

Análisis comparativo de la homología en el gen de la azoreductasa para diferentes taxones de bacterias.

Alejandro Pérez Muñoz¹, Federico Ramírez Molina¹

Marco teórico

La contaminación ambiental es una de las principales preocupaciones en el mundo moderno. Industrias con un amplio poderío en el mercado vierten colorantes en aguas residuales como resultado de sus procesos productivos, contaminando el medio ambiente con efluentes caracterizados por olores fuertes y persistentes; además, se aumenta drásticamente la Demanda Biológica de Oxígeno (DBO), lo que da cuenta de la alteración en el micro-ecosistema [1]. Específicamente, en los últimos años, la industria textil ha evidenciado un crecimiento exponencial a nivel global. Como tal, los ingresos totales anuales de la industria han aumentado en aproximadamente un 60% cada 5 años [2]. Particularmente en Colombia, el incremento ha sido de aproximadamente un 8% de añadido a la manufactura cada año según cifras del banco mundial de datos [3]. Esto, es de gran preocupación debido a la gran cantidad de recursos que necesita esta industria, consumiendo aproximadamente 2000 litros de agua, 4kWh de energía y liberando 23kg de gases invernadero por cada kilogramo de textil producido [4].

A su vez, la carga contaminante se intensifica en las aguas residuales derivadas de la producción industrial de textiles, a razón de que se utilizan diversa cantidad de colorantes que en su mayoría son difíciles de degradar gracias a su compleja estructura química [5][6]. De hecho, se estima que globalmente se producen alrededor de 450000 y 750000 toneladas de colorantes y entre un 1 y 15% de estos son vertidos a través de efluentes industriales [7]. La mayoría de estos colorantes sintéticos inorgánicos utilizados en la industria textil son los de tipo azo, que comúnmente son de bajo costo y propiedades deseadas para la aplicación a los textiles [8]. Además, la presencia de los colorantes en las aguas residuales no solo genera un deterioro aparentemente estético del ambiente, sino que también intervienen de manera negativa en procesos ecológicos que allí suceden como lo son la fotólisis, disminuyendo la disociación de moléculas orgánicas complejas con la radiación solar; y la fotosíntesis, a partir de esta misma disminución en la incidencia de la luz, derivando en una menor cantidad de oxígeno disponible en el agua generando un detrimento de la biota acuática [9][5][10]. Incluso, anteriormente se ha demostrado que los colorantes azo pueden ser carcinogénicos y mutagénicos, además de significativamente toxicológicos gracias a que las aminas aromáticas que derivan de la ruptura del enlace azo son conocidas por su potencial carcinogénico [11].

En este sentido, son amplias las técnicas que se han estudiado para la resolución de la problemática entre manos. Métodos fisicoquímicos de decoloración, tales como la adsorción, técnicas de membrana., coagulación-floculación, y oxidación. Estos son ampliamente efectivos para la remoción de colorantes; sin embargo, denotan incapacidad para algunos reactivos y de tina [12][13][14]. Asimismo, en los tratamientos químicos es evidente un uso excesivo de productos de alto costo y nocivos, pues producen como resultado del proceso de

remoción, contaminación secundaria. Estos métodos solo pueden transferir el colorante de una fase a otra dejando el problema esencialmente sin resolver [15|16].

Ahora bien, los procesos biológicos se plantean como una tentativa en contraposición a las tecnologías existentes para muchos propósitos. Son variados los reportes de acción por fuentes microbianas, incluidos hongos, bacterias, levaduras, algas y actinomicetos [17]. Además, los microorganismos extremófilos se aplican ampliamente en el tratamiento de aguas residuales, debido a su capacidad para sobrevivir en condiciones específicas que representan un factor limitante para los microorganismos mesófilos [18]. Comúnmente, la biodegradación de los colorantes es regida por dos mecanismos: decoloración directa o decoloración indirecta/mediada. El principio de ambos mecanismos es fundamentado en la acción enzimática [19]. De este forma, la degradación de sustancias orgánicas complejas por diferentes enzimas, incluidas lacasa, azoreductasa, lignina peroxidasa, NADH-DCIP reductasa, y hexano oxidasa [20|21]. Particularmente, las familias de enzimas de lacasas y azoreductasas han demostrado un potencial significativo en cuanto a la decoloración de una amplia gama de colorantes industriales conocidos. La biodegradación de colorantes principalmente azo se debe a la reducción de los enlaces azo ($-N=N-$) por las enzimas azoreductasas en condiciones anaeróbicas [22]. En medio de este proceso, se transfieren cuatro electrones de los donantes de electrones al aceptor de electrones (colorante azo) en dos etapas en el enlace azo, lo que da como resultado la decoloración del colorante y la generación de aminas incoloras. Los metabolitos generados o las aminas aromáticas se degradan aún más de forma aeróbica o anaeróbica [23].

Pregunta problema

¿Existe homología por parte del gen codificante de la azoreductasa en diferentes taxones de bacterias?

Objetivos

General

Evaluar la conservación y homología del gen codificante de la azoreductasa en diferentes taxones de bacterias.

Específicos

- Recopilar información de taxones variados a través de la plataforma del NCBI.
- Realizar un múltiple alineamiento para el gen en diferentes taxones de bacterias.
- Construir un cladograma que de cuenta de la relación filogenética de las taxas seleccionadas.

Metodología

Inicialmente, se realizó una búsqueda en la plataforma de una cantidad limitada de secuencias propias del gen que codifica a la azoreductasa. De esta manera, se construyó una base de 26 secuencias de variadas taxas bacterianas para su análisis posterior, así:

- Búsqueda de secuencias

The screenshot shows the NCBI Gene database search results for 'Azoreductase Bacteria S'. The search results are displayed in a tabular format, showing the protein sequence, description, location, and aliases. The search results are filtered by 'Current' status and 'Show additional filters'.

Gene [Create RSS](#) [Save search](#) [Advanced](#) [Help](#)

Gene sources: Genomic, Plasmids, Categories: Annotated genes, Protein-coding, Sequence content: RefSeq, Status: ☒ Current, [Clear all](#), [Show additional filters](#)

Tabular 20 per page Sort by Relevance Send to:

Filters: [Manage Filters](#)

Results by taxon

Top Organisms [\[Tree\]](#)

- [Priestia aryabhatai](#) (5)
- [Priestia megaterium](#) (5)
- [Paenibacillus iibetiae](#) (5)
- [\[Brevibacterium\] frigoritolerans](#) (4)
- [Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168](#) (4)
- [All other taxa](#) (521)

More...

Find related data

Database:

Search details

(Azoreductase[All Fields] AND ("Bacteria"[Organism] OR Bacteria[All Fields])) AND alive[prop]

[See more...](#)

PROTEIN SEQUENCE Was this helpful?

[FMN-dependent NADH-azoreductase](#)

[Bacillus](#)

FMN-dependent NADH-azoreductase catalyzes the reductive cleavage of the azo bond in aromatic azo compounds to form the corresponding amines; requires NADH, but not NADPH, as an electron donor

WP_000522510.1

[Protein family](#) [RefSeq protein](#) [Identical protein groups](#)

Search results

Items: 1 to 20 of 544

[See also 2392 discontinued or replaced items.](#)

[<< First](#) [< Prev](#) Page of 28 [Next >](#) [Last >>](#)

Name/Gene ID	Description	Location	Aliases
<input type="checkbox"/> azoR2 ID: 877936	FMN-dependent NADH-azoreductase [<i>Pseudomonas</i>	NC_002516.2 (2145894..2146502)	PA1962

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>

The following sections contain reference sequences that belong to a specific genome build. [Explain](#)

Reference assembly

Genomic

1. **NZ_CP026116.1 Reference assembly**

Range	1429724..1430344 complement
Download	GenBank , FASTA , Sequence Viewer (Graphics)

- [Klebsiella pneumoniae subsp. pneum...](#)
- [Pseudomonas aeruginosa PAO1](#)
- [Bacillus atrophaeus subsp. globigii str...](#)
- [Bacillus amyloliquefaciens IT-45](#)
- [Bacillus subtilis subsp. spizizenii](#)
- [Shewanella baltica OS678](#)
- [Pectobacterium atrosepticum strain 2...](#)
- [Serratia plymuthica AS9](#)
- [Bacillus cereus strain BC33](#)
- [Mycoplasma gallisepticum VA94_7994..](#)
- [Yersinia ruckeri strain KMM821](#)
- [Klebsiella quasipneumoniae strain Kq...](#)
- [Pantoea agglomerans strain FDAARG...](#)

En segunda instancia, se planteó el uso de dos vías para la obtención de un alineamiento y su posterior uso, con la finalidad de construir un árbol filogenético para los taxones seleccionados.

- Uso de ClustalOmega para el alineamiento y la obtención de la filogenia. Con ayuda de los archivos Fasta recolectados de la NCBI, se realizó un alineamiento de múltiples secuencias en la plataforma mencionada.

Clustal Omega

[Input form](#)[Web services](#)[Also in this section](#)

[Feedback](#)

Tools > Multiple Sequence Alignment > Clustal Omega

Multiple Sequence Alignment

Clustal Omega is a new multiple sequence alignment program that uses seeded guide trees and HMM profile-profile techniques to generate alignments between **three or more** sequences. For the alignment of two sequences please instead use our [pairwise sequence alignment tools](#).

Important note: This tool can align up to 4000 sequences or a maximum file size of 4 MB.

STEP 1 - Enter your input sequences

Enter or paste a set of

DNA

sequences in any supported format:

>NZ_CP071802.1.1910301-1910906 Yersinia ruckeri strain KMM821 chromosome, complete genome
ATGAGTAAAGTTCTGGTTCTGAAATCAAGCATTCTGGCAACGCACCTCACAGTCCAAATCAATTGGCCGATT
TTTTTGTGAAAGATGAAAACTGCCACGTGGGTGACGAAATCACGTTTGTGACCTGGCGGCTCAACC
GATTCTGTATTAGACGGTGAACCTGGTTGGTGCAATTGCCGCCCTTCCGGTGACACCCGTGACTCCACGTGAG
CAACAAGCTCTCGCCCTCTCTGACGAATTGATTGCCGAGCTGCAAGCCCATGACGTGATCGTGATAGCAG
CACCGATGTACAACTTCAACATCCCAACTCAATTGAAGAATTATTTGATCTGATTGCTCGTGGCGGT
GACGTTCCGCTATACAGAAATGCCCGAGAGGTCTGGTGACCGGCAACGTGCAATTGTGCTGACCAGC

Clustal Omega

[Input form](#)[Web services](#)[Help & Documentation](#)[Bioinformatics Tools FAQ](#)

[Feedback](#)

Tools > Multiple Sequence Alignment > Clustal Omega

Results for job clustalo-l20220422-070521-0677-9048459-p1m

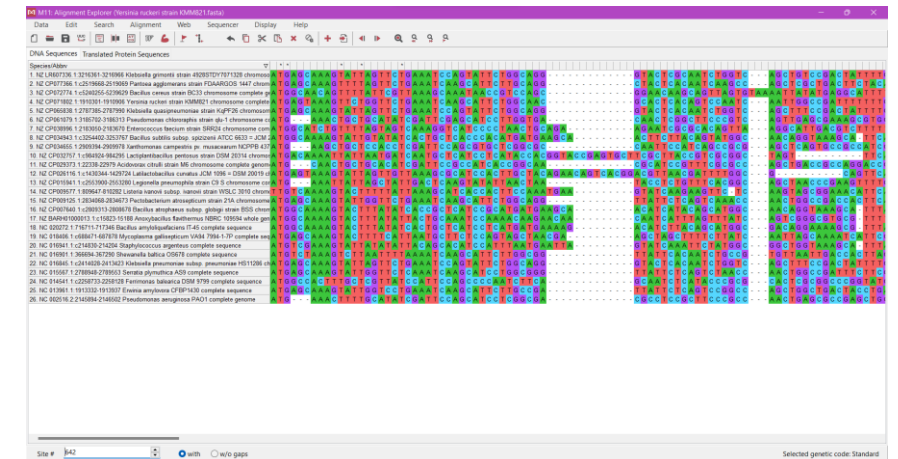
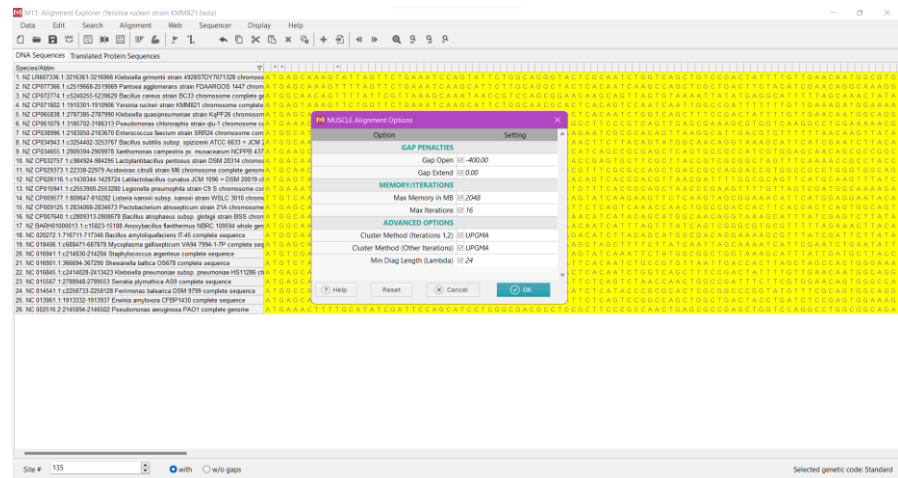
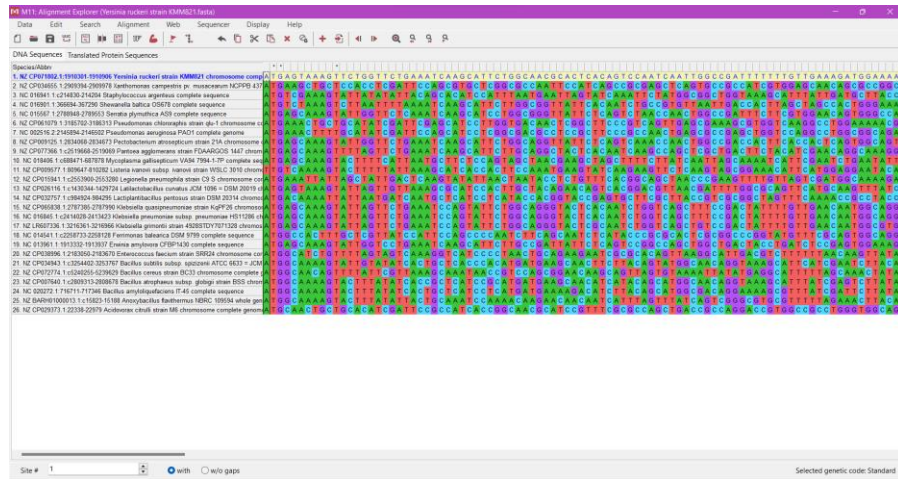
[Alignments](#)[Result Summary](#)[Guide Tree](#)[Phylogenetic Tree](#)[Results Viewers](#)[Submission Details](#)

[Download Alignment File](#)

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

NZ_CP015941.1:c2553900-2553280	---ATGAATATTAGCTATTGACTCAAGTATATTA---ACTAATACCTCTGTTTCACGG	54
NC_016901.1:366694-367290	ATGTCTAAAGTCTTAATTTTAAATCAAGCATTCTT---GGCGGTATTCACAATCTGCC	57
NC_013961.1:1913332-1913937	ATGAGCAAAGTATTGGTCTGAAATCAAGCATTCTT---GCCGATTATTCTCAGTCCGGC	57
NZ_CP077366.1:c2519668-2519069	ATGAGCAAAGTTTTAGTTCTGAAATCAAGCATTCTT---GCAGGTACTCAGATCAAGC	57
NC_CP089125.1:2834068-2834673	ATGAGCAAAGTATTGGTCTGAAATCAAGCATTCTG---GCAGGTATTCTCAGTCAAAAC	57
NZ_CP071802.1:1910301-1910906	ATGAGTAAAGTTCTGGTTCTGAAATCAAGCATTCTG---GCACGCACTCACAGTCCAAT	57
NC_015567.1:2788948-2789553	ATGAGCAAAGTATTGGTCTCAATCAAGCATTCTG---GCGGGTATTCTCAGTCTAAC	57
NZ_LR007336.1:3216361-3216966	ATGAGCAAAGTATTAGTTCTGAAATCCAGTATTCTG---GCAGGTAATCTGCAATCTGGT	57
NZ_CP065838.1:2787385-2787990	ATGAGCAAAGTATTAGTTCTGAAATCCAGTATTCTG---GCAGGTAATCTGCAATCTGGT	57
NC_016845.1:c2414028-2413423	ATGAGCAAAGTATTAGTTCTGAAATCCAGTATTCTG---GCAGGTAATCTGCAATCTGGT	57
NC_014541.1:c2258733-2258128	ATGGCCACTTTGCTCGTTATCCATTCCAGCCCCAAT---CTTCAGCAATCTCATCCCGC	57
NZ_CP034655.1:2909394-2909978	---ATGAAGCTGCTCCACCTCGATTCCAGCGTGCTC---GGCGCCAATTCATCAGCGCG	54
NZ_CP029373.1:22338-22979	---ATGCAACTGCTGCATCGATTCCGCGATCAC---GGCAAGCGATCCGTTTCGGCG	54
NZ_CP061079.1:3185782-3186313	---ATGAAGTCTGTCATATGATTCAGCATCTCT---GGTGAACACTCGGTTCCCGT	54
NC_002516.2:2145894-2146502	---ATGAACCTTTTCATATGATTCAGCATCTCT---GGCAGCGCTCCGCTCCCGC	54

- Paulatinamente, a través de la herramienta MEGA, se realizó un alineamiento basado en MUSCLE y se procedió con la reconstrucción de un árbol filogenético de máxima verosimilitud. Con ayuda de los archivos Fasta recolectados de la NCBI, se realizó un alineamiento de múltiples secuencias en la plataforma mencionada.

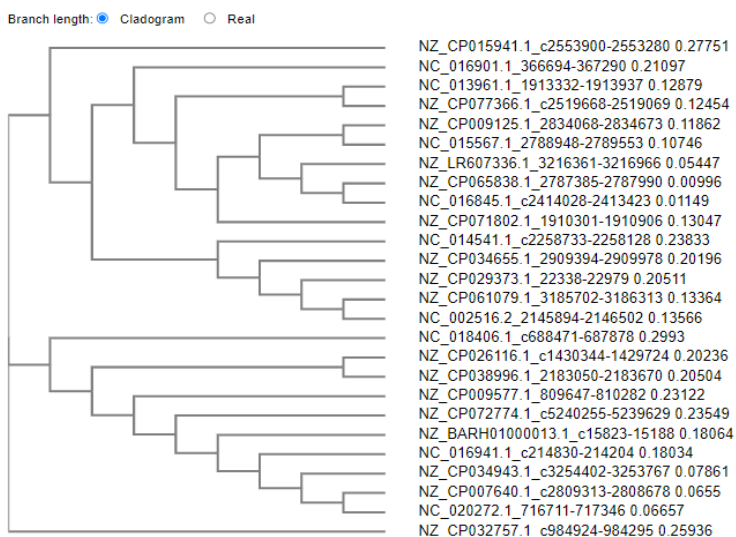


Resultados y Discusión

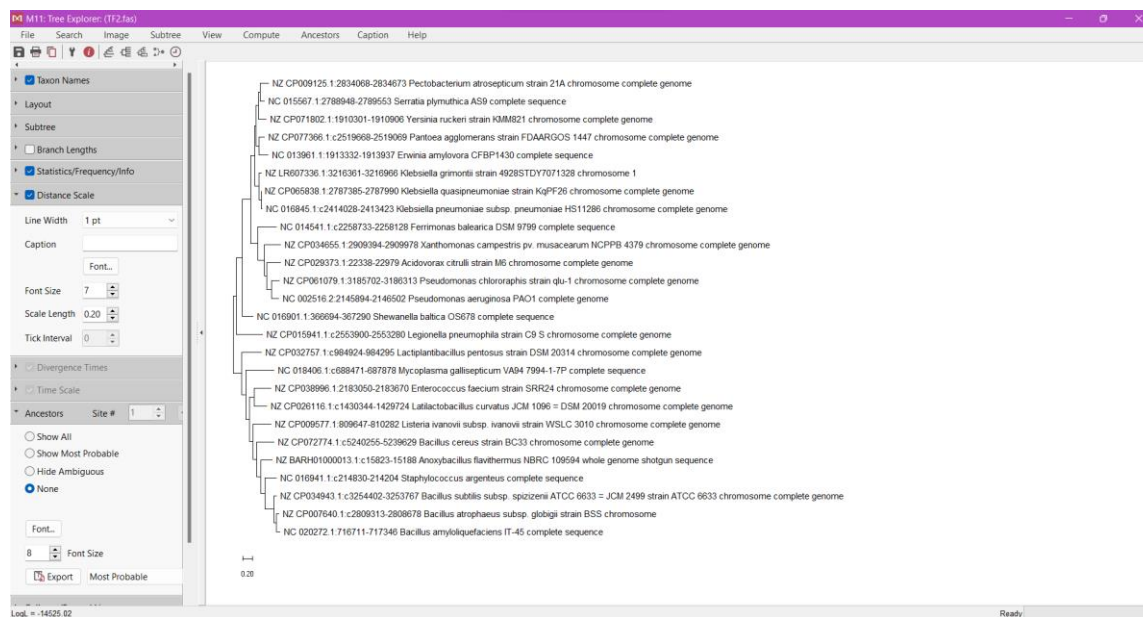
El diseño experimental permite la comparación de resultados entre ambas herramientas (ClustalOmega – MEGA), para este caso, se denotan cambios en los árboles filogenéticos. No obstante, las relaciones entre algunos taxones se mantienen constantes, ver las figuras.

Phylogenetic Tree

This is a Neighbour-joining tree without distance corrections.

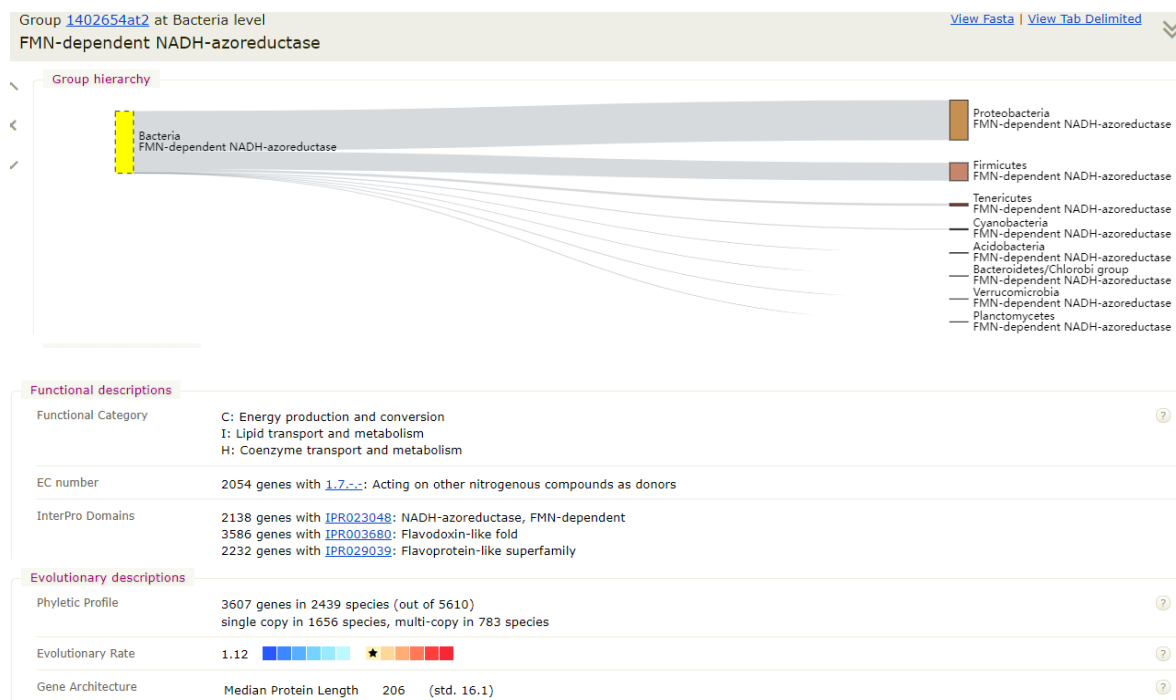


Filogenia obtenida con ClustalOmega.



Filogenia obtenida con MEGA.

También, se contrasta con la literatura, ya que se ha demostrado que este gen posee una amplia conservación en bacterias (ver figura anexa).



Extraído de <https://www.orthodb.org/?ncbi=1&query=23411381>

En la imagen anexa podemos observar la tasa de evolución, es decir, la medida de si este grupo ortólogo presenta niveles apreciablemente mayores o menores de divergencia de secuencias. Debido a que, se derivada de la cuantificación de la divergencia relativa entre sus genes miembros. Además, estas se calculan para cada grupo ortólogo como la media de las identidades entre especies normalizadas con respecto a la identidad media de todos los mejores resultados recíprocos entre especies, calculados a partir de alineaciones por pares de secuencias de proteínas.



Extraído de <https://www.orthodb.org/?ncbi=1&query=23411381>

Los resultados del alineamiento (ver el material anexo al informe, Alineamiento_APM&FARM) ejecutado dan cuenta de proteínas realmente estrechas por similitud en su secuencia, lo que da cuenta de un proceso evolutivo en el que la diversificación del gen mismo no ha sido tan drástica. No obstante, se observan discordancias entre secuencias (mismatches), por lo que se plantean dos posibles escenarios que justifiquen estos datos: el primero es un desarrollo del experimento donde no se alcanzó una curación excelsa de la información; por lo tanto, existe un margen de error en el análisis presentado por los resultados que se alcanzaron. En segunda instancia, se estaría tratando con un margen de divergencia por los algoritmos usados por cada herramienta, difiriendo el ClustalW del MUSCLE, logrando la obtención de datos discordantes. A pesar de este panorama, se plantea la hipótesis de una diversificación en pequeños fragmentos de la secuencia original por presiones evolutivas del ambiente, es decir, gracias a la diversidad de colorantes que es capaz de remover esta proteína, debe presentar ligeros cambios en sus dominios funcionales [24].

Conclusión

Este grupo es bastante variado y, dependiendo de la fuente en la que se encuentre, es decir, de qué organismo, e incluso especie, se obtenga, es posible observar diferencias, como en su actividad catalítica, requerimiento de cofactores y características biofísicas. Por ello, existe una especificidad entre el sustrato y los tipos de azoreductasas descritos hasta ahora, que varía en el requerimiento de cofactores y agentes reductores y en la capacidad de resistencia al oxígeno.

La mayoría de los colorantes azoicos tienen una masa molecular elevada y es poco probable que atraviesen la membrana plasmática de las células. Por lo tanto, los microorganismos tienen un mecanismo de reducción relacionado con el transporte de electrones de los colorantes azoicos en el medio extracelular, por lo que es necesaria la conexión entre el sistema de transporte de electrones intracelular y las moléculas de colorante para que se produzca la degradación. Sin embargo, la acción de las azoreductasas en el medio intracelular también se ha identificado y se han encontrado enzimas de este grupo en bacterias, incluso en microorganismos halófilos y halotolerantes.

Referencias

- [1] Jadhav, I., Vasniwal, R., Shrivastav, D., & Jadhav, K. (2016). Microorganism-Based Treatment of Azo Dyes. *Journal of Environmental Science and Technology*, 9(2), 188–197. <https://doi.org/10.3923/jest.2016.188.197>
- [2] World Bank. (2019). “Textiles and clothing (% of value added in manufacturing) - Colombia”. *World development indicators*. The World Bank Group. Retrieved from data.worldbank.org/indicator/NV.MNF.TXTL.ZS.UNlocations=CO&name_desc=false. Accessed 16 abr. 2022

- [3] Teng, P.Y. (2017). *Social innovation offers five golden opportunities to the apparel industry*. Kearney. <https://www.co.kearney.com/social-impact/article/?/a/social-innovation-offers-five-golden-opportunities-to-the-apparel-industry-article>
- [4] Drumond Chequer, F. M., de Oliveira, G. A. R., Anastacio Ferraz, E. R., Carvalho, J., Boldrin Zanoni, M. V., & de Oliveir, D. P. (2013). *Textile Dyes: Dyeing Process and Environmental Impact. Eco-Friendly Textile Dyeing and Finishing*. doi:10.5772/53659
- [5] Jaramillo, Ana, Jiménez, Sara, Merino, Andrés, & Hormaza, Angelina. (2014). OBTENCIÓN DE UN INÓCULO FÚNGICO PARA LA DEGRADACIÓN DE UN COLORANTE AZO POR FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 17(2), 577-585. Retrieved April 17, 2022, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-42262014000200029&lng=en&tlng=es.
- [6] A. Aristizábal, G. Perilla, J.A. Lara-Borrero & R. Diez (2020) KrCl y XeCl excilamps and LP-Hg lamp for UV and UV/H₂O₂ decolourization of dyes in water, *Environmental Technology*, 41:2, 238-250, DOI: 10.1080/09593330.2018.1494755
- [7] Khattab, T.A., Abdelrahman, M.S. & Rehan, M. Textile dyeing industry: environmental impacts and remediation. *Environ Sci Pollut Res* **27**, 3803–3818 (2020). <https://doi.org/10.1007/s11356-019-07137-z>
- [8] Gonzalez Garza, M. T., Barboza Perez, D., Vazquez Rodriguez, A., Garcia-Gutierrez, D. I., Zarate, X., Cantú Cardenas, M. E., ... Morones-Ramirez, J. R. (2016). *Metal-Induced Production of a Novel Bioadsorbent Exopolysaccharide in a Native Rhodotorula mucilaginosa from the Mexican Northeastern Region*. *PLOS ONE*, 11(2), e0148430. doi:10.1371/journal.pone.0148430
- [9] Villada, Y., & Hormaza, A. (2015). *Simultaneous analysis of the removal of brilliant blue and red 40 through spectrophotometric derivative*. *Ingeniería y Desarrollo*, 33(1), 38–58. doi:10.14482/inde.33.1.5526
- [10] Alves de Lima, R. O., Bazo, A. P., Salvadori, D. M. F., Rech, C. M., de Palma Oliveira, D., & de Aragão Umbuzeiro, G. (2007). *Mutagenic and carcinogenic potential of a textile azo dye processing plant effluent that impacts a drinking water source*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 626(1-2), 53–60. doi:10.1016/j.mrgentox.2006.08.002
- [11] Rai HS, Bhattacharyya MS, Singh J, et al. (2005). Removal of dyes from the effluent of textile and dyestuff manufacturing industry: a review of emerging techniques with reference to biological treatment. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 35(3) :219–238.

- [12] Ahmad A, Mohd-Setapar SH, Chuong CS, et al. (2015). Recent advances in new generation dye removal technologies: novel search for approaches to reprocess wastewater. *RSC Advances*. 5:30801–30818.
- [13] Robinson T, McMullan G, Marchant R, et al. (2001). Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresour Technol*. 77(3):247–255.
- [14] Jadhav J.P., Parshetti G.K., Kalme S.D., Govindwar S.P. (2007). Decolourization of azo dye methyl red by *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 463. *Chemosphere*. 68(2):394-400. doi: 10.1016/j.chemosphere.2006.12.087. Epub 2007 Feb 9. PMID: 17292452.
- [15] Solís M, Solís A, Pérez HI, et al. (2012). Microbial decolouration of azo dyes: a review. *Process Biochemistry*. 47(12):1723–1748.
- [16] Neifar M, Maktouf S, Ghorbel RE, et al. (2015). Extremophiles as source of novel bioactive compounds with industrial potential. In: Gupta V K, Tuohy MG, O'Donovan A, Lohani M, editors. *Biotechnology of bioactive compounds: sources and applications*. Wiley, Hoboken; 2015:245–268.
- [17] Neifar M, Chouchane H, Mahjoubi M, et al. (2016). *Pseudomonas extremorientalis* BU118: a new salt-tolerant laccase-secreting bacterium with biotechnological potential in textile azo dye decolourization. *3 Biotech*. 6,107.
- [18] Shanmugam B, Mahadevan S. (2015). Metabolism and biotransformation of azo dye by bacterial consortium studied in a bioreaction calorimeter. *Bioresour Technol*. 196:500–508.
- [19] Wang VB, Chua SL, Cai Z. (2014). A stable synergistic microbial consortium for simultaneous azo dye removal and bioelectricity generation. *Bioresour Technol*. 155:71–76.
- [20] Sarvajith M, Reddy GKK, Nancharaiah YV. (2018). Textile dye biodecolourization and ammonium removal over nitrite in aerobic granular sludge sequencing batch reactors. *J Hazard Mater*. 342:536–543.
- [21] Srisuwun A, Tantiwa N, Kuntiya A, et al. (2018). Decolorization of Reactive Red 159 by a consortium of photosynthetic bacteria using an anaerobic sequencing batch reactor (AnSBR). *Prep Biochem Biotechnol*. 48(4):303–311.
- [22] Yuan X, Zhang X, Chen X, et al. (2018). Synergistic degradation of crude oil by indigenous bacterial consortium and exogenous fungus *Scedosporium boydii*. *Bioresource technology*. 264:190–197.
- [23] Lade H, Kadam A, Paul D, et al. (2016). Exploring the potential of fungal-bacterial consortium for low-cost biodegradation and detoxification of textile effluent. *Archives of environmental protection*. 42:12–21.

[24] Sghaier I, Guembri M, Chouchane H, et al. (2019). Recent advances in textile wastewater treatment using microbial consortia. *J Textil Eng Moda Technol* . 5(3):134-146. DOI: 10.15406/jteft.2019.05.00194