

TÉCNICAS MOLECULARES COMO HERRAMIENTA PARA EL ESTUDIO DE LOS PROCESOS DE BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS DEL PETRÓLEO

Rita Karen Pacheco Cabañas¹, José Armando Macías Cervantes¹, Nuvia Sosa Díaz¹, Armado Hernández Carro¹, Georgina Cortés Ramírez¹, Angel E. Absalón Constantino¹ y Diana V. Cortés-Espinosa^{1*}.

¹Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada.

Carretera Estatal Santa Inés Tecuexcomac-Tepetitla Km 1.5, Tlaxcala, México, C.P. 90700.

dcortes@ipn.mx

RESUMEN

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs, por sus siglas en inglés) forman parte de la fracción pesada del petróleo y son considerados tóxicos, mutagénicos y carcinogénicos afectando la salud de los seres vivos por su acumulación las partículas del suelo, por lo que son contaminantes ambientales prioritarios. La biorremediación es una tecnología eficiente, económica y amigable con el ambiente en comparación con otras tecnologías, la cual es usada para la degradación de PAHs en suelos contaminados, a través de los procesos metabólicos de los microorganismos. Sin embargo, se desconocen los detalles de los mecanismos de degradación utilizados por los microorganismos, por lo que las técnicas moleculares se han convertido en una herramienta importante para el estudio de los procesos de biorremediación. Este artículo resume la aplicación de estas técnicas en el área de Biotecnología Ambiental, tales como la ingeniería genética, metagenómica, transcriptómica y proteómica, las cuales han permitido desarrollar procesos de biorremediación más eficientes.

Palabras clave: biorremediación, hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), metagenómica, transcriptómica, proteómica.

ABSTRACT

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are part of the heavy fraction of crude oil and they are considered toxic, mutagenic and carcinogenic, affecting the health of living beings due to their accumulation of soil particles, therefore they are considered priority environmental pollutants. Bioremediation is an efficient, economical and environmentally friendly technique compared to other technologies, which is used for degradation of PAHs in contaminated soils, through the metabolic processes of microorganisms. However, the details of the degradation mechanisms used for microorganisms are unknown, so molecular techniques have become an important tool for the study of bioremediation processes. This article summarizes the application of these techniques in the area of Environmental Biotechnology, such as genetic engineering, metagenomics, transcriptomics and proteomics, which have developed more efficient bioremediation processes.

Keywords: Bioremediation, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), metagenomic, transcriptomic, proteomic.



INTRODUCCIÓN

La diversidad de sustancias químicas que existe en la actualidad, ha servido para mejorar significativamente el nivel de vida de la población, sin embargo también han generado un importante problema de contaminación por su liberación al medio ambiente causando un efecto sobre la salud humana. Existen en el ambiente diferentes tipos de moléculas xenobióticas como los hidrocarburos del petróleo, pesticidas, bifenilos policlorados, entre otras que contaminan aguas, suelos y sedimentos (Abdel-Shafy y Mansour, 2016).

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (de sus siglas en inglés, PAHs), son moléculas que forman parte de la fracción aromática del petróleo crudo. Están formadas por anillos aromáticos y son catalogadas como altamente tóxicas y persistentes en el suelo debido a que presentan características teratogénicas, mutagénicas y carcinogénicas para los seres vivos (Keith, 2015). Este hecho ha llevado a la búsqueda de técnicas para la remediación de suelos contaminados con PAHs de manera eficientes y económicas. Existen técnicas fisicoquímicas y las biológicas enfocadas a reducir la toxicidad y movilidad. Los métodos convencionales de remediación de suelos, buscan la eliminación, alteración o aislamiento del contaminante, los cuales son caros y solo transfieren el contaminante de una fase a otra. Por otro lado, los métodos biológicos como la biorremediación, han mostrado gran interés, ya que son económicos y amigables con el ambiente, debido a que aprovecha los procesos metabólicos de microorganismos nativos del suelo para la degradación de estos compuestos. Cuando la microbiota nativa es estimulada por la adición de nutrientes y por ajuste de condiciones ambientales, se conoce como bioestimulación. Para acelerar el proceso de biodegradación, se pueden adicionar microorganismos exógenos de forma individual o en consorcio, que han sido previamente seleccionados por sus características degradadoras y acondicionados en el laboratorio para su eficiente degradación (bioaumentación) (Kuppusamy et. al, 2017).

Los beneficios del uso de consorcios para la bioaumentación se han discutido ampliamente, ya que pueden compartir pasos bioquímicos para mineralizar los compuestos tóxicos. Algunos estudios indican que el uso de consorcios para la degradación de PAHs ha sido más eficientes en comparación con cepas individuales (Zafra et. al, 2017). Sin embargo, se desconocen los detalles del proceso de degradación de los PAHs, como las enzimas que intervienen, los microorganismos activos en el proceso, las interacciones que existen entre la microbiota nativa y los consorcios bioaumentados. Es por ello, que las técnicas moleculares se han convertido en una herramienta

importante en la Biotecnología Ambiental, ya que a través de estas podemos realizar seguimiento e identificación de poblaciones microbianas (metagenómica), establecer las rutas metabólicas de degradación (metaproteómica) y análisis de los cambios provocados en la expresión genética por la presencia de los PAHs (transcriptómica). También se pueden realizar mejoramientos genéticos para poder incrementar la capacidad de degradación de los microorganismos para obtener procesos más eficientes (Cortés-Espinosa et. al, 2012). El objetivo de este trabajo es mostrar la importancia de las técnicas moleculares en el área de Biotecnología Ambiental para el desarrollo de procesos de biorremediación de suelos contaminados.

I. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE MICROORGANISMOS AISLADOS DE SUELOS CONTAMINADOS

La identificación y clasificación de microorganismos aislados de sitios contaminados son de suma importancia para la construcción de consorcios microbianos usados como inóculo en la bioaumentación de suelos contaminados, para lo cual se han desarrollado técnicas para identificar taxonómicamente a los microorganismos mediante el análisis de los genes rRNA 16S (bacterias), y para hongos el rRNA 18S, 5.8S y 28S, que cuentan con dos espaciadores: ITS1 e ITS2 (Fig. 1), los cuales tienen una secuencia conservada que brinda información filogenética y taxonómica específica, ya que presentan menor grado de variabilidad (Zafra et al., 2014).

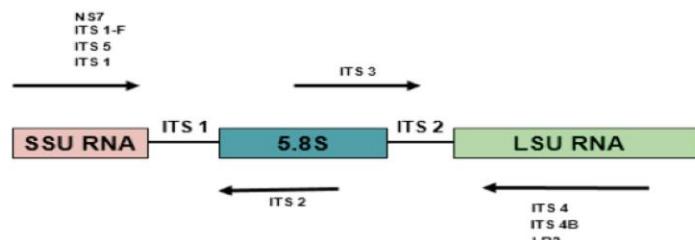


Figura. I. Regiones ITS en el Gen Ribosomal de hongos y cebadores universales para la identificación



A partir de una muestra de suelo se hace la extracción de ADN total y por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), se amplifican las secuencias 16S/18S con cebadores específicos, secuenciados y las secuencias son comparadas con bases de datos como GenBank NCBI para elaborar árboles filogenéticos que muestren el grado de parentesco genético entre varios microorganismos comparados (Fig. 2) (Rodicio y Mendoza, 2004).

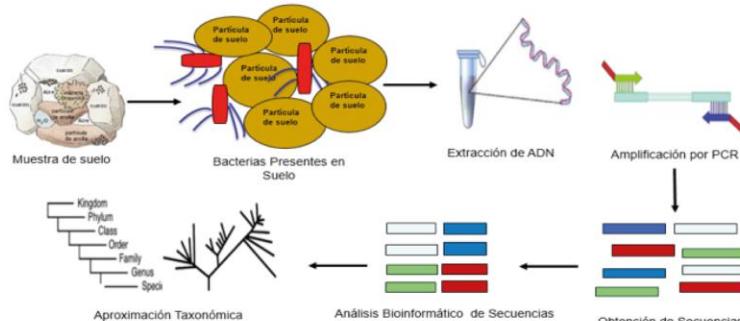


Figura. 2. Protocolo para identificación taxonómica de microorganismos por 16S/18S Ribosomal

En nuestro grupo de trabajo mediante estas técnicas se han identificado microorganismos aislados de suelos contaminados y seleccionados por su capacidad de tolerar y degradar PAHs, como algunas bacterias del género *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Kocuria* y *Delfia* y hongos del género *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* usando los cebadores ITS5 y ITS4B. (Reyes-César et. al, 2014; Zafra et. al, 2014).

2. SEGUIMIENTO DE POBLACIONES MICROBIANAS EN SUELOS CONTAMINADOS

Al trabajar con consorcios microbianos es importante conocer su influencia sobre las comunidades nativas, ya que generan cambios en la estructura de la comunidad, que pueden ser neutros, beneficiosos o incluso perjudiciales en el nuevo hábitat y lo cual depende de factores abióticos, como tipo de suelo, pH, disponibilidad de carbono, concentración de compuestos tóxicos, que tendrán un efecto diferencial sobre la diversidad de poblaciones del suelo en proceso de biorremediación. La microbiología tradicional no ha sido suficiente para el monitoreo de microorganismo en suelos, ya que con este tipo de técnicas solo se logra identificar cerca del 1% de los microorganismos. Sin embargo, los microorganismos no cultivables han demostrado tener un rol importante en los procesos de biorremediación (Desai, et. al, 2010).

2.1. Metagenómica.

La metagenómica es una herramienta molecular que permite obtener información sobre la diversidad microbiana en suelos contaminados y su dinámica durante el proceso de biorremediación, a través del análisis del DNA genómico total de una comunidad microbiana, sin necesidad de cultivarlos (Fig. 3). La metagenómica puede ser dirigida o

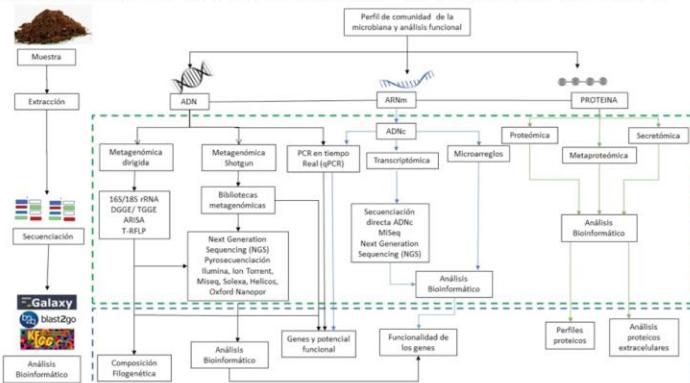


Figura. 3. Herramientas moleculares aplicadas para el análisis de poblaciones microbianas en procesos de biorremediación de suelos contaminados.

shotgun (Techtmann y Hazen, 2016).

En la metagenómica dirigida, se investiga la diversidad de un solo gen para identificar su comportamiento en el ambiente, la biodiversidad filogenética y la abundancia relativa en la muestra de suelo contaminado. Regularmente se realiza el análisis de la secuencia de la subunidad rRNA 16S/18S (bacterias y hongos, respectivamente). A partir de ADN total de una muestra de suelo, los genes amplificados por PCR, son secuenciados usando secuenciación masiva. Las secuencias son analizadas para poder realizar una comparación de los cambios en la diversidad microbiana antes y después de la contaminación.

En el análisis metagenómico shotgun, el DNA total extraído del suelo, es fragmentado para preparar bibliotecas de secuenciación, las cuales se secuencian para terminar el contenido genómico total de la muestra. Esta técnica es una herramienta importante para determinar el potencial funcional de la comunidad microbiana, vinculando un gen funcional con un grupo taxonómico y se pueden llegar a conocer los microorganismos dominantes en el proceso de biorremediación (Fig. 3). En nuestro grupo de trabajo hemos realizado análisis metagenómico taxonómico y funcional para analizar los efectos producidos entre la microbiota nativa y un consorcio microbiano mixto durante un proceso de biorremediación de un suelo contaminado con una mezcla de PAHs, donde el proceso de bioaumentación/bioestimulación produjeron cambios en la diversidad microbiana. La metagenómica funcional mostró cambios en la abundancia de genes involucrados en la degradación de PAHs y las vías que favorecen la formación de

compuestos intermediarios tóxicos se redujeron significativamente (Zafra et. al, 2016).

2.2. Técnicas de código de barras genotípica de comunidades microbianas

Además de los enfoques basados en secuenciación para análisis de comunidades microbianas, se han desarrollado otras técnicas genotípicas conocidas como de código de barras de DNA basadas en PCR, como: electroforesis en gel con gradiente de desnaturación (DGGE)/con gradiente de temperatura (TGGE), análisis automatizado del espaciador intergénico ribosomal (ARISA), polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción terminal (T-RFLP), entre otros. Las técnicas de DGGE/TGGE y ARISA están basadas en el análisis de los productos amplificados por PCR de las regiones del espaciador intergénico de los genes 16S y 18S rRNA o algún gen funcional, a partir de DNA extraído de una muestra de suelo. En el DGGE/TGGE, los fragmentos se separan en geles de poliacrilamida que tienen gradientes desnaturizantes basados en químicos o temperatura (Chikere, 2013).

En ARISA, para hongos se utiliza, el espaciador interno transrito (ITS1-5.8S-ITS2) y en bacterias, la región intergénica del rDNA localizada entre los genes 16S y 23S rRNA. La amplificación se realiza por PCR usando cebadores marcados con fluorescencia, los fragmentos son separados en un gel, el resultado es un patrón complejo de bandas que proporcionan un perfil específico de la comunidad (Desai et. al, 2010).

La técnica T-RFLP permite determinar cualitativamente la diversidad de especies presentes en una comunidad microbiana, los fragmentos de ADN amplificados por PCR con cebadores marcados con fluorescencia, son digeridos con enzimas de restricción y separados en un gel y visualizados por medio de la excitación del compuesto fluorescente, correlacionando la intensidad de la fluorescencia con la abundancia de las especies (Han et. al, 2017).

3. TÉCNICAS MOLECULARES PARA ANÁLISIS FUNCIONAL DE POBLACIONES MICROBIANAS EN PROCESOS DE BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS

La metatranscriptómica y metaproteómica se está aplicando cada vez más a los sistemas ambientales (Fig. 3). El estudio del RNA y la expresión de proteínas proporcionan información clave sobre las funciones metabólicas de una comunidad

microbiana durante un proceso de biorremediación en el momento del muestreo. Los análisis funcionales de comunidades microbianas se utilizan recientemente para predecir las vías de degradación.

3.1. Metatranscriptómica

Con esta técnica se estudian los perfiles de transcripción de mRNA. A partir de una muestra ambiental se extrae el mRNA y se sintetiza en cDNA, el cual es hibridado con microarreglos o secuenciado de manera similar a la metagenómica (fig. 3). Proporcionando un inventario de los niveles de expresión de genes activos en una muestra, permitiendo distinguir, los miembros activos y pasivos de una comunidad microbiana y sus vías metabólicas. La comparación de metatranscriptómes derivados de muestras sometidas a diferentes cultivos o condiciones ambientales puede proporcionar correlaciones entre la expresión génica y variables ambientales (Desai et. al, 2010).

3.2. Microarreglos

La técnica está basada en la hibridación de las moléculas de DNA blanco (de una sola célula o una comunidad microbiana) con la sonda en una matriz para medir el cambio en las señales de fluorescencia (la sonda o cDNA blanco se puede marcar con varios colorantes fluorescentes), si la secuencias de interés se encuentran en la muestra se producirá una fluorescencia (Singh y Nagaraj, 2006).

3.3 PCR en tiempo real (qPCR)

Esta técnica es una herramienta rápida, para la estimación de la dinámica de las comunidades microbianas o monitoreo de sus actividades catabólicas durante un proceso de biorremediación. Está basada en la detección de una molécula cuya fluorescencia aumenta a medida que el producto de PCR se acumula durante cada ciclo de amplificación. La fluorescencia se basa en sondas de hibridación (TaqMan) o utiliza colores (SYBR Green) (Cocci et. al, 2018). .

3.4. Proteómica, secretómica y metaproteómica.

La proteómica se define como el conjunto total de proteínas presentes en una unidad biológica, en cualquier etapa de desarrollo y bajo condiciones específicas. La proteómica no implica la secuenciación de ácidos nucleicos, sino más bien el análisis global de las enzimas catabólicas implicadas en la biodegradación de una comunidad microbiana durante el proceso de biodegradación.

En el área de Biotecnología Ambiental, la proteómica, se usa para el análisis de proteínas totales de un microorganismo individual, mientras que la secretómica se basa en el estudio de las proteínas extracelulares de un organismo y que posiblemente están involucradas en las primeras etapas de oxidación de los PAHs y la metaproteómica es la más utilizada para determinar la funcionalidad de las comunidades microbianas en los procesos de biorremediación de suelos. La cual, ha tomado un interés particular debido a que se pueden caracterizar todas las proteínas expresadas en un tiempo determinado dentro de un ecosistema y juegan un papel clave en la exploración de la funcionalidad microbiana para discernir la contribución enzimática de cada uno de los microorganismos que forman el consorcio. Estos resultados junto con los análisis transcriptómicos permite el establecimiento de rutas de degradación en suelos contaminados (Siggins et. al, 2012).

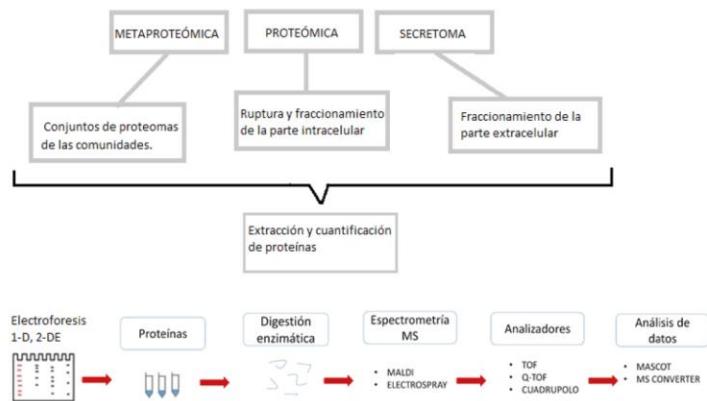


Figura 4. Esquema de la extracción y preparación de la muestra para un ensayo de metaproteómica, proteómica y secretoma.

Para llevar a cabo un análisis proteómico de uno o varios organismos (Fig. 4), se realiza una extracción y purificación de las proteínas. Posteriormente, las proteínas son sometidas a una digestión tríptica para la obtención de péptidos; y por último se hace el uso de la espectrometría de masas, mediante el cual se ioniza la muestra y se separan los péptidos de acuerdo a su relación masa carga m/z.

4. INGENIERÍA GENÉTICA PARA EL MEJORAMIENTO DE MICROORGANISMOS DEGRADADORES DE PHAs

Para poder incrementar la capacidad de oxidación de los PAHs, la ingeniería genética toma relevancia en el área de Biotecnología Ambiental, ya que se pueden hacer modificaciones genéticas para aumentar la actividad enzimática por la sobreexpresión de genes que codifican para

una enzima específica en la degradación de PAHs (expresión homóloga), la inserción de genes que codifican para enzimas claves que participan en los procesos de biodegradación de un microorganismo en otro que tenga capacidad de crecer en sitios contaminados (expresión heteróloga) o dirigir las rutas de degradación para poder mineralizar los PAHs de manera eficiente sin formar intermediarios más tóxicos por el silenciamiento de genes que codifican para producción de enzimas no deseadas, generando microorganismos modificados genéticamente que son más eficientes (Fig. 5).

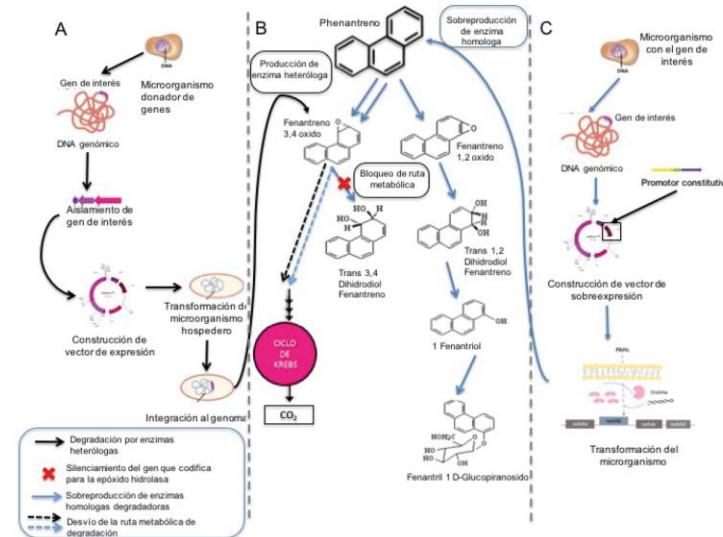


Figura 5. Aplicación de la ingeniería genética para el mejoramiento de microorganismos degradadores de compuestos xenobióticos. A. Expresión heteróloga (Inserción de genes que codifican para la producción de enzimas de interés en un organismo que no expresa este tipo de genes para ahora producir enzimas heterólogas) B. Ingeniería metabólica (Silenciamiento de genes que codifican para enzimas para desvío de rutas de degradación para evitar la formación de productos indeseados) C. Expresión homóloga (sobreexpresión de un gen que codifica para la producción de enzimas degradadoras para incrementar su producción y mejorar el proceso de degradación)

Existen reportes de la expresión homóloga de versátil peroxidasa MnP2 en *Pleurotus ostreatus* para incrementar su capacidad de degradación de PAHs, demostrando una mayor capacidad de degradación (Tsukihara et. al, 2006). En nuestro grupo de trabajo hemos obtenido cepas transformantes de hongos filamentosos *A. niger* y *T. spectabilis*, que producen enzimas heterólogas como manganeso, lignina y versátil peroxidasa. (Cortés-Espinosa et al, 2012).

CONCLUSIONES

Como se expuso en este artículo, las técnicas moleculares se han convertido en una herramienta muy importante en la Biotecnología Ambiental, ya que han permitido profundizar en el estudio de procesos de biorremediación de suelos contaminados con PAHs, conociendo más a detalle los procesos metabólicos, las enzimas involucradas en las rutas

metabólicas de degradación. Las técnicas moleculares metaómicas nos permiten conocer la dinámica y diversidad de poblaciones microbianas hasta el análisis funcional para discernir los cambios a nivel genético de los microorganismos por las condiciones adversas de contaminación. El perfil de la dinámica de la comunidad microbiana durante el proceso de biorremediación ha permitido identificar cepas microbianas o genes claves que son cruciales para un exitoso proceso de biorremediación *in situ* o *ex situ*.

Agradecimientos: Al Instituto Politécnico Nacional por proyecto SIP20180442. Conacyt por apoyo de becas (No. Becarios: 598787, 588791, 486354,613287)

REFERENCIAS

- Abdel-Shafy, H. I. y Mansour, M. S. M. (2016) "A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation", Egyptian Journal of Petroleum. Egyptian Petroleum Research Institute, 25(1), pp. 107–123.
- Chikere, C. B. (2013) "Application of Molecular Microbiology Techniques in Bioremediation of Hydrocarbons and Other Pollutants", British Biotechnology Journal, 3(1), pp. 90–115.
- Cocci, P. et al. (2018) "Investigating the potential impact of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) on gene biomarker expression and global DNA methylation in loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) from the Adriatic Sea", Science of the Total Environment, 619–620, pp. 49–57.
- Cortés-Espinosa, D. V. et al. (2012) "Heterologous expression of manganese peroxidase in *Aspergillus niger* and its effect on phenanthrene removal from soil". J Mol Microbiol Biotechnol 2011;21:120–129.
- Desai, C., Pathak, H. y Madamwar, D. (2010) "Advances in molecular and '-omics' technologies to gauge microbial communities and bioremediation at xenobiotic/anthropogen contaminated sites", Bioresource Technology. Elsevier Ltd, 101(6), pp. 1558–1569.
- Han, X. et al. (2017) "Effects of different agricultural wastes on the dissipation of PAHs and the PAH-degrading genes in a PAH-contaminated soil", Chemosphere. Elsevier Ltd, 172, pp. 286–293.
- Keith, L. H. (2015) "The Source of U.S. EPA's Sixteen PAH Priority Pollutants", Polycyclic Aromatic Compounds, 35(2–4), pp. 147–160.
- Kuppusamy, S. et al. (2017) "Remediation approaches for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contaminated soils: Technological constraints, emerging trends and future directions", Chemosphere. Elsevier Ltd, 168, pp. 944–968.
- Reyes-César, A. et al. (2014) "Biodegradation of a mixture of PAHs by non-ligninolytic fungal strains isolated from crude oil-contaminated soil".
- Rodicio, M. D. R. y Mendoza, M. D. C. (2004) "Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: Fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica", Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, pp. 238–245.
- Siggins, A., Gunnigle, E. y Abram, F. (2012) "Exploring mixed microbial community functioning: Recent advances in metaproteomics", FEMS Microbiology Ecology, pp. 265–280.
- Singh, O. V. y Nagaraj, N. S. (2006) "Transcriptomics, proteomics and interactomics: Unique approaches to track the insights of bioremediation", Briefings in Functional Genomics and Proteomics, 4(4), pp. 355–362.
- Techtmann, S. M. y Hazen, T. C. (2016) "Metagenomic applications in environmental monitoring and bioremediation", Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. Springer Berlin Heidelberg, 43(10), pp. 1345–1354.
- Tsukihara, T. et al. (2006) "Molecular breeding of white rot fungus *Pleurotus ostreatus* by homologous expression of its versatile peroxidase MnP2", Applied Microbiology and Biotechnology, 71(1), pp. 114–120.
- Zafra, G. et al. (2014) "Isolation and Selection of a Highly Tolerant Microbial Consortium with Potential for PAH Biodegradation from Heavy Crude Oil-Contaminated Soils".
- Zafra, G. et al. (2016) "Comparative metagenomic analysis of PAH degradation in soil by a mixed microbial consortium", Journal of Hazardous Materials, 318, pp. 702–710.
- Zafra, G. et al. (2017) "Construction of PAH-degrading mixed microbial consortia by induced selection in soil", Chemosphere, 172, pp. 120–126.

