



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

Facultad de Ciencias de la Vida
Ingeniería en Biotecnología

Tesis de Pregrado

**“Caracterización y potencial biorremediador de bacterias
aisladas de asfalto proveniente de la Cantera de
Pungarayacu en la Provincia de Napo, Ecuador”**

Bryan David Pazmiño Centeno

14 de mayo de 2021, ciudad de Tena, Napo, Ecuador

Declaración de derecho de autor, autenticidad y responsabilidad

Tena, 14 de mayo de 2021

Yo, Bryan David Pazmiño Centeno con documento de identidad N° 2200503551, declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título Ingeniero en Biotecnología son absolutamente inéditos, originales, auténticos y personales.

En virtud de lo cual, el contenido, criterios, opiniones, resultados, análisis, interpretaciones, conclusiones, recomendaciones y todos los demás aspectos vertidos en la presente investigación son de mi autoría y de mi absoluta responsabilidad.

Por la favorable atención a la presente, suscribo de usted,

Atentamente,

Firma:



Bryan David Pazmiño Centeno

Certificado de dirección de trabajo de integración curricular

Certifico que el trabajo de integración curricular titulado: “Caracterización y potencial biorremediador de bacterias aisladas de asfalto proveniente de la Cantera de Pungarayacu en la Provincia de Napo, Ecuador”, en la modalidad de Tesis, fue realizado por Bryan David Pazmiño Centeno, bajo mi dirección.

El mismo ha sido revisado en su totalidad y analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad Regional Amazónica Ikiam, para su entrega y defensa.

Tena, 14 de mayo de 2021

Firma:



Firmado electrónicamente por:
**LEOPOLDO ANTONIO
NARANJO BRICENO**

Leopoldo Antonio Naranjo Briceño

C.I: 1758579294

Agradecimientos

A mi tutor, el Ph.D. Leopoldo Naranjo por todo el tiempo y trabajo que dedicó para la realización de este proyecto de investigación, por todos aquellos consejos que compartió conmigo en bien de mi formación profesional, y sobre todo por su gran carisma y personalidad que lo convierten en una excelente persona e investigador.

A las técnicas de laboratorio de Biología Molecular de Ikiam, Sonia Sislema, Susana Araujo y Nina Espinosa de los Monteros, quienes me proporcionaron su apoyo durante diferentes etapas del trabajo en el laboratorio. Un especial agradecimiento a Katherine Apunte, técnica de laboratorio que siempre me ayudó con su compañía y dirección a la hora de planificar y llevar a cabo muchos de los ensayos realizados. Permitiste que esta experiencia sea mucho más llevadera y amena con tus enseñanzas, consejos y entretenidas pláticas.

A todos los profesores que fueron parte de mi formación profesional, en especial al Ph.D. Rafael de Almeida y a las Ph.D. Caroline Bacquet, Ph.D. Carolina Proaño y Ph.D. Ery Fukushima, que, con su gran carisma, sentido del humor y excelente enseñanza, supieron hacer que me enamorase aún más de la carrea universitaria que elegí.

Dedicatoria

Dedico este trabajo principalmente a mi familia por haberme apoyado desde el inicio. A mi padre Manuel por haberme brindado la oportunidad de continuar con mis estudios, siempre lo he observado y sé por las difíciles situaciones que tuvo que pasar, saliendo victorioso de cada una de ellas. Eres uno de mis principales ejemplos a seguir. A mi madre Pilar por todos los consejos que me ha dado desde que tengo memoria, por ser mi apoyo moral en tiempos difíciles; sin ti no habría llegado a donde estoy ahora. Que este trabajo represente el fruto de todos sus sacrificios, un agradecimiento a todo el tiempo, empeño y esfuerzo que realizaron, a todo el amor y confianza que me otorgaron. Dedico también este trabajo a mis dos hermanas menores, a las que amo mucho y quisiera animar a continuar con sus estudios.

A mi tía Sammy, quien me acogió en su hogar para poder realizar la mayor parte de mis prácticas preprofesionales. Su apoyo fue fundamental para obtener este logro. También a sus hijos que siempre fueron muy atentos y amables conmigo.

A mi abuelita Rosa, con la que podía hablar de lo que sea durante horas. La mejor parte de viajar a mi tierra natal es poder visitarte. A mi abuelita Laura, que siempre me decía que estaba orgullosa de mí y que no podía esperar para verme graduado. Lastimosamente nos dejaste antes de que pudiera cumplirte ese anhelo. Hoy te recuerdo con mucha nostalgia y te dedico este trabajo.

A aquellas personas que al inicio de esta experiencia eran desconocidos pero que hoy puedo llamar amigos; los cuales con sus ideas, conocimientos y divertidas pláticas hicieron que esta experiencia sea de las mejores que he vivido. Alejandro y Mónica, gracias por su sincera amistad y confianza; son de las mejores personas que he llegado a conocer.

Índice general

Declaración de derecho de autor, autenticidad y responsabilidad	ii
Certificado de dirección de trabajo de integración curricular	iii
Agradecimientos.....	iv
Dedicatoria	v
Índice general	vi
Índice de tablas.....	viii
Índice de figuras	ix
Índice de anexos	xiii
Resumen	xiv
Abstract.....	xv
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	1
1.1. Antecedentes.....	1
1.2. Planteamiento del problema.....	8
1.3. Justificación de la investigación.....	9
1.4. Objetivos de la investigación.....	10
CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO	11
2.1. Ubicación del área de estudio	11
2.2. Recolección de muestras de asfalto aflorante	11
2.3. Aislamiento de las cepas bacterianas cultivables.....	11
2.4. Caracterización morfológica de las cepas bacterianas aisladas.....	12
2.5. Caracterización bioquímica de las cepas bacterianas aisladas	12
2.6. Caracterización e identificación molecular de las cepas bacterianas aisladas	13

2.7.	Análisis <i>in silico</i> del potencial biotecnológico de las cepas bacterianas aisladas	15
3.	CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS	17
3.1.	Aislamiento, densidad y características morfológicas de las cepas bacterianas cultivables.....	17
3.2.	Perfil metabólico de las cepas bacterianas seleccionadas basado en pruebas bioquímicas.....	18
3.3.	Caracterización molecular de las cepas bacterianas seleccionadas	18
3.4.	Análisis estructural <i>in silico</i> de las enzimas de interés biotecnológico	22
	CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
4.1.	Identificación tradicional de las cepas bacterianas aisladas.....	39
4.2.	Identificación molecular y clasificación taxonómica de las cepas bacterianas aisladas	39
4.3.	Potenciales aplicaciones biotecnológicas de las cepas bacterianas aisladas.....	40
	CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	51
5.1.	Conclusiones.....	51
5.2.	Recomendaciones.....	51
	REFERENCIAS	53
	ANEXOS	59

Índice de tablas

Tabla 1. Biosurfactantes de importancia económica [12].	5
Tabla 2. Pruebas bioquímicas empleadas para la caracterización del perfil metabólico de las cepas bacterianas seleccionadas.....	12
Tabla 3. Características macro y micromorfológicas de las cepas bacterianas aisladas.	18
Tabla 4. Perfil metabólico de las cepas bacterianas seleccionadas basado en pruebas bioquímicas.....	18
Tabla 5. Identificación molecular de las cepas bacterianas seleccionadas.	20

Índice de figuras

Figura 1. Tecnologías de remediación basada en procesos físicos o químicos [4].	2
Figura 2. Técnicas de biorremediación clasificadas de acuerdo al lugar de aplicación [5].	3
Figura 3. A. Principales mecanismos mejorados de desorción y emulsificación de hidrocarburos empleando biosurfactantes. B. Principales interacciones entre células bacterianas y biosurfactantes [14].	6
Figura 4. Características estructurales de las NRPSs que biosintetizan la surfactina en <i>Bacillus subtilis</i> [10].	8
Figura 5. Cepas bacterianas aisladas en cultivo axénico y su tinción Gram respectiva	17
Figura 6. Genotipos de las cepas bacterianas aisladas obtenidos con la técnica DNA fingerprinting y los oligonucleótidos ERIC-ERIC. El carril C- es un control negativo que comprende todos los reactivos de PCR cargados con agua en lugar de muestra. Los carriles M y 12 representa un marcador molecular de 1 kb. Los carriles 3, 6 y 9 son carriles vacíos. Los carriles del 1 al 11 representan las cuatro cepas estudiadas por duplicado. Los carriles 13 y 14 pertenecen al genotipo de una cepa desconocida que en este caso se empleó como control positivo de la PCR.	19
Figura 7. Árbol filogenético de las cepas bacterianas seleccionadas (●) basado en sus secuencias parciales del gen 16S ARNr.	21
Figura 8. Modelo de la estructura tridimensional de la Serrawettin 1 sintasa putativa (SwrW) de <i>Serratia marcescens</i> . A: Representación en superficie (superior) y cartoon (inferior) de SwrW. Sus dominios de Condensación, Adenilación (dominio core y subdominio), Tiolación y Tioesterificación se señalan con las abreviaturas C, A _{core} , A _{sub} , T y TE, respectivamente. B: Representación en superficie y cartoon del módulo terminal de la síntesis de surfactina (SrfA-C). Sus dominios se indican con la misma nomenclatura antes descrita. C: Superposición de las representaciones en superficie y cartoon de SwrW y SrfA-C.	22
Figura 9. Representación en cartoon de los dominios de condensación (C) de SwrW y SrfA-C. Al extremo derecho la superposición de ambos dominios.	23

Figura 10. Motivos conservados del dominio de condensación. A: Localización espacial de los motivos conservados (C1-C7) del dominio C de SwrW. B: Alineamiento parcial de secuencias del dominio de condensación de SwrW, SrfA-C, EntF (Enterobactina sintetasa, *Escherichia coli*), SyrE (Siringomincina sintetasa, *Pseudomonas syringae*), grsB2 (gramicidina S sintetasa II, *Brevibacillus brevis*) y tycC (tirocidina sintetasa 3, *Brevibacillus brevis*). His catalítica (★). Adicionalmente, se muestra la estructura secundaria parcial del dominio de condensación SwrW (negro) y SrfA-C (gris).....24

Figura 11. Representación en sticks de residuos de aminoácidos en el sitio activo del dominio de condensación. SwrW y SrfA-C en rojo y amarillo, respectivamente.....25

Figura 12. Representación en cartoon de los dominios de adenilación. Acore y Asub en naranja y amarillo, respectivamente de SwrW y SrfA-C. Al extremo derecho la superposición de ambos dominios.25

Figura 13. Motivos conservados del dominio de adenilación. A. Localización espacial de los motivos conservados (A1-A10) del dominio de adenilación de SwrW. B. Alineamiento parcial de secuencias del dominio de adenilación de SwrW, SrfA-C, EntF (Enterobactina sintetasa, *Escherichia coli*), SyrE (Siringomincina sintetasa, *Pseudomonas syringae*), grsB2 (gramicidina S sintetasa II, *Brevibacillus brevis*) y tycC (tirocidina sintetasa 3, *Brevibacillus brevis*). Adicionalmente, se muestra la estructura secundaria parcial del dominio de adenilación de SwrW (negro) y SrfA-C (gris).....26

Figura 14. Representación en cartoon de los dominios de tiolación de SwrW y SrfA-C. Al extremo derecho la superposición de ambos dominios.27

Figura 15. Motivos conservados del dominio de tiolación. A. Localización espacial del motivo conservado (T) en el dominio de tiolación de SwrW. B. Alineamiento parcial de secuencias del dominio de tiolación de SwrW, SrfA-C, EntF (Enterobactina sintetasa, *Escherichia coli*), SyrE (Siringomincina sintetasa, *Pseudomonas syringae*), grsB2 (gramicidina S sintetasa II, *Brevibacillus brevis*) y tycC (tirocidina sintetasa 3, *Brevibacillus brevis*). Ser catalítica (★). Adicionalmente, se muestra la estructura secundaria parcial del dominio de tiolación de SwrW (negro) y SrfA-C (gris).28

Figura 16. Sitio activo del dominio de tiolación (T). En representación sticks se muestran los residuos de aminoácidos que constituyen el motivo conservado de SwrW (rojo) y SrfA-C (amarillo).	28
Figura 17. Representación en cartoon de los dominios de tioesterificación de SwrW y SrfA-C. Al extremo derecho la superposición de ambos dominios.	29
Figura 18. Motivos conservados del dominio de tioesterificación. A. Localización espacial del motivo conservado (TE) en el dominio de tioesterificación de SwrW. B. Alineamiento parcial de secuencias del dominio de tioesterificación de SwrW, SrfA-C, EntF (Enterobactina sintetasa, <i>Escherichia coli</i>), SyrE (Siringomincina sintetasa, <i>Pseudomonas syringae</i>), grsB2 (gramicidina S sintetasa II, <i>Brevibacillus brevis</i>) y tyxC (tirocidina sintetasa 3, <i>Brevibacillus brevis</i>). Ser catalítica (★). Adicionalmente, se muestra la estructura secundaria parcial del dominio de tioesterificación de SwrW (negro) y SrfA-C (gris).	29
Figura 19. Sitio activo del dominio de tioesterificación (TE). En representación sticks se muestran los residuos de aminoácidos que constituyen el motivo conservado de SwrW (celeste) y SrfA-C (amarillo).	30
Figura 20. Modelo de la estructura tridimensional de la MCO de <i>Cedecea lapagei</i> . (CueO-Cdc) A: Representación en superficie (superior) y cartoon (inferior) de CueO-Cdc y sus dominios. B: Representación en superficie y cartoon de la MCO de <i>Ochrobactrum</i> (CueO-Och) y sus dominios. C: Superposición de las representaciones en superficie y cartoon de CueO-Cdc y CueO-Och.	31
Figura 21. Representación en cartoon del dominio 1 de CueO-Cdc y CueO-Och. Al extremo derecho la superposición de ambos dominios.	31
Figura 22. Motivos conservados del dominio 1 de MCO. A. Localización espacial de los motivos conservados (M1-M2) en el dominio de 1 de CueO-Cdc. B. Alineamiento parcial de secuencias del dominio 1 de CueO-Cdc, CueO-Och, CotA_Bs (Coat protein A, <i>Bacillus subtilis</i>), Mco_Mr (Multicopper oxidase, <i>Melanocarpus albomyces</i>), Laccase-1_Ab (Lacasa tipo I, <i>Agaricus bisporus</i>), Laccase-2_Tv (Lacasa tipo II, <i>Trametes versicolor</i>). Residuos aminoacídicos de unión al cobre (★). Adicionalmente, se muestra la estructura secundaria parcial del dominio 1 de	

CueO-Cdc (negro) y CueO-Och (gris).....	32
Figura 23. Representación en sticks de los residuos de aminoácidos que conforman los dos motivos conservados en el dominio 1 de CueO-Cdc (rojo) y CueO-Och (amarillo).	33
Figura 24. Representación en cartoon del dominio 2 de CueO-Cdc y CueO-Och. Al extremo derecho la superposición de ambos dominios.....	33
Figura 25. Representación en cartoon del dominio 3 de CueO-Cdc y CueO-Och. Al extremo derecho la superposición de ambos dominios.....	34
Figura 26. Motivos conservados del dominio 3 de MCO. A: Localización espacial de los motivos conservados (M3-M4) en el dominio de 3 de CueO-Cdc. B: Alineamiento parcial de secuencias del dominio 3 de CueO-Cdc, CueO-Och, CotA_Bs (Coat protein A, <i>Bacillus subtilis</i>), Mco_Mr (Multicopper oxidase, <i>Melanocarpus albomyces</i>), Laccase-1_Ab (Lacasa tipo I, <i>Agaricus bisporus</i>), Laccase-2_Tv (Lacasa tipo II, <i>Trametes versicolor</i>). Residuos aminoacídicos de unión al cobre (★). Adicionalmente, se muestra la estructura secundaria parcial del dominio 3 de CueO-Cdc (negro) y CueO-Och (gris).....	35
Figura 27. Representación en sticks de los residuos de aminoácidos que conforman los dos motivos conservados en el dominio 3 de CueO-Cdc (rojo) y CueO-Och (amarillo).	36
Figura 28. Representación en sticks de los residuos aminoacídicos de unión al cobre en las MCO CueO-Cdc (verde) y CueO-Och (celeste). Las líneas rojas y entrecortadas representan enlaces de coordinación al cobre. Los números sobre estas representan las distancias (Å) entre el átomo de cobre y el átomo de nitrógeno (azul), azufre (amarillo) u oxígeno (rojo). La región amarilla muestra los tres átomos de cobre que conforman el <i>Tri-Nuclear Cluster</i> (TNC).....	37
Figura 29. Sitio activo de la MCO CueO-Cdc. La presentación en superficie representa canales teóricos de entrada de oxígeno (rojo) y salida de agua (celeste). Se muestra una bifurcación (flechas moradas) que sirve como transporte de electrones (e ⁻) liberados en la oxidación del sustrato X, que luego son empleados en conjunto con 4H ⁺ para reducir una molécula de O ₂ que actúa como aceptor final de e ⁻ y formar 2 moléculas de H ₂ O.....	38

Índice de anexos

Anexo 1. Secuencias parciales del gen 16S ARNr de las cepas Asf1y2, Asf3 y Asf4.....	59
Anexo 2. Alineamiento múltiple de secuencias del dominio C de SwrW con el de otras NRPS	60
Anexo 3. Alineamiento múltiple de secuencias del dominio A de SwrW con el de otras NRPS.	61
Anexo 4. Alineamiento múltiple de secuencias del dominio T de SwrW con el de otras NRPS.	61
Anexo 5. Alineamiento múltiple de secuencias del dominio TE de SwrW con el de otras NRPS.	62
Anexo 6. Alineamiento múltiple de secuencias del dominio 1 de CueO-Cdc con el de otras MCO.....	62
Anexo 7. Alineamiento múltiple de secuencias del dominio 2 de CueO-Cdc con el de otras MCO.....	63
Anexo 8. Alineamiento múltiple de secuencias del dominio 3 de CueO-Cdc con el de otras MCO.....	63
Anexo 9. Diagrama de flujo para la identificación tradicional de bastones Gram negativos...64	
Anexo 10. Tabla de cepas de <i>Serratia marcescens</i> que producen las diferentes Serrawetins	65
Anexo 11. Reacción catalítica de los dominios que comprenden en una NRPS.....	65
Anexo 12. Motivos centrales altamente conservados en los dominios catalíticos de péptidos sintetasas.....	66
Anexo 14. Esquema de reacción general de la fosfopanteteinilación postraduccional.....	66
Anexo 13. Biosíntesis de la Serrawettin W1 dependiente de la NRPS SwrW.....	67
Anexo 14. Clasificación de las MCO de acuerdo al número y distribución de sus dominios....	67

Resumen

La Cantera del Pungarayacu, ubicada en la provincia de Napo-Ecuador, es uno de los reservorios más grandes de crudo extrapesado de la región Amazónica. El crudo encontrado es de los más recalcitrantes y difíciles de biodegradar debido a su baja biodisponibilidad. La naturaleza de este sustrato, así como las condiciones físico-químicas del sitio, hacen de esta zona el lugar idóneo para aislar y caracterizar bacterias con potenciales aplicaciones biotecnológicas. En este estudio se aislaron tres cepas bacterianas asociadas al asfalto proveniente de la Cantera del Pungarayacu, identificadas molecularmente como *Serratia marcescens* subsp. *marcescens*, *Cedecea lapagei* y *Serratia marcescens* subsp. *sakuensis*. Sus potenciales aplicaciones biotecnológicas fueron estudiadas mediante un análisis *in silico*. *S. marcescens* subsp. *marcescens* es capaz de sintetizar el biosurfactante Serrawettin W1, que podría ser empleado para incrementar la biodisponibilidad del crudo extrapesado presente en la cantera, aumentando su tasa de biodegradación. Dicho biosurfactante es sintetizado mediante la actividad catalítica de una NRPS denominada SwrW. *C. lapagei* posee una oxidasa multicobre con potencial aplicación en la biodegradación de masa lignocelulósica. *S. marcescens* subsp. *sakuensis* tiene la capacidad de producir un pigmento rojizo llamado prodigiosina, el cual posee actividad proapoptótica hacia líneas celulares cancerosas con poca o nula toxicidad hacia células normales. Este trabajo busca establecer una línea base para el estudio de potenciales biocatalizadores que puedan ser empleados en nuevas estrategias de biorremediación de zonas contaminados con crudo altamente recalcitrante, así como el estudio de otras aplicaciones biotecnológicas desde la Amazonía ecuatoriana.

Palabras clave: biosurfactantes, biorremediación, NRPS, lignocelulosa, crudo, recalcitrante

Abstract

Cantera del Pungarayacu, located in the province of Napo-Ecuador, is one of the largest reservoirs of extra-heavy crude in the Amazon region. The found crude is one of the most recalcitrant and hard to biodegrade due to its low bioavailability. The nature of this substrate, as well as the physical-chemical conditions of the site, make this area the ideal place to isolate and characterize bacteria with potential biotechnological applications. In this study, three bacterial strains asphalt-associated from Cantera del Pungarayacu were isolated and molecularly identified as *Serratia marcescens* subsp. *marcescens*, *Cedecea lapagei* and *Serratia marcescens* subsp. *sakuensis*. Its potential biotechnological applications were studied by *in silico* analysis. *S. marcescens* subsp. *marcescens* can synthesize the biosurfactant Serrawettin W1, which could be used to increase the bioavailability of the extra heavy crude present in the quarry, increasing its rate of biodegradation. This biosurfactant is synthesized by the catalytic activity of a NRPS called SwrW. *C. lapagei* has a multi-copper oxidase with potential application in the biodegradation of lignocellulosic mass. *S. marcescens* subsp. *sakuensis* is able to produce a reddish pigment called prodigiosin, which has proapoptotic activity towards cancer cell lines with little or no toxicity towards normal cells. This work aims to establish a baseline for the study of potential biocatalysts which can be used for new bioremediation strategies in areas contaminated with highly recalcitrant crude oil, as well as the study of other biotechnological applications from the Ecuadorian Amazon.

Keywords: biosurfactants, bioremediation, NRPS, lignocellulose, crude oil, recalcitrant

CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Antecedentes

1.1.1. El petróleo y su impacto ambiental

El petróleo es una mezcla extremadamente compleja, constituida de una gran variedad de hidrocarburos alifáticos, aromáticos y ramificados. Además, puede incluir otros compuestos orgánicos como algunos constituyentes organometálicos [1]. Estos hidrocarburos se han convertido en una de las fuentes de energía más empleadas en la actualidad y, a su vez, sirven como materia prima de numerosas industrias para la elaboración de diferentes productos. Con el tiempo, la demanda incrementada de estos productos en la vida cotidiana ha provocado que la escasez de fuentes de petróleo sea cada vez más evidente, lo cual aumenta el costo de dichos productos ya que aún no se encuentran alternativas rentables para estas industrias [2]. Más importante aún, la manufacturación de productos derivados de petróleo requiere la explotación, transporte y refinación de este último; lo que se traduce en la liberación de grandes cantidades de contaminantes al ambiente como consecuencia del procesamiento del petróleo. A su vez, el petróleo puede ser derramado al suelo o cuerpos de agua, producto de fallas técnicas durante la extracción; amenazando cadenas alimenticias por el acarreo de contaminantes [3].

1.1.2. Técnicas de remediación de sitios contaminados con petróleo

La compleja variedad de compuestos que constituyen la mezcla de contaminantes ha generado la necesidad de desarrollar y establecer tecnologías capaces de remediar y mitigar los efectos perjudiciales de estos compuestos. Estas se pueden dividir en tres grandes tipos: i) físicas, ii) químicas y, iii) biológicas. Aquellas técnicas que se basan en tratamientos físicos y químicos para la remediación de suelos contaminados, ya sean *in situ* o *ex situ* (Figura 1), resultan ser bastante costosas pues requieren equipamiento altamente especializado, además de operadores capacitados, por lo que su relación costo-beneficio no resulta favorable.

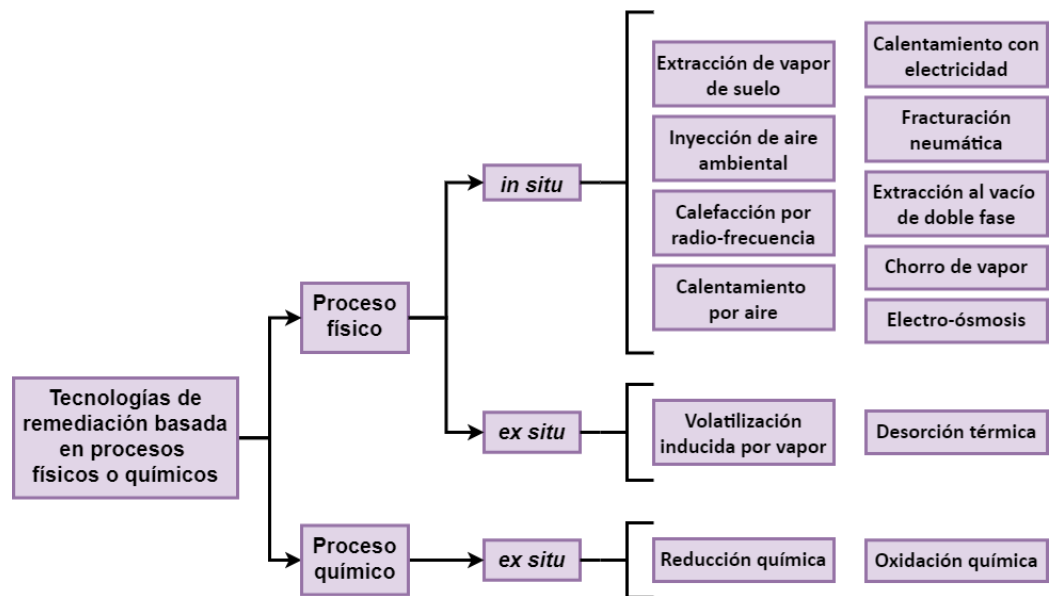


Figura 1. Tecnologías de remediación basada en procesos físicos o químicos [4].

1.1.3. Tecnologías de remediación biológica

La biorremediación se define como un proceso que se basa en mecanismos biológicos para reducir (degradar, desintoxicar, mineralizar o transformar) la concentración de contaminantes a un estado inocuo. En las últimas dos décadas se han evidenciado numerosos avances en las técnicas de biorremediación con el objetivo final de restaurar eficazmente los entornos contaminados a un costo bajo. Los investigadores han desarrollado y modelado diferentes técnicas de biorremediación; sin embargo, debido al tipo de contaminante, no existe una técnica única de biorremediación que sea capaz para restaurar todo tipo de ambientes contaminados en su totalidad [5]. Los microorganismos autóctonos presentes en estos ambientes son esenciales para resolver la mayoría de los desafíos asociados con la biodegradación de sustancias contaminantes [6]. Las características ecológicas y el ahorro de costos se encuentran entre las principales ventajas de la biorremediación en comparación con los métodos basados en procesos químicos y/o físicos para la atenuación de sustancias contaminantes [5].

Dependiendo el lugar donde se lleve a cabo el proceso de biorremediación, este puede ser *in situ* si es realizada en la misma zona contaminada, o *ex situ* si el material a ser tratado debe ser transportado fuera de la zona de origen. Ejecutar una estrategia de biorremediación

ex situ o *in situ* dependerá de factores como las características del sitio, el tipo y la concentración de contaminantes. En general, las técnicas *ex situ* resultan ser más costosas en comparación con las técnicas *in situ*, esto como resultado del costo adicional atribuible a la excavación y transporte del material. Sin embargo, el monitoreo y mantenimiento de las condiciones para un saneamiento eficiente son más fáciles de controlar. En contraste, al aplicar una estrategia de biorremediación *in situ*, es difícil mantener de forma uniforme y en los niveles adecuados todas las condiciones que permiten el crecimiento óptimo de los agentes biológicos. Esto se traduce en la disminución de la eficacia de la técnica de biorremediación, aunque los costos de aplicación de la misma son bastante bajos. Por lo tanto, la elección de una técnica de biorremediación apropiada, que reduzca eficientemente las concentraciones de contaminantes a un estado inocuo y con costos accesibles, es crucial para un proyecto de biorremediación exitoso [5,6]. Por esta razón se han desarrollado diferentes tecnologías de remediación biológica, ya sean de aplicación *ex situ* o *in situ* (Figura 2).

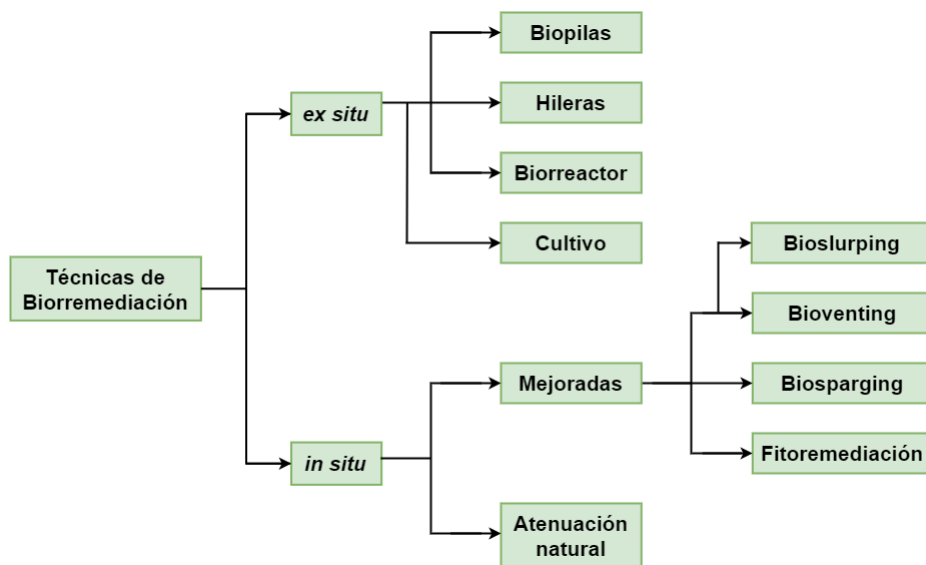


Figura 2. Técnicas de biorremediación clasificadas de acuerdo al lugar de aplicación [5].

Otro criterio a ser considerado para la selección y aplicación de una estrategia de biorremediación es la elección del principio biológico en el que esta se basará. De forma general, una técnica de biorremediación puede ser ejecutada mediante dos enfoques biológicos: 1) bioestimulación, si se adicionan nutrientes que limitan la velocidad de

crecimiento, como son fósforo, nitrógeno u oxígeno, a sitios severamente contaminados para estimular el crecimiento de las bacterias ya existentes en el sitio a tratar y, con ello, incrementar la tasa de degradación de los contaminantes; 2) bioaumentación, si se aplican microorganismos autóctonos o alóctonos (extraídos de un sitio diferente al que será tratado) de tipo salvaje o genéticamente modificados, con el fin de aumentar la población microbiana capaz de biodegradar los compuestos nocivos de la zona contaminada [7].

1.1.4. El rol de las bacterias en técnicas de remediación biológica de zonas contaminadas con petróleo

La biodegradación de hidrocarburos de petróleo es un proceso complejo que dependerá de la presencia de microorganismos que posean capacidad hidrocarbonoclástica. Es decir, contar con microorganismos capaces de expresar enzimas que incluyen oxigenasas, deshidrogenasas e hidroxilasas, las cuales pueden fragmentar los diferentes hidrocarburos que componen el petróleo [8]. Por ejemplo, las enzimas alcano 1-monooxigenasa, ciclohexanol-deshidrogenasa, metano monooxigenasa y ciclohexanona 1,2 monooxigenasa están involucradas en proceso de degradación de alcanos; la naftaleno 1,2-dioxigenasa y salicilaldehído pueden degradar naftaleno; la benceno dioxigenasa, tolueno dioxigenasa y la etilbenceno dioxigenasa son capaces de interactuar con otros hidrocarburos del petróleo [9]. Sin embargo, es importante mencionar que la biodegradación de dichos compuestos está limitada por su biodisponibilidad hacia a los microorganismos. La mayoría de hidrocarburos de petróleo son de naturaleza hidrofóbica y poseen bajas solubilidades en agua, lo cual reduce drásticamente su tasa de biodegradación [9]. Por tanto, el primer paso para lograr una eficiente biodegradación de hidrocarburos de petróleo es asegurar la biodisponibilidad de estos. Las bacterias surgen como una alternativa para compensar dicha limitación, pues algunas de ellas son capaces de sintetizar biosurfactantes.

Los biosurfactantes son moléculas tensioactivas producidas mayormente por bacterias, predominantemente durante el crecimiento en sustratos inmiscibles en agua [10]. Todos los biosurfactantes son anfífilos; es decir, constan de dos partes: una región polar (hidrofílica) y

una región no polar (hidrófoba) [11]. Dichas características permiten que los biosurfactantes puedan reducir la tensión superficial de una sustancia formando una microemulsión, lo cual les confiere actividades de espumación, dispersión y emulsificación. Estas propiedades han permitido que puedan ser empleados en una variedad de aplicaciones tecnológicas, ganando importancia económica en algunos sectores industriales (Tabla 1).

Tabla 1. Biosurfactantes de importancia económica [12].

Biosurfactante	Microorganismo	Importancia económica
Lípidos de celebiosa	<i>Ustilagomaydis</i>	Compuestos antifúngicos
Ramnolipídico	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Biorremediación
Lípidos de tetralosa	<i>Rhodococcuserythropolis</i>	Dilución de hidrocarburos
Soforolipídico	<i>Candida bombicola</i>	Actividad antimicrobial
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>	Actividad antimicrobial
Liquenisina	<i>Bacillus licheniformis</i>	Recuperación de petróleo mejorada microbianamente
Glicolipopéptido de emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Recuperación de petróleo mejorada microbianamente
Glicolipopéptido de microbactano	<i>Microbacterium</i>	Emulsificante

Por ejemplo, algunos biosurfactantes han sido empleados en la biorremediación de zonas contaminadas con petróleo. Un caso destacado es el del biosurfactante ramnolipídico producido por *Pseudomonas aeruginosa*, empleado para remover el petróleo luego del derrame Exxon Valdez en Alaska (24 de marzo de 1984) [13]. El biosurfactante actúa como agente emulsificante al disminuir la tensión superficial de los hidrocarburos formando micelas. Esto provoca que las microgotas encapsuladas en la superficie de la célula microbiana hidrófoba sean absorbidas por esta. Una vez dentro, la maquinaria enzimática de la bacteria es la encargada de degradar estos hidrocarburos (Figura 3). De esta forma, el biosurfactante incrementa la biodisponibilidad de los hidrocarburos del petróleo, aumentando la tasa de biodegradación de estos [8].

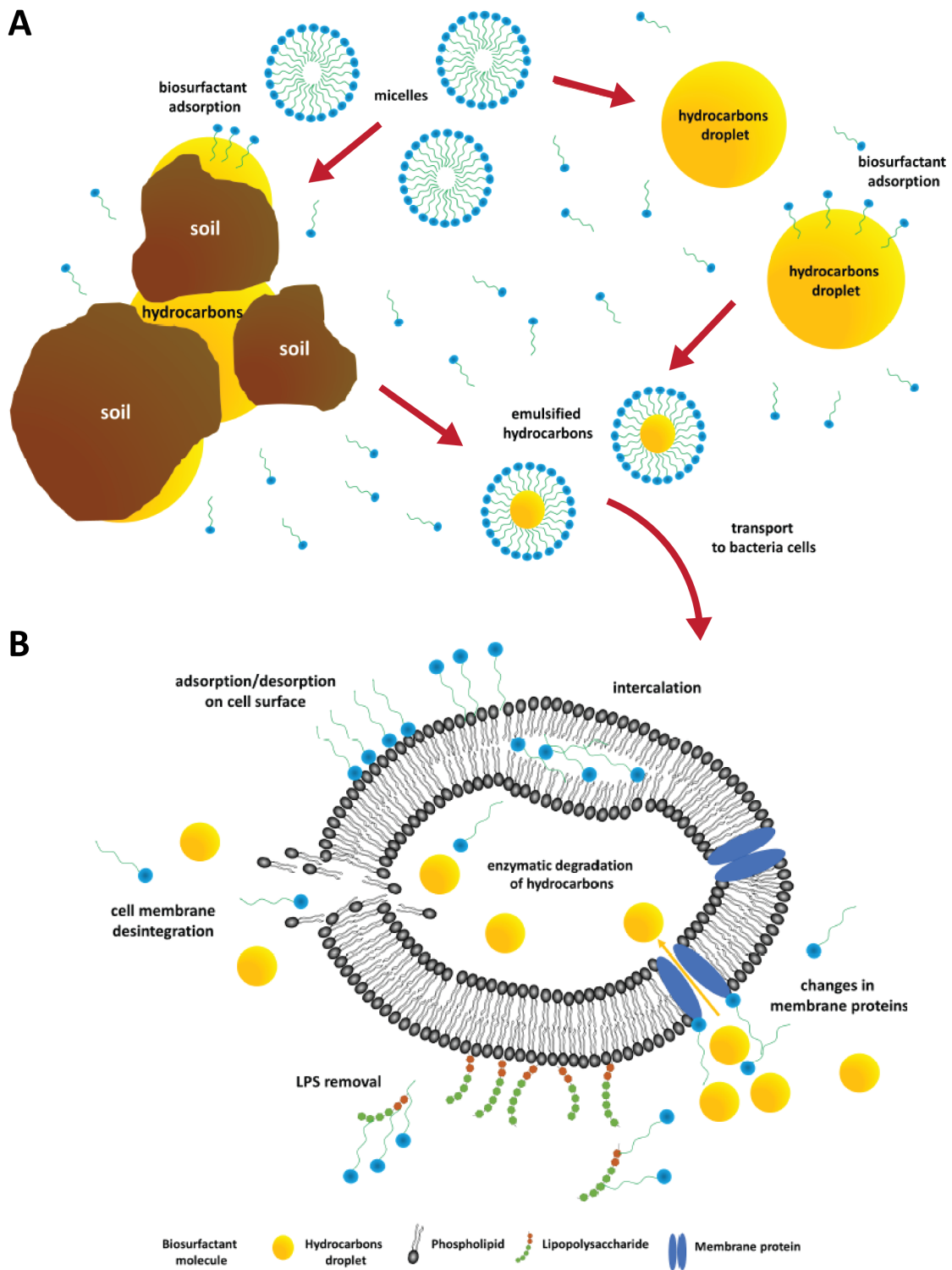


Figura 3. A. Principales mecanismos mejorados de desorción y emulsificación de hidrocarburos empleando biosurfactantes. **B.** Principales interacciones entre células bacterianas y biosurfactantes [14].

El conocimiento de la síntesis de estas biomoléculas es muy importante, ya que permitiría establecer estrategias para su producción a gran escala. Similarmente, como ocurre con las rutas biosintéticas de algunos metabolitos secundarios como toxinas, sideróforos, pigmentos, antibióticos, inmunosupresores o agentes anticancerígenos; los biosurfactantes son producidos por complejos de péptido sintetas no ribosomales (NRPS, por su abreviación del inglés *Non-ribosomal Peptide Synthetase*) [10].

1.1.5. Las NRPSs y sus aplicaciones biotecnológicas

Las NRPSs se definen como enzimas organizadas multi-modularmente que catalizan la síntesis de diversos productos naturales, pudiendo ser estos de origen bacteriano o fúngico, a los que se conoce como péptidos no ribosómicos, puesto que su síntesis no requiere ribosomas [10,15]. Un módulo se define como una sección de la enzima NRPS que tiene como función incorporar específicamente un aminoácido en la estructura del péptido sintetizado (Figura 4) [10]. A su vez, los módulos se pueden dividir en dominios, encargados de catalizar las reacciones individuales necesarias para la síntesis de péptidos no ribosómicos. Cada módulo consta de tres dominios: un dominio adenilación (A), dominio de tiolación (T) o PCP (por su abreviación del inglés *Peptidyl Carrier Proteins*) y un dominio de condensación (C); siguiendo la organización modular repetida A-PCP-C. Adicional a estos tres dominios, los módulos terminales de las NRPS pueden presentar un dominio de epimerización (E) o tioesterificación (TE), encargados del alargamiento o ciclización del péptido sintetizado para ser posteriormente liberado [10].

Las NRPSs son las responsables de que en la actualidad contemos con moléculas bioactivas empleadas en diferentes campos biotecnológicos. Un claro ejemplo de ello son los antibióticos, específicamente desde el descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming en 1928. La síntesis de este antibiótico β -lactámico requiere la actividad catalítica de la δ - (L- α -aminoadipil) -L-cisteinil-D-valina sintetasa (ACVS), una NRPS exclusiva de ciertos hongos filamentosos como Actinomicetos y algunas bacterias como Bacilos [10,15]. Así mismo, los biosurfactantes son sintetizados por NRPSs, y gracias a sus propiedades eco-amigables, como

son baja toxicidad y mayor biodegradabilidad, estos han tenido un aumento en su demanda debido a sus potenciales aplicaciones biotecnológicas en procesos mejorados de extracción de petróleo, restauración ambiental, alimentos, bebidas, cosméticos y detergentes [16].

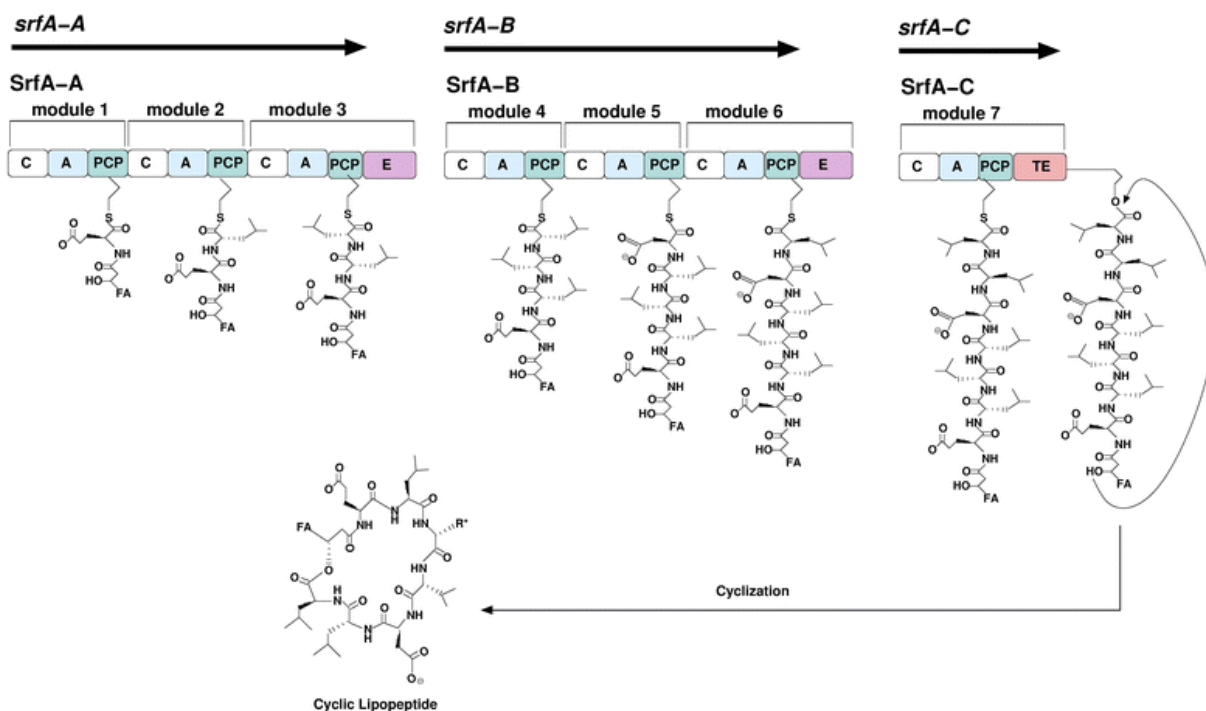


Figura 4. Características estructurales de las NRPSs que biosintetizan la surfactina en *Bacillus subtilis* [10].

1.2. Planteamiento del problema

La Cantera del Pungarayacu, ubicada en la provincia de Napo-Ecuador, posee un crudo con grados API entre 8 y 10 [17], clasificándose como un crudo extrapesado. Dichos crudos están constituidos principalmente por hidrocarburos poliaromáticos de alto peso molecular. Se caracterizan por poseer altos contenido de azufre, nitrógeno y metales. Además, su fracción de asfaltenos es elevada, lo que provoca que estos crudos sean altamente viscosos, siendo los menos atractivos para las empresas petroleras por sus altos costos de procesamiento [18]. Estas propiedades físico-químicas los convierten en uno crudos más recalcitrantes y difíciles de someter a estrategias de biorremediación, pues su biodisponibilidad es muy baja.

Una de las alternativas de remediación biológica para la degradación de estos crudos

es la aplicación de técnicas de biorremediación basadas en el principio de bioestimulación. De esta manera se logra estimular la población microbiana autóctona, misma que está adaptada a las extremas condiciones físico-químicas de la zona. Por esta razón es recomendable caracterizar la población microbiana asociada a estos sustratos altamente recalcitrantes. Así, es posible asegurar que los agentes microbiológicos a ser empelados poseen la maquinaria enzimática adecuada para biodegradar estos compuestos y reducirlos a un estado inocuo.

Lamentablemente, la población bacteriana asociada a los crudos extrapesados de la Cantera del Pungarayacu no ha sido caracterizada, por lo que se desconoce si estas poblaciones son capaces de sintetizar metabolitos relevantes en el mejoramiento de la tasa de biodegradación de hidrocarburos; mismos que podrían constituirse en la base para futuros análisis biomoleculares o para la ingeniería genética enfocada a estrategias de biorremediación, o técnicas de recuperación de petróleo mejoradas por microorganismos. Adicionalmente, la caracterización de las estas poblaciones bacterianas permitirá explorar sus potenciales aplicaciones biotecnológicas en otros campos, como su capacidad para degradar compuestos lignocelulósicos o sintetizar otras moléculas bioactivas de interés comercial.

1.3. Justificación de la investigación

Con base en lo expuesto, la caracterización de bacterias asociadas a los crudos altamente recalcitrantes de la Cantera del Pungarayacu representa una gran oportunidad para obtener cepas con la capacidad de sintetizar moléculas bioactivas, como biosurfactantes con potencial utilidad en la remediación de zonas contaminadas con petróleo, así como aquellas de gran interés comercial: pigmentos naturales y antibióticos, entre otros péptidos no ribosómicos. En el caso de los biosurfactantes, además de la remediación del petróleo, éstos pueden ser aplicados en diferentes áreas industriales por sus versátiles propiedades, provocando que su demanda comercial sea elevada [10,16]. Por ejemplo, los surfactantes que se usan con mayor frecuencia son aquellos obtenidos químicamente del petróleo. Sin embargo, al igual que estos, los biosurfactantes son capaces de reducir las tensiones superficiales de manera eficaz. Y más importante aún, poseen concentraciones de micelas

críticas muy bajas. Es decir, son altamente eficientes incluso a concentraciones bajas. A esto se suma su biocompatibilidad y biodegradabilidad, que los hace más amigables con el medio ambiente, en comparación con los surfactantes sintetizados químicamente [10,16].

Por estas razones es de suma importancia conocer las potenciales aplicaciones biotecnológicas de estas bacterias, mismas que no han sido aisladas ni caracterizadas, mediante el estudio de las enzimas involucradas en la síntesis de estos metabolitos secundarios, lo cual permitiría establecer estrategias de producción a gran escala de los mismos. Adicionalmente, las enzimas responsables de la síntesis de la mayoría de péptidos no ribosómicos son las NRPSs. Sin embargo, la caracterización estructural de estas mediante cristalografía de rayos X o Resonancia Magnética Nuclear (RMN) representa un gran desafío debido a su longitud y organización multimodular, por lo que no se cuentan con muchos modelos estructurales [19]. Es por ello que la presente investigación se enfocó inicialmente en el aislamiento de bacterias autóctonas de muestras de asfalto de la Cantera de Pungarayacu, además del estudio de sus rutas metabólicas asociadas a la síntesis de biosurfactantes empleando herramientas bioinformáticas, así como otras potenciales aplicaciones biotecnológicas.

1.4. Objetivos de la investigación

1.4.1. General:

- Conocer las bacterias cultivables asociadas a muestras de asfalto de la Cantera de Pungarayacu en la Provincia de Napo, Ecuador, y su potencial biotecnológico.

1.4.2. Específicos:

1. Aislar cepas bacterianas asociadas a muestras de asfalto empleando medios de enriquecimiento.
2. Caracterizar morfológica y bioquímicamente las cepas aisladas.
3. Caracterizar e identificar molecularmente las cepas aisladas.

4. Conocer las potenciales aplicaciones biotecnológicas de las cepas aisladas mediante un análisis *in silico*.

CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO

2.1. Ubicación del área de estudio

La Cantera del Pungarayacu se localiza en la provincia del Napo-Ecuador, al pie de la cordillera oriental, y aproximadamente a 20 km al norte de la ciudad del Tena, comprendiendo el Bloque 20. Sus coordenadas geográficas son 00° 40' 00'' Sur, 1° 0' 00'' Norte, 77° 52' 0.6'' Oeste y 77° 41' 28'' Este [20,21].

2.2. Recolección de muestras de asfalto aflorante

Se seleccionaron 5 muestras al azar de asfalto aflorante de la arena bituminosa y se colocaron en frascos de vidrio previamente autoclavados. Las muestras fueron transportadas al laboratorio donde se almacenaron a 4°C para ser procesadas luego de 24-72 h.

2.3. Aislamiento de las cepas bacterianas cultivables

Aproximadamente 10 g de asfalto fueron homogenizados e inoculados en matraces autoclavados de 500 mL que contenían 100 mL de medio líquido LB (Luria-Bertani), mismos que se incubaron a 30°C con agitación a 130 rpm durante 24 h. De cada cultivo se realizaron diluciones seriadas (1×10^{-1} a 1×10^{-8}) en solución de NaCl al 0.9%. Para ello, se inocularon alícuotas de 0.1 mL por duplicado en placas Petri sobre medio de cultivo sólido LB y se incubaron a 30°C sin agitación por 24 h. Luego se determinaron las Unidades Formadoras de Colonias por mg de muestra (UFC/mg de muestra), contando el número de colonias bacterianas por duplicado. Posteriormente, se seleccionaron colonias individuales al azar y se subcultivaron en nuevas placas Petri con medio sólido LB para su caracterización morfológica, bioquímica y molecular. Adicionalmente, células de cada una de las cepas bacterianas seleccionadas se almacenaron a -80°C en tubos Eppendorf de 1.5 mL que contenían solución esterilizada de glicerol al 50% (v/v) en el Banco de Microorganismos de Ikiam.

2.4. Caracterización morfológica de las cepas bacterianas aisladas

A partir de las cepas bacterianas seleccionadas se procedieron a realizar descripciones macro y micromorfológica de las mismas. Las características macroscópicas estudiadas fueron el color, borde, textura y elevación de las colonias. Por otro lado, las características microscópicas como la forma de las células (bacilos, cocos, etc.) y sus respectivas tinciones Gram fueron observadas empleando un microscopio óptico.

2.5. Caracterización bioquímica de las cepas bacterianas aisladas

El perfil metabólico de las cepas aisladas fue estudiado a través de ocho pruebas bioquímicas diferentes, empleando varios métodos microbiológicos convencionales (Tabla 2). La preparación e inoculación de todos los medios de cultivo, así como el revelado de las pruebas bioquímicas evaluadas fue llevado a cabo acorde a lo sugerido por los protocolos citados en la Tabla 2.

Tabla 2. Pruebas bioquímicas empleadas para la caracterización del perfil metabólico de las cepas bacterianas seleccionadas.

Prueba bioquímica	Medio de cultivo empleado	Determinación	Identificación positiva	Referencias
Actividad oxidasa	Tiras reactivas para prueba oxidasa	Presencia de citocromo C oxidasa	Coloración azul oscura en el lugar donde fue colocado el inóculo	[22]
Fermentación de azúcares y producción de H ₂ S	Agar triple azúcar hierro (agar TSI)	Degradación de carbohidratos (glucosa y lactosa) y reducción de azufre	Degradación fermentativa de glucosa y/o lactosa: cambio de coloración del medio naranja a amarillo Formación de H ₂ S: precipitación de sulfuro de hierro (II) de color negro	[23]

Actividad triptofanasa (Indol)	Agua peptonada	Hidrólisis de triptófano en indol y alanina	Formación de anillo de color rojo en la superficie del tubo	[24]
Actividad ureasa	Urea agar base	Hidrólisis de urea en amoníaco y CO ₂	Cambio de coloración del medio amarillo a rosa claro	[25]
Actividad citrato-permeasa	Agar Citrato de Simmons	Conversión de citrato (única fuente de energía) a piruvato	Cambio de coloración del medio verde a azul oscuro	[26]
Actividad catalasa	Medio líquido LB	Degradación de H ₂ O ₂ en agua y oxígeno	Formación de burbujas después de la adición de H ₂ O ₂ al medio	[27]
Fermentación de glucosa (Rojo de metilo)	Agua peptonada suplementada con glucosa y fosfato de potasio dibásico	Degradación fermentativa de glucosa	Cambio de coloración del medio líquido naranja a amarillo	[28]
Producción de acetoína (Voges-Proskauer)	Medio líquido LB	Producción de acetoína (acetil metil carbinol) mediante la degradación fermentativa de glucosa	Cambio de coloración del medio líquido naranja a amarillo	[28]

2.6. Caracterización e identificación molecular de las cepas bacterianas aisladas

2.6.1. Extracción del ADN genómico

Las cepas bacterianas seleccionadas fueron inoculadas en tubos Eppendorf de 1.5 mL autoclavados que contenían un 1 mL de medio líquido LB. Posteriormente fueron incubados a 30°C con agitación a 150 rpm durante 24 h. Luego del periodo de incubación, los tubos fueron centrifugados a 12,000 rpm durante 1 min para precipitar las células. Después de resuspender

las células se llevó a cabo la extracción del ADN genómico empleando el Kit Wizard© Genomic DNA Purification (Promega Corp.; USA), siguiendo la indicaciones del protocolo para bacterias sugerido por el fabricante (<https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/wizard-genomic-dna-purification-kit-protocol.pdf?la=en>)

2.6.2. Determinación de huella genética (*DNA fingerprinting*)

La diversidad genética de las cepas bacterianas seleccionadas se evaluó mediante la huella de ADN o *DNA fingerprinting*, utilizando los oligonucleótidos ERIC-PCR: ERIC-1R (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3') y ERIC-2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3') [29]. Las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) se llevaron a cabo en un termociclador, ProFlex™ 3x32-Well PCR System (Applied Biosystems; USA); realizando una desnaturalización previa a 95°C durante 2 min. Luego se efectuaron 35 ciclos de amplificación programada con las siguientes fases: 1) desnaturalización a 94°C durante 30 s, 2) hibridación a 50°C durante 30 s, 3) extensión a 72°C durante 6 min y 4) extensión final a 72°C durante 6 min. Los productos de PCR fueron cargados por duplicado y separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, que posteriormente se visualizaron en un transiluminador UV, ENDURO™ GDS Touch Gel Documentation System modelo GDST-1302 (Labnet; USA).

2.6.3. Identificación molecular mediante amplificación y secuenciación del gen 16S ARNr

Se contrató el servicio PCR + secuenciación Sanger ofrecido por GENEWIZ® para la identificación molecular de las cepas bacterianas aisladas. Este servicio emplea primers universales que flanquean las regiones V1 a V9 del gen 16S ARNr para la amplificación y Sanger como método de secuenciación. Los datos provistos por GENEWIZ® fueron las secuencias originales con sus respectivos cromatogramas, así como el ensamblaje de las mismas.

2.6.4. Análisis de las secuencias de ADN

Las secuencias curadas y ensambladas de las cepas bacterianas aisladas fueron

comparadas con la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) empleando BLASTN (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) [30]. El alineamiento múltiple de las secuencias fue realizado con el algoritmo MUSCLE [31] integrado en el software MEGA X versión 10.1.8 [32]. Los árboles filogenéticos se construyeron en MEGA X empleando el método de máxima verosimilitud con Bootstrap de 1,000 repeticiones y el modelo de Tamura-Nei [33].

2.7. Análisis *in silico* del potencial biotecnológico de las cepas bacterianas aisladas

2.7.1. Selección de enzimas con potenciales aplicaciones biotecnológicas

Mediante una revisión bibliográfica detallada, luego de la identificación molecular de las cepas aisladas, se identificaron enzimas con potenciales aplicaciones biotecnológicas. El criterio de selección para proceder con el análisis *in silico* de estas enzimas fue su capacidad para ser empleadas en nuevas estrategias de biorremediación de suelos contaminados con petróleo; específicamente su capacidad para sintetizar biosurfactantes. Por ello, se seleccionó la Serrawettin W1 sintasa putativa (SwrW) de *Serratia marcescens*, enzima requerida para la síntesis del biosurfactante Serrawettin W1, como indica su nombre [34,35]. Adicionalmente, también se seleccionó la Oxidadaasa multicobre CueO de *Cedecea lapagei* (CueO-Cdc), por su potencial capacidad para degradar compuestos lignocelulósicos [36].

Tanto SwrW como CueO-Cdc no han sido caracterizadas funcionalmente mediante el estudio de su estructura, puesto que no se cuentan con sus respectivos modelos cristalográficos. Sus actividades enzimáticas han sido atribuidas ya sea mediante estudios de la secuencia del gen que las codifica en el caso de SwrW, o por ensayos de degradación de compuestos modelos en el caso de CueO-Cdc. Es por ello que resulta pertinente validar esta funcionalidad putativa mediante el análisis de sus estructuras, haciendo énfasis en los dominios catalíticos que las componen; al ser comparados con otras enzimas pertenecientes a la misma familia y cuyos modelos cristalográficos ya han sido obtenidos y caracterizados.

Cabe mencionar que las secuencias de las enzimas seleccionadas fueron obtenidas a partir de regiones codificantes de genomas previamente secuenciados y anotados de las cepas identificadas, mismos que se encuentran disponibles en la base de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*); mas no por secuenciación directa del genoma de las cepas aisladas en este estudio.

2.7.2. Obtención de modelos por homología de las enzimas seleccionadas

Una vez seleccionadas las enzimas de interés, y teniendo sus respectivas secuencias aminoacídicas, se procedió a obtener modelos por homología de sus estructuras tridimensionales. Para ello se empleó el algoritmo Phyre² (Protein Homology/analogy Recognition Engine V 2.0) [37], disponible en el portal web <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2>. El modelamiento de posibles ligandos asociados a las estructuras analizadas fue realizado con SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) [38].

2.7.3. Anotación y visualización de los modelos obtenidos

Los archivos PDB fueron visualizados y editados con el software Pymol versión 2.4.0 [39]. Para la identificación y anotación de los dominios se empleó la base de datos Pfam (<http://pfam.xfam.org/>) [40] y el algoritmo SWORD (*Swift and Optimized Recognition of Domains*) [41], disponible en portal web https://www.dsimb.inserm.fr/dsimb_tools/sword/. También se comparó la estructura primaria y secundaria de las enzimas seleccionadas mediante alineamiento múltiple de sus secuencias aminoacídicas con otros modelos estructurales. Este alineamiento fue visualizado con ESPript 3.0 (<http://esript.ibcp.fr/ESPript/cgi-bin/ESPript.cgi>) [42]. Adicionalmente, se empleó el plugin Caver3 versión 3.0.3 para Pymol con el objetivo de predecir posibles canales de proteína (<http://www.caver.cz/index.php?sid=199>).

CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS

3.1. Aislamiento, densidad y características morfológicas de las cepas bacterianas cultivables

Se aislaron 4 cepas etiquetadas como Asfalto 1 – 4 (Asf1-4), mismas que se muestran en la Figura 5. El resultado de la densidad bacteriana (UFC/mg muestra) promedio fue de 5.4×10^9 UFC/mg de muestra. Dos de las cepas bacterianas aisladas mostraron características macromorfológicas (color, borde, textura y elevación) muy similares entre sí. Tanto la cepa Asf1y2 y Asf4 exhibieron borde circular, textura lisa y elevación convexa (Tabla 3). Sin embargo, se diferencian en su coloración. Asf1y2 presenta un color blanco cremoso y Asf4 un llamativo color naranja (Figura 5). En contraste, Asf3 presentó características macromorfológicas únicas si se comparan con las dos cepas antes descritas. Su borde era ondulado, su textura rugosa y su elevación plana (Tabla 3), aunque su color es blanco cremoso, igual que la cepa Asf1y2 (Figura 5). Por otro lado, las características micromorfológicas (tinción Gram y forma celular) fueron idénticas para todas las cepas bacterianas aisladas. Asf1y2, Asf3 y Asf4 eran bastones alargados con tinción Gram negativa (Figura 5).

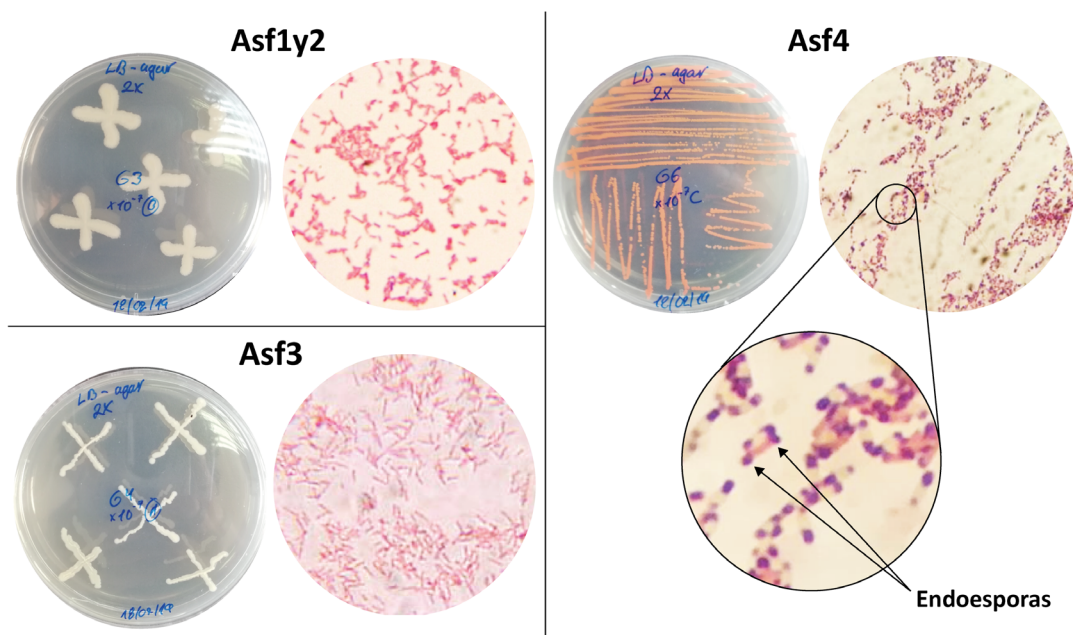


Figura 5. Cepas bacterianas aisladas en cultivo axénico y su tinción Gram respectiva

Tabla 3. Características macro y micromorfológicas de las cepas bacterianas aisladas.

Cepa	Color	Borde	Textura	Elevación	Tinción Gram	Forma celular
Asf1y2	Blanco cremoso	Circular	Lisa	Convexa	–	Bastón
Asf3	Blanco cremoso	Ondulado	Rugosa	Plana	–	Bastón
Asf4	Naranja	Circular	Lisa	Convexa	–	Bastón

3.2. Perfil metabólico de las cepas bacterianas seleccionadas basado en pruebas bioquímicas

Con el fin de conocer el perfil metabólico de las cepas bacterianas seleccionadas se realizaron diferentes pruebas bioquímicas. Asf3 es una cepa que no es capaz de degradar lactosa, pero sí glucosa, no forma gas y tampoco H₂S; sin embargo, es positiva para la prueba Rojo de metilo. En contraste, Asf1y2 y Asf4 comparten el mismo perfil metabólico. Ninguna puede degradar lactosa, pero sí glucosa. Pueden formar gas, pero no H₂S, y son negativas para la prueba Rojo de metilo. Los resultados de las pruebas restantes fueron idénticas para las tres cepas aisladas (Tabla 4).

Tabla 4. Perfil metabólico de las cepas bacterianas seleccionadas basado en pruebas bioquímicas.

Cepa	Oxidasa	TSI Lac/Glu/gas/H ₂ S*	Indol	Ureasa	Citrato de Simmons	Catalasa	Rojo de metilo	Voges– Proskauer
Asf1y2	–	K/A/–/–	–	–	+	+	–	+
Asf3	–	K/A/+/-	–	–	+	+	+	+
Asf4	–	K/A/–/–	–	–	+	+	–	+

***Lac:** degradación de lactosa (positiva: A; negativa: K); **Glu:** degradación de glucosa (positiva: A; negativa: K); **Gas:** ruptura del medio producto de la formación de gas (positiva: +, negativa: –); **H₂S:** formación de precipitado negro (positiva: +, negativa: –).

3.3. Caracterización molecular de las cepas bacterianas seleccionadas

3.3.1. DNA fingerprinting

La determinación de los genotipos de las cepas bacterianas fue realizada mediante la

técnica *DNA fingerprinting*. En la Figura 6 se pueden observar los patrones electroforéticos, por duplicado, obtenidos de las cepas Asf1, Asf2, Asf3 y Asf4. Se obtuvieron tres genotipos diferentes a partir de las cuatro cepas analizadas. Los patrones electroforéticos de las cepas Asf1 y Asf2 son idénticos entre sí (Figura 6), pues las bandas de ADN que constituyen sus patrones electroforéticos son de igual peso molecular (ubicadas al mismo nivel en el gel). Por este motivo ambas cepas se consideraron como una sola para los siguientes análisis bajo la nueva etiqueta Asf1y2.

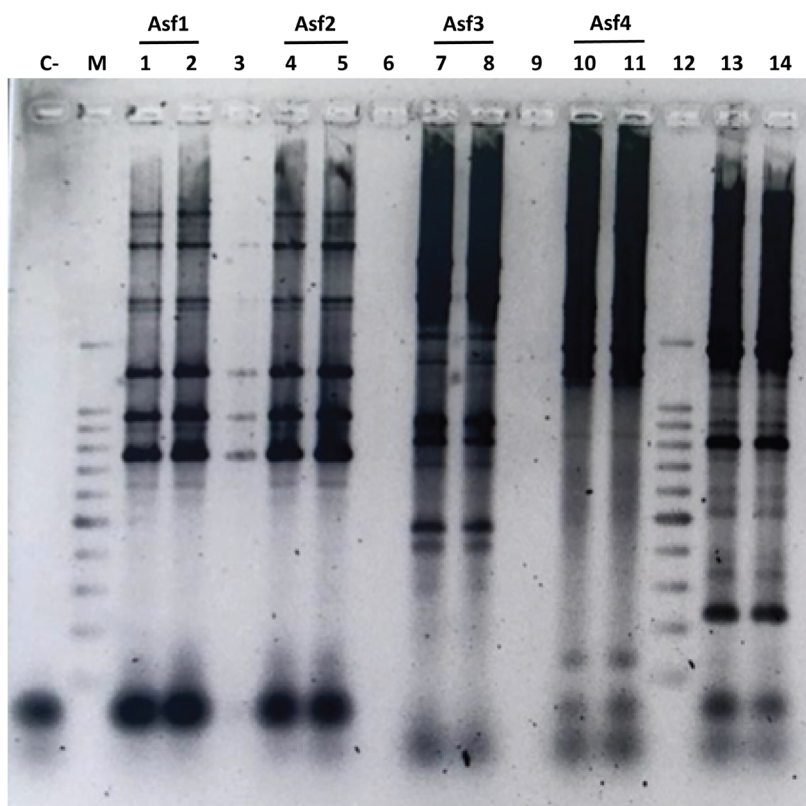


Figura 6. Genotipos de las cepas bacterianas aisladas obtenidos con la técnica *DNA fingerprinting* y los oligonucleótidos ERIC-ERIC. El carril C- es un control negativo que comprende todos los reactivos de PCR cargados con agua en lugar de muestra. Los carriles M y 12 representa un marcador molecular de 1 kb. Los carriles 3, 6 y 9 son carriles vacíos. Los carriles del 1 al 11 representan las cuatro cepas estudiadas por duplicado. Los carriles 13 y 14 pertenecen al genotipo de una cepa desconocida que en este caso se empleó como control positivo de la PCR.

3.3.2. Identificación molecular de las cepas aisladas basada en la secuencia del gen 16S ARNr

Luego de la discriminación molecular de las cepas seleccionadas mediante su genotipo obtenido por la técnica de *DNA fingerprinting*, se procedió a identificarlas molecularmente. El

servicio PCR + secuenciamiento Sanger de GENEWIZ® permitió conocer las secuencias parciales que flanquean las regiones V1 a V9 del gen 16S ARNr de las cepas seleccionadas (Anexo 1). El alineamiento de estas secuencias mediante BLASTn permitió identificar las cepas bacterianas Asf1y2, Asf3 y Asf4 como *Serratia marcescens* subsp. *marcescens* ATCC 13880, *Cedecea lapagei* DSM 4587 y *Serratia marcescens* subsp. *sakuensis* KREDT, respectivamente (Tabla 5).

Tabla 5. Identificación molecular de las cepas bacterianas seleccionadas.

Cepa	Género y especie	Longitud (pb)	Cobertura (%)	Id. (%)	N° de acceso	Referencia
Asf1y2	<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i> ATCC 13880	1446	99	100	NR 041980.1	[43]
Asf3	<i>Cedecea lapagei</i> DSM 4587	1438	77	99	NR 126317.1	[44]
Asf4	<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>sakuensis</i> KREDT	1317	22	99	NR 036886.1	[45]

3.3.3. Árbol filogenético de las cepas bacterianas aisladas

Primero se generó un alineamiento múltiple de las secuencias parciales del gen 16S ARNr de las cepas seleccionadas y 38 secuencias disponibles en la base de datos del NCBI. Dicho alineamiento se llevó a cabo empleando el algoritmo MUSCLE. Luego se generó un árbol filogenético en el software Mega X, a partir del alineamiento múltiple antes mencionado, utilizando el método de máxima verosimilitud y el modelo de Tamura-Nei (1993) con 1000 repeticiones Bootstrap. En la Figura 7 se muestra el árbol con la mayor probabilidad logarítmica (-7373,86). Los valores arriba y abajo de las ramas representan los valores Bootstrap y sustituciones por cada 100 nucleótidos, respectivamente. Los árboles iniciales para la búsqueda heurística se obtuvieron automáticamente aplicando los algoritmos Neighbour-Joining y BioNJ a una matriz de distancias por pares estimadas utilizando el modelo Tamura-Nei, y luego seleccionando la topología con un valor de probabilidad de registro superior. Este análisis involucró 41 secuencias de nucleótidos, con un total de 1599 posiciones en el conjunto de datos final.

El árbol filogenético permitió identificar taxonómicamente las cepas bacterianas seleccionadas. Asf1y2 y Asf3 se agrupan con bacterias que pertenecen al género *Serratia*, mismo que forma parte de la familia *Yersiniaceae*. Por otra parte, Asf4 fue agrupada con bacterias del género *Cedecea*, que al igual que los géneros como *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Raoutella* y *Enterobacter*, están incluidos en la familia *Enterobacteriaceae*. Las familias *Yersiniaceae* y *Enterobacteriaceae* forman parte del orden Enterobacterales, clase Gammaproteobacteria y filo Proteobacteria.

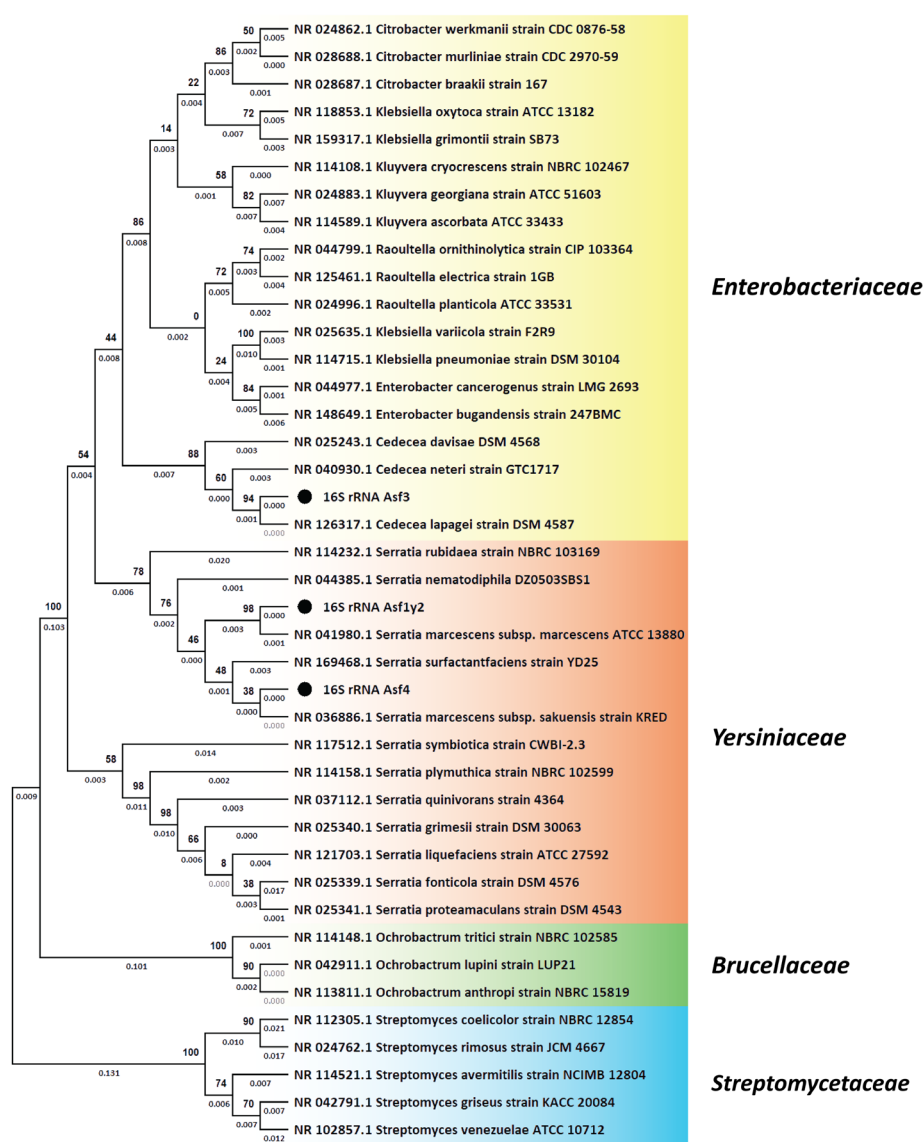


Figura 7. Árbol filogenético de las cepas bacterianas seleccionadas (●) basado en sus secuencias parciales del gen 16S ARNr.

3.4. Análisis estructural *in silico* de las enzimas de interés biotecnológico

3.4.1. Serrawettin W1 sintasa putativa (SwrW)

El modelo estructural obtenido con Phyre² a partir de la secuencia aminoacídica de SwrW (BAD60917.1) se muestra en la Figura 8, el cual fue comparado con el modelo estructural del módulo terminal de la síntesis de surfactina SrfA-C de *Bacillus subtilis* (PDB: 2V5Q) [46]. Ambas enzimas comparten los mismos dominios funcionales: condensación (C), adenilación (dominio core y subdominio), tiolación (T) y tioesterificación (TE).

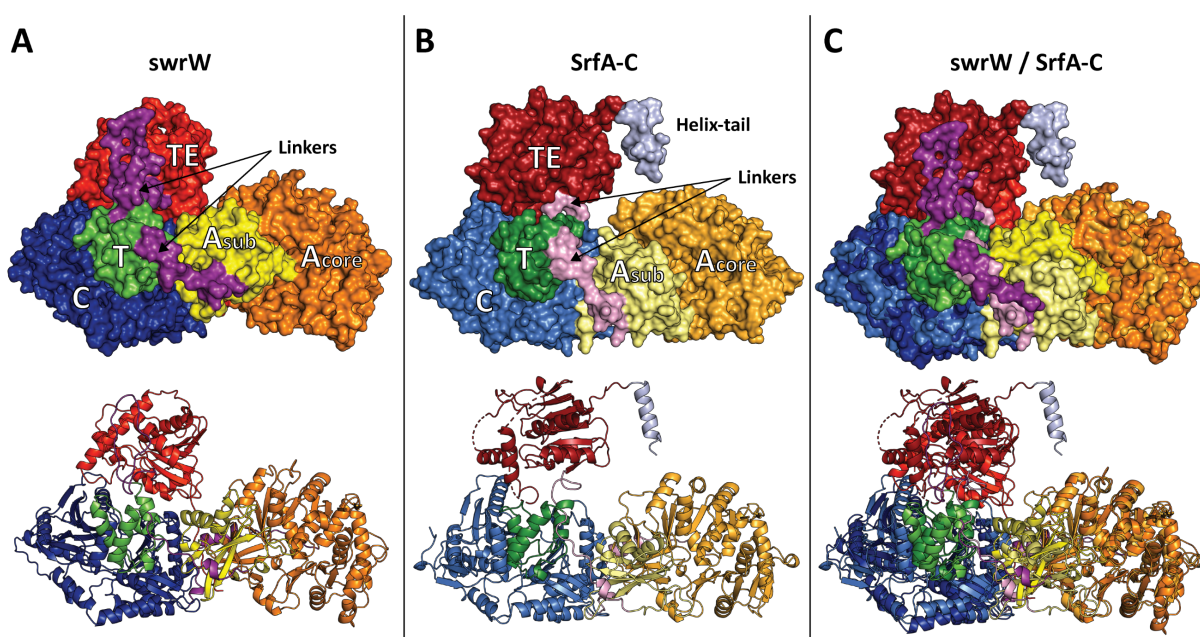


Figura 8. Modelo de la estructura tridimensional de la Serrawettin 1 sintasa putativa (SwrW) de *Serratia marcescens*. **A:** Representación en superficie (superior) y cartoon (inferior) de SwrW. Sus dominios de Condensación, Adenilación (dominio core y subdominio), Tiolación y Tioesterificación se señalan con las abreviaturas C, A_{core}, A_{sub}, T y TE, respectivamente. **B:** Representación en superficie y cartoon del módulo terminal de la síntesis de surfactina (SrfA-C). Sus dominios se indican con la misma nomenclatura antes descrita. **C:** Superposición de las representaciones en superficie y cartoon de SwrW y SrfA-C.

3.4.1.1. Dominio de condensación (C)

Como se puede observar en la Figura 8 existe una gran concordancia estructural de los modelos, tanto a nivel de dominios como de estructuras secundarias (α -hélices y β -hojas). Sin embargo, su comparación más detallada se ve dificultada por la saturación de estas. Por ello,

se muestran a continuación comparaciones individuales entre dominios.

En la Figura 9 se muestra la representación en cartoon del dominio C de SwrW y SrfA-C, así como la superposición de ambos. La distribución tridimensional de sus estructuras secundarias respectivas es muy similar entre ellas. Los dominios de condensación poseen 7 motivos conservados (C1-C7), los cuales se muestran en Figura 10. A su vez, estos se comparan mediante la alineación parcial de otras secuencias de dominio de condensación. El alineamiento completo se muestra en el Anexo 2. Cabe recalcar que el motivo C3, y cuya secuencia es HHXXXDG, actúa como sitio activo debido a su segunda His que es de vital importancia para una correcta actividad catalítica (Figura 11).

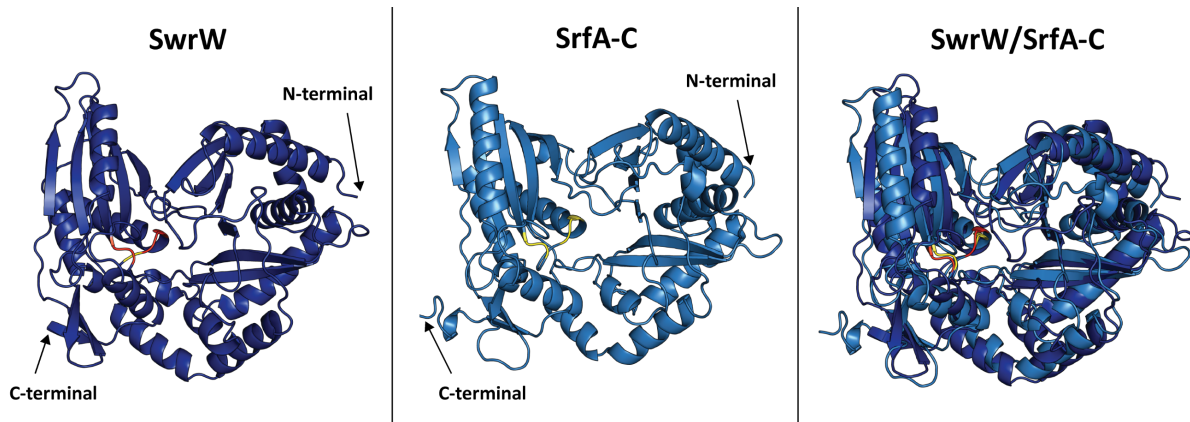
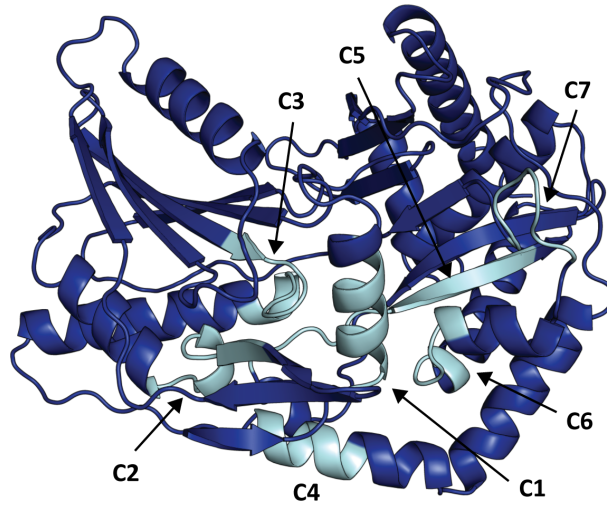


Figura 9. Representación en cartoon de los dominios de condensación (C) de SwrW y SrfA-C. Al extremo derecho la superposición de ambos dominios.

A



B

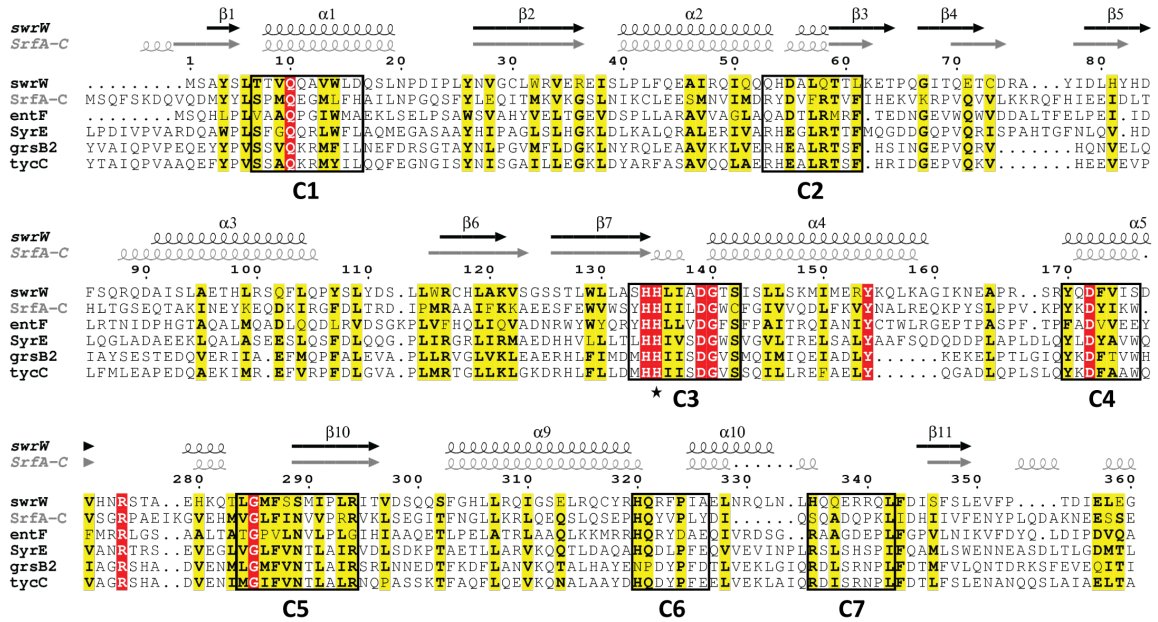


Figura 10. Motivos conservados del dominio de condensación. A: Localización espacial de los motivos conservados (C1-C7) del dominio C de SwrW. **B:** Alineamiento parcial de secuencias del dominio de condensación de SwrW, SrfA-C, EntF (Enterobactina sintetasa, *Escherichia coli*), SyrE (Siringomincina sintetasa, *Pseudomonas syringae*), grsB2 (gramicidina S sintetasa II, *Brevibacillus brevis*) y tycC (tirocidina sintetasa 3, *Brevibacillus brevis*). His catalítica (★). Adicionalmente, se muestra la estructura secundaria parcial del dominio de condensación SwrW (negro) y SrfA-C (gris).

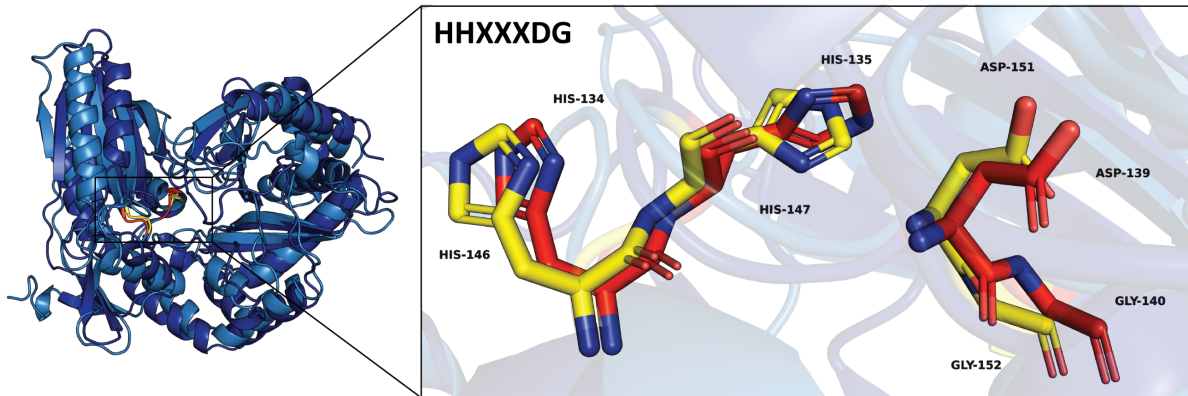


Figura 11. Representación en sticks de residuos de aminoácidos en el sitio activo del dominio de condensación. SwrW y SrfA-C en rojo y amarillo, respectivamente.

3.4.1.2. Dominio de Adenilación (Acore y Asub)

El dominio de adenilación está comprendido por un dominio central (Acore) y un subdominio (Asub), como se muestra en la Figura 12. La comparación estructural de estos dominios presentados por SwrW y SrfA-C guardan una alta similitud en cuanto a la distribución espacial de sus estructuras secundarias (Figura 12). Los dominios de adenilación poseen 10 motivos conservados. La Figura 1 permite observar la localización espacial de estos, así como la comparación de su estructura primaria y secundaria con otros dominios de adenilación. El alineamiento completo se muestra en el Anexo 3.

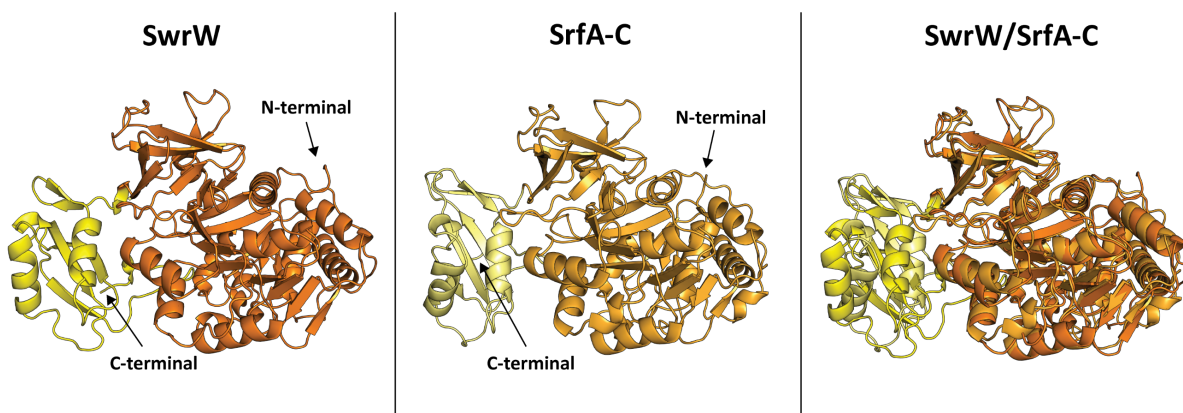


Figura 12. Representación en cartoon de los dominios de adenilación. Acore y Asub en naranja y amarillo, respectivamente de SwrW y SrfA-C. Al extremo derecho la superposición de ambos dominios.

de SwrW, SrfA-C, EntF (Enterobactina sintetasa, *Escherichia coli*), SyrE (Siringomincina sintetasa, *Pseudomonas syringae*), grsB2 (gramicidina S sintetasa II, *Brevibacillus brevis*) y tycC (tirocidina sintetasa 3, *Brevibacillus brevis*). Adicionalmente, se muestra la estructura secundaria parcial del dominio de adenilación de SwrW (negro) y SrfA-C (gris).

3.4.1.3. Dominio de Tiolación (T)

Los dominios de tiolación, también conocidos como dominios PCP (por su abreviación del inglés *Peptidyl Carrier Proteins*), son otro tipo de dominio que constituyen a las NRPS (por su abreviación del inglés *Non Ribosomal Peptide Synthetase*) y el más pequeño que estas presentan (70–90 aa). La Figura 14 compara las estructuras tridimensionales del dominio T de SwrW y SrfA-C.

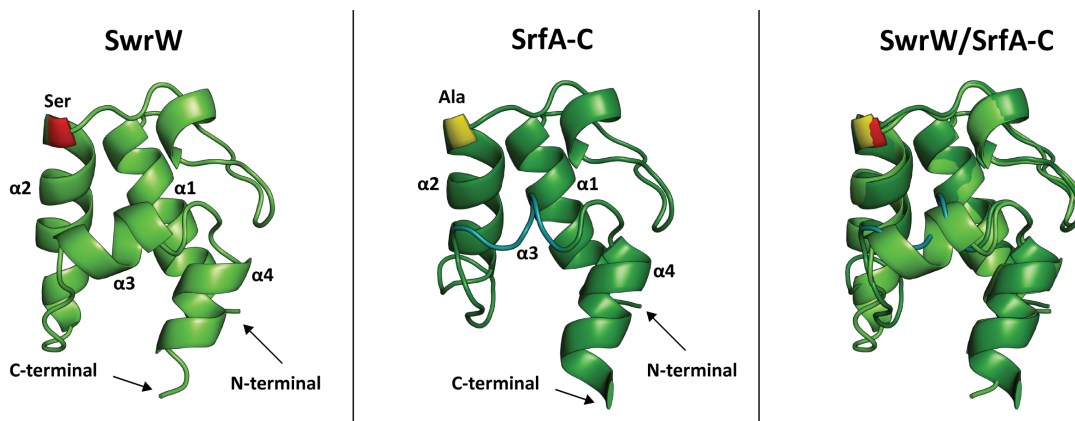


Figura 14. Representación en cartoon de los dominios de tiolación de SwrW y SrfA-C. Al extremo derecho la superposición de ambos dominios.

Los dominios de tiolación presentan un motivo conservado denominado motivo T (Figura 15), en el cual se encuentra una Ser (Figura 16) de vital importancia para el correcto funcionamiento modular de las NRPS. En el caso de SrfA-C los autores indujeron intencionalmente la mutación Ser¹⁰⁰³→Ala, convirtiendo el dominio T de SrfA-C en uno catalíticamente inactivo. El alineamiento completo de este dominio con otros se muestra en el Anexo 4.

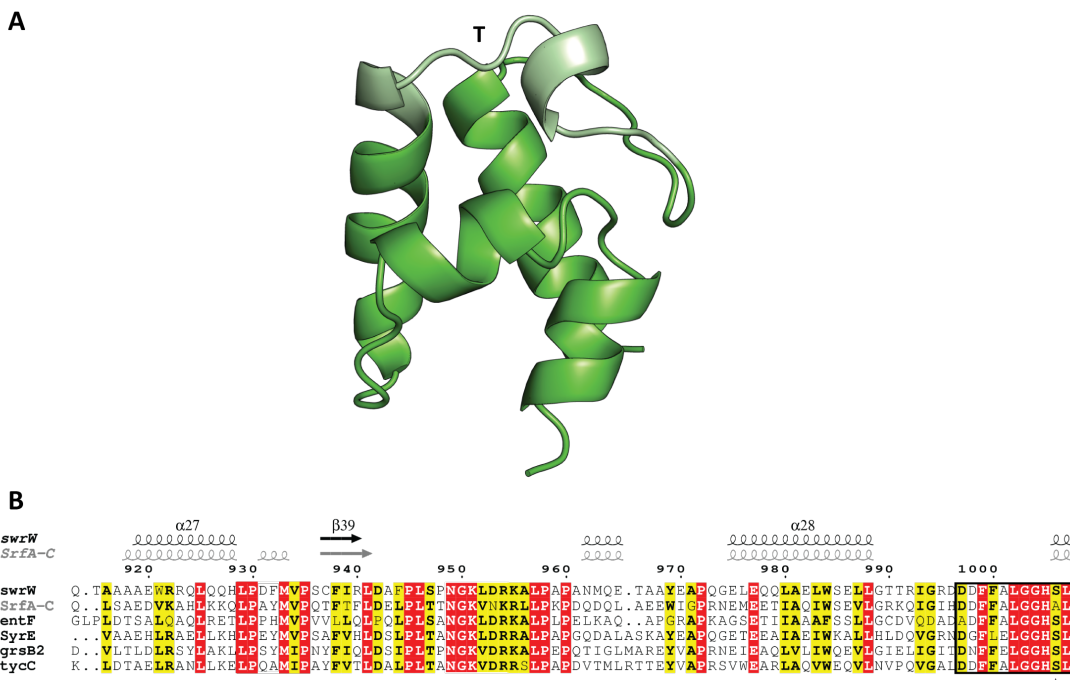


Figura 15. Motivos conservados del dominio de tiolación. **A.** Localización espacial del motivo conservado (T) en el dominio de tiolación de SwrW. **B.** Alineamiento parcial de secuencias del dominio de tiolación de SwrW, SrfA-C, EntF (Enterobactina sintetasa, *Escherichia coli*), SyrE (Siringomincina sintetasa, *Pseudomonas syringae*), grsB2 (gramicidina S sintetasa II, *Brevibacillus brevis*) y tycC (tirocidina sintetasa 3, *Brevibacillus brevis*). Ser catalítica (★). Adicionalmente, se muestra la estructura secundaria parcial del dominio de tiolación de SwrW (negro) y SrfA-C (gris).

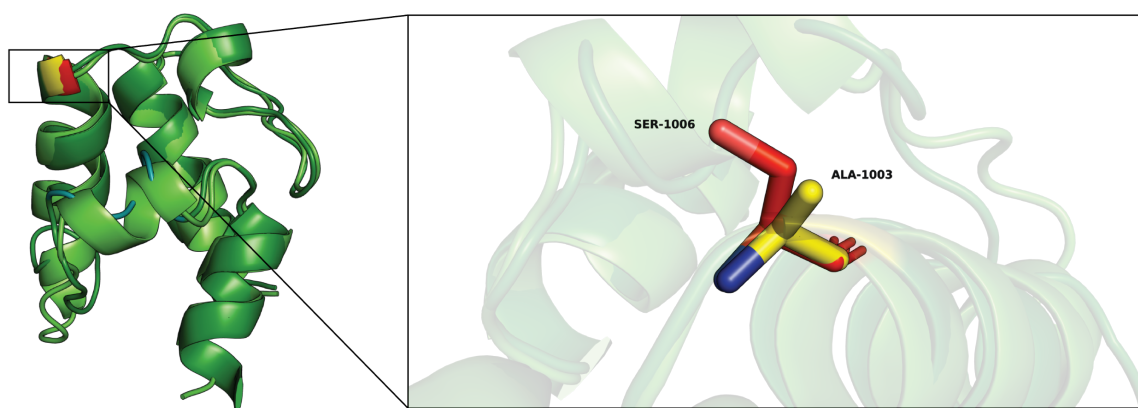


Figura 16. Sitio activo del dominio de tiolación (T). En representación sticks se muestran los residuos de aminoácidos que constituyen el motivo conservado de SwrW (rojo) y SrfA-C (amarillo).

3.4.1.4. Dominio de Tioesterificación (TE)

El dominio de tioesterificación de algunas NRPS es necesario para permitir la liberación

(TE) en el dominio de tioesterificación de SwrW. **B.** Alineamiento parcial de secuencias del dominio de tioesterificación de SwrW, SrfA-C, EntF (Enterobactina sintetasa, *Escherichia coli*), SyrE (Siringomincina sintetasa, *Pseudomonas syringae*), grsB2 (gramicidina S sintetasa II, *Brevibacillus brevis*) y tyxC (tirocidina sintetasa 3, *Brevibacillus brevis*). Ser catalítica (★). Adicionalmente, se muestra la estructura secundaria parcial del dominio de tioesterificación de SwrW (negro) y SrfA-C (gris).

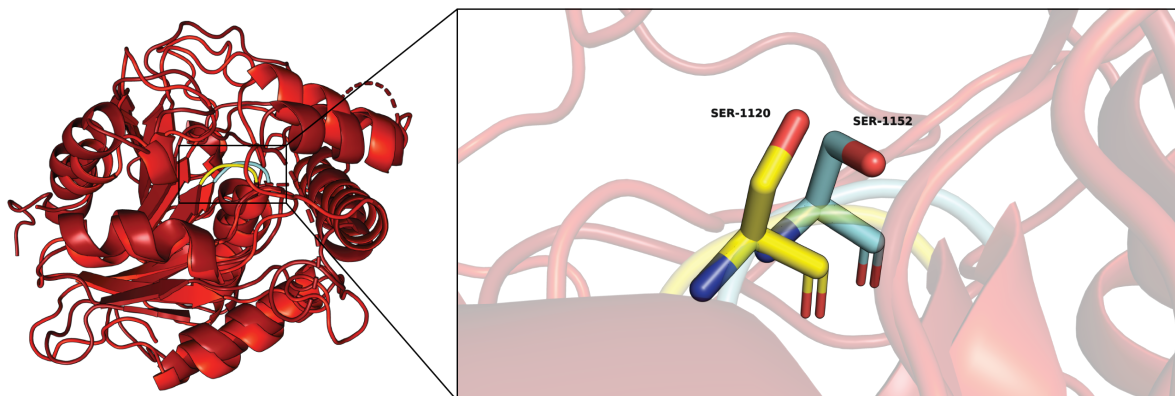


Figura 19. Sitio activo del dominio de tioesterificación (TE). En representación sticks se muestran los residuos de aminoácidos que constituyen el motivo conservado de SwrW (celeste) y SrfA-C (amarillo).

3.4.2. Oxidasa multicobre (CueO-Cdc)

El modelo estructural obtenido con Phyre2 a partir de la secuencia aminoacídica de CueO-Cdc (WP_100777592.1) se muestra en la Figura 20, el cual es comparado con el modelo estructural de otra MCO (PDB: 6EVG) [47] presentada por *Ochrobactrum* (CueO-Och). Ambas enzimas poseen tres dominios que guardan gran semejanza en cuanto a su distribución espacial y estructura secundaria. Para una comparación más detallada de las estructuras de CueO-Cdc y CueO-Och se muestran a continuación comparaciones individuales entre los dominios que conforman a cada enzima.

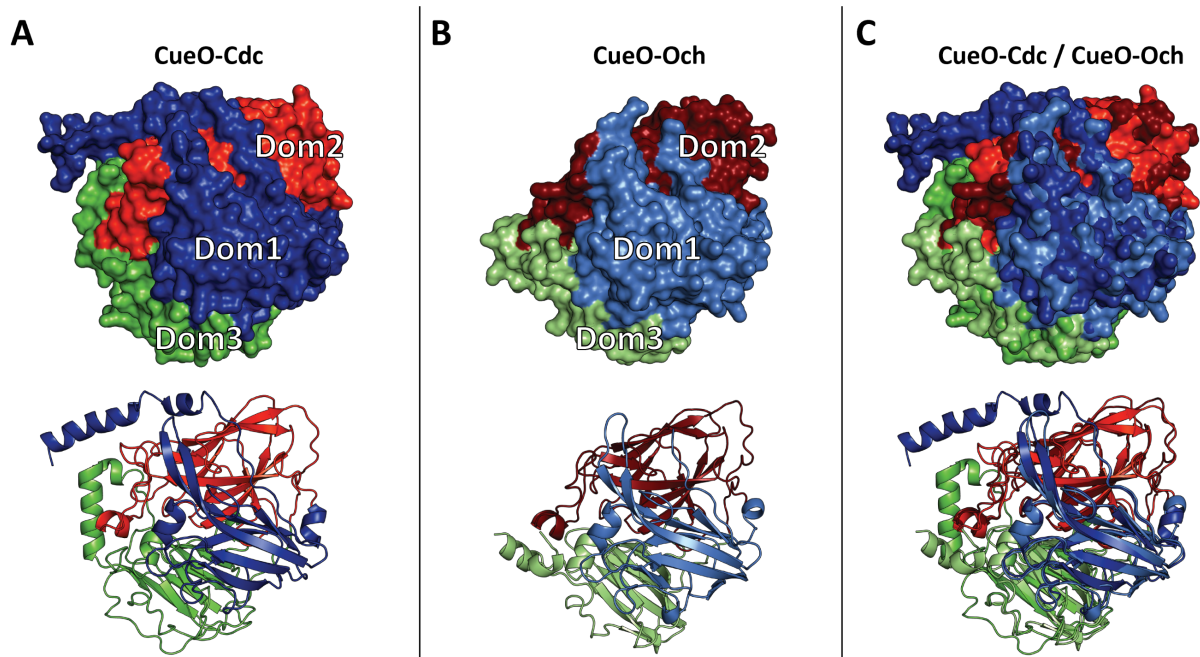


Figura 20. Modelo de la estructura tridimensional de la MCO de *Cedecea lapagei*. (CueO-Cdc) A: Representación en superficie (superior) y cartoon (inferior) de CueO-Cdc y sus dominios. **B:** Representación en superficie y cartoon de la MCO de *Ochrobactrum* (CueO-Och) y sus dominios. **C:** Superposición de las representaciones en superficie y cartoon de CueO-Cdc y CueO-Och.

3.4.2.1. Dominio 1 (CueO)

La diferencia más notoria en este dominio es la presencia de una α -hélice en el extremo N-terminal del dominio 1 de CueO-Cdc, ausente en CueO-Och (Figura 21).

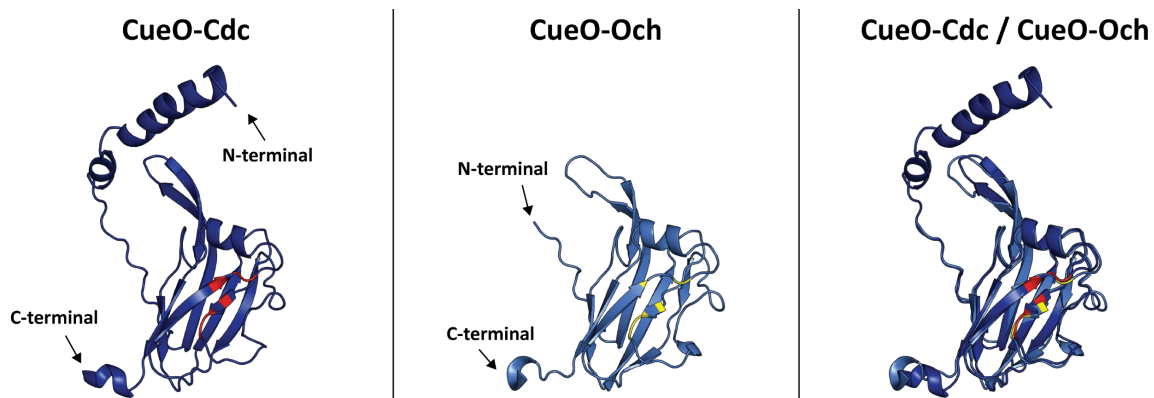


Figura 21. Representación en cartoon del dominio 1 de CueO-Cdc y CueO-Och. Al extremo derecho la superposición de ambos dominios.

De acuerdo al número de dominios y cómo estos se encuentran conectados y distribuidos, las MCO presentan cuatro motivos conservados, los cuales poseen los residuos aminoacídicos de unión al cobre, mismos que en conjunto constituyen el sitio catalítico de este tipo de enzimas. En la Figura 22 se muestran dos de los cuatro motivos que constituyen el sitio activo y que se encuentran en el dominio 1. El alineamiento completo se muestra en el Anexo 6. En la Figura 23 se puede observar con mayor detalle la orientación y la localización de los residuos aminoacídicos de unión al cobre presentes en los dos motivos antes mencionados (M1 y M2), tanto de CueO-Cdc como de CueO-Och.

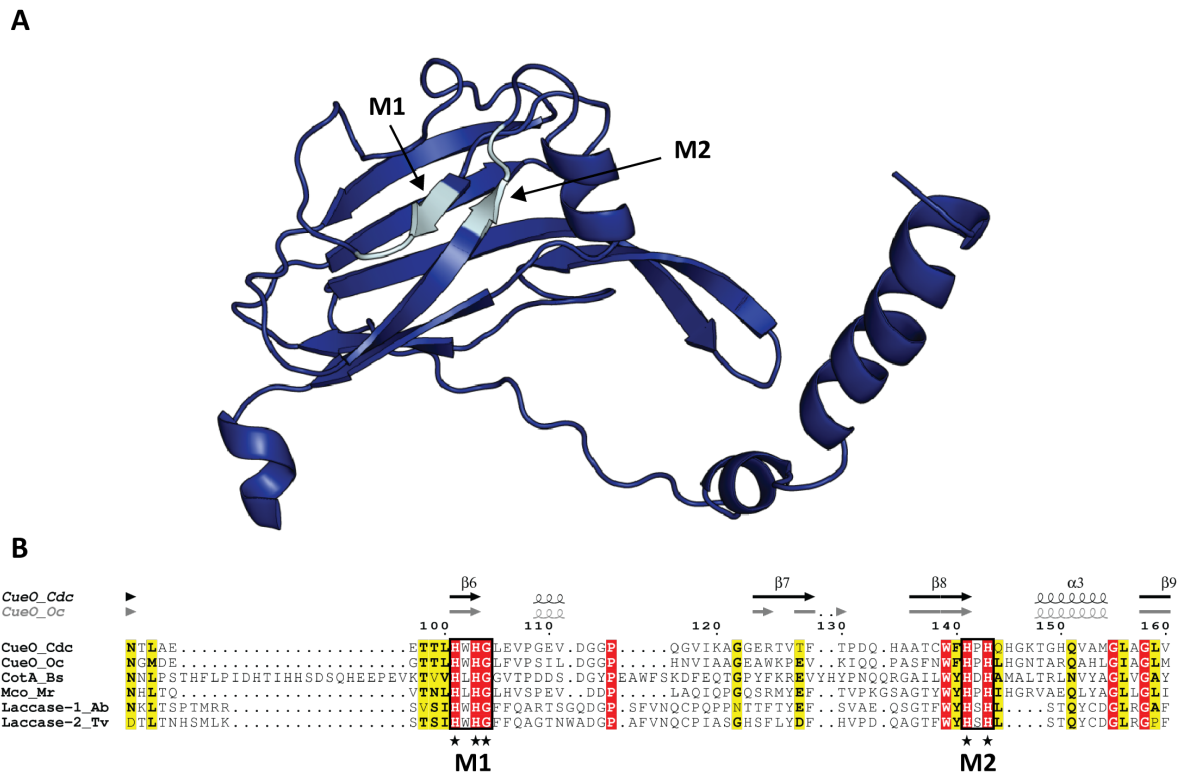


Figura 22. Motivos conservados del dominio 1 de MCO. A. Localización espacial de los motivos conservados (M1-M2) en el dominio de 1 de CueO-Cdc. **B.** Alineamiento parcial de secuencias del dominio 1 de CueO-Cdc, CueO-Och, CotA_Bs (Coat protein A, *Bacillus subtilis*), Mco_Mr (Multicopper oxidase, *Melanocarpus albomyces*), Laccase-1_Ab (Lacasa tipo I, *Agaricus bisporus*), Laccase-2_Tv (Lacasa tipo II, *Trametes versicolor*). Residuos aminoacídicos de unión al cobre (★). Adicionalmente, se muestra la estructura secundaria parcial del dominio 1 de CueO-Cdc (negro) y CueO-Och (gris).

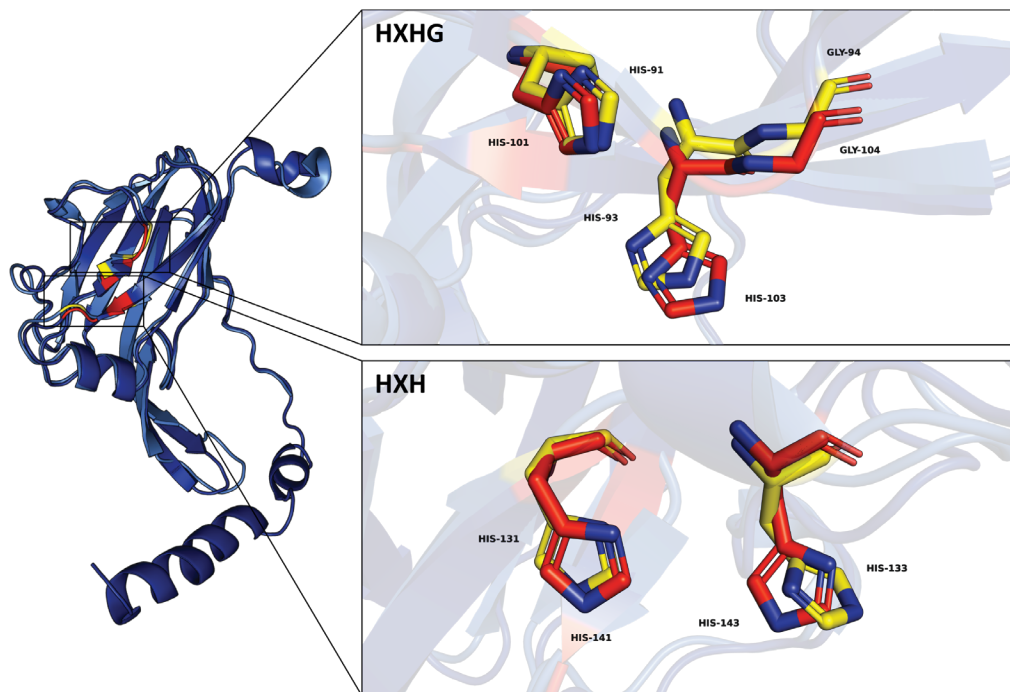


Figura 23. Representación en sticks de los residuos de aminoácidos que conforman los dos motivos conservados en el dominio 1 de CueO-Cdc (rojo) y CueO-Och (amarillo).

3.4.2.2. Dominio 2 (CueO)

En la Figura 24 se puede observar el segundo de los tres dominios que conforman las MCO CueO-Cdc y CueO-Och. Además, se muestra la superposición de estas con la finalidad de observar su correspondencia estructural en el espacio.

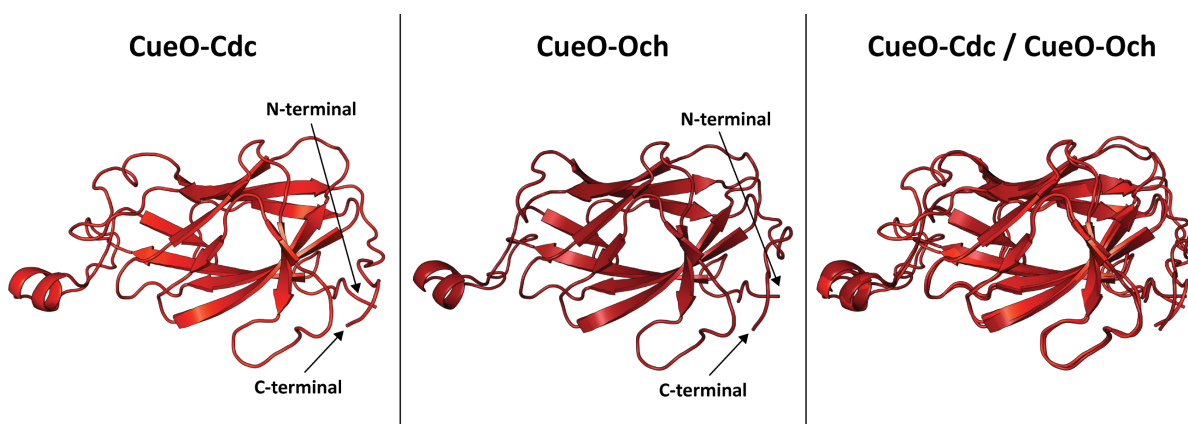


Figura 24. Representación en cartoon del dominio 2 de CueO-Cdc y CueO-Och. Al extremo derecho la superposición de ambos dominios.

Cabe mencionar que en este dominio no se encuentran motivos conservados que pudieran intervenir en la actividad catalítica de estas enzimas, a diferencia del dominio 1 que posee los motivos M1 y M2, o el dominio 2 con sus motivos M3 y M4 que se describen a continuación. Sin embargo, el alineamiento completo se muestra en el Anexo 7.

3.4.2.3. Dominio 3 (CueO)

De forma similar al dominio 1, el dominio 3 posee dos motivos conservados que presentan varios residuos aminoacídicos de unión al cobre. En la Figura 25 se puede observar el plegamiento de las estructuras que constituyen el dominio 3 de CueO-Cdc y CueO-Och, encontrándose una gran concordancia estructural si son comparadas.

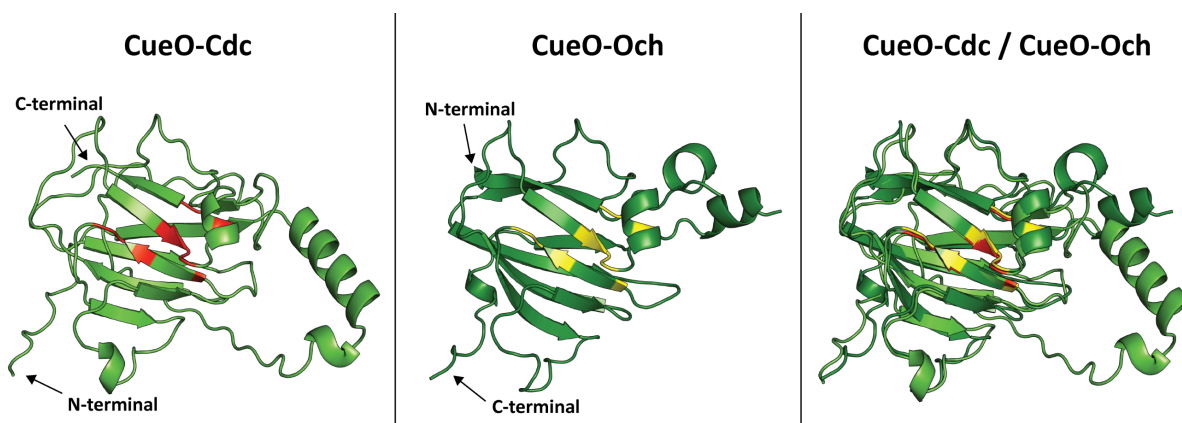


Figura 25. Representación en cartoon del dominio 3 de CueO-Cdc y CueO-Och. Al extremo derecho la superposición de ambos dominios.

Este dominio posee dos de los motivos conservados más largos de la enzima. Su localización espacial, así como su estructura primaria y secundaria se muestran en la Figura 26. En ella también se muestra el alineamiento parcial de estas secuencias. Véase el Anexo 8 para el alineamiento completo.

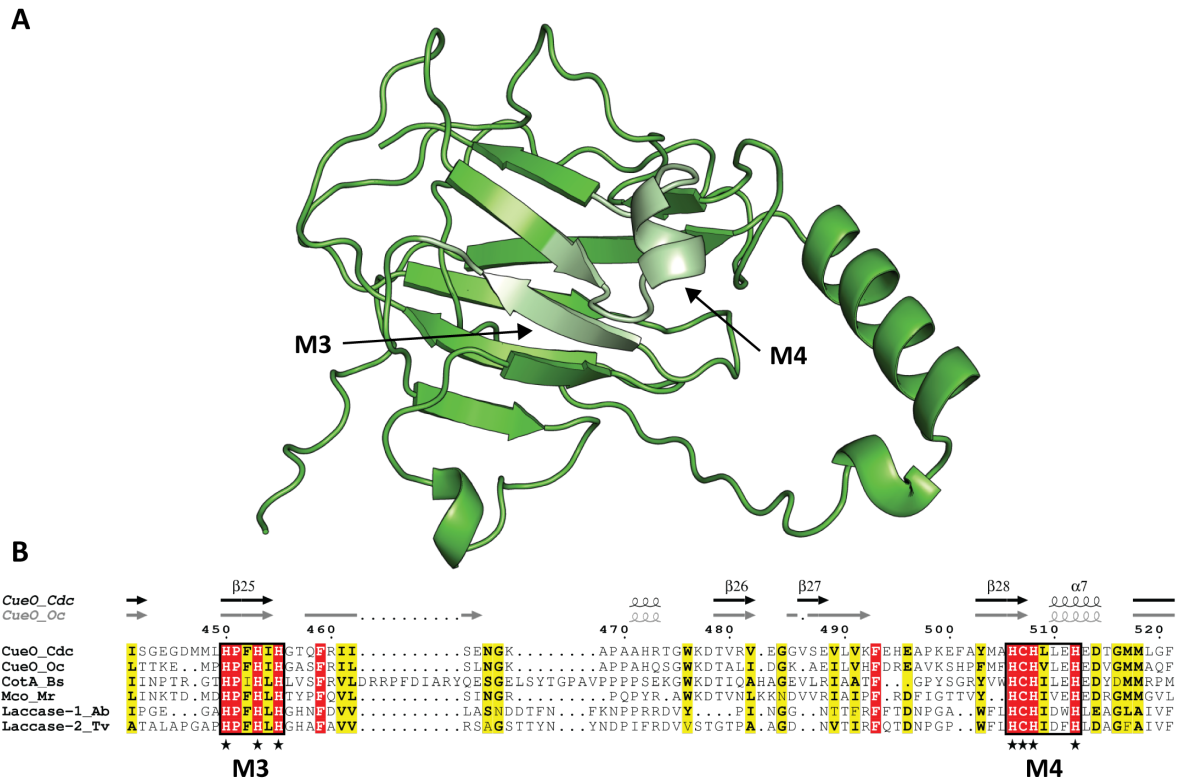


Figura 26. Motivos conservados del dominio 3 de MCO. A: Localización espacial de los motivos conservados (M3-M4) en el dominio de 3 de CueO-Cdc. **B:** Alineamiento parcial de secuencias del dominio 3 de CueO-Cdc, CueO-Och, CotA_Bs (Coat protein A, *Bacillus subtilis*), Mco_Mr (Multicopper oxidase, *Melanocarpus albomyces*), Laccase-1_Ab (Lacasa tipo I, *Agaricus bisporus*), Laccase-2_Tv (Lacasa tipo II, *Trametes versicolor*). Residuos aminoacídicos de unión al cobre (★). Adicionalmente, se muestra la estructura secundaria parcial del dominio 3 de CueO-Cdc (negro) y CueO-Och (gris).

Esto se debe a que dichos motivos están constituidos por un mayor número de residuos aminoacídicos de unión al cobre (Figura 27) si se los compara con aquellos presentes en los motivos conservados del dominio 1 (Figura 23)

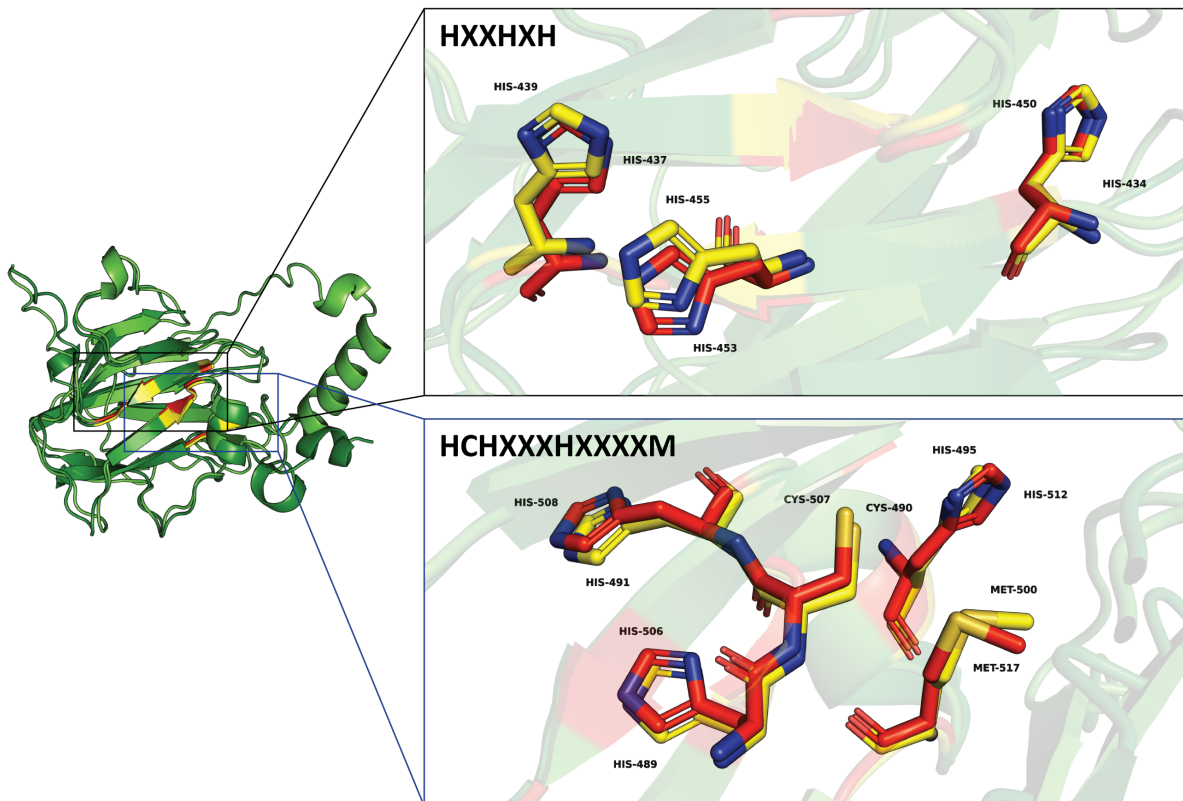


Figura 27. Representación en sticks de los residuos de aminoácidos que conforman los dos motivos conservados en el dominio 3 de CueO-Cdc (rojo) y CueO-Och (amarillo).

En la Figura 28 se muestra las interacciones de estos residuos aminoacídicos de unión al cobre y las distancias entre estos con el átomo metálico, medidas en Å. A su vez, se comparan las distancias presentadas en CueO-Cdc con las que muestra CueO-Och. También se muestra un esquema del sitio activo constituido por todos estos aminoácidos que componen los cuatro motivos conservados, que en conjunto conforma el sitio activo de las MCO.

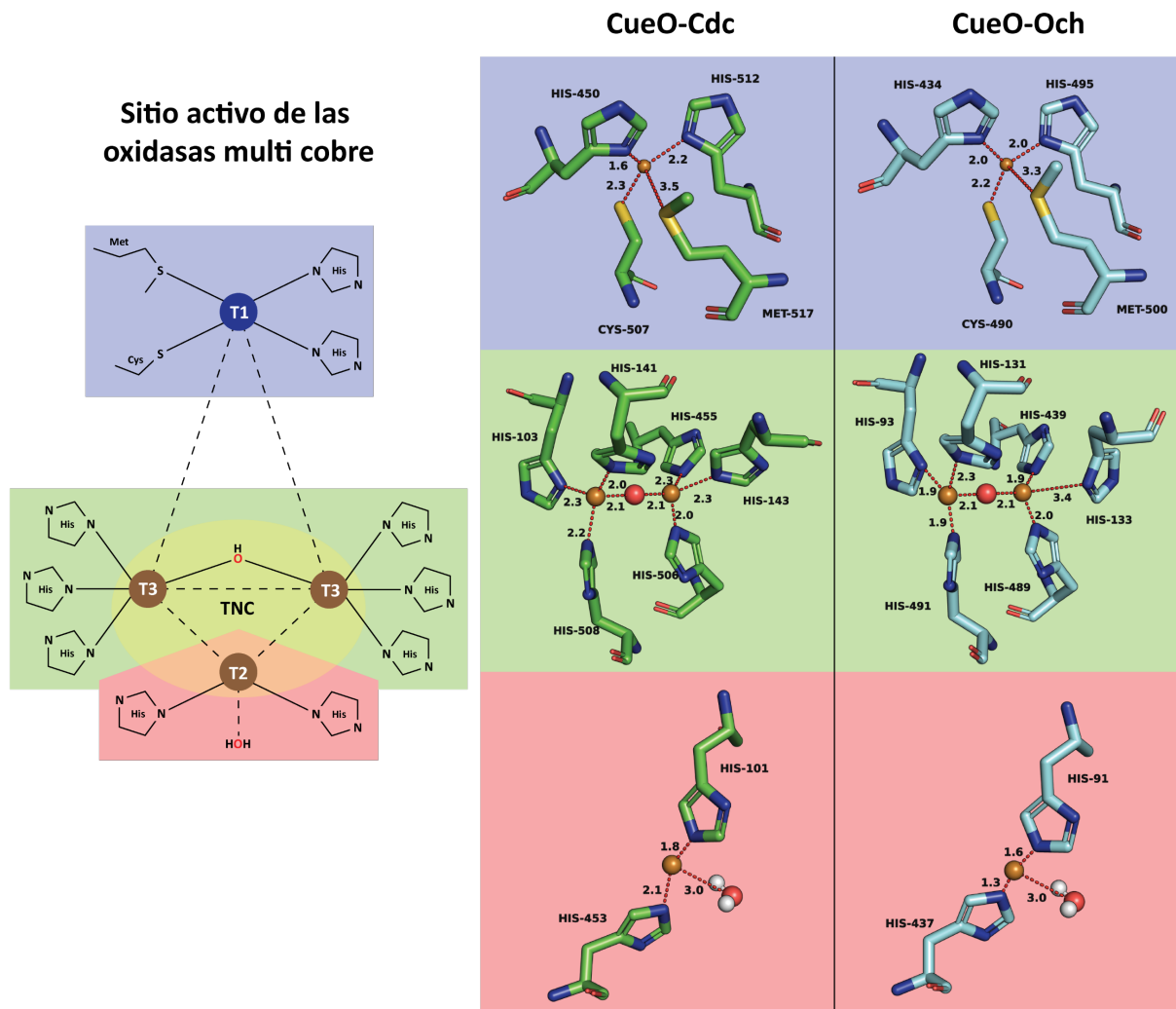


Figura 28. Representación en sticks de los residuos aminoacídicos de unión al cobre en las MCO CueO-Cdc (verde) y CueO-Och (celeste). Las líneas rojas y entrecortadas representan enlaces de coordinación al cobre. Los números sobre estas representan las distancias (Å) entre el átomo de cobre y el átomo de nitrógeno (azul), azufre (amarillo) u oxígeno (rojo). La región amarilla muestra los tres átomos de cobre que conforman el *Tri-Nuclear Cluster* (TNC)

Finalmente, la Figura 29 muestra el sitio activo completo de la MCO CueO-Cdc. También se muestran canales teóricos que funcionan como entrada de moléculas de oxígeno al sitio catalítico, así como canales de salida para las moléculas de agua formadas durante la reacción enzimática. Adicionalmente se muestra cómo se oxida el sustrato X al liberar electrones que son conducidos hasta el TNC (por su abreviación del inglés *Tri-Nuclear Cluster*) de cobre donde ocurre la reducción de una molécula de oxígeno a dos de agua.

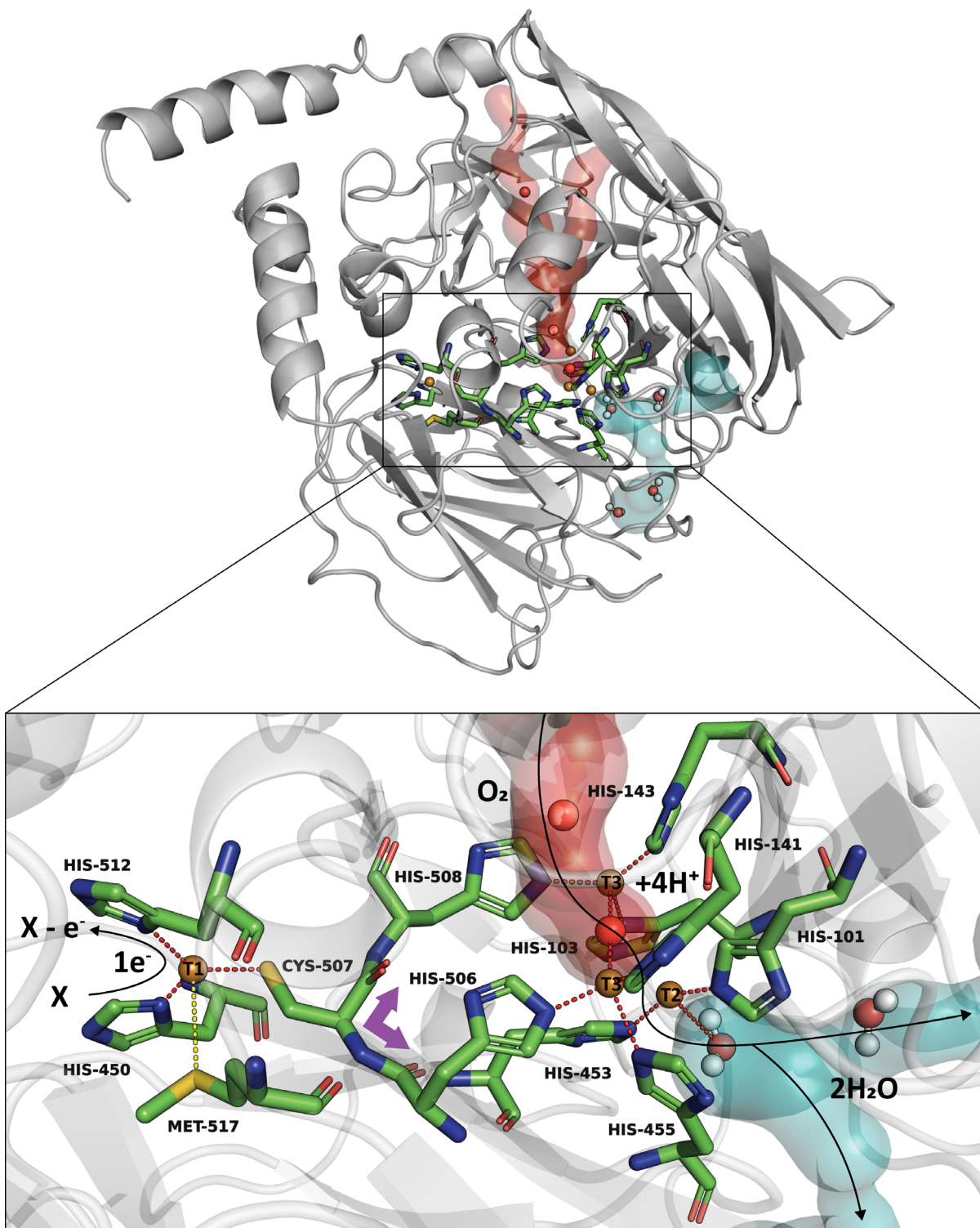


Figura 29. Sitio activo de la MCO CueO-Cdc. La presentación en superficie representa canales teóricos de entra de oxígeno (rojo) y salida de agua (celeste). Se muestra una bifurcación (flechas moradas) que sirve como transporte de electrones (e^-) liberados en la oxidación del sustrato X, que luego son empleados en conjunto con $4H^+$ para reducir una molécula de O_2 que actúa como aceptor final de e^- y formar 2 moléculas de H_2O .

CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Identificación tradicional de las cepas bacterianas aisladas

Mediante la caracterización morfológica y bioquímica de las cepas bacterianas seleccionadas se logró realizar la identificación tradicional de las mismas. Como se muestra en la Tabla 3, todas las cepas bacterianas estudiadas se trataban de bastones alargados Gram negativos. Este fue el primer criterio de discriminación para la identificación tradicional. Luego de determinar la tinción Gram y sus formas celulares se analizaron sus respectivos perfiles metabólicos basados en pruebas bioquímicas. Asf1y2 y Asf4 mostraron un perfil metabólico idéntico (Tabla 4). Ambas son negativas para la prueba oxidasa, indol, ureasa y rojo de metilo. Son positivas para la prueba catalasa y Voges-Proskauer (producen acetoina a partir de piruvato). Son capaces de usar el citrato como única fuente de carbono y energía (Citrato de Simmons positiva). En contraste, no pueden degradar lactosa, pero sí glucosa, además, pueden formar gas y no producen H₂S (K/A/-/-, en prueba TSI). De acuerdo al Anexo 9, los bastones Gram negativos y con prueba oxidasa negativa son bacterias que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*. Con este dato y realizando una revisión del Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey [48] se logró identificar a Asf1y2 y Asf4 como bacterias del género *Serratia*. Asf3 mostró leves diferencias en los resultados de las pruebas bioquímicas en comparación a las dos cepas antes descritas. Específicamente, es positivo para la prueba rojo de metilo y capaz de producir gas producto de la fermentación. Con estas características metabólicas y el resto de pruebas bioquímicas fue posible identificar a Asf3 como una bacteria del género *Cedecea*.

4.2. Identificación molecular y clasificación taxonómica de las cepas bacterianas aisladas

Inicialmente se aislaron cuatro cepas bacterianas denominadas Asf1, Asf2, Asf3 y Asf4. De las cuales, Asf1 y Asf2 mostraron características micro y macro morfológicas idénticas, ocurriendo lo mismo con las pruebas bioquímicas. Por esta razón, se realizó una discriminación molecular basada en los genotipos de las cuatro cepas bacterianas empleando la técnica de

DNA fingerprinting. Como se observa en la Figura 6, se obtuvieron tres patrones electroforéticos a partir de las cuatro cepas analizadas. Los patrones electroforéticos pertenecientes a Asf1 y Asf2 fueron idénticos. Por lo que, y sumado a los resultados de la caracterización morfológica y bioquímica se decidió considerar a Asf1 y Asf2 como la misma cepa. Así, los resultados de las características macro y micromorfológicas, además de las pruebas bioquímicas, fueron unificados y mostrados bajo la nueva etiqueta “Asf1y2”.

Los resultados de la identificación tradicional fueron confirmados por aquellos obtenidos en el árbol filogenético basado en secuencias parciales del gen 16ARNr (Figura 7). Dicho árbol agrupa a Asf1y2 y Asf4 con bacterias del género *Serratia* y a Asf3 con bacterias del género *Cedecea*. Finalmente, y como prueba definitiva, la identificación molecular de las cepas bacterianas estudiadas permitió verificar los resultados de la identificación tradicional. Asf1y2 fue identificada como *Serratia marcescens* subsp. *marcescens* ATCC 1388, Asf3 como *Cedecea lapagei* DSM 4587 y Asf4 como *Serratia marcescens* subsp. *sakuensis* KREDT (Tabla 5). De esta manera, las cepas bacterianas se clasificaron taxonómicamente como bacterias del género y especie *Serratia marcescens* (Asf1y2 y Asf4) y *Cedecea lapagei* (Asf3), mismas que pertenecen a las familias *Yersiniaceae* y *Enterobacteriaceae* (Figura 7) respectivamente.

La identificación taxonómica fue realizada con ayuda del buscador taxonómico del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>). Sin embargo, el manual de Bergey [48] clasifica ambos géneros dentro de la familia *Enterobacteriaceae*. Independientemente de esta clasificación por familias, todas las cepas bacterianas estudiadas pertenecen al orden Enterobacterales, puesto que ambas familias se incluyen en este. Adicionalmente, y continuando con la identificación taxonómica, las cepas se incluyen en la clase Gammaproteobacteria, la cual forma parte del filo Proteobacteria.

4.3. Potenciales aplicaciones biotecnológicas de las cepas bacterianas aisladas

4.3.1. *Serratia marcescens* subsp. *marcescens* ATCC 13880

El género *Serratia* comprende bacterias con forma de bastones alargados de 0.5–0.8 x

0.9–2.0 μm de longitud. Este se ajusta a la definición general de la familia *Enterobacteriaceae*: Gram negativas, generalmente móviles gracias sus flagelos peritricosos y son anaeróbicas facultativas [48]. Este es el caso de *Serratia marcescens*, una bacteria capaz de crecer bajo condiciones extremas y además, se distingue por su capacidad de producir una molécula exolipídica de gran interés: el biosurfactante serrawettin [34]. Existen tres tipos de serrawettin producidos por diferentes cepas de *Serratia marcescens* (Anexo 10): Serrawettin W1, W2 y W3 [34,49]. La cepa ATCC 13380 es capaz de producir Serrawettin W1, biosurfactante con una tensión superficial de 32.2 mN/m [49]. De acuerdo a la identificación molecular (Tabla 5), Asf1y2 es una *Serratia marcescens* sup. *marcescens* cepa ATCC 13380, sugiriendo que la cepa aislada podría ser capaz de producir esta molécula tensioactiva.

La Serrawettin W1 sintasa putativa (SwrW) es una enzima perteneciente a la NRPS que presenta los dominios de condensación (C), de tiolación (T) o PCP, de adenilación (A) y de tioesterificación (TE) [35]. En este caso específico, se podría deducir que es una enzima NRPS que comprende un módulo terminal, debido a la presencia del dominio TE; el cual solo puede ser encontrado en módulos terminales de las NRPS. Sin embargo, esta NRPS es unimodular (comprendida por un solo módulo), en contraste a otras NRPS encontradas en la naturaleza [34], como la NRPS Surfactina sintasa de *Bacillus subtilis* que posee siete módulos en total (Figura 4) [10].

4.3.1.1. Dominio de condensación (C)

Los dominios C generalmente se encuentran ubicados en el extremo N-terminal de un módulo. Son los encargados de catalizar la formación de enlaces amida entre dos sustratos. Para ello, los dominios C transfieren un aminoácido o péptido desde una proteína transportadora (PCP o ACP) localizada aguas arriba, al grupo amino de otro sustrato que se ha cargado previamente en otra proteína transportadora, localizada aguas abajo (Anexo 11) [19]. Estos dominios de aproximadamente 450 residuos pertenecen a la superfamilia de las cloranfenicol acetiltransferasas (CAT). De forma similar a las CAT, los dominios de condensación en las NRPS contienen el motivo conservado HHXXDG, del cual su segunda His

juega un papel imprescindible para la correcta actividad catalítica del dominio; pues se ha evidenciado que mutaciones en este residuo acaban con la actividad de dicho dominio [19]. La Figura 11 muestra la ubicación y orientación de esta His tanto en el dominio C de SwrW como el de SrfA-C. Sin embargo, este motivo conservado es uno de los siete (C1-C7) que caracteriza un dominio C, específicamente se trata del motivo C3. La secuencia de estos motivos es ligeramente diversa, pero sirven como huellas para identificar un dominio C (Anexo 12) [50]. La Figura 10 permite observar la ubicación espacial de estos motivos en el dominio C de SwrW, además compara sus secuencias con otros dominios C. Efectivamente, se puede observar que el motivo C3 de SwrW posee la secuencia de aminoácidos HHXXXDG, presente en otros dominios de condensación como son el de la Enterobactina sintetasa de *Escherichia coli*, Siringomincina sintetasa de *Pseudomonas syringae*, entre otros.

En cuanto al plegamiento de este dominio, mientras que CAT forma un trímero cíclico, los dominios C monoméricos forman un pseudo-dímero, cuyos dos subdominios se pliegan de tal manera que forman una estructura en forma de V [19]. Esta conformación estructural puede ser evidenciada tanto en el modelo de SwrW y SrfA-C (Figura 9). Con estas concordancias a nivel de motivos conservados y plegamiento de su estructura tridimensional se puede considerar que el dominio C de SwrW es efectivamente un dominio de condensación típico de las NRPS.

4.3.1.2. Dominio de adenilación (A_{core} y A_{sub})

Los dominios de adenilación de NRPS constan de aproximadamente 500 residuos. La mayor parte de la enzima, los residuos 1-400, constituyen el subdominio N-terminal (A_{core}), mientras que los 100 residuos finales forman el subdominio C-terminal [19]. La Figura 12 permite apreciar que esta conformación estructural de ambos dominios se cumple tanto para el dominio de adenilación de SwrW y SrfA-C. Adicionalmente, se han identificado diez motivos conservados (A1-A10) que caracterizan este tipo de dominios (Anexo 12). El dominio adenilación de SwrW presenta todos los motivos conservados, además sus secuencias son comparadas con las presentes en otros dominios de adenilación (Figura 13).

La reacción catalizada por este tipo de dominios implica dos pasos: (1) activación dependiente de ATP de un aminoácido por adenilación del ácido carboxílico para formar un aminoacil adenilato y (2) reacción del sustrato previamente activado con el brazo de fosfopanteteína de un PCP para generar un aminoacil tioéster (Anexo 11) [19].

4.3.1.3. Dominio de tiolación (T) o PCP

De forma similar a los dominios transportadores en la síntesis y el metabolismo de ácidos grasos, las enzimas NRPS también utilizan un dominio de proteína portadora de peptidilo (PCP), también conocido como dominio de tiolación; cuyo rol es transportar los sustratos y los intermediarios peptídicos entre diferentes dominios catalíticos [19]. Los dominios T son los más pequeños que se pueden encontrar en las NRPS. Suelen tener de 70 a 90 aminoácidos de longitud. Al igual que otras ACP (por su abreviación del inglés Acyl Carrier Proteins), los dominios T de NRPS están compuestos por cuatro α -hélices principales; siendo las hélices α_1 , α_2 y α_4 las más largas y mayormente paralelas entre sí. En contraste, la hélice α_3 es la más corta y posee una orientación perpendicular a las tres anteriores [19]. El dominio T de SwrW presenta cinco α -hélices, cuatro de ellas cumpliendo las características antes mencionadas y una última de menor tamaño ubicada en un *loop* comprendido entre el final de la hélice α_1 y el inicio de la hélice α_2 (Figura 14). Es normal observar este tipo de estructuras dentro de este *loop*, puesto que su secuencia es altamente variable entre este tipo de dominios. Por otro lado, el dominio T de SrfA-C presenta cuatro hélices- α , pero la de menor tamaño no cumple con la orientación y ubicación esperada. Dicha α -hélice se superpone con aquella localizada en el *loop* del dominio T de SwrW (Figura 14). Adicionalmente, al observar la superposición de ambos dominios se puede notar que la hélice α_3 del dominio T de SwrW se superpone con un *loop* (resaltado en azul) en SrfA-C (Figura 14). Es decir, la hélice α_3 no está presente en el dominio T de SrfA-C.

De forma similar a los dominios C, los dominios T también poseen un motivo conservado que los caracteriza (Anexo 12). La Figura 15 muestra la localización espacial de este

motivo, así como la comparación de su estructura primaria con otros dominios T. En este motivo se haya un residuo de Ser conservado que sirve como sitio para la unión covalente con un cofactor de fosfopanteteína que se deriva de la coenzima A (CoA) (Anexo 11). La Figura 16 permite observar la ubicación y orientación de esta Ser catalítica presente en el motivo conservado del dominio T. La modificación postraducciona cambia el estado apo (inactivo) del dominio T al estado holo (activo) del mismo, siendo esta reacción catalizada por una fosfopanteteinil transferasa (PPTasa) (Anexo 13) [19,51].

En vista que el dominio T de SwrW cumple con las propiedades estructurales, motivos conservados y residuos catalíticos típicos de un dominio de tiolación, es posible considerar a este como un dominio T catalíticamente funcional.

4.3.1.4. Dominio de tioesterificación (TE)

Dentro del módulo final de una ruta NRPS, la actividad del dominio de condensación final cataliza la transferencia del péptido (aguas arriba) al grupo amino cargado en el dominio T terminal. Para liberar el péptido y que la NRPS pueda iniciar otra ronda de síntesis, se requiere la actividad de un dominio de tioesterificación.

La estructura del dominio TE de SrfA-C mostró que el dominio pertenece a la familia de α/β hidrolasas compuestas por una β -hoja central, en su mayoría paralela, que está rodeada por α -hélices. Esta conformación estructural también puede ser visualizada en el dominio TE de SwrW (Figura 17). Similar al dominio de T, los dominios TE también presentan un único motivo conservado con el cual pueden ser identificados (Anexo 12). La Figura 18 permite observar la ubicación de este motivo a la vez que compara su secuencia con otros dominios TE. Dentro de este motivo se haya una Ser catalítica conservada (Figura 19), la cual mediante una reacción de hidrólisis (Anexo 11) permite que el péptido no ribosomal sea liberado de la NRPS.

Es importante recordar que todos estos dominios se encuentran formando la NRPS unimodular SwrW, responsable de la síntesis del biosurfactante Serrawettin W1. El mecanismo mediante el cual esta molécula es sintetizada ya ha sido propuesto, e involucra todos los dominios que componen la NRPS (Anexo 14) [35]. Como primer paso se tiene la adenilación de una L-Ser por parte del dominio A, activándola (reacción 1). Luego la L-Ser activada se une como un tioéster al dominio de T (reacción 2) que ha sido fosfopanteteinilado previamente por PswP (una PPTasa de *S. marcescens* 274). Una vez unida al dominio T, el grupo amino de la L-Ser crea un enlace amida con el 3-D-hidroxicanoilo, transportado por ACP, provocando la separación de esta última (reacción 3). Aún no se han identificado mutantes defectuosos en la formación de ACP y acil-ACP, por lo que el rol ACP que se muestra en el Anexo 14 es mera especulación. Una vez unido al dominio T se forma el ácido serratámico. Luego, el dominio de tiolación se libera transfiriendo el primer ácido serratámico al dominio TE vecino (reacción 4). Llegados a este punto es necesario mencionar que las reacciones 1-3 se repiten hasta obtener un dominio T que ha sido fosfopanteteinilado nuevamente (reacciones 5-7). Luego de estas siete reacciones se tienen dos ácidos serratámicos: uno unido al dominio T y otro al dominio TE. Estos dos ácidos serratámicos vecinos se unirán mediante un enlace éster. Tras la formación de este enlace éster intramolecular, se producirá la liberación del producto circular simétrico Serrawettin W1 (reacciones 8-10). En resumen, excepto por el dominio ACP que lleva el 3-D-hidroxicanoilo, SwrW posee todos los dominios funcionales necesarios para llevar a cabo las reacciones catalíticas antes descritas y que permiten la biosíntesis de la Serrawettin 1.

Un reciente estudio analizó el genoma de 84 cepas del género *Serratia*, descubriendo que el gen core (*swrW*) que permite la síntesis de la Serrawettin W1 se encontraba en 17 de los genomas analizados; de los cuales uno pertenece a la cepa ATCC 13880 [52]. Recordando, la cepa Asf1y2 aislada en este estudio fue identificada como *Serratia marcescens* subsp. *marcescens* ATCC 13880. Esto permite reforzar la posibilidad de que la cepa Asf1y2 sea capaz de producir la NRPS SwrW y, por tanto, pueda sintetizar Serrawettin W1. El mismo estudio determinó que todos los genes envueltos en la síntesis de la Serrawettin W1 se encontraban organizados en un *cluster* de genes, identificados como *clusters* de NRPSs. Este descubrimiento

resulta de gran importancia pues permitiría establecer estrategias de expresión heteróloga de dichos genes con la finalidad de producir serrawettins a gran escala.

Otro de los principales hallazgos de este estudio fue la identificación de cuatro genes presentes en todos los *clusters* de genes envueltos en la síntesis de serrawettins. Estos genes codifican para la CTP sintasa (proteína de resistencia glioxalasa/bleomicina/ dioxigenasa), una proteína de la familia LrgA y una proteína de la familia LrgB. Interesantemente, la proteína de la familia LrgA guarda un gran parentesco con antiholinas presentes en bacteriófagos. Las holinas y las antiholinas se encargan de controlar la formación de canales para que la mureína hidrolasa se exporte a través de la membrana bacteriana con el fin de inhibir la lisis celular inducida por bacteriófagos. En *Serratia*, el operón responsable de la expresión de este tipo de proteínas parece estar asociado en el transporte de serrawettins, actuando como un facilitador; sin que la complejidad de estas moléculas afecte el transporte de la mismas. Inicialmente, la clase de proteínas holinas-antiholinas se descubrió en bacteriófagos, las cuales se encargan de modular la lisis de la célula huésped durante la infección lítica. Por esta razón, se hipotetiza que estas proteínas pudieron ser adquiridas mediante la transferencia horizontal de genes a una bacteria antigua a través de la integración de estos elementos en su genoma [52].

Con todas las características descritas en este estudio, y soportado por las antes mencionadas, la cepa Asf1y2 identificada como *Serratia marcescens* subsp. *marcescens* ATCC 13880 posee un alto potencial para sintetizar Serrawettin 1. Esto la convertiría en una cepa capaz de ser empleada en la biorremediación de sitios contaminados con hidrocarburos recalcitrantes, pues el biosurfactante Serrawettin W1 podría incrementar la biodisponibilidad de estos compuestos, mejorando su tasa de biodegradación.

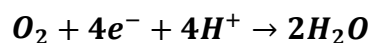
4.3.2. *Cedecea lapagei* DSM 4587

Las bacterias del género *Cedecea* son células con forma de bastón alargado y con 0.6–0.7 1.3–1.9 μm de longitud. Concuerdan con la definición general de la familia

Enterobacteriaceae: Gram negativa, móvil, con cinco a nueve flagelos peritricosos [48]. El nombre de este género viene dado por la abreviación del inglés *Centers for Disease Control*, CDC. Esto debido a que las primeras especies descritas de este género fueron descubiertas en el CDC, específicamente a partir de muestras tomadas del tracto respiratorio de pacientes. Sin embargo, recientemente una especie de este género ha sido aislada de grillos camello de invernadero (*Diestrammena asynamora*) [36], la cual mostró una interesante actividad lacasa. Dicha cepa podría ser empleada para la degradación de compuestos lignocelulósicos como la lignina y hemicelulosa, que son los principales componentes del licor negro; un producto de desecho de la industria de la pulpa de papel que se produce comúnmente durante la descomposición química de la madera pulpada [53].

La cepa Asf3 fue identificada molecularmente como *Cedecea lapagei* DSM 4587, el mismo género y especie que mostró la actividad lacasa. Por esta razón, y por su potencial aplicación se analizó las posibles enzimas involucradas en esta actividad lacasa. Una de ellas, y la más prometedora fue una MCO (CueO-Cdc) con gran similitud a la presentada por *Ochrobactum* sp. (CueO-Och) [47], una bacteria con un alta tasa de degradación compuestos modelo de lignina y lignosulfonato.

Las oxidasas multicobre (MCO por su abreviación del inglés *Multicopper Oxidases*) forman una clase de enzimas que desempeñan una variedad de funciones fisiológicas en diferentes organismos, teniendo en común la presencia de dos sitios de cobre que albergan cuatro iones de cobre en total. Utilizando estas características específicas, las MCO son capaces de acoplar cuatro oxidaciones de un electrón a partir de un sustrato con la consecuente reducción de oxígeno molecular a agua [54], siguiendo la ecuación:



Las MCO tienen estructuras multidominio y se clasifican según el número de dominios como estructuras de dos dominios (2dMCO), tres dominios (3dMCO) y seis dominios (6dMCO) [55]. De acuerdo a esta clasificación, tanto CueO-Cdc como CueO-Och pertenecen al grupo

3dMCO, pues presentan tres dominios distribuidos espacialmente de la misma manera que la mostrada en el Anexo 15. Las 3dMCO se componen de una única cadena de péptidos de alrededor de 500 residuos de aminoácidos con tres dominios secuenciales similares a los de la cupredoxina [55]. Los tres dominios visualizados en la Figura 20 presentan arquitecturas similares a la observada en un barril β . Estas estructuras se pueden apreciar a mayor detalle en las Figuras 21, 24 y 25, que corresponden a los dominios 1, 2 y 3 de las CueO analizadas, respectivamente. El tipo 3dMCO presenta cuatro motivos conservados (M1-M4) cuyas secuencias son HXHG, HXH, HXXHXH, y HCHXXXHXXXM/L/F, respectivamente [55]. Dentro de estos motivos conservados se encuentran todos los residuos aminoacídicos de unión al cobre y constituyen el sitio catalítico de las MCO. En la Figura 22 se pueden observar los motivos M1 y M2, presentes en el dominio 1. Además, se compara la secuencia de esos con otros dominios 1 presentes en diferentes MCO. Adicionalmente, se muestra la localización espacial y orientación de los residuos aminoácidos de unión al cobre en estos motivos, los cuales muestran una gran concordancia si se superponen los modelos del dominio 1 de CueO-Cdc y CueO-Och (Figura 23). De forma similar, los motivos M3 y M4 presentes en el dominio 3, se pueden observar en la Figura 26, así como el alineamiento parcial de sus secuencias con otros dominios 3 de distintas MCO. Los residuos de aminoácidos que comprenden dichos motivos comparten gran concordancia en la orientación y disposición al superponer los modelos del dominio 3 de CueO-Cdc y CueO-Och (Figura 27)

La Figura 28 permite comparar las distancias (medidas en Å) que poseen los distintos enlaces de coordinación que se forman entre el cobre y los residuos de aminoácidos que interaccionan con este. El cobre de tipo 1 (T1) forma cuatro enlaces de coordinación con una Cys, una Met y dos His. Los cobres tipo 3 (T3) forman cuatro enlaces de coordinación; tres con tres His diferentes y uno con un átomo de oxígeno. Finalmente, el cobre de tipo 2 (T2) forma tres enlaces de coordinación, dos con dos His diferentes y uno con un oxígeno de una molécula de agua. En el caso de las His, los enlaces de coordinación son formados con sus átomos de nitrógeno. En contraste, los enlaces de coordinación con la Cys y Met son mediados por átomos de azufre. Como se puede apreciar en la Figura 28, las distancias en CueO-Cdc no se diferencian

en gran magnitud con las presentadas por CueO-Och, e incluso en varios casos estas son iguales. Toda esta configuración es necesaria para que la oxidación del sustrato pueda ser llevada a cabo eficientemente.

La actividad catalítica de las MCO se ejecuta en dos pasos: 1) oxidación del sustrato en el sitio del cobre T1 y 2) reducción de la molécula aceptora de electrones en el sitio TNC. En la Figura 29 se esquematiza el posible proceso oxidación de un sustrato X realizado por CueO-Cdc y descrito a continuación. El primer paso de la actividad catalítica ocurre en el sitio del cobre T1, oxidando el sustrato X. Los electrones liberados son transportados del sitio del cobre T1 al sitio TNC mediante una cadena de aminoácidos bifurcada con la siguiente configuración: $\text{Cu}_{\text{T1}}-\text{Cys}-(\text{Cu}_{\text{TNC}}-\text{His})_2$ [54]. El cobre T1, estabilizado por las His^{450, 512} y Met⁵¹⁷, es capaz de transferir los electrones a la Cys⁵⁰⁷, mismos que son movilizados hasta el sitio TNC, ya sea por la His⁵⁰⁸ o His⁵⁰⁶. Esto permite que el oxígeno que ingresa por los canales teóricos de entrada (representación en superficie color rojo), actúe como aceptor final de los electrones transportados y sea reducido a dos moléculas de agua; las cuales inmediatamente dejan la MCO por los canales teóricos de salida (representación en superficie color celeste).

Al comparar la estructura modelada de CueO-Cdc con aquella obtenida por cristalografía de rayos X de CueO-Och, se puede considerar a CueO-Cdc como una MCO con actividad lacasa, capaz de degradar compuestos modelos de lignina; pues cumple con todos los requisitos para ser considerada una MCO. La estructura y distribución de los dominios concuerdan con los presentados por CueO-Och, y más importante aún, presenta todos los residuos aminoácidos de unión al cobre imprescindibles para la actividad catalítica, a la vez que sus orientaciones son altamente fieles a las observadas en CueO-Och. Por tanto, la cepa Asf3 identificada como *Cedecea lapagei* DSM 4587 podría ser capaz de degradar compuestos lignocelulósicos, lo cual la habilita como una bacteria con potencial aplicación en la biodegradación de residuos que poseen lignina. De igual manera, los compuestos formados productos de la biodegradación podrían ser empleados en la elaboración y refinación de biocombustibles.

4.3.3. *Serratia marcescens* subsp. *sakuensis* KREDT

Esta cepa comparte el mismo perfil bioquímico y características morfológicas que las presentadas por *Serratia marcescens* subsp. *marcescens* ATCC 13380. Sin embargo, su coloración la diferencia de esta. La cepa identificada como *Serratia marcescens* subsp. *sakuensis* KREDT posee una llamativa pigmentación rojiza-naranja (Figura 5). Es probable que dicha pigmentación se deba a su capacidad para producir prodigiosina. Se ha descubierto que la prodigiosina, un metabolito secundario, es producido por *Serratia marcescens*, *Pseudomonas magnesorubra*, *Vibrio psychroerythrous*, *Serratia rubidaea*, *Vibrio gazogenes*, *Alteromonas rubra*, *Rugamonas rubra* y actinomicetos Gram positivos, como *Streptoverticillium rubrireticuli long* y *Streptoverticillium rubrireticuli longisporreptomycetes* [56]. Este metabolito secundario solo es producido en las últimas etapas del crecimiento bacteriano, y se ha evidenciado que la producción de este se ve afectada por varios factores ambientales, la disponibilidad de fosfato inorgánico, la composición del medio, el pH y especialmente por la temperatura [56]. La biosíntesis de prodigiosina se ve estimulada a 30°C e inhibida a 37°C [35].

El estudio de los mecanismos biológicos que regulan la síntesis de este metabolito secundario se ha disparado en los últimos años debido a las potenciales aplicaciones de este. Las prodigiosinas bacterianas y sus derivados sintéticos son agentes proapoptóticos eficaces contra diversas líneas celulares cancerosas. Están dirigidas a múltiples dianas celulares que incluyen células resistentes a múltiples fármacos con poca o nula toxicidad hacia las líneas celulares normales [56]. Un estudio que logró aislar y caracterizar esta cepa a partir de un tanque de tratamiento de aguas residuales domésticas, pudo identificar el pigmento producido por la cepa KREDT como prodigiosina mediante espectrometría de masas de alta resolución [45]. Por esta razón, la cepa Asf4 identificada molecularmente como *Serratia marcescens* subsp. *sakuensis* KREDT podría ser considerada como una fuente de este metabolito secundario con potenciales aplicaciones médicas.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

En el presente estudio se pudieron aislar tres cepas bacterianas asociadas a muestras de asfalto natural tomadas en la Cantera del Pungarayacu, ubicada en Tena, Napo-Ecuador. La caracterización morfológica de estas cepas permitió clasificarlas como bastones alargados Gran negativos. Su caracterización bioquímica permitió identificar tradicionalmente dos de las cepas como bacterias pertenecientes al género *Serratia* y asociar la tercera al género *Cedecea*. La caracterización molecular permitió identificar taxonómicamente como bacterias pertenecientes a las familias *Yersiniaceae* y *Enterobacteriaceae*, las cuales forman parte del orden Enterobacterales, clase Gammaproteobacteria y filo Proteobacteria. Adicionalmente, La caracterización molecular permitió identificar molecularmente las cepas como *Serratia marcescens* subsp. *marcescens* ATCC 13880, *Serratia marcescens* subsp. *sakuensis* KREDT y *Cedecea lapagei* DSM 4587.

Finalmente, el estudio de sus potenciales aplicaciones biotecnológicas mediante un acercamiento *in silico* permitió concluir que las cepas bacterianas aisladas pueden ser empleadas en procesos de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos recalcitrantes, biodegradación de biomasa lignocelulósica que puede ser aprovechada en la elaboración y refinamiento de biocombustibles; y como fuente del metabolito secundario prodigiosina que posee actividad proapoptótica.

5.2. Recomendaciones

Este trabajo busca establecer una línea base para facilitar una investigación más detallada sobre estas cepas bacterianas con alto potencial hidrocarbonoclástico y biotecnológico. La prospección a futuro es poder medir estas potenciales aplicaciones biotecnológicas de manera cuantitativa. Por lo tanto, se recomienda establecer un diseño experimental que permita medir la capacidad degradadora de las cepas bacterianas aisladas empleando hidrocarburos modelos como única fuente de carbono y energía, así como

determinar su grado de tolerancia a los mismos. Paralelamente, medir el potencial de sintetizar biosurfactantes y la actividad emulsificante asociada a estas moléculas. Así mismo, desarrollar ensayos de degradación de compuestos modelos de lignina con el objetivo de cuantificar la capacidad ligninolítica de las cepas bacterianas aisladas.

Es importante mencionar que el establecimiento de consorcios microbiológicos es fundamental para la ejecución de un exitoso programa de biorremediación. Por ello, también se sugiere realizar ensayos de antagonismos con otros grupos microbiológicos, como son los hongos, con el fin de conocer cepas bacterianas y fúngicas que sean compatibles entre sí. Esto con la finalidad de ser empleadas de forma conjunta y aumentar la eficiencia de biodegradación de compuestos contaminantes y altamente recalcitrantes, sobre todo en ambientes frágiles y de alta diversidad biológica como la región Amazónica.

REFERENCIAS

1. Yuniati MD. Bioremediation of petroleum-contaminated soil: A Review. IOP Conf Ser: Earth Environ Sci. 2018;118: 012063. doi:10.1088/1755-1315/118/1/012063
2. Varjani SJ. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. Bioresource Technology. 2017;223: 277–286. doi:10.1016/j.biortech.2016.10.037
3. Li X, Li H, Qu C. A Review of the Mechanism of Microbial Degradation of Petroleum Pollution. IOP Conf Ser: Mater Sci Eng. 2019;484: 012060. doi:10.1088/1757-899X/484/1/012060
4. Fox RD. Physical/Chemical Treatment of Organically Contaminated Soils and Sediments. Journal of the Air & Waste Management Association. 1996;46: 391–413. doi:10.1080/10473289.1996.10467473
5. Azubuike CC, Chikere CB, Okpokwasili GC. Bioremediation techniques—classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. World J Microbiol Biotechnol. 2016;32: 180. doi:10.1007/s11274-016-2137-x
6. Verma JP, Jaiswal DK. Book Review: Advances in Biodegradation and Bioremediation of Industrial Waste. Front Microbiol. 2016;6. doi:10.3389/fmicb.2015.01555
7. Goswami M, Chakraborty P, Mukherjee K, Dey S, Mitra G, Tribedi P. Bioaugmentation and biostimulation: a potential strategy for environmental remediation. Journal of Microbiology & Experimentation. 2018;6. doi:10.15406/jmen.2018.06.00219
8. Das N, Chandran P. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. Biotechnology Research International. 2010;2011: e941810. doi:10.4061/2011/941810
9. Xu X, Liu W, Tian S, Wang W, Qi Q, Jiang P, et al. Petroleum Hydrocarbon-Degrading Bacteria for the Remediation of Oil Pollution Under Aerobic Conditions: A Perspective Analysis. Front Microbiol. 2018;9. doi:10.3389/fmicb.2018.02885
10. Martínez-Núñez MA, López VEL y. Nonribosomal peptides synthetases and their applications in industry. Sustainable Chemical Processes. 2016;4: 13. doi:10.1186/s40508-016-0057-6
11. Pacwa-Płociniczak M, Płaza GA, Piotrowska-Seget Z, Cameotra SS. Environmental

- Applications of Biosurfactants: Recent Advances. *Int J Mol Sci.* 2011;12: 633–654.
doi:10.3390/ijms12010633
12. Karlapudi AP, Venkateswarulu TC, Tammineedi J, Kanumuri L, Ravuru BK, Dirisala V ramu, et al. Role of biosurfactants in bioremediation of oil pollution-a review. *Petroleum.* 2018;4: 241–249. doi:10.1016/j.petlm.2018.03.007
 13. Harvey S, Elashvili I, Valdes JJ, Kamely D, Chakrabarty AM. Enhanced Removal of Exxon Valdez Spilled Oil from Alaskan Gravel by a Microbial Surfactant. *Bio/Technology.* 1990;8: 228–230. doi:10.1038/nbt0390-228
 14. Kaczorek E, Pacholak A, Zdarta A, Smulek W. The Impact of Biosurfactants on Microbial Cell Properties Leading to Hydrocarbon Bioavailability Increase. *Colloids and Interfaces.* 2018;2: 35. doi:10.3390/colloids2030035
 15. Le Govic Y, Papon N, Le Gal S, Bouchara J-P, Vandeputte P. Non-ribosomal Peptide Synthetase Gene Clusters in the Human Pathogenic Fungus *Scedosporium apiospermum*. *Front Microbiol.* 2019;10. doi:10.3389/fmicb.2019.02062
 16. Drakontis CE, Amin S. Biosurfactants: Formulations, properties, and applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science.* 2020;48: 77–90. doi:10.1016/j.cocis.2020.03.013
 17. Carrera B, Santiago W. Análisis de la respuesta acústica de crudos pesados del campo Pungarayacu utilizando física de rocas. 2016 [cited 19 Apr 2021]. Available: <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/7755>
 18. Correa Pabón RE, Souza Filho CR de. Crude oil spectral signatures and empirical models to derive API gravity. *Fuel.* 2019;237: 1119–1131. doi:10.1016/j.fuel.2018.09.098
 19. Miller BR, Gulick AM. Structural Biology of Non-Ribosomal Peptide Synthetases. *Methods Mol Biol.* 2016;1401: 3–29. doi:10.1007/978-1-4939-3375-4_1
 20. Valencia S. Análisis de parámetros de perforación para pozos de crudos pesados del campo Pungarayacu. 2014 [cited 21 Dec 2020]. Available: <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/7689>
 21. Calle de la Torre P. Caracterización comparativa TBP y cromatográfica del crudo extrapesado extraído de las arenas de Pungarayacu. 2014 [cited 21 Dec 2020]. Available: <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/2869>

22. Shields P, Cathcart L. Oxidase Test Protocol. Nov 2010 [cited 27 Nov 2020]. Available: <https://www.asmscience.org/content/education/protocol/protocol.3229>
23. Lehman D. Triple Sugar Iron Agar Protocols. Sep 2005 [cited 27 Nov 2020]. Available: <https://www.asmscience.org/content/education/protocol/protocol.2842>
24. MacWilliams MP. Indole Test Protocol. Dec 2009 [cited 27 Nov 2020]. Available: <https://www.asmscience.org/content/education/protocol/protocol.3202>
25. Brink B. Urease Test Protocol. Nov 2010 [cited 27 Nov 2020]. Available: <https://www.asmscience.org/content/education/protocol/protocol.3223>
26. MacWilliams MP. Citrate Test Protocol. Dec 2009. Available: <https://www.asmscience.org/content/education/protocol/protocol.3203>
27. Reiner K. Catalase Test Protocol. Nov 2010 [cited 27 Nov 2020]. Available: <https://www.asmscience.org/content/education/protocol/protocol.3226>
28. McDevitt S. Methyl Red and Voges-Proskauer Test Protocols. Dec 2009 [cited 27 Nov 2020]. Available: <https://www.asmscience.org/content/education/protocol/protocol.3204>
29. Sechi LA, Zanetti S, Dupré I, Delogu G, Fadda G. Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequences as Molecular Targets for Typing of *Mycobacterium tuberculosis* Strains. *J Clin Microbiol.* 1998;36: 128–132.
30. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997;25: 3389–3402.
31. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 2004;32: 1792–1797. doi:10.1093/nar/gkh340
32. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol.* 2018;35: 1547–1549. doi:10.1093/molbev/msy096
33. Tamura K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol.* 1993;10: 512–526. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023

34. Apao MMN, Teves FG, Madamba MRSB. Sequence analysis of putative swrW gene required for surfactant serrawettin W1 production from *Serratia marcescens*. *African Journal of Biotechnology*. 2012;11: 12040–12044. doi:10.4314/ajb.v11i57.
35. Li H, Tanikawa T, Sato Y, Nakagawa Y, Matsuyama T. *Serratia marcescens* Gene Required for Surfactant Serrawettin W1 Production Encodes Putative Aminolipid Synthetase Belonging to Nonribosomal Peptide Synthetase Family. *Microbiology and Immunology*. 2005;49: 303–310. doi:https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2005.tb03734.x
36. Mathews SL, Epps MJ, Blackburn RK, Goshe MB, Grunden AM, Dunn RR. Public questions spur the discovery of new bacterial species associated with lignin bioconversion of industrial waste. *Royal Society Open Science*. 2019;6: 180748. doi:10.1098/rsos.180748
37. Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJE. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*. 2015;10: 845–858. doi:10.1038/nprot.2015.053
38. Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res*. 2018;46: W296–W303. doi:10.1093/nar/gky427
39. The PyMOL Molecular Graphics System Version 2.4.0. Schrödinger, LCC; Available: <https://pymol.org/2/>
40. El-Gebali S, Mistry J, Bateman A, Eddy SR, Luciani A, Potter SC, et al. The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic Acids Research*. 2019;47: D427–D432. doi:10.1093/nar/gky995
41. Postic G, Ghouzam Y, Chebrek R, Gelly J-C. An ambiguity principle for assigning protein structural domains. *Science Advances*. 2017;3: e1600552. doi:10.1126/sciadv.1600552
42. Robert X, Gouet P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Research*. 2014;42: W320–W324. doi:10.1093/nar/gku316
43. Spröer C, Mendrock U, Swiderski J, Lang E, Stackebrandt E. The phylogenetic position of *Serratia*, *Buttiauxella* and some other genera of the family Enterobacteriaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*,. 1999;49: 1433–1438. doi:10.1099/00207713-49-4-1433

44. Grimont PA, Grimont F, Farmer III J, Asbury MA. *Cedecea davisae* gen. nov., sp. nov. and *Cedecea lapagei* sp. nov., new Enterobacteriaceae from clinical specimens. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 1981;31: 317–326.
45. Ajithkumar B, Ajithkumar VP, Iriye R, Doi Y, Sakai T. Spore-forming *Serratia marcescens* subsp. *sakuensis* subsp. nov., isolated from a domestic wastewater treatment tank. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2003;53: 253–258. doi:10.1099/ijs.0.02158-0
46. Tanovic A, Samel SA, Essen L-O, Marahiel MA. Crystal Structure of the Termination Module of a Nonribosomal Peptide Synthetase. *Science*. 2008;321: 659–663. doi:10.1126/science.1159850
47. Granja-Travez RS, Wilkinson RC, Persinoti GF, Squina FM, Fülöp V, Bugg TDH. Structural and functional characterisation of multi-copper oxidase CueO from lignin-degrading bacterium *Ochrobactrum* sp. reveal its activity towards lignin model compounds and lignosulfonate. *FEBS J*. 2018;285: 1684–1700. doi:10.1111/febs.14437
48. Garrity G, Brenner DJ, Krieg NR, Staley JR, editors. *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria*. 2nd ed. Springer US; 2005. doi:10.1007/0-387-28022-7
49. Matsuyama T, Tanikawa T, Nakagawa Y. Serrawettins and Other Surfactants Produced by *Serratia*. In: Soberón-Chávez G, editor. *Biosurfactants: From Genes to Applications*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2011. pp. 93–120. doi:10.1007/978-3-642-14490-5_4
50. Marahiel MA, Stachelhaus T, Mootz HD. Modular Peptide Synthetases Involved in Nonribosomal Peptide Synthesis. *Chem Rev*. 1997;97: 2651–2674. doi:10.1021/cr960029e
51. Beld J, C. Sonnenschein E, R. Vickery C, P. Noel J, D. Burkart M. The phosphopantetheinyl transferases: catalysis of a post-translational modification crucial for life. *Natural Product Reports*. 2014;31: 61–108. doi:10.1039/C3NP70054B
52. Marques-Pereira C, Proença DN, Morais PV. Genome Sequences of *Serratia* Strains Revealed Common Genes in Both *Serratamolides* Gene Clusters. *Biology (Basel)*. 2020;9. doi:10.3390/biology9120482
53. Mathews SL, Pawlak J, Grunden AM. Bacterial biodegradation and bioconversion of

industrial lignocellulosic streams. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2015;99: 2939–2954.
doi:10.1007/s00253-015-6471-y

54. Rulíšek L, Ryde U. Theoretical studies of the active-site structure, spectroscopic and thermodynamic properties, and reaction mechanism of multicopper oxidases. *Coordination Chemistry Reviews.* 2013;257: 445–458. doi:10.1016/j.ccr.2012.04.019
55. Komori H, Higuchi Y. Structural insights into the O₂ reduction mechanism of multicopper oxidase. *The Journal of Biochemistry.* 2015;158: 293–298. doi:10.1093/jb/mvv079
56. Darshan N, Manonmani HK. Prodigiosin and its potential applications. *J Food Sci Technol.* 2015;52: 5393–5407. doi:10.1007/s13197-015-1740-4

ANEXOS

> 16S_rRNA_Asf1y2

CTGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAGCACAGGGGAGCTTGCTCCCTGGGTGACGAGCGGGGACG
GGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAACCGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGG
GACCTTCGGGCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTC
TGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAC TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCT
GATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTCAGCGAGGAGGAAGGTGGTGAGCTTAATACGTTTCATCAAT
TGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGT
AAAGCGCAGCAGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGCTCAACCTGGGAAC TGCAATTTGAAACTGGCAAGCTAGAGTCTCGTA
GAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTTGACGAAGACTGACG
CTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGG
CGTGGCTTCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAG
CGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTCCAGAGATGGATTGGTGCCCTC
GGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTT
GTTGCCAGCGGTTCCGGCCGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAA ACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC AAGTCATCATGGCCCTTACG
AGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCATATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTATGTCGTAGTCCGGAT
TGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACAC
CGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTA

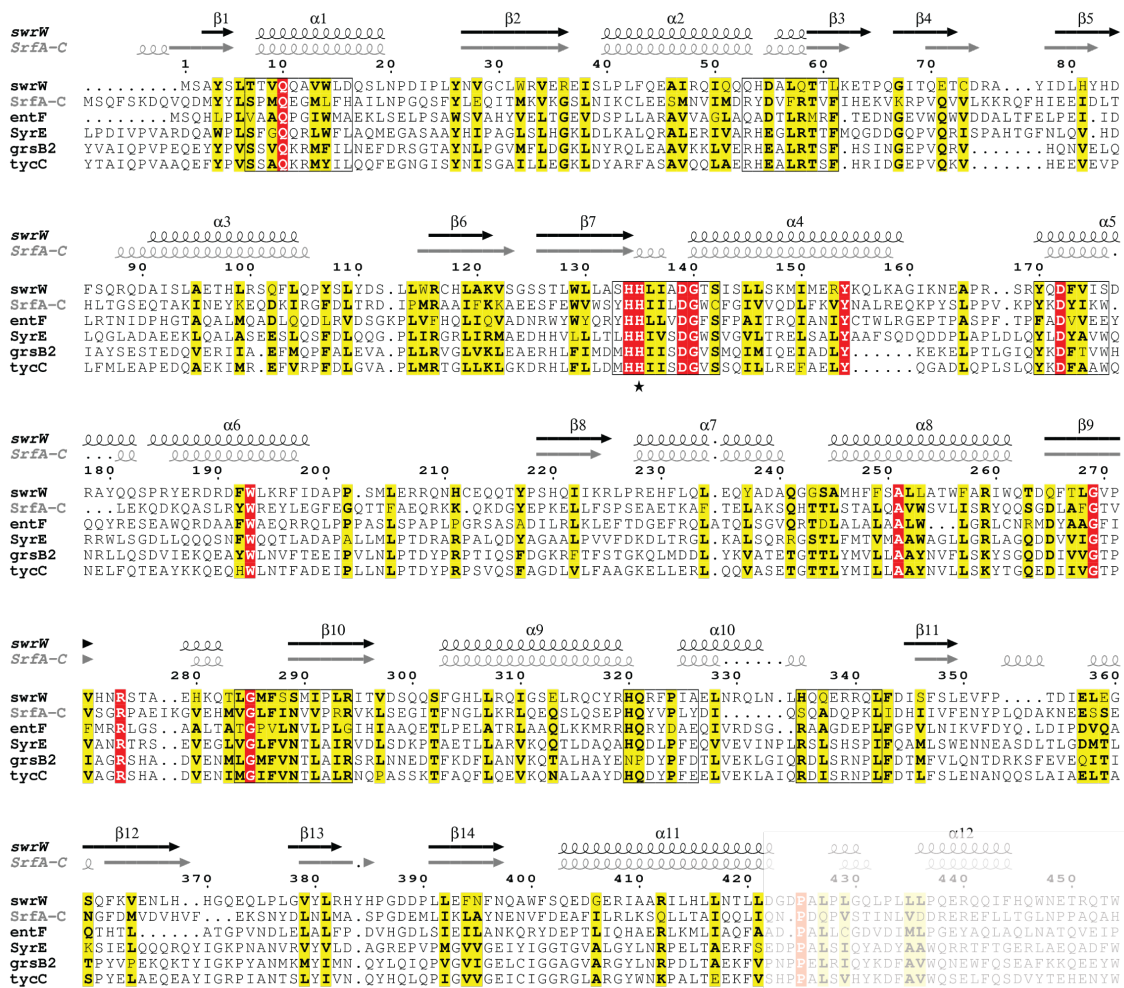
> 16S_rRNA_Asf3

AGATTGAACGCTGGCGGCAGGCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAGCACGGGAGAGCTTGCTCTCTGGGTGACGAGCGGGGACGGGTGAG
TAATGCTCGGGGATCTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAACCGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTT
CGGGCCTCTTGCCATCAGATGAACCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAG
GATGACCAGCCACACTGGAAC TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCA
GCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGTACTTTCAGCGAGGAGGAAGGCATTAAGGTTAATAACCTTAGTGATTGACGT
TACTCGCAGAAGAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCG
CACGAGGGCGGTTTGTAAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGCTCAACCTGGGAAC TGCAATTTGAAACTGGCAAGCTTGAGTCTTGTAGAGGGG
GGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTTGACAAAGACTGACGCTCAGG
TGCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGTCGACTTGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGC
TTCCGGAGCTAACCGGTTAAGTCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGG
AGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACTACTCTTGACATCCAGAGAACTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAAC
TCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTGCTCAGCTTGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCC
AGCGGTTCCGGCCGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAA ACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC AAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGG
GCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCCTGTAGTCCGGATTGGAGT
CTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCG
TCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTAC

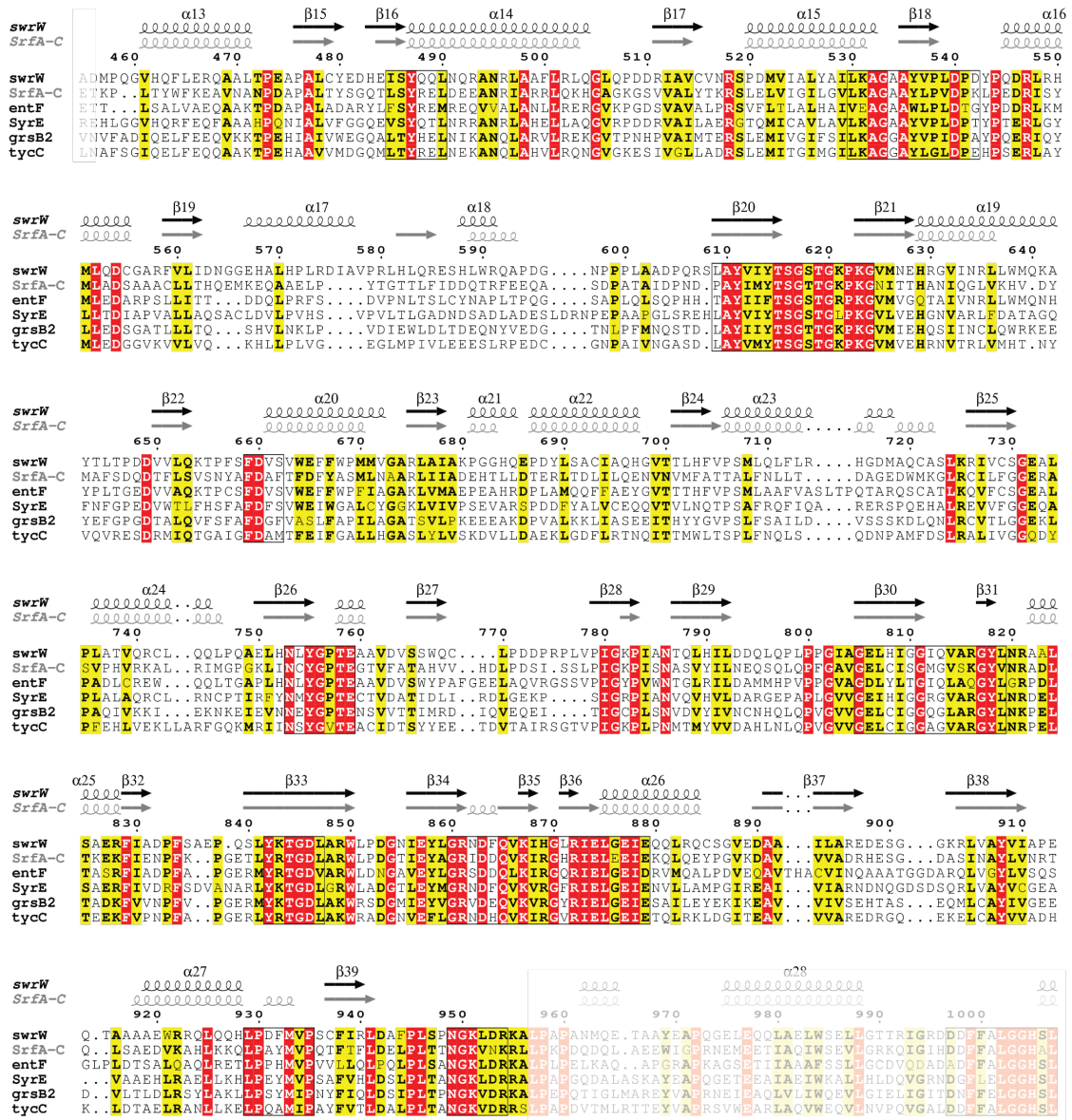
> 16S_rRNA_Asf4

CCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAGCACAGGGGAGCTTGCTCCCTGGGTGACGAGCGGCGGA
CGGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAACCGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGG
GGGACCTTCGGGCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGG
TCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAC TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGC
CTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTCAGCGAGGAGGAAGGGTGGTGAACCTAATACGCTCATC
ACATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGG
GCGTAAAGCGCACGAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGCTCAACCTGGGAAC TGCAATTTGAAACTGGCAAGCTAGAGTCT
CGTAGAGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTTGACGAAGACT
GACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTT
GAGGCGTGGCTTCGGAGCTAACCGGTTAATTCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCA
CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACTACTCTTGACATCCAGAGAACTTCCAGAGATGGATTGGTGC
CTTCGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTATC
CTTTGTTGCCAGCGGTTCCGGCCGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAA ACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC AAGTCATCATGGCCCT
TACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTACGTCGTAGTCC
GGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCG

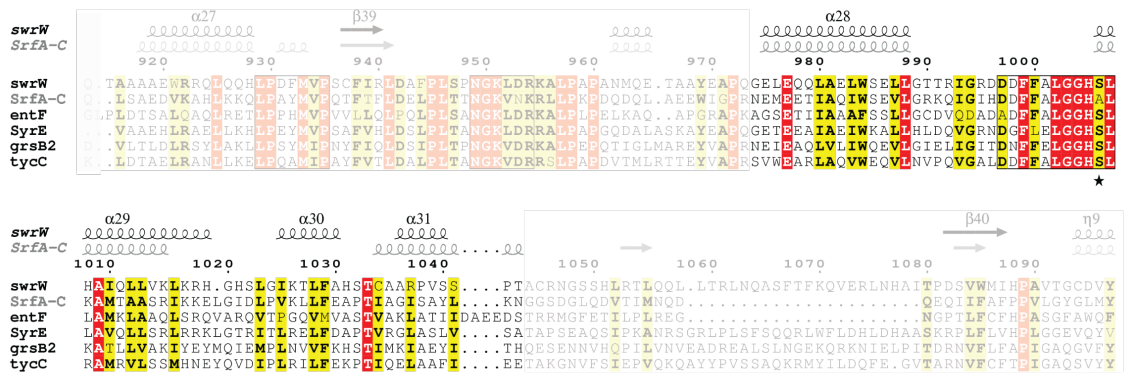
Anexo 1. Secuencias parciales del gen 16S ARNr de las cepas Asf1y2, Asf3 y Asf4.



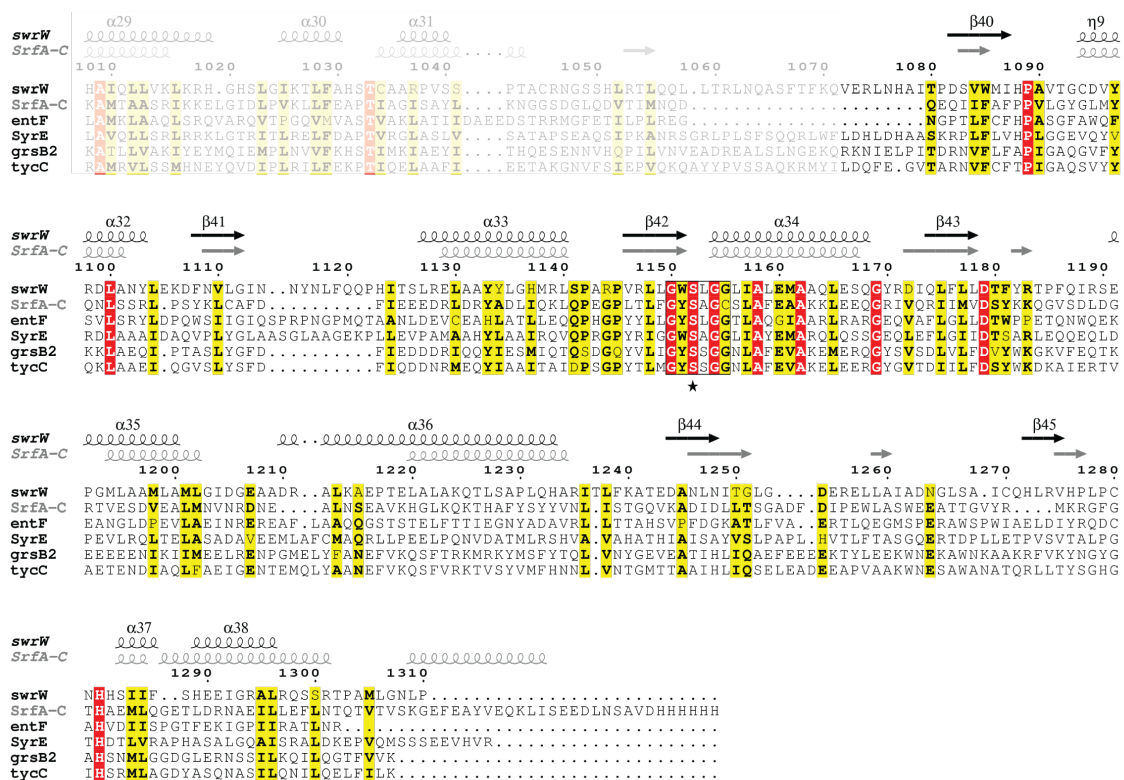
Anexo 2. Alineamiento múltiple de secuencias del dominio C de SwrW con el de otras NRPS.



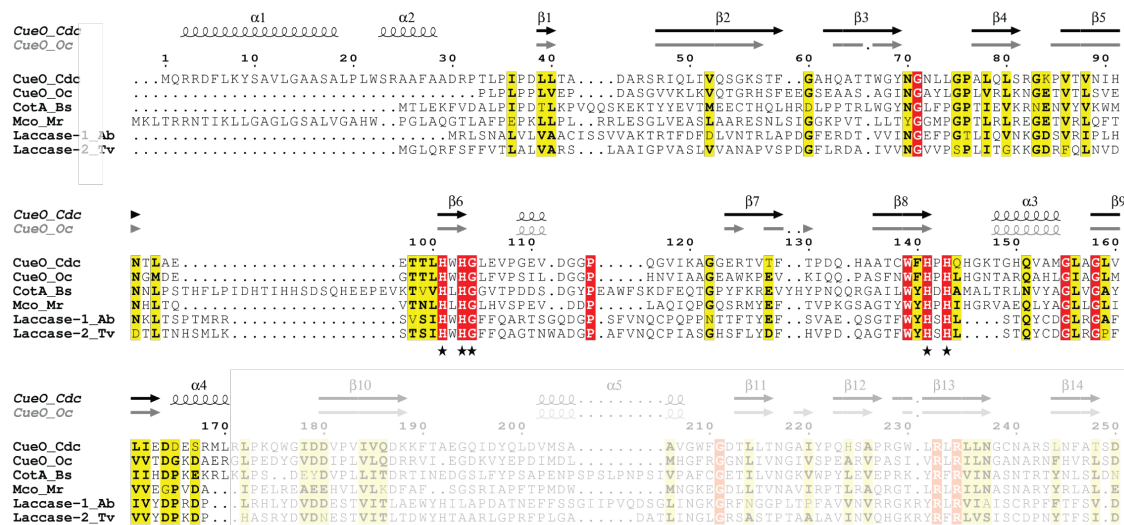
Anexo 3. Alineamiento múltiple de secuencias del dominio A de SwrW con el de otras NRPS.



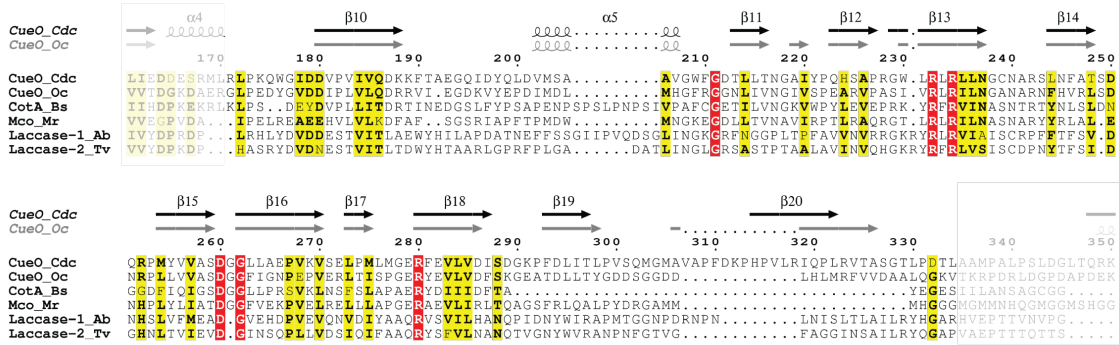
Anexo 4. Alineamiento múltiple de secuencias del dominio T de SwrW con el de otras NRPS



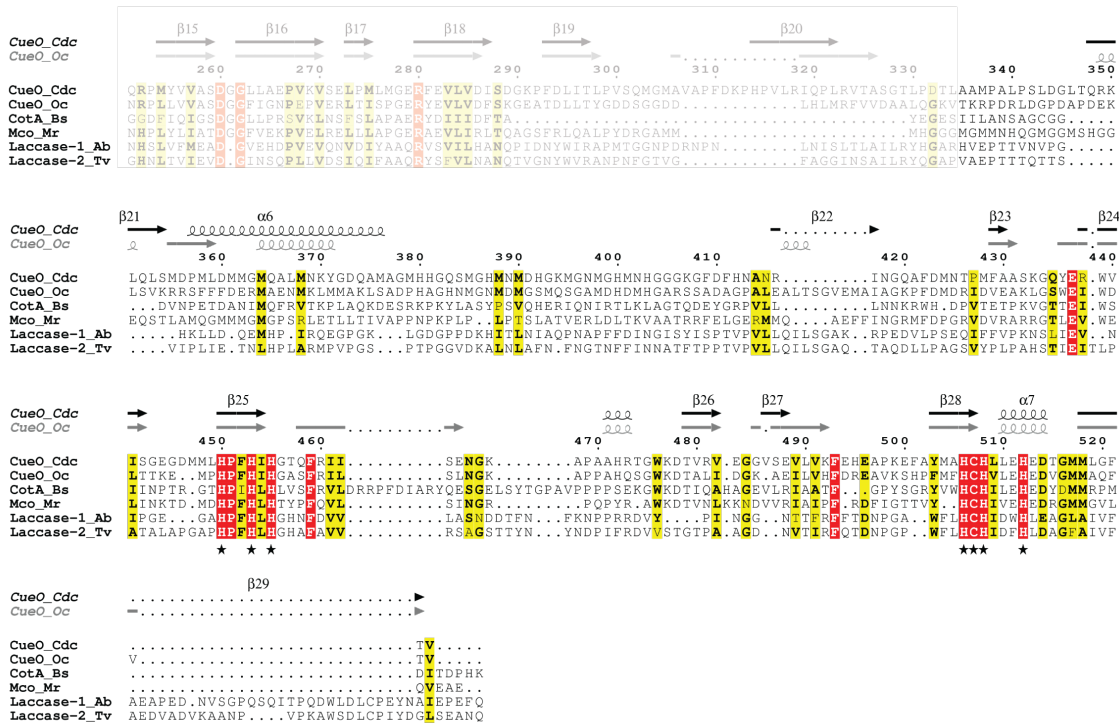
Anexo 5. Alineamiento múltiple de secuencias del dominio TE de SwrW con el de otras NRPS.



Anexo 6. Alineamiento múltiple de secuencias del dominio 1 de CueO-Cdc con el de otras MCO.



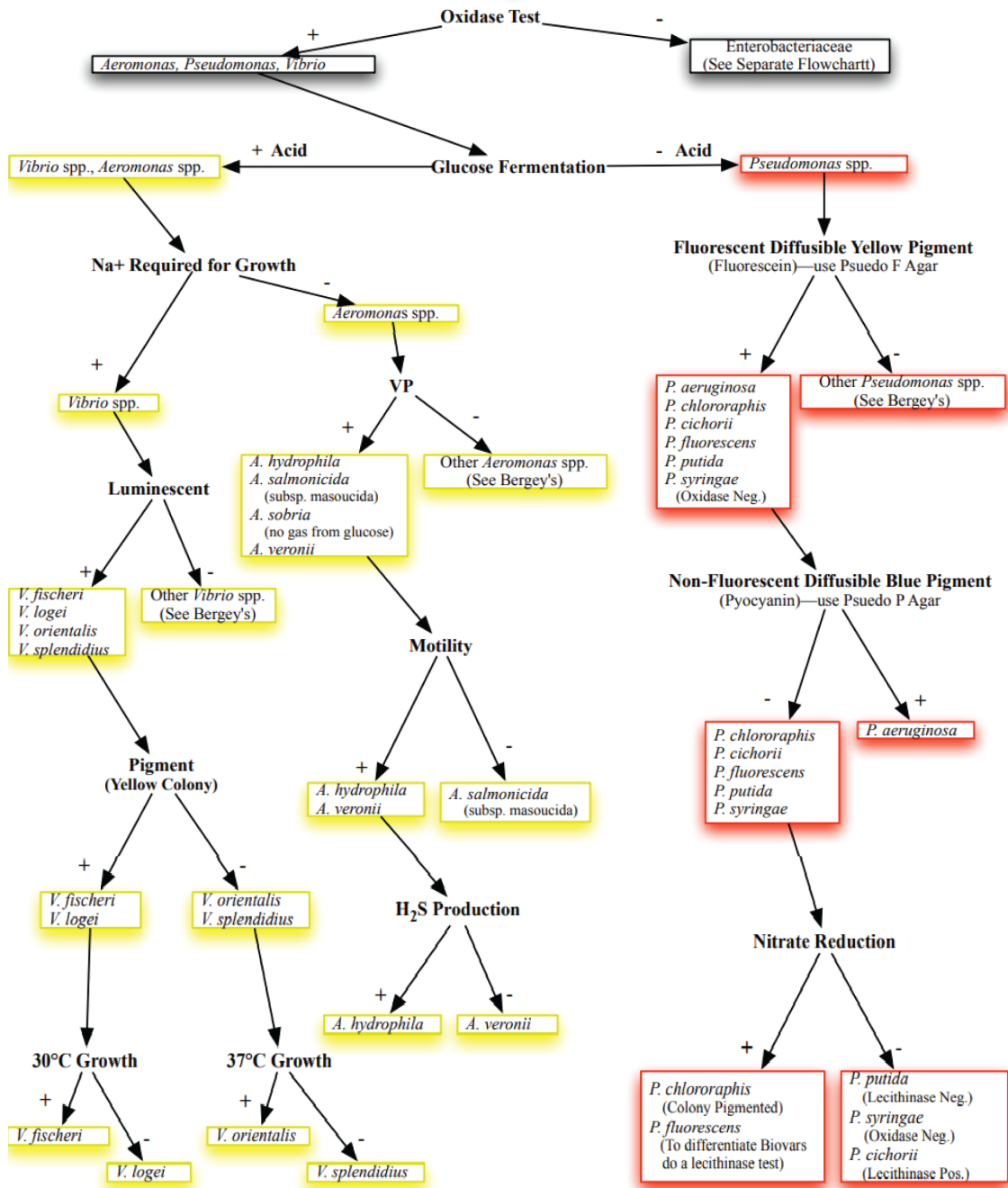
Anexo 7. Alineamiento múltiple de secuencias del dominio 2 de CueO-Cdc con el de otras MCO.



Anexo 8. Alineamiento múltiple de secuencias del dominio 3 de CueO-Cdc con el de otras MCO.

Gram Negative Rods ID Flowchart

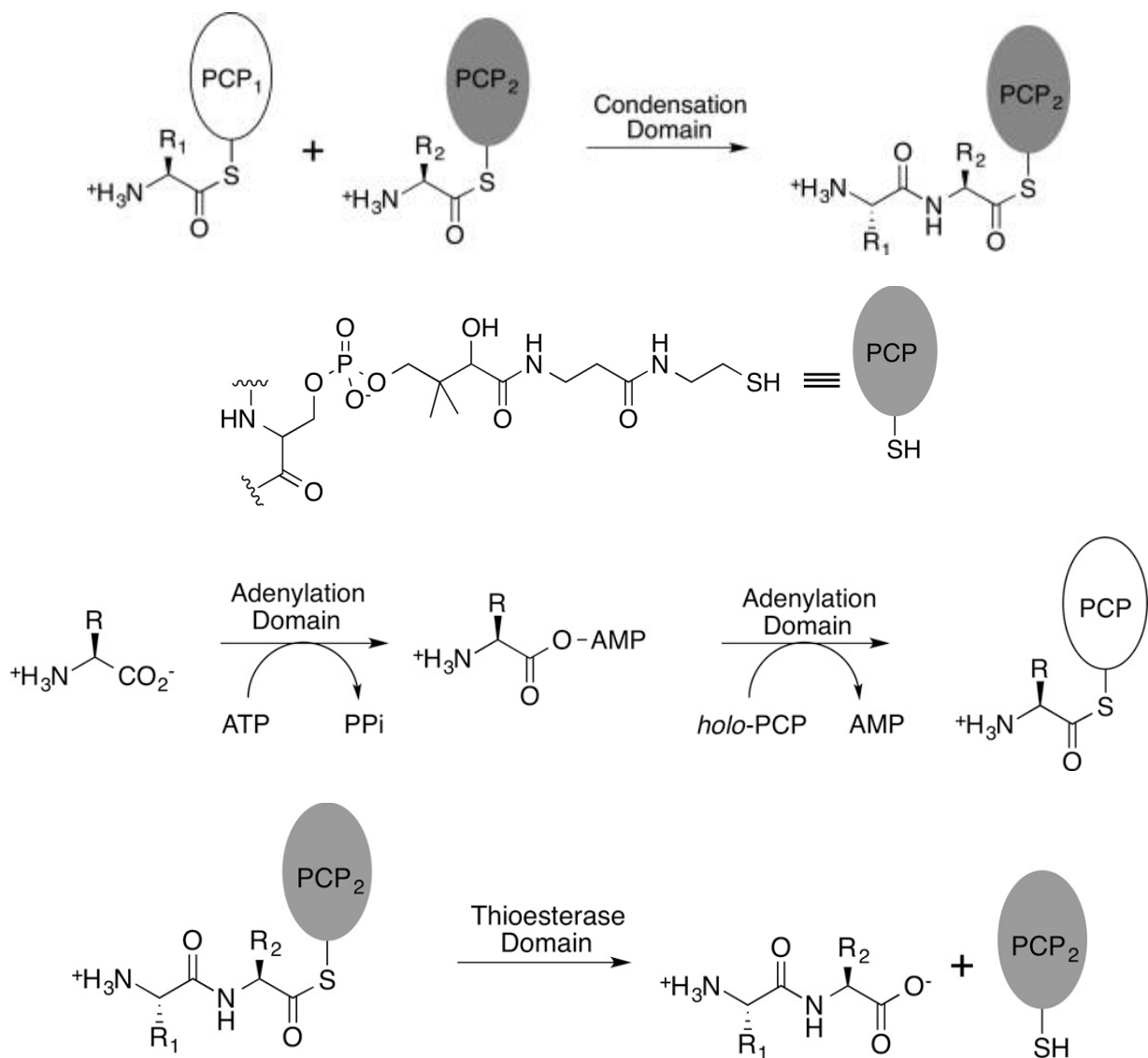
Gram Negative Rods



Anexo 9. Diagrama de flujo para la identificación tradicional de bastones Gram negativos.

Biosurfactante	Cepa	Tensión superficial (mN/m)
Serrawetin W1	<i>S. marcescens</i> ATCC 13380 <i>S. marcescens</i> 274 <i>S. marcescens</i> NS 38	32.2
Serrawetin W2	<i>S. marcescens</i> NS 25	33.9
Serrawetin W3	<i>S. marcescens</i> NS 45	28.8

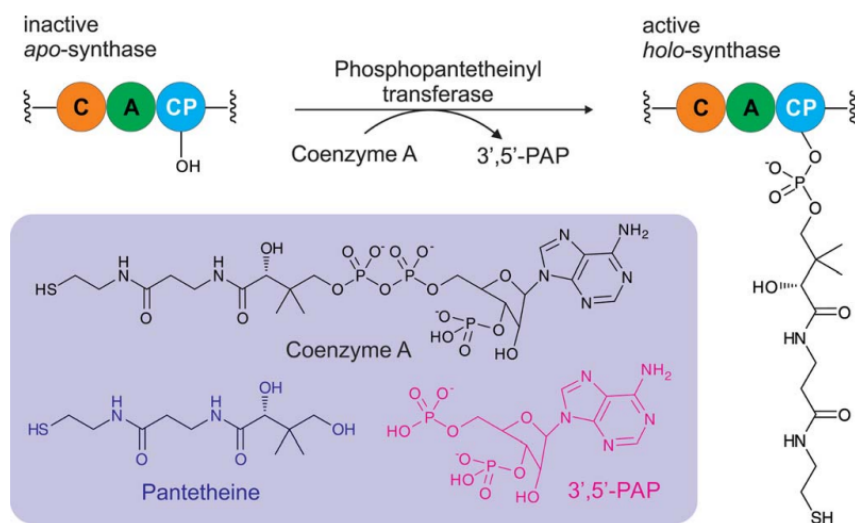
Anexo 10. Tabla de cepas de *Serratia marcescens* que producen las diferentes Serrawetins [49].



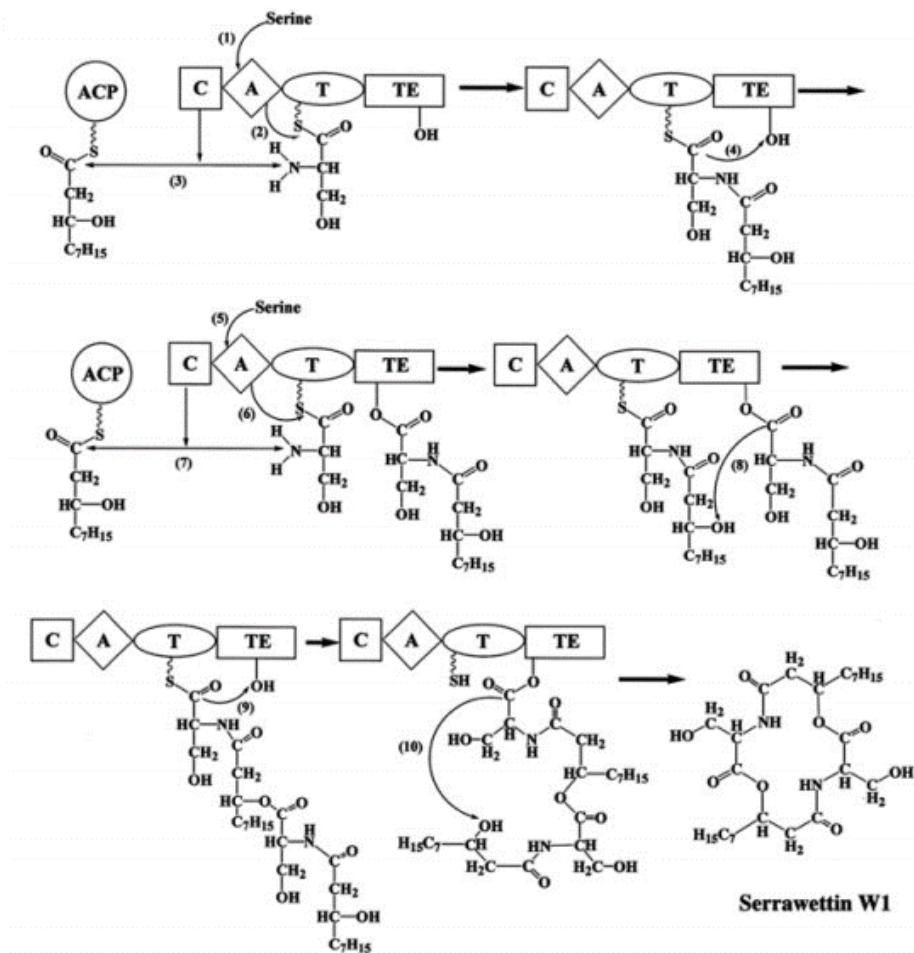
Anexo 11. Reacción catalítica de los dominios que comprenden en una NRPS [19].

domain ^a	core(s) ^b	consensus sequence
adenylation	A1	L(TS)YxEL
	A2 (core 1)	LKAGxAYL(VL)P(LI)D
	A3 (core 2)	LAYxxYTSG(ST)TGxPKG
	A4	FDxS
	A5	NxYGPTE
	A6 (core 3)	GELxIxGxG(VL)ARGYL
	A7 (core 4)	Y(RK)TGDL
	A8 (core 5)	GRxDxQVKIRGxRIELGEIE
	A9	LPxYM(IV)P
	A10	NGK(VL)DR
thiolation condensation	T (core 6)	DxFFxxLGG(HD)S(LI)
	C1	SxAQxR(LM)(WY)xL
	C2	RHExLRTxF
	C3 (His)	MHHxISDG(WV)S
	C4	YxD(FY)AVW
	C5	(IV)GxFVNT(QL)(CA)xR
	C6	(HN)QD(YV)PFE
thioesterase epimerization	TE	G(HY)SxG
	E1	PIQxWF
	E2 (His)	HHxISDG(WV)S
	E3 (race A)	DxLLxAxG
	E4 (race B)	EGHGRE
	E5 (race C)	RTVGWFTxxYP(YV)PFE
	E6	PxxGxGYG
<i>N</i> -methylation	E7 (race D)	FNYLG(QR)
	M1 (SAM)	VL(DE)GxGxG
	M2	NELSxYRYxAV
M3	VEsSxARQxGxLD	

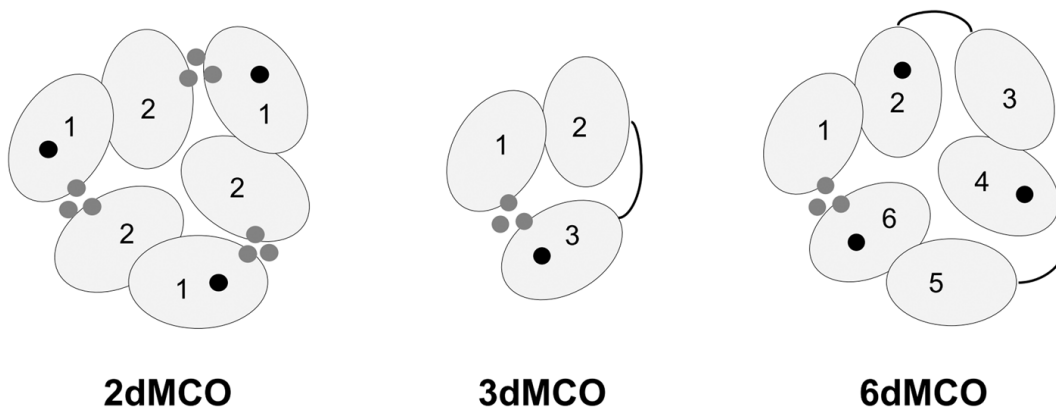
Anexo 12. Motivos centrales altamente conservados en los dominios catalíticos de péptidos sintetasas [50].



Anexo 13. Esquema de reacción general de la fosfopanteteinilación postraduccional por una PPTasa. La PPTasa transfiere el grupo panteteína de la CoA a un residuo de serina conservado en la apo-CP cambiando su estado a holo-CP. Se muestra la configuración típica de los módulos que contiene una NRPS: C (condensación), A (adenilación) y CP (proteína transportadora: ACP o PCP) [51].



Anexo 14. Biosíntesis de la Serrawettin W1 dependiente de la NRPS SwrW [35].



Anexo 15. Clasificación de las MCO de acuerdo al número y distribución de sus dominios [55].