

# **Reconstrucción universal de rutas de degradación de compuestos aromáticos**

**Samuel Jimena López**

Trabajo de Fin de Grado

Grado en Biología

2020-2021

## ÍNDICE

RESUMEN .....	pág 1
Palabras clave .....	pág 1
1- INTRODUCCIÓN .....	pág 1
1.1- Compuestos aromáticos .....	pág 3
1.2- Biodegradación de compuestos aromáticos.....	pág 4
1.3- <i>Pseudomonas putida</i> .....	pág 6
1.4- Perspectivas desde la biología de sistemas .....	pág 6
2- OBJETIVOS.....	pág 9
3- MATERIALES Y MÉTODOS .....	pág 9
3.1- Creación del modelo .....	pág 9
3.2- Análisis de flujos de carbono .....	pág 11
3.3- Rendimiento de carbonos .....	pág 11
3.4- Comparativa entre las rutas de degradación del benzoato .....	pág 12
4- RESULTADOS.....	pág 13
4.1- Modelo.....	pág 13
4.2- Análisis de flujos de carbono .....	pág 13
4.3- Rendimiento de carbonos .....	pág 15
4.4- Comparativa entre las rutas de degradación del benzoato .....	pág 17
5- Discusión.....	pág 18
5.1- Modelo .....	pág 18
5.2- Análisis de flujos de carbono .....	pág 19
5.3- Rendimiento de carbonos .....	pág 21
5.4- Comparativa entre las rutas de degradación del benzoato .....	pág 23
5.5- Conclusiones.....	pág 23
BIBLIOGRAFÍA.....	pág 24
ANEXOS.....	pág 30

## RESUMEN

Los compuestos aromáticos actúan como contaminantes en los ecosistemas provocando diversos perjuicios tanto al medio natural como a la salud humana. Las estrategias de biodegradación de estos compuestos pueden ser modeladas *in silico* para su posterior implementación *in vivo*. Se ha utilizado como base el metabolismo de la bacteria *Pseudomonas putida* KT2440 para realizar un modelo y, utilizando los métodos de COBRA, se ha analizado el potencial de degradación de ese modelo en un sistema bacteriano teniendo en cuenta flujos de carbono para el crecimiento en biomasa del sistema y rendimiento de carbonos de los diferentes compuestos que pueden ser captados del medio. Además, se ha realizado una comparativa entre la ruta aerobia de degradación del benzoato presente en el metabolismo de *P.putida* y las rutas aerobia y anaerobia de degradación del benzoato presentes en la base de datos EAWAG-BDD. Con esta comparativa se ha podido establecer que la ruta de degradación aerobia de *P.putida* KT2440 y de la base de datos EAWAG-BDD permiten el mismo crecimiento del sistema bacteriano y que la ruta de degradación anaerobia del benzoato de la base de datos permite un mayor crecimiento del sistema bacteriano y un mayor rendimiento de carbonos del benzoato. De esta forma, el modelo estaría mejorando el desarrollo del sistema bacteriano cuando viviera a expensas del benzoato.

### Palabras clave

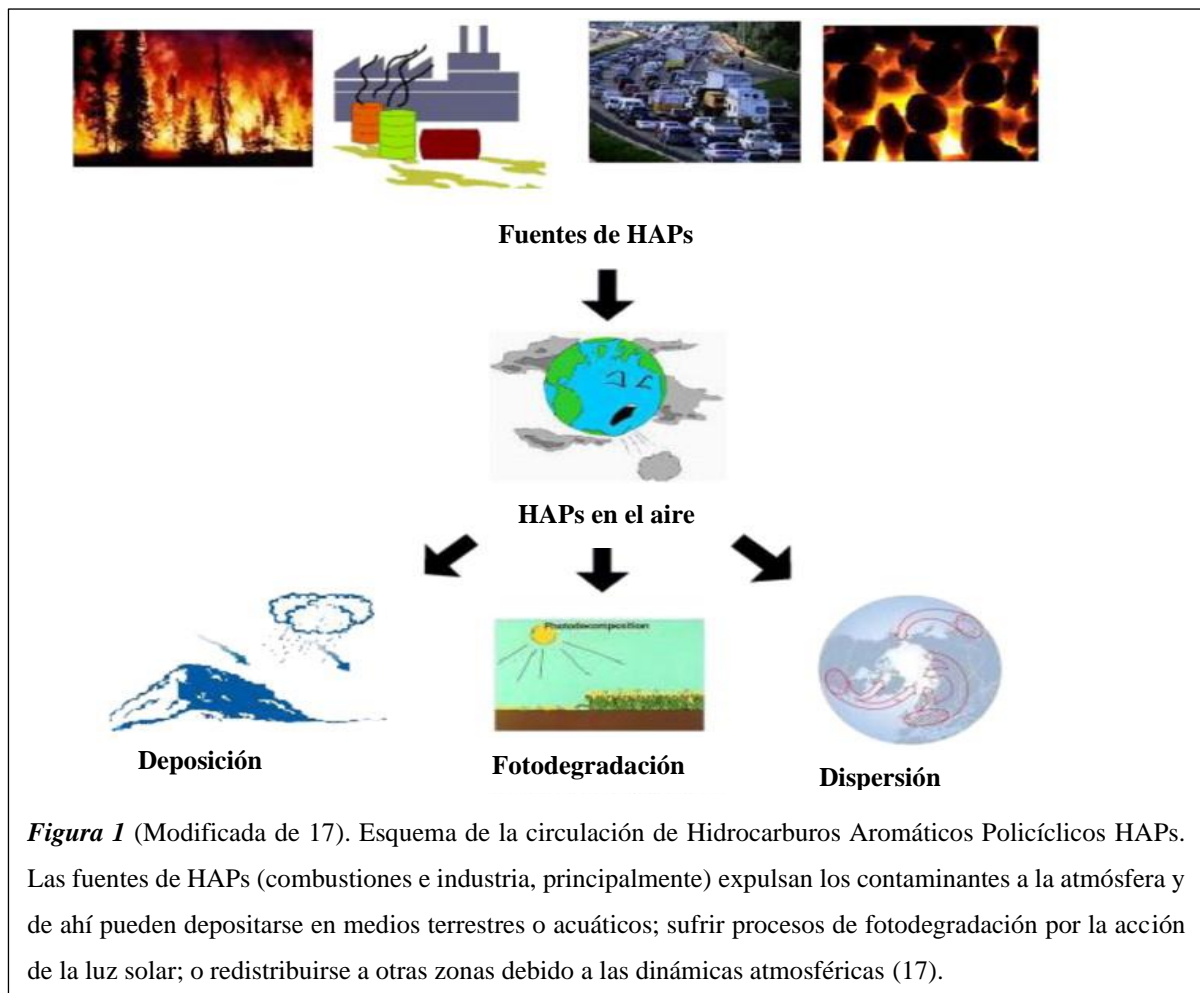
Modelo metabólico, *Pseudomonas putida* KT2440, COBRA, Compuestos aromáticos, Biodegradación, Flujos de carbono, Rendimiento de carbonos, FBA

## 1.- INTRODUCCIÓN

El ser humano lleva miles de años produciendo contaminantes y liberándolos al medio ambiente (1). Sin embargo, con el desarrollo de las actividades humanas como la minería o la industria química, se han creado nuevas fuentes de contaminantes (2, 3). Muchos de estos contaminantes son compuestos recalcitrantes que necesitan de la actividad biológica para su degradación y existen microorganismos que han desarrollado rutas de degradación/detoxificación de estos compuestos.

Estos compuestos contaminantes de origen antropogénico pueden acabar dañando recursos importantes para la salud humana como el suelo o el agua y pueden redistribuirse por el planeta (Figura 1) (4). Esto podría afectar a las sociedades humanas por ser nocivos para el conjunto del ecosistema y con ello perjudicar los servicios ecosistémicos que reciben las sociedades

humanas. Los servicios ecosistémicos son los beneficios en productos, regulación del entorno, aspectos culturales y servicios que obtienen las sociedades humanas de los ecosistemas (5). Algunos ejemplos concretos de servicios ecosistémicos son la presencia de agua limpia y potable, la existencia de ciclos de nutrientes o la formación de suelo (6). Con el daño a estos ecosistemas por la acumulación de contaminantes se podrían perder estos servicios.



Hay diferentes estrategias para degradar la variedad de contaminantes generados con el fin de que no produzcan daños ni a los humanos ni a los ecosistemas en su conjunto. En el caso de los contaminantes aromáticos, pueden utilizarse para su degradación procesos químicos, fotoquímicos, físicos, térmicos o biológicos (7, 8, 9, 10, 11).

Las técnicas no biológicas han sido útiles para zonas muy contaminadas a gran escala, pero resultan costosas y pueden incrementar la exposición al contaminante en las áreas cercanas, sobre todo las técnicas térmicas. Este potencial riesgo hace que pueda generarse oposición social a la realización de estos procesos (12). Además, en ocasiones estas técnicas solamente mueven el contaminante de un medio a otro o presentan una degradación incompleta (12, 13).

La fotodegradación es especialmente importante en los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) permitiendo su rotura y formando fragmentos más pequeños (14, 15, 16) (Figura 1).

La biorremediación es el uso de seres vivos para la degradación de contaminantes ambientales (12). La biorremediación de compuestos aromáticos puede ser llevada a cabo por plantas, algas, bacterias y hongos (13, 18). Aunque las técnicas de biodegradación varíen en su efectividad en función del contaminante y necesiten tiempos relativamente largos para su ejecución son una buena alternativa a las técnicas de descontaminación tradicionales. Las técnicas de biodegradación de contaminantes son relativamente baratas y de baja complejidad tecnológica. Ofrecen la oportunidad de utilizar la propia actividad biológica para eliminar o reducir la toxicidad de una amplia variedad de contaminantes (12).

### **1.1- Compuestos aromáticos**

Los compuestos aromáticos son compuestos químicos que tienen uno o varios anillos con electrones  $\pi$  deslocalizados a su alrededor (19). Debido a ello, son persistentes en el medio por la estabilidad estructural de esos anillos aromáticos (20). Los xenobióticos son compuestos generados por las actividades humanas que no están presentes en los ecosistemas de manera natural (21). Son muy recalcitrantes puesto que los microorganismos no tienen las rutas catabólicas necesarias para la degradación de estos compuestos (20) y necesitan desarrollar nuevas rutas metabólicas. Por el contrario, los compuestos aromáticos simples como el benceno han sido utilizados extensamente por bacterias como fuente de energía y carbono (22). De hecho, existen organismos capaces de vivir a expensas de estos sustratos y degradar metabólicamente compuestos aromáticos que no pueden utilizar para crecer como los clorofenoles (23, 24).

Los compuestos aromáticos pueden ser monocíclicos o policíclicos y pueden presentar átomos de cloro en su estructura, como las dioxinas, o de otros elementos (20). Los compuestos aromáticos pueden causar efectos tóxicos en humanos y en otros organismos, teniendo efectos mutagénicos y teratogénicos, y afectar a diversos órganos y sistemas como los riñones o el sistema nervioso (20, 25).

Los compuestos aromáticos tienen diversas fuentes antropogénicas. Por ejemplo, el Benzo[a]pyrene se produce en la quema de combustibles fósiles, incendios e industrias como las cementeras (26, 27). También puede haber fuentes naturales de compuestos aromáticos como son los incendios forestales y las emisiones volcánicas, especialmente de HAPs (28) (Figura 1).

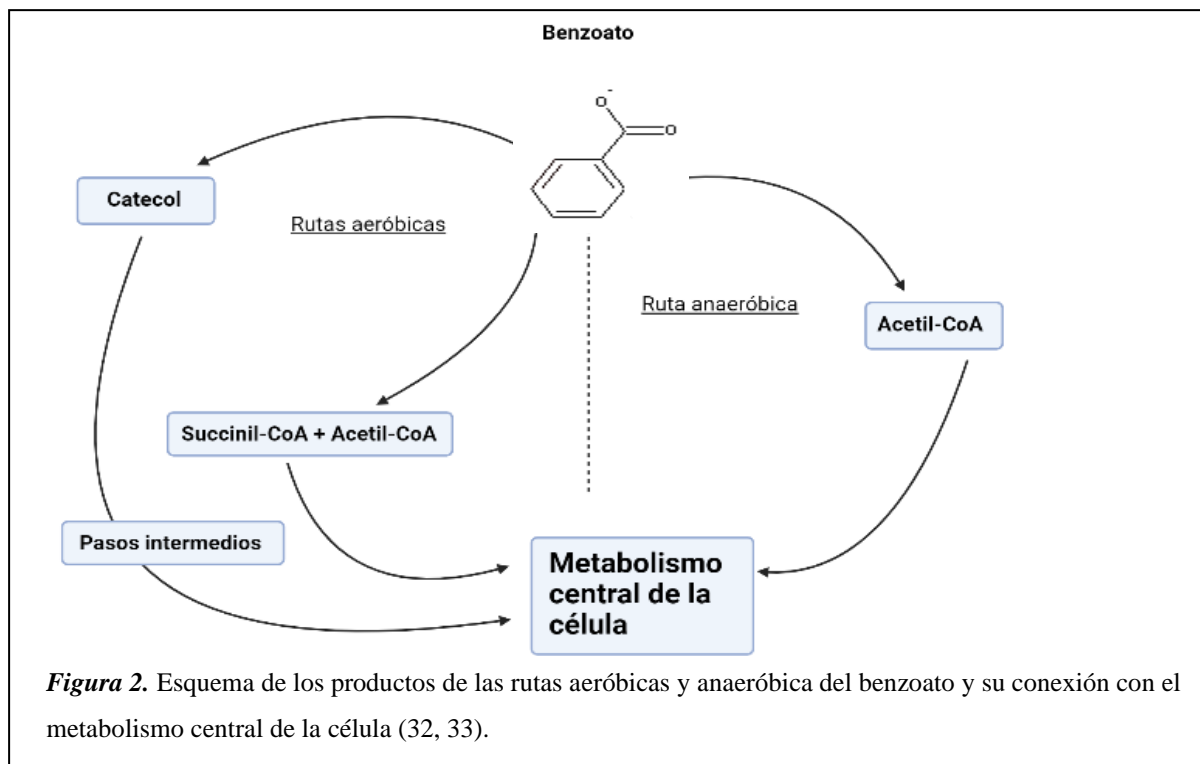
## 1.2- Biodegradación de compuestos aromáticos

Debido a los potenciales problemas que pueden causar estos compuestos aromáticos se necesitan emplear técnicas que puedan permitirles su descomposición. La biodegradación de compuestos aromáticos utilizando microorganismos puede llegar a eliminar del todo estos contaminantes (20) o al menos convertirlos en formas menos tóxicas.

Hay diferentes rutas de degradación en función de si se realiza en condiciones aeróbicas o anaeróbicas. De hecho, hay compuestos que pueden degradarse en una condición y en la otra, o que necesitan ambas condiciones para su completa degradación (las llamadas rutas aeróbicas híbridas). Muchas de las rutas aerobias están interconectadas y canalizadas a rutas centrales más conectadas con el metabolismo central de los microorganismos (20). En el caso de las vías anaerobias, suelen terminar en unas pocas moléculas comunes como el benzoil-CoA (29).

Las vías aerobias utilizan oxígeno ya sea como aceptor de electrones en algunos de los pasos o como sustrato en las reacciones por las oxigenasas. Clásicamente, se conocían reacciones de hidroxilación y de rotura oxigenolítica que actuaban sobre el anillo aromático y terminaban produciendo metabolitos relacionados con el catecol. No obstante, también hay rutas de degradación aerobia que no convergen en intermediarios relacionados con el catecol, sino que terminan en otros intermediarios como el gentisato (30, 31). En ambos casos al final conectan con el metabolismo central de la célula. Otra estrategia en las rutas de degradación aerobias es utilizar oxigenasas para romper el anillo aromático formando un epóxido no aromático. Pero estas rutas tienen características anaerobias y son las que hemos denominado rutas aeróbicas híbridas. En estas rutas se necesita la activación de los compuestos por una CoA tioesterasa (31).

Las vías anaeróbicas deben usar otros aceptores de electrones tales como nitrato o hierro (III) y otras reacciones enzimáticas diferentes a las de las vías aerobias (29, 31). Hay dos estrategias principales de degradación anaerobia de compuestos aromáticos que se basan en la reducción del anillo aromático, por lo que emplean reductasas, y en la convergencia general de las rutas anaerobias en el benzoil-CoA. Por un lado, existen estrategias reductivas ATP-dependientes, en las que se obtiene benzoil-CoA por una hidrólisis dependiente de ATP catalizada por las benzoil-CoA reductasas. Por otro lado, existen estrategias ATP-independientes que usan otra clase de benzoil-CoA reductasas. Ambas rutas coinciden generalmente en los mismos intermediarios por lo que tienen enzimas en común (31).



Un ejemplo de compuesto que presenta una ruta de degradación aerobia y otra anaerobia es el benzoato (Figura 2). La degradación anaerobia del benzoato se inicia con formación de benzoil-CoA dependiente de ATP. El anillo aromático del benzoil-CoA se reduce y se forma cyclohex-1,5-diene-1-carboxil-CoA que entra en una ruta derivada de la beta oxidación y acaba produciendo acetil-CoA que pasa al metabolismo central de la célula. Por otro lado, la degradación aeróbica clásica se basa en la hidroxilación del anillo aromático dando lugar a catecol. También existe otra ruta de degradación aeróbica que inicia con la formación de benzoil-CoA por una benzoil-CoA ligasa. Después esta molécula se ve atacada por una epoxidasa, una hidrolasa y una deshidrogenasa para finalmente, por una reacción no del todo caracterizada, formar succinil-CoA y acetil-CoA que entran en el metabolismo central de la célula (32, 33, 34).

Normalmente un solo microorganismo no presenta todas las vías catabólicas de compuestos aromáticos. De hecho, puede no presentar siquiera los genes necesarios para la degradación completa de un compuesto aromático. Por eso, para eliminar estos compuestos persistentes, se realizan estrategias de biorremediación utilizando consorcios microbianos sintróficos. Estos consorcios consisten en distintos grupos de especies o cepas de microorganismos que se encargan de los diferentes pasos de las rutas de degradación y se complementan (20). De esta forma, aumenta el espectro de compuestos aromáticos que puede degradar el sistema.

Para la biodegradación de compuestos aromáticos se han empleado modelos bacterianos (35) y basados en microalgas (36). Unos de los organismos utilizados en el campo de la biodegradación de compuestos recalcitrantes, como los compuestos aromáticos, es *Pseudomonas putida*.

### **1.3- *Pseudomonas putida***

Se trata de una  $\gamma$ -proteobacteria que puede estar presente en agua, suelos y organismos vivos tanto plantas como animales. Constituyen un grupo muy heterogéneo con una gran versatilidad metabólica (37, 38, 39).

Las bacterias dentro del género *Pseudomonas* presentan genes para la degradación de múltiples compuestos aromáticos como el benzoato o el tolueno, que se transforman en intermediarios del ciclo de Krebs mediante las rutas catabólicas centrales (37, 38, 39). Por lo tanto, pueden metabolizar estos compuestos y obtener materia y energía de ellos. Los genes relacionados con el catabolismo de un compuesto aromático suelen agruparse en “clusters” y pertenecer al mismo operón (37, 40). No obstante, también hay reacciones conocidas cuyas enzimas y genes implicados están aún por caracterizar (30).

De las 11 rutas de metabolismo central encontradas en el género *Pseudomonas*, *P. putida* contiene 9. Esto hace de ella una buena candidata para su uso en estudios de biodegradación de compuestos persistentes (37, 41). Además, el genoma de *P. putida* puede modificarse fácilmente y utilizar los cultivos de estas bacterias como biofactorías (42). Dentro de *P. putida* encontramos varias cepas y la más conocida y mejor caracterizada es *P. putida* KT2440 (43). Dentro de esta cepa hay diferentes modelos a escala genómica como *iJN1462* (44), que es el utilizado en este trabajo.

Por lo tanto, es importante integrar la biología de sistemas y la modelización en el contexto de *P. putida* para poder profundizar el estudio de redes metabólicas complejas y, con ello, idear estrategias de degradación de compuestos aromáticos.

### **1.4- Perspectivas desde la biología de sistemas**

La biorremediación de compuestos recalcitrantes necesita de una red compleja de interacciones metabólicas intra e interespecífica. La complejidad de análisis necesita datos ambientales, metagenómicos y metabólicos, entre otros, y para la integración y análisis de esa gran cantidad de información requiere de recursos computacionales orientados hacia la biología sintética (45).



Existen diversas plataformas para predecir la biodegradabilidad de los diferentes compuestos, como BiodegPred (46), y bases de datos con metabolitos, rutas de degradación desglosadas en cada reacción, condiciones a las que se producen las reacciones y genes implicados, como KEGG (47, 48, 49), EAWAG-BDD (50) o MetaCyc (51, 52, 53, 54) (Tabla 1).

Base de datos	Rutas	Reacciones	Compuestos	Enzimas	Organismos	Genes
EAWAG-BDD	219	1503	1396	993	543	No
KEGG	547	11556	7852	7852	7218	34 627 862
MetaCyc	2937	Sí	Sí	Sí	3295	Sí

**Tabla 1.** Resumen de la presencia y número de entradas de cada base de datos de las rutas metabólicas, reacciones totales, compuestos, enzimas, organismos y genes. En el caso de EAWAG-BDD únicamente presenta información de microorganismos. KEGG, por su parte, presenta entradas de 6317 bacterias, 557 eucariotas y 344 arqueas. MetaCyc no concreta los números de cuantas reacciones, compuestos, enzimas y genes presenta ni los tipos de organismos incluidos.

La base de datos EAWAG-BDD presenta información concreta de rutas de degradación de compuestos aromáticos incluyendo si esas reacciones se dan en condiciones aerobias o anaerobias, algo importante teniendo en cuenta lo reflejado en el punto 1.2 de este trabajo sobre las diferentes estrategias enzimáticas de degradación de compuestos aromáticos. También presenta el contexto teórico y referencias bibliográficas de estas rutas de degradación. Dentro de las desventajas de la base de datos EAWAG-BDD es que las reacciones no están bien caracterizadas, así como suelen carecer de información esencial. Aun así, la contextualización de estas dentro de las rutas de degradación es adecuada lo que permite en algunos casos la conexión con otras rutas de degradación.

La base de datos KEGG proporciona recursos para entender sistemas biológicos con información a nivel molecular y genético. Contiene mucha información relacionada con rutas de degradación y apartados sobre enzimas que contienen los genes en diferentes organismos, información sobre las enzimas y su funcionamiento, la estequiometría de las reacciones y bibliografía, entre otras cosas. Un punto importante de KEGG es que presenta conexiones con el metabolismo central por lo que permite seguir el producto de una ruta hasta su completa degradación, en el caso de que los productos de la ruta conecten con el metabolismo central.

MetaCyc es una base de datos que contiene rutas metabólicas en diferentes organismos incluyendo, en ocasiones, esquemas visuales de cómo y dónde sucede la reacción. Además, también presenta información sobre la enzima, los genes necesarios para sintetizar las enzimas, referencias bibliográficas y te permite hacer comparaciones entre los diferentes organismos contemplados en la base de datos.

Estas bases de datos y otras muchas existentes solapan en parte de su información y también se diferencian de las demás en ciertos aspectos, pero todas tienen referencias a otras bases de datos para que puedas comparar y complementar la información que obtienes de ellas. El empleo de estas bases de datos unido al conocimiento del metabolismo de *P. putida* es fundamental para elaborar modelos de biodegradación de compuestos aromáticos que puedan ser analizados *in silico* para su posterior implementación *in vivo*.

Para la extracción de datos a partir del modelo, existen programas complejos, entre ellos COBRA, que es un conjunto de métodos de análisis y reconstrucción basados en la manipulación de las condiciones limitantes. Este programa es usado en el campo de la bioingeniería en modelos metabólicos en eucariotas y procariotas (55). Estos modelos son una aproximación *in silico* de un sistema biológico, incluyendo rutas metabólicas representadas en un contexto genómico (56). COBRA es capaz de analizar aspectos fisicoquímicos y limitaciones biológicas para determinar los fenotipos viables de una reconstrucción metabólica con unas condiciones dadas (55). Las condiciones limitantes pueden ser establecidas teniendo en cuenta aspectos termodinámicos, compartimentalización, conservación de la masa, acumulación de metabolitos y actividad transcripcional (55, 57, 58, 59).

COBRApy es un paquete de lenguaje de programación Python diseñado para el modelado en condiciones limitantes y que permite incrementar la complejidad de procesos biológicos con los métodos de COBRA y utiliza una programación orientada a objetos (55). El paquete COBRApy permite realizar análisis FBA (“Flux Balance Analysis”). Los FBAs son una aproximación matemática que permite analizar el flujo de determinadas reacciones a través de una red metabólica (60, 61, 62). Para que este flujo exista la red metabólica debe ser continua y no debe haber obstrucciones ni huecos que impidan esta continuidad. La realización de este tipo de análisis sobre un modelo metabólico creado con unas limitaciones establecidas permite un análisis individualizado de la continuidad de la red metabólica partiendo de un metabolito concreto. De esta forma, puede probarse la idoneidad de un compuesto en un determinado modelo en base al objetivo establecido en el análisis. En los modelos que determinan el crecimiento de un sistema biológico, el objetivo es la producción de biomasa. Esto se consigue añadiendo una o más reacciones artificiales al modelo de producción de biomasa. Estas reacciones consumen metabolitos simulando la producción de biomasa (60, 61, 62).

Para poder realizar estos análisis, se debe emplear un formato adecuado que sea comprensible para el programa como SBML, que es un formato estándar para la distribución de modelos y

que es válido para el uso de COBRA. COBRApy es capaz de leer y escribir en formato SBML (62). De esta forma, cuando se crea un modelo se debe exportar en formato SBML para poder trabajar con COBRApy.

## 2- OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo son 3:

- En primer lugar, crear *in silico* un modelo de degradación de compuestos aromáticos en *P. putida* utilizando la cepa KT2440.
- En segundo lugar, realizar análisis de flujos de carbono y rendimiento de carbonos sobre el modelo creado.
- En tercer lugar, realizar la comparativa entre la ruta del benzoato propia del metabolismo de *P. putida* y las dos rutas de degradación del benzoato añadidas presentes en la base de datos EAWAG-BDD y determinar si alguna de esas dos se corresponde con la propia de la bacteria y qué ruta permite un mayor crecimiento en biomasa del sistema bacteriano y un mayor rendimiento del benzoato.

## 3- MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1- Creación del modelo

Como base para el modelo se ha utilizado el metabolismo de *P. putida* KT2440 iJN1462 y se han añadido 99 rutas de degradación de compuestos aromáticos utilizando la base KEGG al modelo hecho en Excel en base al chasis metabólico de *P. putida* iJN1462 (Anexo 1). El documento Excel (Anexo 1) donde se ha creado el modelo sigue el formato de COBRA (<https://github.com/opencobra/cobratoolbox/blob/master/docs/source/notes/ExcelModelFileDefinition.md>). Presenta una hoja para la lista de reacciones (“Reaction List”) y otra para la lista de metabolitos (“Metabolite List”). Tanto las reacciones añadidas a la base del chasis metabólico de *P. putida*, como los metabolitos añadidos a los presentes en el modelo, aparecen con el fondo en azul, para distinguirlas de los datos del chasis metabólico. Cada reacción dentro de la hoja de reacciones presenta, por columnas, una abreviación de la reacción (“Abbreviation”); el nombre de la enzima implicada si se conoce (“Description”); la reacción ajustada estequiométricamente si es posible (“Reaction”); los genes de la enzima implicada si se conocen (“GPR”); el subsistema metabólico al que pertenecen pudiendo ser a una ruta de degradación, a un sistema de intercambio para captar los compuestos o a un sistema de demanda para expulsarlos en el caso de que no puedan seguir siendo degradados (“Subsystem”);

información de la reversibilidad de la reacción (“Reversible”), con valores 0 (no reversible) y 1 (reversible); información sobre su flujo del exterior de la célula al interior celular (“Lower bound”) y del interior al exterior (“Upper bound”); una columna llamada “Objective” que alude al objetivo del análisis del modelo, teniendo el objetivo valor 1 y el resto 0. Como el objetivo es el crecimiento en biomasa, hay reacción artificial que simula la adquisición de biomasa y es la única que presenta un 1; un par de columnas vacías que no han sido utilizadas para el modelo (“Confidence Score” y “EC number”); y una columna de notas (“Notes”) que ha sido utilizada en este caso para indicar, cuando se pueda, las condiciones aerobias o anaerobias en las que se da la reacción. Dentro de la hoja de “Metabolite list” del anexo 1, hay varias columnas: una columna “Abbreviation” que presenta la abreviación del metabolito y el compartimento en el que se encuentra pudiendo ser citoplasma (“[c]”), periplasma (“[p]”) o medio extracelular (“[e]”); otra columna en la que se presenta el nombre completo del metabolito (“Description”); la columna donde se presenta el tipo y número de elementos presentes en la fórmula química del compuesto sin carga (“Formula”); la fórmula química del compuesto con carga (“Charged formula”); y la carga que presenta el compuesto cargado (“Charge”). El resto de columnas de esta hoja no han sido utilizadas y tienen relación con la nomenclatura del compuesto en diferentes sistemas de nomenclatura química. La información necesaria para añadir las reacciones al modelo ha sido obtenida de las bases de datos ya mencionadas EAWAG-BDD, KEGG y MetaCyc, con especial importancia de EAWAG-BDD para añadir reacciones y metabolitos y de KEGG para incluir genes.

Partiendo de este modelo se ha utilizado Python 3.8 y la librería COBRApy (55) 0.22.0 principalmente, aunque también se ha requerido de la librería PANDAS (63) 1.0.3 para el script usado en la creación del modelo en Python. El modelo se ha desarrollado con la herramienta Excel y exportado a formato SBML para poder ser leído por COBRApy mediante el módulo Python importExcelModel ([https://github.com/dsanleo/excel\\_to\\_cobrapy](https://github.com/dsanleo/excel_to_cobrapy)). El código Python utilizado para la importación es el siguiente:

```
>>> import importExcelModel
```

```
>>> import cobra
```

```
>>> my_model=importExcelModel.import_excel_model('Modelo_Creado.xls',model_id='Modelo_Aromaticos')
```

### 3.2- Análisis de flujos de carbono

De esta forma, “my\_model” es el nombre del modelo para realizar los análisis posteriores. En este momento, el modelo presentaría por defecto captación de glucosa por la bacteria. Para poder analizar los flujos mediante el análisis FBA utilizando los compuestos de forma individual, se debe establecer este flujo en 0 y para ello se utiliza esta línea de código:

```
>>> my_model.reactions.get_by_id("X").bounds=(l,u)
```

Siendo X la reacción implicada en el intercambio del metabolito con el medio y los valores “l” (valor negativo) el flujo de entrada permitido del metabolito y “u” (valor positivo) el flujo de salida permitido del metabolito. Para eliminar la captación de glucosa se sustituye X por la reacción de intercambio de la glucosa (EX\_glc(e)) y los valores “l” y “u” por 0. Estos flujos de los metabolitos que se establecen llevan las unidades de mmol/(g peso seco\*hora).

Usando este modelo se ha utilizado un script (Anexo 2) que permite analizar el flujo de carbono de las reacciones de intercambio del modelo mostrando el compuesto que capta la bacteria, la reacción implicada en este intercambio, los carbonos que presenta ese compuesto, los nitrógenos que presenta ese compuesto y el valor del flujo de carbono entendiéndose como un valor del crecimiento en biomasa (gramos de biomasa por gramo de sustrato) si la bacteria utiliza ese compuesto como fuente de carbono.

Una vez obtenidos estos valores se han almacenado en un documento de texto (Anexo 3) y se ha procedido a agruparlos en función del número de carbonos (Anexo 4) y del número de nitrógenos (Anexo 5) para buscar relaciones dentro de las agrupaciones. Para los análisis estadísticos en esta parte del trabajo se ha realizado la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov y la prueba U de Mann-Whitney como prueba de contraste de hipótesis para determinar si las diferencias de medias son significativas.

### 3.3- Rendimiento de carbonos

Se ha calculado el rendimiento de carbonos de los distintos metabolitos. Para esto se han tenido en cuenta el número de carbonos presentes en el metabolito, la cantidad de metabolito proporcionado o captado por la célula y el CO<sub>2</sub> expulsado y, si hubiera, otros compuestos con carbono que haya podido expulsar la bacteria porque se han generado y ya no puede seguir aprovechando. La fórmula general para calcular el rendimiento de carbonos sería:

$$\text{Rendimiento de carbonos} = 1 - \frac{\text{flujo de carbono expulsado} * \%}{N^{\circ} \text{ de C del compuesto} * \text{flujo del compuesto}}$$

Los rendimientos se suelen calcular con flujos de entrada del compuesto pequeños. En este caso se ha utilizado un flujo de entrada de -0,5 para la mayoría de los metabolitos y en algunos ha sido necesario un flujo mayor. El código utilizado para obtener los datos de flujos, una vez cargado el modelo, ha sido el siguiente:

```
>>> my_model.reactions.get_by_id("X").bounds=(-0,5,0)

>>> print(my_model.summary())
```

Sustituyendo la X por la abreviatura de la reacción de intercambio implicada en la captación del metabolito que estemos analizando. El output obtenido se ha almacenado en un documento Excel (Anexo 6) donde, en la hoja 1, aparece en cada columna el análisis de los diferentes metabolitos utilizados. En la fila 1 se plasma el metabolito utilizado y el valor de entrada establecido. En las filas inferiores están los datos de crecimiento en biomasa (“1.0 BiomassKT2440\_WT3”) medida en gramo de biomasa por gramo de nutriente, intercambio de metabolitos con el medio (“Uptakes”) especificando el metabolito implicado, la reacción, el flujo de esa reacción, el número de carbonos del metabolito y porcentaje del flujo de carbono proporcionado por cada reacción. Estos detalles también se presentan en las filas inferiores en el apartado de compuestos expulsados por la célula (“Secretion”). En este caso el signo negativo del flujo de las reacciones indica que se está expulsando ese metabolito.

Una vez obtenidos los datos necesarios y calculados los rendimientos, se ha comprobado si las diferencias entre las medias del chasis metabólico y de las rutas añadidas eran estadísticamente significativas. Para los análisis estadísticos en este punto, se ha realizado la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov y la prueba U de Mann-Whitney como prueba de contraste de hipótesis para determinar si las diferencias de medias son significativas.

### **3.4- Comparativa entre las rutas de degradación del benzoato**

Por último, se ha procedido a realizar la comparativa entre la ruta de degradación del benzoato ya presente en la cepa bacteriana utilizada y las rutas de degradación del benzoato existentes en la base de datos EAWAG-BDD, para esto se ha cargado el modelo en Python de la misma manera que en apartado 3.1 y se han asignado valores de -5 al flujo desde el exterior al interior de la bacteria del benzoato utilizando el código reflejado en el apartado 3.2, lo que implicaría un flujo de benzoato de 5 captado por la bacteria desde el exterior. Se establece en 0 la entrada de glucosa para que la única fuente de carbono sea el benzoato. Se ha hecho el análisis alternando las rutas operativas del modelo: todas las rutas del modelo, ruta del chasis

metabólico bacteriano, rutas añadidas, ruta aerobia añadida y ruta anaerobia añadida. De esta forma se obtiene el flujo de carbono de las distintas rutas y los mismos valores para buscar cuál es la ruta de degradación del benzoato más eficiente en el modelo. El código utilizado ha sido el mismo del apartado 3.1 y 3.2.

## 4- RESULTADOS

### 4.1- Modelo

El modelo obtenido utilizando como chasis la red metabólica de *P. putida* KT2440 iJN1462 se encuentra en el Anexo 1. Este documento presenta la estructura descrita en el apartado 3.1. El resumen del modelo previo y el obtenido añadiendo las rutas de degradación se resume en la Tabla 2. El metabolismo bacteriano presentaba 2087 metabolitos a los que se han añadido 943 para obtener 3030, el total de metabolitos del modelo. Además, presentaba 2826 reacciones a las que se han añadido 1091 para obtener 3917, el total de reacciones del modelo.

	Chasis de <i>P. putida</i> KT2440 iJN1462	Modelo creado
Metabolitos	2087	3030
Reacciones	2826	3917

**Tabla 2.** Resumen de metabolitos y reacciones del modelo creado. El chasis de *P. putida* KT2440 iJN1462 se corresponde con el metabolismo conocido de la cepa bacteriana y el modelo creado agrupa ese chasis y las reacciones de degradación de compuestos aromáticos añadidas.

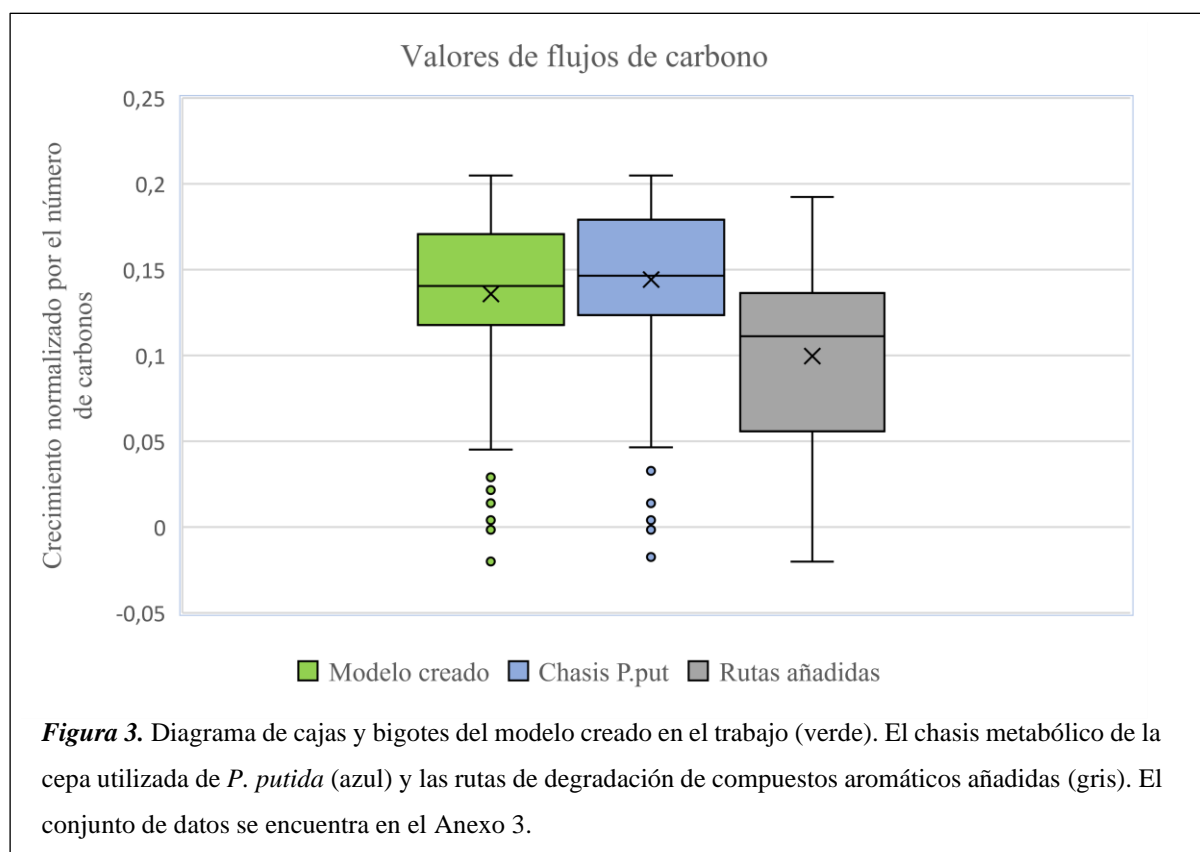
### 4.2- Flujos de carbono

Los resultados en cuanto a flujos de carbono en función de los distintos sustratos se dan en términos de crecimiento bacteriano en biomasa. Para el análisis del modelo se ha establecido la limitación en las fuentes de carbono. Los resultados se encuentran en el Anexo 3 y se muestran los resultados de flujo de carbono con cada uno de los metabolitos que potencialmente podrían ser degradados por la bacteria tanto presentes en el chasis como añadidos para el modelo. En el documento se encuentran: la reacción analizada (“Reaction”), el número de carbonos del metabolito que intercambia esa reacción (“N carbons”), el número de nitrógenos que tiene el metabolito que intercambia esa reacción (“N nitrogen”), el metabolito que intercambia esa reacción (“Metabolite”) y el flujo de carbono, es decir la biomasa, asociado a esa reacción (“Solution”).

Algunos resultados (Anexo 3) aparecen con un 0, lo que estaría indicando que esas reacciones no presentan flujo de carbono y que habría algún tipo de bloqueo en esas rutas que no permite que se produzca el crecimiento bacteriano en base a ese sustrato o que las bacterias no pueden

obtener carbono de esos compuestos, aunque sí puedan transformarlos. Cuando los metabolitos pueden ser metabolizados por la bacteria, las reacciones de intercambio de ese compuesto presentan un número distinto de cero y, en este archivo, ese flujo está normalizado por el número de carbonos del sustrato.

Atendiendo al diagrama de cajas y bigotes (Figura 3) la media del valor del flujo de carbono del modelo creado es de 0,1359, la del chasis metabólico es de 0,1405 y la de las reacciones añadidas 0,0996, como señalan las “x”. Además, el máximo de crecimiento bacteriano lo presenta el chasis de *P. putida* con un crecimiento de 0,2048, que se corresponde con la reacción de intercambio EX\_lag160(e), que incorpora 1-acil-sn-glicerol-hexadecanoato; mientras que las rutas añadidas de compuestos aromáticos tienen su máximo dato de crecimiento en 0,1924, que se corresponde con la reacción de intercambio EX\_ACTE(e), que incorpora acetileno. El valor mínimo de flujo del modelo es aproximadamente -0.020129 y se corresponde con la reacción de intercambio de la N,N-dietil-m-toluamida (EX\_DMTA(e)).



Valores de flujo de carbono negativos como en las reacciones de intercambio de N,N-dietil-m-toluamida, metanol, urea, cinamida, y dimetilfosfinato (Anexo 3), estarían indicando que el sistema bacteriano pierde biomasa con la metabolización de estos compuestos.

Atendiendo a la Tabla 3, ambos conjuntos de datos de flujos no siguen una distribución normal (significación = 0,000) por lo que se ha realizado una prueba no paramétrica para muestras



independientes con el fin de ver si las diferencias en las medias entre el chasis y las rutas añadidas es significativa. En nivel de significación es de 0,000 por lo que se rechaza la hipótesis nula que afirma que no hay diferencias significativas y se puede afirmar que hay diferencias significativas entre el promedio de crecimiento en biomasa del chasis y el de las rutas añadidas. Por lo tanto, los metabolitos que se incorporan en la célula por reacciones de intercambio pertenecientes al chasis metabólico presentan un mayor flujo de carbono y le proporcionan al sistema bacteriano un mayor crecimiento en biomasa que los metabolitos que se incorporan a la célula por reacciones de intercambio pertenecientes a las rutas de degradación añadidas.

Se han agrupado los datos obtenidos de los flujos (Anexo 3) en función del número de carbonos (Anexo 4) y el número de nitrógenos (Anexo 5) que presenta el metabolito inicial, con el fin de relacionar estas agrupaciones con tendencias en los valores de flujo. Los datos están presentes en estos documentos de la misma forma que en el Anexo 3, explicado al inicio de este apartado 4.2. Los metabolitos con 17, 22, 24, 25, 27, 30, 32, 33, 34, 36, 38, 40, 42, 43, 48, 62, 72 y 148 carbonos, no presentan flujos de carbono (Anexo 4) y los metabolitos contemplados en el modelo que tienen en su estructura más de 6 átomos de nitrógeno tampoco presentan flujos de carbono (Anexo 5). El resto de agrupaciones, tanto en función de sus carbonos como de sus nitrógenos, presentan datos de flujos de carbono variados.

Prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov			
Grupo	Estadístico	GL	Significación
Chasis	0,180	296	0,000
Rutas	0,332	107	0,000
Resumen del contraste de hipótesis por la prueba U de Mann-Whitney			
Hipótesis nula (H <sub>0</sub> )	Significación	Decisión	
La distribución de los datos de flujos de carbono es la misma entre los distintos grupos	0,000	Rechazar H <sub>0</sub>	

**Tabla 3.** Resumen de las pruebas estadísticas realizadas sobre los datos de flujos de carbono. La prueba de normalidad usada ha sido la de Kolmogorov-Smirnov ya que el número de datos en ambos casos superaba 50. El grupo Chasis se corresponde con los datos asociados a las reacciones de intercambio del chasis metabólico de *P.putida*; y el grupo de Rutas hace referencia a las rutas de degradación añadidas en el modelo creado. En la tabla también están reflejados el estadístico y los grados de libertad (“GL”) con los que se ha realizado la prueba y la significación obtenida. El contraste de hipótesis se ha realizado usando la prueba U de Mann-Whitney y en la tabla se reflejan la hipótesis nula, la significación obtenida y la decisión respecto a rechazar o aceptar la hipótesis nula.

#### 4.3- Rendimiento de carbonos

El rendimiento de carbonos de cada compuesto se presenta en la tabla de la hoja 2 del Anexo 6, que presenta columnas con el compuesto (“Metabolito”) y columnas con el rendimiento

asociado a ese metabolito (“R”). Los compuestos presentes en la tabla de la hoja 2 del Anexo 6 se han dispuesto siguiendo el orden de aparición en el modelo (Anexo 1) y en la hoja 1 del Anexo 6 con los datos necesarios para calcular el rendimiento (hoja 1, Anexo 6).

Los datos obtenidos para calcular el rendimiento se han simulado siguiendo lo expuesto en el apartado 3.3 de este trabajo y se han almacenado en el Anexo 6. Los rendimientos calculados varían entre los metabolitos tanto asociados a reacciones del chasis bacteriano como asociados a las rutas añadidas. Hay algunos ejemplos de rendimiento de carbonos en la tabla 4 y se ha calculado el valor promedio del rendimiento de carbonos del chasis metabólico y de las rutas de degradación de compuestos aromáticos añadidas (Tabla 5).

Metabolito	Procedencia	Carbonos	CO <sub>2</sub>	Otros compuestos	R
1-acil-sn-glicerol hexadecanoato	Chasis	19	-1,667	No	0,82
Acetato	Chasis	2	-0,612	No	0,39
epsilon-Caprolactano	Rutas añadidas	6	-0,827	S-adenosil-4-metiltio-2-oxobutanoato; 5-desoxirribosa	0,72
Ciclohexano	Rutas añadidas	6	-2,739	No	0,09
Endosulfano	Rutas añadidas	9	0	Endosulfano hidroxicarboxilato	0,00

**Tabla 4.** Datos de rendimiento de carbonos de algunos ejemplos del modelo creado. Se han calculado los rendimientos con la ecuación descrita en el apartado de 2.3 de este trabajo y se han utilizado los datos del Anexo 6. La columna “Metabolito” contiene los nombres de los diferentes compuestos seleccionados como ejemplos; la columna “Procedencia” hace referencia a si la reacción de intercambio de ese metabolito se encuentra en el chasis metabólico de *P.putida* KT2400 o en las rutas de degradación de compuestos aromáticos añadidas en el modelo creado; la columna “Carbonos” indica el número de carbonos del compuesto; en la columna “CO<sub>2</sub>” se han anotado los flujos de expulsión de CO<sub>2</sub> del metabolito; en la columna “Otros compuestos” se han anotado los datos de flujo de expulsión de otros compuestos con carbono al exterior celular, siempre que estos compuestos representen al menos un 0,02% del flujo de carbono hacia el medio extracelular; y en la columna “R” se encuentran los datos de rendimiento calculados como se ha reflejado en el apartado 2.3 de este trabajo.

Además, se han realizado las pruebas estadísticas descritas en el punto 3.3 de este trabajo para comparar las medias de rendimiento obtenidas del chasis y de las rutas añadidas (Tabla 5). Con una significación de 0,000 se rechaza la hipótesis nula que afirma que no hay diferencias entre las medias y se demuestra que hay evidencia significativa suficiente como para afirmar que los metabolitos que tienen reacciones de intercambio asociadas al chasis metabólico bacteriano tienen de media un rendimiento mayor que los metabolitos que tienen reacciones de intercambio asociadas a las rutas añadidas en el modelo creado.

Resumen de los datos de rendimiento de carbonos			
Procedencia de las rutas		Valor promedio rendimiento	
Chasis metabólico		0,56	
Rutas añadidas		0,42	
Prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov			
Grupo	Estadístico	GL	Significación
Chasis	0,491	222	0,000
Rutas	0,510	52	0,000
Resumen del contraste de hipótesis por la prueba U de Mann-Whitney			
Hipótesis nula (H <sub>0</sub> )	Significación	Decisión	
La distribución de los datos de rendimiento de carbonos es la misma entre los distintos grupos	0,000	Rechazar H <sub>0</sub>	

**Tabla 5.** En esta tabla se muestra el promedio del rendimiento de los metabolitos cuyas reacciones de intercambio pertenecen al chasis metabólico de *P.putida* KT2440 o a las rutas de degradación de compuestos aromáticos añadidas. La prueba de normalidad usada ha sido la de Kolmogorov-Smirnov ya que el número de datos en ambos casos superaba 50. El grupo Chasis se corresponde con los datos asociados a las reacciones de intercambio del chasis metabólico de *P.putida*; y el grupo de Rutas hace referencia a las rutas de degradación añadidas en el modelo creado. En la tabla están reflejados el estadístico y los grados de libertad con los que se ha realizado la prueba (GL) y la significación obtenida. El contraste de hipótesis se ha realizado usando la prueba U de Mann-Whitney y en la tabla se reflejan la hipótesis nula, la significación obtenida y la decisión respecto a rechazar o aceptar la hipótesis nula en base a la significación obtenida.

#### 4.4- Comparativa entre las rutas de degradación del benzoato

La comparativa entre las diferentes rutas de degradación del benzoato presentes en el modelo se presentan en la Tabla 6.

	Todas	Chasis	Base	Aerobia (base)	Anaerobia (base)
<b>Cantidad</b>	5	5	5	5	5
<b>Crecimiento</b>	0,4925	0,4493	0,4925	0,4493	0,4925
<b>CO<sub>2</sub> expulsado</b>	-15,17	-16,91	-15,17	-16,91	-15,17
<b>Rendimiento</b>	0,5666	0,5169	0,5666	0,5169	0,5666

**Tabla 6.** Comparativa del crecimiento del sistema bacteriano y rendimiento de carbonos de las diferentes rutas de degradación del benzoato presentes en el modelo creado. Se establece el funcionamiento de: todas, solamente la ruta presente en el chasis metabólico, las rutas incorporadas de la base de datos EAWAG-BDD, la ruta anaerobia incorporada de la base de datos y la ruta anaerobia incorporada de la base de datos. Se analiza el modelo proporcionando 5 mmol/(g peso seco\* hora) de benzoato en todos los casos. El crecimiento se mide en términos de biomasa y el rendimiento de carbonos se calcula en base al CO<sub>2</sub> expulsado teniendo en cuenta que el benzoato es una molécula de 7 carbonos. Los rendimientos se expresan en forma de cociente que viene a indicar la proporción de carbonos que utiliza la bacteria para su crecimiento en biomasa de la totalidad de carbonos que incorpora procedentes del benzoato.

## 5- DISCUSIÓN

### 5.1- Modelo

De este trabajo, se ha obtenido un modelo de degradación de compuestos aromáticos utilizando como base el chasis metabólico de *P. putida* KT2440.

Anteriormente, se han realizado otros análisis de modelos metabólicos en COBRApy utilizando *P. putida* KT2440 (64, 65) con los diferentes modelos a escala genómica. El hecho de que se utilicen en los modelos, distintos formatos y presenten variaciones en las anotaciones incrementa la complejidad de analizar las diferentes reconstrucciones metabólicas de forma simultánea (66). No existen formatos de anotaciones estándar entre estos modelos y muchos de ellos no presentan la información necesaria para una correcta simulación de flujos y análisis de objetivos (66).

En este trabajo, se ha creado un modelo metabólico utilizando el formato SBML y los métodos de COBRA. El método de compartimentalización utilizado ha sido estableciendo 3 espacios: citoplasma [c], periplasma [p] y medio externo [e]. El medio externo y el periplasma han sido únicamente espacios necesarios para el transporte de los metabolitos del medio extracelular al medio intracelular en las reacciones de intercambio (“Exchange”) y transporte (del medio externo al periplasma y del periplasma al citoplasma). En el citoplasma es donde se dan las reacciones químicas del modelo. La mayoría de las reacciones presentes y añadidas están correctamente descritas y ajustadas. Sin embargo, el modelo presenta algunas reacciones muy poco caracterizadas en las bases de datos utilizadas. De estas reacciones se desconocen las enzimas implicadas, los ajustes estequiométricos, algunos de los productos formados o de los sustratos necesarios, y las condiciones aerobias o anaerobias de la reacción. Estas reacciones que no pueden ser ajustadas ni correctamente descritas por la falta de información aparecen subrayadas en el documento Excel del modelo creado (Anexo 1) en distintas rutas. Algunas de estas reacciones con poca información muestran el conocimiento de la degradación completa hasta CO<sub>2</sub> de ese metabolito, pero no contienen información de pasos intermedios, sustratos necesarios o productos formados junto a ese CO<sub>2</sub>. Pretenden indicar que el destino final de ese compuesto se conoce y es la degradación completa hasta CO<sub>2</sub>, pero se desconocen más aspectos de la reacción o reacciones hasta llegar a ese punto.

A modo informativo y como se ha mencionado en el apartado 3.1 del trabajo, el apartado de “Notes” del modelo (Anexo 1) alberga, si se conocen, las condiciones aerobias o anaerobias a las que se dan las reacciones de degradación de compuestos aromáticos añadidas. Estas

condiciones son un punto importante a la hora de realizar modelos metabólicos puesto que algunas reacciones solo se producirán en un ambiente óxico y otras en un ambiente anóxico. Sin embargo, la base de datos EAWAG-BDD solamente tiene catalogadas unas pocas rutas como aerobias o anaerobias. Dentro de las rutas, la base de datos permite dar una información orientativa de las condiciones a las que se produce cada reacción que en ocasiones puede llegar a ser contradictoria. Es el caso de la enoil-CoA hidratasa que cataliza una reacción dentro de la ruta anaerobia del benzoato que EAWAG presenta como posible reacción aerobia. No obstante, esta información orientativa se basa en la super-regla de la beta oxidación (67), que es una ruta aerobia. Como se ha mencionado, la ruta anaerobia del benzoato deriva en parte de la beta oxidación (34). De esta forma, la reacción es anaerobia y únicamente se presenta como aerobia porque la base de datos la agrupa con la super-regla de la beta oxidación.

En otras reacciones, la base de datos no presenta información sobre las condiciones aerobias o anaerobias a las que se dan. Esto provoca que en el modelo creado falte este dato en muchas reacciones. Aunque este dato pueda ser objeto de análisis, con lo obtenido de las bases de datos utilizadas no se han podido recabar suficiente información como para analizar el modelo en función de si el entorno es aerobio o anaerobio. No obstante, el modelo creado presenta una batería amplia de rutas de degradación que permiten analizar la degradación de compuestos aromáticos para un posible estudio posterior *in vivo*.

## **5.2- Flujos de carbono**

El análisis del balance de flujos que permite el modelo se presenta con el objetivo de crecimiento en biomasa y muestra los flujos de carbono operativos del modelo. Este objetivo de crecimiento en biomasa es común y ha sido ampliamente utilizado para el estudio de modelos metabólicos a escala genómica (68, 69, 70, 71). Tras el análisis (Anexo 3) se observa que tanto en el propio chasis metabólico de *P. putida* KT2440 como en las rutas de degradación de compuestos aromáticos añadidas, hay reacciones de intercambio que no presentan flujo de carbono. Estas reacciones pueden no presentar flujo de carbono por estar obstruidas o por tener huecos que rompan la continuidad de la ruta. En muchos de estos casos, esta situación se debe a falta de información sobre la ruta o la reacción concreta en las bases de datos consultadas para la realización del modelo en este trabajo. La información disponible condiciona el modelo y esto queda reflejado en el análisis. Conforme se vaya completando la información sobre estas rutas y se vayan caracterizando más enzimas y compuestos, se podrán mejorar los modelos metabólicos y se podrán obtener aproximaciones de los flujos de carbono y, por tanto, del

crecimiento en biomasa, más cercanas a la situación *in vivo*. También es posible que una reacción de flujo 0 tenga ese valor porque la bacteria no es capaz de extraer carbonos de ese compuesto y, por lo tanto, el crecimiento en biomasa es 0.

No obstante, el modelo creado en este trabajo ha permitido la obtención de una gran cantidad de datos de flujos de carbono (Anexo 3) que permiten el análisis de: el modelo en su conjunto, el chasis metabólico de *P. putida* KT2440 y las rutas de degradación de compuestos aromáticos añadidas. Para analizar las reacciones que sí presentan flujo de carbono es necesario acudir al Anexo 1, con el modelo creado descrito en los apartados 3.1 y 4.1 de este trabajo y al Anexo 3, con los datos de flujos de carbono descritos en el apartado 4.2 de este trabajo.

Los valores de flujos de carbono negativos indican que, si solo se aporta ese sustrato que se intercambia en la reacción con ese valor, el sistema bacteriano no solo no crece en biomasa, sino que pierde biomasa. Esto sucede en las reacciones de intercambio de N,N-dietil-m-toluidina, metanol, urea, cinamida, y dimetilfosfinato. De esta forma, estos sustratos no son susceptibles de ser utilizados como fuente de carbono para su degradación teniendo en cuenta el modelo creado en el trabajo. Del mismo modo, no pueden funcionar como sustratos aquellos metabolitos cuyas reacciones de intercambio tengan un valor de flujo de carbono de 0. El sistema bacteriano no estaría decreciendo como en el caso anterior, pero tampoco podría crecer a expensas de esos compuestos porque no existe flujo de carbono a partir de ellos.

Dentro de las reacciones con flujo positivo hay mucha variedad tanto en las presentes en el chasis metabólico de la bacteria como en las reacciones añadidas. La idoneidad del sustrato como fuente de carbono y energía para el crecimiento en biomasa del sistema bacteriano dependerá del valor del flujo de carbono de su reacción de intercambio. Los metabolitos asociados a un valor bajo de flujo de carbono como la naringenina se traducirán en un ritmo de crecimiento lento del sistema bacteriano; y los metabolitos asociados a un valor de flujo de carbono alto como el acetileno, se traducirán en un ritmo de crecimiento rápido del sistema bacteriano.

A la hora de comparar los valores en estos flujos de carbono, se debe tener en cuenta el modelo en conjunto, el chasis metabólico y las reacciones añadidas (Figura 3). Como han reflejado los análisis estadísticos (Tabla 3) el sistema bacteriano crece de media más utilizando su chasis metabólico que utilizando las rutas de degradación de compuestos aromáticos añadidas. No obstante, dentro de estos conjuntos hay una gran variación en estos valores de crecimiento en biomasa que suponen los valores de flujo de carbono. Para el modelo creado en este trabajo, se

pueden alcanzar niveles de crecimiento bacteriano en biomasa altos con la degradación de compuestos aromáticos como el acetileno o el épsilon-caprolactano con valores de 0,1924 y 0,1893, respectivamente (Anexo 3).

Atendiendo a la agrupación por el número de carbonos (Anexo 4) se observa que los grupos que no presentan flujos de carbono suelen tener un solo metabolito para el análisis, como es el caso de 40, 72 o 148 carbonos. De este modo, añadiendo nuevas rutas metabólicas y repitiendo el análisis esta tendencia de la agrupación podría variar. Los metabolitos agrupados por su número de carbonos que se asocian flujo de carbono parecen tener valores variados salvo los metabolitos con 1 carbono que se relacionan con valores de flujo de carbono bajos o incluso negativos.

Atendiendo a la agrupación de datos en función del número de nitrógenos (Anexo 5), los metabolitos contemplados en el modelo que tienen en su estructura más de 6 átomos de nitrógeno no presentan flujos de carbono y por lo tanto no permiten el crecimiento bacteriano. El resto de agrupaciones presentan valores variados.

Con estas agrupaciones se ha buscado relacionar el número de carbonos del metabolito y el número de nitrógenos del metabolito, con valores de flujo de carbono. Aunque, en algunos casos se han podido establecer tendencias, sobre todo en qué agrupaciones no presentan flujos de carbono, con el modelo creado en este trabajo, no se han encontrado tendencias en las agrupaciones.

### **5.3- Rendimiento**

El rendimiento de carbono es un dato que se usa en numerosos estudios (72, 73, 74) para determinar cuánto carbono de los diferentes metabolitos que puede captar la bacteria del medio externo se usa para el crecimiento en biomasa del sistema bacteriano.

El rendimiento de carbonos de todos los metabolitos del modelo que pueden ser potencialmente captados y utilizados como fuente de carbono se encuentra en la hoja 2 del anexo 6. Algunos ejemplos que comentar están presentes en la Tabla 4. El 1-acil-sn-glicerol hexadecanoato y el acetato son ejemplos de metabolitos captados por reacciones propias del chasis metabólico de *P. putida* KT2440. En el primer caso y, atendiendo al Anexo 3, la reacción de este metabolito presenta un crecimiento en biomasa asociado al flujo de carbono muy alto (0,2048) y un rendimiento muy alto (Tabla 4). Este compuesto le proporciona a la bacteria mucho carbono y también permite un alto crecimiento en biomasa, por lo que es idóneo para el crecimiento

bacteriano; en el segundo caso, el acetato tiene un rendimiento de carbonos menor, de 0,39 (Tabla 4). Esto concuerda con un menor valor de crecimiento en biomasa, que es de 0,1324 (Anexo 3).

Los siguientes ejemplos de la Tabla 4 pertenecen a las rutas de degradación de compuestos aromáticos añadidas. El épsilon-caprolactano presenta un rendimiento alto de 0,72, lo que concuerda con su valor de flujo de carbono asociado de 0,1893 (Anexo 3). El Ciclohexano tiene un rendimiento de carbonos muy bajo, de 0,09, lo que concuerda, de nuevo, con su valor de flujo de carbono asociado de 0,0216 (Anexo 3). Hay otros metabolitos como el endosulfano que presentan un rendimiento 0. Es decir, el sistema bacteriano no es capaz de extraer carbonos de esa molécula o, al menos, los redondeos que devuelven como output los métodos de COBRA no reflejan que se extraiga ningún átomo de carbono. El valor de crecimiento en biomasa utilizando endosulfano asociado al flujo de carbono de la reacción de intercambio de este metabolito es muy cercano a 0 (0,00073) (Anexo 3). Es decir, de esta molécula no pueden obtenerse carbonos o se obtienen muy pocos y el crecimiento en biomasa utilizándola como sustrato es prácticamente 0. Aunque parece que hay una tendencia entre presentar un rendimiento alto y un valor de flujo de carbono alto, hay metabolitos como el dibenzotiofeno que no lo cumplen. El dibenzotiofeno presenta un valor de flujo pequeño, de 0,029 (Anexo 3), y un rendimiento alto, de 0,77 (Anexo 6). De esta forma, aunque el sistema bacteriano no pueda tener un flujo de carbono alto utilizando el dibenzotiofeno sí estaría extrayendo de esa molécula gran parte de sus carbonos.

Atendiendo a los promedios de rendimientos reflejados en la Tabla 5. El chasis metabólico presenta de media un rendimiento mayor que las rutas de degradación de compuestos aromáticos. Esto, al igual que la diferencia en el valor de crecimiento en biomasa asociado a los flujos de carbono (Figura 3) se entiende dentro de que los compuestos aromáticos, necesitan en ocasiones modificaciones con gastos de energía para poder ser aprovechados y las rutas, en su conjunto, no llevan tanto tiempo evolucionando como para que la eficiencia en su degradación sea muy alta. Sin embargo, las rutas del chasis metabólico de *P. putida* sí llevan un largo recorrido en la evolución y su degradación por el sistema bacteriano suele conllevar un mayor crecimiento en biomasa y un mayor rendimiento de carbonos de los metabolitos utilizados.



#### 5.4- Comparativa ruta del benzoato

Las rutas de degradación del benzoato han sido muy estudiadas tanto de forma individual como comparadas (34, 75, 76). Presentar una ruta de degradación aerobia y otra anaerobia permite que su degradación se dé, potencialmente, en más condiciones y en organismos con diferentes modos de vida. En este modelo creado en base al metabolismo de *P. putida* KT2440 (Anexo 1), que ya contiene una ruta de degradación para el benzoato, se han añadido las dos rutas presentes en la base de datos EAWAG-BDD (32, 33).

Con la comparativa entre estas rutas contemplada en la Tabla 6 se ha podido comprobar que la ruta aerobia de la base de datos EAWAG-BDD y la ruta perteneciente al metabolismo de *P. putida* KT2440 son iguales o, al menos, en términos de crecimiento en biomasa y rendimiento de carbonos producen el mismo resultado en el sistema bacteriano. Además, se ha podido comprobar que, permitiendo el uso de unas u otras rutas hay diferencias en cuanto al flujo de carbono y, por tanto, al crecimiento en biomasa. El sistema bacteriano, va a buscar el máximo crecimiento y, para ello, va a utilizar las rutas disponibles que le permitan crecer más en biomasa. Cuando se permite que el sistema emplee todas sus rutas disponibles el crecimiento en biomasa del sistema bacteriano es de 0,4925, que coincide con el crecimiento en biomasa que presenta el sistema bacteriano cuando únicamente se le permite usar la ruta anaerobia de degradación del benzoato y cuando solamente se le permite usar las rutas de degradación de benzoato añadidas. Este dato estaría indicando que la bacteria, si puede, utilizará la ruta de degradación anaerobia del benzoato cuando tenga sustrato disponible. Si únicamente se le permite usar el chasis metabólico de *P. putida* KT2440 o la ruta aerobia añadida de la base de datos EAWAG-BDD, el crecimiento en biomasa es de 0,4493. El rendimiento es mayor y el flujo de CO<sub>2</sub> expulsado es menor cuando la bacteria utiliza la ruta de degradación anaerobia del benzoato comparada con la situación en la que el sistema bacteriano utiliza la ruta de degradación aerobia del benzoato, en la que el rendimiento es menor y el flujo de CO<sub>2</sub> expulsado mayor.

Por lo tanto, la ruta de degradación óptima para el crecimiento en biomasa utilizando como sustrato el benzoato en el modelo creado en este trabajo es la ruta de degradación anaeróbica.

#### 5.6- Conclusiones

A modo de conclusión, del presente trabajo se ha obtenido un modelo de degradación de compuestos aromáticos usando como base el metabolismo de *P. putida* KT2440 iJN1462. Se han utilizado 99 rutas de compuestos aromáticos para presentar una aproximación amplia de

los flujos de carbono simulados con el modelo. Algunas de las rutas de degradación añadidas no presentan flujos de carbono y, las que lo presentan, proporcionan un crecimiento en biomasa en promedio menor que el que brinda el metabolismo propio del sistema bacteriano. Sin embargo, atendiendo a cada ruta hay mucha variación en este dato de crecimiento en biomasa y hay rutas como la ruta del compuesto aromático épsilon-caprolactano que permiten un buen crecimiento del sistema bacteriano. Además, se han calculado los datos de rendimiento de carbonos de los posibles metabolitos que presentan flujo de carbono en el sistema bacteriano y han sido congruentes, en muchos casos, presentando mayor flujo de carbono las reacciones de intercambio de los metabolitos con un mayor rendimiento en carbonos. Sin embargo, no es una regla que se cumpla en todos los metabolitos por lo que no se debe tratar como tal. Finalmente, con la comparativa entre las distintas rutas de degradación del benzoato se ha comprobado que la más idónea para el crecimiento bacteriano es la ruta anaerobia, que no está en el chasis metabólico de *P. putida* KT2440. Por lo tanto, en este modelo se estaría mejorando el desarrollo del sistema bacteriano viviendo a expensas de benzoato.

Cabe recordar que, el modelo creado depende de la información presente en las distintas bases de datos que a su vez se fundamentan en el conocimiento existente de las diferentes rutas de degradación. Es por esto por lo que, de cara al futuro, el modelo podría mejorarse cuando aumente la información disponible sobre rutas de degradación de compuestos aromáticos.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1- De Vleeschouwer, F., Gérard, L., Goormaghtigh, C., Mattielli, N., Le Roux, G., & Fagel, N. (2007). Atmospheric lead and heavy metal pollution records from a Belgian peat bog spanning the last two millenia: Human impact on a regional to global scale. *Science of The Total Environment*, 377(2–3), 282–295. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.02.017>.
- 2- Bränvall, M. L., Bindler, R., Emteryd, O., & Renberg, I. (2001). Four thousand years of atmospheric lead pollution in northern Europe: a summary from Swedish lake sediments. *Journal of Paleolimnology*, 25(4), 421–435. <https://doi.org/10.1023/a:1011186100081>
- 3- Lima, R., & Bachmann, R. T. (2002). Pollutant emissions from modern incinerators. *International Journal of Environment and Pollution*, 18(4), 336. <https://doi.org/10.1504/ijep.2002.003731>
- 4- Garcia-Martin, J. A., Chavarría, M., de Lorenzo, V., & Pazos, F. (2020). Concomitant prediction of environmental fate and toxicity of chemical compounds. *Biology Methods and Protocols*, 5(1). <https://doi.org/10.1093/biomethods/bpaa025>
- 5- Woodhead, A. J., Hicks, C. C., Norström, A. V., Williams, G. J., & Graham, N. A. J. (2019). Coral reef ecosystem services in the Anthropocene. *Functional Ecology*, 30(6), 1023-1034. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13331>
- 6- Tallis, H., & Kareiva, P. (2005). Ecosystem services. *Current Biology*, 15(18), 746-748. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.09.007>

- 7- RIVAS, F. (2006). Polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed on soils: A short review of chemical oxidation based treatments. *Journal of Hazardous Materials*, 138(2), 234–251. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.07.048>
- 8- Gan, S., Lau, E., & Ng, H. (2009). Remediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Journal of Hazardous Materials*, 172(2–3), 532–549. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.07.118>
- 9- Lamichhane, S., Bal Krishna, K., & Sarukkalige, R. (2016). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) removal by sorption: A review. *Chemosphere*, 148, 336–353. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.01.036>
- 10- Kadri, T., Rouissi, T., Kaur Brar, S., Cledon, M., Sarma, S., & Verma, M. (2017). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by fungal enzymes: A review. *Journal of Environmental Sciences*, 51, 52–74. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2016.08.023>
- 11- Zada, A., Khan, M., Khan, M. A., Khan, Q., Habibi-Yangjeh, A., Dang, A., & Maqbool, M. (2021). Review on the hazardous applications and photodegradation mechanisms of chlorophenols over different photocatalysts. *Environmental Research*, 195, 110742. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.110742>
- 12- Vidali, M. (2001). Bioremediation. An overview. *Pure and Applied Chemistry*, 73(7), 1163–1172. <https://doi.org/10.1351/pac200173071163>.
- 13- Haglund, P. (2007). Methods for Treating Soils Contaminated with Polychlorinated Dibenzo-p-Dioxins, Dibenzofurans, and Other Polychlorinated Aromatic Compounds. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*, 36(6), 467–474. [https://doi.org/10.1579/0044-7447\(2007\)36\[467:mftscw\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1579/0044-7447(2007)36[467:mftscw]2.0.co;2)
- 14- Nguyen, V. H., Phan Thi, L. A., Van Le, Q., Singh, P., Raizada, P., & Kajitvichyanukul, P. (2020). Tailored photocatalysts and revealed reaction pathways for photodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in water, soil and other sources. *Chemosphere*, 260, 127529. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127529>
- 15- Kot-Wasik, A., Dąbrowska, D., & Namieśnik, J. (2004). Photodegradation and biodegradation study of benzo(a)pyrene in different liquid media. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 168(1–2), 109–115. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2004.05.023>
- 16- Morrow, A. M., Allen, N. S., & Edge, M. (1998). Photodegradation of water-based acrylic coatings containing silica. *Journal of Coatings Technology*, 70(5), 65–72. <https://doi.org/10.1007/bf02697839>
- 17- Kim, K. H., Jahan, S. A., Kabir, E., & Brown, R. J. (2013). A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. *Environment International*, 60, 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.07.019>
- 18- Haritash, A., & Kaushik, C. (2009). Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials*, 169(1–3), 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.03.137>
- 19- Schleyer, P. V. R. (2001). Introduction: Aromaticity. *Chemical Reviews*, 101(5), 1115–1118. <https://doi.org/10.1021/cr0103221>

- 20- Cao, B., Nagarajan, K. & Loh, K.C. (2009). Biodegradation of aromatic compounds: current status and opportunities for biomolecular approaches. *Appl Microbiol Biotechnol* 85, 207–228. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2192-4>
- 21- Dionisi, D. (2014). Potential and Limits of Biodegradation Processes for the Removal of Organic Xenobiotics from Wastewaters. *ChemBioEng Reviews*, 1(2), 67–82. <https://doi.org/10.1002/cben.201300008>
- 22- Li, H., Liu, Y. H., Luo, N., Zhang, X. Y., Luan, T. G., Hu, J. M., Wang, Z. Y., Wu, P. C., Chen, M. J., & Lu, J. Q. (2006). Biodegradation of benzene and its derivatives by a psychrotolerant and moderately haloalkaliphilic *Planococcus* sp. strain ZD22. *Research in Microbiology*, 157(7), 629–636. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2006.01.002>
- 23- Wang, S. (2000). New cell growth pattern on mixed substrates and substrate utilization in cometabolic transformation of 4-chlorophenol. *Water Research*, 34(15), 3786–3794. [https://doi.org/10.1016/s0043-1354\(00\)00144-5](https://doi.org/10.1016/s0043-1354(00)00144-5)
- 24- Loh, K. C., & Wang, Y. (2008). Enhanced Cometabolic Transformation of 4-Chlorophenol in the Presence of Phenol by Granular Activated Carbon Adsorption. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 84(2), 248–255. <https://doi.org/10.1002/cjce.5450840212>
- 25- Wallace, S. J., de Solla, S. R., Head, J. A., Hodson, P. V., Parrott, J. L., Thomas, P. J., Thomas & Langlois, V. S. (2020). Polycyclic aromatic compounds (PACs) in the canadian environment: Exposure and effects on wildlife. *Environmental Pollution*, 265, 114863. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114863>
- 26- Belis, C. A., Cancelinha, J., Duane, M., Forcina, V., Pedroni, V., Passarella, R., . . . Larsen, B. R. (2011). Sources for PM air pollution in the po plain, italy: I. critical comparison of methods for estimating biomass burning contributions to benzo(a)pyrene. *Atmospheric Environment*, 45(39), 7266–7275. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2011.08.061>
- 27- Liao, K., & Yu, J. Z. (2020). Abundance and sources of benzo[a]pyrene and other PAHs in ambient air in hong kong: A review of 20-year measurements (1997–2016). *Chemosphere*, 259, 127518. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127518>
- 28- Abdel-Shafy, H. I., & Mansour, M. S. (2016). A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum*, 25(1), 107–123. <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2015.03.011>
- 29- Chakraborty, R., & Coates, J. D. (2004). Anaerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons. *Applied microbiology and biotechnology*, 64(4), 437–446. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1526-x>
- 30- Díaz, E., Jiménez, J. I., & Nogales, J. (2013). Aerobic degradation of aromatic compounds. *Current opinion in biotechnology*, 24(3), 431–442. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.10.010>
- 31- Fuchs, G., Boll, M., & Heider, J. (2011). Microbial degradation of aromatic compounds — from one strategy to four. *Nature Reviews Microbiology*, 9(11), 803–816. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2652>
- 32- *Benzoate Degradation Pathway*. (1999, 20 abril). EAWAG-BDD. Recuperado el día 19 de junio de 2021 de [http://eawag-bbd.ethz.ch/benz2/benz2\\_map.html](http://eawag-bbd.ethz.ch/benz2/benz2_map.html)
- 33- *Benzoate Degradation Pathway (Anaerobic)*. (1997, 15 diciembre). EAWAG-BDD. Recuperado el 20 de junio de 2021 de [http://eawag-bbd.ethz.ch/benz2/benz2\\_map.html](http://eawag-bbd.ethz.ch/benz2/benz2_map.html)

- 34- Valderrama, J. A., Durante-Rodríguez, G., Blázquez, B., García, J. L., Carmona, M., & Díaz, E. (2012). Bacterial Degradation of Benzoate. *Journal of Biological Chemistry*, 287(13), 10494–10508. <https://doi.org/10.1074/jbc.m111.309005>
- 35- Díaz, E., Ferrández, A., Prieto, M. A., & García, J. L. (2001). Biodegradation of aromatic compounds by *Escherichia coli*. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 65(4), 523–569. <https://doi.org/10.1128/MMBR.65.4.523-569.2001>
- 36- Lika, K., & Papadakis, I. A. (2009). Modeling the biodegradation of phenolic compounds by microalgae. *Journal of Sea Research*, 62(2), 135-146. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2009.02.005>
- 37- Jiménez J.I., Nogales J., García J.L., Díaz E. (2010) A Genomic View of the Catabolism of Aromatic Compounds in *Pseudomonas*. En: Timmis K.N. (eds) *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer, Berlin, Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4\\_91](https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4_91)
- 38- Silby, M. W., Winstanley, C., Godfrey, S. A., Levy, S. B., & Jackson, R. W. (2011). *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS microbiology reviews*, 35(4), 652–680. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00269.x>
- 39- Poblete-Castro, I., Borrero-de Acuña, J. M., Nikel, P. I., Kohlstedt, M., & Wittmann, C. (2017). Host organism: *Pseudomonas putida*. *Industrial biotechnology: Microorganisms*, 1(8). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. <https://doi.org/10.1002/9783527807796.ch8>
- 40- Díaz, E., Jiménez, J. I., & Nogales, J. (2013). Aerobic degradation of aromatic compounds. *Current Opinion in Biotechnology*, 24(3), 431-442. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.10.010>
- 41- Belda, E., van Heck, R. G., José Lopez-Sanchez, M., Cruveiller, S., Barbe, V., Fraser, C., Klenk, H. P., Petersen, J., Morgat, A., Nikel, P. I., Vallenet, D., Rouy, Z., Sekowska, A., Martins Dos Santos, V. A., de Lorenzo, V., Danchin, A., & Médigue, C. (2016). The revisited genome of *Pseudomonas putida* KT2440 enlightens its value as a robust metabolic chassis. *Environmental microbiology*, 18(10), 3403–3424. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13230>
- 42- Nikel, P. I., & de Lorenzo, V. (2018). *Pseudomonas putida* as a functional chassis for industrial biocatalysis: From native biochemistry to trans-metabolism. *Metabolic engineering*, 50, 142–155. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.05.005>
- 43- Nelson, K. E., Weinel, C., Paulsen, I. T., Dodson, R. J., Hilbert, H., Martins dos Santos, V. A., Fouts, D. E., Gill, S. R., Pop, M., Holmes, M., Brinkac, L., Beanan, M., DeBoy, R. T., Daugherty, S., Kolonay, J., Madupu, R., Nelson, W., White, O., Peterson, J., Khouri, H., ... Fraser, C. M. (2002). Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental microbiology*, 4(12), 799–808. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00366.x>
- 44- Nogales, J., Mueller, J., Gudmundsson, S., Canalejo, F. J., Duque, E., Monk, J., . . . Palsson, B. O. (2020). High-quality genome-scale metabolic modelling of *Pseudomonas putida* highlights its broad metabolic capabilities. *Environmental Microbiology*, 22(1), 255-269. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14843>
- 45- de Lorenzo, V. (2008). Systems biology approaches to bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(6), 579-589. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.10.004>

- 46- Garcia-Martin, J. A., Chavarría, M., de Lorenzo, V., & Pazos, F. (2020). Concomitant prediction of environmental fate and toxicity of chemical compounds. *Biology Methods and Protocols*, 5(1). <https://doi.org/10.1093/biomethods/bpaa025>
- 47- Kanehisa, M. (2000). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 27–30. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>
- 48- Kanehisa, M. (2019). Toward understanding the origin and evolution of cellular organisms. *Protein Science*, 28(11), 1947–1951. <https://doi.org/10.1002/pro.3715>
- 49- Kanehisa, M., Furumichi, M., Sato, Y., Ishiguro-Watanabe, M., & Tanabe, M. (2021). KEGG: integrating viruses and cellular organisms. *Nucleic acids research*, 49(D1), D545–D551. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa970>
- 50- Gao, J., Ellis, L. B. M., & Wackett, L. P. (2009). The University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database: improving public access. *Nucleic Acids Research*, 38(suppl\_1), D488–D491. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp771>
- 51- Caspi, R., Altman, T., Billington, R., Dreher, K., Foerster, H., Fulcher, C. A., Holland, T. A., Keseler, I. M., Kothari, A., Kubo, A., Krummenacker, M., Latendresse, M., Mueller, L. A., Ong, Q., Paley, S., Subhraveti, P., Weaver, D. S., Weerasinghe, D., Zhang, P., & Karp, P. D. (2013). The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of Pathway/Genome Databases. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), D459–D471. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1103>
- 52- Caspi, R., Billington, R., Keseler, I. M., Kothari, A., Krummenacker, M., Midford, P. E., Ong, W. K., Paley, S., Subhraveti, P., & Karp, P. D. (2019). The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes - a 2019 update. *Nucleic Acids Research*, 48(D1), D445–D453. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz862>
- 53- Caspi, R., Dreher, K., & Karp, P. D. (2013). The challenge of constructing, classifying, and representing metabolic pathways. *FEMS Microbiology Letters*, 345(2), 85–93. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12194>
- 54- Karp, P. D., & Caspi, R. (2011). A survey of metabolic databases emphasizing the MetaCyc family. *Archives of Toxicology*, 85(9), 1015–1033. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0705-2>
- 55- Ebrahim, A., Lerman, J. A., Palsson, B. O., & Hyduke, D. R. (2013). COBRApy: CONstraints-Based Reconstruction and Analysis for Python. *BMC Systems Biology*, 7(1), 74. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-7-74>
- 56- Poolman, M. G., Miguet, L., Sweetlove, L. J., & Fell, D. A. (2009). A Genome-Scale Metabolic Model of *Arabidopsis* and Some of Its Properties. *Plant Physiology*, 151(3), 1570–1581. <https://doi.org/10.1104/pp.109.141267>
- 57- Vazquez, A., Beg, Q. K., deMenezes, M. A., Ernst, J., Bar-Joseph, Z., Barabási, A. L., Boros, L. G., & Oltvai, Z. N. (2008). Impact of the solvent capacity constraint on *E. coli* metabolism. *BMC Systems Biology*, 2(1). <https://doi.org/10.1186/1752-0509-2-7>
- 58- Henry, C. S., Broadbelt, L. J., & Hatzimanikatis, V. (2007). Thermodynamics-Based Metabolic Flux Analysis. *Biophysical Journal*, 92(5), 1792–1805. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.093138>
- 59- Gama-Castro, S., Jimenez-Jacinto, V., Peralta-Gil, M., Santos-Zavaleta, A., Penaloza-Spinola, M. I., Contreras-Moreira, B., Segura-Salazar, J., Muniz-Rascado, L., Martinez-Flores, I., Salgado, H., Bonavides-Martinez, C., Abreu-Goodger, C., Rodriguez-Penagos, C., Miranda-Rios, J., Morett, E.,

- Merino, E., Huerta, A. M., Trevino-Quintanilla, L., & Collado-Vides, J. (2007). RegulonDB (version 6.0): gene regulation model of *Escherichia coli* K-12 beyond transcription, active (experimental) annotated promoters and Textpresso navigation. *Nucleic Acids Research*, 36, D120-D124. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm994>
- 60- Orth, J. D., Thiele, I., & Palsson, B. (2010). What is flux balance analysis? *Nature Biotechnology*, 28(3), 245–248. <https://doi.org/10.1038/nbt.1614>
- 61- Feist, A. M., & Palsson, B. O. (2010). The biomass objective function. *Current Opinion in Microbiology*, 13(3), 344–349. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.03.003>
- 62- The cobrapy core team. (2021, 24 febrero). *Documentation for COBRApy — cobra 0.21.0 documentation*. Documentation for COBRApy. Recuperado el 19 de junio de 2021 de <https://cobrapy.readthedocs.io/en/latest/>
- 63- Jeff Reback, Wes McKinney, jbrockmendel, Joris Van den Bossche, Tom Augspurger, Phillip Cloud, ... Mortada Mehryar. (2020, March 18). pandas-dev/pandas: Pandas 1.0.3 (Version v1.0.3). Zenodo. <http://doi.org/10.5281/zenodo.3715232>
- 64- van Duuren, J. B., Puchalka, J., Mars, A. E., Bückner, R., Eggink, G., Wittmann, C., & dos Santos, V. A. M. (2013). Reconciling *in vivo* and *in silico* key biological parameters of *Pseudomonas putida* KT2440 during growth on glucose under carbon-limited condition. *BMC Biotechnology*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/1472-6750-13-93>
- 65- Sohn, S. B., Kim, T. Y., Park, J. M., & Lee, S. Y. (2010). In silicogenome-scale metabolic analysis of *Pseudomonas putida* KT2440 for polyhydroxyalkanoate synthesis, degradation of aromatics and anaerobic survival. *Biotechnology Journal*, 5(7), 739–750. <https://doi.org/10.1002/biot.201000124>
- 66- Ravikrishnan, A., & Raman, K. (2015). Critical assessment of genome-scale metabolic networks: the need for a unified standard. *Briefings in Bioinformatics*, 16(6), 1057–1068. <https://doi.org/10.1093/bib/bbv003>.
- 67- Rule bt0335. (2008, 13 abril). EAWAG-BDD. Recuperado el 19 de junio de 2021 de <http://eawag-bbd.ethz.ch/servlets/rule.jsp?rule=bt0335>
- 68- Teusink, B., Wiersma, A., Molenaar, D., Francke, C., de Vos, W. M., Siezen, R. J., & Smid, E. J. (2006). Analysis of Growth of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 on a Complex Medium Using a Genome-scale Metabolic Model. *Journal of Biological Chemistry*, 281(52), 40041–40048. <https://doi.org/10.1074/jbc.m606263200>
- 69- Nookaew, I., Jewett, M. C., Meechai, A., Thammarongtham, C., Laoteng, K., Cheevadhanarak, S., Nielsen, J., & Bhumiratana, S. (2008). The genome-scale metabolic model iIN800 of *Saccharomyces cerevisiae* and its validation: a scaffold to query lipid metabolism. *BMC Systems Biology*, 2(1), 71. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-2-71>
- 70- Poolman, M. G., Miguët, L., Sweetlove, L. J., & Fell, D. A. (2009b). A Genome-Scale Metabolic Model of *Arabidopsis* and Some of Its Properties. *Plant Physiology*, 151(3), 1570–1581. <https://doi.org/10.1104/pp.109.141267>.
- 71- Balagurunathan, B., Jonnalagadda, S., Tan, L., & Srinivasan, R. (2012). Reconstruction and analysis of a genome-scale metabolic model for *Scheffersomyces stipitis*. *Microbial Cell Factories*, 11(1), 27. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-27>.

- 72- Alonso, A. P., Goffman, F. D., Ohlrogge, J. B., & Shachar-Hill, Y. (2007). Carbon conversion efficiency and central metabolic fluxes in developing sunflower (*Helianthus annuus* L.) embryos. *The Plant Journal*, 52(2), 296–308. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2007.03235.x>
- 73- Saifuddin, M., Bhatnagar, J. M., Segrè, D., & Finzi, A. C. (2019). Microbial carbon use efficiency predicted from genome-scale metabolic models. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11488-z>.
- 74- Williams, T. C., Poolman, M. G., Howden, A. J., Schwarzlander, M., Fell, D. A., Ratcliffe, R. G., & Sweetlove, L. J. (2010). A Genome-Scale Metabolic Model Accurately Predicts Fluxes in Central Carbon Metabolism under Stress Conditions. *Plant Physiology*, 154(1), 311–323. <https://doi.org/10.1104/pp.110.158535>.
- 75- Loh, K. C., & Chua, S. S. (2002). Ortho pathway of benzoate degradation in *Pseudomonas putida*: induction of meta pathway at high substrate concentrations. *Enzyme and Microbial Technology*, 30(5), 620–626. [https://doi.org/10.1016/s0141-0229\(02\)00016-9](https://doi.org/10.1016/s0141-0229(02)00016-9).
- 76- Oie, C. S., Albaugh, C. E., & Peyton, B. M. (2007). Benzoate and salicylate degradation by *Halomonas campisalis*, an alkaliphilic and moderately halophilic microorganism. *Water Research*, 41(6), 1235–1242. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.12.029>.

## ANEXOS

Todos los anexos se encuentran en el siguiente enlace a Drive:

[https://drive.google.com/drive/folders/1Rppph6dsn08KD5\\_TKilBtgV\\_DA53fHXXH?usp=sharing](https://drive.google.com/drive/folders/1Rppph6dsn08KD5_TKilBtgV_DA53fHXXH?usp=sharing)

Anexo 1-Archivo excel con el modelo creado. “Modelo\_creado”.

Anexo 2-Script para el análisis de flujos del modelo. “Script\_flujos”

Anexo 3-Datos de flujos de carbono para cada reacción normalizados por el número de carbonos del compuesto inicial. “Datos\_flujos”.

Anexo 4-Flujos de carbono agrupados en función del número de carbonos. “ClusterC”.

Anexo 5-Flujos de carbono agrupados en función del número de nitrógenos. “ClusterN”.

Anexo 6-Archivo excel con los datos procedentes del modelo para calcular los rendimientos y la tabla con los rendimientos calculados. “Datos\_Rendimientos”.