

BIODEGRADACION DE BENCENO POR *Planococcus* sp. UNA BACTERIA PERILITICA QUE HABITA EN EL DESIERTO DE LA JOYA- AREQUIPA.

Jani Pacheco Aranibar^{2,3}, Julio Bernabé Ortiz^{1,2}

(1)Universidad Católica de Santa María. Arequipa-Perú

(2)Centro de Biología Molecular, Universidad Nacional de San Agustín. Arequipa Perú.

(3)Instituto de Biotecnología del ADN Uchumayo. Arequipa – Perú

RESUMEN: *Planococcus* sp. una bacteria aislada de rocas de cuarzo del desierto de la Joya, fue caracterizada mediante métodos bioinformáticos, moleculares y microbiológicos. Nuestros estudios en laboratorio demuestran que esta bacteria es capaz de degradar Benceno en condiciones medioambientales; esta propiedad biodegradativa de *Planococcus*, una especie extremofila, es reportada por primera vez y podría explotarse para biorremediación de suelos y aguas contaminados con hidrocarburos aromáticos.

Palabras Clave: Biodegradación Benceno, Desierto Joya, *Planococcus*.

ABSTRACT: *Planococcus* sp. A perilitic bacterium isolated from quartz rocks from the desert of La Joya, was characterized by bioinformatic, molecular and microbiological methods. Our result a laboratory studies level show that this bacterium is capable of degrading Benzene under environmental conditions; This biodegradative property of *Planococcus*, an extremophile species, is reported for the first time and could be exploited for bioremediation of soils and waters contaminated with aromatic hydrocarbons.

Keywords: Benzene Biodegradation, Joya Desert, *Planococcus*.

INTRODUCCIÓN

Los hidrocarburos aromáticos monocíclicos (MAH), están constituidos por un anillo benceno y se diferencian entre ellos por las sustituciones de radicales, el más simple de los MAH es el Benceno formado por un anillo sin ninguna sustitución, otros compuestos más comunes son el Tolueno, metilbenceno, Xileno, etc. Los MAH son relativamente solubles en agua y distribuidos ampliamente en casi todo los ecosistemas, y son considerados agentes mutagénicos y carcinogénicos por la agencia internacional para investigación en cáncer (IARC)(1,2).

El benceno fue usado históricamente en la industria de la imprenta, como solvente de compuestos orgánicos de los colorantes, también como aditivo de la gasolina sin plomo (3). En la actualidad se usa mucho para la fabricación de metacrilatos, fenol, ciclohexano, anilina, alquil benceno, chlorobenzenos, y otros productos usados en medicinas, colorantes, insecticidas y plásticos (4).

Las principales fuentes de emisión de benceno ambiental son el parque automotriz, el humo del tabaco, evaporación de colorantes de impresión, refinación del petróleo; debido a su solubilidad en agua, puede quedarse almacenado en aguas subterráneas, los ríos o suelos y filtrado al subsuelo (5), constituyendo un contaminante peligroso y más aún al catalogarse como un agente cancerígeno (2). Muchos métodos han sido probados para lograr su degradación; dentro de ellos la biodegradación están siendo muy estudiada, a la fecha se ha reportado su degradación utilizando variedad de microorganismos como *Azoarcus* sp (6),

y *Bacillus cereus* (7) y recientemente una bacteria *Peptococcaceae* (8,9), sin embargo en nuestra región no han sido descrito bacterias que degradan benceno, ni mucho menos extremofilas que habitan en el desierto. Además es importante explorar por nuevas bacterias que puedan degradar el benceno con la misma eficacia y de esta forma poder estudiar la transformación de productos formados durante su biodegradación.

Nosotros identificamos una bacteria aislada en la zona "mar de cuarzo" que se encuentra en el desierto de la Joya Arequipa- Perú y el principal objetivo en este trabajo es evaluar su capacidad biodegradativa frente al benceno, en condiciones de laboratorio.

MATERIAL Y MÉTODOS

Medios para aislamiento y cultivo de *Planococcus* sp.

Los medios para su aislamiento fue el Minimal Salt Medium (MSM) compuesto por Na₂HPO₄· 2H₂O (3.0 g/l), KH₂PO₄ (1.5 g/l), (NH₄)₂SO₄ (0.5 g/l), MgCl₂·6H₂O (0.1 g/l), CaCl₂ (0.02 g/l), y elementos traza I(1 mL/L). la solución de elementos traza I contiene EDTA (0.5 g/l), FeSO₄·7H₂O (0.2 g/l), elementos traza II (100 mL). la solución de elementos traza II contiene H₃BO₃ (0.3 g/l), MnCl₂·4H₂O (0.03 g/l), CoCl₂· 6H₂O (0.2 g/l), ZnSO₄·7H₂O (0.1 g/l), Na₂MoO₄·2H₂O (0.03 g/l), NiCl₂·6H₂O (0.02 g/l), and CuCl₂· 2H₂O (0.01 g/l). El medio fue esterilizado por autoclavado antes de uso y el pH fue mantenido a 7.

Aislamiento y cultivo de *Planococcus* sp.

Las muestras fueron tomadas de la zona mar de cuarzo, ubicada en el desierto de la joya, departamento de Arequipa – PERU.

Una roca de cuarzo fue levantada del suelo del desierto y la zona del cuarzo que estuvo en contacto con el suelo, aspecto marrón, fue raspada con la ayuda de un bisturí estéril y la tierra obtenida del raspado

Correspondencia:

Dra. Jani Pacheco Aranibar
Centro de Biología Molecular, Universidad Nacional de San Agustín. Arequipa - Perú.
Instituto de Biotecnología del ADN Uchumayo, Arequipa - Perú
E-mail: jparanibar@hotmail.com

fue colectada en un bolsa estéril, rotulada y llevad al laboratorio para su cultivo.

La tierra colectada fue mezclada con 1 ml de PBS estéril conteniendo 0.01% de tritón X100, después de una agitación vigorosa, y centrifugación, el sobrenadante fue sembrado en medio MSM e incubado a 25°C por 3 días, las colonias que crecieron fueron asiladas y repicadas por 5 veces hasta obtener un cultivo puro.

Identificación Molecular.

Muestras de cultivo puro fueron usadas para el aislamiento de ADN, usando el método fenol-cloroformo. El ADN correspondiente a la región rRNA16S fue amplificado utilizando primers universales mediante la técnica de PCR, los ampliaciones purificados fueron utilizados para su secuenciación. La secuencia fue utilizada para encontrar su homólogos mas cercanos mediante el Software Blast.

Caracterización Microbiológica.

Muestras de cultivo puro fueron sembrados en Agar nutritivo para la caracterización microbiológica, pruebas de Gram, TSI LIA, INDOL, entre otros.

Enzayos de Degradacion de Benceno.

Para la degradacion de benceno se utiliza en metodo espectrofotometrico, y la cuantificacion se hace en base a un factor de calibracion elaborado con diferentes concentraciones de benceno y medidas su absorbancia 261 nm en el espectro UV.

RESULTADOS

Caracterización microbiológica,

la cepa aislada es Gram positiva y presenta las siguientes características para LIA: Producción de CO₂ positivo, Lisina: negativo Descarboxilacion: positivo, Desaminación: negativo y producción de H₂S: negativo. Para TSI: producción de CO₂ positivo, producción de Glucosa: negativo, producción de Lactosa: negativo y producción de H₂S: negativo, tiene capacidad proteasa.

TABLA Nro.1
Pruebas Bioquímicas de la Cepa aislada

Prueba	CEPA 24	Control <i>Proteus vulgaris</i>
SIM	Sulfuro	-
	Indol	-
	Motilidad	-
Citrato de Simmons	-	+
LIA	No produce gas Alcalino K/K	desaminación
TSI	Produce gas K/K	A/A
Agar Sangre	No hemolisis	efecto hauch
GRAM	+	-

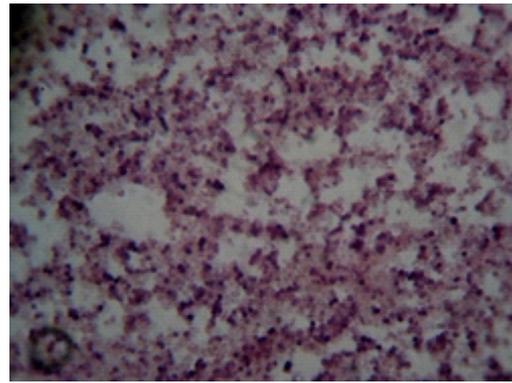


Fig. Nro.1. tinción de GRAM 100X. la Cepa Aislada muestra bacterias en forma de cocos

Identificación Molecular de *Planococcus* sp.

Para la caracterización molecular de *Planococcus* se uso la secuencia del Gen RNA ribosomal 16S y los software descritos en material y métodos.

La secuencia del gen RNA ribosomal 16S de la cepa Joya-2006-3 fue parcial, y su posición taxonomica fue lograda con el software Blast del NCBI (Nacional Center Biotechnology Information) tomando como base la homologia de su secuencia con otras secuencias de la base de datos.

El análisis bioinformático de las secuencias obtenidas de las cepas *Planococcus joya* nos indica que es una nueva especie de *Planococcus* al compararse con las diferentes especies descritas en el GenBank. *Planococcus joya* es un grupo divergente del grupo de las especies *Planococcus* sp. y *Planococcus maritimus*.

Biodegradacion de Benceno.

Para el estudio de su actividad degradativa, la cepa aislada fue incubada en medio MSM conteniendo 2.5 mM de benceno, e incubada a 25 °C en agitacion constante. Cada 12 horas se tomaron alicuotas para medir la concentración de Benceno y ademas el crecimiento bacteriano.

La cepa fue capaz de degradar 190 mg/L de Benceno en 36 horas días y el máximo crecimiento bacteriano se alcanzó a esta concentración.

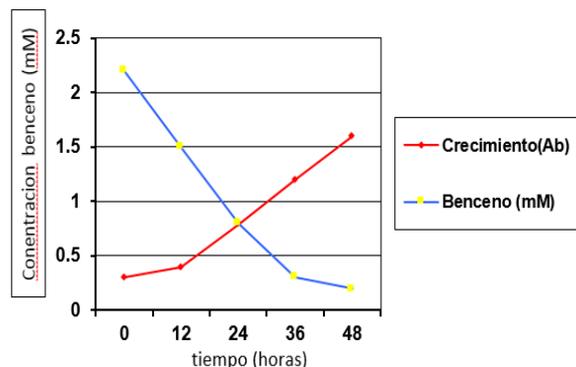


Fig. Nro.1. Degradación de Benceno durante 24 h en presencia de *Planococcus* sp.

DISCUSION

El análisis bioinformático de las secuencias obtenidas de las cepas denominadas Joya2006-03 mostró que esta relacionada a especies del género *Planococcus*.

Los porcentajes de homología entre secuencias de ADNr 16S superaron el 97%. Su morfología microscópica corresponde a cocos Gram positivos (10) como la observada en las Figuras 1. Anteriormente se ha reportado la presencia del género *Planococcus* en otros desiertos alrededor del mundo, con condiciones extremas de aridez y radiación solar, como en el desierto frío del Himalaya (11) con capacidad de degradar alcanos lineales y ramificados (12) e hidrocarburos aromáticos por microorganismos extremófilos (13).

Los estudios Biotecnológicos de esta bacteria muestra que tiene propiedades degradativas de compuestos aromáticos como el benceno. Este contaminante presente en el suelo, subsuelo, agua (4, 5, 6,) derivados de las fuentes como el parque automotriz e industria de imprenta, pueden llegar a los humanos y producir cáncer (1,2). Muchas investigaciones pertinentes a la degradación de compuestos aromáticos como el benceno ha resultado en una buena documentación de una diversa microflora (6,7), sin embargo solo dos reportes muestran la habilidad de *Planococcus* sp, nosotros en nuestros hallazgos mostramos que la cepa *Planococcus* sp. Que habita en el desierto de la Joya de Arequipa es capaz de degradar Benceno.

En conclusión, la cepa aislada del desierto de la Joya se ubica taxonómicamente como *Planococcus* sp. tiene la habilidad de degradar compuestos aromáticos como el Benceno bajo condiciones ambientales.

En adición, investigaciones futuras de cultivos puros de esta especie se convertirán en una alternativa de bacterias utilizadas para la biorremediación de suelos y aguas contaminadas con compuestos aromáticos.

REFERENCIAS

- [1] Agents Classified by the IARC Monographs, Volumes 1 – 111. Available online: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/ClassificationsAlphaOrder.pdf>.
- [2] H. Bartsch* and L. Tomatis*. Environmental Health Perspectives Vol. 47, pp. 305-317, 1983 Comparison between Carcinogenicity and Mutagenicity Based on Chemicals Evaluated in the IARC Monographs
- [3] Williams PRD, Panko JM, Unice K et al. (2008). Occupational exposures associated with petroleum-derived products containing trace levels of benzene. *J Occup Environ Hyg*, 5: 565–574. doi:10.1080/15459620802282110 PMID:18615290
- [4] Wang, Y., Yan, G., Wang, Q., Chen, C., Li, M., & Guo, S. (2015). Refining wastewater treatment using EGSB-BAF system. *Desalination and Water Treatment*, 53(10), 2808–2815.
- [5] Chen K-F, Chang Y-C, Huang S-C (2012) Biodegradation potential of MTBE and BTEX under aerobic, nitrate reducing, and methanogenic conditions at a gasoline-contaminated site. *Desalin Water Treat* 48:278–284. doi:10.1080/19443994.2012.698825
- [6] Kasai Y, Takahata Y, Manefield M, Watanabe K (2006) RNA-based stable isotope probing and isolation of anaerobic benzene-degrading bacteria from gasoline-contaminated groundwater. *Appl Environ Microbiol* 72:3586–3592. doi:10.1128/aem.72.5.3586-3592.2006
- [7] Dou J, Ding A, Liu X, Du Y, Deng D, Wang J (2010) Anaerobic benzene biodegradation by a pure bacterial culture of *Bacillus cereus* under nitrate reducing conditions. *J Environ Sci* 22:709–715. doi:10.1016/S1001-0742(09)60167-4
- [8] van der Zaan BM, Saia FT, Stams AJ, Plugge CM, de Vos WM, Smidt H, Langenhoff AA, Gerritse J (2012) Anaerobic benzene degradation under denitrifying conditions: Peptococcaceae as dominant benzene degraders and evidence for a syntrophic process. *Environ Microbiol* 14:1171–1181. doi:10.1111/j.1462-2920.2012.02697.x
- [9] Tian, M., Du, D., Zhou, W., Zeng, X., & Cheng, G. (2017). Phenol degradation and genotypic analysis of dioxygenase genes in bacteria isolated from sediments. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(2), 305–313. <http://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.12.002>
- [10] ENGELHARDT M., DALY K., SWANNELL R., HEAD I. 2001. Isolation and characterization of a novel hydrocarbon-degrading, Gram-positive bacterium, isolated from intertidal beach sediment, and description of *Planococcus alkanoclasticus* sp. nov. *J Appl Microbiol*, 90(2):237-47.
- [11] MAYILRAJ S., SURESH K., KROPPESTEDT RM., SAINI HS. 2006 *Dietzia kunjomensis* sp. nov., isolated from the Indian Himalayas. *Int J Syst Evol Microbiol* 56(Pt 7):1667-71.
- [12] Dalvi, S., Azetsu, S., Patrauchan, M. A., Aktas, D. F., & Fathepure, B. Z. (2012). Proteogenomic Elucidation of the Initial Steps in the Benzene Degradation Pathway of a Novel Halophile, *Arhodomonas* sp. Strain Rozel, Isolated from a Hypersaline Environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(20), 7309–7316. <http://doi.org/10.1128/AEM.01327-12>
- [13] Dalmaso, G. Z. L., Ferreira, D., & Vermelho, A. B. (2015). Marine Extremophiles: A Source of Hydrolases for Biotechnological Applications. *Marine Drugs*, 13(4), 1925–1965. <http://doi.org/10.3390/md13041925>

Recibido el 20 de junio del 2017 y aceptado para su publicación el 30 de junio del 2017