



SUBSECRETARÍA DE EDUCACIÓN SUPERIOR  
DIRECCIÓN GENERAL DE EDUCACIÓN SUPERIOR  
TECNOLÓGICA  
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA  
GUTIÉRREZ, CHIAPAS.

# **INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ**

## **RESIDENCIA PROFESIONAL INGENIERÍA BIOQUÍMICA**

### **TEMA:**

**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE  
*Acinetobacter Calcoaceticus* OTEC 02.**

### **QUE PRESENTA:**

**YUDITH ALEJANDRA RUIZ GÓMEZ**

**NUMERO DE CONTROL: 10270447**

### **ASESOR:**

**DR. REINER RINCON ROSALES**

**TUXTLA GUTIÉRREZ, CHIAPAS DICIEMBRE, 2014**

## INDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>4</b>
<b>II. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>5</b>
<b>III. OBJETIVOS</b> .....	<b>6</b>
3.1 Objetivo general.....	6
3.2 Objetivos específicos.....	6
<b>IV. CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DONDE REALIZÓ EL PROYECTO</b> .....	<b>7</b>
<b>V. PROBLEMAS A RESOLVER</b> .....	<b>8</b>
<b>VI. ALCANCES Y LIMITACIONES</b> .....	<b>9</b>
<b>VII. FUNDAMENTO TEORICO</b> .....	<b>10</b>
7. 1 Contaminación ambiental .....	10
7.2 Características de los contaminantes orgánicos persistentes, POP. ....	11
7.3 Compuestos xenobióticos y grado de toxicidad. ....	13
7.4 Capacidad de los microorganismos para degradar compuestos xenobióticos. .....	14
7.4.1 Rutas catabólicas para hidrocarburos naturales y xenobióticos. ....	17
7.5 Estudios de la Biodegradación de compuestos fenólicos a partir de <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> .....	20
7.6 marcadores moleculares.....	21
7.6.1 Marcador molecular basado en PCR. ....	22
7.7 Identificación Taxonómica.....	23
7.8 Identificación filogenética.....	25
<b>VIII. DESCRIPCION DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS</b> .....	<b>26</b>
8.1 Antecedentes del microorganismo .....	26
8.2 Resiembra PyCa ++ .....	26
8.3 Estudio microscópico .....	26
8.4 Extracción de ADN .....	27
8.5 Aplicación de las herramientas moleculares para amplificar los genes de <i>Acinetobacter Calcoaceticus</i> OTEC 02.....	27
8.5.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	27
8.5.2 Huellas genómicas ERIC. ....	28
8.5.3 Determinación de enzimas de restricción (Técnica de ARDRA).....	29

8.6 Evaluación de la cantidad y calidad de las técnicas aplicadas.....	29
8.7 Extracción de plásmidos.....	29
<b>IX. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....</b>	<b>31</b>
9.1 EXTRACCIONDE ADN Y AMPLIFICACION DE MARCADORES.....	31
9.1.1 Extracción de ADN.....	31
9.1.2 Determinación de PCR 16-S.....	32
9.1.4 Determinación ARDRA (Enzimas de restricción).....	33
9.1.5 Determinación de huellas genómicas. Técnica de Eric.....	34
9.2 Extracción de plásmidos.....	35
9.3 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA.....	36
9.3.1 Morfología de la <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> OTEC 02.....	36
9.4 Análisis filogenético de la <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> OTEC 02. a partir del gen 16S ADNr.....	38
9.5 Características Taxonómicas de la <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> OTEC 02.....	39
<b>X. CONCLUSIONES.....</b>	<b>40</b>
<b>XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>41</b>
<b>XII. Anexos.....</b>	<b>43</b>

## I. INTRODUCCIÓN

Durante mucho tiempo el uso ilegal de compuestos xenobióticos ha ocasionado diversos factores que amenazan la seguridad de nuestro planeta. Hoy en día nos enfrentamos a una enorme crisis de deterioro ambiental, es por ello que se buscan nuevas fuentes de remediación biológicas que cumplan con los requisitos necesarios para biodegradar compuestos altamente tóxicos que persisten en el ambiente.

Esta investigación está encaminada al área científica y tecnológica, cuya finalidad fue aportar más información sobre la cepa bacteriana *Acinetobacter calcoaceticus* OTEC 02. En estudios anteriores, este microorganismo demostró capacidad biodegradar compuestos clorados, tales como bifenilos, compuestos aromáticos y DDT. Lo anterior ha generado el interés por realizar estudios a nivel de biología molecular para conocer más características sobre la cepa OTEC 02. Por tal motivo se procedió a estudiar las características fenotípicas y genotípicas a través de estudios de marcadores moleculares y genes plasmídicos, y también a corroborar el estatus taxonómico de la bacteria a través de estudios genómicos y su genoma completo. La caracterización de dicha bacteria propiciara a un mejor manejo para su empleo en programas de biorremediación de ecosistemas contaminados con compuestos xenobioticos.

## II. JUSTIFICACIÓN

Una cantidad importante de información se han generado en relación al estudio y tratamiento de compuestos xenobióticos tales como diclorodifeniltricloroetano (DDT), bifenilos policlorados (BPC), compuestos aromáticos entre otros. La contaminación de estos compuestos persistentes ocasionados por el hombre se ha convertido en el estudio principales de muchas investigaciones, el uso de numerosos microorganismos desempeñan un papel importante en la descomposición y mineralización de estos contaminantes.

Se han realizado numerosas pruebas de campo y experimentos de laboratorio y se han identificado muchos compuestos orgánicos nocivos que son lentamente biodegradables.

Actualmente el estudio de nuevos microorganismos que presentan características capaces de degradar compuestos altamente tóxicos han tomado gran relevancia a nivel mundial. Debido al efecto que causan sobre la estructura biológica y sobre todo porque algunos de ellos actúan como hormonas (xenohormonas).

Los daños ocasionados por los compuestos xenobióticos son de gran relevancia para la comunidad científica y cada vez se busca nuevas alternativas para combatir estos compuestos químicos a través de remediaciones biológicas.

La cepa *Acinetobacter calcoaceticus* OTEC 02 presenta características biológicas para su empleo en programas de biorremediación. La caracterización de la cepa OTEC 02 propiciara a un mejor manejo para su empleo en programas de biorremediación de ecosistemas que se encuentren contaminados por compuestos xenobióticos.

### III. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo general

Caracterizar fenotípica y genotípica la cepa *Acinetobacter Calcoaceticus* OTEC 02 y determinar su potencial para biodegradar compuestos xenobióticos.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Estudiar las características fenotípicas de la cepa *Acinetobacter Calcoaceticus* OTEC 02 usando tinciones especiales y estudios microscópicos.
- Caracterizar genotípicamente la cepa *Acinetobacter Calcoaceticus* OTEC 02, a través del estudio de genes cromosomales y plasmídicos.
- Revisar el estatus taxonómico y filogenético de la cepa *Acinetobacter Calcoaceticus* OTEC 02, con base en el gen 16S ADNr.

#### IV. CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DONDE REALIZÓ EL PROYECTO

Las actividades realizadas en el presente trabajo se llevaron a cabo en el laboratorio del Polo Tecnológico Nacional para el desarrollo de investigación y pruebas analíticas en Biocombustibles bajo la dirección del Dr. Reiner Rincón Rosales, el laboratorio se encuentra ubicado en el Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez de la ciudad de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.

Este laboratorio pertenece al área de Ingeniería Química y Bioquímica, el cual cuenta con los siguientes equipos: Bio Rad Mini-sub<sup>®</sup> cell GT(Electroforesis Power Supply-EPS 301, Micropipetas Transferpette<sup>®</sup> S (1000  $\mu$ L, 100  $\mu$ L y 10  $\mu$ L), Puntas Labcon( pipet tips) for pipetman <sup>®</sup> 10  $\mu$ L, cámara de electroforesis UVP entre otros.



Figura 1. Laboratorio de ingeniería química y bioquímica

## V. PROBLEMAS A RESOLVER.

Este trabajo aporta información más reciente sobre las determinaciones genómicas y fenotípicas de la bacteria *Acinetobacter calcoaceticus* OTEC 02, dicha bacteria fue obtenida a partir de suelos contaminados con hidrocarburos en la ciudad de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas y posteriormente fue aislada, debido a su capacidad para crecer con fenol como única fuente de carbono.

Los resultados obtenidos durante la investigación permitieron estudiar el rasgo filogenético de dicha Cepa al igual que su estatus taxonómico para reafirmar el potencial y capacidad que presenta este microorganismo de degradar eficazmente contaminantes con estructura o propiedades química poco comunes en la naturaleza y que por lo consiguiente son difíciles de tratar.

Así mismo se logro evaluar satisfactoriamente la cantidad y calidad de ADN genómico presentes en la cepa OTEC 02, a través de las diferentes técnicas empleadas de biología molecular. Por lo tanto la caracterización de la *Acinetobacter calcoaceticus* OTEC 02 es de gran importancia para posteriormente estudiar el potencial enzimático con la que podría trabajar este microorganismo para biodegradar compuestos tóxicos en el medio ambiente.



## VI. ALCANCES Y LIMITACIONES

### **Alcances**

Se logro amplificar los genes cromosomales de la *Acinetobacter calcoaceticus* OTEC 02, utilizando las diferentes herramientas moleculares tales como, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), huellas genómicas por medio de ERIC-PCR y un análisis de restricción de ADN ribosomal (ARDRA). Así como también se nos permitió reafirmar las características fenotípicas de la cepa OTEC 02 que nos describieron de una manera más detalla las propiedades únicas de dicho microorganismo.

### **Limitaciones**

El genoma de la bacteria de la cepa OTEC 02 fue realizado en el laboratorio MACROGEN (Seúl, Corea) ya que el laboratorio del ITTG no cuenta con los equipos necesarios para realizar dicha prueba.

Por el momento no hay resultados precisos del potencial de biodegradación de este microorganismo debido a que aun se encuentra en estudio.

## VII. FUNDAMENTO TEORICO

### 7. 1 Contaminación ambiental

Hoy en día nos enfrentamos a numerosas crisis ambientales ocasionadas por la gran demanda de la población. La aceleración del crecimiento tecnológico de las sociedades industriales y agroindustriales y la degradación ambiental ponen en estado de riesgo los procesos naturales que sostienen la vida en la tierra y en los ecosistemas.

El suelo es un recurso vivo y no-renovable, es vital para la producción de alimentos. Entre los múltiples elementos y compuestos que conforman un suelo natural se encuentran sustancias que por sus características pudieran considerarse contaminantes.

Un suelo contaminado es una porción delimitada de terreno subterráneo, donde sus cualidades originales han sido modificadas por la acción humana, produciendo (Schenquer, Mongielio & Acosta, 2004):

- Contaminación física con variaciones en parámetros como temperatura y radiactividad.
- Contaminación biológica, al inducir la proliferación de especies o cepas patógenas o ajenas a los microorganismos presentes en el suelo de forma natural.
- Contaminación química por adición de elementos o compuestos en concentraciones que alteren la composición originaria del suelo, este tipo de contaminación es la predominante.

Los contaminantes químicos más característicos y peligrosos son:

- Metales pesados: mucho de ellos son elementos esenciales para la vegetación y la fauna. El riesgo potencial que su presencia provoca se produce cuando se acumulan en grandes cantidades en el suelo.

- Contaminantes inorgánicos: los contaminantes inorgánicos presentes en el suelo de forma natural están en concentraciones reguladas por los ciclos biológicos asociados a cada suelo. La sobresaturación de alguno de ellos hace que se alcancen concentraciones consideradas como contaminantes, alterando los ciclos de regulación.
- Contaminantes orgánicos: los contaminantes orgánicos constituyen un grupo formado por un elevadísimo número de sustancias, con gran diversidad estructural y efectos diferentes en el medio, siendo mucha de ellas altamente tóxicas. Pueden destacarse los compuestos aromáticos, hidrocarburos policíclicos, hidrocarburos clorados, pesticidas, etc. (Schenquer et al., 2004).

## **7.2 Características de los contaminantes orgánicos persistentes, POP.**

Los contaminantes orgánicos persistentes poseen características de toxicidad capaces de ocasionar efectos adversos a la salud y al ambiente.

Estas sustancias son compuestos orgánicos resistentes a la degradación biológica, fotolítica o química. Con frecuencia son halogenados y se caracterizan porque poseen baja solubilidad en agua y alta en lípidos lo que favorece la bioacumulación en tejidos grasos. También son semivolátiles por lo que pueden ser transportados por el aire a grandes distancias antes de que se depositen en los suelos o en las aguas (Trujillo, 2006).

Existen una gran variedad de compuestos POP, tanto naturales como sintéticos, que son notorios por sus características de persistencia y bioacumulabilidad. Entre ellos se encuentran insecticidas organoclorados de primera generación como el dieldrín, el DDT y algunos productos y subproductos industriales como los bifenilos policlorados, la dioxina y los furanos (Trujillo, 2006). En 1962 se hizo pública la presencia de los DDT (Diclorodifeniltricloroetano) en calamares del fondo marino, en pingüinos de la Antártida y en tejidos grasos del hombre. En aves acuáticas,

los efectos del DDT se asociaron con infertilidad y en el caso del hombre se asoció con el incremento de la aparición de cánceres.

Algunos organoclorados son considerados entre los compuestos más resistentes a la degradación, los bifenilos policlorados (BPC), por ejemplo, pueden resistir por periodos de años y se puede bioconcentrar unas 70,000 veces (Ramírez, 2006).

Los BPC, son sustancias orgánicas sintéticas pertenecientes a los hidrocarburos clorados. Presentan dos anillos bencénicos unidos mediante un enlace sencillo formando el bifenil y, se obtienen químicamente al sustituir uno o más átomos de hidrógeno por átomos de cloro en la molécula bifenil, mediante la adición de anhídrido de cloro usando cloruro férrico como catalizador. La molécula bifenil ya clorada, se denomina bifenil clorado y la mezcla de ellos es la que se conoce como bifenilos policlorados (Martínez & Carrillo, 1998).

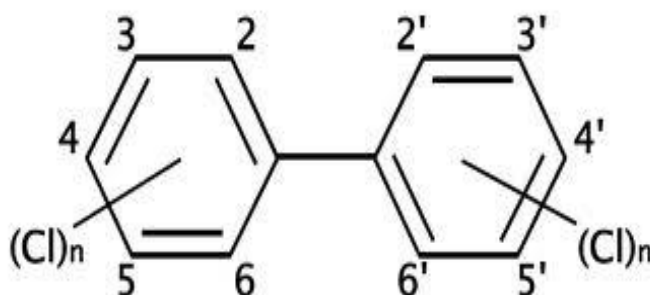


Figura 2.- Estructura química de los BPC's (Ruiz, 2003).

Los policlorobifenilos (BPC) se han relacionados con problemas de infertilidad, con el desarrollo de algunos tipos de tumores y con un desarrollo inadecuado del sistema nervioso central (Rodríguez, 2005). Su uso como insecticida fue extensivo durante los años 60 y 70. Además se utilizaron en la industria de los refrigerantes, de plastificantes, y en la producción de papel sin carbono. Los efectos sobre la producción son un aumento en abortos y defectos de nacimiento (Rodríguez et al., 2005).

### 7.3 Compuestos xenobióticos y grado de toxicidad.

Los compuestos xenobióticos poseen una gran capacidad de contaminación ambiental por su alto grado de toxicidad, los más importantes desde el punto de vista cuantitativo son los derivados aromáticos clorados y nitrados, base de las industrias de fabricación de explosivos, colorantes, herbicidas, plaguicidas, disolventes aislantes y todo tipo de productos manufacturados de interés industrial. Algunos compuestos clorados y nitrados pueden ser de origen natural permitiendo una ruta alterna de biodegradación (Martínez & Carrillo, 1998).

Se han identificado muchos compuestos aromáticos halogenados (bifenilos y anilinas) y varios pesticidas. La biodegradación lenta de estos compuestos natural puede ser causada por condiciones fisicoquímicas desfavorables (tales como, temperatura, pH, potencial redox, salinidad, concentración de oxígeno) o puede verse afectada por la disponibilidad de otros nutrientes y la accesibilidad de los sustratos (solubilidad, disociación de materiales adsorbidos, etc.)(Meer et al., 1992). La biodegradación de compuestos aromáticos clorados ha recibido gran atención debido a su especial toxicidad, esto se debe al efecto que causa sobre la estructura biológica y sobre todo porque algunos de ellos actúan como hormonas (xenohormonas)(Fig.3) (Rodríguez et al., 2005).

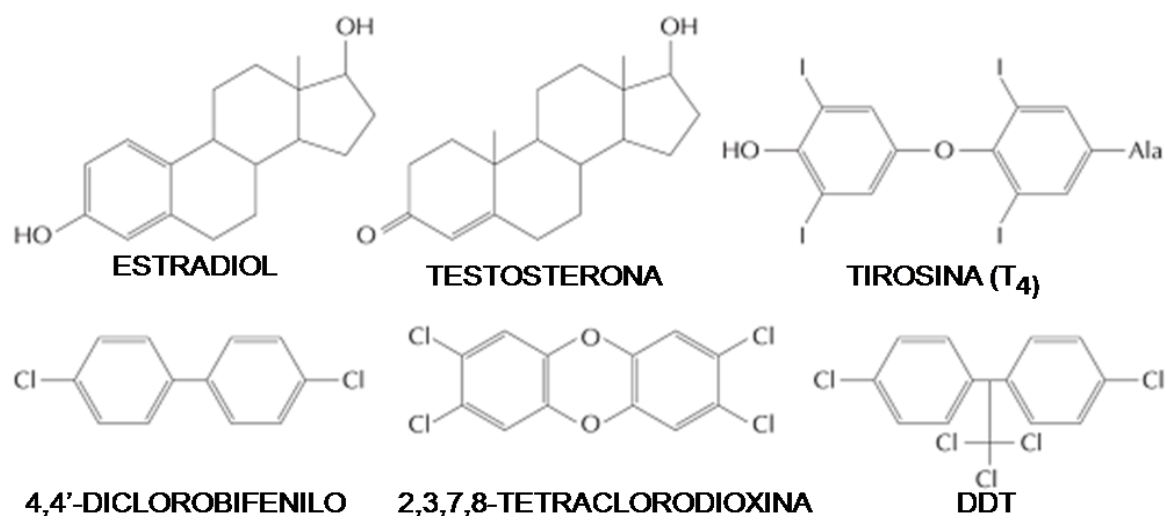


Figura 3. Semejanza estructural de algunas hormonas animales con compuestos xenobióticos clorados (Rodríguez et al., 2005).

Compuestos tóxicos como los policlorobifenilos (BPC) , las dioxinas y los furanos clorados tienen cierta semejanza con algunas hormonas como el estradiol, pero en la mayoría de los casos no se conoce exactamente a qué nivel actúan (Rodríguez et al., 2005).

#### **7.4 Capacidad de los microorganismos para degradar compuestos xenobióticos.**

La adaptación de las capacidades de degradación de algunos compuestos orgánicos o resistencia a metales pesados se ha demostrado para las bacterias en los ecosistemas de laboratorio. Diferentes procesos moleculares y bioquímicos pueden causar tales respuestas adaptativas (Meer et al., 1992).

- 1) La primera es la inducción de enzimas específicas en los miembros de la comunidad.
- 2) El crecimiento de una subpoblación específica de una comunidad microbiana capaz de absorber y metabolizar el sustrato.
- 3) La adaptación puede implicar la selección de mutantes que adquirieron especificidades enzimáticas alteradas o actividades metabólicas novedosas y que no estaban presentes en el inicio de la exposición de la comunidad a los compuestos introducidos.

Un proceso selectivo puede requerir tiempo de adaptación más largo que los otros dos procesos (de inducción y crecimiento). Bien puede ser responsable de la adaptación observado en la mineralización de los xenobióticos recalcitrantes, tales como compuestos aromáticos halogenados (Meer et al., 1992).

Una comparación general de las principales vías para el catabolismo de compuestos aromáticos en bacterias ha revelado que los pasos de conversión iniciales se llevan a cabo por diferentes enzimas, los compuestos se transforman a un número limitado de productos centrales intermediarios, tales como protocatecuato y (sustituidos) catecoles. Estos intermedios de dihidroxilación se canalizan en una de las dos posibles vías, ya sea un tipo de escisión de vía *meta* o un tipo de escisión de vía *orto* (Fig. 4). Ambos tipos de vías conducen a

intermedios de rutas metabólicas centrales, tales como el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) (Meer et al., 1992).

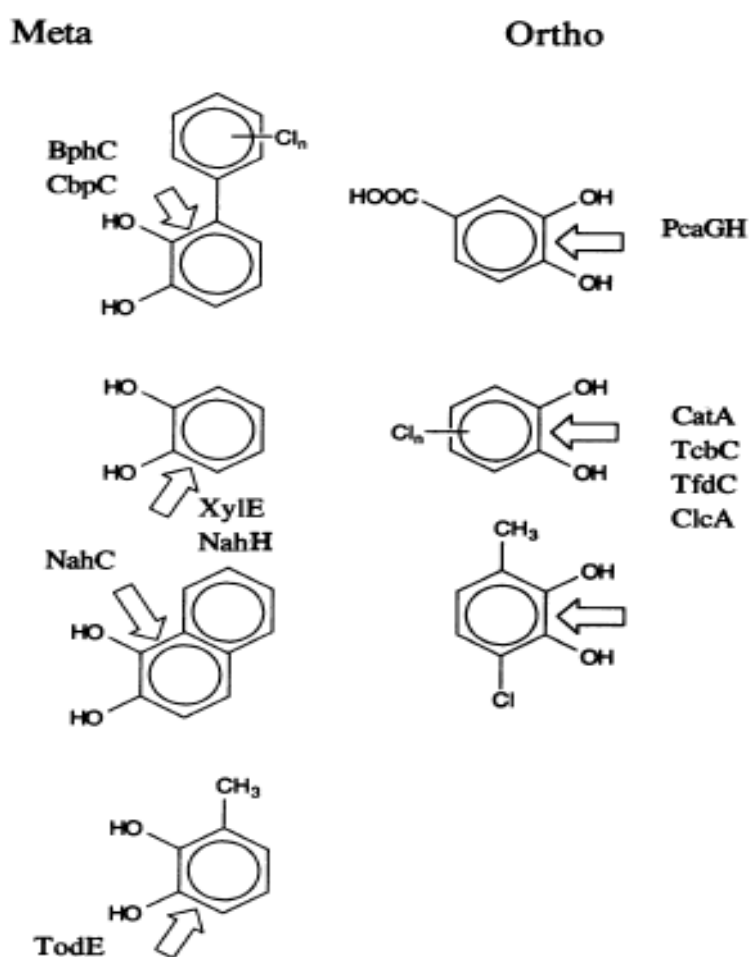


Figura 4. Enzimas dioxigenasa extradiol e intradiol. El catecol 2,3-dioxigenasa cataliza la escisión meta de catecol como indican las flechas. La familia de estradiol incluye TodE, Nach, BphC. La escisión *orto* está catalizada por dioxigenasas intradiol. La superfamilia de dioxigenasa intradiol incluye protocatecuato 3,4-dioxigenasas (PcaGH) , catecol 1,2-dioxigenasa (CatA) , y chlorocatechol 1,2- dioxigenasas (TcbC, TfdC y ClcA). Se detectó la actividad de la catecol 1,2-dioxigenasa que convierte 3-metil-6-chlorocatechol en un mutante de *Pseudomonas* sp. JS6 tensión (Meer et al., 1992).

Se ha demostrado que las poblaciones microbianas pueden adaptarse para utilizar compuestos previamente persistentes como fuente de carbono. Tal adaptación puede ser causada por la selección de las cepas mutantes que han adquirido actividades metabólicas novedosas o enzimas específicas alteradas. Existen una

amplia variedad de procesos que provocan cambios en el material genético existente y dan lugar a las funciones metabólicas alteradas (Meer, 1994).

Los detalles de los diferentes mecanismos genéticos han sido recientemente estudiados. Al considerar los diferentes mecanismos genéticos implicados en la evolución y alteraciones de secuencias de ADN, existe una gran distinción entre procesos evolutivos verticales y horizontales (Meer, 1994).

Los procesos verticales son las que conducen a una divergencia en las secuencias de ADN en las células hijas, debido a la acumulación de mutaciones. Estas mutaciones pueden ser cambios de pares de bases individuales o las que conducen a grandes cambios en la secuencia, por ejemplo deleciones y duplicaciones. Los efectos de las mutaciones puntuales sobre la especificidad de las enzimas o en el reconocimiento de efector por proteínas reguladoras han sido bien establecidos, y se ha hecho evidente que estos procesos pueden tener consecuencias directas para la adaptación de las cepas de compuestos xenobióticos. Por otro lado los procesos horizontales son los que provocan un intercambio de secuencias de ADN entre el genoma de dos organismos diferentes (movimiento intracelular), o entre diferentes moléculas de ADN, por ejemplo, dentro de los elementos cromosómicos y extracromosómicos dentro de un organismo (movimiento intermolecular) (Meer, 1994).

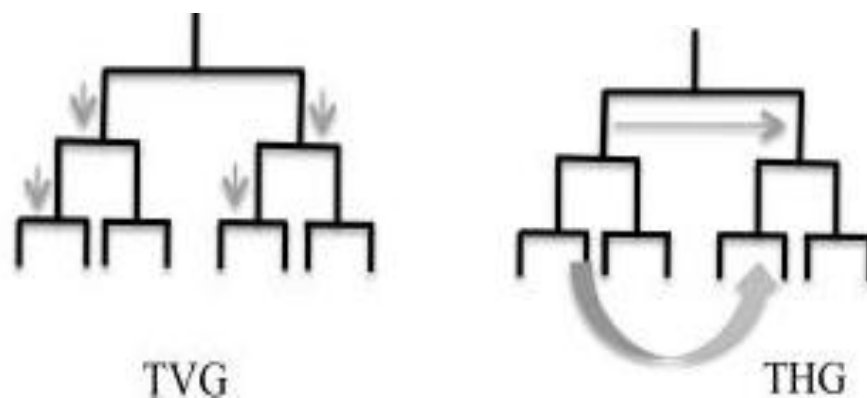


Figura 5. Transferencia de genes horizontal y vertical (Meer, 1994).



#### **7.4.1 Rutas catabólicas para hidrocarburos naturales y xenobióticos.**

Algunos compuestos xenobióticos cuya estructura química guarda semejanza con los compuestos naturales son fáciles de degradar por diversos microorganismos y pueden entrar, por lo tanto en los ciclos naturales de regeneración de los elementos. Sin embargo alguno de estos compuestos xenobióticos es difícil de biodegradar y tienden acumularse en el medio ambiente generando serios problemas.

La mayoría de los microorganismos capaces de degradar carbonos de diversos hidrocarburos alifáticos alguno de ellos corresponden a bacterias Gram negativas, especialmente *Pseudomonas*, en gran parte debido a que las técnicas genéticas están más desarrolladas para estos microorganismos. Sin embargo, hongos, bacterias Gram positivas, anaerobios estrictos, cianobacterias, etc. Tienen también un gran potencial catabólico, aunque se han estudiado en menor profundidad debido a la dificultad de su manipulación genética (López, 1994).

Los hidrocarburos aromáticos y alifáticos forman parte del petróleo, ceras, aceites, etc. Son productos naturales, en su mayoría biodegradables. Sin embargo, la introducción artificial de grupos electronegativos de estos compuestos como sustituyentes cloro o nitro, disminuye considerablemente su biodegradabilidad.

Con frecuencia los microorganismos encuentran series dificultades para asimilar muchos de estos compuestos, los ejemplos más conocidos se deben al DDT y los BPCs y muy especialmente la dioxina (López, 1994).

La continúa y rápida evolución genética características del suelo y marina, que sucede tanto por mutaciones como por transferencia de genes entre diferentes estirpes o especies bacterianas, probablemente ha facilitado la aparición y diseminación de rutas metabólicas que degradan algunos hidrocarburos clorados o nitrados.

En la figura 6, se muestra una de las rutas mejor conocidas la que permite a *pseudomonas sp.* B13 mineralizar 3-clorobenzoato. Se trata de una amplificación de la ruta que tiene B13 para degradar benzoato, que está codificada en el cromosoma de muchas bacterias Gram negativas. Las primeras dos enzimas de la

ruta del benzoato son capaces de transformar 3-clorobenzoato en 3-clorocatecol. Sin embargo, las siguientes enzimas de la ruta (catecol-1,2-dioxigenasa) no son activas frente a clorocatecoles. B13 ha adquirido tres enzimas específicas, entre ellas un clorocatecol-1,2-dioxigenasa, que permite que la degradación continúe. Estas tres enzimas están codificadas en un plásmido transmisible.

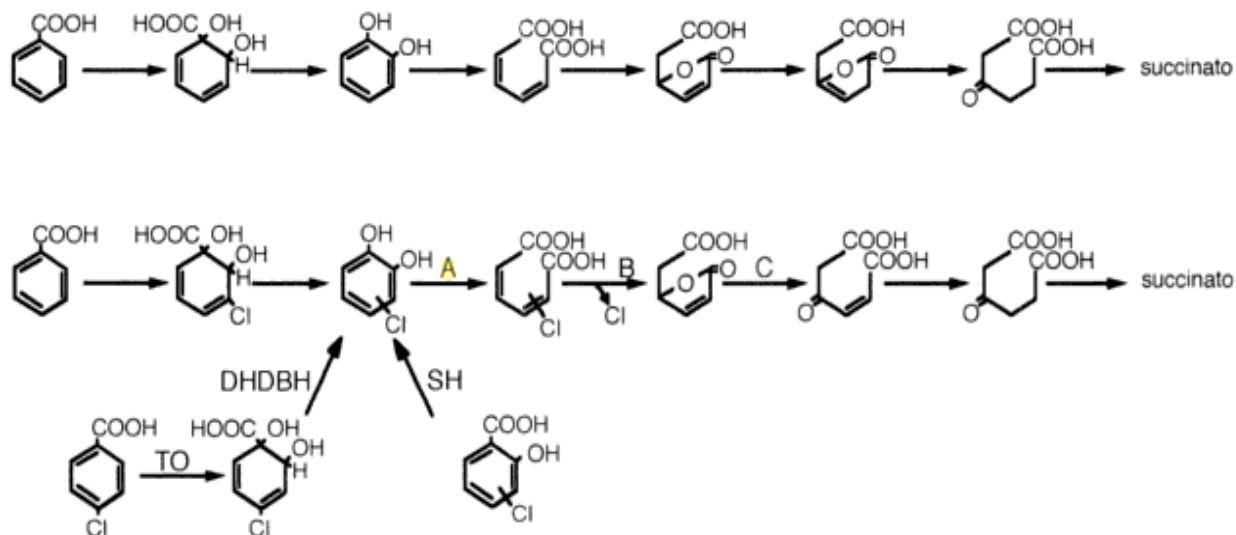


Figura 6. Degradación de 3-clorobenzoato por *Pseudomonas* sp. B13 y su expansión para permitirle degradar 4-clorobenzoato y clorosalicilatos mediante la introducción de genes clonados. En la parte superior se muestra la ruta que B13 utiliza para degradar benzoato, y en la parte central la correspondiente a 3-clorobenzoato. Esta última está basada en la ruta del benzoato, pero tiene tres enzimas adicionales, específicas para la rotura y asimilación de clorocatecoles (indicadas como A, B y C). Los genes correspondientes a la ruta del benzoato están localizados en el cromosoma de la bacteria, mientras que las tres enzimas específicas de clorocatecoles están codificadas en un plásmido. En la parte inferior de la figura se muestra dos ejemplos de expansión de la ruta de 3-clorobenzoato mediante la adición de genes clonados. La introducción en B13 de un gen que codifica para un salicilato hidroxilasa, junto con el regulador de transcripción necesario para su expresión permitiendo ampliar la ruta para asimilar también clorosalicilatos. Así mismo, la introducción de genes que transforman 4-clorobenzoato en 4-clorocatecol permitió expandir la ruta a 4-clorobenzoato (López, 1994).

#### 7.4.2 Biodegradación de los policlorobifenilos (PCB) por bacterias.

El aislamiento de bacterias capaces de degradar los BPC ha permitido detectar la presencia de microorganismos, fundamentalmente bacterias, capaces de biodegradarlos. Hasta el momento no se ha encontrado ninguna bacteria capaz de degradar todos los BPC, sin embargo, el bifenilo es un compuesto natural fácilmente degradado por diversas bacterias en condiciones aeróbicas. Con ligeras modificaciones, todas las bacterias estudiadas hasta la fecha degradan el bifenilo siguiendo una estrategia común (Fig. 7), que se puede dividir en dos procesos (Rodríguez et al., 2005):

- Oxidación de bifenilo hasta benzoato con la producción de un derivado de 5 átomos de carbono que se transforma en acetaldehído y piruvato y

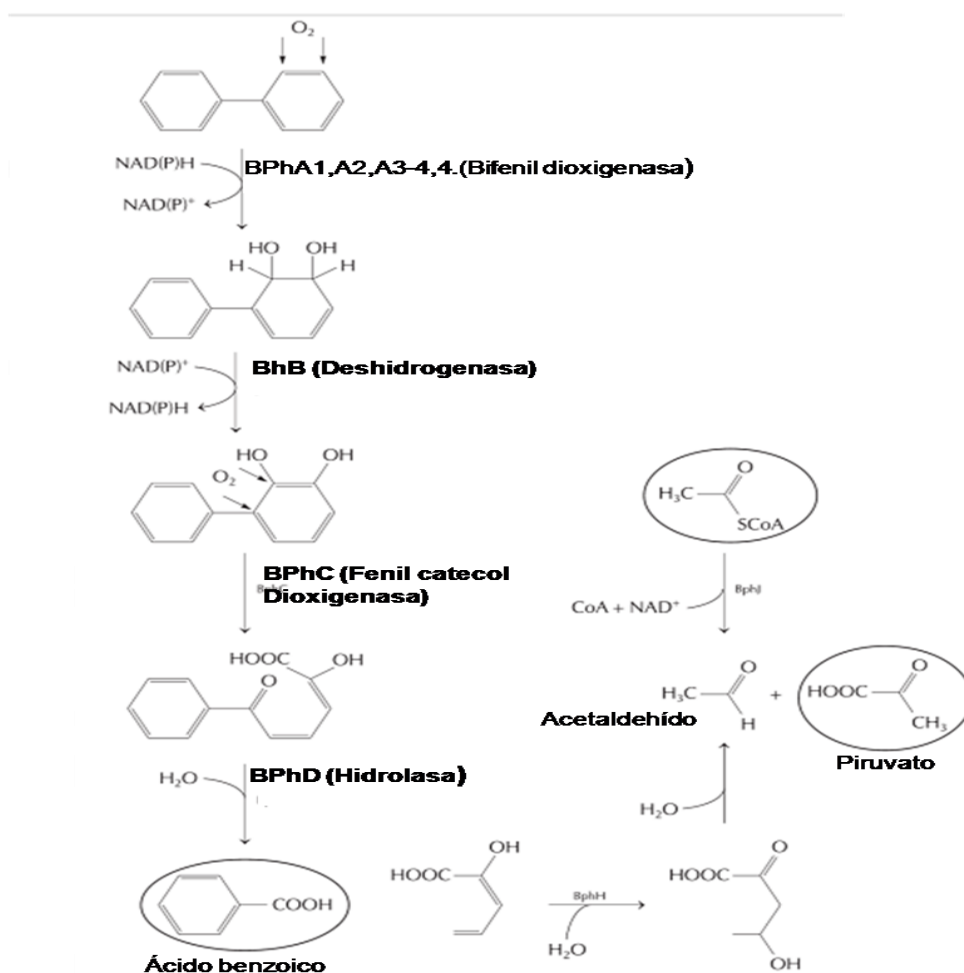


Figura 7. Esquema general de la ruta degradativa de bifenilo por bacterias. Junto con la flecha se indica las proteínas que catalizan el proceso (Rodríguez *et al.*, 2005).

- b) Oxidación del benzoato hasta piruvato y acetaldehído. Por analogía con la ruta degradativa de tolueno, a la primera serie de reacciones se le denomina ruta superior y a la segunda, ruta inferior.

Las enzimas responsables de la degradación del bifenilo son las que atacan a los BPC, pero existen varios pasos limitantes. El primero es el grado de cloración cuanto más cloro tenga el anillo aromático, más difícil se hace el ataque electrofílico del oxígeno. La solución de este problema puede de ser, un tratamiento microbiológico del residuo en condiciones anaeróbicas. Dicho tratamiento se ha mostrado muy eficaz en la dechloración de PCB, con el único inconveniente de que es muy lento (Rodríguez et al., 2005).

#### **7.5 Estudios de la Biodegradación de compuestos fenólicos a partir de *Acinetobacter calcoaceticus*.**

De las diversas técnicas disponibles para la eliminación de fenoles, la biodegradación es un método amigable y rentable para el medio ambiente y se ha estudiado ampliamente el uso de cultivos puros y mixtos. Muchas especies se han aislado y caracterizado como organismos que degradan fenol, tales como especies de *Pseudomonas*, *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus brevis* y *Candida tropicalis*. La *Acinetobacter calcoaceticus* es una bacteria aeróbica Gram negativa con una alta capacidad de utilizar fenol como única fuente de carbono y energía. Así, los compuestos fenólicos pueden ser degradados por lodos aclimatados activado, por el consorcio microbiano en biorreactores, en reactores de lecho fluidizado, y en biorreactores de membrana de fibra (Cordova et al., 2008).

Existen estudios en los que se determinaron que la *Acinetobacter calcoaceticus* PHEA-2 fue aislado originalmente de las industrias de aguas residuales en China debido a su capacidad para utilizar fenol como única fuente de carbono (Zhan et al., 2011).

## **7.6 marcadores moleculares**

Un marcador molecular es un fragmento (secuencia) de ADN que por sí solo, o combinado en alineación con otros, puede ser físicamente localizado dentro del genoma de un organismo. Tales fragmentos pueden encontrarse cerca a un gen que codifica una característica de interés o en regiones que sin ser codificantes contienen características estructurales particulares. Una de las características de los marcadores moleculares es que son específicos para cada individuo, grupo de individuos, especies o aún de grupos sistemáticos mayores, lo cual los convierte en herramientas útiles para el análisis tanto de individuos como de poblaciones (Rocha, 2003).

El ADN tiene una estructura fisicoquímica especial que le confiere propiedades únicas para el almacenamiento y la transferencia de información de generación en generación (Rocha 2002). Los marcadores moleculares exhiben las características fisicoquímicas del ADN y su herencia se explica con las mismas leyes establecidas por la genética. Como consecuencia, los marcadores moleculares se han constituido en una inmensa caja de herramientas extremadamente útiles para la detección de polimorfismos en animales, plantas superiores, patógenas y plagas (virus, hongos, insectos, nematodos, etc.)(Rocha, 2003).

El ADN purificado se puede examinar a dos niveles alternativos. Uno es buscar marcadores moleculares en el ADN total o en cada genoma (núcleo, mitocondria, cloroplasto): por ejemplo hibridación de ADN, RFLPs o minisatélites. El otro es detectar marcadores en un segmento pequeño de ADN producto de una amplificación enzimática, como microsatélites o RAPDs (Gonzales, 1998).

A nivel de los ácido nucleicos, la hibridación del ADN fue uno de los primeros marcadores para detectar variaciones en las poblaciones. A esto se le siguió el uso de los RFLPs, los mapas génicos y las secuencias. Con la introducción reciente de la RCP (reacción en cadena de polimerasa, PCR en inglés) ha habido una explosión en la diversidad de marcadores moleculares que se aplican en muchas áreas de la biología (González, 1998).

### 7.6.1 Marcador molecular basado en PCR.

La técnica de PCR fue desarrollada por Kary B. Mullis en 1984, quien recibió el Premio Nobel de Medicina y Fisiología en 1993 por esta invención (Rocha, 1988).

La reacción en cadena polimerasa (PCR), es un sistema de amplificación *in vitro* del ADN por el que puede en conseguirse en pocas horas grandes cantidades de un gen (o de una parte de él) a partir de muy poco ADN, incluso el aportado por una sola célula (Robertis & Hib, 2001).

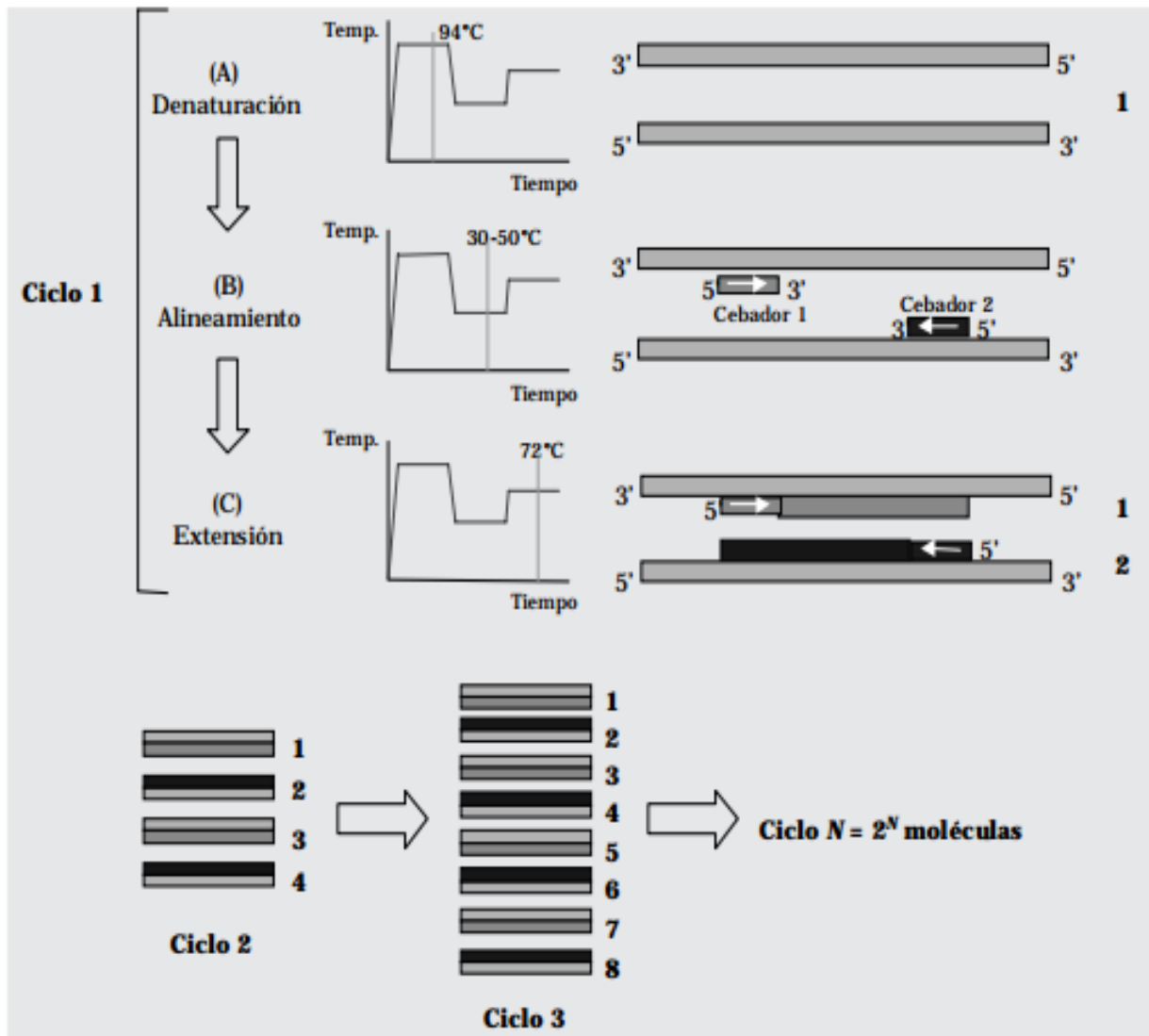


Figura.8. Representación grafica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Rocha, 1998).

El 16S ARNr bacterial contiene nueve “regiones hipervariables” que demuestran una considerable diversidad entre diferentes especies bacterianas. Las regiones hipervariables están flaqueadas por extensiones conservadas en muchas bacterias, permitiendo la amplificación por PCR de secuencias usando primers universales (Cisneros, 2010).

Varios genes que codifican para proteínas tales como *reA*, *groEL*, *hsp75*, *rpoB*, *rpoD*, y *gyrB*, han sido usados para la clasificación de bacteria a nivel intragénico. Sin embargo, el agrupamiento filogenético de las cepas de *Acinetobacter* basados en genes de *reA* muestra diferencias considerables comparados con los basados en genes de *gyrB* (Cisneros, 2010).

La fiabilidad del análisis de hibridación DNA-DNA puede ser superior a la comparación de un solo gen que codifica para proteína cuando es aplicado a la clasificación de cepas recientemente divergentes debido a que la hibridación de DNA-DNA mide la similitud entre la totalidad de las secuencias genómicas. Aunque la hibridación DNA-DNA es un método recomendado para la identificación de especies genómicas, es impopular debido al hecho de que requiere la preparación de DNAs cromosomales puros de todas las cepas a ser examinadas y que la hibridación debe ser conducida a todas las combinaciones de cepas. Además, las secuencias de datos depositadas en bases de datos puede ser usados para análisis filogenéticos en demanda, y los datos de secuencias acumuladas pueden ser usados para diseñar primers específicos para PCR útiles para la rápida identificación de cepas particulares y la delineación de esas bacterias(Cisneros,2010).

### **7.7 Identificación Taxonómica.**

La taxonomía es la ciencia de la “clasificación”, agrupa y separa los organismos, de acuerdo con sus características fenotípicas, estructurales o genéticas. (Picazo & García, 1999)

La taxonomía tiene en cuenta tres procesos:

1. Clasificación en sentido estricto. Aquí se agrupan en conjunto los objetos o los seres que poseen semejanzas, generalmente genotípicas entre sí.

2. Nomenclatura. Se encarga de dar un nombre diferente a cada uno de los grupos creados. Para lograr una denominación uniforme de los organismos que tengan validez internacional.

3. Identificación. En este proceso se reconoce a un ser u objeto como perteneciente a uno de los grupos conformados previamente, o se le define como inclasificable entre los grupos existentes.

Cada grupo de organismo de cualquier nivel taxonómico creado por las clasificaciones se denomina genéricamente *taxón* y su plural es *taxa* o *taxones* (Montoya, 2008).

Un sistema de clasificación biológico se basa en una jerarquía taxonómica u ordenamiento de grupos o categorías que coloca la especie en un extremo, y el otro el reino en la siguiente sucesión (Montoya, 2008).

1. Especie. Un grupo de microorganismos estrechamente relacionados. Los estudios genéticos, especialmente los basados en estructura y homología del ADN y ARN (sobre todo el ARN) han permitido definir este término. Una especie bacteriana es son todos los individuos (cepas) que presentan una afinidad del 70% en su ADN y menos de un 5% de divergencia en secuencias relacionadas (Picazo & García, 1999).

2. Género. Un grupo de especies similares.

3. Familia. Un grupo de géneros similares.

4. Orden. Un grupo de familias similares.

5. Clase. Un grupo de órdenes similares.

6. *Filum*. Un grupo de clase relacionadas.

Las clasificaciones filogenéticas se fundamentan en las relaciones genéticas generales que tienen las bacterias sobre la base de unos antepasados comunes. Para su realización se emplean técnicas de biología molecular con el fin de conocer el ADN y el ARN. Se ha podido comprobar que existen ciertas macromoléculas celulares que pueden ejercer la función de cronometro evolutivo para lo que deben cumplir una serie de características (Picazo & García, 1999):

a) Estar universalmente distribuidas; b) llevar a cabo la misma función en todos los seres vivos; c) su secuencia ha de permitir la identificación de regiones de



homología y de heterogeneidad, y d) tasa de cambio que se correlacione con la distancia evolutiva. El ARN ribosómico (ARNr), por el carácter ancestral de la biosíntesis de proteínas, parece ser un excelente candidato para la medida de la distancia evolutiva, ya que se cumplen con las condiciones reflejadas anteriormente. El ARNr 16S constituye el blanco de los estudios taxonómicos debido a su naturaleza, pequeño tamaño (aproximadamente 1500 nucleótidos) y la posibilidad de secuenciación directa mediante una transcriptasa inversa (Picazo & García, 1999).

### **7.8 Identificación filogenética.**

El análisis filogenético de datos intraespecíficos permite reconstruir la genealogía de la especie e investigar aspectos de su historia evolutiva reciente en un contexto geográfico, incluyendo eventos de aislamiento y divergencia, expansión de rango, contacto secundario, etc. (Avice, 2000). Estos enfoques han permitido constatar para muchas especies la existencia de unidades intraespecíficas con suficiente divergencia evolutiva como para requerir una conservación independiente (Moritz, 1994), o incluso para ser designadas como especies distintas (Sáez, 2009).

Los marcadores moleculares, en combinación con métodos de reconstrucción filogenética, han sido utilizados desde hace décadas para la reconstrucción de las relaciones evolutivas entre especies, con la aspiración última de reconstruir el árbol de la vida (Maddison et al., 2007). En el contexto de la conservación, este tipo de enfoques permiten tomar en consideración las divergencias evolutivas en las medidas de biodiversidad e invocar a la distinción filogenética como criterio para asignar prioridades de conservación (Faith, 2002). Al mismo tiempo las filogenias moleculares han sido utilizadas en combinación con el método comparativo para identificar los correlatos ecológicos de la susceptibilidad a la extinción (Owens y Bennett, 2000).

## VIII. DESCRIPCION DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS

### 8.1 Antecedentes del microorganismo

La *Acinetobacter calcoaceticus* OTEC 02 fue obtenida a partir de suelos contaminados con hidrocarburos en la ciudad de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas y posteriormente fue aislada, debido a su capacidad para crecer con fenol como única fuente de carbono (Cisneros, 2010).

### 8.2 Resiembra PyCa ++

Para preparar el medio de cultivo Py<sup>Ca ++</sup>, se peso 0.3 gr de extracto de levadura, 0.5 gr de peptona de caseína y 1.5 gr de Agar. Posteriormente se esterilizó el medio a 15 lb/pulg<sup>2</sup> durante 15 minutos y se adiciono cloruro de calcio (1 ml CaCl<sub>2</sub>/ 100 ml Py<sup>Ca ++</sup>) previamente esterilizado.

Finalmente se procedió a colocar el medio en placas de Petri y se dejo a prueba de esterilización por un día para posteriormente activar la cepa.

### 8.3 Estudio microscópico

Para el estudio morfológico de la cepa OTEC 02 se empleo la técnica de tinción de Gram (Forbes, Sahm & weissfeld, 2009). Primeramente se tomo una pequeña muestra de la cepa y se figo en el porta objeto, se adiciono cristal violeta cubriendo toda la muestra durante 1 minuto y se procedió a lavar con agua, luego se le agregó yodo lugol durante 1 min y posteriormente se lavo con agua. La muestra se lavo con alcohol acetona durante 15 a 30 segundos y finalmente se le agrego safranina para teñir la bacteria y nuevamente se lavo con agua. Se caracterizo fenotípicamente la cepa OTEC 02 a través de un microscopio.

#### **8.4 Extracción de ADN**

Se extrajo el ADN total genómico de la *Acinetobacter calcoaceticus* OTEC 02 usando el protocolo de aislamiento de ZR Fungal/Bacterial DNA Kit™.

Se tomo 30 µl de la cepa y se colocó en un tubo de ZR Bashing Bead™ lisis y se le Añadió 750 µl de Solución de Lisis al tubo. Posteriormente se centrifugó a 10000 rpm durante un minuto, se transfirió 400 µl del sobrenadante a un filtro Zymo-Spin™ IV y se centrifugó a 7000 rpm por un minuto, luego se adiciono 1,200 µl de ADN fúngico / Bacterial Binding Buffer para el filtrado en el tubo de recogida y se transfirió 800 µl de esta mezcla un Zymo-Spin™ Columna IC, se centrifugó a 10 000 rpm por un minuto, se desecho el flujo a través del tubo de recogida y se transfirió los siguientes 800 µl de la mezcla un Zymo-Spin™ Columna IC para repetir el proceso.

Se añadió 200 µl de ADN Pre-Wash Buffer al Zymo-Spin™ Columna IC en un nuevo tubo de recogida y se centrifugó a 10 000 rpm durante un minuto y finalmente se añadió 500 µl de Fungal/Bacterial DNA Wash Buffer al Zymo-Spin™ Columna IC y se centrifugo a 10 000 rpm durante un minuto y se transfirió de la Zymo-Spin™ Columna IC a un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml y se adiciono 20 µl de DNA Elution Buffer directamente en la columna y se centrifugó a 10000 rpm durante 30 segundos para eluir el ADN.

#### **8.5 Aplicación de las herramientas moleculares para amplificar los genes de *Acinetobacter Calcoaceticus* OTEC 02.**

##### **8.5.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).**

Esta técnica se fundamenta en la propiedad natural de las ADN polimerasas para replicar hebras de ADN, para lo cual emplea ciclos de altas y bajas temperaturas alternas para separar hebras de ADN recién formadas entre si tras cada fase de replicación (Olive & Bean, 1999).

Para la amplificación del gen de la cepa OTEC 02, se preparo una carga de 100 µl, se usaron 83.63 µl de agua miliq, 0.8 dNTP's, 1 µl del primer 27 F (5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 1492 R (5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') (Morerira, Huising & Bignell, 2012), 3 µl de MgCl<sub>2</sub>, 10 µl de buffer 10X y 0.5 µl de Taq. Polimerasa. La mezcla se distribuyo en tubos de PCR, colocando 24 µl de la carga y 1 µl del ADNm.

Las condiciones para PCR fueron 94 °C durante 3 min, luego a 94 °C durante 45 min, 57 °C durante 1 min, 72 °C durante 2 min lo cual se repitió hasta 35 ciclos y finalmente a, 72 °C durante 5 min.

### 8.5.2 Huellas genómicas ERIC.

Esta técnica está basada en el ADN y depende de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y "primer" dirigidos a secuencias de nucleótidos específicos designadas como secuencias para generar huellas genómicas especificas de cada cepa bacteriana (Welsh & Celland, 1990).

Se amplifico el ADN de las secuencias de nucleótidos, para generar las huellas genómicas especificas de la cepa OTEC 02, se preparó una carga de 40 µl, se usaron 15.9 µl de agua miliq, 4 µl de buffer 10 X, 4 µl de DMSO 10 %, 6.1 µl de MgCl<sub>2</sub>, 4.97 µl de DTP's, 0.8 µl de los primer ERIC 1 y 2, 0.32 µl de Taq. Polimerasa. Se coloco la mezcla en tubos para PCR equitativamente colocando 9 µl de la carga y 1 µl del ADNm.

Las condiciones para la determinación de huellas genómicas fueron:

1 hld	3 tmp		30 ciclos	2 Holds	
95 °C	93 °C	50 °C	65 °C	65 °C	40 °C
3 min	0.43 seg.	1 min	8 min	16 min	∞

### **8.5.3 Determinación de enzimas de restricción (Técnica de ARDRA).**

La técnica consiste en amplificar por PCR el gen 16S ADNr de la comunidad total, aislar las diferentes copias que se encuentran en la mezcla y posteriormente someter a cada una de las copias de digestión enzimática (Hill et al., 2000).

Se amplificó un gen de ADN a partir del 16S ADNr para la identificación de la Cepa OTEC 02, para ello se preparó una carga de 34  $\mu$ l, se usaron 28.8  $\mu$ l de agua miliq, 4  $\mu$ l de buffer 10 X, 4  $\mu$ l de la Enzima RsaI, posteriormente la carga se distribuyó en tubos para PCR colocando 8.5  $\mu$ l de la Mezcla y 1.5  $\mu$ l del producto de PCR. Se incubó la muestra a 37 °C durante 6 horas

### **8.6 Evaluación de la cantidad y calidad de las técnicas aplicadas.**

Se evaluó la cantidad y calidad del ADN extraídos de las técnicas antes mencionadas, primeramente se preparó un gel de agarosa (1gr/ 100 ml de agua destilada) y se colocó en un horno durante 4 min hasta que la mezcla presentara un tono translucido, se adicionó la mezcla a un molde para su gelificación, y finalmente se montó el equipo para electroforesis, las muestras se corrieron a 100 Volts, 400 MA por 30 min. Después de la migración el gel se tiñó en una solución de bromuro de etilo (1mg/ ml) y se analizó en un cámara de electroforesis de UVP Photo Doc-it a 260 nm.

### **8.7 Extracción de plásmidos.**

Se procedió a la resiembra de la cepa *Acetobacter calcoaceticus* OTEC 02 en medio líquido Py<sup>Ca ++</sup>, el cual contenía 0.3 gr de extracto de levadura y 0.5 gr de peptona de caseína. Se preparó 8 tubos con el medio Py<sup>Ca ++</sup>, líquido y se dejó a prueba de esterilización por un día, posteriormente se comprobó que el medio no presentara ningún otro componente para inocular la cepa OTEC 02. Se dejó en agitación por 24 horas.

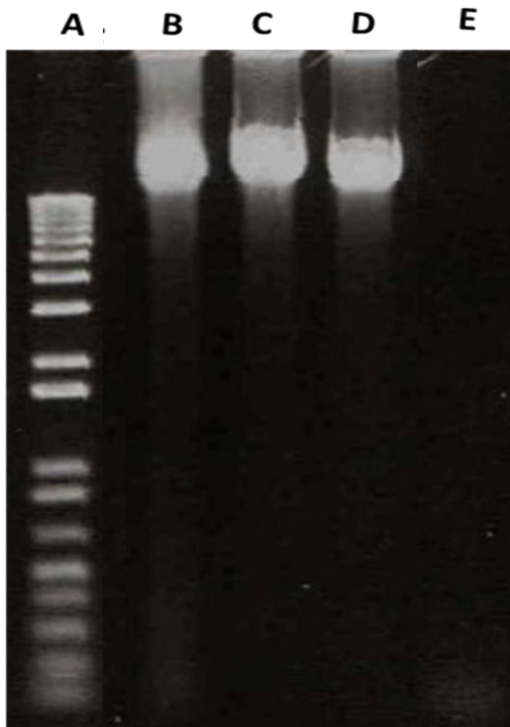
Se procedió a extraer el plásmido bacteriano de la cepa OTEC 02 utilizando el protocolo Eckhardt: primeramente se preparó el gel (agarosa al 1%) y se le adicióno la solución amortiguadora de electroforesis TBE 1X , una vez disuelto se adicióno 10% de la solución SDS en TBE 1X. Se tomo 200  $\mu$ l de la alícuota previamente frescas cuya dilución óptica alcanzo entre 0.4 a 0.5. Se coloco en tubos Eppendorf (1.6 mL), a cada tubo se le adicióno 900  $\mu$ l de sarcosil (N-Laurisarosina al 3% en TBX) , se mezclaron en un vortex y se centrifugaron a 1200 rpm por un minuto, se desecho el sobrenadante quedando únicamente la pastilla. Se realizó una mezcla de E1 (10% de sucrosa en TBE más RNAsa) con algunos grupos de lisozima (polvo liofilizado) y posteriormente se le adicióno 20  $\mu$ l a cada tubo Eppendorf. Finalmente se evaluó la cantidad de plásmidos presentes a través de una electroforesis a 5 Volt, 400 mA, por 30 min lo que permitió la lisis celular y posteriormente a 80 volt, 400 mA, por 8 horas.

## IX. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 9.1 EXTRACCIONDE ADN Y AMPLIFICACION DE MARCADORES.

#### 9.1.1 Extracción de ADN.

Se logro un buen aislamiento de ADN de la Cepa OTEC 02 permitiéndonos evaluar la calidad de ADN presentes en la *Acinetobacter calcoaceticus* OTEC 02. Se puede observar, que el material genético es de buena calidad y no presenta otros componentes (proteínas, nucleótidos etc.).

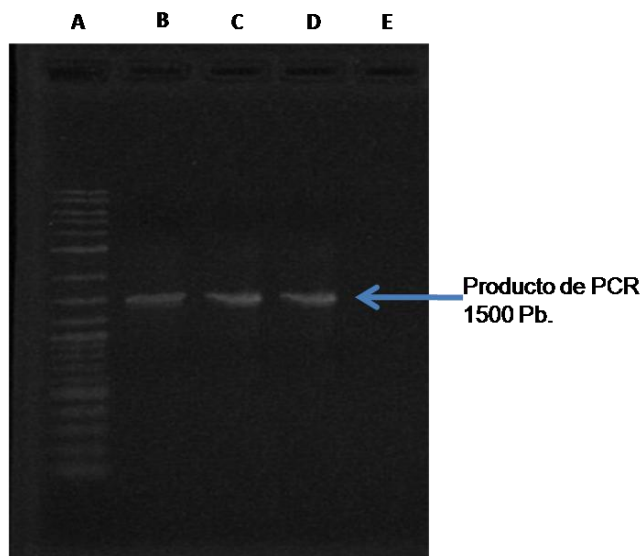


Muestras	Cepa
A	Kb plus
B	OTEC 02 #1
C	OTEC 02 #2
D	OTEC 02 #3
E	Control -

Figura 9.. Electroforesis del material genético de la cepa OTEC 02

### 9.1.2 Determinación de PCR 16-S.

En primer lugar se emplearon los primer Fd1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y Rd1(5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') (Weisburg *et al.*, 1991) para amplificar el gen cromosomal 16S ADNr de la *Acinetobacter calcoacetius* OTEC 02, cuyo resultado no se observaron con gran claridad debido a que el gen de la cepa OTEC 02 no se distinguió en su totalidad. Se decidió entonces utilizar primer universales 27 F (5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 1492 R (5'TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') diseñados para amplificar el gen bacteriano (Weisburg *et al.*,1991) para las 3 muestras de la misma cepa en estudio. Finalmente se logro amplificar el gen cromosomal 16S ADNr con un tamaño aproximado de 1500 Pb.



Muestras	Cepas
A	Kb plus
B	OTEC 02 #1
C	OTEC 02 #2
D	OTEC 02 #3
E	Control -

Figura 10. Producto de PCR de la región 16S ADNr de las 3 muestras de la cepa OTEC02.

### 9.1.3 Determinación de PCR-*nif* H.

Para comprobar si la *A. Calcoaceticus* OTEC 02 presentaba características de fijación de nitrógeno se busco la presencia del gen *nifH* presentes en la mayoría de los diazótrofos (Bacterias que fijan nitrógeno atmosférico) (Voet, 2004). En



este caso la reacción de PCR no amplificó ningún segmento en ninguna de las 3 muestras empleadas de dicha bacteria.

#### 9.1.4 Determinación ARDRA (Enzimas de restricción).

Se logró amplificar las muestras de la cepa OTEC 02, amplificando un fragmento desde 300 pb. Y 1500 pb. Del gen que codifica la subunidad específicas del ARN ribosomal (Fig.11). Se puede apreciar la similitud que presentan la muestra A como la muestra D, dichas muestras pertenecen a la *Acinetobacter calcoaceticus* OTEC 02.

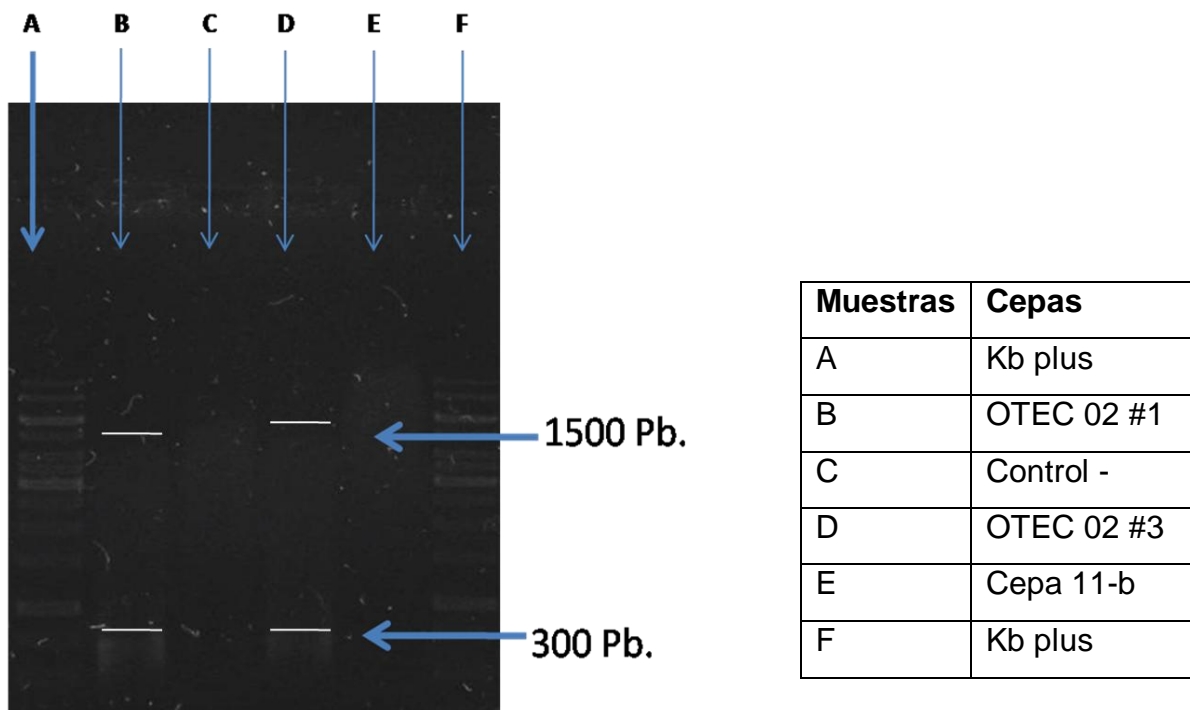


Figura 11. Producto de PCR luego de la digestión con la enzima RsaI para las 3 muestras de la cepa OTEC02.

### 9.1.5 Determinación de huellas genómicas. Técnica de Eric.

Esta técnica nos permitió amplificar las huellas genómicas de la *Acinetobacter calcoaceticus* OTEC 02. Se puede observar que las enzimas de restricción cortan una determinada secuencia de bases específicas, amplificando el gen con un tamaño aproximado de 1000 pb. Y 1500 pb. De muestras empleadas para la cepa OTEC 02.

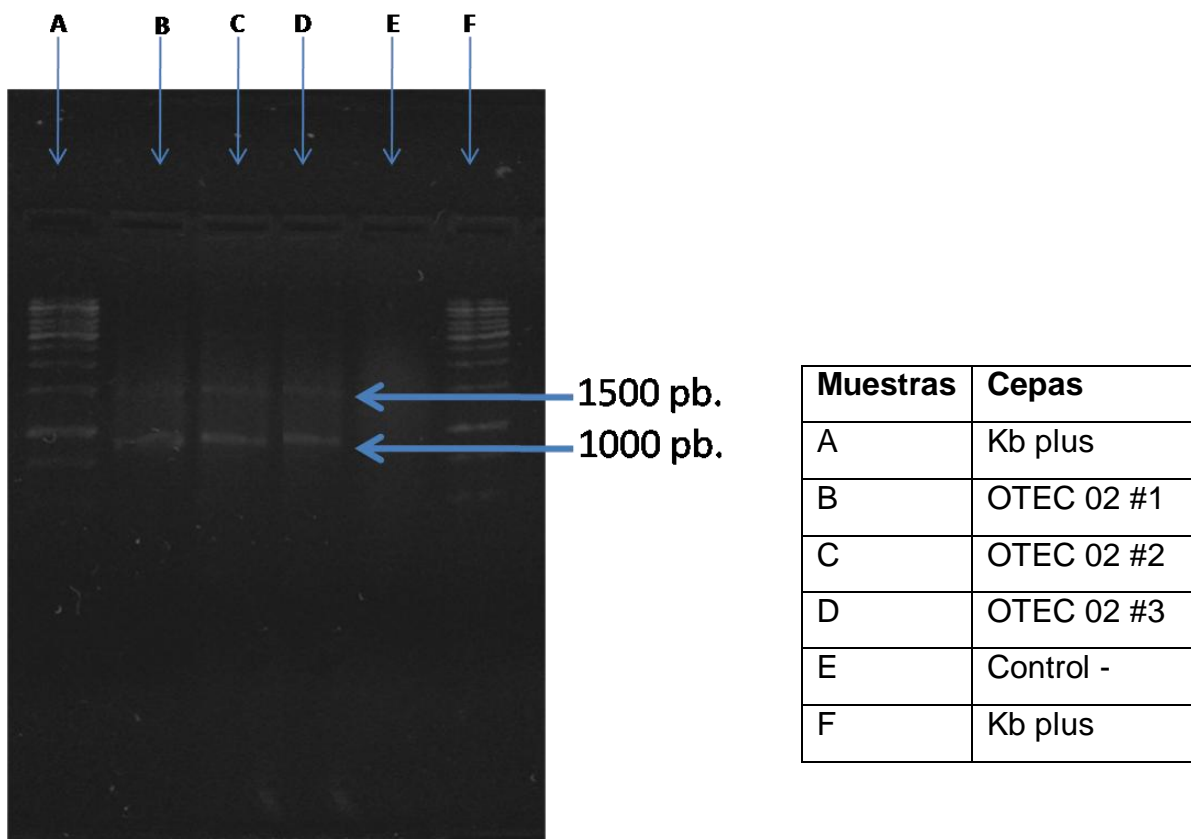


Figura 12. Huellas genómicas ERIC de las cepas de OTEC 02

## 9.2 Extracción de plásmidos.

Para extraer el plásmido de la *Acinetobacter calcoaceticus* OTEC 02. Se utilizó el protocolo Eckhardt en donde se cuantificó la presencia de ADN plasmídico (Fig.12), debido a que se contaba únicamente con los reactivos para esta técnica. La cepa OTEC 02 no presentó ningún indicio de presencia de plásmidos.

Sin embargo existen nuevas técnicas como el protocolo para el aislamiento de plásmidos de lisis alcalina y el kit comercial Rache® que podrían emplearse para dicha bacteria y reafirmar nuevamente la presencia o ausencia de plásmidos para la *A. calcoaceticus* OTEC 02.

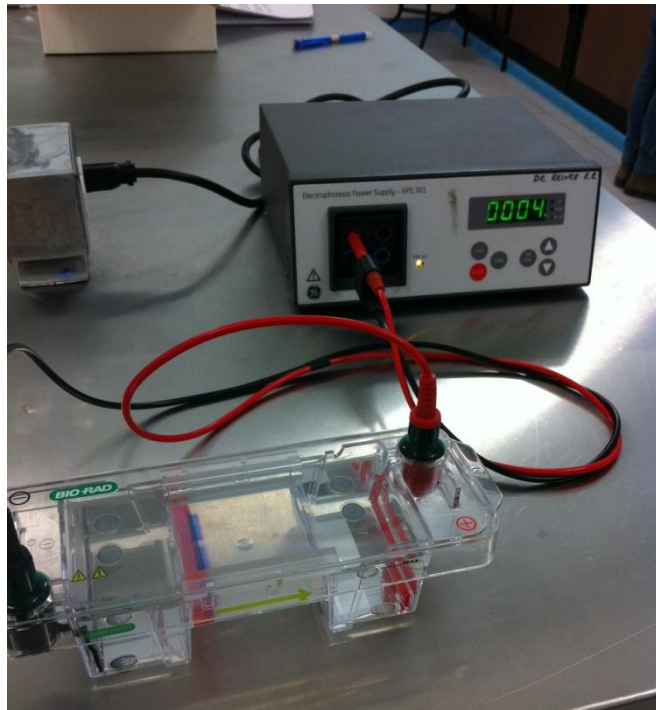


Figura 13. Equipo de electroforesis para correr las muestras de ADN plasmídico.

### 9.3 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA.

#### 9.3.1 Morfología de la *Acinetobacter calcoaceticus* OTEC 02.

Las características morfológicas mayores de la bacteriana. Se encargan de estudiar los aspectos grandes y más notorios de la bacteria como, la forma, el ordenamiento y el tamaño (Montoya, 2008).

La *Acinetobacter calcoaceticus* OTEC 02 es Gram negativa (Fig.14). La dimensión y morfología de la cepa OTEC 02 se determinó a través de microscopía electrónica (Fig. 15A) caracterizándose de la siguiente manera.

Tabla 1. Características Morfológicas de la cepa OTEC 02.

Identificación morfológica	Características
Tamaño	1-2 $\mu\text{m}$
Forma	Bacilar
Superficie	Lisa
Consistencia	Creмосa
Color	Blanco
Bordes	Liso Cremado
Elevación	Convexas
Transmisión de Luz	Opaca
Aspecto	Húmedo

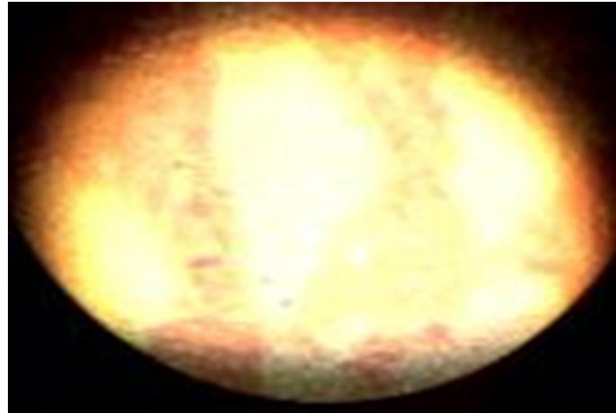
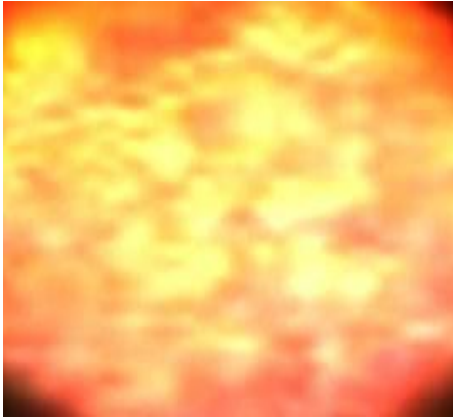
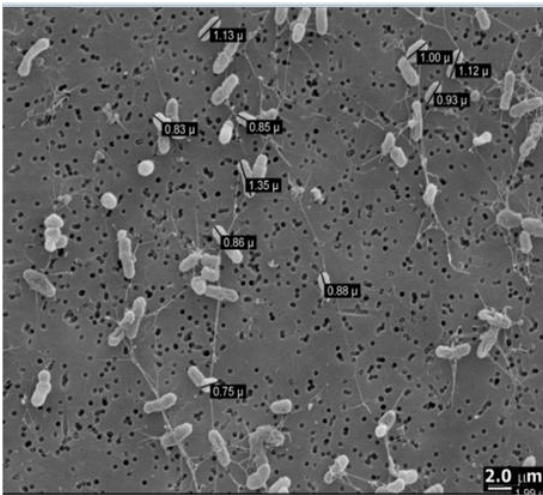
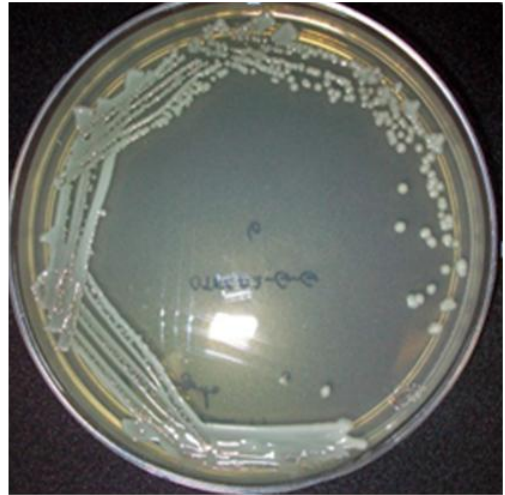


Figura 14. Determinación de la técnica de gran para la cepa OTEC 02.



(A)



(B)

Figura 15. Aspectos microscópicos de la cepa *Acinetobacter* OTEC-02 (A). Imagen de la cepa OTEC-02 al microscopio electrónico de transmisión 50 000X. (B). Morfología de las colonias de la cepa OTEC-02 en el medio PY.

#### 9.4 Análisis filogenético de la *Acinetobacter calcoaceticus* OTEC 02. a partir del gen 16S ADNr.

El siguiente árbol filogenético se muestra la relación que tiene la *Acinetobacter calcoaceticus* OTEC02 con otras especies de cepas bacterianas basadas en el gen 16S.

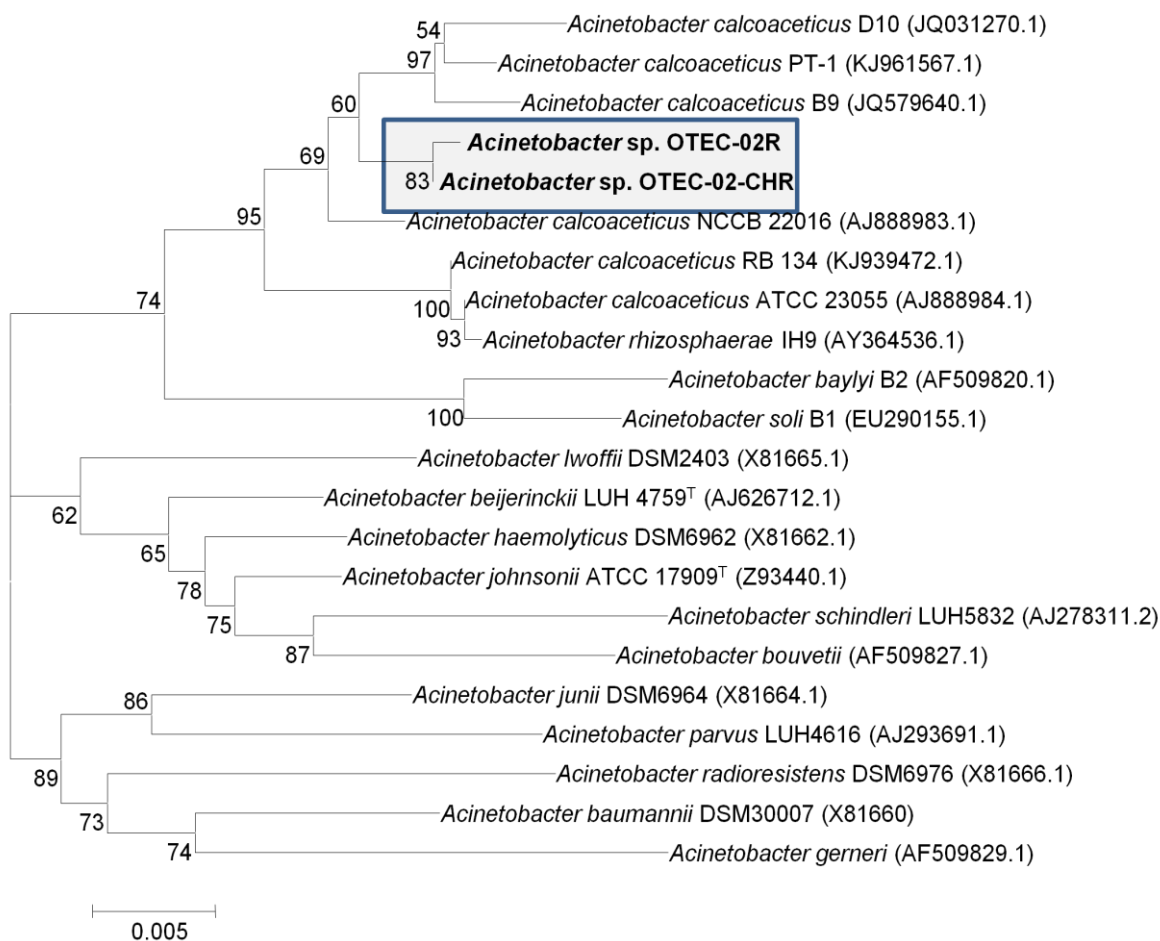


Figura. 16. árbol filogenético basado en el gen 16S ADNr de la cepa *A. calcoaceticus* OTEC 02 y especies bacterianas relacionadas. Usando el método NJ con 1000 Bootstrap.

### 9.5 Características Taxonómicas de la *Acinetobacter calcoaceticus* OTEC 02.

Se reviso la taxonomía correspondiente a la cepa OTEC 02 en el banco de datos NCBI cuyos resultados arrojaron de la siguiente manera:

Tabla 2. Taxonomía actual de la cepa OTEC 02 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>, revisada el 11/12/2014).

<b>Estatus taxonómico de la <i>A. calcoaceticus</i> OTEC02</b>	
<b>Cepa</b>	OTEC 02
<b>Dominio</b>	Bacteria
<b>Phylum</b>	Proteobacteria
<b>Subdivisión</b>	<i>Gamma (γ-proteobacteria)</i>
<b>Clase</b>	<i>I</i> <i>(Zymobacteria)</i>
<b>Orden</b>	<i>VII</i> <i>(Pseudomonadales</i>
<b>Familia</b>	<i>II</i> <i>(Moraxellaceae)</i>
<b>Genero</b>	<i>Acinetobacter</i>
<b>Especie probable</b>	<i>Calcoaceticus</i>

## X. CONCLUSIONES

La bacteria *Acinetobacter calcoaceticus* OTEC 02 resulto un bacilo Gram negativo (1.5 x 0.7µm), de crecimiento rápido (24-48 hrs), presenta bacilos con flagelos polares que le permiten movilidad en el medio, no producen gomas exopolisacáridos y en el medio PY forman colonias blancas, ligeramente opacas, de 1 a 2 mm Ø.

La bacteria amplificó el gen 16S aprox. de 1500 Pb. Lo que corrobora la extensión esperada de este gen cromosomal para la especie *Acinetobacter*, usando los primers universales 27F y 1492R pero este gen no se amplificó con los primers Fd1 y Rd1.

No amplificó el gen plasmídico *nifH* para esta cepa. Lo que indica que la cepa no tiene la capacidad para fijar nitrógeno atmosférico.

No se encontró la presencia de plásmidos en la cepa OTEC 02 después de usar el protocolo Eckhardt.

Las pruebas genómicas realizadas a la cepa OTEC02, permitieron establecer las bases para el secuenciamiento del genoma completo de esta especie. Información que permitirá en el futuro conocer los genes involucrados en la biodegradación de compuestos xenobióticos.

### **Recomendación**

Se recomienda realizar estudios a nivel de transcriptoma de la cepa OTEC-02 para determinar la calidad en la síntesis de los RNAm para determinar el potencial en la formación de las diferentes enzimas involucradas en la biodegradación de contaminantes xenobióticos.

Realizar pruebas de biorremediación in situ para conocer el potencial de degradación de contaminantes en diferentes ecosistemas.



## XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Avise, J.C. 2000. Phylogeography: The History and Formation of Species, Harvard University Press, Cambridge, MA. USA.

Betty forbes. Daniel F. Sahn. Alice S Weissfeld. 2009. Diagnostico microbiologico. 12a. Edicion. Editorial Buenos aires. Medica panamericana S.A. P: 80-82.

Castillo Rodríguez, F., Roldán Ruiz, M. D., Plá, R. B., H., Romera F. J M. J., Caballero Domínguez. Conrado M. Vivián. M. M., Luque R. (2005). Biotecnología ambiental. 1ra. Edición. Editorial Tébar, S. L, Madrid. P: 467-476.

Cisneros Pérez, C. (2010). Identificación y caracterización de cepas degradadoras de fenol. Tesis de maestría no publicada. Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.

Donal Voet. Judith G. Voet. 2004. Bioquímica. 3ra. Edición. Editorial Buenos aires. Medica panamericana S.A . P:1084-1085.

E. M. F. De Robertis., Hib J. (2001). Biología celular y molecular. 3ra. Edición. Editorial. El Ateneo .Buenos aires, Argentina. P: 405-412.

Fátima M. S Moreira. E Jeroen Huising. David E. Bignell. 2012. Manual de Biología de suelos tropicales. Muestreo y caracterización de la biodiversidad bajo suelo. 1ra. Edición. Instituto Nacional de ecología, México. P: 197-198.

González, D. (1998). Marcadores moleculares para los estudios comparativos de la variación en ecología y sistemas. 14; 1-21.

Hill GT. Mitkowski NA. Aldrich Wolfe L. Emele LR. Jurkoine DD. Ficke A. Maldonado Ramirez S. Lynch ST. Nelson EB. 2000. Methods for assessing the composition of soils microbial communities.

López Carrascosa, J. y Modrego, A. (1994). La biotecnología y su aplicación industrial en España. 1ra. Edición. Editorial, S.A. P: 131-134.

Maddison, D.R., Schulz, K.S., Maddison, W.P. 2007. The tree of life web project. Zootaxa, 19-40.

Martínez, R. A. y Carrillo Castellanos, R. J. (1998). Criterios Fundamentales Para Resolver Problemas de Resistencia de Materiales. Volumen II. 1ra. Edición. Editorial SEDIP-PROVITA. Baruta. Miranda. P: 62-63.

Moritz, C. 1994. Defining evolutionarily-significant-units for conservation. Trends in Ecology and Evolution 9:373-375.

Picazo, J. J., García Rodríguez, J.A. (1999). Compendio de microbiología médica. Editorial Harcourt, S.A. Madrid, España. P: 129-130.

Olive D.M. Bean P. 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. J Clin Microbiol. 37:1661-1669.

Owens, I.P.F., Bennett, P.M. 2000. Ecological basis of extinction risk in birds: Habitat loss versus human persecution and introduced predators. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97:12144-12148.

ROCHA S., P.J. 2003. ; Marcadores moleculares, una herramienta útil para la selección genética de la palma de aceite (Colombia) v.23 no.3, p.9-17.

Ruíz, A. (2012). Biorremedación de aguas contaminadas por compuestos hidrosolubles de gasolina. 66 pp.

Ruda de Schenquer, E.E., MOngielio, A.,Acosta, A.(2004). Contaminación y salud del suelo. Editorial. UNL. Santa fé, república de Argentina.P:39-41.

Sáez, A.G. 2009. Genes y especies. Ecosistemas 18(1):3-9.

Trujillo Ramírez O. I. (2006). Análisis de pesticidas por cromatografía de gas, un modelo operacional.1ra. Edición. Universidad Nacional de Colombia Sede Manizales. P: 19-22.

Van der Meer, J.R. (1994). Genetic adaptation of bacteria to chlorinated aromatic compounds.15: 239-249.

Van der Meer, J.R., De Vos W. M., Harayama, S., Zehnder A. J. (1992). Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds.56 (4):677.

Welsh J. Mc Cellad M.1990. Fingerprinting genome using PCR with arbitrary primer. Nucleic Acids Res, 18:7213-8.

. Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A. and Lane, D.J. 1991. *16S ribosomal amplication for phylogenetic study*. J. Bacteriol. 173, 697^703.

## XII. Anexos

Anexo A. Resiembra de la cepa OTEC 02.



Anexo B. Electroforesis y extracción de ADN.



Anexo C. Tinción de Gram.

