD168 de $0,098 \text{ h}^{-1}$ y un tiempo de duplicación de $7,071 \text{ h}$ en benceno (5 mM).

3.4.2. Ensayo de degradación de benceno por células en reposo

Se evaluó la degradación de benceno mediante ensayos de células en reposo de la cepa QD168. Un cultivo de la cepa QD168 se creció en medio mineral M9 con benceno y succinato como fuentes de carbono. Al alcanzar fase exponencial ($\text{turbidez}_{600\text{nm}} \sim 0,8$) las células se recolectaron y se concentraron 20 veces para obtener un concentrado celular ($\text{turbidez}_{600\text{nm}} \sim 16$). Estas células fueron expuestas a benceno (5 mM) por 60 min . Se cuantificó la cantidad de benceno remanente por HPLC. Se utilizó una muestra de bacterias hervidas como control negativo. Aunque en el control de bacterias hervidas se observa una baja en la concentración de benceno durante el ensayo, una degradación completa de benceno por la cepa QD168 se observa a los 60 min a diferencia del control de células muertas (Figura 20).

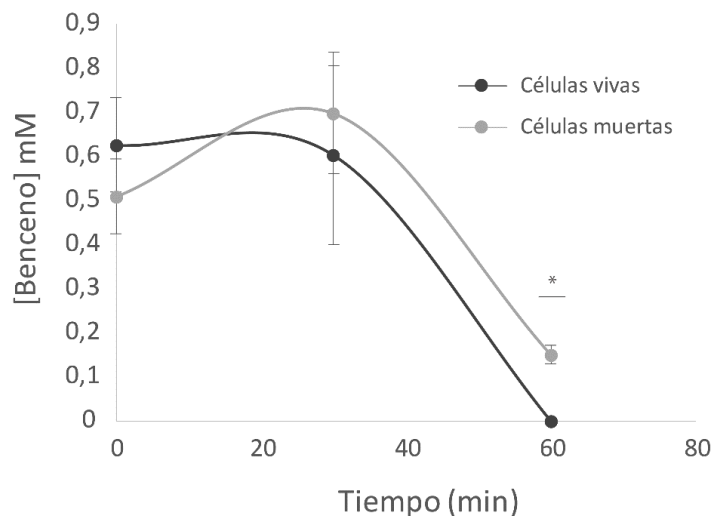


Figura 20. Degradación de benceno por células en reposo de *A. aquatilis* QD168. Se presenta la concentración remanente de benceno en cada muestra analizada. Se utilizó un control de células hervidas como control negativo. Se realizó un t-test de dos colas para identificar diferencias entre las condiciones analizadas (* = $p < 0,05$).

Durante el crecimiento de *A. aquatilis* QD168 en benceno se midió la formación de fenol y catecol. Se identificó un pequeño pico con un tiempo de retención de $2,627 \text{ min}$ a las 32 h de crecimiento en benceno 5 mM . Al analizar su espectro de absorción UV-Vis se identificó un máximo de absorción a 272 nm . Ambos parámetros corresponden con los valores determinados para el estándar del compuesto aromático fenol. Además, el intermediario identificado y el estándar de

fenol poseen el mismo espectro UV-Vis (Anexos, **Figura 39**). El intermediario catecol no fue identificado en las muestras obtenidas durante el crecimiento de *A. aquatilis* QD168 en el hidrocarburo aromático benceno.

3.4.3. Análisis transcripcional de las rutas catabólicas de benceno en *A. aquatilis* QD168

Se analizaron todas las rutas catabólicas de benceno presentes en *A. aquatilis* QD168. Para esto se realizó un análisis transcripcional de las hidroxilasas y dioxigenasas involucradas en la activación y apertura del anillo aromático de benceno. La ruta de degradación mediante la enzima multicomponente fenol

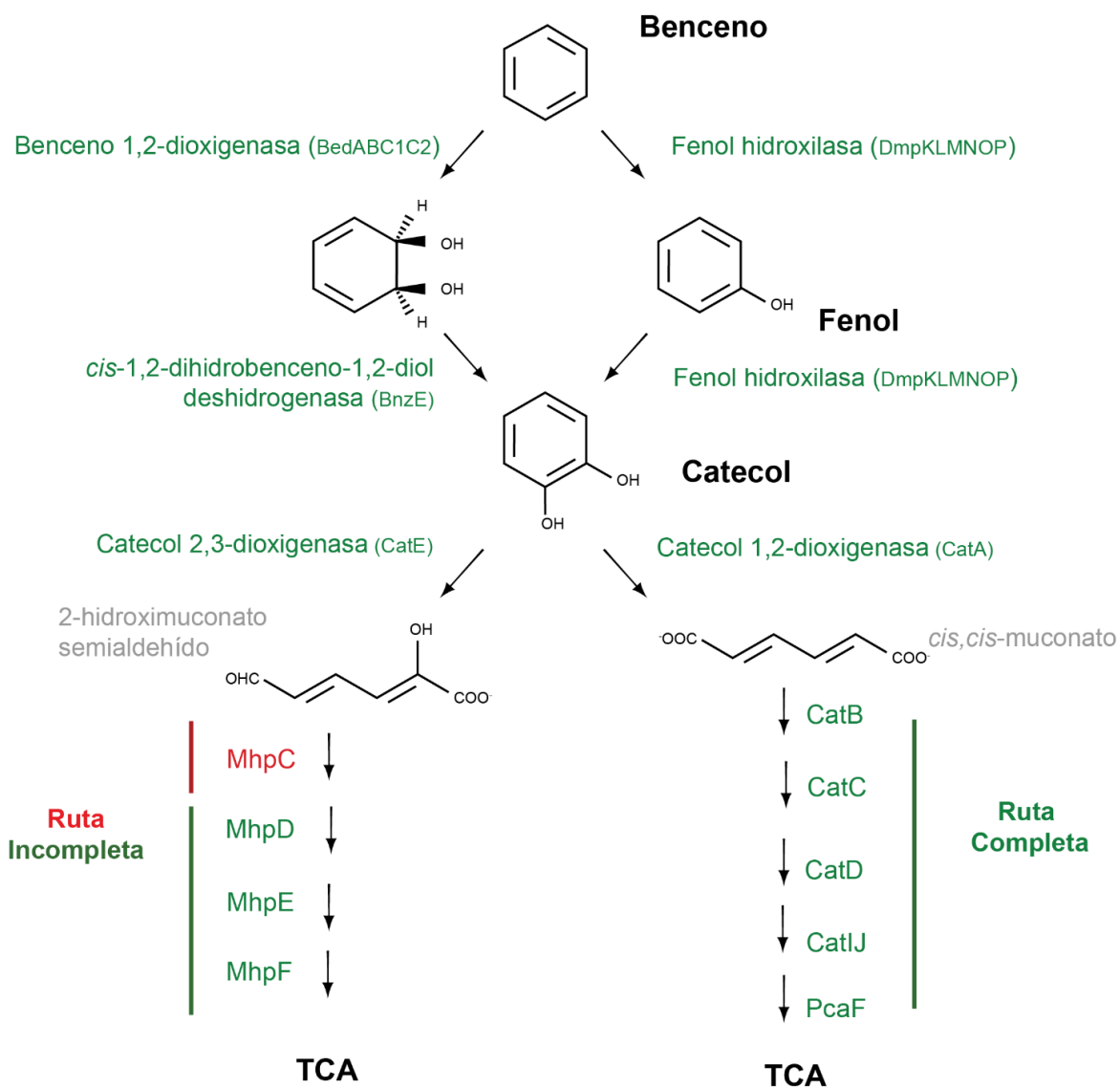


Figura 21. Esquema de las rutas periféricas y centrales del catabolismo de benceno codificadas en el genoma de *A. aquatilis* QD168. En verde se muestran los genes identificados en el estudio *in silico* y en rojo las enzimas sin un homólogo en el genoma de la cepa QD168.

hidroxilasa, responsable de dos monooxigenaciones consecutivas en benceno para formar fenol y luego catecol, se encuentra completa (DmpKLMNOP). De la enzima multicomponente benceno 1,2-dioxigenasa, responsable de la dioxigenación de benceno para la posterior formación de catecol, se encuentran dos copias de las subunidades- α (*bedC1_1*, D3M96_09765 y *bedC1_2*, D3M96_04330). Sin embargo, no se encontraron en su vecindario genómico los demás componentes de una ARHDO. En cuanto a las rutas centrales de degradación de catecol, todos los genes de la ruta del β -cetoadipato (genes *catRBAIJDC*) se identificaron. Se identificó un gen que codifica la enzima catecol 2,3-dioxigenasa (*catE*, D3M96_10490), pero la ruta de degradación por la apertura *meta* del anillo aromático se encuentra incompleta (Figura 21).

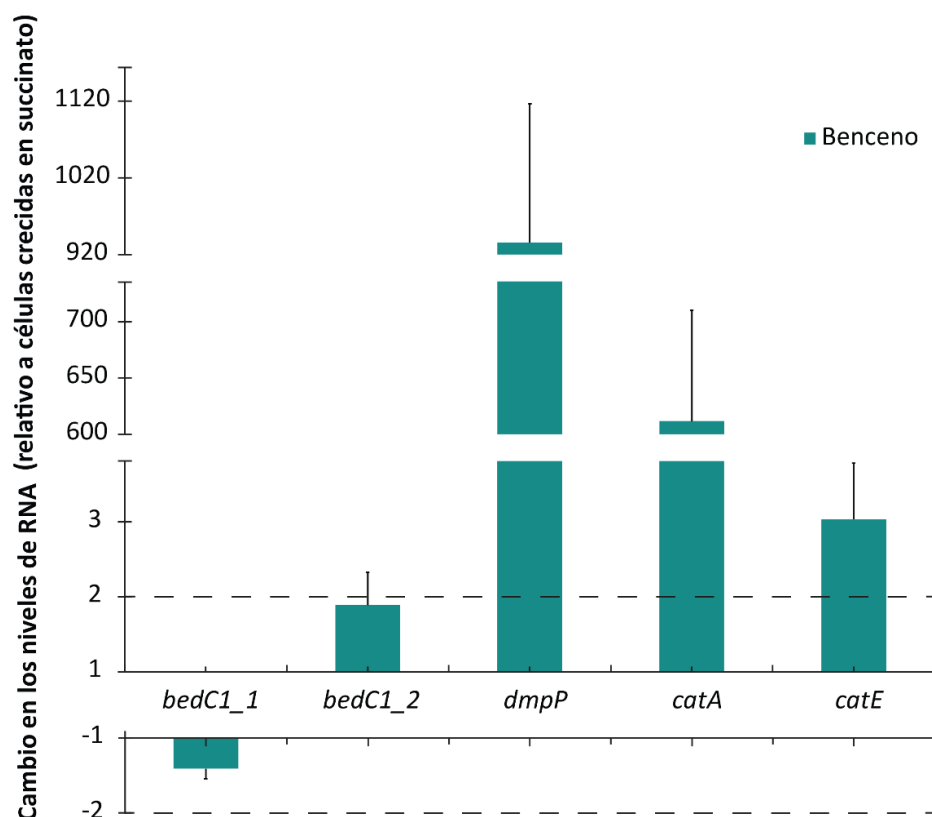


Figura 22. Niveles de expresión de genes de la ruta catabólica de benceno en *A. aquatilis* QD168 durante la degradación de benceno. Se muestran los niveles de expresión durante el crecimiento en benceno en fase exponencial de los genes que codifican: la subunidad α de la enzima multicomponente benceno 1,2-dioxigenasa (*bedC1_1*, D3M96_09765; *bedC1_2*; D3M96_04330), la subunidad P5 de la enzima multicomponente fenol hidroxilasa (*dmpP*, D3M96_09760), la enzima catecol 1,2-dioxygenasa (*catA*, D3M96_09460) y catecol 2,3-dioxigenasa (*catE*, D3M96_10490). Se muestran los niveles de cambio relativo al crecimiento en succinato y utilizando como genes normalizadores los genes ARNr 16S (D3M96_01130) y *ftsZ* (D3M96_04730) integrados en el mismo análisis de datos. Las barras de cada condición representan el \log_{10} (cambio relativo) de la media de cada intervalo para mejor visualización. Las barras de error corresponden a la DE de la razón de cambio de tres réplicas biológicas independientes. Se realizó un t-test de dos colas para identificar diferencias entre las condiciones analizadas (* = $p < 0,05$).

Se determinaron los niveles transcripcionales de los genes que codifican las subunidades α de la benceno 1,2-dioxigenasa (*bedC1_1* y *bedC1_2*), el componente P5 de la fenol hidroxilasa (*dmpP*, D3M96_09760) y las dioxigenasas catecol 1,2-dioxigenasa (*catA*) y la catecol 2,3-dioxigenasa (*catE*). Se utilizaron como genes normalizadores los transcritos ARNr 16S (D3M96_01130) y *ftsZ* (D3M96_04730). El análisis transcripcional del crecimiento de la cepa QD168 en benceno durante fase exponencial indicó un aumento > 610 veces en el transcrito del gen *catA* que codifica la catecol 1,2-dioxigenasa y > 930 veces del transcrito del gen *dmpP*. Se cuantificó un aumento > 3 veces en los niveles de expresión del gen *catE*, con respecto al control (**Figura 22**), además de un aumento (≥ 2 veces) en los transcritos de *bedC1_2* comparado con la condición control.

3.5. Análisis de los genes asociados a la respuesta adaptativa a estrés oxidativo en *A. aquatilis* QD168

Para estudiar la respuesta a estrés oxidativo en *A. aquatilis* QD168 se identificaron genes que codifican enzimas antioxidantes y sistemas de reparación a daño por estrés oxidativo, reguladores transcripcionales de respuesta a estrés oxidativo e isoenzimas resistentes a estrés oxidativo (**Figura 23**; Anexos, **Tabla 30**). Para la búsqueda de los genes asociados a la respuesta adaptativa a estrés oxidativo en la cepa QD168, se realizó un análisis de homología de secuencias utilizando como modelo las secuencias aminoacídicas de proteínas de estrés oxidativo con evidencia experimental desde la base de datos UniProtKB/SwissProt.

3.5.1. Identificación de enzimas antioxidantes y sistemas de reparación a daño por estrés oxidativo en *A. aquatilis* QD168

Se realizó una búsqueda de genes ortólogos a genes que codifican enzimas antioxidantes (catalasas, peroxidasas y superóxido dismutasas) y sistemas de reparación de daño a estrés oxidativo (sistemas tiorredoxina-tiorredoxina reductasa y glutatión-glutatión reductasa). Se identificaron en el genoma de *A. aquatilis* QD168 genes que codifican las enzimas antioxidantes catalasa (*katA*, *katE*), superóxido dismutasa (*sodB1*, *sodB2* y *sodC1*), alquil hidroperóxido reductasa (*ahpC1*, *ahpC2*, *ahpD*, *ahpF*) y citocromo c551 peroxidasa (*ccp1*, *ccp2*). En *A. aquatilis* QD168 se identificaron genes del sistema de reparación catalizado por la enzima tiorredoxina reductasa (*trxB*) y las tiorredoxinas (*tlpA*, *trxA*, *trxC1* y *trxC2*). Se identificaron genes que codifican las glutarredoxinas (*grxC*, *grxD*), las peroxirredoxinas (*bcp*, *hyPrx5* y *prx*) y una rubredoxina (*rubA2*) (**Tabla 23**).

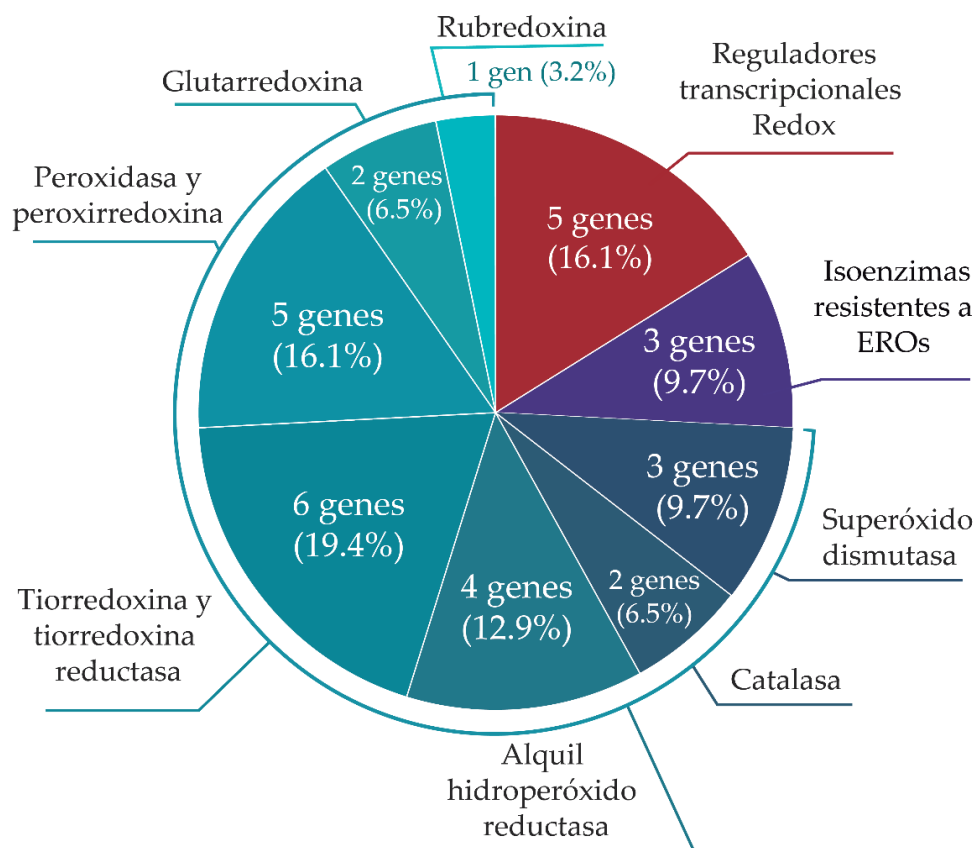


Figura 23. Determinantes genéticos asociados a la respuesta adaptativa a estrés oxidativo de *A. aquatilis* QD168. Los grupos predominantes en la cepa QD168 corresponden a genes que codifican reguladores transcripcionales, sistemas antioxidantes y sistemas de reparación de daño oxidativo (tiorredoxina/tiorredoxina reductasa, 19,4%; peroxidasa/peroxirredoxinas, 16,1%, y reguladores transcripcionales, 16,1%)

3.5.1. Identificación de los reguladores transcripcionales OxyR, SoxR, PerR y OhrR en *A. aquatilis* QD168

Se identificó en la cepa QD168 el gen *oxyR* (D3M96_10585), que codifica el regulador transcripcional OxyR. OxyR es un regulador de la familia LysR que regula la transcripción de genes inducido por peróxido de hidrógeno. Se determinó en la proteína OxyR de la cepa QD168 un motivo hélice-giro-hélice de unión a ADN y dos residuos de cisteínas conservados, necesarios para la activación de este regulador en *E. coli* (datos no mostrados). El producto del gen *oxyR* de la cepa QD168 presenta moderada identidad con el OxyR de la bacteria *Dickeya chrysanthemi* (> 29%; Calcutt *et al.*, 1998).

Se identificaron en *A. aquatilis* QD168 dos genes que codifican el regulador SoxR (*soxR1*, D3M96_08910; y *soxR2*, D3M96_14980). El activador transcripcional SoxR es sensible a redox, controlando la respuesta a superóxido mediada en *E. coli*. Se identificaron en los productos génicos SoxR1 y SoxR2 los cuatro residuos de cisteína de unión a un centro [2Fe-2S] necesarios para la activación del regulador SoxR en

Tabla 23. Enzimas antioxidantes de *A. aquatilis* QD168

Gen	ORF	CDS	Función	Organismo (identidad %/similitud %)	Nº de acceso
<i>ahpC1</i>	D3M96_12750	AhpC1	Alquil hidroperóxido reductasa subunidad C (peroxidasa)	<i>M. tuberculosis</i> CDC 1551 (36/55)	P9WQB6.1
<i>ahpC2</i>	D3M96_15655	AhpC2	Alquil hidroperóxido reductasa subunidad C (peroxidasa)	<i>S. Typhimurium</i> LT2 (70/83)	P0A251.2
<i>ahpD</i>	D3M96_11630	AhpD	Alquil hidroperóxido reductasa AhpD (reductasa)	<i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 (32/53)	Q9ANL0.1
<i>ahpF</i>	D3M96_15650	AhpF	Alquil hidroperóxido reductasa subunidad AhpF (reductasa)	<i>P. putida</i> KT2440 (70/82)	P0A155.1
<i>bcp</i>	D3M96_06785	Bcp	Peroxiirredoxina Bcp	<i>C. burnetii</i> RSA 493 (48/67)	Q83CY8.1
<i>ccp1</i>	D3M96_07750	Ccp1	Citocromo c551 peroxidasa	<i>N. europaea</i> ATCC 19718 (34/51)	P55929.2
<i>ccp2</i>	D3M96_04015	Ccp2	Citocromo c551 peroxidasa	<i>N. europaea</i> ATCC 19718 (65/78)	P55929.2
<i>grxC</i>	D3M96_17565	GrxC	Glutaredoxina 3	<i>P. aeruginosa</i> PAO1 (52/70)	Q9HU55.1
<i>grxD</i>	D3M96_17835	GrxD	Glutaredoxina 4	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 (57/74)	P73056.1
<i>hyPrx5</i>	D3M96_10550	HyPrx5	Peroxiirredoxina híbrida hyPrx5	<i>H. influenzae</i> Rd KW20 (44/57)	P44758.1
<i>katA</i>	D3M96_19795	KatA	Catalasa	<i>B. pertussis</i> Tohama I (76/88)	P0A323.1
<i>katE</i>	D3M96_12900	KatE	Catalasa C	<i>S. meliloti</i> 1021 (60/73)	Q9X576.2
<i>prx</i>	D3M96_04155	Prx	Peroxiirredoxina	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 substr. Kazusa (42/61)	P73728.1
<i>rubA2</i>	D3M96_16850	RubA2	Rubredoxina-2	<i>P. aeruginosa</i> PAO1 (65/79)	Q9HTK8.1
<i>sodB1</i>	D3M96_09520	SodB1	Superóxido dismutasa [Mn/Fe]	<i>Methylomonas</i> sp. J (73/82)	P23744.1
<i>sodB2</i>	D3M96_08650	SodB2	Superóxido dismutasa [Fe]	<i>B. pertussis</i> Tohama I (85/89)	P37369.2
<i>sodC1</i>	D3M96_17950	SodC1	Superóxido dismutasa [Cu-Zn] 1	<i>S. Typhimurium</i> ST4/74 (60/74)	E8XDJ8.1
<i>tlpA</i>	D3M96_11580	TlpA	Proteína similar a la tiorredoxina TlpA	<i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 (35/52)	P43221.1
<i>trxA</i>	D3M96_12535	TrxA	Tiorredoxina 1	<i>P. aeruginosa</i> PAO1 (74/87)	Q9X2T1.1
<i>trxB</i>	D3M96_14510	TrxB	Tiorredoxina reductasa	<i>V. cholerae</i> O1 biovar El Tor N16961 (70/82)	Q9KSS4.1
<i>trxC1</i>	D3M96_11430	TrxC1	Tiorredoxina 2	<i>S. coelicolor</i> A3(2) (51/68)	9RD25.1
<i>trxC2</i>	D3M96_15235	TrxC2	Tiorredoxina 2	<i>S. coelicolor</i> A3(2) (41/48)	Q9RD25.1

E. coli (datos no mostrados). Los genes *soxR1* y *soxR2* se encuentran distribuidos en el cromosoma de la cepa QD168. El producto génico SoxR1 presenta alta identidad con el regulador SoxR de la bacteria *S. enterica* serovar Typhimurium LT (> 61%), mientras que el producto génico SoxR2 posee > 63% de identidad con el regulador

SoxR de *E. coli* O157:H7. Al realizar un árbol filogenético con otros reguladores SoxR que poseen evidencia experimental, SoxR1 de la cepa QD168 no agrupa con otras secuencias analizadas y SoxR2 de la cepa QD168 agrupa con homólogos de la clase *Gammaproteobacteria* (Anexos, **Figura 36**). Este clado específico agrupó homólogos de SoxR de bacterias entéricas (*E. coli* K12, *S. Typhi* CT18 y *S. Typhimurium* LT2), y bacterias no-entericas (*P. putida* KT2440 y *A. oleovorans* DR1). SoxR2 de *A. aquatilis* QD168 agrupó con el clado de bacterias no-entericas.

Se identificó en la cepa QD168 un gen *ohrR* que codifica el regulador transcripcional de resistencia a hidroperóxidos orgánicos OhrR que presenta moderada identidad con el regulador OhrR de *B. subtilis* subsp. *subtilis* 168 (> 29%; Fuangthong *et al.*, 2001). Un regulador PerR se identificó en el genoma de la cepa QD168, que presenta una identidad del 37% con el regulador transcripcional tipo HTH PerR de *E. coli* K-12 (**Tabla 24**).

Tabla 24. Reguladores transcripcionales de estrés oxidativo de *A. aquatilis* QD168

Gen	ORF	CDS	Función	Organismo (identidad %/similitud %)	N° de acceso
<i>ohrR</i>	D3M96_17665	OhrR	Regulador transcripcional de resistencia a peróxidos orgánicos	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> 168 (29/49)	O34777.1
<i>oxyR</i>	D3M96_10585	OxyR	Activador de genes inducible por peróxido de hidrógeno OxyR	<i>D. chrysanthemi</i> (42/60)	P71318.1
<i>perR</i>	D3M96_00075	PerR	Regulador transcripcional tipo HTH PerR	<i>E. coli</i> K-12 (37/51)	Q57083.1
<i>soxR1</i>	D3M96_08910	SoxR1	Activador transcripcional sensible a Redox SoxR	<i>S. Typhimurium</i> LT (61/74)	P0A2R0.1
<i>soxR2</i>	D3M96_14980	SoxR2	Activador transcripcional sensible a Redox SoxR	<i>E. coli</i> O157:H7 (63/76)	P0ACS3.1

3.5.2. Identificación de isoenzimas resistentes a estrés oxidativo en *A. aquatilis* QD168

En el genoma de *A. aquatilis* QD168 se identificaron 3 genes que codifican isoenzimas resistentes a estrés oxidativo. El gen *fumC* codifica la enzima fumarato hidratasa clase II, que ha sido caracterizada en *Deinococcus radiodurans* R1 (Identidad > 74%; White *et al.*, 1999). Los genes *acnA1* y *acnA2* codifican las enzimas aconitato hidratasa A en la cepa QD168. *AcnA1* y *AcnA2* presentan una alta identidad con las aconitato hidratatas A de las bacterias *Thermus thermophilus* B8 (> 50%; Fazius *et al.*, 2012) y *Mycobacterium smegmatis* MC2155 (> 68%; Deshayes *et al.*, 2007), respectivamente (**Tabla 25**).

Tabla 25. Isoenzimas resistentes a estrés oxidativo de *A. aquatilis* QD168

Gen	ORF	CDS	Función	Organismo (identidad %/similitud %)	N° de acceso
<i>acnA1</i>	D3M96_08240	AcnA1	Aconitato hidratasa A	<i>T. thermophilus</i> HB8 (50/68)	Q5SMF6.1
<i>acnA2</i>	D3M96_18610	AcnA2	Aconitato hidratasa A	<i>M. smegmatis</i> MC2 155 (68/79)	A0QX20.1
<i>fumC</i>	D3M96_10680	FumC	Fumarato hidratasa, clase II	<i>D. radiodurans</i> R1 (74/83)	Q9RR70.1

Los genes que codifican enzimas antioxidantes, sistemas de reparación, reguladores transcripcionales e isoenzimas resistentes a estrés oxidativo identificadas *in silico* fueron localizados en el genoma de la cepa QD168. En general, los genes relacionados a la respuesta adaptativa a estrés oxidativo se encontraron en copia única y sin un vecindario genómico relacionado a su respuesta o al catabolismo de compuestos aromáticos (Figura 24). Los genes *ahpCF*, que codifican para las subunidades peroxidasa y reductasa de la enzima alquil hidroperóxido reductasa son los únicos genes de esta respuesta adaptativa que se encuentran organizados en un operon (Figura 24).

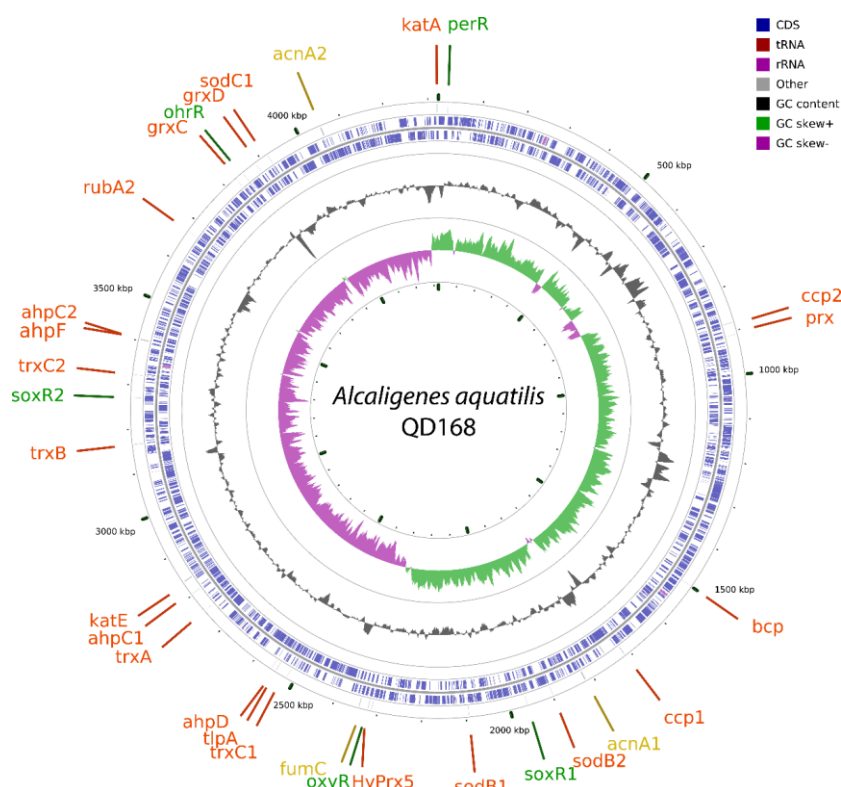


Figura 24. Localización genómica de los genes asociados a la respuesta adaptativa a estrés oxidativo de la bacteria *A. aquatilis* QD168. Se indica desde los círculos internos a externos: Círculo 1, asimetría GC (G-C)/(G+C); Círculo 2, contenido GC; Círculos 3 y 4 las secuencias codificantes en las hebras templado y codificante, respectivamente; y Círculo 5, las secuencias codificantes de proteínas asociadas a la respuesta adaptativa a estrés oxidativo. Los genes que codifican enzimas antioxidantes/sistemas de reparación de daño por estrés oxidativo, reguladores transcripciones e isoenzimas resistentes a estrés oxidativo están indicados mediante los colores naranja, verde y amarillo, respectivamente. La representación fue obtenida mediante CGview.

3.6. Estudio de la respuesta adaptativa a estrés oxidativo de *A. aquatilis* QD168 durante la degradación de benceno

Para estudiar la respuesta adaptativa a estrés oxidativo de *A. aquatilis* QD168 durante la degradación de benceno se analizó en una primera etapa el efecto de la exposición de los inductores clásicos de estrés oxidativo: H_2O_2 , fuente de radical $\cdot OH$, y PQ, como generador de radical $O_2^{\cdot -}$.

3.6.1. Efecto de la exposición a agentes oxidantes en la respuesta a estrés oxidativo de *A. aquatilis* QD168

El efecto de la exposición a los agentes oxidantes H_2O_2 y PQ en la respuesta a estrés oxidativo de *A. aquatilis* QD168 se estudió mediante determinación de susceptibilidad y viabilidad celular, daño a macromoléculas y cuantificación de la expresión de genes asociados a la respuesta adaptativa a estrés oxidativo en la cepa QD168 durante la exposición a H_2O_2 y PQ.

Para estudiar el efecto fisiológico que produce la exposición de agentes oxidantes en *A. aquatilis* QD168, se determinó una concentración subletal de exposición a H_2O_2 y PQ. Para esto, se evaluó el efecto de los agentes oxidantes H_2O_2 y PQ sobre *A. aquatilis* QD168 mediante ensayos de susceptibilidad y viabilidad celular a distintas concentraciones de ambos agentes oxidantes. En ambos casos se incluyeron controles de células no expuestas.

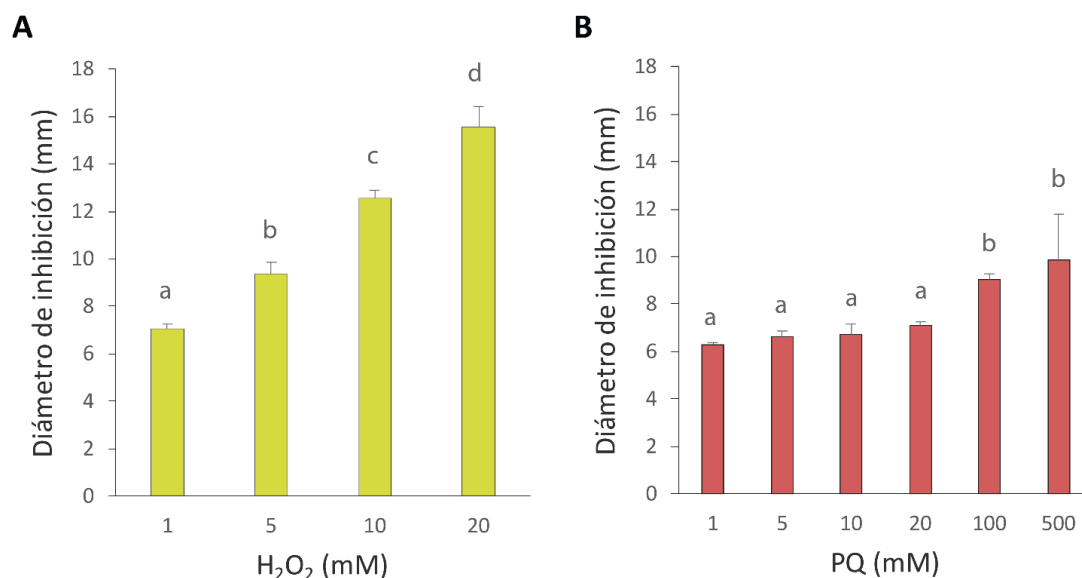


Figura 25. Susceptibilidad de *A. aquatilis* QD168 a agentes oxidantes. La cepa QD168 fue crecida en succinato 2 mM hasta fase exponencial (turbidez_{600nm} ~ 0,4) y fue expuesta a H_2O_2 (A) o PQ (B) en discos de difusión en agar. La zona de inhibición del crecimiento de 6 mm corresponde al diámetro del disco de difusión sin el agente oxidante. Las barras de error corresponden a la DE de tres valores independientes. Se realizó un ANOVA de una vía seguido de un test LSD de Fisher para identificar diferencias entre las condiciones analizadas (letras indican diferencias entre los grupos, p < 0,05).

Susceptibilidad de *A. aquatilis* QD168 durante la exposición a agentes oxidantes

Para evaluar susceptibilidad, células de la cepa QD168 se crecieron hasta fase exponencial en medio mínimo M9 modificado con NaCl (1,75% p/v) y succinato 2 mM como única fuente de carbono. Se expusieron las células a concentraciones crecientes de H₂O₂ (1, 5, 10 y 20 mM) y PQ (1, 5, 10, 20, 100 y 500 mM) en discos de difusión en agar. Se incubó por 24 h a 30°C y se midió la zona de inhibición del crecimiento. A partir de las concentraciones 5 mM de H₂O₂ (**Figura 25A**) y 100 mM de PQ (**Figura 25B**) se observó un efecto inhibitorio en la cepa QD168. Se observó que la cepa QD168 es más resistente a PQ que a H₂O₂. No se observó efecto en el crecimiento de la cepa QD168 utilizando concentraciones menores que 100 mM de PQ (**Figura 25B**). PQ provocó un efecto inhibitorio en las concentraciones de 100 mM y 500 mM. Sin embargo, no se observó una zona de inhibición del crecimiento definida como lo observado con H₂O₂ (datos no mostrados).

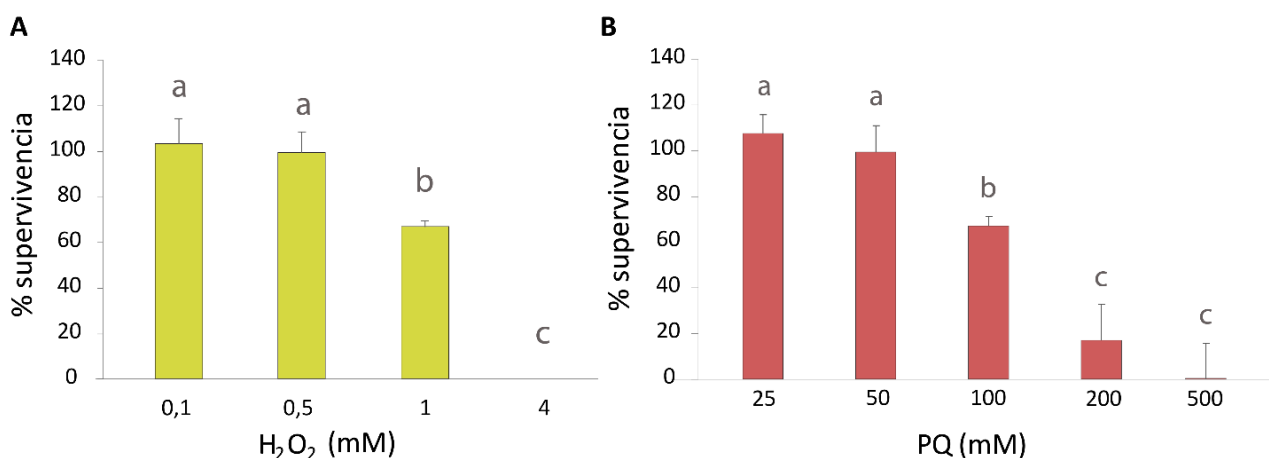


Figura 26. Supervivencia de *A. aquatilis* QD168 a agentes oxidantes. La cepa QD168 se creció en succinato 2 mM hasta fase exponencial ($turbidez_{600nm} \sim 0,4$) y se expuso a H₂O₂ (**A**) o PQ (**B**) por 60 min. Los valores se normalizaron con células no expuestas. Las barras de error corresponden a la DE de tres valores independientes. Se realizó un ANOVA de una vía seguido de un test LSD de Fisher para identificar diferencias entre las condiciones analizadas (letras distintas indican diferencias entre los grupos, $p < 0,05$).

Viabilidad de *A. aquatilis* QD168 durante la exposición a agentes oxidantes

Para determinar concentraciones subletales de los agentes oxidantes, se caracterizó la viabilidad celular de la cepa QD168 frente a su exposición por un tiempo de 60 min. *A. aquatilis* QD168 se creció hasta fase exponencial en medio mínimo M9 modificado con NaCl (1,75% p/v) y succinato 2 mM como única fuente de carbono. Las células se expusieron a concentraciones crecientes de H₂O₂ (0,1, 0,5, 1 y 4 mM) y PQ (25, 50, 100, 200 y 500 mM) por 60 min. Se evaluó la

supervivencia la cepa QD168 determinando UFC/ml de células expuestas a agentes oxidantes. Como control se utilizaron células expuestas a NaCl (1,75% p/v). Se determinaron como concentraciones subletales 100 μ M de H₂O₂ y 50 mM de PQ (Figura 26).

Daño a macromoléculas frente a la exposición a agentes oxidantes en *A. aquatilis* QD168

Para estudiar el efecto fisiológico de la exposición de agentes oxidantes sobre el daño a macromoléculas, se analizó el daño oxidativo a membrana celular y a proteínas de *A. aquatilis* QD168 durante la exposición a los agentes oxidantes H₂O₂ y PQ en concentraciones subletales. Células de la cepa QD168 se crecieron en medio mínimo M9 modificado con NaCl (1,75% p/v) y succinato (2 mM). Al alcanzar la fase exponencial se expusieron las células a H₂O₂ (100 μ M), PQ (50 mM) o una solución salina de NaCl 1,75% p/v durante 60 min. Se cuantificaron sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) como parámetro de daño a membrana, y grupos carbonilos en proteínas totales como parámetro de daño a proteínas.

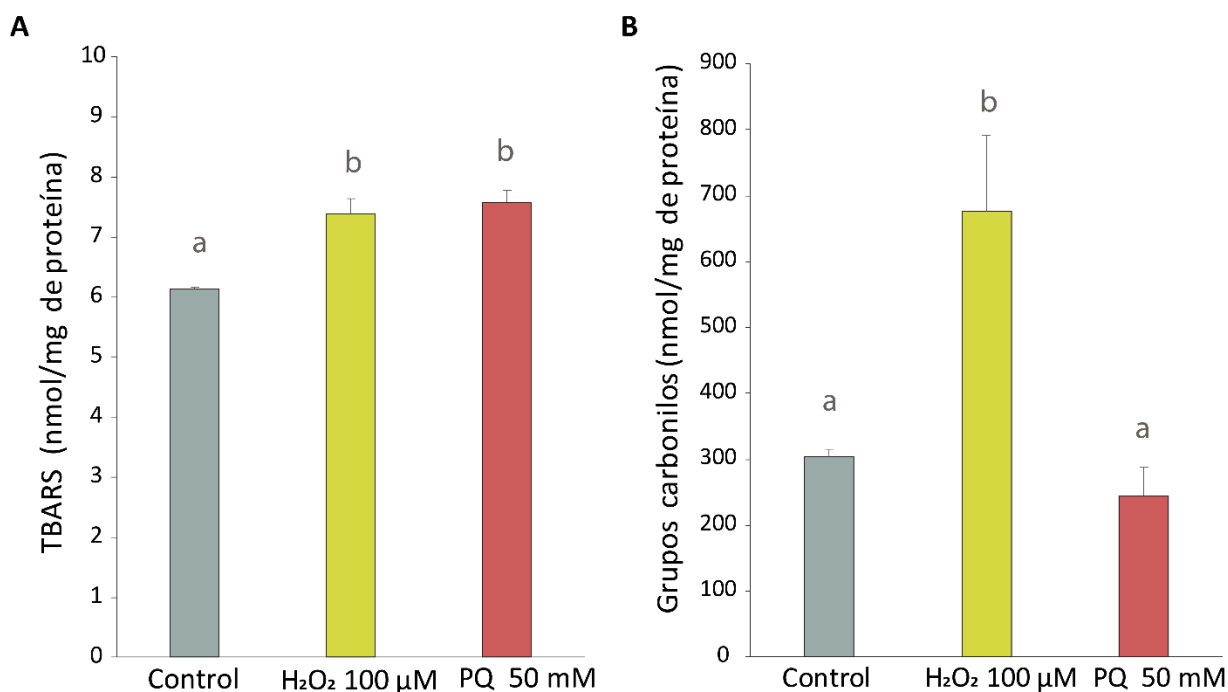


Figura 27. Daño a macromoléculas en *A. aquatilis* QD168 frente a la exposición a agentes oxidantes. La cepa QD168 se creció en succinato 2 mM hasta fase exponencial (turbidez_{600nm} ~ 0,4) y fue expuesta a H₂O₂ (100 μ M) o PQ (50 mM) por 60 min. Se cuantificaron TBARS (A) o grupos carbonilos totales (B). El control corresponde a células no expuestas a agentes oxidantes. Las barras de error corresponden a la DE de tres mediciones independientes. Se realizó un ANOVA de una vía seguido de un test LSD de Fisher para identificar diferencias entre las condiciones analizadas (letras distintas indican diferencias entre los grupos, p < 0,05).

Daño de membranas durante la exposición de agentes oxidantes en *A. aquatilis* QD168

Durante la exposición con concentraciones subletales de H₂O₂ (100 μM) y PQ (50 mM), se observó un aumento en el daño a membrana celular en comparación a células no expuestas, evidenciado indirectamente por un aumento en TBARS con respecto al control (**Figura 27A**). Se observó el mismo efecto frente a la exposición a ambos agentes oxidantes, aunque la concentración utilizada de PQ fue 500 veces mayor a la concentración de H₂O₂.

Carbonilación de proteínas durante la exposición a agentes oxidantes en *A. aquatilis* QD168

Se observó un aumento de la carbonilación de proteínas durante la exposición a H₂O₂ (100 μM) en comparación a bacterias no expuestas a agentes oxidantes. Las células de la cepa QD168 expuestas a 50 mM de PQ (**Figura 27B**) no mostraron cambio de la carbonilación de proteínas en comparación al control.

Análisis transcripcional de genes asociados a la respuesta adaptativa a estrés oxidativo en *A. aquatilis* QD168 durante la exposición a agentes oxidantes

Para evaluar la respuesta adaptativa a estrés oxidativo en *A. aquatilis* QD168 durante la exposición a agentes oxidantes, se estudió la expresión de genes durante la exposición a concentraciones subletales de H₂O₂ y PQ. Se cuantificaron los niveles de transcritos de los genes que codifican las enzimas alquil hidropéroxido reductasa (*ahpC1*, D3M96_12750; *ahpC2*, D3M96_15655), catalasa E (*katE*, D3M96_12900), superóxido dismutasa C (*sodC1*, D3M96_17950), fumarato hidratasa clase II (*fumC*, D3M96_10680) y los reguladores transcripcionales OxyR (*oxyR*, D3M96_10585), PerR (*perR*, D3M96_00075) y SoxR (*soxR1*, D3M96_08910; *soxR2*, D3M96_14980). Para estudiar el nivel de expresión de los genes se creció a la cepa QD168 en succinato (2 mM) hasta fase exponencial, para luego ser expuestas a concentraciones subletales de H₂O₂ (0,5 mM) o PQ (50 mM) por 60 min. Como condición control se utilizaron cultivos expuestos a una solución salina de NaCl (1,75% p/v). Los genes ARNr 16S y *ftsZ* se utilizaron como genes normalizadores.

Los genes que codifican las enzimas alquil hidropéroxido reductasa presentaron un mayor nivel de cambio por exposición a H₂O₂, observándose un aumento (> 5 veces) en la expresión del gen *ahpC2* y una disminución (> 4 veces) del transcrito *ahpC1* en comparación a bacterias no expuestas a agentes oxidantes

(Figura 28). Durante la exposición a H₂O₂, se observó un aumento (≥ 2 veces) de los transcritos *ahpC2* y *soxR1* en relación con el control. Se evidenció un leve aumento (< 2 veces) de los genes que codifican las enzimas superóxido dismutasa C (*sodC1*), fumarato hidratasa II (*fumC*), y los reguladores transcripcionales PerR (*perR*) y SoxR2 (*soxR2*) al comparar con bacterias sin exposición a H₂O₂.

Durante la exposición a PQ de la cepa QD168, se determinó un aumento >3 veces de los transcritos de los genes *ahpC1* y *soxR2*, mientras que el gen *ahpC2* presenta un aumento >7 veces comparado con los niveles de transcrito observados en bacterias no expuestas. La expresión de los genes *ahpC1*, *ahpC2*, *fumC*, *soxR1* y *soxR2* aumentaron ≥ 2 veces en relación con el control. Los genes *katE*, *sodC1*, *oxyR* y *perR* mostraron un leve aumento (< 2 veces) con respecto a la condición control (Figura 28).

Entre los cambios de niveles de expresión de los transcritos de células de *A. aquatilis* QD168 expuestas a concentraciones subletales de H₂O₂ y PQ, en general, se observó un mayor aumento en los niveles de transcritos frente a la exposición a PQ que frente a H₂O₂ en relación a la condición control (Figura 28). Se observó una diferencia significativa ($p > 0.05$) en los niveles de los transcritos *ahpC1*, *fumC*, *oxyR* y *soxR2* (Figura 28) al comparar la exposición a cada agente oxidante.

3.6.2. Efecto de la degradación de benceno en la respuesta adaptativa a estrés oxidativo de *A. aquatilis* QD168

Para estudiar el efecto de la degradación de benceno sobre la respuesta adaptativa a estrés oxidativo de *A. aquatilis* QD168, se evaluó daño a macromoléculas y se realizó un análisis transcripcional de genes asociados a la respuesta adaptativa a estrés oxidativo durante la fase exponencial de crecimiento en benceno. Se utilizó como control células de la cepa QD168 en fase exponencial de crecimiento en succinato. Se evaluó el efecto de la degradación de benceno en el daño a membrana celular y proteínas utilizando el crecimiento en succinato de la cepa Q1D68 como control. Se obtuvieron muestras de fase exponencial del crecimiento de la cepa QD168 en benceno (5 mM) y succinato (2 mM) como control. Se cuantificó TBARS y grupos carbonilos en extractos de proteínas totales.

Daño de la membrana celular en *A. aquatilis* QD168 durante la degradación de benceno

Los niveles de TBARS producidos durante la degradación de benceno por la cepa QD168 aumentaron en comparación al crecimiento en succinato, sugiriendo

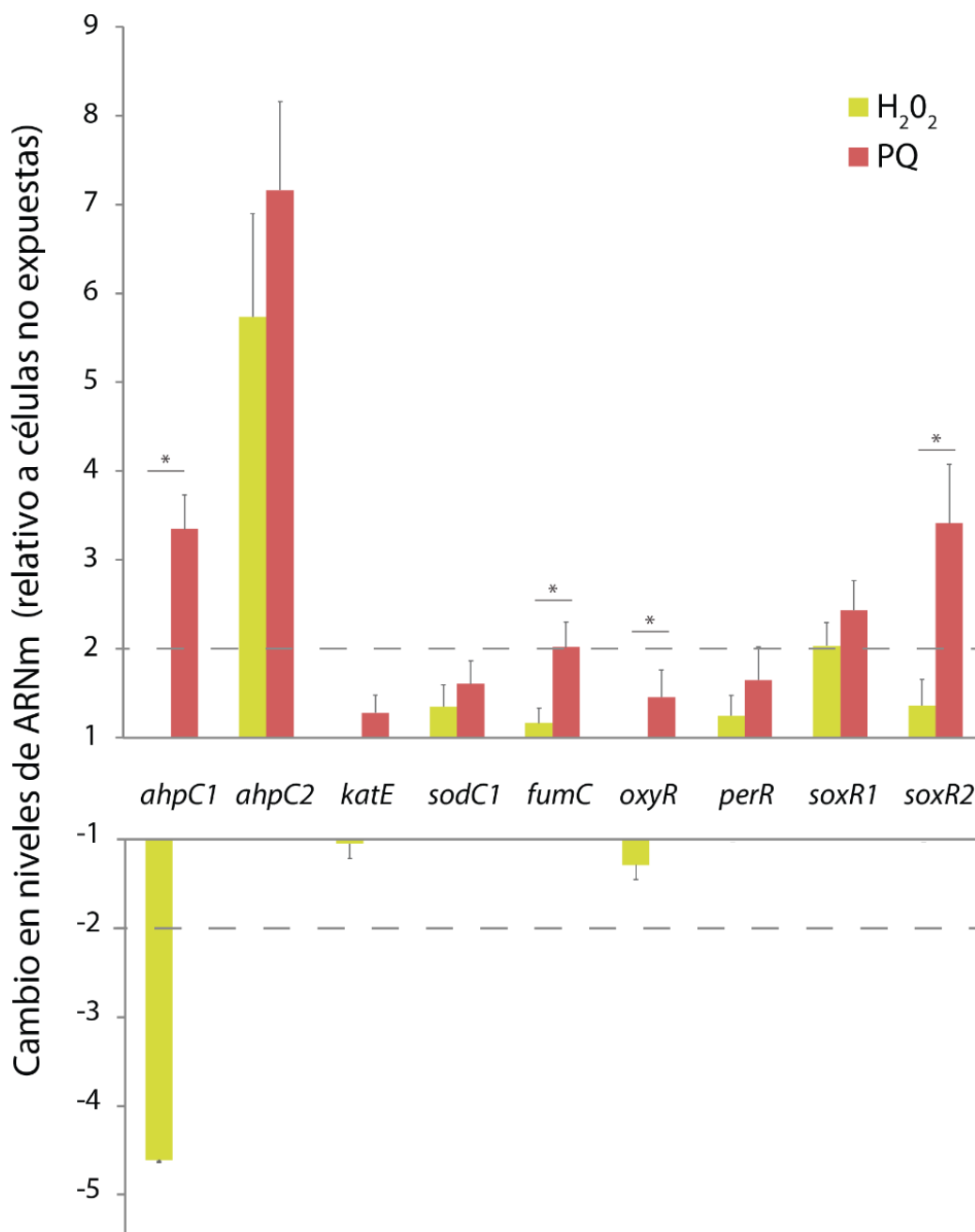


Figura 28. Niveles de expresión de genes asociados a la respuesta adaptativa a estrés oxidativo en *A. aquatilis* QD168 frente a la exposición a H₂O₂ y PQ. Se muestran los niveles de expresión frente a la exposición a H₂O₂ (0,5 mM) y PQ (50 mM) de los genes que codifican para las enzimas alquil hidroperóxido reductasa (*ahpC1*, D3M96_12750; *ahpC2*, D3M96_15655), catalasa E (*katE*, D3M96_12900), superóxido dismutasa C (*sodC1*, D3M96_17950), fumarato hidratasa clase II (*fumC*, D3M96_10680), los reguladores transcripcionales OxyR (*oxyR*, D3M96_10585), PerR (*perR*, D3M96_00075) y SoxR (*soxR1*, D3M96_08910; *soxR2*, D3M96_14980). Se muestran los niveles de cambio relativo a la condición sin exposición a agentes oxidantes y utilizando como genes normalizadores los genes ARNr 16S (D3M96_01130) y *ftsZ* (D3M96_04730) integrados en el mismo análisis. Las barras de cada condición representan la media de cada intervalo. Las barras de error corresponden a la DE de la razón de cambio de tres réplicas biológicas independientes. Se realizó un t-test de dos colas para identificar diferencias entre las condiciones analizadas (* = p < 0,05).

indirectamente un incremento en la lipoperoxidación de la membrana celular en estas condiciones (**Figura 29A**). La degradación de benceno por la cepa QD168 provocó un aumento en la producción de TBARS, similar a lo observado durante la exposición a agentes oxidantes (**Figura 27A**).

Carbonilación de proteínas en *A. aquatilis* QD168 durante la degradación de benceno

Se evidenció un aumento en el contenido de grupos carbonilos totales en extractos de proteínas durante la degradación de benceno por la cepa QD168 (**Figura 29B**) en comparación al crecimiento en succinato. El crecimiento de la cepa QD168 en benceno (5 mM) causó un aumento en la carbonilación de proteínas, similar a lo observado durante la exposición a H₂O₂ (**Figura 27B**).

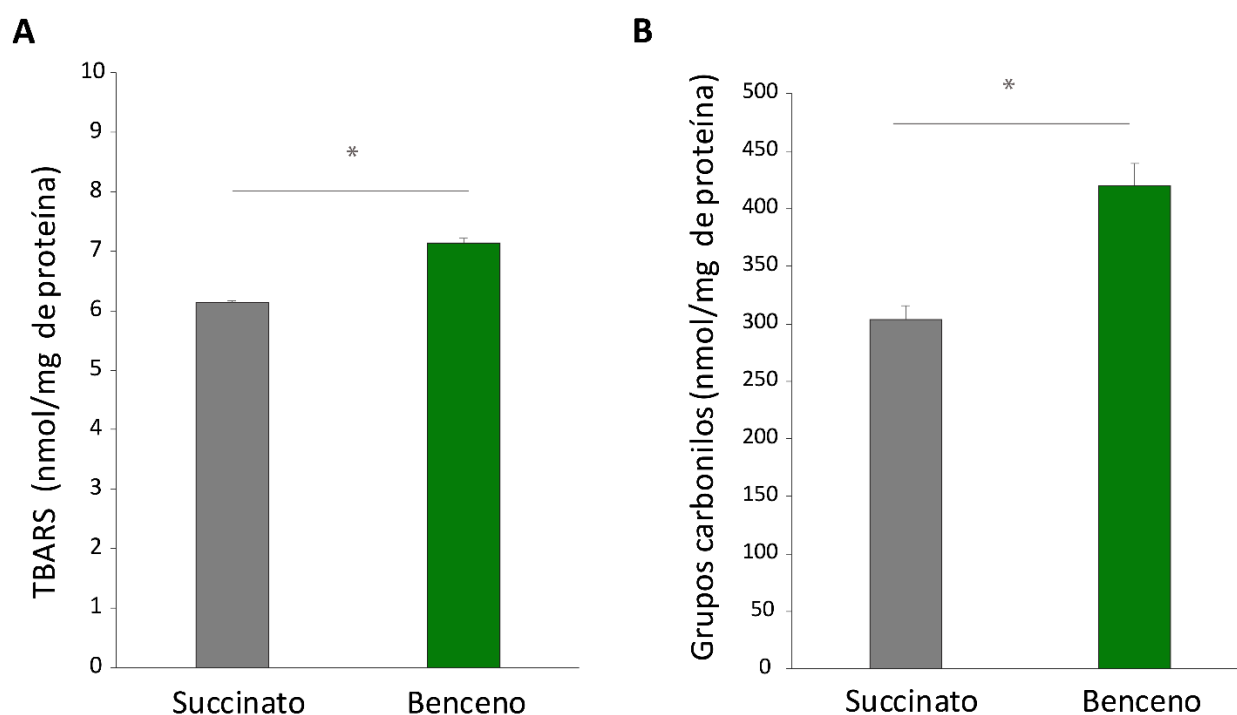


Figura 29. Daño a macromoléculas en *A. aquatilis* QD168 durante la degradación de benceno. La cepa QD168 se creció en medio mínimo M9 modificado con NaCl (1.75%) y benceno (5 mM) como única fuente de carbono hasta fase exponencial (turbidez 600nm ~ 0,3) o en succinato (2 mM) como única fuente de carbono hasta fase exponencial (turbidez 600nm ~ 0,4). Se cuantificaron TBARS (**A**) o grupos carbonilos totales (**B**). Las barras de error corresponden a la DE de tres valores independientes. Se realizó un t-test de dos colas para identificar diferencias entre las condiciones analizadas (* = p <0,05).

Análisis de la expresión de genes asociados a la respuesta adaptativa a estrés oxidativo de *A. aquatilis* QD168 durante la degradación de benceno

Se estudió la expresión de genes asociados a la respuesta adaptativa a estrés oxidativo de *A. aquatilis* QD168 durante la degradación de benceno en fase

exponencial de crecimiento. Se determinaron los niveles de transcritos de los genes que codifican las enzimas alquil hidropéroxido reductasa (*ahpC1*, D3M96_12750; *ahpC2*, D3M96_15655), catalasa E (*katE*, D3M96_12900), superóxido dismutasa C (*sodC1*, D3M96_17950), fumarato hidratasa clase II (*fumC*, D3M96_10680) y los reguladores transcripcionales OxyR (*oxyR*, D3M96_10585), PerR (*perR*, D3M96_00075) y SoxR (*soxR1*, D3M96_08910; *soxR2*, D3M96_14980). Para estudiar el nivel de expresión de los genes asociados a la respuesta adaptativa a estrés oxidativo se creció a la cepa QD168 en benceno (5 mM) y se realizó la extracción de ARN total de células en fase exponencial. Como condición control se emplearon células en fase exponencial de la cepa QD168 en medio mínimo M9 modificado con NaCl (1,75% p/v) utilizando succinato como única fuente de carbono. Los genes de ARNr 16S y *ftsZ* se utilizaron como genes normalizadores.

Durante el crecimiento en benceno de *A. aquatilis* QD168 se determinó un aumento > 3 veces en la expresión del gen que codifica la enzima antioxidante *ahpC2* y el regulador transcripcional *soxR2*, un aumento > 5 veces de los transcritos de los genes que codifican la isoenzima fumarato hidratasa clase II (*fumC*) y la enzima antioxidante AhpC1 (*ahpC1*) y un aumento > 8 veces del transcrito del regulador transcripcional OxyR en comparación a las bacterias crecidas en succinato como única fuente de carbono. En fase exponencial del crecimiento de la cepa QD168 en benceno (5 mM), se observó un aumento (≥ 2 veces) de los genes *ahpC1*, *ahpC2*, *fumC*, *oxyR*, y *soxR2*, y una disminución (≥ 2 veces) del gen *katE* en comparación al control (**Figura 30**). Se observó una disminución > 2 veces del gen que codifica la enzima catalasa E (*katE*) en comparación al crecimiento en succinato. Los niveles de transcrito del gen que codifica el regulador SoxR1 aumentaron levemente (< 2 veces) en comparación al control.

En general, al analizar la expresión de los genes asociados a la respuesta adaptativa a estrés oxidativo durante la degradación de benceno en la bacteria *A. aquatilis* QD168, se observó un patrón similar de inducción a la observada durante la exposición a agentes oxidantes (**Figura 30**).

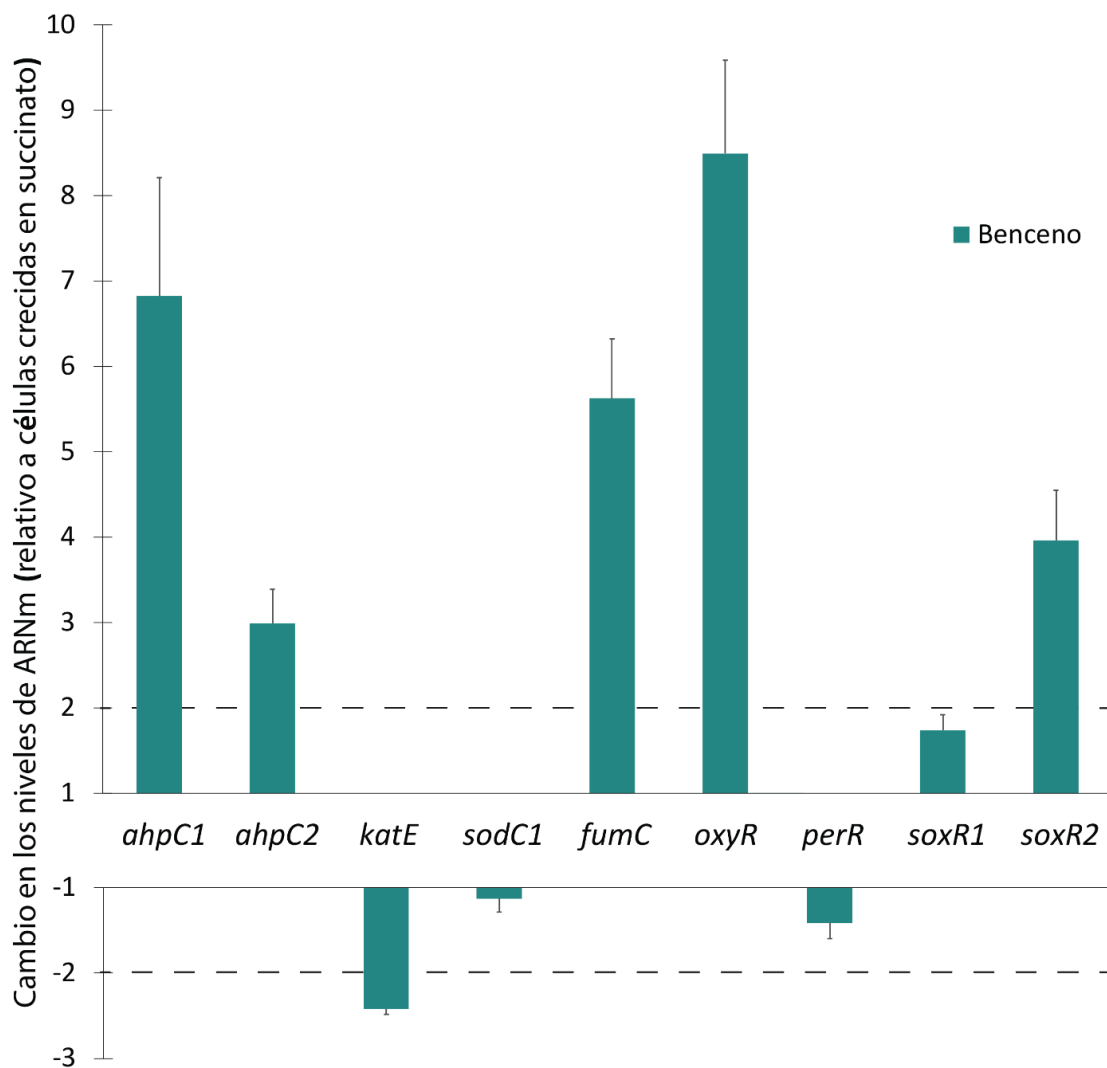


Figura 30. Niveles de expresión de genes asociados a la respuesta adaptativa a estrés oxidativo en *A. aquatilis* QD168 durante la degradación de benceno. Se muestran los niveles de expresión durante el crecimiento en benceno en fase exponencial temprana o en fase exponencial tardía de los genes que codifican para las enzimas alquil hidroperóxido reductasa (*ahpC1*, D3M96_12750; *ahpC2*, D3M96_15655), catalasa E (*katE*, D3M96_12900), superóxido dismutasa C (*sodC1*, D3M96_17950), fumarato hidratasa clase II (*fumC* D3M96_10680), los reguladores transcripcionales OxyR (*oxyR*, D3M96_10585), PerR (*perR*, D3M96_00075) y SoxR (*soxR1*, D3M96_08910; *soxR2*, D3M96_14980). Se muestran los niveles de cambio relativo a la condición sin exposición a agentes oxidantes y utilizando como genes normalizadores los genes ARNr 16S (D3M96_01130) y *ftsZ* (D3M96_04730) Las barras de cada condición representan la media de cada intervalo. Las barras de error corresponden a la DE de la razón de cambio de tres réplicas biológicas independientes.

4. DISCUSIÓN

El metabolismo aerobio desencadena un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno, creando una situación de estrés oxidativo en el compartimiento intracelular. Durante el catabolismo aerobio de compuestos aromáticos, estrés oxidativo endógeno puede ser producido debido a reacciones de oxigenación defectuosas, daño a membranas celulares y desacoplamiento catalítico de las dioxigenasas involucradas (Kim y Park, 2014). En bacterias, se ha descrito un aumento en la respuesta a estrés oxidativo durante la exposición a fenol y catecol en *Bacillus subtilis* 168 (Le *et al.*, 2006), como también durante la degradación de fluoranteno en *Mycobacterium* sp. JS14 (Lee *et al.*, 2007) y bifenilos policlorados (PCBs) en *Paraburkholderia xenovorans* LB400 (Agulló *et al.*, 2007; Ponce *et al.*, 2011). Aunque se ha reportado un aumento en la expresión de sistemas enzimáticos antioxidantes durante la degradación de compuestos aromáticos, pocos estudios han profundizado en determinar la respuesta a estrés oxidativo durante el catabolismo de estos compuestos. *Alcaligenes aquatilis* QD168 es una bacteria marina aislada desde sedimentos expuestos a hidrocarburos en un derrame petrolero en la bahía de Quintero, Valparaíso, Chile. Los sitios contaminados con petróleo crudo son ambientes caracterizados por un alto contenido de hidrocarburos aromáticos, encontrando a menudo los compuestos monoaromáticos: benceno, tolueno, etilbenceno y los tres isómeros de xileno, comúnmente conocidos como BTEX (Fuentes *et al.*, 2014). En este trabajo, el genoma de la bacteria *A. aquatilis* QD168 fue secuenciado y anotado para identificar genes asociados a la respuesta adaptativa a estrés oxidativo y del catabolismo de compuestos aromáticos, además de estudiar la respuesta adaptativa a estrés oxidativo durante la degradación de compuestos aromáticos. Se realizó una reconstrucción metabólica del catabolismo aromático de la cepa QD168 mediante un análisis *in silico* para luego corroborar funcionalmente las rutas identificadas. Asimismo, se identificaron determinantes genéticos en *A. aquatilis* QD168 involucrados en la respuesta a estrés oxidativo y se estudió la respuesta fisiológica de *A. aquatilis* QD168 frente a la exposición de H₂O₂ y el compuesto de ciclaje redox PQ. La ruta catabólica del benceno fue caracterizada y elegida para estudiar la respuesta fisiológica de estrés oxidativo durante la degradación de este compuesto aromático en la cepa QD168.

Caracterización fisiológica y bioquímica de *A. aquatilis* QD168

El medioambiente marino varía constantemente en cuanto a sus condiciones osmóticas externas y oscilaciones de temperatura del fondo marino. Bacterias han desarrollado un gran repertorio de mecanismos de osmoprotección ante estos cambios. Uno de estos mecanismos es la producción de solutos compatibles como azúcares (*e.g.*, trehalosa y sacarosa), polioles (*e.g.*, glicerol, sorbitol y manitol), betaínas (*e.g.*, glicina-betaina), amino ácidos (prolina, glutamato, glutamina y alanina) y ectoínas (ectoína y 5-hidroxiectoína) (Krämer, 2010). La ectoína es uno de los solutos compatibles encontrados en microorganismos halotolerantes y halófilos. La hidroxilación del soluto ectoína a 5-hidroxiectoína mediante una ectoína hidroxilasa codificada en el gen *ectD* confiere propiedades protectoras adicionales (Pastor *et al.*, 2010). La cepa QD168 posee en su genoma 4 genes que codifican la biosíntesis de ectoína/5-hidroxiectoína (*ectABCD*), y 4 genes que codifican el transporte de estos solutos (*ehuBCDA*), lo cual podría explicar la tolerancia de esta bacteria a NaCl (10 % w v⁻¹). La tolerancia a NaCl por cepas de *Alcaligenes* spp. ha sido reportada previamente (Lu *et al.*, 2017). *A. aquatilis* CCTCC 2015279^T mostró una tolerancia a NaCl hasta 7% w v⁻¹, mientras que *A. faecalis* subsp. *faecalis* CGMCC 11786^T, *A. faecalis* subsp. *parafaecalis* DSM 13975^T y *A. faecalis* subsp. *phenolicus* DSM 16503^T toleran NaCl hasta 8% w v⁻¹. *A. endophyticus* AER10^T ha mostrado un mayor tolerancia a NaCl, observando crecimiento hasta un 10% w v⁻¹ (Lu *et al.*, 2017). Basharat *et al.* identificó la agrupación génica de producción de ectoína en la cepa *Alcaligenes faecalis* subsp. *phenolicus* MB207 (Basharat *et al.*, 2018), por lo que este mecanismo podría ser una característica del género *Alcaligenes*. No obstante, además de la presencia de los genes de síntesis y transporte de ectoína/5-hidroxiectoína, la cepa QD168 posee un transportador de glicina-betaina (OusVW) que podría estar implicado en esta tolerancia a salinidad.

Las oscilaciones de temperatura también son factores importantes que considerar del medioambiente marino. Bacterias del género *Alcaligenes* son clasificadas como bacteria mesófilas, teniendo un rango de temperatura de crecimiento de 10 a 40°C (Abbas *et al.*, 2015; Lu *et al.*, 2017). Las cepas tipo correspondientes a las subespecies de *A. faecalis* (subsp. *faecalis*, *phenolicus* y *parafaecalis*) poseen un óptimo rango de crecimiento entre 33 y 37°C, mientras que las cepas *A. aquatilis* 22996^T y *A. pakistanensis* NCCP-650^T poseen un óptimo rango de crecimiento entre 25 y 33°C (Abbas *et al.*, 2015). La cepa QD168 posee un

crecimiento óptimo a 30°C y presenta muerte celular a los 40°C siendo una bacteria mesófila.

Identificación taxonómica y posicionamiento filogenómico de la cepa QD168

La secuenciación del gen ARNr 16S ha sido una herramienta ampliamente utilizada para la identificación taxonómica de bacterias y arqueas. Un primer intento de clasificar la cepa QD168 mediante secuenciación parcial del gen ARNr 16S reveló un 100% de similitud con la cepa tipo *Alcaligenes aquatilis* LMG 22996^T (datos no publicados). La obtención del genoma completo permitió un análisis de la secuencia completa del gen ARNr 16S obteniendo un valor del 99,9% con *A. aquatilis* LMG 22996^T seguida de valores menores a 98,3% con las tres cepas tipo restantes (*A. faecalis*, *A. endophyticus* y *A. pakistanensis*). Estos valores son menores al 98,65% de similitud del gen ARNr 16S propuesto como límite de delineación de especies (Kim *et al.*, 2014). De todas formas, para corroborar la clasificación de la cepa QD168 como miembro de la especie *A. aquatilis*, se realizó un MLSA de tres genes (ARNr 16S, *gyrB* y *nirK*) con las cuatro cepas tipo que conforman el género *Alcaligenes*. Estos genes han sido usados previamente como marcadores filogenéticos en la descripción de especie de *A. pakistanensis* (Abbas *et al.*, 2015). Los valores obtenidos por el MLSA permiten discriminar sistemáticamente a la cepa QD168 como miembro de la especie *A. aquatilis*.

La secuenciación de genoma completo se ha convertido en un análisis de rutina para entender la relación filogenética entre cepas bacterianas (Sangal *et al.*, 2016; Mahato *et al.*, 2017). De acuerdo con nuestro conocimiento, este es el primer estudio filogenómico realizado en el género *Alcaligenes*. La posición filogenómica de *A. aquatilis* QD168 entre los miembros analizados del género *Alcaligenes*, revelaron el mismo patrón de agrupamiento utilizando el MLSA de 35 genes marcadores que utilizando el límite propuesto para la delineación de especies del 95% de ANIb (Konstantinidis y Tiedje, 2005; Richter y Rosselló-Móra, 2009). Usando ambos análisis, cinco perfiles de agrupamiento fueron identificados entre las cepas de *Alcaligenes* spp. Los genomas disponibles correspondientes al género *Alcaligenes* se encuentran altamente representados por la especie *A. faecalis*, conformando cerca del 84,6% de todos los genomas analizados. Sin embargo, la presencia de al menos una cepa de *A. faecalis* en cada grupo filogenómico identificado indica una clasificación errónea a nivel de especie en este género. Se ha descrito previamente una clasificación errónea a nivel de especie durante los análisis taxonómicos

basados en genomas completos de los géneros *Amycolatopsis* (Sangal *et al.*, 2018), *Pseudomonas* (Gomila *et al.*, 2017) y *Caldicellulosiruptor* (Lee *et al.*, 2018). El género *Alcaligenes* se encuentra actualmente conformado por cuatro especies, representadas por *A. faecalis* (Accession N°: AB680368.1), *A. aquatilis* (Van Trappen *et al.*, 2005), *A. pakistanensis* (Abbas *et al.*, 2015) y *A. endophyticus* (Lu *et al.*, 2017), pero sólo el genoma de la cepa tipo de *A. faecalis* (DSM 30030^T) se encuentra disponible. En esta tesis se recomienda la secuenciación del genoma completo de las cepas tipo correspondientes a cada especie del género *Alcaligenes* para obtener mayor seguridad sobre la identificación taxonómica de sus miembros.

A. faecalis representa la especie más estudiada de este género y tres subespecies han sido previamente caracterizadas: *A. faecalis* subsp. *faecalis*; *A. faecalis* subsp. *parafaecalis* (Schroll *et al.*, 2001) y *A. faecalis* subsp. *phenolicus* (Rehfuss y Urban, 2005). Los bajos valores de ANIb obtenidos (< 92.3%) y el MLSA entre *A. faecalis* subsp. *faecalis* DSM 30030^T y *A. faecalis* subsp. *phenolicus* DSM 16503^T indican dos linajes filogenéticos diferentes. Estos resultados sugieren la reclasificación de *A. faecalis* subsp. *phenolicus* en *Alcaligenes phenolicus* sp. nov. La reclasificación de subespecies a especies apoyado en análisis filogenómicos ha sido reportada previamente en *Clavibacter michiganensis* (Li *et al.*, 2018), *Leuconostoc mesenteroides* (Jeon *et al.*, 2017) y *Fusobacterium nucleatum* (Kook *et al.*, 2017).

A. aquatilis QD168 es parte del grupo filogenómico III, representado por las cepas *A. aquatilis* BU33N (N° de acceso: GCA_003076515), *A. faecalis* JQ135 (Zhang *et al.*, 2018), *A. faecalis* UBA7629 y *A. faecalis* UBA3227 (Parks *et al.*, 2017). La identificación de las cepas QD168 y BU33N por homología del gen ARNr 16S muestran una similitud sobre el 99,9% con *A. aquatilis* LMG 22996^T. Aunque la cepa tipo de la especie *A. aquatilis* aún no ha sido secuenciada, la información presentada en esta tesis indica que el posicionamiento filogenómico de *A. aquatilis* se encuentra en el grupo filogenómico III.

Identificación de genes del catabolismo aromático en la cepa QD168

Proteobacterias aisladas desde sitios contaminados son conocidas por degradar un amplio espectro de compuestos aromáticos (Chain *et al.*, 2006; McLeod *et al.*, 2006; Pérez-Pantoja *et al.*, 2008, 2012). Análisis genómicos de bacterias ambientales, tales como las cepas *Pseudomonas putida* KT2240, *Parabukholderia xenovorans* LB400 y *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134 (Jimenez *et al.*, 2002; Chain *et al.*, 2006; Pérez-Pantoja *et al.*, 2008) han revelado metabolismos versátiles y un amplio repertorio enzimático para la degradación de compuestos aromáticos. Según

nuestro conocimiento, esta es la primera caracterización genómica sobre el catabolismo de compuestos aromáticos realizada a un miembro actual del género *Alcaligenes*, así como también a la especie *A. aquatilis*.

Un total de siete vías centrales y 16 vías/reacciones periféricas fueron identificadas en el genoma de *A. aquatilis* QD168. Las vías centrales incluyen las vías del catecol, protocatecuato, 3-(2,3-dihidroxifenil)-propionato, fenilacetil-CoA, homogentisato, 2,5-dihidroxinicotinato y gentisato. Además, la cepa QD168 fue capaz de utilizar 3-hidroxibenzoato, 4-hidroxibenzoato, benzoato, benceno, cinamato, 3-hidroxicinamato, nicotinato, triptófano, antranilato, *p*-aminobenzoato, benzamida, tolueno y bifenilo como fuente de carbono para su crecimiento. Estos resultados apoyan la predicción de las vías periféricas de benzoato (*benABCD*), cinamato (*hcaBCFE*), nicotinato (*nicABC*), triptófano (*kynABC*), 4-hidroxibenzoato (*phbA*), antranilato (*andAaAbAcAd*) y benceno (*dmpKLMNOP*) identificadas en el genoma de QD168. Sin embargo, para los compuestos: 3-hidroxibenzoato, 3-hidroxicinamato, benzamida, *p*-aminobenzoato, bifenilo y tolueno, en los que se observó crecimiento de la cepa QD168, no se identificaron genes que codifican proteínas relacionadas a rutas de degradación de estos compuestos previamente descritos en literatura. Adicionalmente, 18 genes (*e.g.*, monooxigenasas, hidroxilasas y dioxigenasas hidroxilantes de anillo aromático) no pudieron ser asociados a una ruta catabólica específica, pudiendo jugar un rol clave en la degradación de estos compuestos. La falta de un contexto genómico claro y los bajos porcentajes de identidad contra oxigenasas con una función validada experimentalmente no permitieron su asignación a una ruta catabólica aromática. Se necesitan análisis funcionales adicionales para determinar el papel catabólico de estos genes en la cepa QD168 durante la degradación de los compuestos aromáticos. Sin embargo, aunque los genes que cofican la ruta de degradación de tolueno no fueron encontrados en la cepa QD168, la presencia de los genes *dmp* (fenol hidroxilasa multicomponente) podrían explicar el crecimiento en tolueno observado en la cepa QD168. En *Arthrobacter* sp. W1 y *Comamonas testosteroni*, una fenol hidroxilasa, codificada por los genes *dmp*, cataliza la oxidación de benceno y tolueno (Ma *et al.*, 2013; Teramoto *et al.*, 1999).

Las cepas del género *Alcaligenes* han presentado una amplia capacidad catabólica frente a compuestos aromáticos (Kiyohara *et al.*, 1982; Hopper y Kaderbhai, 1999; Rehfuss y Urban, 2005; Kumar *et al.*, 2013; Sagarkar *et al.*, 2014; Singha *et al.*, 2017; Basharat *et al.*, 2018), pero pocos estudios han revelado los determinantes genéticos responsables de su metabolismo. *A. faecalis* JQ135 es una

cepa aislada desde aguas residuales municipales de una planta de tratamiento en China, capaz de degradar los compuestos derivados de piridina: picolinato, 5-hidroxicolinato y nicotinato (Qiu *et al.*, 2017, 2018). La cepa JQ135 es la única bacteria del género que posee estudios funcionales de genes catabólicos aromáticos involucrados en la degradación de picolinato y 5-hidroxicolinato. El genoma de *A. faecalis* JQ135 fue secuenciado y los genes *nic* descritos en *P. putida* KT2440 de degradación de nicotinato fueron identificados (Zhang *et al.*, 2018). Además, la cepa JQ135 pertenece al grupo filogenómico III, por lo que debería ser reclasificada como miembro de la especie *A. aquatilis*. Aunque varias cepas de *Alcaligenes* spp. han sido descritas por su capacidad de degradar compuestos aromáticos y sus genomas han sido secuenciados, existe poca información sobre la fisiología y respuesta adaptativa a estrés de cepas pertenecientes al género *Alcaligenes* en presencia de contaminantes ambientales.

Estudio funcional de la vía del benceno en *A. aquatilis* QD168

Los compuestos aromáticos son importantes contaminantes ambientales, los cuales pueden estar presentes como componentes de pesticidas, herbicidas, tintes y petróleo, como también en compuestos industriales como los bifenilos policlorados (PCBs) (Diaz *et al.*, 2001; Fuentes *et al.*, 2014; Harwood y Parales, 1996). Los compuestos monoaromáticos, tales como: benceno, tolueno, etilbenceno y los tres isómeros de xileno constituyen la fracción volátil de hidrocarburos aromáticos del petróleo encontrados a menudo en sitios industriales contaminados (Fuentes *et al.*, 2014). En esta tesis, benceno fue utilizado como el compuesto aromático modelo debido a la amplia distribución y toxicidad de compuestos BTEX en sitios industriales contaminados, además de ser un compuesto ampliamente estudiado en degradación bacteriana de compuestos aromáticos. Asimismo, el benceno es considerado el más tóxico y peligroso de todos los compuestos BTEX (Ross, 2000). Varias cepas bacterianas marinas han sido descritas como degradadoras de compuestos BTEX (Bae *et al.*, 2018; Jiang *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2008); no obstante, la información sobre los genes catabólicos y la evidencia funcional involucrada en el catabolismo de BTEX por *Alcaligenes* spp. es limitada. Algunos reportes han descrito la degradación de benceno por *Achromobacter xylosoxydans* Y234 (Daugulis *et al.*, 2003; Powell *et al.*, 2014), perteneciente a la familia *Alcaligenaceae*, y filogenéticamente cercana al género *Alcaligenes*. En esta tesis, se reportó un análisis genómico y funcional de la vía de benceno en *A. aquatilis* QD168. La agrupación génica *dmpRKLMNOP* que codifica para la enzima multicomponente

fenol hidroxilasa y un regulador transcripcional (DmpR) fueron identificados en QD168. Un aumento en la expresión del gen *dmpP*, que codifica la proteína P5 de la fenol hidroxilasa, fue observada durante el crecimiento de *A. aquatilis* QD168 en benceno (Figura 22). Además, fenol fue detectado como un intermediario durante su crecimiento en benceno, sugiriendo que la degradación de benceno en la cepa QD168 ocurre vía fenol como intermediario, siguiendo con la formación de catecol. En la cepa QD168, se propone la ruta catabólica de benceno mediante apertura de catecol en posición *orto*, debido a un significativo aumento en la expresión del gen *catA* (Figura 31). Además, durante el crecimiento de *A. aquatilis* QD168 en benceno no se observó coloración amarilla-verdosa, evidencia de la apertura de catecol en posición *meta* y producción de 2-hidroxiomuconato semialdehído.

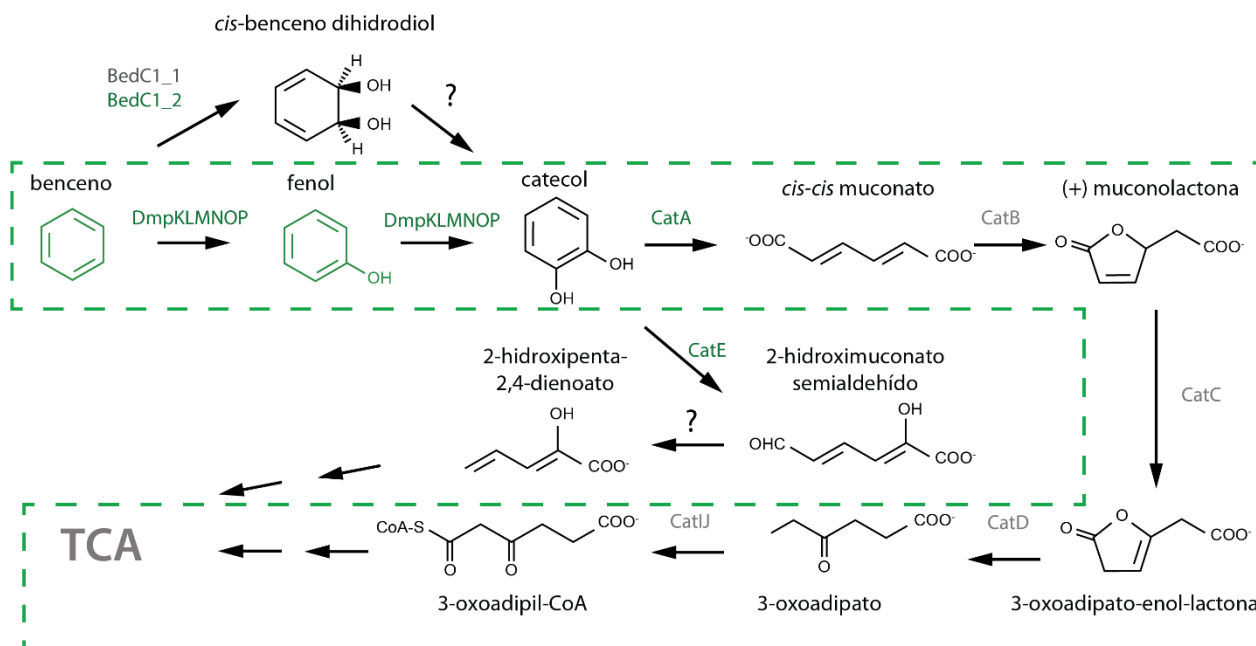


Figura 31. Ruta catabólica de benceno propuesta en *A. aquatilis* QD168. Los compuestos y enzimas representadas en verde presentaron evidencia experimental durante el desarrollo de esta tesis. La línea punteada verde destaca la ruta catabólica propuesta para la cepa QD168.

La ruta del catabolismo de fenol mediante la apertura *meta* de catecol ha sido mejor caracterizada en *Pseudomonas* sp. CF600, codificada en el operón *dmpKMNLOPQBCDEFGHI*. Los genes *dmpKMNLOP* codifican la enzima multicomponente fenol hidroxilasa (ruta superior), mientras que los genes *dmpQBCDEFGHI* codifican las enzimas requeridas para la apertura *meta* (Shingler *et al.*, 1992). El regulador transcripcional DmpR de *Pseudomonas* sp. CF600 ha sido caracterizado como un activador de enzimas catabólicas de fenol y sus derivados, siendo activado por un amplio número de compuestos aromáticos, incluyendo: fenol, catecol, cresol y benzaldehído (Shingler y Moore, 1994). Divergiendo de ese

modelo, la degradación de benceno y fenol mediante la apertura *orto* del catecol ha sido demostrado en *Pseudomonas* sp. M1 codificado por la agrupación génica *phc* (Santos y Sá-Correia, 2007). Los genes *phc* codifican una fenol hidroxilasa que cataliza la formación de catecol y *cis,cis*-muconato en *Pseudomonas* sp. M1 (Santos & Sá-Correia, 2007).

Identificación de genes de la respuesta adaptativa a estrés oxidativo en la *A. aquatilis* QD168

En esta tesis un amplio repertorio de enzimas antioxidantes y reguladores transcripcionales de respuesta a estrés oxidativo fueron identificados en *A. aquatilis* QD168, sugiriendo una buena respuesta a estrés oxidativo. Genes que codifican enzimas antioxidantes fueron altamente representadas por alquil hidropéroxido reductasas (*ahp*, 4 genes), tiorredoxinas (*trx*, 6 genes) y peroxirredoxinas/peroxidasas (6 genes) que comprenden el 48,1% de los genes de respuesta a estrés oxidativo identificados. En *E. coli*, la regulación de los genes *ahp* y *trx* durante la exposición a H₂O₂ se encuentra principalmente mediada por el regulador OxyR (Imlay, 2013). Un ortólogo del regulador OxyR (*oxyR*; D3M96_10585) fue identificado en el genoma de *A. aquatilis* QD168, como también dos ortólogos del regulador transcripcional SoxR (*soxR1*, D3M96_08910; *soxR2*, D3M96_14980), el cual responde a compuestos generadores de radical superóxido (Pomposiello y Demple, 2001). El represor de resistencia a hidropéroxidos orgánicos, OhrR (*ohrR*, D3M96_17665) también fue identificado en el genoma de la cepa QD168. El represor OhrR ha sido descrito en *Bacillus subtilis* como un represor involucrado en la respuesta a peróxido (Fuangthong *et al.*, 2001). El producto génico de D3M96_00075 de la cepa QD168 mostró una identidad del 37% con el regulador transcripcional PerR tipo HTH de *E. coli*, probablemente involucrado en la resistencia a la exposición de H₂O₂ (Fuangthong *et al.*, 2002). El análisis del linaje filogenético de los reguladores transcripcionales SoxR1 y SoxR2 de *A. aquatilis* QD168 reveló que SoxR1 no agrupa con otros ortólogos de SoxR. Por otro lado, SoxR2 agrupó con ortólogos pertenecientes a la clase *Gammaproteobacteria*. Este clado consiste en dos subgrupos; uno incluyendo los SoxR de bacterias entéricas (*E. coli* K-12, *S. Typhi* CT18 y *S. Typhimurium* LT2) y otro de bacterias no-entericas (*P. putida* KT2440 y *A. oleovorans* DR1). El mecanismo de respuesta del factor transcripcional SoxR en bacterias entéricas y no-entericas es diferente. En bacterias entéricas, SoxR induce la expresión del factor transcripcional SoxS, el cual activa una respuesta transcripcional que involucra a más de 100 genes para

reestablecer el balance redox y reparar el daño oxidativo producido (Dietrich y Kiley, 2011; Sheplock *et al.*, 2013). El regulón SoxRS es único a bacterias entéricas. En bacterias no-entéricas, el regulador transcripcional SoxR controla directamente un pequeño grupo de genes entre los que se encuentran algunas oxigenasas, oxidoreductasas o transportadores (Dietrich *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2017). Nuestros resultados son consistentes con esta información, el regulador SoxR2 de *A. aquatilis* QD168 agrupa con bacterias no entéricas y el gen *soxS* no fue identificado en su genoma.

Respuesta a estrés oxidativo frente a agentes oxidantes de *A. aquatilis* QD168

En concordancia con el amplio repertorio de genes de resistencia a estrés oxidativo encontrados, se observó una inusual resistencia a PQ (0,2 M) y una tolerancia a H₂O₂ (0,1 mM) en la cepa QD168. Notablemente, las concentraciones inhibitorias de H₂O₂ y PQ son significativamente más altas comparadas con las reportadas en *E. coli*. Inhibición del crecimiento de *E. coli* MG1655 ha sido reportado a bajas concentraciones de H₂O₂ (0,03 mM), posiblemente inactivando los residuos sulfhidrilos del sitio activo de algunas enzimas (Seaver & Imlay, 2001). *A. aquatilis* QD168 es más resistente a PQ que *E. coli* B, mostrando un 67 ± 4.03% de supervivencia en 100 mM de PQ, mientras que la cepa B tiene una viabilidad menor (~30%) usando 2,5 mM de PQ, una concentración 40 veces menor (Kitzler *et al.*, 1990). Mecanismos de resistencia a PQ han sido descritos en *Stenotrophomonas matophilia*, mediante una bomba de expulsión codificada por el gen *mfsA* y regulada por regulador transcripcional SoxR (Srijaruskul *et al.*, 2015). La cepa QD168 no posee genes homólogos a esta bomba de expulsión, pero un mecanismo similar podría estar involucrado en la resistencia a este agente oxidante. La mayor toxicidad de H₂O₂ evidenciada en *A. aquatilis* QD168 se puede explicar por la incorporación celular mediante difusión, atravesando las membranas fácilmente sin requerir la presencia de un transportador (Imlay, 2008).

La exposición a PQ y a H₂O₂ en la cepa QD168 provocó un estado de estrés oxidativo, evidenciado por daño a macromoléculas y un aumento en la expresión de genes que codifican proteínas asociadas a la respuesta adaptativa a estrés oxidativo. Este estudio incluyó los genes que codifican los reguladores transcripcionales *oxyR*, *perR*, *soxR1* y *soxR2*, además de los genes que codifican las enzimas antioxidantes *ahpC1*, *ahpC2*, *katE* y *sodC1*, y la isoforma de la enzima fumarato hidratasa II (*fumC*). Tanto la exposición a H₂O₂ como a PQ, aumentó la

expresión del gen *ahpC2*. En el caso de H_2O_2 , el gen *ahpC1* mostró una disminución de más de 4 veces, en comparación con las células no tratadas, mientras que el gen *ahpC2* incrementó más de 5 veces (Figura 32). El único regulador que reveló un cambio en la expresión frente a la exposición con H_2O_2 , fue SoxR1, con un aumento de 2 veces de su transcrito en comparación a células de la cepa QD168 no expuestas al agente oxidante.

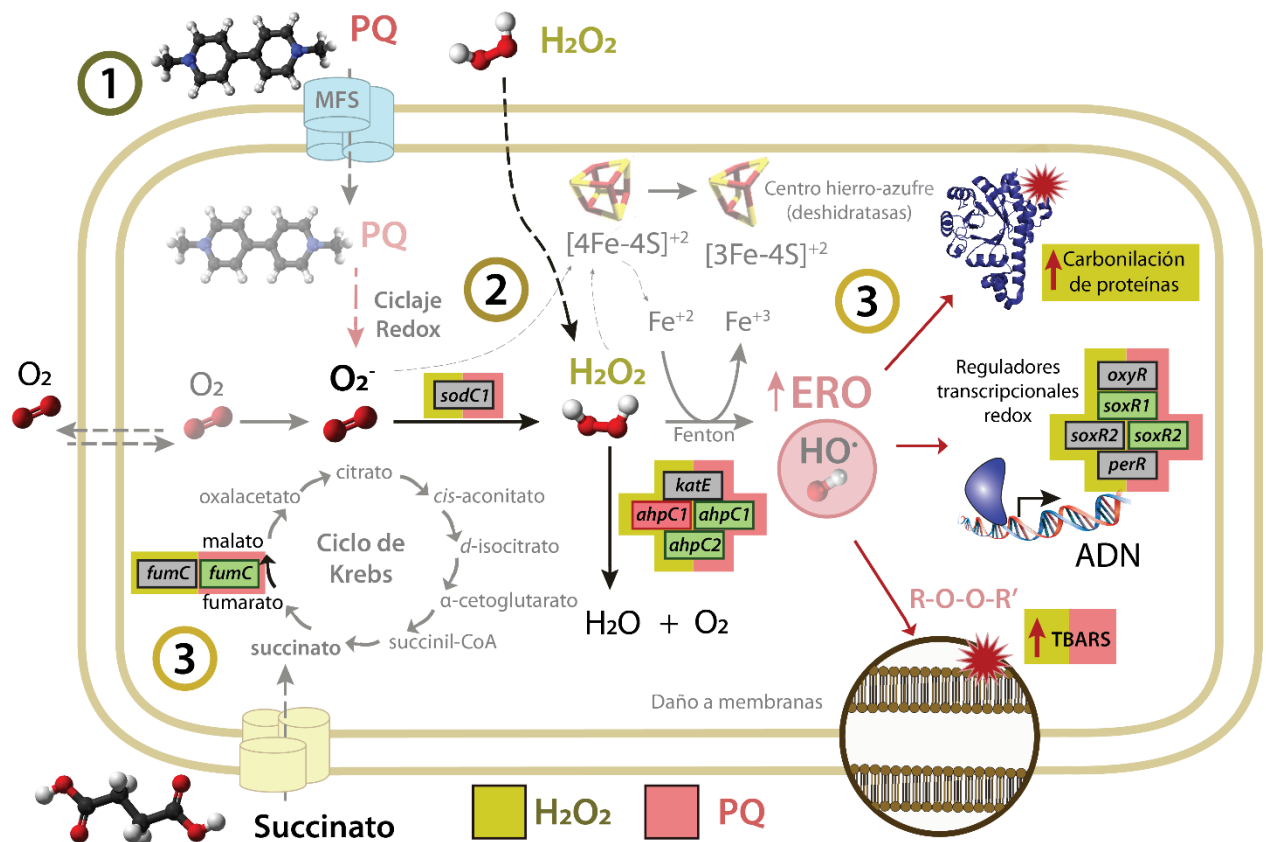


Figura 32. Representación gráfica de la respuesta adaptativa a estrés oxidativo de *A. aquatilis* QD168 frente a la exposición a H_2O_2 y PQ. Ingreso a la célula de H_2O_2 y PQ (1). Producción de especies reactivas de oxígeno al interior de la célula mediada por los agentes oxidantes (2). Daño macromolecular y respuesta transcripcional de genes asociados a la respuesta adaptativa de estrés oxidativo (3).

En el caso de la exposición a PQ, *ahpC1* y *ahpC2* mostraron un aumento > 3 y 7 veces, respectivamente, en comparación a células no expuestas a agentes oxidantes. Un estudio de proteómica en *P. aeruginosa* HP durante la exposición de PQ (0,8 mM) mostró un aumento de 1,4 veces de la proteína AhpC (Thippakorn *et al.*, 2018). El gen *fumC* mostró un aumento de expresión de más de 2 veces durante la exposición a PQ, en relación a la condición control. En *E. coli* el incremento de la expresión de fumarato hidratasa II se produce durante el daño por estrés oxidativo, debido a que las isoformas fumarato hidratasa A y B poseen un centro

hierro-azufre sensible a EROs (Imlay, 2013). Además, los genes que codifican los activadores transcripcionales sensibles a redox SoxR incrementaron su transcripción en *A. aquatilis* QD168. El gen que codifica *soxR2* incrementó más de 3 veces, mientras que el gen *soxR1* aumentó más de 2 veces frente a la exposición a PQ en comparación a células no expuestas (**Figura 32**). Durante la exposición con los agentes oxidantes H₂O₂ y PQ no se presentó una inducción de los genes que codifican las enzimas catalasa (*katE*) ni superóxido dismutasa (*sodC1*). *A. aquatilis* QD168 presenta en su genoma otras copias de estos genes (*katA*, *sodB1* y *sodB2*). Aunque *katA* ha sido catalogada como un gen de expresión constitutiva, se ha observado que el regulón OxyR de *P. aeruginosa* PA14 es capaz de controlar su transcripción durante la presencia de H₂O₂ (Heo *et al.*, 2010).

Mediante análisis transcripcionales se corroboró una respuesta adaptativa a estrés oxidativo durante la exposición a ambos agentes oxidantes. En ambos casos de exposición un aumento en la expresión del gen *ahpC2* fue observado. Las alquil hidroperóxido reductasas son enzimas antioxidantes de dos componentes (AhpCF) que han sido catalogadas como enzimas primarias en la detoxificación de H₂O₂ en bacteria (Parsonage *et al.*, 2005). La expresión de *ahpC2* durante ambas condiciones revela que no existe una respuesta a estrés oxidativo específica a cada agente oxidante, como lo evidenciado en los regulones OxyR y SoxR de *E. coli*. El regulón OxyR de *E. coli* controla la transcripción de los genes *ahpCF* y *katG* (Imlay, 2013). Por otro lado, la expresión contraria de los genes *ahpC1* y *ahpC2* durante la exposición con H₂O₂ podrían revelar una regulación diferencial de ambas copias del componente peroxidasa. La producción de superóxido por el compuesto redox PQ puede ser dismutada a H₂O₂ mediante la enzima superóxido dismutasa (SOD). El gen *sodC1*, que codifica una superóxido dismutasa dependiente de cobre-zinc, no cambió sus niveles de transcritos durante la exposición a agentes oxidantes en relación a la condición control (**Figura 32**). Sin embargo, en el genoma de *A. aquatilis* QD168 se encuentran los genes *sodB1* y *sodB2*, los cuales podrían ser regulados durante un aumento de estrés oxidativo.

Respuesta a estrés oxidativo durante el crecimiento en benceno por *A. aquatilis* QD168

Durante el catabolismo aerobio de compuestos aromáticos, se ha reportado una respuesta adaptativa a estrés oxidativo en bacterias. La exposición y crecimiento de cepas pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Burkholderia*, *Mycobacterium* y *Rhodococcus* en compuestos aromáticos ha revelado inducción de enzimas

antioxidantes, de estrés general o isoenzimas resistentes a estrés oxidativo mediante estudios transcriptómicos y proteómicos (Kim *et al.*, 2004; Agulló *et al.*, 2007; Le *et al.*, 2006; Patrauchan *et al.*, 2008). Sin embargo, pocos estudios se han centrado en caracterizar la respuesta adaptativa a estrés oxidativo durante el catabolismo de un compuesto aromático. En esta tesis se observó daño a macromoléculas y aumento en la transcripción de genes de respuesta a estrés oxidativo durante el crecimiento de la cepa QD168 en benceno (5 mM) (**Figura 29, Figura 30**).

Los mecanismos moleculares implicados en el aumento de EROs y en el estado de estrés oxidativo durante el crecimiento y degradación de compuestos aromáticos han sido poco caracterizados en bacterias. Las reacciones iniciales de oxigenación realizadas por las enzimas dioxigenasas tipo Rieske no hemo y monooxigenasas se basan en la activación de una molécula de oxígeno molecular (O_2). Las monooxigenasas producen la activación de O_2 , incorporando un átomo de oxígeno en la molécula blanco y reduciendo el otro átomo de oxígeno en H_2O . La utilización de sustratos análogos causa desacoplamiento de la enzima, causando su autooxidación y produciendo H_2O_2 (Hayaishi, 1974; Massey, 1994). En estudios *in vitro*, se ha observado un 50% de transferencia de oxígeno al producto final y un 50% de producción de H_2O_2 durante la utilización de *m*-metilfenol como sustrato por una fenol hidroxilasa (Detmer y Massey, 1985). También se ha observado que el desacoplamiento de la naftaleno 1,2-dioxigenasa (NDO), utilizando benceno como sustrato, provoca el consumo no enzimático de NADH y la producción de H_2O_2 (Lee, 1999). Este desacoplamiento enzimático de monooxigenasas presentes en reacciones catabólicas de compuestos aromáticos podría explicar el estado de estrés oxidativo observado en bacterias degradadoras. Pocos estudios han demostrado un aumento de las EROs durante el metabolismo de compuestos aromáticos. Durante el crecimiento de *Pseudomonas* sp. B4 en presencia de bifenilo o clorobenzoatos, se ha observado la generación de EROs endógeno observando un aumento de 10 veces en la fluorescencia de células crecidas en bifenilo en comparación al crecimiento en glucosa (Chávez *et al.*, 2004). Pérez-Pantoja *et al.* reporta que en la ruta de degradación de 2,4-dinitrotolueno en *Burkholderia* sp. DNT, la enzima dinitrotolueno dioxigenasa (DntA) es la mayor responsable de producción de EROs intracelular durante la degradación de este compuesto, sugiriendo un desacoplamiento enzimático y obteniendo un rendimiento defectuoso por una enzima aún evolucionando para metabolizar este xenobiótico (Pérez-Pantoja *et al.*, 2013). En esta tesis, la degradación de benceno

por una fenol hidroxilasa en *A. aquatilis* QD168 podría ser el gatillante de un desacoplamiento de la enzima, causando una mayor producción de EROs intracelular y el consecuente estado de estrés oxidativo (**Figura 33**).

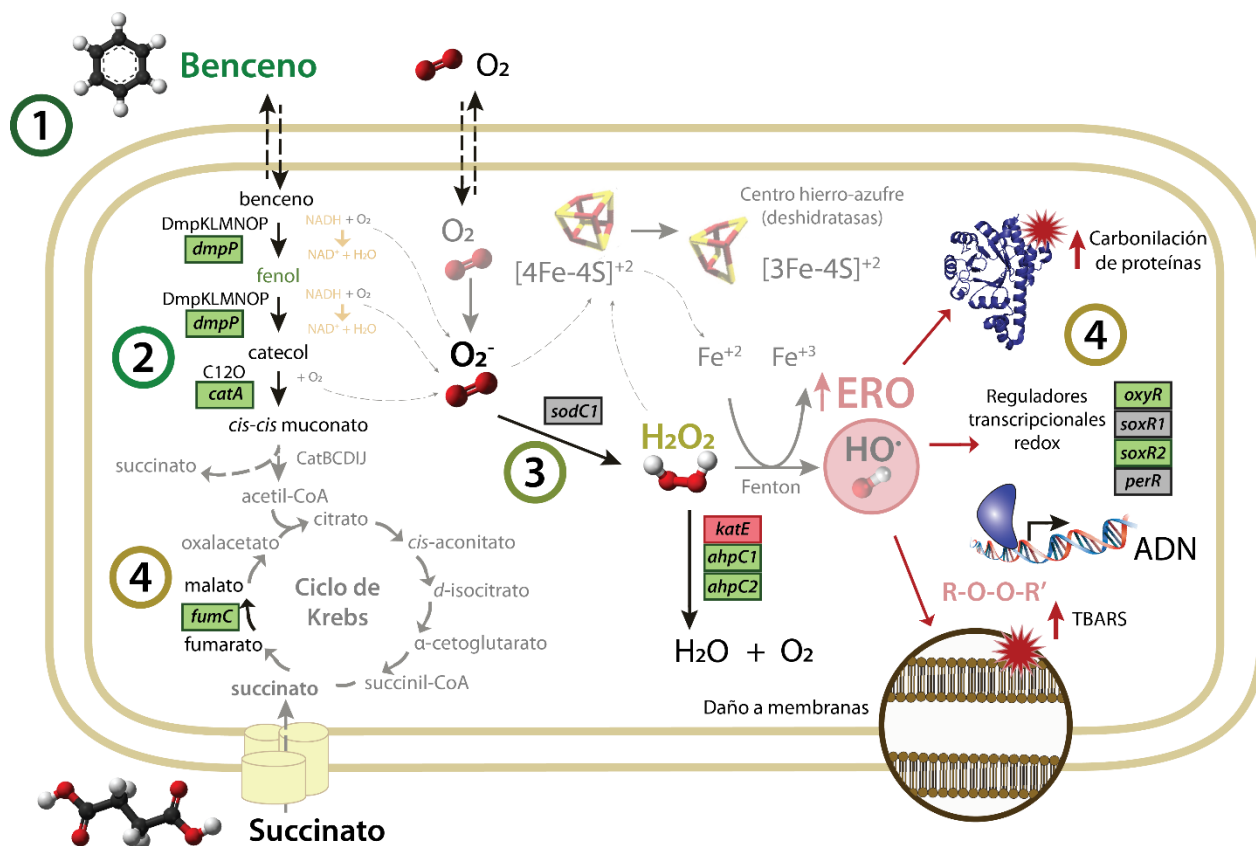


Figura 33. Representación gráfica de la respuesta adaptativa a estrés oxidativo de *A. aquatilis* QD168 durante la degradación de benceno. Ingreso a la célula del hidrocarburo aromático benceno (1). Ruta de degradación aerobia de benceno mediante las enzimas fenol hidroxilasa (DmpKLMNOP) y catecol 1,2 dioxigenasa (C120) (2). Producción de especies reactivas de oxígeno al interior de la célula (3). Daño oxidativo y respuesta transcripcional de genes asociados a la respuesta adaptativa de estrés oxidativo (4).

Además del desacoplamiento enzimático, se ha propuesto que el daño a membrana ocasionado por el metabolismo aromático altera el transporte de electrones en cadenas respiratorias. En *P. putida* KT2440, la exposición a *o*-xileno provocó una disminución en los transcritos de componentes de la cadena transportadora y un aumento concomitante con la síntesis de glutatión y una glutatión S-transferasa, enzimas encargadas de la detoxificación de xenobióticos (Domínguez-Cuevas *et al.*, 2006). Un aumento al daño de membrana fue observado en la cepa QD168 durante el crecimiento en benceno, evidenciado por un aumento de TBARS en comparación al control (**Figura 33**). Aunque no se evaluaron genes que codifican componentes de la cadena transportadora de electrones, el

crecimiento en benceno podría afectar este proceso y aumentar la producción endógena de H₂O₂ mediante alteraciones a la respiración celular.

El crecimiento de la cepa QD168 en benceno aumentó la transcripción de los genes que codifican las enzimas alquil hidroperóxido reductasas, *ahpC1* (> 7 veces) y *ahpC2* (> 2 veces), además de la inducción del gen que codifica la isoenzima resistente a EROs, fumarato hidratasa clase II (*fumC*; > 5 veces) con respecto al control (**Figura 33**). Esto sugiere una respuesta a estrés oxidativo mediante la detoxificación de H₂O₂ y recambio de enzimas del ciclo de Krebs por isoenzimas resistentes a EROs durante el crecimiento en benceno. Estos resultados están en concordancia con estudios realizados en *Rhodococcus jostii* RHA1 y *P. xenovorans* LB400. Durante el crecimiento en bifenilo en la cepa LB400, se observó un aumento de la enzima alquil hidroperóxido reductasa AhpC; (Agulló *et al.*, 2007). La reductasa de hidroperóxidos orgánicos (Ohr), la enzima AhpC y la isoenzima resistente a EROs, aconitato hidratasa A (AcnA) se indujeron en presencia de *p*-cimeno en *P. xenovorans* LB400, sugiriendo un estado de estrés oxidativo durante la exposición de este compuesto (Agulló *et al.*, 2017). En *R. jostii* RHA1 se ha reportado un aumento mayor a 2 veces en los perfiles de expresión de una catalasa y un alquil hidroperóxido reductasa al crecer en bifenilo, benzoato, etilbenceno, estireno, fenilacetato y benceno. Al comparar las proteínas inducidas en los 5 compuestos evaluados en *R. jostii* RHA1, el crecimiento en benceno produce el aumento más pronunciado en intensidad de señal en AhpC, siendo 4 veces mayor que la intensidad de señal observada durante el crecimiento en etilbenceno (Patrauchan *et al.*, 2008).

Durante el crecimiento en benceno de la cepa QD168, aumentó la inducción de los genes que codifican los reguladores transcripcionales *oxyR* (>8 veces) y *soxR2* (>4 veces) con respecto al control (**Figura 33**). En *P. xenovorans* LB400, se ha observado el aumento en la expresión del regulador *oxyR* durante el crecimiento en los compuestos aromáticos: 3-hidroxifenilacetato y 4-hidroxifenilacetato (Méndez, 2017). La exposición a tolueno en *P. putida* KT2440 indujo la expresión de varias proteínas del regulón *oxyR*, observando un aumento en catalasas (KatG), alquil hidroperóxido reductasas y varias peróxidasas (Domínguez-Cuevas *et al.*, 2006; Ramos *et al.*, 2015). Tal como lo observado durante la exposición a PQ, la transcripción del gen que codifica el activador transcripcional sensible a redox SoxR2 se ve aumentada durante el crecimiento en benceno de la cepa QD168. La exposición en PQ también aumento la expresión de los genes *ahpC1*, *ahpC2* y *fumC*, por lo que la respuesta transcripcional de los genes evaluados se asemeja entre

ambas condiciones. Estos resultados sugieren que la respuesta a estrés oxidativo causada por el catabolismo de benceno podría estar regulada por los reguladores OxyR y SoxR2, observando una respuesta similar a la obtenida mediante la exposición del compuesto redox PQ.

En esta tesis, la exploración genómica realizada en la bacteria marina *A. aquatilis* QD168 reveló un gran número de determinantes genéticos involucrados en la respuesta fisiológica a condiciones ambientales adversas. El potencial catabólico determinado explica las capacidades metabólicas de la cepa QD168 para sobrevivir en un ambiente contaminado con petróleo crudo, identificando un gran repertorio enzimático para la degradación de compuestos aromáticos y una respuesta adaptativa ante el catabolismo aerobio de estos compuestos. Según lo observado en esta tesis, el catabolismo de benceno genera una respuesta adaptativa a estrés oxidativo, evidenciado por daño a macromoléculas y aumento de genes asociados a la respuesta adaptativa a estrés oxidativo. Esta respuesta podría estar mediada por los reguladores transcripcionales OxyR y SoxR2 en la cepa QD168. De todas formas, es necesario realizar más estudios en ambos reguladores para determinar su función en el catabolismo de hidrocarburos aromáticos. Los resultados de esta tesis revelan a *A. aquatilis* QD168 como una adecuada candidata para la biorremediación de ambientes marinos y salinos contaminados con hidrocarburos aromáticos.

5. CONCLUSIONES

- La identificación taxonómica de la bacteria *Alcaligenes* sp. QD168 mediante secuencia completa del gen ARNr 16S y MLSA de los genes *nirK*, *gyrB* y 16S ARNr, permitió su clasificación filogenética en la especie *A. aquatilis*. El empleo de ANIb (utilizando un valor de agrupación >95%) y del MLSA de 35 genes marcadores permitió dilucidar el posicionamiento filogenómico de las 26 cepas de *Alcaligenes* spp. y el linaje correspondiente a la especie *A. aquatilis*.
- En el genoma de *A. aquatilis* QD168 se identificaron 90 genes que codifican proteínas asociadas al catabolismo de compuestos aromáticos, distribuidos en 43 genes que codifican proteínas de 7 rutas centrales del catabolismo de compuestos aromáticos (*e.g.*, catecol, protocatecuato, gentisato); y 47 genes que codifican proteínas de rutas y reacciones periféricas del catabolismo de compuestos aromáticos (*e.g.*, benceno, fenol, 4-hidroxibenzoato). Asimismo, la cepa QD168 posee 30 genes que codifican proteínas asociadas a la respuesta adaptativa a estrés oxidativo (*e.g.*, alquil hidroperóxido reductasas, fumarato hidratasa II, el activador transcripcional sensible a redox SoxR)
- *A. aquatilis* QD168 tiene la capacidad de crecer en 13 compuestos aromáticos (*viz.*, benceno, tolueno, bifenilo, fenol, benzoato, 3-hidroxibenzoato, 4-hidroxibenzoato, cinamato, 3-hidroxicinamato, nicotinato, antranilato, triptófano, 4-aminobenzoato y benzamida), lo que se correlaciona con los genes catabólicos identificados. Once compuestos fueron utilizados como única fuente de carbono (*viz.*, benceno, tolueno, bifenilo, fenol, benzoato, 3-hidroxibenzoato, 4-hidroxibenzoato, cinamato, 3-hidroxicinamato, nicotinato, antranilato y triptófano) y cinco compuestos como única fuente de carbono y nitrógeno (*viz.*, nicotinato, antranilato, triptófano, 4-aminobenzoato y benzamida).
- *A. aquatilis* QD168 posee una alta resistencia al agente oxidante PQ, induciendo la expresión de los genes *soxR1*, *soxR2*, *ahpC1*, *ahpC2* y *fumC* durante la exposición a este compuesto. En contraste, la cepa QD168 es

mucho más sensible a H_2O_2 , observándose un aumento en la expresión del gen *ahpC2* y una disminución de la expresión del gen *ahpC1*.

- El crecimiento de *A. aquatilis* QD168 en benceno provocó un estado de estrés oxidativo, lo que se reflejó en daño oxidativo a membrana celular y a proteínas totales. El aumento de la expresión de los genes que codifican los reguladores transcripcionales *oxyR* y *soxR2*, y de los genes *fumC*, *ahpC1* y *ahpC2* confirman una respuesta adaptativa a estrés oxidativo durante el catabolismo aerobio de benceno.

6. PROYECCIONES

- Basado en la distribución de los genomas del género *Alcaligenes* en cada grupo filogenómico, un estudio de genómica comparativa sobre los genes que codifican proteínas relacionadas con el catabolismo aerobio de compuestos aromáticos y los genes que codifican proteínas asociadas a la respuesta adaptativa a estrés oxidativo pertenecientes a cada genoma permitiría definir las capacidades metabólicas de cada grupo filogenómico, establecer si el grupo filogenómico III (*A. aquatilis*) posee determinantes genéticos únicos a su linaje, así como también identificar vecindarios genéticos únicos en los genomas de cepas de *Alcaligenes* spp.
- La generación de mutantes por transposición permitiría encontrar los genes responsables del crecimiento de la bacteria *A. aquatilis* QD168 en los compuestos aromáticos sin una ruta identificada *in silico* (e.g., 3-hidroxibenzoato, 3-hidroxicinamato, benzamida y *p*-aminobenzoato), como también genes relacionados a la alta resistencia al agente oxidante PQ.
- La generación y caracterización de las cepas mutantes $\Delta oxyR$, $\Delta soxR1$ y $\Delta soxR2$ de la bacteria *A. aquatilis* QD168 frente a la exposición de agentes oxidantes permitirían estudiar su rol en la respuesta a estrés oxidativo, además de establecer la función de los reguladores transcripcionales OxyR y SoxR durante el crecimiento de la cepa QD168 en compuestos aromáticos.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, S., Ahmed, I., Iida, T., Lee, Y.-J., Busse, H.-J., Fujiwara, T., Ohkuma, M. (2015). A heavy-metal tolerant novel bacterium, *Alcaligenes pakistanensis* sp. nov., isolated from industrial effluent in Pakistan. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 108, 859-870.
- Agulló, L., Cámara, B., Martínez, P., Latorre, V., Seeger, M. (2007). Response to (chloro)biphenyls of the polychlorobiphenyl-degrader *Burkholderia xenovorans* LB400 involves stress proteins also induced by heat shock and oxidative stress. *FEMS Microbiol. Lett.* 267, 167–175.
- Agulló, L., Romero-Silva, M. J., Domenech, M., Seeger, M. (2017). *p*-Cymene promotes its catabolism through the *p*-Cymene and the *p*-cumate pathways, activates a stress response and reduces the biofilm formation in *Burkholderia xenovorans* LB400. *PLoS One* 12, 1–24. d
- Ahmed, A. M., Lyautey, E., Bonnineau, C., Dabrin, A., Pesce, S. (2018). Environmental concentrations of copper, alone or in mixture with arsenic, can impact river sediment microbial community structure and functions. *Front. Microbiol.* 9.
- Albers, P. (2003). "Petroleum and individual polycyclic aromatic hydrocarbons," in *Handbook of Ecotoxicology, Second Edition* (CRC Press). 14.
- Atlas, R., Philp, J. (2005). Bioremediation: applied microbial solutions for real-world environmental cleanup. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 70, 307.
- Bae, S. S., Jung, J., Chung, D., Baek, K. (2018). *Marinobacterium aestuarii* sp. nov., a benzene-degrading marine bacterium isolated from estuary sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 68, 651–656.
- Baek, K., Bae, S. S., Jung, J., Chung, D. (2018). Complete genome sequence of *Marinobacterium aestuarii* ST58-10 T , a benzene-degrading bacterium isolated from estuarine sediment. *Microbiol. Resour. Announc.* 7: e00971-18.
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., Lesin, V.M., Nikolenko, S.I., Pham, S., Pribelski, A.D., Pyshkin, A.V., Sirotkin, A.V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M.A., Pevzner, P.A. (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 19, 455–477.
- Barbe, V. (2004). Unique features revealed by the genome sequence of *Acinetobacter* sp. ADP1, a versatile and naturally transformation competent bacterium. *Nucleic Acids Res.* 32, 5766–5779.
- Basharat, Z., Yasmin, A., He, T., Tong, Y. (2018). Genome sequencing and analysis of *Alcaligenes faecalis* subsp. *phenolicus* MB207. *Sci. Rep.* 8, 3616.
- Beltrametti, F., Marconi, A. M., Bestetti, G., Colombo, C., Galli, E., Ruzzi, M., Zennaro, E. (1997). Sequencing and functional analysis of styrene catabolism genes from *Pseudomonas fluorescens* ST. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2232–2239.
- Burlage, R. S., Hooper, S. W., Saylor, G. S. (1989). The TOL (pWW0) catabolic plasmid. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 1323–1328.
- Calcutt, M. J., Lewis, M. S., Eisenstark, A. (1998). The *oxyR* gene from *Erwinia carotovora*: cloning, sequence analysis and expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 167, 295–301.
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., Madden, T.L. (2009). BLAST+: Architecture and applications. *BMC Bioinformatics.* 10, 1–9.
- Carver, T., Thomson, N., Bleasby, A., Berriman, M., Parkhill, J. (2009). DNAPlotter: Circular and linear interactive genome visualization. *Bioinformatics.* 25, 119-120.
- Chain, P. S. G., Denef, V. J., Konstantinidis, K. T., Vergez, L. M., Agullo, L., Reyes, V. L., Hauser, L., Córdova, M., Gómez, L., González, M., Land, M., Lao, V., Larimer, F., LiPuma, J.J., Mahenthiralingam, E., Malfatti, S.A., Marx, C.J., Parnell, J.J., Ramette, A., Richardson, P., Seeger, M., Smith, D., Spilker, T., Sul, W.J., Tsoi, T.V., Ulrich, L.E., Zhulin, I.B., Tiedje, J.M. (2006). *Burkholderia xenovorans* LB400 harbors a multi-replicon, 9.73-Mbp genome shaped for

- versatility. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 15280–15287.
- Chandra, S., Sharma, R., Singh, K., Sharma, A. (2013). Application of bioremediation technology in the environment contaminated with petroleum hydrocarbon. *Ann. Microbiol.* 63, 417–431.
- Chang, H.-K., Mohseni, P., Zylstra, G. J. (2003). Characterization and regulation of the genes for a novel anthranilate 1,2-dioxygenase from *Burkholderia cepacia* DBO1. *J. Bacteriol.* 185, 5871–5881.
- Chávez, F. P., Lünsdorf, H., Jerez, C. A. (2004). Growth of polychlorinated-biphenyl-degrading bacteria in the presence of biphenyl and chlorobiphenyls generates oxidative stress and massive accumulation of inorganic polyphosphate. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 3064–3072.
- Chin, C. S., Alexander, D. H., Marks, P., Klammer, A. A., Drake, J., Heiner, C., Clum, A., Copeland, A., Huddleston, J., Eichler, E.E., Turner, S.W., Korlach, J. (2013). Nonhybrid, finished microbial genome assemblies from long-read SMRT sequencing data. *Nat. Methods* 10, 563–569.
- Cock, P. J. A., Antao, T., Chang, J. T., Chapman, B. A., Cox, C. J., Dalke, A., Friedberg, I., Hamelryck, T., Kauff, F., Wilczynski, B., de Hoon, M.J. (2009). Biopython: Freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics. *Bioinformatics* 25, 1422–1423.
- Cronin, C. N., Kim, J., Fuller, J. H., Zhang, X., McIntire, W. S. (1999). Organization and sequences of p-hydroxybenzaldehyde dehydrogenase and other plasmid-encoded genes for early enzymes of the p-cresol degradative pathway in *Pseudomonas putida* NCIMB 9866 and 9869. *DNA Seq.* 10, 7–17.
- Dash, H. R., Mangwani, N., Chakraborty, J., Kumari, S., Das, S. (2013). Marine bacteria: potential candidates for enhanced bioremediation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 561–571.
- Daugulis, A. J., Amsden, B. G., Bochansz, J., Kayssi, A. (2003). Delivery of benzene to *Alcaligenes xylosoxidans* by solid polymers in a two-phase partitioning bioreactor. *Biotechnol. Lett.* 25, 1203–1207.
- Dehmel, U., Engesser, K. H., Timmis, K. N., Dwyer, D. F. (1995). Cloning, nucleotide sequence, and expression of the gene encoding a novel dioxygenase involved in metabolism of carboxydiphenyl ethers in *Pseudomonas pseudoalcaligenes* POB310. *Arch. Microbiol.* 163, 35–41.
- Deshayes, C., Perrodou, E., Gallien, S., Euphrasie, D., Schaeffer, C., Van-Dorsselaer, A., Poch, O., Lecompte, O., Reytrat, J.M. (2007). Interrupted coding sequences in *Mycobacterium smegmatis*: authentic mutations or sequencing errors? *Genome Biol.* 8, R20.
- Detmer, K., Massey, V. (1985). Effect of substrate and pH on the oxidative half-reaction of phenol hydroxylase. *J. Biol. Chem.* 260, 5998–6005.
- Díaz, E., Ferrández, A., García, J. L. (1998). Characterization of the hca cluster encoding the dioxygenolytic pathway for initial catabolism of 3-phenylpropionic acid in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 180, 2915–2923.
- Diaz, E., Ferrandez, A., Prieto, M. A., Garcia, J. L. (2001). Biodegradation of aromatic compounds by *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65, 523–569.
- Dietrich, L. E. P., Kiley, P. J. (2011). A shared mechanism of SoxR activation by redox-cycling compounds. *Mol. Microbiol.* 79, 1119–1122.
- Dietrich, L. E. P., Price-Whelan, A., Petersen, A., Whiteley, M., Newman, D. K. (2006). The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 61, 1308–1321.
- Dietrich, L. E. P., Teal, T. K., Price-Whelan, A., Newman, D. K. (2008). Redox-active antibiotics control gene expression and community behavior in divergent bacteria. *Science* . 321, 1203–1206
- Domínguez-Cuevas, P., González-Pastor, J.-E., Marqués, S., Ramos, J.-L., de Lorenzo, V. (2006). Transcriptional tradeoff between metabolic and stress-response programs in *Pseudomonas putida* KT2440 cells exposed to toluene. *J. Biol. Chem.* 281, 11981–11991.
- Duchaud, E., Rusniok, C., Frangeul, L., Buchrieser, C., Givaudan, A., Taourit, S., Bocs, S.,

- Boursaux-Eude, C., Chandler, M., Charles, J.F., Dassa, E., Derose, R., Derzelle, S., Freyssinet, G., Gaudriault, S., Médigue, C., Lanois, A., Powell, K., Siguier, P., Vincent, R., Wingate, V., Zouine, M., Glaser, P., Boemare, N., Danchin, A., Kunst, F. (2003). The genome sequence of the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Nat. Biotechnol.* 21, 1307–1313.
- Eddy, S. R. (2011). Accelerated Profile HMM Searches. *PLoS Comput. Biol.* 7, e1002195.
- Entsch, B., Nan, Y., Weaich, K., Scott, K. F. (1988). Sequence and organization of *pobA*, the gene coding for *p*-hydroxybenzoate hydroxylase, an inducible enzyme from *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* 71, 279–291.
- Fazius, F., Shelest, E., Gebhardt, P., Brock, M. (2012). The fungal α -amino adipate pathway for lysine biosynthesis requires two enzymes of the aconitase family for the isomerization of homocitrate to homoisocitrate. *Mol. Microbiol.* 86, 1508–1530. d
- Ferrández, A., Garcíá, J. L., Díaz, E. (1997). Genetic characterization and expression in heterologous hosts of the 3-(3-hydroxyphenyl)propionate catabolic pathway of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 179, 2573–81.
- Ferrández, A., Miñambres, B., Garcíá, B., Olivera, E. R., Luengo, J. M., Garcíá, J. L., Díaz, E. (1998). Catabolism of phenylacetic acid in *Escherichia coli*. Characterization of a new aerobic hybrid pathway. *J. Biol. Chem.* 273, 25974–25986.
- Fuangthong, M., Atichartpongkul, S., Mongkolsuk, S., Helmann, J. D. (2001). OhrR is a repressor of *ohrA*, a key organic hydroperoxide resistance determinant in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 183, 4134–4141.
- Fuangthong, M., Herbig, A. F., Bsat, N., Helmann, J. D. (2002). Regulation of the *Bacillus subtilis fur* and *perR* genes by PerR: not all members of the PerR regulon are peroxide inducible. *J. Bacteriol.* 184, 3276–3286.
- Fuentes, S., Ding, G. C., Cárdenas, F., Smalla, K., Seeger, M. (2015). Assessing environmental drivers of microbial communities in estuarine soils of the Aconcagua River in Central Chile. *FEMS Microbiol. Ecol.* 91.
- Fuentes, S., Méndez, V., Aguila, P., Seeger, M. (2014). Bioremediation of petroleum hydrocarbons: Catabolic genes, microbial communities, and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 4781–4794.
- Fuenzalida, M., Quiroz, R. (2012). La dimensión espacial de los conflictos ambientales en Chile. *Polis. Revista Latinoamericana.* 11, 157–168.
- Gibson, D. T., Parales, R. E. (2000). Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 237, 236–243.
- Godoy-Faúndez, A., Antizar-Ladislao, B., Reyes-Bozo, L., Camaño, A., Sáez-Navarrete, C. (2008). Bioremediation of contaminated mixtures of desert mining soil and sawdust with fuel oil by aerated in-vessel composting in the Atacama Region (Chile). *J. Hazard. Mater.* 151, 649–657.
- Gomila, M., Busquets, A., Mulet, M., Garcíá-Valdés, E., Lalucat, J. (2017). Clarification of taxonomic status within the *Pseudomonas syringae* species group based on a phylogenomic analysis. *Front. Microbiol.* 8, 1–13.
- Harayama, S., Kasai, Y., Hara, A. (2004). Microbial communities in oil-contaminated seawater. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15, 205–214.
- Harwood, C. S., Parales, R. E. (1996). The β -keto adipate pathway and the biology of self-identity. *Annu. Rev. Microbiol.* 50, 553–590.
- Hayaishi, O. (1974). “General properties and biological functions of oxygenases,” in *Molecular mechanisms of oxygen activation* (Elsevier), 1–28.
- Hayashi, T., Makino, K., Ohnishi, M., Kurokawa, K., Ishii, K., Yokoyama, K., Han, C.G., Ohtsubo, E., Nakayama, K., Murata, T., Tanaka, M., Tobe, T., Iida, T., Takami, H., Honda, T., Sasakawa, C., Ogasawara, N., Yasunaga, T., Kuhara, S., Shiba, T., Hattori, M., Shinagawa, H. (2001). Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison

- with a laboratory strain K-12. *DNA Res.* 8, 11–22.
- Head, I. M., Jones, D. M., Röling, W. F. M. (2006). Marine microorganisms make a meal of oil. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 173–182.
- Heidelberg, J. F., Eisen, J. A., Nelson, W. C., Clayton, R. A., Gwinn, M. L., Dodson, R. J., Haft, D.H., Hickey, E.K., Peterson, J.D., Umayam, L., Gill, S.R., Nelson K.E., Read T.D., Tettelin H., Richardson, D., Ermolaeva, M.D., Vamathevan, J., Bass, S., Qin, H., Dragoi, I., Sellers, P., McDonald, L., Utterback, T., Fleishmann, R.D., Nierman, W.C., White, O., Salzberg, S.L., Smith, H.O., Colwell, R.R., Mekalanos, J.J., Venter, J.C., Fraser, C.M. (2000). DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* 406, 477–483.
- Hellems, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F., Vandesompele, J. (2007). qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.* 8, R19.
- Heo, Y.J., Chung, I.Y., Cho, W.J., Lee, B.Y., Kim, J.H., Choi, K.H., Lee, J.W., Hassett, D.J., Cho, Y.H. (2010). The major catalase gene (*katA*) of *Pseudomonas aeruginosa* PA14 is under both positive and negative control of the global transactivator OxyR in response to hydrogen peroxide. *J. Bacteriol.* 192, 381–390.
- Hopper, D. J., Kaderbhai, M. A. (1999). 2,4'-Dihydroxyacetophenone dioxygenase (EC 1.13.11.41) from *Alcaligenes* sp. 4HAP: a novel enzyme with an atypical dioxygenase sequence. *Biochem. J.* 344, 397.
- Huerta-Cepas, J., Szklarczyk, D., Forslund, K., Cook, H., Heller, D., Walter, M. C., Rattei T., Mende, D.R., Sunagawa, S., Kuhn, M., Jensen, L.J., von Mering, C., Bork, P. (2016). eggNOG 4.5: a hierarchical orthology framework with improved functional annotations for eukaryotic, prokaryotic and viral sequences. *Nucleic Acids Res.* 44, D286–D293.
- Imlay, J. A. (2008). Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu. Rev. Biochem.* 77, 755–776.
- Imlay, J. A. (2013). The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: Lessons from a model bacterium. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 443–454.
- Irie, S., Doi, S., Yorifuji, T., Takagi, M., Yano, K. (1987). Nucleotide sequencing and characterization of the genes encoding benzene oxidation enzymes of *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 169, 5174–5179.
- Ishiyama, D., Vujaklija, D., Davies, J. (2004). Novel pathway of salicylate degradation by *Streptomyces* sp. strain WA46. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1297–1306.
- Jang, S., Imlay, J. A. (2007). Micromolar intracellular hydrogen peroxide disrupts metabolism by damaging iron-sulfur enzymes. *J. Biol. Chem.* 282, 929–937.
- Jeon, H. H., Kim, K. H., Chun, B. H., Ryu, B. H., Han, N. S., Jeon, C. O. (2017). A proposal of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *Jonggajibkimchii* subsp. nov. and reclassification of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *suionicum* (Gu *et al.*, 2012) as *Leuconostoc suionicum* sp. nov. based on complete genome sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 67, 2225–2230.
- Jiang, B., Zhou, Z., Dong, Y., Tao, W., Wang, B., Jiang, J., *et al.* (2015). Biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and *o*-, *m*-, and *p*-xylenes by the newly isolated bacterium *Comamonas* sp. JB. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 176, 1700–1708.
- Jimenez, J. I., Minambres, B., Garcia, J. L., Diaz, E. (2002). Genomic analysis of the aromatic catabolic pathways from *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* 4, 824–841.
- Katoh, K., Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* 30, 772–780.
- Kim, J., Park, C., Imlay, J. A., Park, W. (2017). Lineage-specific SoxR-mediated regulation of an endoribonuclease protects non-enteric bacteria from redox-active compounds. *J. Biol. Chem.* 292, 121–133.
- Kim, J., Park, W. (2014). Oxidative stress response in *Pseudomonas putida*. *Appl. Microbiol.*

- Biotechnol.* 98, 6933–6946.
- Kim, M., Oh, H. S., Park, S. C., Chun, J. (2014). Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64, 346–351
- Kim, S.J., Jones, R. C., Cha, C.J., Kweon, O., Edmondson, R. D., Cerniglia, C. E. (2004). Identification of proteins induced by polycyclic aromatic hydrocarbon in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and de novo sequencing methods. *Proteomics* 4, 3899–3908.
- Kim, S. I., Leem, S. H., Choi, J. S., Ha, K. S. (1998). Organization and transcriptional characterization of the *cat1* gene cluster in *Acinetobacter lwoffii* K24. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 243, 289–294.
- Kitzler, J. W., Minakami, H., Fridovich, I. (1990). Effects of paraquat on *Escherichia coli*: differences between B and K-12 strains. *J. Bacteriol.* 172, 686–690.
- Kiyohara, H., Nagao, K., Kouno, K., Yano, K. (1982). Phenanthrene-degrading phenotype of *Alcaligenes faecalis* AFK2. *Appl. Environ. Microbiol.* 43, 458–461.
- Kolde, R. (2012). pheatmap: Pretty Heatmaps in R package. *R Packag. version 61*. doi:10.1039/b818082b.
- Konstantinidis, K. T., Tiedje, J. M. (2005). Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 2567–2572
- Kook, J. K., Park, S. N., Lim, Y. K., Cho, E., Jo, E., Roh, H., Shin, Y., Paek, J., Kim, H.S., Kim, H., Shin, J.H., Chang, Y.H. (2017). Genome-based reclassification of *Fusobacterium nucleatum* subspecies at the species level. *Curr. Microbiol.* 74, 1137–1147.
- Krämer, R. (2010). Bacterial stimulus perception and signal transduction: Response to osmotic stress. *Chem. Rec.* 10, 217–229.
- Krumsiek, J., Arnold, R., Rattei, T. (2007). Gepard: A rapid and sensitive tool for creating dotplots on genome scale. *Bioinformatics* 23, 1026–1028.
- Kumar, A., Bhunia, B., Dasgupta, D., Mandal, T., Dey, A., Datta, S., Bhattacharya, P. (2013). Optimization of culture condition for growth and phenol degradation by *Alcaligenes faecalis* JF339228 using Taguchi Methodology. *Desalin. Water Treat.* 51, 3153–3163.
- Kuramitsu, S., Inoue, K., Ogawa, T., Ogawa, H., Kagamiyama, H. (1985). Aromatic amino acid aminotransferase of *Escherichia coli*: nucleotide sequence of the *tyrB* gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 133, 134–139.
- Kweon, O., Kim, S. J., Baek, S., Chae, J. C., Adjei, M. D., Baek, D. H., Kim, Y.C., Cerniglia, C.E. (2008). A new classification system for bacterial Rieske non-heme iron aromatic ring-hydroxylating oxygenases. *BMC Biochem.* 9, 1–20.
- Lanfear, R., Frandsen, P. B., Wright, A. M., Senfeld, T., Calcott, B. (2017). Partitionfinder 2: New methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses. *Mol. Biol. Evol.* 34, 772–773.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., Mcgettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics.* 21, 2947–2948.
- Larsson, A. (2014). AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics* 30, 3276–3278.
- Le, T.T., Eymann, C., Albrecht, D., Sietmann, R., Schauer, F., Hecker, M., Antelmann, H. (2006). Differential gene expression in response to phenol and catechol reveals different metabolic activities for the degradation of aromatic compounds in *Bacillus subtilis*. *Environ. Microbiol.* 8, 1408–1427.
- Lee, L. L., Blumer-Schuette, S. E., Izquierdo, J. A., Zurawski, J. V., Loder, A. J., Conway, J. M., Elkins, J.G., Podar, M., Clum, A., Jones, P.C., Piatek, M.J., Weighill, D.A., Jacobson, D.A., Adams, M.W.W.,

- Kelly, R.M. (2018). Genus-wide assessment of lignocellulose utilization in the extremely thermophilic genus *Caldicellulosiruptor* by genomic, pangenomic, and metagenomic analyses. *Appl. Environ. Microbiol.* 84:e02694-17.
- Lee, S. E., Seo, J. S., Keum, Y. S., Lee, K. J., Li, Q. X. (2007). Fluoranthene metabolism and associated proteins in *Mycobacterium* sp. JS14. *Proteomics* 7, 2059–2069.
- Li, X., Tambong, J., Yuan, K. X., Chen, W., Xu, H., Lévesque, C. A., De Boer, S.H. (2018). Re-classification of *Clavibacter michiganensis* subspecies on the basis of whole-genome and multi-locus sequence analyses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 68, 234–240.
- Lu, C. Y., Li, Y. Q., Tian, Y., Han, M. X., Rao, M. P. N., Li, Y. R., Zhu, Z.N., Wei, D.Q., An, D.D., Li, W.J. (2017). *Alcaligenes endophyticus* sp. nov., isolated from roots of *Ammodendron bifolium*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 67, 939–943.
- Luo, S., Wehr, N. B. (2009). Protein carbonylation: avoiding pitfalls in the 2,4-dinitrophenylhydrazine assay. *Redox Rep.* 14, 159–166.
- Ma, F., Shi, S. N., Sun, T. H., Li, A., Zhou, J. T., Qu, Y. Y. (2013). Biotransformation of benzene and toluene to catechols by phenol hydroxylase from *Arthrobacter* sp. W1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 5097–5103.
- Mahato, N. K., Gupta, V., Singh, P., Kumari, R., Verma, H., Tripathi, C., Rani, P., Sharma, A., Singhvi, N., Sood, U., Hira, P., Kohli, P., Nayyar, N., Puri, A., Bajaj, A., Kumar, R., Negi, V., Talwar, C., Khurana, H., Nagar, S., Sharma, M., Mishra, H., Singh, A.K., Dhingra, G., Negi, R.K., Shakarad, M., Singh, Y., Lal, R. (2017). Microbial taxonomy in the era of OMICS: application of DNA sequences, computational tools and techniques. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 110, 1357–1371.
- Maruyama, K., Miwa, M., Tsujii, N., Nagai, T., Tomita, N., Harada, T., Sobajima, H., Sugisaki, H. (2001). Cloning, sequencing, and expression of the gene encoding 4-hydroxy-4-methyl-2-oxoglutarate aldolase from *Pseudomonas ochraceae* NGJ1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65, 2701–2709.
- Massey, V. (1994). Activation of molecular oxygen by flavins and flavoproteins. *J. Biol. Chem.* 269, 22459–62.
- McLeod, M. P., Warren, R. L., Hsiao, W. W. L., Araki, N., Myhre, M., Fernandes, C., Miyazawa, D., Wong, W., Lillquist, A.L., Wang, D., Dosanjh, M., Hara, H., Petrescu, A., Morin, R.D., Yang, G., Stott, J.M., Schein, J.E., Shin, H., Smailus, D., Siddiqui, A.S., Marra, M.A., Jones, S.J., Holt, R., Brinkman, F.S., Miyauchi, K., Fukuda, M., Davies, J.E., Mohn, W.W., Eltis, L.D. (2006). The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 15582–15587.
- Mesquita, C. S., Oliveira, R., Bento, F., Geraldo, D., Rodrigues, J. V., Marcos, J. C. (2014). Simplified 2,4-dinitrophenylhydrazine spectrophotometric assay for quantification of carbonyls in oxidized proteins. *Anal. Biochem.* 458, 69–71.
- Michas, A., Vestergaard, G., Trautwein, K., Avramidis, P., Hatzinikolaou, D. G., Vorgias, C. E., Wilkes, H., Rabus, R., Schloter, M., Schöler, A. (2017). More than 2500 years of oil exposure shape sediment microbiomes with the potential for syntrophic degradation of hydrocarbons linked to methanogenesis. *Microbiome* 5, 118.
- Michel, J., Owens, E. H., Zengel, S., Graham, A., Nixon, Z., Allard, T., Holton, W., Reimer, P.D., Lamarche, A., White, M., Rutherford, N., Childs, C., Mauseth, G., Challenger, G., Taylor, E. (2013). Extent and degree of shoreline oiling: Deepwater Horizon oil spill, Gulf of Mexico, USA. *PLoS One* 8, e65087.
- Momany, C., Levдикov, V., Blagova, L., Lima, S., Phillips, R. S. (2004). Three-Dimensional Structure of Kynureninase from *Pseudomonas fluorescens*. *Biochemistry* 43, 1193–1203.
- Mongodin, E. F., Nelson, K. E., Daugherty, S., DeBoy, R. T., Wister, J., Khouri, H., Weidman, J., Walsh, D.A., Papke, R.T., Sanchez Perez, G., Sharma, A.K., Nesbø, C.L., MacLeod, D., Baptiste, E., Doolittle, W.F., Charlebois, R.L., Legault, B., Rodriguez-Valera, F. (2005). The genome of

- Salinibacter ruber*: Convergence and gene exchange among hyperhalophilic bacteria and archaea. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 18147–18152.
- Mudge, S. M., Seguel, C. G. (1999). Organic contamination of San Vicente Bay, Chile. *Mar. Pollut. Bull.* 38, 1011-1021.
- Nam, J.-W., Nojiri, H., Yoshida, T., Habe, H., Yamane, H., Omori, T. (2001). New classification system for oxygenase components involved in ring-hydroxylating oxygenations. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65, 254–263.
- Navarro-Llorens, J. M., Patrauchan, M. A., Stewart, G. R., Davies, J. E., Eltis, L. D., Mohn, W. W. (2005). Phenylacetate catabolism in *Rhodococcus* sp. strain RHA1: a central pathway for degradation of aromatic compounds. *J. Bacteriol.* 187, 4497–504.
- Noda, Y., Nishikawa, S., Shiozuka, K., Kadokura, H., Nakajima, H., Yoda, K., Katayama, Y., Morohoshi, N., Haraguchi, T., Yamasaki, M. (1990). Molecular cloning of the protocatechuate 4,5-dioxygenase genes of *Pseudomonas paucimobilis*. *J. Bacteriol.* 172, 2704–9.
- Nogales, J., Canales, Á., Jiménez-Barbero, J., Serra, B., Pingarrón, J. M., García, J. L., Díaz, E. (2011). Unravelling the gallic acid degradation pathway in bacteria: the *gal* cluster from *Pseudomonas putida*. *Mol. Microbiol.* 79, 359–374.
- Nordlund, I., Powlowski, J., Shingler, V. (1990). Complete nucleotide sequence and polypeptide analysis of multicomponent phenol hydroxylase from *Pseudomonas* sp. strain CF600. *J. Bacteriol.* 172, 6826–33.
- Overbeek, R., Olson, R., Pusch, G. D., Olsen, G. J., Davis, J. J., Disz, T., Edwards, R.A., Gerdes, S., Parrello, B., Shukla, M., Vonstein, V., Wattam, A.R., Xia, F., Stevens, R. (2014). The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Res.* 42, 206–214.
- Pagnout, C., Frache, G., Poupin, P., Maunit, B., Muller, J. F., Féraud, J. F. (2007). Isolation and characterization of a gene cluster involved in PAH degradation in *Mycobacterium* sp. strain SNP11: Expression in *Mycobacterium smegmatis* mc2155. *Res. Microbiol.* 158, 175–186.
- Palma-Fleming, H., Cornejo, C., González, M., Pérez, V., González, M., Gutierrez, E., Sericano, J.L., Seeger, M. (2008). Polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in coastal environments of Valdivia and Valparaíso, Chile. *J. Chil. Chem. Soc.* 53, 1393–1398.
- Parks, D. H., Rinke, C., Chuvochina, M., Chaumeil, P. A., Woodcroft, B. J., Evans, P. N., Hugenholtz, P., Tyson G.W. (2017). Recovery of nearly 8,000 metagenome-assembled genomes substantially expands the tree of life. *Nat. Microbiol.* 2, 1533–1542.
- Parra, S., Bravo, M. A., Quiroz, W., Querol, X., Paipa, C. (2015). Distribution and pollution assessment of trace elements in marine sediments in the Quintero Bay (Chile). *Mar. Pollut. Bull.* 99, 256–263.
- Parsonage, D., Youngblood, D. S., Sarma, G. N., Wood, Z. A., Karplus, P. A., Poole, L. B. (2005). Analysis of the link between enzymatic activity and oligomeric state in AhpC, a bacterial peroxiredoxin. *Biochemistry* 44, 10583–10592.
- Pastor, J. M., Salvador, M., Argandoña, M., Bernal, V., Reina-Bueno, M., Csonka, L. N., Iborra, J.L., Vargas, C., Nieto, J.J., Cánovas, M. (2010). Ectoines in cell stress protection: Uses and biotechnological production. *Biotechnol. Adv.* 28, 782–801.
- Patrauchan, M. A., Florizone, C., Eapen, S., Gomez-Gil, L., Sethuraman, B., Fukuda, M., Davies, J., Mohn, W.W., Eltis, L.D. (2008). Roles of ring-hydroxylating dioxygenases in styrene and benzene catabolism in *Rhodococcus jostii* RHA1. *J. Bacteriol.* 190, 37–47.
- Patrauchan, M. A., Parnell, J. J., McLeod, M. P., Florizone, C., Tiedje, J. M., Eltis, L. D. (2011). Genomic analysis of the phenylacetyl-CoA pathway in *Burkholderia xenovorans* LB400. *Arch. Microbiol.* 193, 641–650.
- Pérez-Pantoja, D., De La Iglesia, R., Pieper, D. H., González, B. (2008). Metabolic reconstruction of aromatic compounds degradation from the genome of the amazing pollutant-degrading

- bacterium *Cupriavidus necator* JMP134. 32, 736-794.
- Pérez-Pantoja, D., Donoso, R., Agulló, L., Córdova, M., Seeger, M., Pieper, D. H., González, B. (2012). Genomic analysis of the potential for aromatic compounds biodegradation in *Burkholderiales*. *Environ. Microbiol.* 14, 1091–1117.
- Pérez-Pantoja, D., Nickel, P. I., Chavarría, M., de Lorenzo, V. (2013). Endogenous Stress Caused by Faulty Oxidation Reactions Fosters Evolution of 2,4-Dinitrotoluene-Degrading Bacteria. *PLoS Genet.* 9, e1003764.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, 45e–45.
- Piraino, E., Owens, E., Rios, J., Graham, A. (2017). Oil behaviour and the response to a sunken oil spill of slurry in Quintero bay, Chile. *Int. Oil Spill Conf. Proc.* 2017, 124–133.
- Pohlmann, A., Fricke, W. F., Reinecke, F., Kusian, B., Liesegang, H., Cramm, R., Eitinger, T., Ewering, C., Pötter, M., Schwartz, E., Strittmatter, A., Voss, I., Gottschalk, G., Steinbüchel, A., Friedrich, B., Bowien, B. (2006). Genome sequence of the bioplastic-producing “Knallgas” bacterium *Ralstonia eutropha* H16. *Nat. Biotechnol.* 24, 1257–1262.
- Pomposiello, P. J., Demple, B. (2001). Redox-operated genetic switches: The SoxR and OxyR transcription factors. *Trends Biotechnol.* 19, 109-114.
- Ponce, B. L., Latorre, V. K., González, M., Seeger, M. (2011). Antioxidant compounds improved PCB-degradation by *Burkholderia xenovorans* strain LB400. *Enzyme Microb. Technol.* 49, 509–516.
- Powell, S., Forslund, K., Szklarczyk, D., Trachana, K., Roth, A., Huerta-Cepas, J., Gabaldón, T., Rattei, T., Creevey, C., Kuhn, M., Jensen, L.J., von Mering, C., Bork, P. (2014). eggNOG v4.0: nested orthology inference across 3686 organisms. *Nucleic Acids Res.* 42, D231–D239.
- Providenti, M. A., Cook, A. M., Wyndham, R. C., Mampel, J., MacSween, S. (2001). *Comamonas testosteroni* BR6020 possesses a single genetic locus for extradiol cleavage of protocatechuate. *Microbiology* 147, 2157–2167.
- Qiu, J., Liu, B., Zhao, L., Zhang, Y., Cheng, D., Yan, X., Jiang, J., Hong, Q., He, J., (2018). A novel degradation mechanism for pyridine derivatives in *Alcaligenes faecalis* JQ135. *Appl. Environ. Microbiol.* 84. e00910-18.
- Qiu, J., Zhang, J., Zhang, Y., Wang, Y., Tong, L., Hong, Q., He, J. (2017). Biodegradation of picolinic acid by a newly isolated bacterium *Alcaligenes faecalis* strain JQ135. *Curr. Microbiol.* 74, 508–514.
- Ramos, J.-L., Sol Cuenca, M., Molina-Santiago, C., Segura, A., Duque, E., Gómez-García, M. R., Udaondo, Z., Roca, A. (2015). Mechanisms of solvent resistance mediated by interplay of cellular factors in *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiol. Rev.* 39, 555–566.
- Reasoner, D. J., Geldreich, E. E. (1985). A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 1-7.
- Rehfuss, M., Urban, J. (2005). *Alcaligenes faecalis* subsp. *phenolicus* subsp. nov. a phenol-degrading, denitrifying bacterium isolated from a graywater bioprocessor. *Syst. Appl. Microbiol.* 28, 421–429.
- Richter, M., Rosselló-Móra, R. (2009). Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 19126–19131.
- Richter, M., Rosselló-Móra, R., Oliver Glöckner, F., Peplies, J. (2016). JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. *Bioinformatics* 32, 929–931.
- Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A., Huelsenbeck, J.P. (2012). MrBayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst. Biol.* 61, 539–542.
- Ross, D. (2000). The role of metabolism and specific metabolites in benzene-induced toxicity: Evidence and issues. *J. Toxicol. Environ. Heal. - Part A* 61, 357–372.
- Rost, R., Haas, S., Hammer, E., Herrmann, H., Burchhardt, G. (2002). Molecular analysis of aerobic

- phenylacetate degradation in *Azoarcus evansii*. *Mol. Genet. Genomics*. 267, 656–663.
- Rüetschi, U., Odelhög, B., Lindstedt, S., Barros-Söderling, J., Persson, B., Jörnvall, H. (1992). Characterization of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. Primary structure of the *Pseudomonas* enzyme. *Eur. J. Biochem.* 205, 459–66.
- Sagarkar, S., Bhardwaj, P., Yadav, T. C., Qureshi, A., Khardenavis, A., Purohit, H. J., Kapley, A. (2014). Draft genome sequence of atrazine-utilizing bacteria isolated from indian agricultural Soil. *Genome Announc.* 2, 3153–3163.
- Salinero, K., Keller, K., Feil, W. S., Feil, H., Trong, S., Di Bartolo, G., Lapidus, A. (2009). Metabolic analysis of the soil microbe *Dechloromonas aromatica* str. RCB: indications of a surprisingly complex life-style and cryptic anaerobic pathways for aromatic degradation. *BMC Genomics* 10, 351.
- Sambrook, J., Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning - Sambrook & Russel - Vol. 1, 2, 3.*
- Sangal, V., Goodfellow, M., Blom, J., Tan, G. Y. A., Klenk, H., Sutcliffe, I. C. (2018). Revisiting the taxonomic status of the biomedically and industrially important genus *Amycolatopsis*, using a phylogenomic approach. *Front. Microbiol.* 9, 1–9.
- Sangal, V., Goodfellow, M., Jones, A. L., Schwalbe, E. C., Blom, J., Hoskisson, P. A. Sutcliffe, I. C. (2016). Next-generation systematics: An innovative approach to resolve the structure of complex prokaryotic taxa. *Sci. Rep.* 6, 179–206.
- Santos, P. M., Sá-Correia, I. (2007). Characterization of the unique organization and co-regulation of a gene cluster required for phenol and benzene catabolism in *Pseudomonas* sp. M1. *J. Biotechnol.* 131, 371–378.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods.* 9, 671–675.
- Schroll, G., Busse, H. J., Parrer, G., Rölleke, S., Lubitz, W., Denner, E. B. (2001). *Alcaligenes faecalis* subsp. *parafaecalis* subsp. nov., a bacterium accumulating poly-beta-hydroxybutyrate from acetone-butanol bioprocess residues. *Syst. Appl. Microbiol.* 24, 37–43.
- Sebahia, M., Preston, A., Maskell, D. J., Kuzmiak, H., Connell, T. D., King, N. D., Orndorff, P.E., Miyamoto, DM., Thomson, N.R., Harris, D., Goble, A., Lord, A., Murphy, L., Quail, M.A., Rutter, S., Squares, R., Squares, S., Woodward, J., Parkhill, J., Temple, L.M. (2006). Comparison of the genome sequence of the poultry pathogen *Bordetella avium* with those of *B. bronchiseptica*, *B. pertussis*, and *B. parapertussis* reveals extensive diversity in surface structures associated with host interaction. *J. Bacteriol.* 188, 6002–6015.
- Seemann, T. (2014). Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30, 2068–2069.
- Seo, J. S., Keum, Y. S., Li, Q. X. (2009). Bacterial degradation of aromatic compounds. 6, 278-309.
- Sheplock, R., Recinos, D. A., Mackow, N., Dietrich, L. E. P., Chander, M. (2013). Species-specific residues calibrate SoxR sensitivity to redox-active molecules. *Mol. Microbiol.* 87, 368-381.
- Shingler, V., Moore, T. (1994). Sensing of aromatic compounds by the DmpR transcriptional activator of phenol-catabolizing *Pseudomonas* sp. strain CF600. *J. Bacteriol.* 176, 1555-6150.
- Shingler, V., Powlowski, J., Marklund, U. (1992). Nucleotide sequence and functional analysis of the complete phenol/3,4-dimethylphenol catabolic pathway of *Pseudomonas* sp. strain CF600. *J. Bacteriol.* 174, 711–724.
- Simon, M. J., Osslund, T. D., Saunders, R., Ensley, B. D., Suggs, S., Harcourt, A., Suen, W.C., Cruden, D.L., Gibson, D.T., Zylstra, G.J. (1993). Sequences of genes encoding naphthalene dioxygenase in *Pseudomonas putida* strains G7 and NCIB 9816-4. *Gene* 127, 31–37.
- Singha, L. P., Kotoky, R., Pandey, P. (2017). Draft Genome Sequence of *Alcaligenes faecalis* BDB4, a Polyaromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from crude oil-contaminated soil. *Genome Announc.* 5, 4–5.
- Srijaruskul, K., Charoenlap, N., Namchaiw, P., Chattrakarn, S., Giengkam, S., Mongkolsuk, S., Vattanaviboon, P. (2015). Regulation by SoxR of *mfsA*, which encodes a major facilitator protein

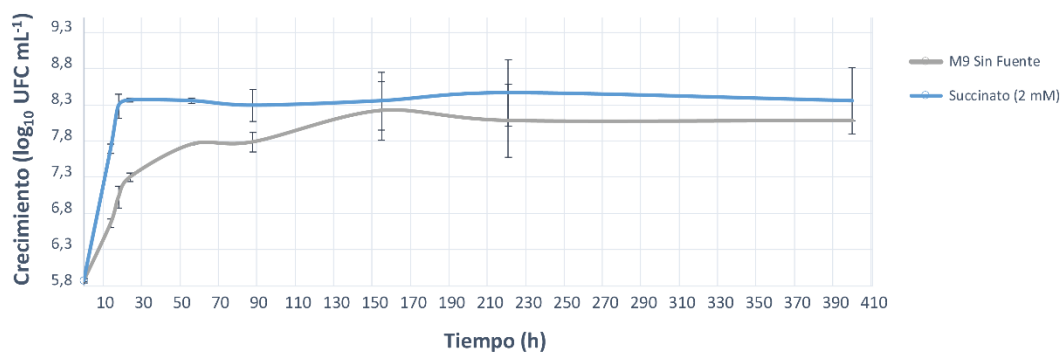
- involved in paraquat resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. *PLoS One* 10, 1–16.
- Stothard, P., Wishart, D. S. (2005). Circular genome visualization and exploration using CGView. *Bioinformatics*. 21, 537-539.
- Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrenner, P., Hickey, M. J., Brinkman, F.S., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., Garber, R.L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L.L., Coulter, S.N., Folger, K.R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G.K., Wu, Z., Paulsen, I.T., Reizer, J., Saier, M.H., Hancock, R.E., Lory, S., Olson, M.V. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406, 959–964.
- Tanabe, M., Kanehisa, M. (2012). Using the KEGG database resource. *Curr. Protoc. Bioinforma.*, 1–54.
- Tatusova, T., DiCuccio, M., Badretdin, A., Chetvernin, V., Nawrocki, E. P., Zaslavsky, L., Lomsadze, A., Pruitt, K.D., Borodovsky, M., Ostell, J. (2016). NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic Acids Res.* 44, 6614–6624.
- Teramoto, M., Futamata, H., Harayama, S., Watanabe, K. (1999). Characterization of a high-affinity phenol hydroxylase from *Comamonas testosteroni* R5 by gene cloning, and expression in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1c. *Mol. Gen. Genet.* 262, 552-558
- Thippakorn, C., Isarankura-Na-Ayudhya, C., Pannengpetch, S., Isarankura-Na-Ayudhya, P., Schaduengrat, N., Nantasenammat, C., Prachayasittikul, V. (2018). Oxidative responses and defense mechanism of hyperpigmented *P. aeruginosa* as characterized by proteomics and metabolomics. *EXCLI J.* 17, 544–562.
- Touchon, M., Hoede, C., Tenaillon, O., Barbe, V., Baeriswyl, S., Bidet, P., Bingen, E., Bonacorsi, S., Bouchier, C., Bouvet, O., Calteau, A., Chiapello, H., Clermont, O., Cruveiller, S., Danchin, A., Diard, M., Dossat, C., Karoui, M.E., Frapy, E., Garry, L., Ghigo, J.M., Gilles, A.M., Johnson, J., Le Bouguéneq, C., Lescat, M., Mangenot, S., Martinez-Jéhanne, V., Matic, I., Nassif, X., Oztas, S., Petit, M.A., Pichon, C., Rouy, Z., Ruf, C.S., Schneider, D., Tournet, J., Vacherie, B., Vallenet, D., Médigue, C., Rocha, E.P., Denamur, E. (2009). Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. *PLoS Genet.* 5, e1000344.
- Van Trappen, S., Tan, T. L., Samyn, E., Vandamme, P. (2005). *Alcaligenes aquatilis* sp. nov., a novel bacterium from sediments of the Weser Estuary, Germany, and a salt marsh on Shem Creek in Charleston Harbor, USA. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 2571–2575.
- Vojtková, H., Kosina, M., Sedláček, I., Mašláňová, I., Harwotová, M., Molinková, V. (2015). Characterization of *Pseudomonas monteilii* CCM 3423 and its physiological potential for biodegradation of selected organic pollutants. *Folia Microbiol. (Praha)*. 60, 411–416.
- Wang, L., Qiao, N., Sun, F., Shao, Z. (2008). Isolation, gene detection and solvent tolerance of benzene, toluene and xylene degrading bacteria from nearshore surface water and Pacific Ocean sediment. *Extremophiles* 12, 335–342.
- Wang, R. F., Wennerstrom, D., Cao, W. W., Khan, A. A., Cerniglia, C. E. (2000). Cloning, expression, and characterization of the *katG* gene, encoding catalase-peroxidase, from the polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium *Mycobacterium* sp. strain PYR-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4300–4304.
- Wang, Y., Li, J., Liu, A. (2017). Oxygen activation by mononuclear nonheme iron dioxygenases involved in the degradation of aromatics. *J. Biol. Inorg. Chem.* 22, 395–405.
- White, O., Eisen, J. A., Heidelberg, J. F., Hickey, E. K., Peterson, J. D., Dodson, R. J., Haft, D.H., Gwinn, M.L., Nelson, W.C., Richardson, D.L., Moffat, K.S., Qin, H., Jiang, L., Pamphile, W., Crosby, M., Shen, M., Vamathevan, J.J., Lam, P., McDonald, L., Utterback, T., Zalewski, C., Makarova, K.S., Aravind, L., Daly, M.J., Minton, K.W., Fleischmann, R.D., Ketchum, K.A., Nelson, K.E., Salzberg, S., Smith, H.O., Venter, J.C., Fraser, C.M. (1999). Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1. *Science* 286, 1571–1577..
- Wu, M., Scott, A. J. (2012). Phylogenomic analysis of bacterial and archaeal sequences with

AMPHORA2.

- Xu, Y., Chen, B., Chao, H., Zhou, N.-Y. (2013). *mhpT* encodes an active transporter involved in 3-(3-hydroxyphenyl)propionate catabolism by *Escherichia coli* K-12. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 6362–6368.
- Xu, Y., Chen, M., Zhang, W., Lin, M. (2003). Genetic organization of genes encoding phenol hydroxylase, benzoate 1,2-dioxygenase alpha subunit and its regulatory proteins in *Acinetobacter calcoaceticus* PHEA-2. *Curr. Microbiol.* 46, 235–240.
- Yagi, J. M., Sims, D., Brettin, T., Bruce, D., Madsen, E. L. (2009). The genome of *Polaromonas naphthalenivorans* strain CJ2, isolated from coal tar-contaminated sediment, reveals physiological and metabolic versatility and evolution through extensive horizontal gene transfer. *Environ. Microbiol.* 11, 2253–2270.
- Zhang, Y., Chen, Q., Ji, J., Zhao, L., Zhang, L., Qiu, J., He, J. (2018). Complete genome sequence of *Alcaligenes faecalis* strain JQ135, a bacterium capable of efficiently degrading nicotinic acid. *Curr. Microbiol.* 75, 1551–1554.
- Zheng, M., Wang, X., Doan, B., Lewis, K. A., Schneider, T. D., Storz, G. (2001). Computation-directed identification of OxyR DNA binding sites in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 183, 4571–4579.
- Zhou, N.-Y., Fuenmayor, S. L., Williams, P. A. (2001). *nag* genes of *Ralstonia* (formerly *Pseudomonas*) sp. strain U2 encoding enzymes for gentisate catabolism. *J. Bacteriol.* 183, 700–708.

8. ANEXOS

A



B

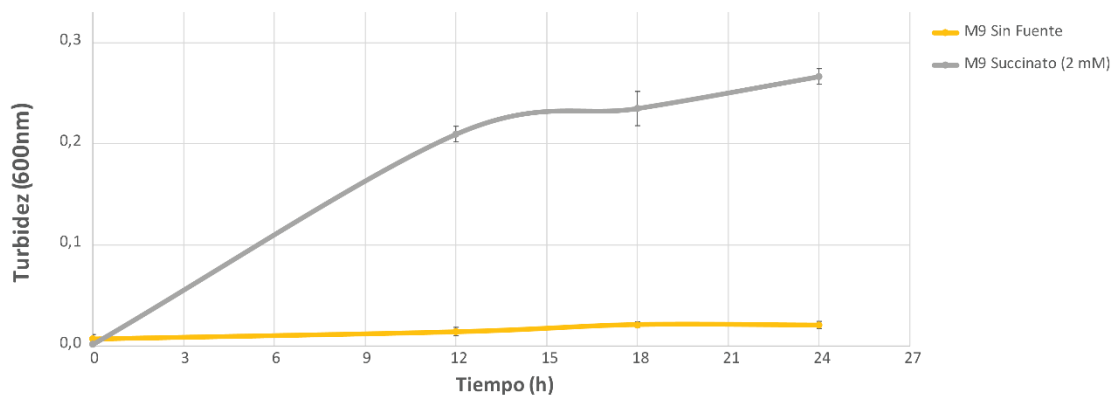


Figura 34. Crecimiento de *A. aquatilis* QD168 sin fuente de carbono. Crecimiento de la cepa QD168 en medio mínimo M9 utilizando succinato (2 mM) como única fuente de carbono o sin fuente de carbono mediante unidades UFC/ml(A) y turbidez (B).

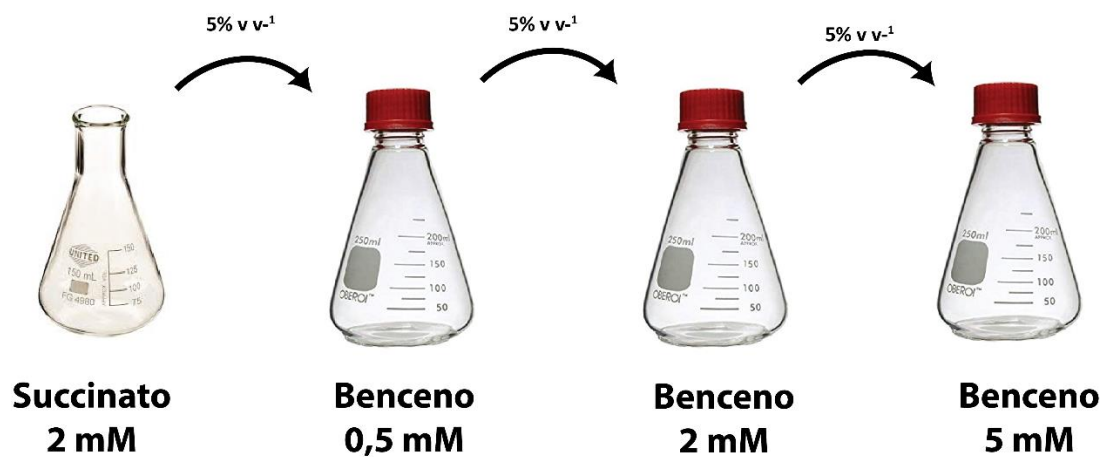


Figura 35. Adaptación del cultivo de *A. aquatilis* QD168 en benceno. Crecimiento realizado en medio mínimo M9 suplementado con 1,75% de NaCl utilizando las fuentes de carbono señaladas.

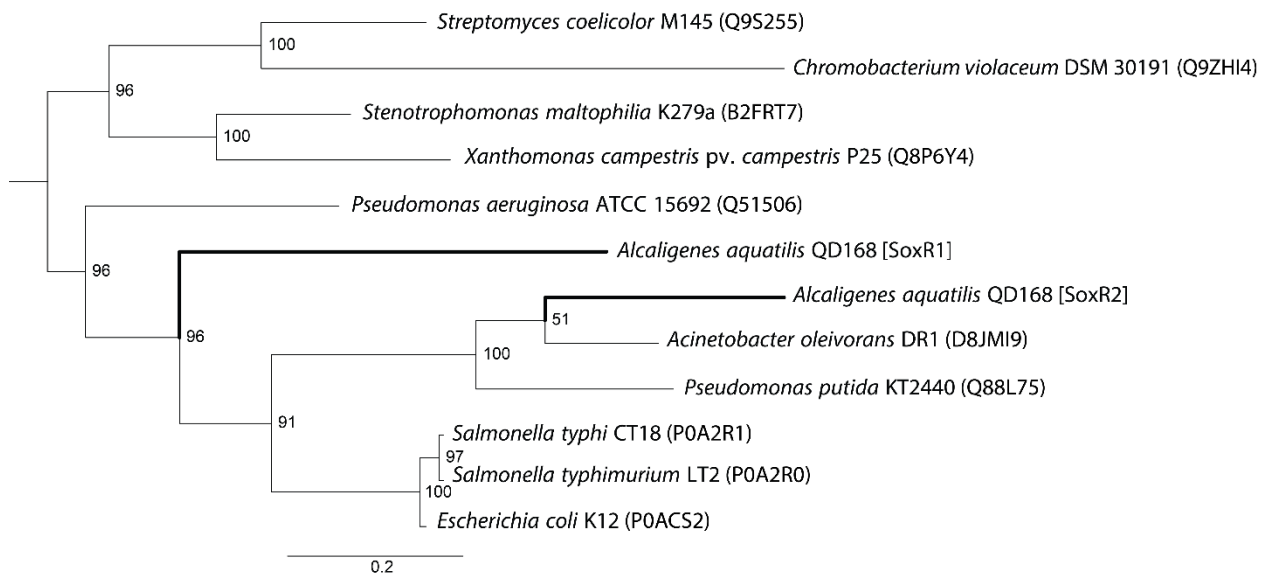


Figura 36. Árbol filogenético de los reguladores transcripcionales SoxR de *A. aquatilis* QD168 y otras bacterias. Árbol filogenético: filogenia enraizada en un punto medio (mid-rooted phylogeny) muestra cinco clados distintivos.

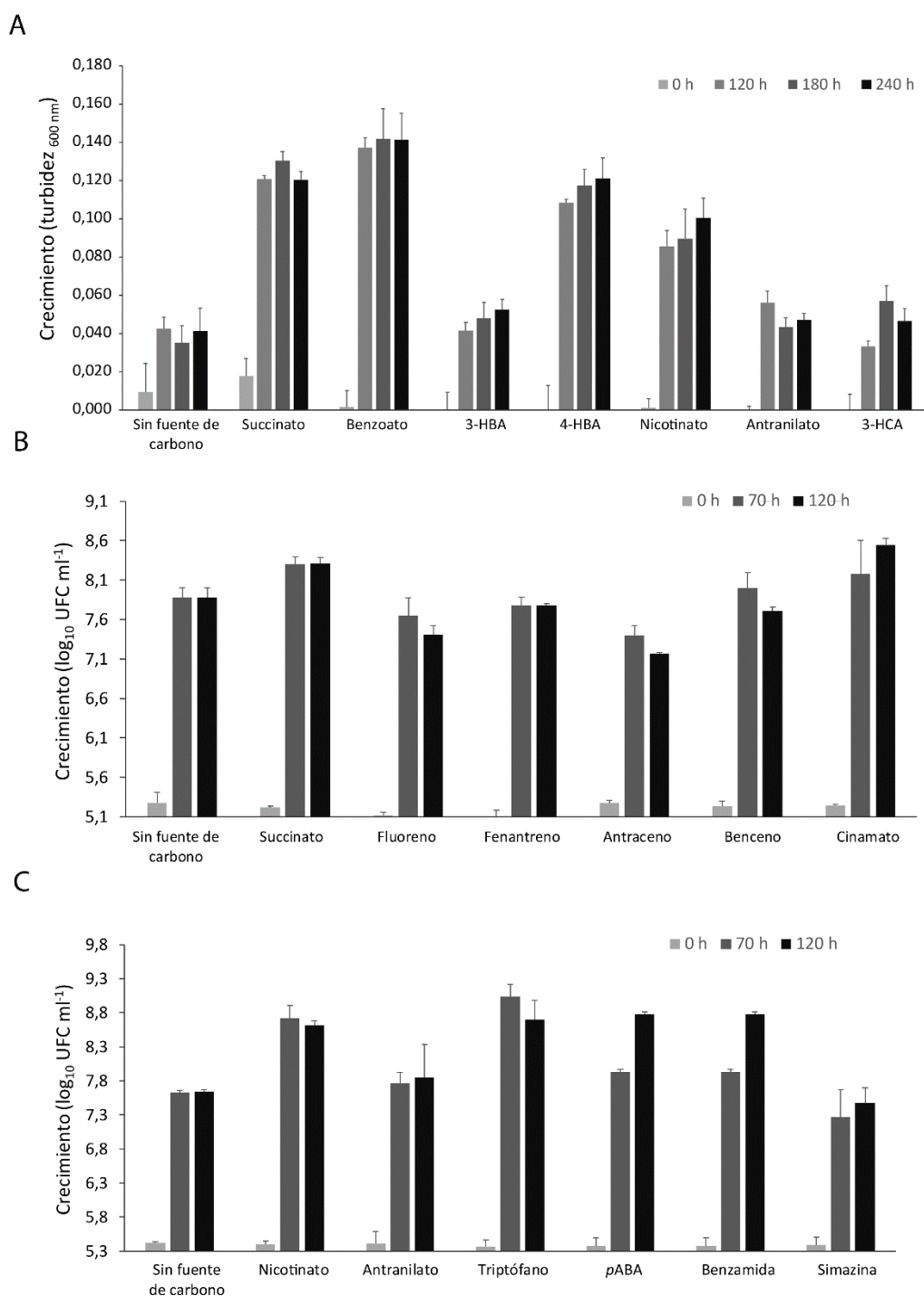


Figura 37. Crecimiento en medio líquido de la bacteria *A. aquatilis* QD168 en distintos hidrocarburos aromáticos. La cepa QD168 fue crecida en medio mínimo utilizando succinato 2 mM, benzoato 1,17 mM, 3-hidroxibenzoato (3-HBA) 1,17 mM, 4-hidroxibenzoato (4-HBA) 1,17 mM, nicotinato 1,33 mM, antranilato 1 mM y 3-hidroxicinamato (3-HCA) 1 mM, usando como control medio mínimo M9 sin fuente de carbono (A). Se evaluó el crecimiento en medio mínimo utilizando succinato 2 mM, fluoreno 0,62 mM, fenantreno 0,52 mM, antraceno 0,52 mM, benceno 1,33 mM y cinamato 0,89 mM, usando como control medio mínimo sin fuente de carbono (B). Se evaluó el crecimiento en medio mínimo M8 utilizando nicotinato 1 mM, antranilato 1 mM, triptófano 0,73 mM, *p*-aminobenzoato (*p*ABA) 1,14 mM, benzamida 1,14 mM y simazina 1,14 mM como única fuente de carbono y nitrógeno, usando como control medio mínimo M8 sin fuente de carbono (C). Las barras de error corresponden a la desviación estándar de 3 réplicas independientes. Se realizó un ANOVA de una vía seguido de un test LSD de Fisher para identificar diferencias entre las condiciones analizadas (letras distintas indican diferencias entre los grupos).

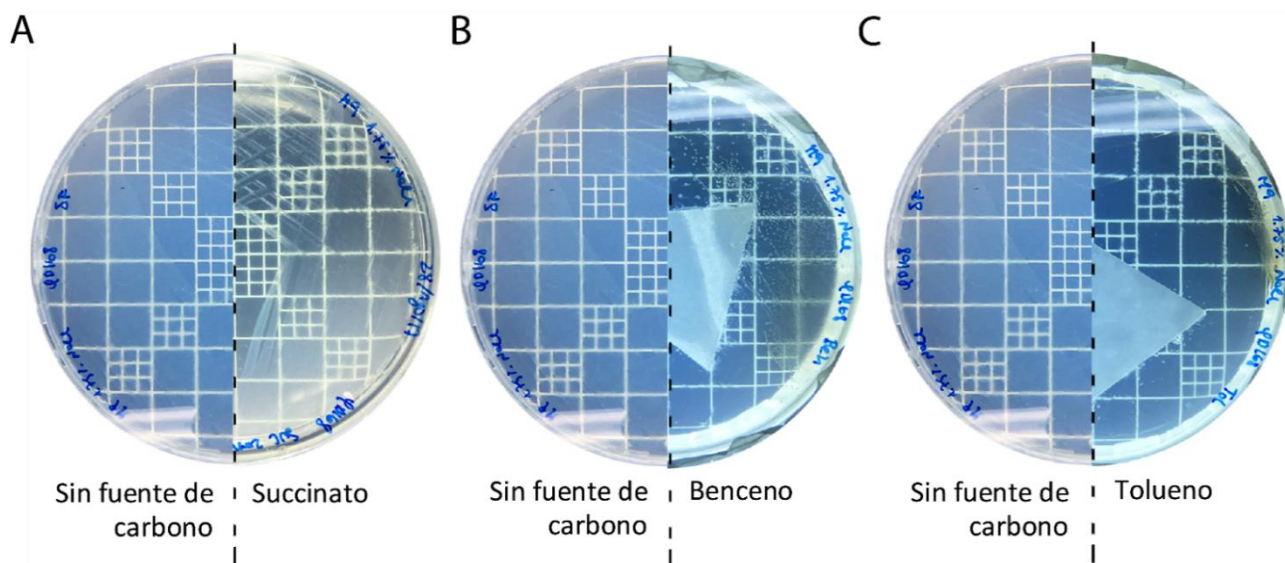


Figura 38. Crecimiento en medio sólido de *A. aquatilis* QD168 en hidrocarburos aromáticos volátiles. La cepa QD168 fue crecida en medio mínimo agar M9 modificado con 1,75% p/v de NaCl y los compuestos succinato (A), benceno (B) y tolueno (C) como única fuente de carbono.

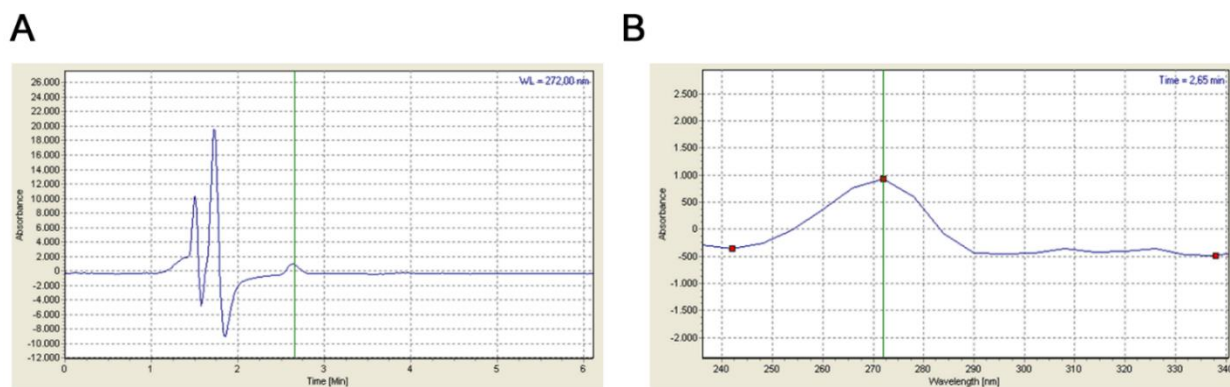


Figura 39. Cromatograma de HPLC durante el crecimiento de *A. aquatilis* QD168 en benceno. Tiempo de retención del metabolito = 2,627(A), y espectro de absorbancia del metabolito identificado ($\lambda_{max} = 272 \text{ nm}$) (B).

Tabla 26. Conjunto de datos genómicos de *Alcaligenes* spp.

Especie	Cepa	Estado del Genoma	Tamaño (Mb)	GC%	Contigs	País de aislamiento	Fuente de aislamiento	N° de Acceso	Referencias
<i>A. aquatilis</i>	QD168	Completo	4,34	56,4	1	Chile	Sedimento contaminado con petróleo crudo, Bahía de Quintero, Valparaíso	GCA_003671915.1	Este estudio
<i>A. aquatilis</i>	BU33N	Cromosoma	3,84	56,1	4	Túnez	Sedimento marino contaminado con hidrocarburos en un puerto refinero en Bizerta	GCA_003076515.1	No publicado
<i>A. faecalis</i>	BDB4	Cromosoma	4,24	56	2	India	Suelo contaminado con petróleo crudo	GCA_002205415.1	Singha <i>et al.</i> 2017
<i>A. faecalis</i>	DSM 30030 ^T	Completo	4,08	56,6	1	-	Fecas humanas	GCA_002443155.1	No publicado
<i>A. faecalis</i>	JQ135	Completo	4,08	55,9	1	China	Aguas residuales municipal	GCA_002242175.1	Qiu <i>et al.</i> 2017, Qiu <i>et al.</i> 2018
<i>A. faecalis</i>	P156	Completo	4,05	56,7	1	China	Planta de tratamiento de desechos sólidos	GCA_001641975.2	No publicado
<i>A. faecalis</i>	ZD02	Completo	4,25	56,8	2	China	Cadáveres de <i>Caenorhabditis elegans</i>	GCA_000967305.2	Ju <i>et al.</i> 2016
<i>A. faecalis</i>	GZAF1	Contig	4,39	56,8	61	Palestina	Muestra de herida humana, Hospital Al-Shifa	GCA_002120075.1	Laham <i>et al.</i> 2017
<i>A. faecalis</i>	GZAF3	Contig	4,35	56,8	31	Palestina	Muestra de orina humana, Hospital Al-Shifa	GCA_002119995.1	Laham <i>et al.</i> 2017
<i>A. faecalis</i>	GZAF5	Contig	4,44	56,9	58	Palestina	Muestra de herida humana, Hospital Al-Shifa	GCA_002120045.1	Laham <i>et al.</i> 2017
<i>A. faecalis</i>	MOR02	Contig	4,4	56,4	23	México	Hemolinfa de un cadáver de larva <i>Galleria mellonella</i>	GCA_000770015.1	Quiroz-Castañeda <i>et al.</i> 2015
<i>A. faecalis</i>	NBIB-017	Scaffold	4,17	56,4	17	China	Arrozal en la provincia de Hubei	GCA_001530325.1	Liu <i>et al.</i> 2016
<i>A. faecalis</i> subsp. <i>faecalis</i>	NCIB 8687	Contig	3,9	57,2	186	USA	Muestra de suelo desde el patio del Instituto Politécnico Rensselaer	GCA_000275465.1	No publicado
<i>A. faecalis</i> subsp. <i>faecalis</i>	NCTC 10388	Contig	4,25	56,3	8	UK	Herida humana, Bristol	GCA_900445215.1	No publicado
<i>A. faecalis</i> subsp. <i>fenolicus</i>	DSM 16503 ^T	Scaffold	4,25	56,4	27	USA	Bioprosesor de aguas grises, Centro Espacial Johnson, Houston, Texas	GCA_000429385.1	Reh fuss <i>et al.</i> 2005
<i>A. faecalis</i> subsp. <i>fenolicus</i>	IITR89	Scaffold	3,77	57,6	23	India	Río Cauvery en Erode, India	GCA_001516865.1	Regar <i>et al.</i> 2016
<i>A. faecalis</i> subsp. <i>fenolicus</i>	MB207	Contig	4,16	56,4	9	Pakistán	Efluente de una curtería en Multan	GCA_002082085.1	Basharat <i>et al.</i> 2018
<i>A. faecalis</i>	UBA1128 5	Scaffold	3,92	55,4	16	Australia	Muestra de queso, (metagenoma)	GCA_003521065.1	Parks <i>et al.</i> 2017
<i>A. faecalis</i>	UBA3227	Scaffold	4,05	56	11	USA	Metal, MTA de la ciudad de New York (metagenoma)	GCA_002362965.1	Parks <i>et al.</i> 2017
<i>A. faecalis</i>	UBA3878	Scaffold	3,68	57,2	16	USA	Madera, MTA de la ciudad de New York (metagenoma)	GCA_002392125.1	Parks <i>et al.</i> 2017

<i>A. faecalis</i>	UBA7605	Scaffold	3,99	56,4	8	USA	Madera, MTA de la ciudad de New York (metagenoma)	GCA_002476455.1	Parks <i>et al.</i> 2017
<i>A. faecalis</i>	UBA7622	Scaffold	3,93	55,9	9	USA	Madera, MTA de la ciudad de New York (metagenoma)	GCA_002484125.1	Parks <i>et al.</i> 2017
<i>A. faecalis</i>	UBA7629	Scaffold	4,17	56,9	15	USA	Metal, MTA de la ciudad de New York (metagenoma)	GCA_002484005.1	Parks <i>et al.</i> 2017
<i>A. faecalis</i>	YBY	Contig	4,33	56,6	11	China	Lodo activado	GCA_003122065.1	No publicado
<i>Alcaligenes</i> sp.	EGD-AK7	Contig	4,28	56,6	69	India	Suelo agrícola	GCA_000465875.3	Sagarkar <i>et al.</i> 2014
<i>Alcaligenes</i> sp.	HPC1271	Contig	4,27	56,6	78	India	Lodo activado del efluente de una planta de tratamiento de aguas residuales industriales	GCA_000313875.1	Kapley <i>et al.</i> 2013

(GenBank, Septiembre 2018)

Tabla 27. Categorías COGs de *Alcaligenes* spp.

Categorías COGs	<i>A. aquatilis</i> QD168	<i>A. aquatilis</i> BU33N	<i>A. faecalis</i> ZD02	<i>A. faecalis</i> DSM 30030^T	<i>A. faecalis</i> DSM 16503^T	<i>A. faecalis</i> JQ135	<i>A. faecalis</i> MB207	<i>A. faecalis</i> GZAF5	<i>Alcaligenes</i> sp. EGD-AK7
[D] Control del ciclo celular, división celular y segregación cromosómica	0,75	0,74	0,75	0,76	0,73	0,77	0,73	0,8	0,72
[M] Biogénesis de pared celular, membrana y cápsula.	4,34	4,85	4,79	4,61	4,68	4,69	4,72	4,64	4,71
[N] Movilidad celular	1,08	1,14	1,11	1,19	1,11	1,06	1,13	1,02	1,1
[O] Modificaciones postraduccionales, recambio de proteínas y chaperonas	3,51	3,72	3,45	3,48	3,37	3,51	3,44	3,35	3,36
[T] Mecanismos de transducción de señales	2,91	3,09	3,32	3,11	3,2	2,96	3,44	2,99	2,84
[U] Tráfico intracelular, secreción y transporte vesicular.	2,68	1,7	1,96	1,61	2,89	2,05	1,73	2,16	2,04
[V] Mecanismos de defensa	1,03	1,02	1,18	1,13	1,16	1,25	1,23	1,21	1,02
[W] Estructuras extracelulares	0,0	0,03	0,03	0,03	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
[A] Procesamiento y modificación del ARN	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,02	0,02
[B] Estructura y dinámica de la cromatina	0,08	0,09	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,07	0,07
[J] Traducción, estructura y biogénesis ribosomal	4,34	4,88	4,56	4,64	4,48	4,61	4,67	4,32	4,31
[K] Transcripción	7,95	8,09	8,63	8,22	8,16	7,8	8,64	8,84	7,87
[L] Replicación, recombinación y reparación	5,11	3,46	3,48	3,74	4,08	3,81	3,28	4,05	3,59
[C] Producción y conversión de energía	6,19	7,18	6,72	6,85	6,42	6,71	6,75	6,39	6,33
[E] Transporte y metabolismo de aminoácidos	7,4	8,37	7,96	8,36	7,75	7,93	8,22	7,62	7,62
[F] Transporte y metabolismo de nucleótidos	2,13	2,47	2,27	2,24	2,14	2,26	2,34	2,14	2,19
[G] Transporte y metabolismo de carbohidratos	3,91	4,34	4,46	4,24	4,0	4,1	4,38	4,27	4,01
[H] Transporte y metabolismo de coenzimas	3,06	3,38	3,17	3,14	2,94	3,25	3,1	3,01	2,94
[I] Transporte y metabolismo de lípidos	3,01	3,26	3,24	3,32	3,4	3,25	3,31	3,08	3,21
[P] Transporte y metabolismo de iones inorgánicos	6,34	6,78	7,24	6,91	6,72	6,68	7,11	6,7	6,28
[Q] Transporte, catabolismo y biosíntesis de metabolitos secundarios	3,06	3,32	3,24	3,29	3,1	3,14	3,28	3,11	2,94
[S] Función desconocida	23,67	21,06	21,94	21,43	21,6	21,46	21,23	22,85	23,89
No clasificados	7,45	7,01	6,41	7,59	7,93	8,55	7,11	7,31	8,87

Tabla 28. Rutas centrales de compuestos aromáticos predichas en *A. aquatilis* QD168

Ruta Central	Gen	ORF	CDS	Función	Organismo (identidad %/similitud %)	N° de acceso
Catecol	<i>catR</i>	D3M96_09450	CatR	Regulador transcripcional, (Familia LysR)	<i>A. iwoffii</i> K24 (60/79)	O33945.1
	<i>catB</i>	D3M96_09455	CatB	Muconato cicloisomerasa	<i>A. iwoffii</i> K24 (64/78)	O33946.1
	<i>catA</i>	D3M96_09460	CatA	Catecol 1,2-dioxigenasa	<i>A. baylyi</i> ADP1 (73/85)	P07773.1
	<i>catI</i>	D3M96_09465	CatI	3-Oxo adipato CoA-transferasa subunidad A	<i>P. putida</i> (71/86)	Q01103.2
	<i>catJ</i>	D3M96_09470	CatJ	3-Oxo adipato CoA-transferasa subunidad B	<i>P. putida</i> KT2440 (68/81)	P0A101.2
	<i>catD</i>	D3M96_09475	CatD	3-Oxo adipato enol-lactonasa	<i>A. baylyi</i> ADP1 (53/67)	P00632.3
	<i>catC</i>	D3M96_09480	CatC	Muconolactona delta-isomerasa	<i>A. iwoffii</i> K24 (69/81)	O33947.1
Protocatecuato	<i>ligC</i>	D3M96_07050	LigC	4-Carboxi-2-hidroxi muconato-6-semialdehido deshidrogenasa	<i>S. paucimobilis</i> SYK6 (73/82)	Q9KWL3.1
	<i>ligB</i>	D3M96_07055	LigB	Protocatecuato 4,5-dioxigenasa subunidad beta	<i>S. paucimobilis</i> SYK6 (58/78)	P22636.1
	<i>ligA</i>	D3M96_07060	LigA	Protocatecuato 4,5-dioxigenasa subunidad alfa	<i>S. paucimobilis</i> SYK6 (61/79)	P22635.1
	<i>ligI</i>	D3M96_07065	LigI	2-Pirona-4,6-dicarboxilato hidrolasa	<i>Comamonas</i> sp. E6 (75/87)	Q93PS7.1
	<i>ligK</i>	D3M96_07070	LigK	4-Carboxi-4-hidroxi-2-oxo adipato aldolasa	<i>P. straminea</i> (92/95)	Q9AQI0.1
	<i>ligJ</i>	D3M96_07075	LigJ	4-Oxalomesaconato hidrolasa	<i>Acidovorax</i> sp. T1 (94/97)	WP_08774320
	<i>pcaK</i>	D3M96_07080	PcaK	4-Hidroxi benzoato transportador	<i>P. putida</i> KT2440 (49/67)	Q51955.1
	<i>galD</i>	D3M96_07085	GalD	4-Oxalomesaconato tautomerasa	<i>P. putida</i> KT2440 (49/64)	Q88JY0.1
	<i>pcaQ</i>	D3M96_07090	LysR	Regulador transcripcional (Familia LysR)	<i>E. coli</i> K-12 (35/57)	Q47005.1
3-(2,3-Dihidroxifenil) propionato/ 2,3-dihidroxicinamato	<i>mhpB</i>	D3M96_14800	MhpB	2,3-Dihidroxifenilpropionato/2,3-Dihidroxicinamato 1,2-dioxigenasa	<i>P. putida</i> (59/74)	Q9F9U5.1
	<i>mhpC</i>	D3M96_14805	MhpC	2-Hidroxi-6-oxononadiendioato/2-hidroxi-6-oxononatriendioato hidrolasa	<i>K. pneumoniae</i> MGH 78578 (76/87)	A6TAC7.1
	<i>mhpD</i>	D3M96_14810	MhpD	2-Ceto-4-pentenoato hidratasa	<i>P. putida</i> (69/81)	Q49KF9.1
	<i>mhpF</i>	D3M96_14815	MhpF	Acetaldehido deshidrogenasa	<i>C. necator</i> H16 (78/88)	Q0K3S6.1
	<i>mhpE</i>	D3M96_14820	MhpE	4-Hidroxi-2-oxo valerato aldolasa	<i>D. aromatica</i> RCB (90/96)	Q47B13.1
	<i>mhpT</i>	D3M96_14825	MhpT	3-(3-Hidroxi fenil) propionato transportador	<i>E. coli</i> K-12 (44/64)	P77589.2
Fenilacetil-CoA	<i>paaA</i>	D3M96_12710	PaaA	1,2-Fenilacetil-CoA epoxidasa, subunidad A	<i>E. coli</i> K-12 (68/82)	P76077.1
	<i>paaB</i>	D3M96_12705	PaaB	1,2-Fenilacetil-CoA epoxidasa, subunidad B	<i>E. coli</i> K-12 (63/80)	P76078.1
	<i>paaC</i>	D3M96_12700	PaaC	1,2-Fenilacetil-CoA epoxidasa, subunidad C	<i>E. coli</i> K-12 (48/63)	P76079.1
	<i>paaD</i>	D3M96_12695	PaaD	1,2-Fenilacetil-CoA epoxidasa, subunidad D	<i>E. coli</i> K-12 (49/65)	P76080.2
	<i>paaE</i>	D3M96_12690	PaaE	1,2-Fenilacetil-CoA epoxidasa, subunidad E	<i>E. coli</i> K-12 (46/64)	P76081.1
	<i>paaZ</i>	D3M96_12685	PaaZ	Oxepina-CoA hidrolasa	<i>E. coli</i> K-12 (27/45)	P77455.1
	<i>paaG</i>	D3M96_12680	PaaG	1,2-Epoxifenilacetil-CoA isomerasa	<i>E. coli</i> K-12 (58/73)	P77467.1

	<i>paal</i>	D3M96_12675	Paal	Acil-coenzima A tioesterasa	<i>E. coli</i> K-12 (53/70)	P76084.1
Homogentisato	<i>hmgC</i>	D3M96_13400	HmgC	Maleilacetoacetato isomerasa	<i>P. aeruginosa</i> PAO1 (47/64)	P57109.1
	<i>hmgA</i>	D3M96_03780	HmgA	Homogentisato 1,2-dioxigenasa	<i>B. avium</i> 197N (77/84)	Q2KYC8.1
	<i>hmgB</i>	D3M96_03775	HmgB	Fumarilacetoacetasa	<i>B. pertussis</i> Tohama I (65/78)	Q7VUG1
2,5-dihidroxi nicotinato	<i>nicE</i>	D3M96_17640	NicE	Maleato isomerasa	<i>A. faecalis</i> (98/98)	O24766.1
	<i>nicD</i>	D3M96_16080	NicD	N-formilmaleamato deformilasa	<i>P. putida</i> KT2440 (59/73)	Q88FY3.1
	<i>nicX</i>	D3M96_16075	NicX	2,5-Dihidroxipiridina 5,6-dioxigenasa	<i>P. putida</i> KT2440 (55/70)	Q88FY1.1
	<i>nicF</i>	D3M96_16070	NicF	Maleamato amidohidrolasa	<i>P. putida</i> KT2440 (43/56)	Q88FY5.1
	<i>nicD2</i>	D3M96_15900	NicD2	N-formilmaleamato deformilasa	<i>P. putida</i> KT2440 (60/73)	Q88FY3.1
	<i>nicX2</i>	D3M96_15895	NicX2	2,5-dihidroxipiridina 5,6-dioxigenasa	<i>P. putida</i> KT2440 (55/70)	Q88FY1.1
	<i>nicF2</i>	D3M96_15890	NicF2	Maleamato amidohidrolasa	<i>P. putida</i> KT2440 (43/53)	Q88FY5.1
Gentisato	<i>sdgD</i>	D3M96_00260	SdgD	Gentisato 1,2-dioxigenasa	<i>Streptomyces</i> sp. (37/51)	Q7X284.1
	<i>nagL</i>	D3M96_13400	NagL1	Maleilpiruvato isomerasa	<i>V. cholerae</i> N16961 (46/69)	Q9KSB2.1
	<i>nagK</i>	D3M96_11765	NagK	Fumarilpiruvato hidrolasa	<i>Ralstonia</i> sp. (42/64)	O86042.1

Tabla 29. Rutas y reacciones periféricas de compuesto aromáticos predichas en *A. aquatilis* QD168

Ruta central	Ruta/Reacción periférica	Gen	ORF	CDS	Función	Organismo (identidad %/similitud %)	N° de acceso
Catecol	Benzoato	<i>benE</i>	D3M96_09800	BenE	Benzoato transportador	<i>A. baylyi</i> ADP1 (46/68)	O30513.2
		<i>benD</i>	D3M96_09795	BenD	1,2-dihidroxi-3,4-ciclohexadieno-1-carboxilato deshidrogenasa	<i>P. putida</i> (66/76)	P23102.1
		<i>benC</i>	D3M96_09790	BenC	Benzoato 1,2-dioxigenasa oxidoreductasa	<i>A. baylyi</i> ADP1 (51/67)	P07771.2
		<i>benB</i>	D3M96_09785	BenB	Benzoato 1,2-dioxigenasa beta subunidad	<i>B. cepacia</i> 2CBS (58/73)	P07770.1
		<i>benA</i>	D3M96_09780	BenA	Benzoato 1,2-dioxigenasa alpha subunidad	<i>B. cepacia</i> 2CBS (63/77)	P07769.2
		<i>benM</i>	D3M96_09775	BenM	Regulador transcripcional, Familia LysR	<i>A. baylyi</i> ADP1 (41/64)	O68014.2
	Fenol/Benceno	<i>dmpP</i>	D3M96_09760	DmpP	Fenol hidroxilasa proteína P5	<i>A. pittii</i> PHEA-2 (73/84)	Q7WTJ2.3
		<i>dmpO</i>	D3M96_09755	DmpO	Fenol hidroxilasa proteína P4	<i>Pseudomonas</i> sp. CF600 (40/61)	P19733.1
		<i>dmpN</i>	D3M96_09750	DmpN	Fenol hidroxilasa proteína P3	<i>Pseudomonas</i> sp. CF600 (72/83)	P19732.1
		<i>dmpM</i>	D3M96_09745	DmpM	Fenol hidroxilasa proteína P2	<i>Pseudomonas</i> sp. CF600 (59/76)	P19731.1
		<i>dmpL</i>	D3M96_09740	DmpL	Fenol hidroxilasa proteína P1	<i>A. pittii</i> PHEA-2 (60/75)	Q7WTJ6.3
		<i>dmpK</i>	D3M96_09735	DmpK	Fenol hidroxilasa proteína P0	<i>Pseudomonas</i> sp. CF600 (53/66)	P19729.1
		<i>dmpR</i>	D3M96_09730	DmpR	Regulador transcripcional (Fenol)	<i>A. guillouiae</i> NCIB 8250 (56/72)	Q43965.1
Antranilato	<i>andAd</i>	D3M96_16060	AndAd	Antranilato 1,2-dioxigenasa subunidad menor	<i>B. cepacia</i> (35/57)	Q84BZ2.1	
	<i>andAc</i>	D3M96_16055	AndAc	Antranilato 1,2-dioxigenasa subunidad mayor	<i>B. cepacia</i> (42/63)	Q84BZ3.1	
	<i>andAb</i>	D3M96_16050	AndAb	Antranilato 1,2-dioxigenasa componente reductasa	<i>B. cepacia</i> (33/49)	Q84BZ0.1	
	<i>andAa</i>	D3M96_16045	AndAa	Antranilato 1,2-dioxigenasa subunidad ferredoxina	<i>B. cepacia</i> (58/72)	Q84BZ1.1	
Triptófano	<i>kynA</i>	D3M96_18575	KynA	Triptófano 2,3-dioxigenasa	<i>P. naphthalenivorans</i> CJ2 (81/88)	A1VRP1.1	
	<i>kynB</i>	D3M96_00275	KynB	Quinurenina formamidasa	<i>S. ruber</i> DSM 13855 (25/37)	Q2S2F5.1	
	<i>kynU1</i>	D3M96_08330	KynU1	Quinureninasa	<i>D. radiodurans</i> R1 (31/47)	Q9RYH5.2	
	<i>kynU2</i>	D3M96_02255	KynU2	Quinureninasa	<i>P. fluorescens</i> (57/71)	P83788.1	
Protocatecuato	4-Hidroxibenzoato	<i>phbA</i>	D3M96_07120	PhbA	4-Hidroxibenzoato hidroxilasa	<i>P. aeruginosa</i> PAO1 (65/76)	P20586.1
	4-cresol	<i>pchC</i>	D3M96_07105	PchC	4-cresol deshidrogenasa subunidad citocromo c	<i>P. putida</i> NCIMB 9869 (44/63)	P09787.2
		<i>pchF</i>	D3M96_07115	PchF	4-cresol deshidrogenasa subunidad flavoproteína	<i>P. putida</i> NCIMB 9869 (77/88)	P09788.3
		<i>pchA</i>	D3M96_07100	PchA	4-hidroxibenzaldehido deshidrogenasa	<i>P. putida</i> NCIMB 9869 (37/57)	Q59702.2
	4-carboxidifenil éter	<i>pobA</i>	D3M96_00065	PobA	Fenoxibenzoato dioxigenasa subunidad alfa	<i>P. pseudoalcaligenes</i> POB310 (30/46)	Q52185.1

		<i>pobB</i>	D3M96_00060	PobB	Fenoxibenzoato dioxigenasa subunidad beta	<i>P. pseudoalcaligenes</i> POB310 (40/54)	Q52186.1
3-(2,3-Dihidroxifenil)-propionato /2,3-dihidroxicinamato	3-fenilpropionato/cinamato	<i>hcaD</i>	D3M96_14795	HcaD	3-Fenilpropionate/cinnamate dioxigenasa ferredoxina	<i>P. luminicens</i> subsp. <i>laumondii</i> TTO1 (45/63)	Q7N4V5.1
		<i>hcaB</i>	D3M96_14790	HcaB	3-Fenilpropionate-dihidrodiol/cinnamate-dihidrodiol deshidrogenasa	<i>E. coli</i> IAI1 (70/80)	B7M7P4.1
		<i>hcaC</i>	D3M96_14785	HcaC	3-Fenilpropionate/cinamato dioxigenasa ferredoxinaa	<i>E. coli</i> O157:H7 (66/76)	P0ABW1.1
		<i>hcaF</i>	D3M96_14780	HcaF	3-Fenilpropionate/cinamato dioxigenasa subunidad beta	<i>P. luminicens</i> subsp. <i>laumondii</i> TTO1 (66/79)	Q7N4V9.1
		<i>hcaE</i>	D3M96_14775	HcaE	3-fenilpropionate/cinamato dioxigenasa subunidad alfa	<i>P. luminicens</i> subsp. <i>laumondii</i> TTO1 (78/87)	Q7N4W0.1
		<i>hcaR</i>	D3M96_14770	HcaR	Activator transcripcional HcaR	<i>E. coli</i> K-12 (46/59)	Q47141.2
Fenilacetil-CoA	Fenilacetato	<i>paaK</i>	D3M96_12670	PaaK	Fenilacetato-CoA ligase	<i>A. Evansii</i> KB 740 (71/84)	Q9L9C1.1
	Estireno	<i>styB</i>	D3M96_00350	StyB	Flavina reductasa dependiente de NADH	<i>P. fluorescens</i> (36/55)	O06835.1
		<i>styA</i>	D3M96_00345	StyA	Estireno monooxigenasa	<i>P. fluorescens</i> (30/47)	O06834.1
Homogentisato	4-Hidroxifenil piruvato	<i>hpd</i>	D3M96_15170	Hpd	4-Hidroxifenilpiruvato dioxigenasa	<i>Pseudomonas</i> sp. P.J. 874 (85/90)	P80064.1
	Fenilpiruvato	<i>hpd</i>	D3M96_15170	Hpd	4-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa	<i>Pseudomonas</i> sp. P.J. 874 (85/90)	P80064.1
	Tirosina	<i>tyrB1</i>	D3M96_08960	TyrB	Aminoácido aromático aminotransferasa	<i>P. aeruginosa</i> PAO1 (67/80)	P72173.2
		<i>tyrB2</i>	D3M96_19035	TyrB	Aminoácido aromático aminotransferasa	<i>E. coli</i> K-12 (55/71)	P04693.1
2,5-Dihidroxinicotinato	Nicotinato	<i>nicT</i>	D3M96_09560	NicT	Proteína de Transporte NicT	<i>P. putida</i> KT2440 (77/87)	Q88FY6.1
		<i>nicC</i>	D3M96_09555	NicC	6-Hidroxinicotinato 3-monooxigenasa	<i>P. putida</i> KT2440 (84/91)	Q88FY2.1
		<i>nicR</i>	D3M96_09550	NicR	Represor transcriptional tipo HTH, NicR	<i>P. putida</i> KT2440 (71/82)	Q88FY0.1
		<i>nicB1</i>	D3M96_15915	NicB1	Nicotinato deshidrogenasa subunidad B	<i>P. putida</i> KT2440 (41/56)	Q88FX8.1
		<i>nicA</i>	D3M96_15910	NicA	Nicotinato deshidrogenasa subunidad A	<i>P. putida</i> KT2440 (63/80)	Q88FX9.1
		<i>nicB2</i>	D3M96_15905	NicB2	Nicotinato deshidrogenasa subunidad B	<i>P. putida</i> KT2440 (58/70)	Q88FX8.1
Gentisato	Saliciloil-CoA	<i>sdgC</i>	D3M96_00255	SdgC	Saliciloil-CoA 5-hidroxilasa	<i>Streptomyces</i> sp. WA46 (40/54)	Q7X281.1

Tabla 30. Genes de respuesta a estrés oxidativo en *A. aquatilis* QD168

Categoría	Gen	ORF	CDS	Función	Organismo (identidad %/similitud %)	N° de acceso
Enzimas antioxidantes	<i>ahpC1</i>	D3M96_12750	AhpC1	Alquil hidroperóxido reductasa subunidad C (peroxidasa)	<i>M. tuberculosis</i> CDC 1551 (36/55)	P9WQB6.1
	<i>ahpC2</i>	D3M96_15655	AhpC2	Alquil hidroperóxido reductasa subunidad C (peroxidasa)	<i>S. Typhimurium</i> LT2 (70/83)	P0A251.2
	<i>ahpD</i>	D3M96_11630	AhpD	Alquil hidroperóxido reductasa AhpD (reductasa)	<i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 (32/53)	Q9ANL0.1
	<i>ahpF</i>	D3M96_15650	AhpF	Alquil hidroperóxido reductasa subunidad AhpF (reductasa)	<i>P. putida</i> KT2440 (70/82)	P0A155.1
	<i>bcp</i>	D3M96_06785	Bcp	Peroxirredoxina Bcp	<i>C. burnetii</i> RSA 493 (48/67)	Q83CY8.1
	<i>ccp1</i>	D3M96_07750	Ccp1	Citocromo c551 peroxidasa	<i>N. europaea</i> ATCC 19718 (34/51)	P55929.2
	<i>ccp2</i>	D3M96_04015	Ccp2	Citocromo c551 peroxidasa	<i>N. europaea</i> ATCC 19718 (65/78)	P55929.2
	<i>grxC</i>	D3M96_17565	GrxC	Glutaredoxina 3	<i>P. aeruginosa</i> PAO1 (52/70)	Q9HU55.1
	<i>grxD</i>	D3M96_17835	GrxD	Glutaredoxina 4	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 (57/74)	P73056.1
	<i>hyPrx5</i>	D3M96_10550	HyPrx5	Peroxirredoxina híbrida hyPrx5	<i>H. influenzae</i> Rd KW20 (44/57)	P44758.1
	<i>katA</i>	D3M96_19795	KatA	Catalasa	<i>B. pertussis</i> Tohama I (76/88)	P0A323.1
	<i>katE</i>	D3M96_12900	KatE	Catalasa C	<i>S. meliloti</i> 1021 (60/73)	Q9X576.2
	<i>prx</i>	D3M96_04155	Prx	Peroxirredoxina	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 substr. Kazusa (42/61)	P73728.1
	<i>rubA2</i>	D3M96_16850	RubA2	Rubredoxina-2	<i>P. aeruginosa</i> PAO1 (65/79)	Q9HTK8.1
	<i>sodB1</i>	D3M96_09520	SodB1	Superóxido dismutasa [Mn/Fe]	<i>Methylomonas</i> sp. J (73/82)	P23744.1
	<i>sodB2</i>	D3M96_08650	SodB2	Superóxido dismutasa [Fe]	<i>B. pertussis</i> Tohama I (85/89)	P37369.2
	<i>sodC1</i>	D3M96_17950	SodC1	Superóxido dismutasa [Cu-Zn] 1	<i>S. Typhimurium</i> ST4/74 (60/74)	E8XDJ8.1
	<i>tlpA</i>	D3M96_11580	TlpA	Proteína similar a tiorredoxina TlpA	<i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 (35/52)	P43221.1
	<i>trxA</i>	D3M96_12535	TrxA	Tiorredoxina 1	<i>P. aeruginosa</i> PAO1 (74/87)	Q9X2T1.1
	<i>trxB</i>	D3M96_14510	TrxB	Tiorredoxina reductasa	<i>V. cholerae</i> O1 biovar El Tor N16961 (70/82)	Q9KSS4.1
<i>trxC1</i>	D3M96_11430	TrxC1	Tiorredoxina 2	<i>S. coelicolor</i> A3(2) (51/68)	9RD25.1	
<i>trxC2</i>	D3M96_15235	TrxC2	Tiorredoxina 2	<i>S. coelicolor</i> A3(2) (41/48)	Q9RD25.1	
Regulador transcripcional	<i>ohrR</i>	D3M96_17665	OhrR	Regulador transcripcional de resistencia a peróxidos orgánicos	<i>B. subtilis</i> subsp. subtilis 168 (29/49)	O34777.1
	<i>oxyR</i>	D3M96_10585	OxyR	Activador de genes inducible por peróxido de hidrógeno OxyR	<i>D. chrysanthemi</i> (42/60)	P71318.1
	<i>perR</i>	D3M96_00075	PerR	Regulador transcripcional tipo HTH PerR	<i>E. coli</i> K-12 (37/51)	Q57083.1

	<i>soxR1</i>	D3M96_08910	SoxR1	Activador transcripcional sensible a Redox SoxR	<i>S. Typhimurium</i> LT (61/74)	P0A2R0.1
	<i>soxR2</i>	D3M96_14980	SoxR2	Activador transcripcional sensible a Redox SoxR	<i>E. coli</i> O157:H7 (63/76)	P0ACS3.1
Isoforma resistente a ROS	<i>acnA1</i>	D3M96_08240	AcnA1	Aconitato hidratasa A	<i>T. thermophilus</i> HB8 (50/68)	Q5SMF6.1
	<i>acnA2</i>	D3M96_18610	AcnA2	Aconitato hidratasa A	<i>M. smegmatis</i> MC2 155 (68/79)	A0QX20.1
	<i>fumC</i>	D3M96_10680	FumC	Fumarato hidratasa, clase II	<i>D. radiodurans</i> R1 (74/83)	Q9RR70.1