



MÁSTERES de la UAM

Facultad de Ciencias /13-14

Máster en
Microbiología



excelencia Campus Internacional
UAM
CSIC+



**Reconstrucción y
análisis a escala genó-
mica del metabolismo
de la bacteria modelo
en degradación anae-
róbica de compuestos
aromáticos *Azoarcus*
sp. CIB**
Lucía Agudo Algibe

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE BIOLOGÍA

Proyecto fin de Máster Microbiología

(Itinerario Ambiental)

Reconstrucción y análisis a escala genómica del
metabolismo de la bacteria modelo en degradación
anaeróbica de compuestos aromáticos *Azoarcus* sp. CIB

Lucía Agudo Algibe

Eduardo Díaz Fernández

Juan Nogales Enrique

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS

Madrid, 2014

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, darles las gracias a mis directores del trabajo fin de máster, Eduardo y Juan, por darme la oportunidad de formar parte del grupo y por tantas cosas que con cada uno de vosotros he aprendido. En especial, gracias Eduardo por haber aportado esos conocimientos que se adquieren con la experiencia y de los que he aprendido tanto. Gracias Juan, porque a pesar de ser cabezona, “corta de memoria”, un pequeño “Padawan” y entre muchas cosas más, espe que algún día pueda dar a alguien esas *Masterclass* tanto profesionales como personales que me has enseñado.

También agradecer a todas las personas del CIB a las que he tenido oportunidad de conocer y con las que he compartido, y espero compartir, grandes experiencias. En especial darles las gracias a mis compañeros del laboratorio 373, Igor y Gonzalo, por aconsejarme en todo momento y por hacerme reír con sus comentarios y vídeos. También agradecer a Cris, Natalia, Natalia H., Carlos y Julia por escucharme siempre y por aguantar mis rondas a vuestros laboratorios los miércoles, aunque a veces no funcionen.

Agradecer a todos mis compañeros del máster que han sufrido conmigo este año agotable. Gracias a Cris, Toni, Yanick, Mercedes, Marta, Enrique, Ana, Violeta, Sara y Jesús porque sin vosotros no hubiera sido tan llevadero este curso.

Por último, agradecer tanto a mis amigos como a mi familia, pero sobre todo a mis padres y hermanos que a pesar de no entender por completo mis preocupaciones siempre me han apoyado.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
1. Los compuestos aromáticos	2
2. El catabolismo de los compuestos aromáticos en bacterias	3
a. Catabolismo aeróbico de compuestos aromáticos	3
b. Catabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos	5
3. Reconstrucción a escala genómica de un modelo metabólico.....	7
OBJETIVOS	11
MATERIALES Y MÉTODOS	12
1. Materiales	12
2. Métodos.....	12
a. Construcción de un <i>draft</i> inicial.	13
b. Curación manual de la versión inicial del modelo.	15
c. Conversión de la reconstrucción a modelo matemático.	18
d. Validación del modelo y análisis.....	19
RESULTADOS	20
1. Construcción y características del modelo metabólico <i>i</i> LA772 de <i>Azoarcus</i> sp. CIB	20
2. Validación del modelo metabólico <i>i</i> LA772 de <i>Azoarcus</i> sp. CIB.....	24
a. Validación de fuentes de carbono.....	24
b. Validación del proceso de desnitrificación.....	25
3. Análisis a nivel de sistemas del metabolismo de compuestos aromáticos en <i>Azoarcus</i> sp. CIB	26
a. Evaluación del rendimiento energético de rutas aeróbicas y anaeróbicas de degradación de compuestos aromáticos.....	26
b. Análisis funcional del metabolismo de compuestos aromáticos en función de la disponibilidad de oxígeno.....	28
4. Análisis del metabolismo accesorio implicado en la degradación de compuestos aromáticos en <i>Azoarcus</i> sp. CIB.....	30
a. Identificación de reacciones esenciales para el metabolismo de compuestos aromáticos.....	31
b. Análisis de robustez de las reacciones esenciales para el metabolismo anaeróbico de los compuestos aromáticos.	33
DISCUSIÓN	36
<i>i</i> LA772 representa con alto grado de fidelidad las capacidades metabólicas de <i>Azoarcus</i> sp. CIB.....	36

2.	Estudio del proceso de desnitrificación en <i>Azoarcus</i> sp. CIB utilizando iLA772.....	37
3.	Análisis del potencial metabólico de <i>Azoarcus</i> sp. CIB usando iLA772	38
4.	Efecto de la disponibilidad de oxígeno en la degradación de copuestos aromáticos en CIB.	40
5.	Estudio del metabolismo accesorio de compuestos aromáticos en <i>Azoarcus</i> sp. CIB ...	41
CONCLUSIONES		44
BIBLIOGRAFÍA		45

RESUMEN

Azoarcus sp. CIB es una bacteria anaerobia facultativa cuyo genoma ha sido recientemente secuenciado y que presenta una gran versatilidad metabólica frente a los compuestos aromáticos, a los cuales degrada en su mayoría tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas (desnitrificando). Esta cualidad la ha convertido en una bacteria modelo en procesos de biodegradación. No obstante, se desconocen aspectos fundamentales tanto de su metabolismo primario como del metabolismo secundario, lo cual limita la completa utilización de su potencial biodegradativo con fines biotecnológicos. En este trabajo se ha realizado una reconstrucción metabólica a escala genómica de *Azoarcus* sp. CIB con objeto de conocer y explorar distintos aspectos de su fisiología y metabolismo desde un punto de vista de sistemas, con especial hincapié en aquellos relacionados con su capacidad para la degradación de compuestos aromáticos.

El modelo metabólico a escala genómica de *Azoarcus* sp. CIB (*iLA772*) comprende un total de 772 genes, 902 metabolitos y 1010 reacciones que reflejan gran parte de las capacidades metabólicas de esta bacteria. Este modelo proporciona una información muy precisa sobre el metabolismo central de la cepa CIB. Por otro lado *iLA772* contiene uno de los modelados más completos del metabolismo de aromáticos hasta la fecha, incluyendo rutas que han sido modeladas por primera vez, tales como la ruta aeróbica box y la ruta anaeróbica bad del benzoato. El análisis realizado con el modelo *iLA772* sobre las fuentes de carbono testadas *in vivo* permitió validar y confirmar la capacidad predictiva del modelo, a la vez que sugirió nuevas fuentes potenciales de carbono que no habían sido probadas previamente. Por otro lado, el estudio del metabolismo de benzoato en función de la disponibilidad de oxígeno, sugirió que la co-expresión de las rutas de degradación tanto aeróbica como anaeróbica del benzoato observada experimentalmente en anaerobiosis, podría aportar una ventaja energética a bacterias que habitan medios fluctuantes en la cantidad de oxígeno. El hecho, de que el estudio del metabolismo de fenilacetato mostrara un comportamiento similar sugiere que la coexistencia de metabolismo aeróbico y anaeróbico de un mismo compuestos aromático podría ser una estrategia ampliamente extendida en bacterias aeróbicas facultativas. Finalmente, el estudio del metabolismo accesorio de compuestos aromáticos utilizando *iLA722* ha sugerido un papel fundamental de los sistemas flavoproteicos de transferencia electrónica (ETF), en el mismo.

Dado que el modelo metabólico a escala genómica *iLA772* de *Azoarcus* sp. CIB se ha mostrado altamente preciso y completo, se espera que se convierta en una importante herramienta computacional que dirija esfuerzos biotecnológicos encaminados a la optimización de las capacidades biodegradativas no solo de CIB sino también de otras bacterias con similares características.

I. INTRODUCCIÓN

1. Los compuestos aromáticos

Los compuestos aromáticos constituyen el segundo tipo de compuestos orgánicos más distribuido en la naturaleza, sólo por detrás de los carbohidratos. Se trata de un grupo muy variado en su composición, basado en la presencia de uno o más anillos bencénicos que pueden estar sustituidos en diferentes posiciones por una gran diversidad de grupos funcionales distintos, tales como hidroxilos, aminas, halógenos, entre otros. La categoría de compuesto aromático no se aplica sólo al benceno y sus derivados, sino que también se hace extensiva a compuestos cíclicos con dobles enlaces conjugados que poseen un número de átomos de carbono diferente de 6 en el anillo aromático (p. ej., el furano) y a los compuestos heterocíclicos (N-; S-; O-heterociclos). Un gran número de estos compuestos aromáticos se encuentran ampliamente distribuidos en el medio ambiente de forma no recalcitrante, constituyendo parte de las biomacromoléculas tales como el ADN, ARN y los aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano), los combustibles fósiles, o incluso el tracto intestinal de los animales (Carmona *et al.*, 2009; Porter & Young, 2014). En cambio, la pared celular de las plantas es su principal fuente en el medio ambiente, debido a la liberación de productos derivados de la degradación de lignina, la cual constituye el 25% de la biomasa de la tierra (Gibson & Harwood, 2002; Cesarino *et al.*, 2012). La superficie de las raíces de las plantas y su área circundante, denominada rizosfera, es un ambiente complejo en el que está presente una gran diversidad de compuestos aromáticos como resultado del metabolismo de los vegetales y microorganismos (Matilla *et al.*, 2007). A pesar de este origen natural, durante el último siglo se han acumulado en la naturaleza compuestos aromáticos de origen antropogénico. Muchos de estos compuestos aromáticos pertenecen al grupo de los xenobióticos, es decir, compuestos generados como consecuencia de la actividad humana que contienen sustituyentes que no existen o se encuentran raramente en la naturaleza. Esto hace que no puedan ser degradados o lo hagan muy lentamente (Carmona *et al.*, 2009; Porter & Young, 2014). Los compuestos xenobióticos persisten por largos periodos en el ambiente, acumulándose en la cadena trófica y provocando efectos adversos en los ecosistemas naturales y en la salud humana causando desde leves daños dermatológicos hasta graves afecciones del sistema nervioso central o leucemias (Chee-Sanford *et al.*, 1996; Navia & Seeger, 2006). Entre los aromáticos contaminantes, cabría destacar especialmente a los que constituyen el grupo denominado BTEX: benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos, debido a su importancia como contaminantes de acuíferos y de sedimentos procedentes de filtraciones o vertidos de petróleo o derivados de éste (Porter & Young, 2014). Debido a este problema, en las últimas décadas ha surgido un gran interés en la búsqueda y desarrollo de estrategias biológicas que puedan eliminar los compuestos aromáticos de los

ecosistemas, tales como la biorremediación, biotransformación o el desarrollo de biosensores (Díaz, 2004; Fuchs *et al.*, 2011).

2. El catabolismo de los compuestos aromáticos en bacterias

Dada la gran abundancia y persistencia de los compuestos aromáticos, su reciclaje es vital para el mantenimiento del ciclo del carbono en el planeta (Harwood & Parales, 1996). Pese a la gran estabilidad termodinámica que le otorga la configuración electrónica del anillo bencénico a estas moléculas, las bacterias han desarrollado estrategias para la mineralización de la mayoría de estos compuestos presentes en la naturaleza (Gibson & Harwood, 2002; Díaz, 2004; Sierra-García *et al.*, 2014). Por dicha estabilidad, los microorganismos han desarrollado soluciones que implican una gran variedad de “rutas periféricas” encargadas de activar los diversos sustratos aromáticos a un número limitado de intermediarios centrales, los cuales posteriormente perderán su carácter aromático y se transformarán en compuestos del metabolismo primario de la célula a través de las denominadas “rutas centrales” (Heider & Fuchs, 1997; Díaz *et al.*, 2013).

El catabolismo de los compuestos aromáticos implica dos procesos secuenciales: 1) modificación de la densidad electrónica del anillo aromático, y 2) ruptura del anillo. Estos procesos suponen la aplicación de reacciones de oxidación o reducción dependiendo de si el metabolismo se lleva a cabo en condiciones aeróbicas o anaeróbicas, respectivamente (Heider & Fuchs, 1997; Díaz, 2004). Por tanto, dependiendo del aceptor final de los electrones, los compuestos aromáticos están sometidos a dos tipos básicos de catabolismo. Si el aceptor es una molécula de oxígeno, se trata de una degradación aeróbica. Si el aceptor final de los electrones es otra molécula distinta al oxígeno, la degradación es de tipo anaeróbica. Estos catabolismos presentan características diferenciales, así en el metabolismo aeróbico generalmente se produce la desestabilización del anillo aromático a través de reacciones de oxidación que introducen grupos hidroxilo, mientras que en el catabolismo anaeróbico la desestabilización del anillo aromático se lleva a cabo generalmente mediante la formación de un derivado tioesterificado de coenzima A (CoA) que favorece las posteriores reacciones de reducción del anillo (Carmona *et al.*, 2009; Fuchs *et al.*, 2011; Díaz *et al.*, 2013).

2.1. Catabolismo aeróbico de compuestos aromáticos

La degradación aeróbica de compuestos aromáticos es el mecanismo de mineralización mejor estudiado. En el catabolismo aeróbico se diferencian dos rutas, i) las rutas aeróbicas clásicas en las que el compuesto sufre una activación del anillo y posterior ruptura y conversión en un compuesto intermediario no aromático. El ejemplo clásico es la degradación del benzoato a catecol, el cual es degradado al intermediario β -ceto adipato (vía central del β -ceto adipato) mediante la apertura de anillo tipo *orto* (Fig. 1) (Harwood & Parales, 1996; Díaz *et al.*, 2013); y

ii) las rutas aeróbicas híbridas en las que combinan características del catabolismo anaeróbico (los sustratos son transformados en derivados de CoA mediante una tioesterificación mediada por enzimas denominadas CoA ligasas) y del catabolismo aeróbico (pérdida del carácter aromático del derivado de CoA mediante una reacción de oxigenación que genera un derivado, el cual sufre posteriormente la apertura del anillo alicíclico por la acción de una hidrolasa) (Fuchs *et al.*, 2011; Díaz *et al.* 2013). Una de las dos rutas aerobias híbridas mejor estudiadas ha sido la ruta box de degradación de benzoato vía benzoil-CoA (Fig. 1) en *Azoarcus evansii* (Zaar *et al.*, 2004; Rather *et al.*, 2011), aunque también se ha estudiado en otras bacterias tales como otras cepas del género *Azoarcus* (Valderrama *et al.*, 2014), *Thauera aromatica* (Schuhle *et al.*, 2001), *Bacillus stearothermophilus* (Zaar *et al.*, 2001) y *Burkholderia xenovorans* LB400 (Denef *et al.*, 2006). La otra ruta aeróbica híbrida de la que se dispone de gran información es la ruta paa involucrada en la degradación del fenilacético, que a diferencia del benzoato que puede ser degradado por rutas aeróbicas clásicas o por la ruta híbrida del benzoil-CoA, hasta la fecha sólo se conoce la ruta híbrida paa para su degradación aeróbica (Teufel *et al.*, 2012).

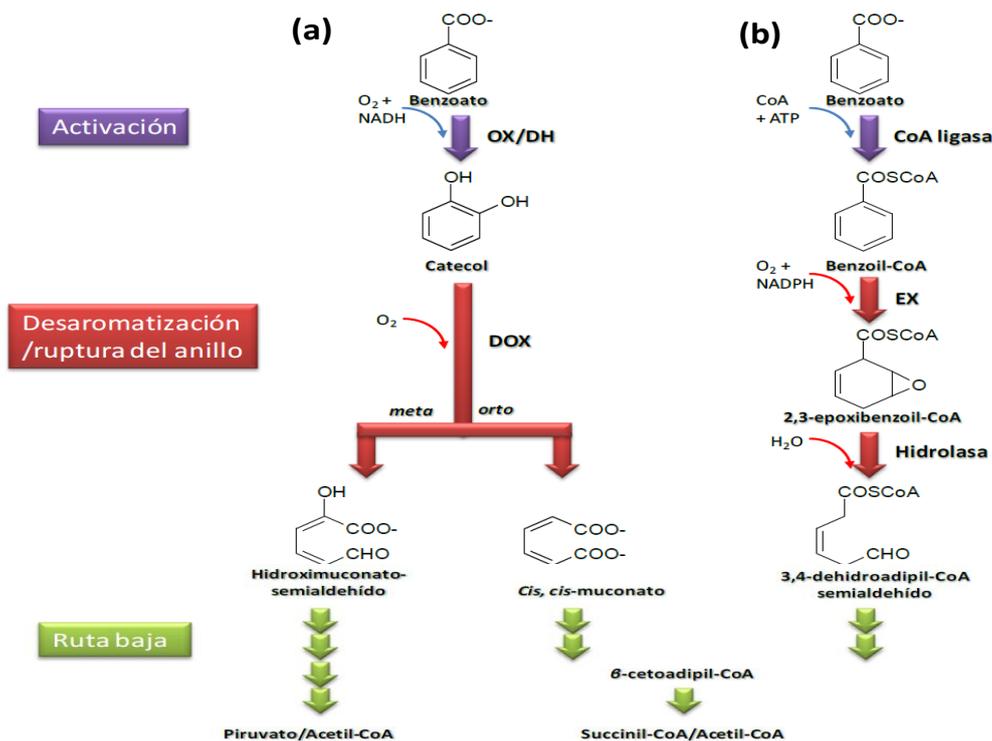


Fig. 1. Esquema de las dos estrategias bioquímicas para degradación aeróbica de los compuestos aromáticos en bacterias. Se ha utilizado el benzoato como compuesto modelo. El benzoato puede ser degradado por la vía aeróbica clásica (A) o por la vía aeróbica híbrida (B). En ambas estrategias pueden ser identificados un primer paso de activación del anillo (flecha morada), un segundo paso que involucra la desaromatización/ruptura del anillo (flechas rojas) con una posterior degradación hacia metabolitos centrales mediante las rutas bajas (flechas verdes). La ruptura orto del anillo catecolico (vía central del β-cetoadipato) y la vía híbrida del benzoil-CoA convergen en el intermediario común β-cetoadipil-CoA. Las abreviaturas representan: OX, oxigenasa hidroxilante de anillo; DH, dihidrodiol deshidrogenasa; DOX, dioxigenasa de ruptura de anillo (intradiol o extradiol dioxigenasas); EX, aril-CoA epoxidasa. **Adaptado de Díaz *et al.*, 2013.**

2.2. Catabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos

Existen numerosos hábitats en los que no está presente el oxígeno y que sufren la contaminación de los compuestos aromáticos, tales como acuíferos subterráneos, sedimentos acuáticos o lechos sumergidos (Lovley, 2003). Por ello, la actividad microbiana en estos ambientes es clave en los ciclos biogeoquímicos (Lovley, 2003; Heider, 2007). El catabolismo anaeróbico está menos estudiado que el catabolismo aeróbico. En ausencia de oxígeno, el metabolismo bacteriano requiere de otros aceptores finales de electrones. En la degradación anaeróbica de compuestos aromáticos las bacterias emplean como aceptores finales de electrones moléculas inorgánicas tales como el NO_3^- , que es reducido a NO_2^- o N_2 (desnitrificación) (Spormann & Widdel, 2000). Las técnicas de secuenciación de genomas han permitido obtener en los últimos tiempos una información más completa del potencial catabólico de diferentes proteobacterias que degradan anaeróbicamente compuestos aromáticos como por ejemplo *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 (α -proteobacteria fotótrofa; Larimer *et al.*, 2004), *Aromatoleum aromaticum* EbN1 (β -proteobacteria desnitrificante; Rabus *et al.*, 2005), *Thauera* sp. MZ1T (β -proteobacteria desnitrificante; CP001281), o *Geobacter metallireducens* GS-15 (δ -proteobacteria reductora de hierro; Butler *et al.*, 2007).

Dentro del catabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos cabe destacar dos tipos de rutas, i) Las rutas catabólicas que generan como intermediarios centrales compuestos hidroxilados y que posteriormente sufren la reducción directa del anillo mediante el aporte de poder reductor en forma de NADPH o por una ferredoxina (Alhapel *et al.*, 2006); y ii) Las rutas catabólicas que conducen a la formación de benzoil-CoA u otros aril-CoA derivados (Schink & Friedrich, 2000). El benzoil-CoA es el intermediario central más común en la degradación anaeróbica (Carmona *et al.*, 2009), ya que en él convergen diferentes rutas periféricas a través de las cuales son degradados una gran variedad de compuestos tales como el etilbenceno, bencilalcohol, *p*-cresol, tolueno, fenol, fenilacetato, fenilpropionato, fenilalanina, vanilina, anilina, benzoato, y sus derivados hidroxilados o aminados, así como moléculas aromáticas halogenadas (Heider & Fuchs, 1997; Schink & Friedrich, 2000; Gibson & Harwood, 2002; Carmona *et al.*, 2009; Fuchs *et al.*, 2011). Dado que el benzoato se incorpora directamente a la ruta central del benzoil-CoA a través de una activación mediada por la benzoato-CoA ligasa (Fig. 2), este compuesto se ha utilizado como sustrato modelo para todos los estudios de caracterización de dicha ruta central (Carmona *et al.*, 2009). La ruta central del benzoil-CoA se estructura en dos segmentos metabólicos. En el primero el benzoil-CoA es reducido y posteriormente transformado en un compuesto alifático (ruta alta del benzoil-CoA). En la segunda este intermediario alifático es metabolizado hacia intermediarios centrales a través de una vía similar a la β -oxidación de los ácidos grasos (ruta baja del benzoil-CoA) (Fig. 2). Mientras que la ruta alta es específica del catabolismo de compuestos aromáticos, la ruta baja es

común para el catabolismo de compuestos aromáticos y otros compuestos tales como los ácidos dicarboxílicos de número impar de átomos de carbono (Harrison & Harwood, 2005).

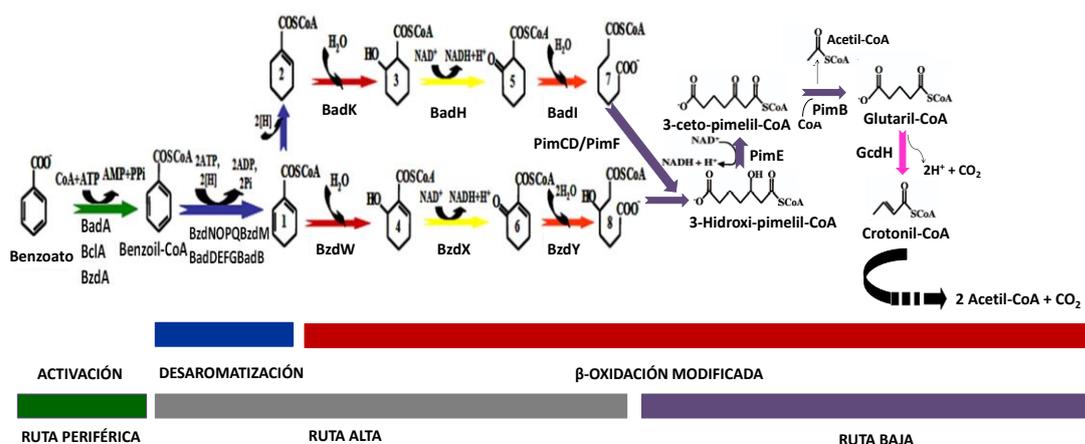


Fig. 2. Esquema de las rutas bioquímicas para la degradación anaeróbica del benzoato en bacterias.

En la parte inferior de la figura, se indican las diferentes fases de la degradación anaeróbica del benzoato: (I) Ruta periférica o activación del benzoato a benzoil-CoA (recuadro verde) por medio de la benzoato-CoA ligasa (flecha verde); (II) Ruta central, o alta del benzoil-CoA (recuadro gris), donde tiene lugar la desaromatización o reducción del anillo aromático (recuadro azul) por medio de la benzoil-CoA reductasa (flecha azul) y la β-oxidación modificada (recuadro rojo) mediante procesos de hidratación (flechas rojas), deshidrogenación (flechas amarillas) e hidrólisis (flechas naranjas) del compuesto alicíclico; (III) Ruta baja del benzoil-CoA (recuadro morado) en la que los compuestos C7-dicarboxil-CoA son además degradados a dos moléculas de acetil-CoA y una de CO₂ a través de una serie de reacciones que involucra una β-oxidación de un ácido dicarboxílico (flechas moradas), una glutaril-CoA deshidrogenasa (flecha rosa), y una β-oxidación de ácidos grasos de cadena corta (flecha segmentada). Se indican también las enzimas implicadas en la ruta periférica, alta y baja en *R. palustris* (Bad), y *Azoarcus* (Bzd). Las enzimas implicadas en la ruta baja son las siguientes: PimCD, flavina que contiene acil-CoA deshidrogenasa; PimF, enoil-CoA hidratasa; PimE, hidroxiacil-CoA dehidrogenasa; PimB, acil-CoA acetiltransferasa (β-cetothiolasa); GcdH, glutaril-CoA deshidrogenasa. Los distintos metabolitos representados en la figura en la ruta alta se indican a continuación: (1) ciclohex-1,5-dieno-1-carbonil-CoA; (2) ciclohex-1-eno-1-carbonil-CoA; (3) 6-hidroxiciclohex-1-eno-1-carbonil-CoA; (4) 2-hidroxiciclohex-1-carbonil-CoA; (5) 6-cetociclohex-1-eno-1-carbonil-CoA; (6) 2-cetociclohexano-1-carbonil-CoA; (7) 3-hidroxipimelil-CoA; (8) pimelil-CoA. La serie de metabolitos (2, 3, 5, 7), sólo ha sido descrita en *R. palustris*, microorganismo en el que la benzoil-CoA reductasa BadDEFG realiza una reducción extra del anillo aromático, mientras que la serie (1, 4, 6, 8), está presente en bacterias de los géneros *Thauera*, *Azoarcus*, *Magnetospirillum*, *Geobacter* y *Syntrophus*. **Modificado de Carmona et al. (2009).**

La identificación de las cepas bacterianas presentes en los ambientes anóxicos revela la presencia frecuente de microorganismos encuadrados en el género *Azoarcus* (β -proteobacterias). El género *Azoarcus* se puede dividir principalmente en dos grupos ecológicos de bacterias. Un grupo se caracteriza por estar asociado con las raíces de las plantas, siendo algunos de sus miembros los primeros en hallarse dentro del género, aislados en la rizosfera de *Leptochloa fusca* (L.) Kunth (hierba de Kallar). Estas primeras bacterias se definieron tras realizar los primeros análisis fisiológicos como microorganismos no desnitrificantes (Reinhold & Hurek, 1993), con actividad nitrogenasa (Fries *et al.*, 1994). Los estudios posteriores aumentaron el número de especies identificadas dentro del género *Azoarcus*, demostrando que muchas de estas mostraban metabolismo desnitrificante en presencia de diversos compuestos aromáticos suministrados como única fuente de carbono y energía. Algunas de las nuevas especies identificadas presentaban un metabolismo anaerobio estricto, *A. anaerobius* (Springer *et al.*, 1998), mientras que otras eran anaerobias facultativas, como *A. evansii* (Anders *et al.*, 1995), *A. toluolyticus* (Zhou *et al.*, 1995), *A. toluvorans* (Fries *et al.*, 1994; Song *et al.*, 1999), *A. toluclasticus* (Song *et al.*, 1999) y *A. buckelii* (Mechichi *et al.*, 2002). La bacteria *A. aromaticum* EbN1 (Rabus & Widdel, 1995) en un principio se identificó como un miembro del género *Azoarcus*, pero en la actualidad se clasifica como un miembro del nuevo género *Aromatoleum*. Todos los miembros del género poseen motilidad, debida en la mayoría de los casos a un único flagelo polar (Anders *et al.*, 1995; Song *et al.*, 1999), y casi todos ellos presentan morfología de diplobacilo. La cepa *Azoarcus* sp. CIB fue aislada por nuestro laboratorio por su capacidad de utilizar tolueno en condiciones anaeróbicas (López-Barragán *et al.*, 2004). Estudios posteriores pusieron de manifiesto que esta cepa además posee la capacidad inusual dentro de su género de degradar tanto aeróbica como anaeróbicamente (desnitrificando) vía benzoil-CoA un amplio número de compuestos aromáticos como el benzoato, tolueno, fenilacético o el *p*-cresol, entre otros (Barragán *et al.*, 2005; Durante-Rodríguez *et al.*, 2006; Blázquez *et al.*, 2008; Durante-Rodríguez *et al.*, 2008 & 2010). Por consiguiente la cepa CIB, bacteria que ha sido objeto de estudio de este trabajo, es un sistema modelo ideal para ampliar los estudios sobre la genética y el metabolismo de las rutas periféricas y centrales de degradación de compuestos aromáticos

3. Reconstrucción a escala genómica de un modelo metabólico

En los últimos años, las ciencias biológicas han sido sometidas a una avalancha de datos en forma de las llamadas "ómicas". Los datos de transcriptómica, proteómica, metabolómica y fluxómica son ahora recogidos durante los experimentos biológicos. Estas cantidades sustanciales de datos que se generan han permitido un avance sin precedentes en el campo. En paralelo, los progresos realizados en bioinformática y en la aplicación de análisis computacional, a escala genómica, han contribuido en gran medida a la mejor comprensión de

los sistemas biológicos. Sin embargo, la correcta contextualización y el uso efectivo de este enorme volumen de datos parecen ser un reto desde un punto de vista puramente matemático y estadístico, y los enfoques basados en su integración están empezando a ser una preocupación importante. La biología de sistemas intenta obtener una comprensión detallada de los procesos biológicos a través de un enfoque completo, mediante el cual los datos sobre los procesos subcelulares, incluyendo un nivel multidimensional del metabolismo, regulación y señalización, son integrados detalladamente en forma de modelos computacionales para una sola célula o incluso grupos de células.

Un campo emergente de la biología de sistemas es la reconstrucción a escala genómica de modelos metabólicos (GEMREs, del inglés, *GE*nome-scale *ME*tabolic *RE*construction). Estas reconstrucciones son bases de datos estructuradas de conocimiento específico de especie dado que contienen información detallada del organismo en estudio, tales como la estequiometría de las reacciones que tienen lugar en él, la reversibilidad de estas reacciones, las relaciones entre los genes, las proteínas y transformaciones bioquímicas, y los datos bioquímicos y fisiológicos disponibles para la especie sujeta a estudio en el momento de la reconstrucción (Feist *et al.*, 2009; Thiele & Palsson, 2010). Estas reconstrucciones pueden ser además transformadas a modelos matemáticos a escala genómica (GEMs, del inglés, *GE*nome-scale *M*odels) que permiten el cálculo de las capacidades metabólicas y el fenotipo de un organismo dado a partir de su genotipo. Contrariamente a los modelos cinéticos y estocásticos, que requieren una gran cantidad de datos cinéticos, lo cual los hace no escalable a escala genómica, los GEMs permiten obtener información metabólica detallada, en términos de distribución de flujo sujetos a una serie de asunciones (Orth *et al.*, 2010). Por lo tanto, la reconstrucción y el análisis basado en restricciones (COBRA, del inglés, *CO*nstraint-*B*ased *RE*construction and *A*nalysis) (Hyduke *et al.*, 2011; Lewis *et al.*, 2012) si es escalable a escala genómica y se centra en la aplicación de una serie de restricciones impuestas por el genoma (límites internos) y el medio ambiente (límites de los sistemas) en un organismo dado, y describe el conjunto de estados fenotípicos viables en estas condiciones. Un método cada vez más aceptado para analizar estos GEMs es el análisis equilibrado de flujos (FBA, del inglés *Flux Balance Analysis*). El FBA es un enfoque matemático para el estudio de los modelos metabólicos en términos de distribución de flujo y que se basa en la resolución de un problema de optimización lineal mediante la maximización o minimización de una función objetivo $\mathbf{Z} = \mathbf{c}^T \mathbf{v}$, sujeta a un conjunto de restricciones.

Matemáticamente, la aplicación de FBA puede representarse como sigue:

$$\begin{aligned} \max \quad & \mathbf{c}^T \mathbf{v} \\ \text{sujeto a} \quad & \mathbf{S}\mathbf{v} = \mathbf{0} \\ & \mathbf{v}_{\min} \leq \mathbf{v} \leq \mathbf{v}_{\max} \end{aligned}$$

\mathbf{Z} es una combinación lineal de los flujos, donde \mathbf{c} es un vector con n elementos que contiene ceros para todas las entradas excepto para la reacción (s) que forma parte de la función objetivo (por ejemplo, tasa de crecimiento), y que indica como cada reacción contribuye a la función objetivo. S es una matriz $m \times n$ que contiene todos los coeficientes estequiométricos en el modelo de m metabolitos y n reacciones. El vector \mathbf{v} tiene n elementos, que representan los valores de flujo individuales para cada reacción que se va a determinar. Las limitaciones $\mathbf{S}\mathbf{v} = \mathbf{0}$ corresponden a la conversión de la masa en estado estacionario. Los vectores \mathbf{v}_{\min} y \mathbf{v}_{\max} son vectores con n elementos cada uno, que representan el límite más bajo (lb, del inglés, *lower bounds*) y más altos (ub, del inglés, *upper bounds*) en los flujos, respectivamente. La salida de este problema de optimización lineal es un vector de distribución de flujo particular \mathbf{v} , que maximiza o minimiza la función objetivo.

En los últimos años hemos sido testigos de un aumento en el número de nuevos GEMREs. Estos GEMREs han ampliado el espacio metabólico adecuado para el análisis computacional y el alcance de sus aplicaciones está aumentando continuamente (Lewis *et al.*, 2012; McCloskey *et al.*, 2013). Además, la reconstrucción automatizada de modelos ha empezado a estar disponible, acelerando considerablemente el proceso de reconstrucción (Liao *et al.*, 2012). Esta expansión ha proporcionado herramientas para abordar tanto cuestiones científicas básicas como aplicadas, tales como estudios de evolución bacteriana, ingeniería metabólica, análisis y generación de redes biológicas, así como la validación de nuevas hipótesis bioquímicas (Liao *et al.*, 2012; Monk *et al.*, 2014).

Los estudios en los que se utilizan los GEMREs se basan en el análisis de los flujos óptimos de los objetivos celulares que impulsan la evolución. La transformación de estas reconstrucciones a GEMs basados en restricciones describen matemáticamente estos flujos que permiten calcular estados fenotípicos mediante la optimización de las funciones biológicas (Thiele & Palsson; 2010; Lewis *et al.*, 2012). Además, estos modelos representan todos los genes metabólicos conocidos en una célula, así como sus funciones. Por tanto cuando se utiliza los GEMs en el análisis de un conjunto de datos a escala genómica, ellos proporcionan una visión novedosa porque representan conexiones bioquímicas reales entre los componentes celulares. Por otro lado, como los genes metabólicos están asociados con las funciones bioquímicas de sus productos génicos, las simulaciones de los flujos de metabolitos a través de

la red metabólica pueden proporcionar predicciones de cómo cada producto génico afecta a la función de esta red (Lewis *et al.*, 2012). Por lo tanto, los fenotipos celulares pueden ser calculados y los datos pueden interpretarse con GEM, proporcionando ideas de cómo el genotipo celular contribuye al fenotipo celular.

Otra de las aplicaciones de los GEMs es el diseño de cepas útiles en ingeniería metabólica. Dado que estos modelos capturan la actividad de cientos de enzimas, pueden ser evaluados los fenotipos mutantes a través de perturbaciones y simulaciones *in silico* (Ibarra *et al.*, 2002; Lewis *et al.*, 2010). Así, varios métodos basados en restricciones empleados en los GEMs tienen como objetivo acoplar el producto dado al objetivo celular, incrementando así la productividad con el crecimiento exponencial de la célula (Lewis *et al.*, 2012). Por otro lado, los GEMs están caracterizando el papel metabólico en la estructura de comunidades microbianas, proporcionando una idea de las interacciones biológicas tales como el mutualismo, la competencia, el parasitismo, así como de la evolución de la comunidad (Lewis *et al.*, 2012). Todas estas aplicaciones junto con otras como la identificación de funciones metabólicas perdidas, el cálculo del rendimiento del crecimiento celular o la capacidad de predicción de la localización de enzimas, hace que los GEMs sean útiles para guiar a la investigación científica. A pesar del avance en este campo actualmente existen escasos estudios en el metabolismo de compuestos aromáticos que utilicen estas herramientas computacionales (Monk *et al.*, 2014). El aumento de los GEMs de bacterias degradadoras de estos compuestos, como la cepa CIB, así como el análisis del metabolismo de estos compuestos a nivel de sistemas aportarían nuevos conocimientos biológicos con objeto de optimizar procesos de biorremediación.

II. OBJETIVOS

Como se ha comentado en la Introducción de este trabajo, la bacteria *Azoarcus* sp. CIB se ha convertido en un microorganismo modelo para el estudio del catabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos. A la versatilidad metabólica de la cepa CIB frente a los compuestos aromáticos, y a su capacidad de ser manipulada genéticamente, se suma la reciente secuenciación completa de su genoma (no publicado), lo que facilita en gran medida los estudios genéticos y los abordajes globales en este organismo.

Por lo expuesto anteriormente, en este trabajo se planteó llevar a cabo la reconstrucción y análisis metabólico a escala genómica de *Azoarcus* sp. CIB con el objetivo general de aumentar nuestro conocimiento sobre esta cepa, tanto para conocer en detalle su metabolismo central, como para poder diseñar estrategias racionales que en el futuro permitan optimizar el catabolismo de compuestos aromáticos en condiciones aeróbicas y/o anaeróbicas.

Los objetivos específicos de este trabajo han sido:

1. Llevar a cabo la reconstrucción metabólica a escala genómica de la cepa *Azoarcus* sp. CIB.
2. Estudio del metabolismo de compuestos aromáticos en *Azoarcus* sp. CIB a nivel de sistemas que permita la identificación de cuellos de botella metabólicos y el diseño de cepas con capacidades biodegradativas mejoradas.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

Para la reconstrucción del modelo metabólico *in silico* de *Azoarcus* sp. CIB se utilizaron las herramientas bioinformáticas que se describen a continuación, así como el proceso de configuración inicial de éstas.

1. Equipo

- 1.1. Un ordenador personal capaz de correr Matlab
- 1.2. Matlab, versión 7.0 o superior a éste (The MathWorks Inc., Natick, MA). Matlab es un programa que permite realizar cálculos numéricos y visualizarlos.
- 1.3. COBRA Toolbox versión 2.0 o superior a éste (Hyduke *et al.*, 2011). COBRA Toolbox es un conjunto de secuencias de comandos específicos para llevar a cabo la reconstrucción y análisis de modelos basados en restricciones y que corren en el entorno Matlab.
- 1.4. La biblioteca de programas libSBML 4.0.1 o superior a éste
- 1.5. SBML Toolbox versión 3.1.1. o superior para MATLAB que permita leer y escribir modelos en formato SBML.
- 1.6. Un solucionador de programación lineal. COBRA Toolbox soporta varios solucionadores de acceso abierto y comercial. Para este trabajo se utilizó GLPK (<https://www.gnu.org/software/glpk/>)
- 1.7. Un programa que pueda utilizarse para reunir los datos. Este trabajo se llevó a cabo en Microsoft Excel 2010.

2. Configuración del equipo

- 2.1. Instalar Matlab
- 2.2. Instalar libSBML, el SBML Toolbox, y seleccionar el solucionador GLPK
- 2.3. Instalar el COBRA Toolbox 2.0
- 2.4. Iniciar Matlab y navegar al directorio de COBRA Toolbox
- 2.5. Salvar la ruta
- 2.6. Inicializar COBRA Toolbox escribiendo *initCobraToolbox*

2. MÉTODOS

Proceso de reconstrucción metabólica del modelo *iLA772* a escala genómica.

La reconstrucción del modelo metabólico de *Azoarcus* sp. CIB se llevó a cabo en cuatro etapas consecutivas comunes en cualquier reconstrucción; i) construcción del *draft*; ii) curación manual del *draft*; iii) conversión a modelo matemático; y iv) evaluación y análisis; tal y como muestra la figura 3.

Etapa 1: Construcción de un *draft* inicial.

Como elemento indispensable para llevar a cabo la reconstrucción metabólica de un organismo dado, es necesario disponer de una anotación genómica de alta calidad. La asignación de funciones a los ORF codificados en el genoma de *Azoarcus* sp. CIB se realizó previamente al comienzo de este trabajo como se detalla a continuación.

1. Anotación del genoma.

Tras la secuenciación del genoma de la cepa CIB, primero se realizó una anotación automática prediciendo inicialmente los genes (ORF) con el programa Glimmer (de su siglas en inglés, *Gene Locator and Interpolated Markov ModelER*) y llevando a cabo una posterior depuración de éstos. A continuación, se anotaron dichos genes automáticamente mediante su comparación realizando BLAST con las bases de datos del NCBI: *Non-redundant protein sequences* (nr) y SwissProt. A cada gen se le asignó el acrónimo Az_CIBx, donde x es el gen. La anotación proporciona la información de los genes y por tanto enzimas presentes en la cepa CIB y que fueron la base de la reconstrucción del modelo metabólico.

2. Elaboración de una lista de genes ortólogos entre *Pseudomonas putida* KT2440 (KT2440) y *Escherichia coli* MG1655 (MG1655).

Para la construcción del primer *draft* del modelo de CIB, se utilizaron dos modelos metabólicos de alta calidad existentes de *Pseudomonas putida* KT2440 (*i*JN1411, no publicado) y de *Escherichia coli* MG1655 (*i*JO1366; Orth *et al.*, 2011). En primer lugar se procedió a identificar los genes ortólogos entre CIB y las cepas KT2440 y MG1655 mediante BLASTp recíproco. Para ello se comparó la secuencia de aminoácidos de las proteínas codificadas en el genoma CIB con las cepas KT2440 y MG1655. Se consideró como genes ortólogos aquellos que obtuvieron doble coincidencia en el análisis y que compartieran un mínimo de un 40% de identidad a lo largo de toda la secuencia, un 80 % de cobertura (% de aminoácido que el BLASTp puede alinear), y un 10^{-20} del valor esperado (representa el número de aciertos que esperaríamos hallar por casualidad dada la calidad de la alineación y el tamaño de la base de datos).

La creación de este *draft* inicial se obtuvo a partir del programa GEMSiRV-MrBac (<http://sb.nhri.org.tw/GEMSiRV/en/GEMSiRV>). MrBac genera un *draft* del modelo de la cepa CIB mediante la asignación de las funciones (reacciones) presentes en los modelos de las cepas KTT2440 y MG1655 a los genes ortólogos previamente identificados en CIB. Para ello, se introdujo la lista previamente creada de estos genes ortólogos al servidor de MrBac. El *draft* resultante fue exportado a Excel como herramienta de análisis de datos que permitió manejarlos más fácilmente. Mediante esta estrategia se identificaron mayoritariamente funciones involucradas en el metabolismo central, las cuales se encuentran altamente conservadas entre bacterias.

3. Elaboración automática de una lista de genes específicos de *Azoarcus* sp. CIB.

La herramienta informática SEED (http://theseed.org/wiki/Main_Page) proporciona la generación, optimización, exploración, comparación y análisis de modelos metabólicos a escala genómica basados en la secuencia de proteínas. En el presente trabajo se utilizó adicionalmente dicha herramienta para generar un *draft* automático del metabolismo específico de la cepa CIB.

El archivo resultante de SEED contenía tanto los genes de cuyos productos estaban involucrados en funciones del metabolismo central como aquellos que participarían en procesos específicos de esta cepa y no estaban presentes ni en *P. putida* ni en *E. coli*. Hay que destacar que este *draft* presenta menos fiabilidad que el generado a partir de modelos pre-existentes puesto que éste último está basado en las funciones asignadas a genes ortólogos de modelos metabólicos que han sido revisados anteriormente con detalle por expertos.

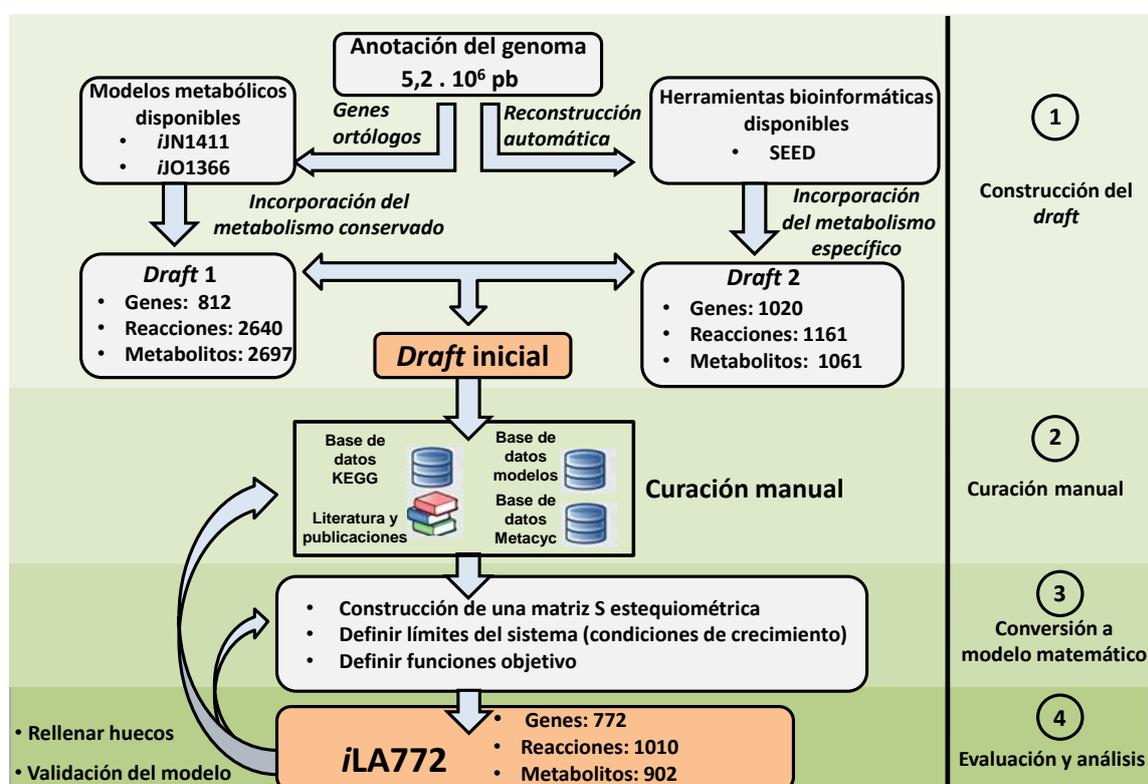


Fig. 3. Proceso de reconstrucción de un modelo metabólico a escala genómica. Representación detallada de las etapas llevadas a cabo en la reconstrucción del modelo iLA772.

Finalmente, se unieron ambos *draft* para generar uno inicial, el cual contendría previsiblemente tanto el metabolismo central como el metabolismo específico de *Azoarcus* sp. CIB. En este *draft* se tuvo en cuenta la localización de cada metabolito, asignándoles uno de los tres compartimentos celulares: citoplasma, membrana o periplasma, así como la reorganización de cada reacción de la reconstrucción a un determinado subsistema, es decir a un grupo

determinado en el que los metabolitos están interrelacionados y que cumplen la misma función (ej., glucolisis, metabolismo de lípidos o degradación de compuestos aromáticos).

Etapa 2: Curación manual de la versión inicial del modelo.

Aunque la versión inicial del modelo aporta una información muy aproximada de las capacidades metabólicas de CIB basado en su contenido génico, no se pueden establecer con absoluta certeza ciertas propiedades específicas en este microorganismo, tales como la localización de las reacciones, o la especificidad de sustratos y cofactores, ya que estas propiedades son generalmente específicas de especie. Debido a esto, con el fin de reflejar en la reconstrucción las verdaderas capacidades metabólicas de CIB, es necesaria una revisión manual de las reacciones incluidas en el *draft* inicial. Esta revisión se llevó a cabo mediante la utilización de recursos bioinformáticos como BLAST, bases de datos como BRENDA, KEGG o Metacyc entre otros, así como a partir de la literatura científica existente sobre CIB y especies filogenéticamente relacionadas. La revisión manual se realizó sistemáticamente siguiendo los pasos que se describen a continuación:

1. Revisión manual de la versión inicial con la ayuda de la literatura existente.

La revisión manual de cada reacción se llevó a cabo mediante la comprobación de los sustratos y cofactores correctos de cada enzima, puesto que pueden diferir entre organismos. Posteriormente las reacciones fueron balanceadas tanto en masa como en carga. Además se verificó la correcta estequiometría y direccionalidad de la reacción, así como la localización subcelular de cada metabolito.

2. Verificación de la asociación gen-proteína-reacción (GPR).

El *draft* automático asigna a cada reacción el gen o genes que codifican la enzima responsable. Es por tanto crítico verificar manualmente si los genes asociados a una reacción son los correctos, puesto que errores en la asociación de la GPR cambiarán los resultados de los estudios *in silico*. La comprobación de la asociación de la GPR a cada reacción en CIB se llevó a cabo con la ayuda de la anotación del genoma mediante la realización de un BLASTp en la base de datos del NCBI de la secuencia de aminoácidos de las proteínas codificadas por su respectivo gen. Se asumieron determinados criterios (ver métodos, etapa 1, punto 2) que junto con la revisión de la literatura científica existente, corroboraron si dicha enzima estaba presente en el metabolismo de CIB. Además, la revisión de la literatura permitió verificar si la proteína funcional era un complejo enzimático, si la proteína o complejo pudiera participar en más de una reacción, y si más de una proteína pudiera llevar a cabo la misma función.

3. Aportar referencias sobre la información actual de cada reacción.

Los datos reunidos de algunos organismos relacionados con el organismo de estudio, así como los datos específicos existentes sobre el mismo se incluyen en la reconstrucción en forma de referencias y notas. Así, se revisó la información actual de cada reacción de la reconstrucción de CIB en recursos bioinformáticos como BRENDA y/o revisando la literatura existente. Estos datos permitieron revisar las evidencias y material de apoyo para la inclusión de reacciones y genes presentes en CIB.

4. Asignación del valor de confianza a cada reacción.

El valor de confianza proporciona de manera rápida la información y evidencias actualmente disponibles del microorganismo a modelar. Por ello, a cada reacción de la reconstrucción se le asignó un valor de confianza con un rango de 0 a 4, donde 0 es el valor de evidencias más bajo y 4 el más alto (Tabla 1). Por ejemplo, se asignó un valor de confianza de 2 a las reacciones basadas en datos fisiológicos o evidencias genéticas/bioquímicas de organismos relacionados con la cepa CIB tales como *A. aromaticum* (Rabus *et al.*, 2005) y *Azoarcus* sp. KH32C (KEGG), entre otros.

Tabla 1. Sistema empleado actualmente para la asignación del valor de confianza a cada reacción. Tomado de Thiele & Palsson, 2010.

Tipo de evidencia	Valor de confianza	Ejemplos
Datos bioquímicos	4	Evidencias directas para funciones de productos de genes y reacciones bioquímicas: ensayos bioquímicos, purificación de proteínas
Datos genéticos	3	Evidencias directas o indirectas para la función de un gen: caracterización de un gen <i>knockout</i> , caracterización y sobreexpresión de un gen <i>knockin</i>
Datos fisiológicos	2	Evidencias indirectas para reacciones bioquímicas basadas en datos fisiológicos: productos de secreción o componentes del medio definidos que sirven como evidencias para el transporte y reacciones metabólicas
Datos del modelo	1	No existen evidencias disponibles, pero la reacción se requiere para el modelo. La función incluida es un hipótesis y necesita verificarse mediante experimentación

5. Añadir capacidades metabólicas específicas de cada especie.

Para incluir las capacidades metabólicas específicas de CIB carentes en KT440 y MG1655, se revisaron manualmente aquellas reacciones y sus correspondientes GPRs presentes en el *draft* generado por SEED y ausentes en el *draft* inicial construido a partir de los modelos *iJN1411* y *iJO1366*. Además se verificó su función mediante revisión bibliográfica existente. En el caso de la cepa CIB, el análisis de estos genes permitió reconstruir gran parte de las rutas de

degradación de compuestos aromáticos como el benzoato o el tolueno, tanto aeróbica como anaeróbicamente. Igualmente, aportó información útil para la conexión de rutas metabólicas centrales como por ejemplo las reacciones llevadas a cabo por las enzimas L-asparaginasa y L-alanina deshidrogenasa del metabolismo de los aminoácidos.

6. Construcción de la función objetivo: la reacción de biomasa (BOF, de sus siglas en inglés, *Biomass Objective Function*).

La BOF es una reacción única de cada especie que contiene todos los precursores esenciales que constituyen el contenido de la biomasa de un organismo. Esta reacción describe la velocidad a la que la biomasa celular se sintetiza en las proporciones correctas, por lo que simula el crecimiento celular (Feist & Palsson, 2010). Puesto que se asume que las bacterias optimizan su tasa de crecimiento en estado estacionario, la predicción de flujos *in silico*, se computa maximizando la reacción BOF, resolviendo así el conjunto de ecuaciones lineales generado al usar el FBA. Dado que actualmente existe insuficiente información sobre la composición macromolecular de *Azoarcus* sp. CIB para construir una BOF específica, se asumió una BOF típica de bacterias gram negativas como *P. putida* (Tabla 2) (Nogales *et al.*, 2008).

Tabla 2. Composición macromolecular de la biomasa de *Pseudomonas putida* KT440 presente en el modelo metabólico *iJN746* (Nogales *et al.*, 2008) y asumida en *Azoarcus* sp. CIB.

Compuesto	mmol/g peso seco	Compuesto	mmol/g peso seco
5-methyltetrahydrofolato	0,05	L-leu	0,326
acetil-CoA	0,00005	L-lys	0,146
L-ala	0,488	L-met	0,00215
amp	0,001	nad	0,00005
L-arg	0,281	nadh	0,00013
L-asn	0,229	nadp	0,0004
L-asp	0,229	nadph	0,0005
atp	45,7318	fosfatidiletanolamina- didodecanoil-n-C120 (pe120)	0,0005
cardiolipin-tetradodecanoil-n-C120 (clpn120)	0,0005	pe160	0,0005
clpn160	0,0005	pe161	0,0005
clpn161	0,0005	pe180	0,0005
clpn180	0,0005	pe181	0,0005
clpn181	0,0005	peptidoglicano	0,028
coA	0,000006	fosfatidilglicerol- didodecanoil-n-C120 (pg120)	0,0005
ciclopropano-fosfatidiletanolamina- dihexadec-9-10-ciclo-anoil-n-C160-ciclo (cpe160)	0,0005	pg160	0,0005
cpe180	0,0005	pg180	0,0005
ciclopropano-fosfatidilglicerol-dihexadec-9- 10-ciclo-anoil-n-C160-ciclo (cpg160)	0,0005	L-phe	0,176
cpg180	0,0005	L-pro	0,035
ctp	0,126	putrescina	0,035
L-cys	0,087	L-ser	0,205
datp	0,0247	sirohemo	0,0005
dctp	0,0254	succinil-coA	0,000003
dgtp	0,0247	L-thr	0,241

fad	0,00001	L-trp	0,054
L-gln	0,25	L-tyr	0,131
L-glu	0,25	udpg	0,003
gly	0,203	utp	0,136
gtp	45,5608	L-val	0,402
h2o	0,0005	adp	45,5608
hemo-O	0,09	h	45,56035
L-his	0,276	pi	45,5628
L-ile	0,428	ppi	0,7302

7. Completar la reconstrucción con reacciones no asociadas a genes.

En el *draft* inicial que se generó automáticamente, se asocian genes a todas las reacciones por similitud de secuencia. Sin embargo, a veces no se conocen los genes que codifican reacciones bioquímicas bien conocidas en el microorganismo de estudio. Estas reacciones se denominan reacciones huérfanas. Por otro lado es bien conocida la existencia de reacciones espontáneas en sistemas biológicos. Es por esto que estas reacciones huérfanas y espontáneas están ausentes en los *draft* y es necesaria su inclusión en un paso posterior. Así, un total de 63 reacciones huérfanas y 10 espontáneas fueron añadidas a la reconstrucción, algunos ejemplos son la β -ureidopropionasa del metabolismo de la síntesis de coa, y la disociación del ácido carboxílico, respectivamente.

8. Completar la reconstrucción con transportadores y reacciones de intercambio.

Es necesario introducir reacciones que representen los transportadores de los metabolitos que se están intercambiando entre los diferentes compartimentos celulares o entre estos y el exterior. Este paso es importante para determinar los nutrientes potencialmente utilizables por el microorganismo de estudio. Es importante contar con evidencias experimentales para verificar que existen dichos transportadores. También se deben incluir las reacciones de transporte de metabolitos que se intercambian por difusión como el O₂ o el CO₂. Un total de 37 reacciones fueron incluidas.

Etapa 3: Conversión de la reconstrucción a modelo matemático.

Esta etapa se lleva a cabo en dos pasos.

1. Conversión a representación matemática.

La conversión a formato matemático se realizó de forma automática utilizando Matlab. De esta forma se construyó la matriz estequiométrica de CIB constituida por 1010 reacciones y 902 metabolitos (ver introducción).

2. Seleccionar la función objetivo.

Para resolver los problemas de la programación lineal usando la aproximación FBA es necesario optimizar una función objetivo como se ha indicado en la introducción. A menudo se

utiliza como objetivo la BOF con el fin de estimar los flujos metabólicos que maximizan la tasa de crecimiento del organismo de estudio. Así, nosotros seleccionamos la reacción de la biomasa (BOF) como objetivo.

Etapa 4: Validación del modelo y análisis.

Para determinar la fiabilidad del modelo, comprobar posibles errores durante la reconstrucción, o la identificación de huecos entre rutas metabólicas, es necesario una comprobación y validación del mismo. Todos los análisis llevados a cabo en este trabajo se realizaron con el paquete de *software* COBRA Toolbox (Hyduke *et al.*, 2011), en el entorno de computación de Matlab (The MathWorks Inc., Natick, MA).

1. Denominación del modelo final.

El modelo *iLA772* se nombró de acuerdo con la convención para modelos metabólicos en donde *i* es sinónimo de *in silico*, LA hace referencia a las iniciales del constructor del modelo (Lucía Agudo), y 772 indica el número de genes incluidos en la reconstrucción.

IV. RESULTADOS

1. Construcción y características del modelo metabólico *iLA772* de *Azoarcus* sp. CIB

La reconstrucción metabólica de *Azoarcus* sp. CIB, *iLA772* se realizó en base a la anotación de alta calidad de su genoma recientemente llevada a cabo en nuestro grupo de investigación. El genoma de la cepa CIB está constituido por $5,2 \times 10^6$ pb y contiene un total de 4739 genes (ORF). Adicionalmente, durante el proceso de reconstrucción, se llevó a cabo una revisión exhaustiva de la anotación teniendo en cuenta tanto la literatura científica disponible como bases de datos metabólicas y bioquímicas (ej. KEGG, BRENDA, BIGG, entre otras).

El primer paso de la reconstrucción consistió en la identificación mediante BLASTp recíproco de aquellos genes ortólogos entre *Azoarcus* sp. CIB y *P. putida* y entre *Azoarcus* sp. CIB y *E. coli*. De esta forma se observó que la cepa CIB presenta 2047 y 1553 genes ortólogos a *P. putida* y *E. coli*, respectivamente. Esta información fue posteriormente utilizada para construir una primera versión del modelo de CIB mediante la asignación automática de reacciones bioquímicas a aquellos genes de CIB en función de las asignadas a sus genes ortólogos en *P. putida* y *E. coli* en sus modelos metabólicos *iJN1411* y *iJO1366*, respectivamente. Esta primera versión contenía un total de 2640 reacciones, 2697 metabolitos y 812 genes (Fig. 4). De estos, 626 reacciones y sus 794 metabolitos asociados estaban presentes tanto en el modelo de *P. putida* KT2440 (*iJN1411*) como en el de *E. coli* MG1655 (*iJO1366*) lo cual indica el conjunto de reacciones comunes en las tres especies. Un total de 643 reacciones y 537 metabolitos fueron incluidos a partir del contenido metabólico del modelo de *P. putida*, lo cual indica las capacidades metabólicas de CIB presentes igualmente en *P. putida*. Por último, 745 reacciones y 572 metabolitos se incluyeron en función del contenido presente en *iJO1366*. De esta versión inicial del modelo se revisó manualmente un total de 964 reacciones, de las cuales 19 fueron descartadas tras observar durante la revisión manual una insuficiente identidad de secuencia entre los genes ortólogos identificados automáticamente y tras llevar a cabo una revisión profunda en la literatura existente para estas reacciones (e.g., se eliminaron la ruta de biosíntesis de la menaquinona y la glutatión oxidorreductasa inicialmente incluida en el *draft*). Finalmente, 799 reacciones de las 964 fueron introducidas en el modelo *iLA772*, mientras que 166 se revisarán de forma más exhaustiva en el futuro debido a que con las evidencias encontradas hasta ahora no se puede concluir su presencia o ausencia en el metabolismo de la cepa CIB.

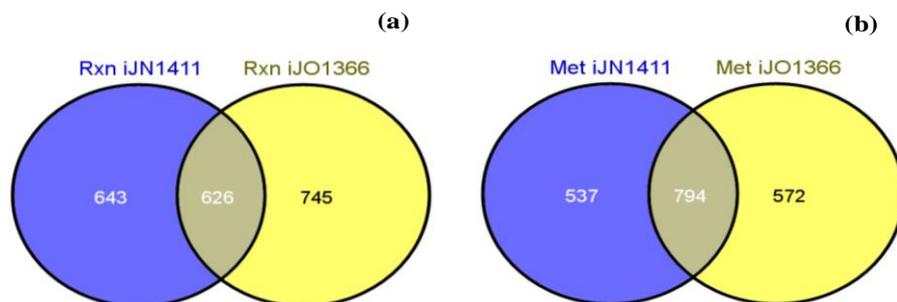


Fig. 4. Diagrama de Venn representando el número de reacciones (a) y metabolitos (b) presentes en la versión inicial del modelo de *Azoarcus* sp. CIB obtenido mediante la comparación de los genomas de las cepas KT2440 (*iJN1411*) y MG1655 (*iJO1366*) con el genoma de *Azoarcus* sp. CIB y asignación automática de reacciones.

El segundo *draft* creado a partir de la herramienta bioinformática SEED estaba constituido por 1161 reacciones, 1061 metabolitos y 1020 genes que representaban el metabolismo conocido de esta cepa en base a su anotación genómica. Este *draft* aportó al modelo final un total de 116 reacciones entre las que se encontraban aquellas que participaban en las rutas de degradación, aeróbica y/o anaeróbica, de algunos compuestos aromáticos como el benzoato, tolueno, fenilacetato, fenilacetaldehído, ciclohexanocarboxilato, gentisato, *p*-cresol, fenol, la ruta aeróbica del etilbenceno, así como gran parte de la ruta de desnitrificación. Cabe destacar que la revisión de este segundo *draft* está todavía en su fase inicial y se tiene previsto completar su revisión en el futuro, por lo que funciones metabólicas específicas de CIB permanecen aun ausentes en *iLA772*.

El modelo final *iLA772* contiene 772 genes, cuyos productos génicos participan en 1010 reacciones involucrando 902 metabolitos (Tabla 3). De estas 1010 reacciones, 915 fueron introducidas a partir del *draft* inicial y 10 fueron reacciones espontáneas incluidas basadas en evidencias experimentales. Por ejemplo, la reacción L-glutamato 5-semialdehído deshidratasa que participa en el metabolismo de la arginina y prolina es una reacción espontánea bien conocida (Revelles & Espinosa-Urgel, 2004). El modelo se completó con un total de 63 reacciones huérfanas incluidas tras una revisión literaria que soportaba la presencia de éstas en CIB pese a que actualmente se desconozca el gen(es) responsables. Así, por ejemplo se introdujo la reacción llevada a cabo por la enzima benzaldehído deshidrogenasa involucrada en el metabolismo de compuestos aromáticos (Wöhlbrand *et al.*, 2007; Carmona *et al.*, 2009). Finalmente se añadieron 22 reacciones de intercambio de metabolitos (ver métodos etapa 2, punto 8). Todas las reacciones incluidas en el modelo fueron localizadas en algunos de los tres compartimentos celulares en los que se puede dividir la red metabólica de CIB, es decir, en citoplasma, membrana periplasmática y periplasma.

Las reacciones se categorizaron en 14 subsistemas distintos. Es notorio señalar que el metabolismo de los lípidos fue el subsistema que incluía mayor número de reacciones, lo que denota la importancia del metabolismo de lípidos en *Azoarcus* sp. CIB (Fig. 5). Cabe destacar que en *iLA772* hasta un 8 % de las reacciones están involucradas en el metabolismo de compuestos aromáticos, lo que refleja el gran potencial metabólico de CIB frente a estos compuestos (Fig. 5). Dentro de este subsistema, se han modelado por primera vez rutas de degradación de compuestos aromáticos, tales como la ruta aeróbica box del benzoato y la tod del tolueno, así como la ruta de degradación aeróbica del gentisato y etilbenceno, la ruta de degradación anaeróbica del fenilacetato (ruta pad), y la ruta bad de degradación del compuesto alicíclico ciclohexanocarboxilato. El metabolismo de degradación de compuestos aromáticos en *iLA772* se completa con la ruta anaeróbica central bzd del benzoato/benzoil-CoA, la ruta periférica bss-bbs de degradación anaeróbica de tolueno/*m*-xileno, la ruta anaeróbica del fenol y *p*-cresol, además de la ruta aeróbica paa del fenilacetato, que ya habían sido modeladas con anterioridad en *Geobacter metallireducens* (Sun *et al.*, 2009), *P.putida* KT440 (Nogales *et al.*, 2008) y en *E. coli* MG1655 (Feist *et al.*, 2007).

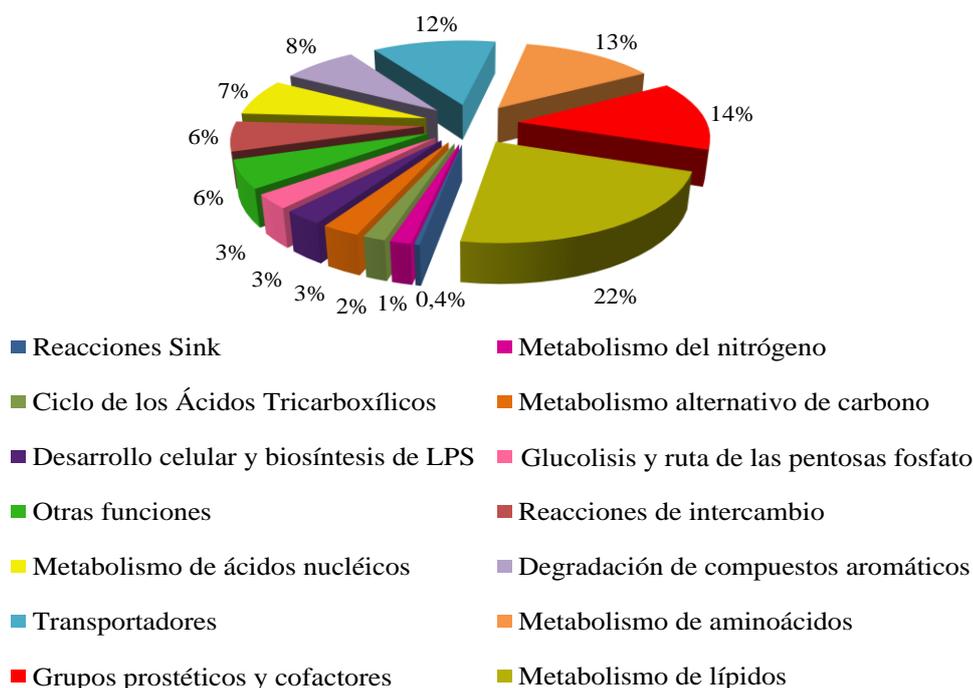


Fig. 5. Clasificación funcional de las reacciones metabólicas en el modelo de *Azoarcus* sp. CIB. Las 1010 reacciones del modelo fueron categorizadas en 14 subsistemas.

iLA772 contiene las rutas catabólicas completas involucradas en obtención de energía a partir de una gran cantidad de moléculas orgánicas (ver más adelante), así como las rutas anabólicas para la biosíntesis de las macromoléculas necesarias para el crecimiento, e.g., ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, azúcares y cofactores. Finalmente, cabe destacar que *iLA772*

contiene uno de los modelados más completos del proceso de respiración hasta la fecha, incluyendo no solo un modelado detallado de la fosforilación oxidativa, sino también las reacciones necesarias para la utilización de tres aceptores finales de electrones, i.e., oxígeno, nitrato/nitrito y arsenato.

La comparación de *iLA772* con modelos metabólicos publicados de otras bacterias, revela que *iLA772* no difiere significativamente en su contenido con éstos en cuanto a parámetros de calidad y cantidad. Así, *iLA772* contiene un número similar de reacciones, metabolitos y genes a los de los modelos metabólicos de *P. aeruginosa* o *B. subtilis*. Sorprende, no obstante, este resultado teniendo en cuenta la poca información disponible para *Azoarcus* sp. CIB tal y como refleja el denominado "Índice de conocimiento de cada especie" (SKI, del inglés *Species Knowledge Index*) (Tabla 3). El SKI refleja la comprensión actual sobre cada especie, definida como la relación entre el número de publicaciones y el número de genes codificantes de proteínas presentes en el genoma de dicha especie (Janssen *et al.*, 2005). Es por tanto razonable pensar que el aceptable contenido metabólico incluido en *iLA772* pueda ser una consecuencia directa de la metodología empleada para su construcción, esto es, utilizar modelos metabólicos de alta calidad ya publicados y asignar la misma función que en éstos a los genes ortólogos de *Azoarcus* sp. CIB.

Tabla 3. Propiedades de la reconstrucción metabólica de *Azoarcus* sp. CIB y comparación con las de otros modelos bacterianos

	<i>iJN1411</i> <i>P. putida</i>	<i>iJO1366</i> <i>E. coli</i>	<i>iYO844</i> <i>B. subtilis</i>	<i>iMO1056</i> <i>P. aeruginosa</i>	<i>iLA772</i> <i>Azoarcus</i> sp. CIB
Genes codificantes de proteínas por genoma	5350	4464 ^b	4106 ^a	5669	4739
Valor SKI	0,88	71	4,97	5,12	0,057
Genes (% del genoma)	1411 (26%)	1366 (32%)	844 (21%)	1056 (18,6%)	772 (16,3%)
Reacciones	2754	2251	1020	883	1010
Reacciones con gen asociado	1670	2088	904	839	932
Reacciones sin gen asociado	--	163 (7,3%)	116 (13%)	44 (5%)	70 (6,9 %)
Metabolitos	2057	1136	988	--	902

Las propiedades de la reconstrucción metabólica se compararon con reconstrucciones metabólicas publicadas de *P. putida* KT440 (*iJN1411* [No publicado]), *E. coli* MG1655 (*iJO1366* [Orth *et al.*, 2011]), *B. subtilis* (*iYO844* [Oh *et al.*, 2007]), y *P. aeruginosa* (*iMO1056* [Oberhardt *et al.*, 2008]). ^a Tomadas de KEGG [Kanehisa *et al.*, 2006]; ^b basadas en Riley *et al.*, 2006.

2. Validación del modelo metabólico *iLA772* de *Azoarcus* sp. CIB

2.1. Validación de fuentes de carbono

Con objetivo de validar la información metabólica contenida en *iLA772* y su calidad, se procedió a evaluar la capacidad del modelo para utilizar diferentes nutrientes como únicas fuentes de carbono y energía. Posteriormente, se compararon los resultados *in silico* con los datos experimentales referentes a 53 fuentes de carbono que se habían ensayado previamente en nuestro grupo (Fig. 6). La capacidad de utilizar diferentes nutrientes, nos indicaría que el modelo es compacto, está altamente conectado y no presenta huecos metabólicos no deseados. Por otra parte, una medida de la calidad de cualquier reconstrucción metabólica es su capacidad de predecir capacidades metabólicas del organismo modelado. Por lo tanto si *iLA772* es capaz de predecir fuentes de carbono utilizadas por CIB experimentalmente, sería indicativo de que es un modelo de alta calidad y capacidad predictiva. El análisis de fuentes de carbono que podía utilizar *iLA772* y la posterior comparación con datos experimentales nos permitió clasificar dichas fuentes de carbono en 4 diferentes categorías (Fig. 6).

- **Fuentes de carbono en las que el modelo es capaz de crecer y también lo hace CIB *in vivo*.** Así, de las fuentes de carbono probadas, el modelo predice correctamente hasta un 51,4 % de las fuentes de carbono en condiciones aeróbicas y un 47,6 % en condiciones anaeróbicas.
- **Fuentes de carbono en las que CIB es capaz de crecer pero el modelo es incapaz de hacerlo.** En esta categoría se agruparían aquellas fuentes de carbono de las cuales se desconoce su metabolismo y/o la ruta de degradación está ausente en *iLA772*. De esta forma, la inclusión de estas rutas bioquímicas de degradación es un claro objetivo para las siguientes versiones del modelo. Cabe destacar que el modelo presenta menor capacidad predictiva en condiciones anaeróbicas, presentando un 29% de error, frente a un 17% en condiciones aeróbicas, lo que está de acuerdo con el menor conocimiento acerca del metabolismo anaeróbico en bacterias.
- **Fuentes de carbono en las que no se ha observado crecimiento de la cepa CIB pero que el modelo predice crecimiento:** 15,8 % en condiciones aeróbicas y 6,9 % en condiciones anaeróbicas. La existencia de este grupo de fuentes de carbono podría indicar la falta de adaptación evolutiva de la cepa CIB para utilizar estos compuestos (ver Discusión).
- **Fuentes de carbono en las que no se ha observado crecimiento *in vivo* ni tampoco *in silico*:** 16,3 % en condiciones aeróbicas y 4,9 % en condiciones anaeróbicas (datos no mostrados).

Por otro lado, el modelo *iLA772* fue capaz de utilizar isocitrato, 2-oxoglutarato, fumarato y 4-aminobutirato, fuentes de carbono que todavía no se han probado experimentalmente *in vivo* (Fig. 6), y que refleja las capacidades predictivas de *iLA772* (ver Discusión).

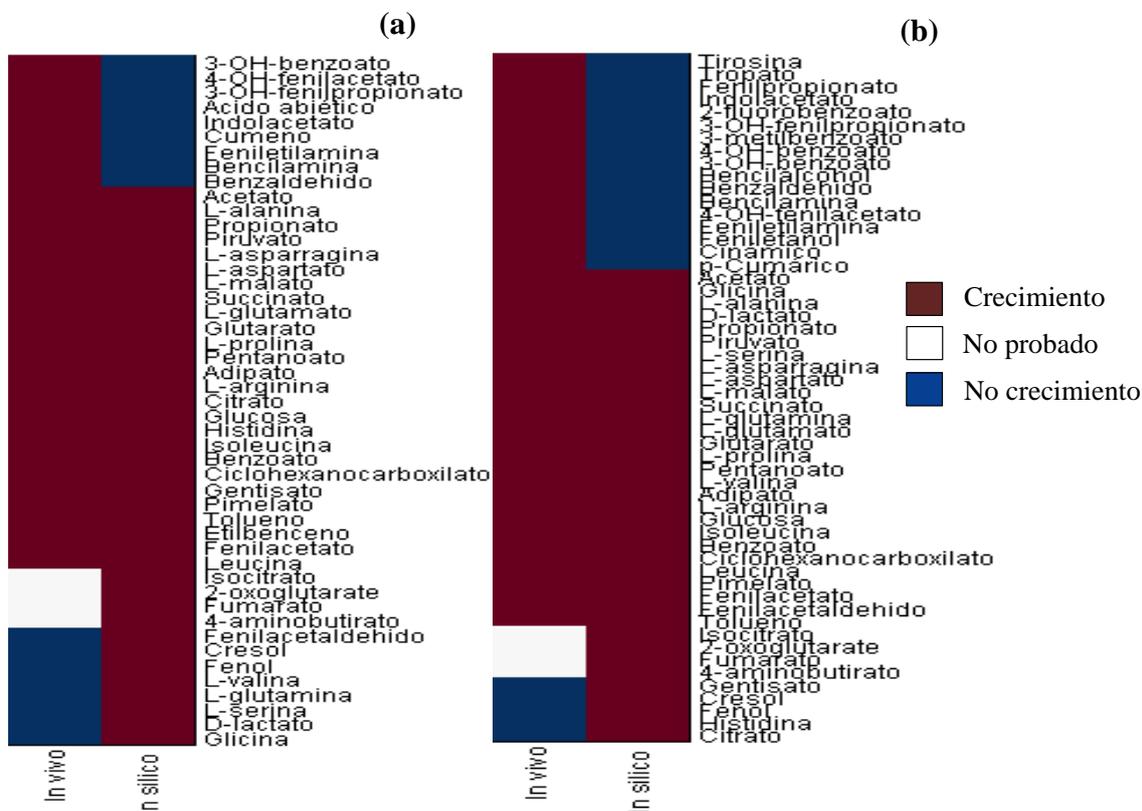


Fig. 6. Fuentes de carbono testadas tanto *in vivo* (experimentalmente) como *in silico* en condiciones aerobias (a) o anaerobias con NO₃⁻ como aceptor de electrones (b) en *Azoarcus sp. CIB*. Se muestran en blanco las fuentes de carbono comprobadas *in silico* pero no *in vivo*, en rojo fuentes de carbono en las que existe crecimiento, y en azul fuentes de carbono en las que no se observó crecimiento.

2.2. Validación del proceso de desnitrificación

Puesto que *Azoarcus sp. CIB* es un microorganismo capaz de desnitrificar anaerómicamente en presencia de compuestos aromáticos como única fuente de carbono y esta capacidad metabólica ha sido modelada por primera vez, se quiso analizar con *iLA772* el proceso de desnitrificación a nivel de sistemas y en términos de distribución de flujos. Para realizar este análisis se tomaron datos experimentales obtenidos del crecimiento anaeróbico en benzoato de *Azoarcus Evansii*, una cepa muy relacionada filogenéticamente a la cepa CIB, y que incluían una concentración de 5 mM de benzoato como fuente de carbono y 20 mM de NO₃⁻ como aceptor final de electrones (Ziegler *et al.*, 1987). De este modo, y utilizando una biomasa inicial de 0,08 g/L se simuló la acumulación de biomasa en función del tiempo monitorizando

simultáneamente el consumo de benzoato y nitrato. La simulación utilizando *iLA772* mostró un aumento en la biomasa producida linealmente proporcional al consumo de benzoato y NO_3^- (Fig. 7). Interesantemente, y en buena concordancia con datos experimentales (ver Discusión), el NO_3^- consumido no se transforma directamente en N_2 sino que se aprecia una acumulación transitoria de NO_2^- . Finalmente y cuando el NO_3^- se ha agotado totalmente (5,5 horas), el modelo utiliza NO_2^- como aceptor final de electrones el cual se transforma estequiométricamente en N_2 hasta que el benzoato se agota y cesa el crecimiento. Este análisis simula con un alto grado de detalle el proceso de desnitrificación descrito en *A. Evansii* en presencia de benzoato como fuente de carbono, y por lo tanto revela un alto grado de predictibilidad para *iLA772* (ver Discusión).

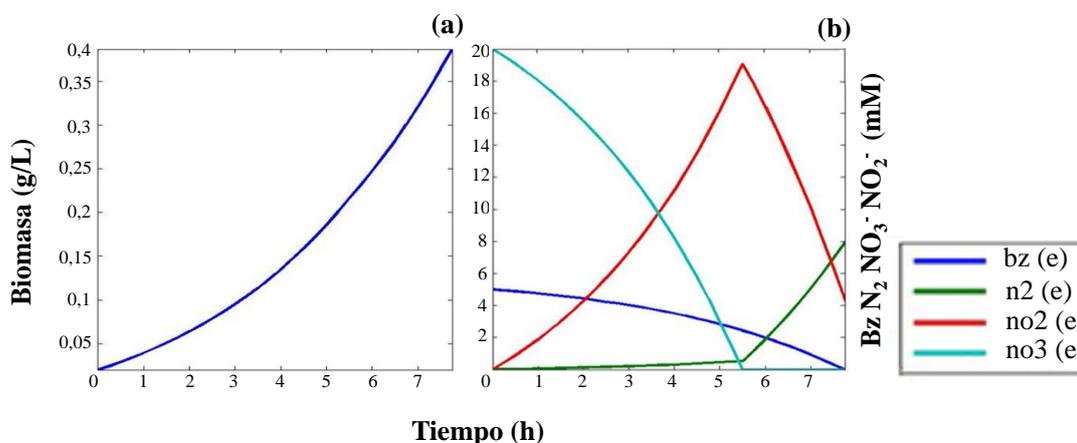


Fig. 7. Biomasa producida *in silico* por *iLA772* basada en la optimización de la reacción de biomasa utilizando benzoato 5mM como fuente de carbono y nitrato 20 mM como aceptor de electrones en función del tiempo (a). Variación de las concentraciones de benzoato (bz), nitrato (no_3), nitrito (no_2) y nitrógeno molecular (n_2) en función del tiempo (b).

3. Análisis a nivel de sistemas del metabolismo de compuestos aromáticos en *Azoarcus* sp. CIB

Uno de los objetivos principales de este trabajo fue el estudio a nivel de sistemas de la degradación de compuestos aromáticos en la cepa *Azoarcus* sp. CIB con objeto de incrementar el conocimiento actual e identificar posibles cuellos de botella en este proceso con fines biotecnológicos. Es por esto que una vez validada la gran capacidad predictiva de *iLA772* se llevó a cabo, en primer lugar, un análisis *in silico* con el objetivo de evaluar aspectos energéticos de diferentes rutas de degradación de compuestos aromáticos.

3.1. Evaluación del rendimiento energético de rutas aeróbicas y anaeróbicas de degradación de compuestos aromáticos.

Como se ha mencionado anteriormente, la cepa CIB tiene la capacidad de degradar numerosos compuestos aromáticos tanto aeróbica como anaeróbicamente. No obstante, hasta

ahora no se han realizados estudios comparativos sobre el rendimiento energético de estos procesos biodegradativos ni en la cepa CIB ni en ninguna otra bacteria. Se desconoce por tanto la ventaja potencial que proporciona esta versatilidad metabólica en condiciones de disponibilidad variable de oxígeno, una situación encontrada a menudo en la naturaleza. Así, el conocimiento sobre el rendimiento energético de estas rutas en función de las condiciones ambientales aportaría una valiosa información con el fin de optimizar procesos de biodegradación *in vivo*, mientras podría dar explicación a observaciones experimentales que hasta la fecha no han podido ser resueltas con abordajes clásicos.

En este trabajo se abordó este reto mediante el análisis del metabolismo de benzoato y fenilacetato (dos compuestos aromáticos modelo) en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Para ello se maximizó independientemente como función objetivo la producción de biomasa (velocidad de crecimiento (h^{-1})) y la capacidad de producir ATP en condiciones aerobias y/o anaerobias utilizando como aceptores de electrones O_2 y/o NO_3^- , respectivamente (Tabla 4). Este análisis mostró que *iLA772* en presencia de ambos compuestos aromáticos y con O_2 como aceptor final de electrones, activa preferentemente las rutas de degradación aeróbicas (box: benzoato; paa: fenilacetato) (Tabla 4). Esto podría indicar que las rutas aeróbicas son más eficientes energéticamente que las rutas anaeróbicas. Estos resultados también se observan cuando *iLA772* utiliza como aceptores finales de electrones O_2 y NO_3^- conjuntamente, sugiriendo de nuevo que el O_2 es el aceptor de electrones más energético. Corroborando este hecho, cuando el NO_3^- actúa como único aceptor final de electrones sólo fueron activadas las rutas anaeróbicas (bzd: benzoato y pad: fenilacetato), y el rendimiento energético, así como la velocidad de crecimiento, de *iLA772* disminuyó con respecto a los resultados obtenidos con O_2 y utilizando las rutas aeróbicas (Tabla 4). Interesantemente, la ruta anaeróbica clásica del benzoato (bzd) se mostró más eficiente que la ruta alternativa (bad). Cabe destacar que no existe crecimiento utilizando las rutas de degradación aerobias en ausencia de O_2 puesto que en reacciones claves de la ruta aeróbica (oxigenasas y dioxigenasas) el O_2 actúa como co-metabolito. Por otro lado, estos resultados (normalizados al número de carbonos que presenta cada sustrato) muestran que el fenilacetato genera un crecimiento mayor de *iLA772* que el benzoato. Esto sugiere que el fenilacetato es una fuente de carbono más energética que el benzoato, probablemente debido a que es una molécula que presenta un estado más alto de reducción. Tomados en su conjunto, se puede concluir que el modelo *iLA772* sugiere que el metabolismo aeróbico es mucho más eficiente que el metabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos en *Azoarcus* sp. CIB, no sólo por el mayor rendimiento energético de la respiración aeróbica, como podría esperarse, sino también por la mayor producción de equivalentes de reducción proporcionados por las rutas de degradación aeróbicas (box y paa) (Tabla 4).

Tabla 4. Rendimiento energético (ATP) y crecimiento de *iLA772* en benzoato y fenilacetato utilizando diferentes rutas de degradación.

Fuente de carbono	Ruta	Aceptor de electrones					
		O ₂		NO ₃ ⁻		O ₂ + NO ₃ ⁻	
		ATP (mmol/gDW.h)	Velocidad de crecimiento (h ⁻¹)	ATP (mmol/gDW.h)	Velocidad de crecimiento (h ⁻¹)	ATP (mmol/gDW.h)	Velocidad de crecimiento (h ⁻¹)
Bz	Todas	117,5	0,5285	78,75	0,4106	117,5	0,5285
Bz	box	117,5	0,5285	0	0	117,5	0,5285
Bz	bzd	116,25	0,5014	78,75	0,4106	116,25	0,5014
Bz	bad	115	0,4959	77,5	0,4040	115	0,4959
Pac	Todas	140	0,6263	83,75	0,4369	140	0,6263
Pac	paa	140	0,6263	0	0	140	0,6263
Pac	pad	127,5	0,572	83,75	0,4369	127,5	0,572

Rendimiento energético, obtenido en términos de producción de ATP, y velocidad de crecimiento derivada del metabolismo del benzoato (Bz) y fenilacetato (Pac). Se computó el rendimiento energético utilizando todas las rutas de degradación presentes en *iLA772* para un mismo metabolito (benzoato, bz) o (fenilacético, pac), o bien utilizando únicamente una de ellas (box, para la ruta aeróbica del benzoato, bzd para la ruta anaeróbica clásica del benzoato; bad para la ruta anaeróbica alternativa del benzoato, paa y pad para las rutas aeróbica y anaeróbica del fenilacetato, respectivamente).

3.2 Análisis funcional del metabolismo de compuestos aromáticos en función de la disponibilidad de oxígeno.

i. Análisis de sistemas del metabolismo del benzoato en *Azoarcus* sp. CIB

Datos experimentales en *Azoarcus* sp. CIB demuestran la coexistencia tanto de la ruta box (aerobia) como de la ruta bzd (anaerobia) de degradación del benzoato en condiciones que experimentalmente se consideran anaerobias (Valderrama *et al.*, 2012), sin que hasta la fecha se haya podido dar una explicación a este hecho. Con la finalidad de arrojar luz a la inesperada expresión de la ruta box en anaerobiosis, se simuló el metabolismo de benzoato en *iLA772* en función de la disponibilidad de oxígeno y se analizó la distribución de flujo de enzimas claves del metabolismo, tales como la citrato sintasa (como representante del ciclo de los ácidos tricarboxílicos) y de la isocitrato liasa (como representante del ciclo del glioxilato). Igualmente se monitorizó la distribución de flujos de ambas rutas de degradación (Fig. 8). El análisis realizado mostró cómo en ausencia total de O₂ sólo está activa la ruta anaerobia (a), mientras que aproximadamente con 3 mmoles de O₂, esta ruta se desactiva y sólo persiste la ruta de degradación aerobia (b), hasta llegar a los 9 mmoles de O₂, siendo ésta la cantidad óptima para obtener el máximo crecimiento (c). Destaca la co-participación de ambas rutas de degradación cuando la cantidad de O₂ presente en el medio es inferior a 3 mmoles (I). Consumos crecientes de oxígeno incrementan linealmente la velocidad de crecimiento (II), hasta llegar a una cantidad de O₂ que es tóxica para la célula (III), como refleja la caída de la velocidad de crecimiento

(Fig. 8). Cabe destacar igualmente el papel más activo del ciclo del glioxilato en el metabolismo anaeróbico del benzoato. Así, el flujo a través de la isocitrato liasa disminuye de forma lineal con la disminución de la actividad de la ruta anaeróbica. Por otro lado la producción de CO₂ disminuye a medida que aumenta la disponibilidad de oxígeno hasta llegar al punto óptimo en la velocidad de crecimiento celular, a partir de la cual la producción de CO₂ aumenta. Esto podría indicar que el exceso de O₂ es eliminado mediante un aumento de su reducción a través de la respiración celular, tal y como refleja en esta situación el incremento del flujo del ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

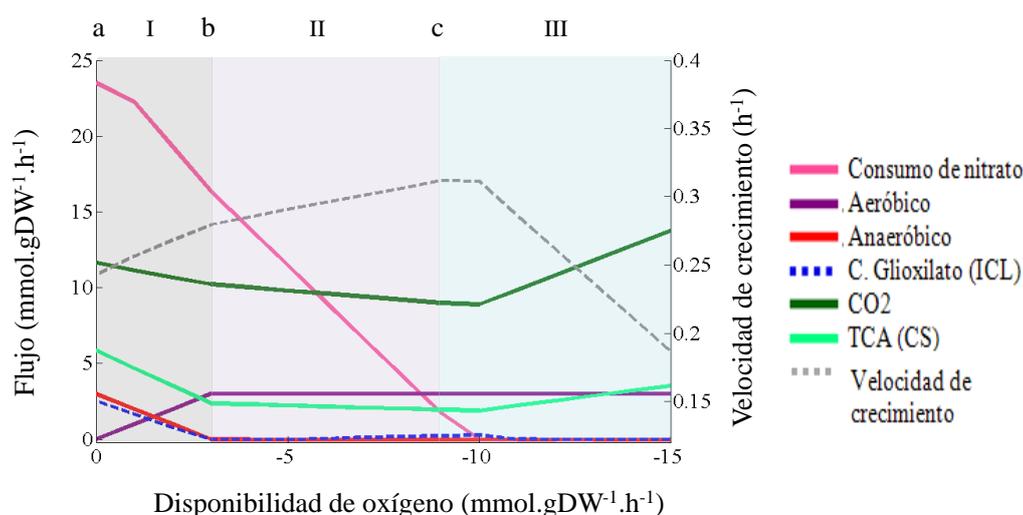


Fig. 8. Distribución de flujos y variación de la velocidad de crecimiento durante el metabolismo del benzoato por *iLA772* en función de la disponibilidad de oxígeno. En el metabolismo aeróbico (morado) y anaeróbico (rojo) del benzoato se distinguen tres situaciones límite: condiciones de anaerobiosis (a), utilización única de la ruta aerobia (b), y consumo óptimo de O₂ para alcanzar el máximo crecimiento (c). Entre dichos puntos se definen igualmente tres fases de transición: co-participación de ambas rutas (I), utilización única de la ruta aerobia con limitación de O₂ donde se sigue utilizando nitrato (II), y exceso de consumo de O₂ que puede considerarse tóxico y disminuye la velocidad de crecimiento de *iLA772* (III). Se utilizó para el análisis un consumo de benzoato de 3 mmoles/gDW.h. y un consumo de nitrato de 23,5 mmoles/gDW.h.. El consumo de oxígeno varió desde 0 a 15 mmoles/gDW.h.

ii. Análisis de sistemas del metabolismo del fenilacetato en *Azoarcus* sp. CIB

El fenilacetato es otro compuesto aromático modelo que puede ser utilizado tanto aeróbica como anaeróbicamente por la cepa *Azoarcus* sp. CIB (Fig. 6). En cambio, a diferencia del benzoato, no se tienen datos experimentales tan detallados acerca de su metabolismo en este microorganismo. En un intento de predecir si la co-participación de rutas aeróbicas y anaeróbicas en ausencia de oxígeno es una estrategia extendida en el metabolismo de compuestos aromáticos en *Azoarcus* sp. CIB, se llevó a cabo el mismo análisis anteriormente realizado con el benzoato utilizando *iLA772*.

Al igual que sucedía con el catabolismo del benzoato, aunque durante la degradación del fenilacetato en ausencia total de O_2 (a) sólo está activa la ruta anaerobia, ambas rutas coexisten en presencia de bajas concentraciones de O_2 (hasta consumos de 2 mmoles/gDW.h), momento en el que sólo persiste la ruta de degradación aerobia (b) (Fig. 9). El consumo óptimo de O_2 , el cual coincide con la máxima velocidad de crecimiento, se estimó en 9 mmoles/gDW.h (c). Igualmente, se observa un papel clave del ciclo del glioxilato en el metabolismo del fenilacético en condiciones anaeróbicas, así como un aumento en la producción de CO_2 y del flujo del ciclo de los ácidos tricarbóxicos con respecto a la disminución de la velocidad de crecimiento.

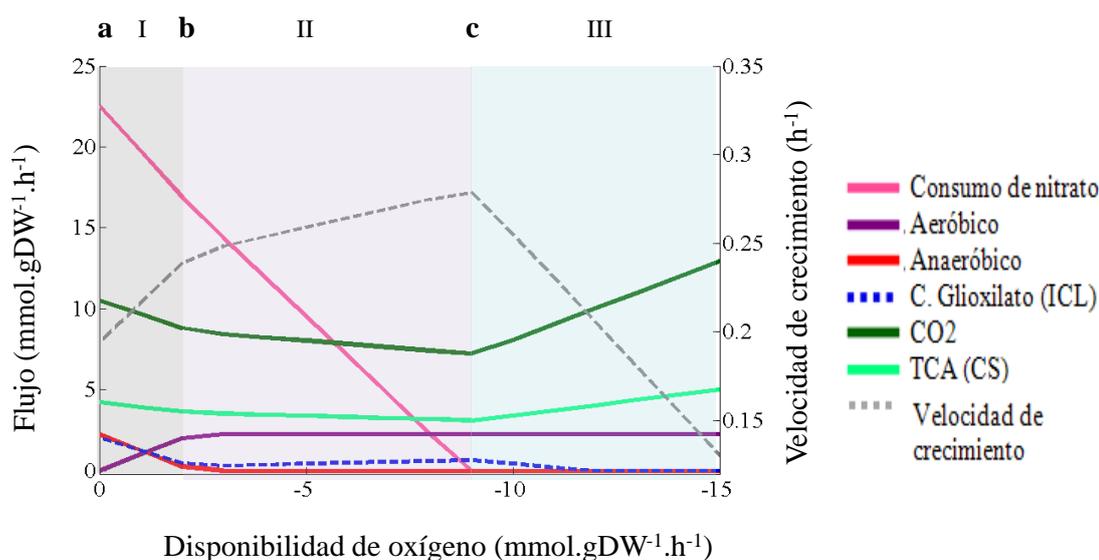


Fig. 9. Distribución de flujos y variación de la velocidad de crecimiento durante el metabolismo del fenilacético en función de la disponibilidad de oxígeno. En el metabolismo aeróbico (morado) y anaeróbico (rojo) del fenilacético se distinguen tres situaciones límites: condiciones de anaerobiosis (a), utilización única de la ruta aerobia (b), y consumo óptimo de O_2 para alcanzar el máximo crecimiento (c). Entre dichos puntos se encuentra igualmente tres fases de transición: co-participación de ambas rutas (I), utilización única de la ruta aerobia con limitación de O_2 donde se sigue utilizando nitrato (II), y exceso de consumo de O_2 que puede considerarse tóxico y disminuye la velocidad de *Azoarcus* sp. CIB (III). Se utilizó para el análisis un consumo de fenilacético de 2,25 mmoles/gDW.h. y 23,5 mmoles/gDW.h. de nitrato. El consumo de oxígeno fue variado desde 0 a 15 mmoles/gDW.h.

4. Análisis del metabolismo accesorio implicado en la degradación de compuestos aromáticos en *Azoarcus* sp. CIB

Como se ha mencionado con anterioridad, *Azoarcus* sp. CIB es una cepa modelo en el estudio de la degradación de compuestos aromáticos. Es por esto que entre el potencial biotecnológico de esta cepa destaca su utilización como agente biológico en procesos de biodegradación de compuestos xenobióticos en el medio ambiente. Por este motivo, se planteó como uno de los objetivos de este trabajo el estudio del metabolismo accesorio implicado en la

degradación de compuestos aromáticos con el fin de identificar cuellos de botella metabólicos a la hora de optimizar las capacidades biodegradativas de CIB.

4.1 Identificación de reacciones esenciales para el metabolismo de compuestos aromáticos

Como abordaje inicial, nos planteamos la identificación de aquellas reacciones esenciales en el metabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos. Para ello, se evaluó en primer lugar utilizando el modelo *iLA772* las reacciones esenciales durante el crecimiento con piruvato como fuente de carbono control (no aromático), y con benzoato y fenilacetato como fuentes de carbono aromáticas, en condiciones anaerobias. Para realizar este análisis, en cada una de las condiciones se fueron eliminando individualmente cada una de las reacciones incluidas en el modelo y se maximizó la velocidad de crecimiento. Comparando el ratio entre la velocidad de crecimiento del modelo completo (modelo silvestre) y el que resultaba de la eliminación de cada una de las reacciones (modelo mutante) se pudo computar el efecto que sobre el crecimiento tenía la eliminación de cada una de las reacciones del modelo. Así, el ratio podía tener un valor entre 0 (reacción esencial) y 1 (reacción no esencial). Puesto que una disminución en el crecimiento inferior al 50% en el modelo “mutante” con respecto al modelo “silvestre” se puede considerar que es significativo, se consideraron reacciones importantes en el metabolismo aquellas cuya eliminación generaba ratios inferiores a 0,5 (Fig. 10).

Como se muestra en la figura 10, 307 reacciones de las 1010 que contiene el modelo *iLA772* son esenciales en las tres fuentes de carbono simuladas. Por otra parte, las reacciones que sólo son esenciales en una única condición estaban involucradas en el transporte y degradación específica de cada una de estas fuentes de carbono. Finalmente, se identificaron 13 reacciones esenciales que son comunes en el metabolismo de benzoato y fenilacetato (Tabla 5). Entre ellas se encuentra la reacción benzoil-CoA reductasa (BzdNOPQM) involucrada en la ruta central del benzoil-CoA (Fig. 2). Estudios *in vivo* con mutantes de *Azoarcus* sp. CIB en el gen *bzdN* que codifica una subunidad de esta enzima mostraron una inhibición en su crecimiento con benzoato como única fuente de carbono y energía (López-Barragán *et al.*, 2004), contrastando así los resultados obtenidos con *iLA772* (Tabla 5).

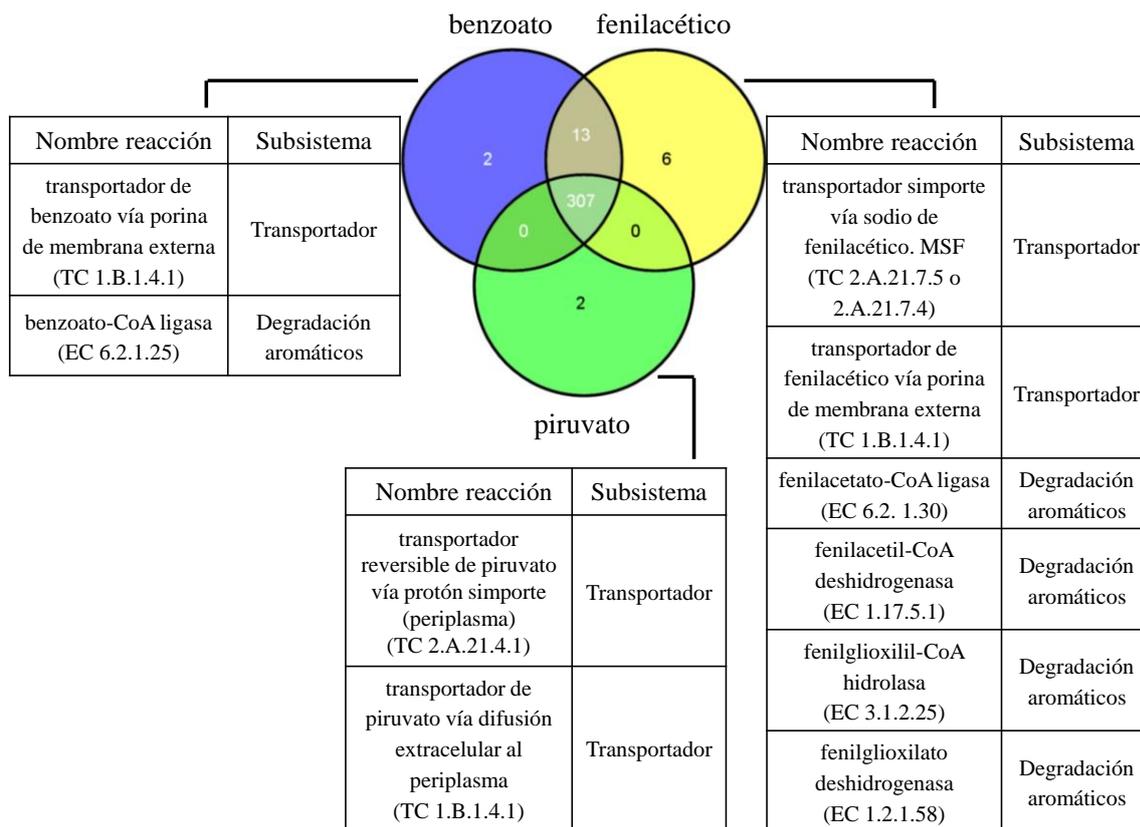


Fig. 10. Diagrama de Venn representando el número de reacciones esenciales en *Azoarcus* sp. CIB para la utilización de benzoato, fenilacetato y piruvato como fuentes de carbono. Las tablas representan las reacciones esenciales únicas en cada una de las tres fuentes de carbono, así como el subsistema al que pertenecen. Se indica el código de la comisión enzimática (EC) y el de la clasificación de transportadores (TC).

Entre las reacciones esenciales en el metabolismo de ambos compuestos aromáticos, también destaca la llevada a cabo por la glutaril-CoA deshidrogenasa, que participa en la ruta baja de degradación del benzoato (Fig. 2). Interesantemente, estudios *in vivo* mostraron que una deleción del gen *gcdH*, el cual codifica la glutaril-CoA deshidrogenasa, abolía también la capacidad de crecer en benzoato como única fuente de carbono y energía a CIB (Blázquez *et al.*, 2008), lo cual validaba adicionalmente las predicciones *in silico*.

Entre las reacciones que desempeñan un papel importante en el metabolismo de ambos compuestos aromáticos, no solo están presentes las relacionadas con la ruta central de la degradación de estos compuestos aromáticos vía benzoil-CoA, como podría esperarse, sino también reacciones del metabolismo central tales como la catalizada por la aconitasa, involucrada en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, y la isocitrato liasa, enzima que participa en el ciclo del glioixilato (Tabla 5), lo cual confirma el papel clave del ciclo del glioixilato en la degradación anaeróbica de compuestos aromáticos previamente puesto de manifiesto (Sección 3.2). Por último, cabe destacar como reacción importante para ambos compuestos aromáticos la llevada a cabo por la flavoproteína transferente de electrones o sistema ETF (del inglés, *Electron Transfer Flavoprotein*) (Tabla 5). Este sistema consiste en una flavoproteína que

funciona como aceptor de electrones procedentes de deshidrogenasas específicas, transfiriendo posteriormente estos electrones a la cadena general de transporte de electrones (Husain & Steenkamp, 1985).

Tabla 5. Reacciones esenciales y/o importantes y proteínas asociadas a éstas en *Azoarcus* sp. CIB para la utilización de benzoato y fenilacetato. Se indica el ratio de crecimiento en benzoato y fenilacetato entre el modelo completo iLA772 y el modelo en ausencia de la reacción indicada.

Subsistema metabólico	Proteína	Reacción	EC	Ratio benzoato	Ratio fenilacetato
Ciclo del glioxilato					
	AceA	Isocitrato liasa	4.1.3.1	0	0
Ciclo de los ácidos tricarboxílicos					
	AcnAB	aconitato A citrato hidratasa	4.2.1.3	0,42	0,48
	AcnAB	aconitato B isocitrato hidratasa	4.2.1.3	0,42	0,48
	GltA	citrato sintasa	2.3.3.1	0,42	0,48
	FumBC	fumarasa	4.2.1.2	0,42	0,48
	SdhABCD	succinato deshidrogenasa irreversible	1.3.99.1	0,43	0,49
Degradación aromáticos					
Ruta alta	BzdNOPQM	benzoil-CoA reductasa	1.3.7.8	0	0
	PimE	3-hidroxipimeloil-CoA deshidrogenasa	1.1.1.259	0	0
Ruta baja	PimB	Oxopimelil-CoA:glutaryl-CoA acyltransferase	Sin determinar	0	0
	GcdH	glutaryl-CoA deshidrogenasa	1.3.99.7	0	0
	Hbd	3-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa	1.1.1.157	0	0
	FadB	3-hidroxiacil-CoA deshidratasa	4.2.1.17	0	0
Otros					
	EtfABD	sistema ETF	1.5.5.1	0,38	0,41

4.2. Análisis de robustez de las reacciones esenciales para el metabolismo anaeróbico de los compuestos aromáticos.

Con objeto de llevar a cabo un estudio más exhaustivo del papel de las reacciones claves en el metabolismo de compuestos aromáticos identificadas, realizamos un "análisis de robustez". Este análisis de robustez, es una medida del cambio que se produce en el flujo máximo de la función objetivo (en este caso, velocidad de crecimiento) cuando se cambia el flujo óptimo a través de cualquier reacción metabólica en particular (en este caso la glutaryl-CoA deshidrogenasa y el sistema ETF) (Edwards & Palsson, 2000).

Así, en primer lugar se realizó un análisis de robustez de la reacción llevada a cabo por la enzima glutaril-CoA deshidrogenasa. Esta enzima ha sido implicada no sólo en el metabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos sino también en el catabolismo de, entre otros, la lisina, hidroxilisina, triptófano y ácidos dicarboxílicos de cadena larga, en muchos organismos (Carmona *et al.*, 2009; Wischgoll *et al.*, 2009). El análisis de robustez mostró como en todas las fuentes de carbono analizadas (excepto piruvato), ya sean los compuestos aromáticos (benzoato, tolueno y fenilacetato), los ácidos dicarboxílicos de cadena media-larga (glutarato y pimelato), o compuestos alicíclicos (ciclohexano carboxilato), el crecimiento depende de la presencia de la reacción llevada a cabo por la glutaril-CoA deshidrogenasa (Fig. 11). Cuando no existe flujo en esta reacción, la velocidad de crecimiento es 0, indicando que esta reacción es esencial para el metabolismo de todas estas fuentes de carbono (Tabla 5 y Fig. 11). Interessantemente, la máxima velocidad de crecimiento utilizando piruvato como fuente de carbono se alcanza con un flujo a través de la glutaril-CoA deshidrogenasa de 0 mmoles/gDW.h, lo que indica que no juega ningún papel en el metabolismo de este compuesto.

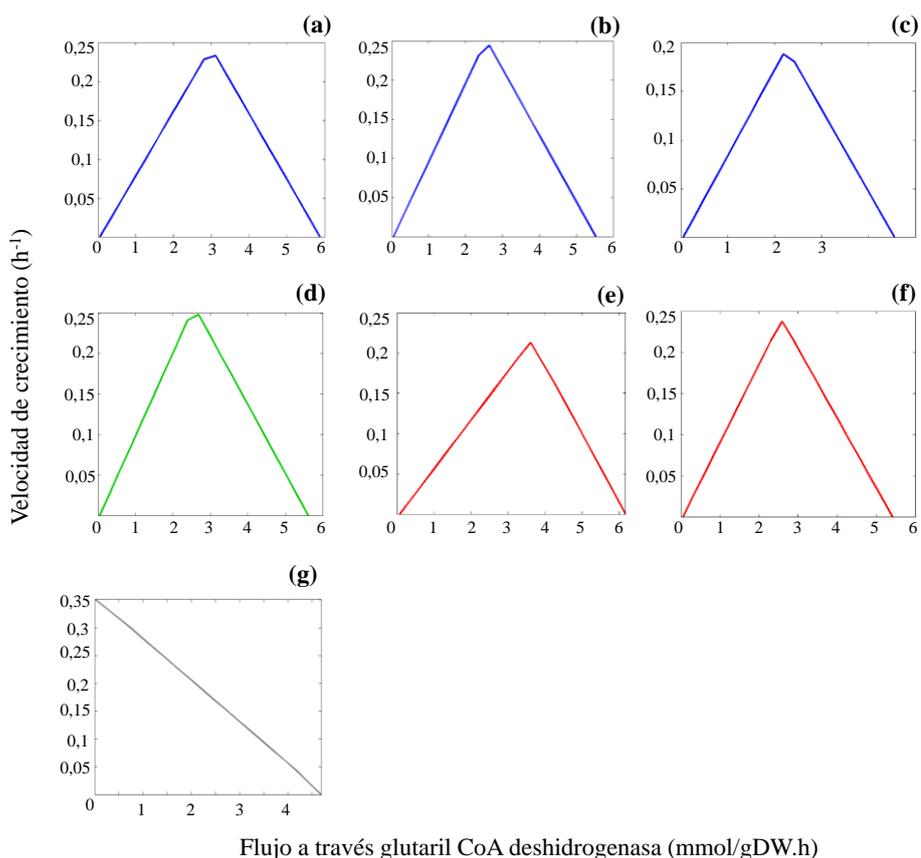


Fig. 11. Análisis de robustez de la reacción glutaril-CoA deshidrogenasa cuando *iLA772* utiliza distintas fuentes de carbono. Se ilustra el efecto que ejerce sobre la velocidad de crecimiento de *iLA772* la alteración del flujo de la reacción llevada a cabo por la glutaril-CoA deshidrogenasa. En azul se muestran los compuestos aromáticos: benzoato (a), tolueno (b) y fenilacetato (c), en verde se muestra el ciclohexano carboxilato como compuesto alicíclico (d), en rojo se muestran los ácidos dicarboxílicos de cadena media-larga impar: glutarato (e) y pimelato (f), y en gris el piruvato como compuesto control (g).

Por otro lado, el efecto severo sobre el crecimiento que ejerce la ausencia del sistema ETF en la cepa CIB nos llevó igualmente a realizar un análisis de robustez para validar la implicación directa de esta reacción en el metabolismo de compuestos aromáticos en condiciones anaeróbicas. Al igual que en el caso anterior, se computó la velocidad de crecimiento en función del flujo de la reacción llevada a cabo por este sistema (Fig. 12). Puesto que el sistema ETF no es esencial para el catabolismo del piruvato (Tabla 5), se utilizó éste como fuente de carbono control igualmente. Los compuestos aromáticos utilizados fueron el fenol, benzoato, fenilacetato, tolueno y *p*-cresol, por generar *in silico* una reducción de la velocidad de crecimiento significativa de *i*LA772 en ausencia del sistema ETF (tabla 5). Los resultados muestran como efectivamente durante la degradación del piruvato dicha reacción no es esencial puesto que cuando no hay flujo en ella la velocidad de crecimiento es la máxima ($0,35 \text{ h}^{-1}$) (Fig. 12). En cambio, en todos los compuestos aromáticos estudiados, en ausencia de esta reacción se computó una velocidad de crecimiento menor a la máxima (Fig. 12). Finalmente, se puede observar cómo la velocidad de crecimiento crece linealmente con respecto al incremento en el flujo a través del sistema ETF, hasta alcanzar la máxima velocidad de crecimiento.

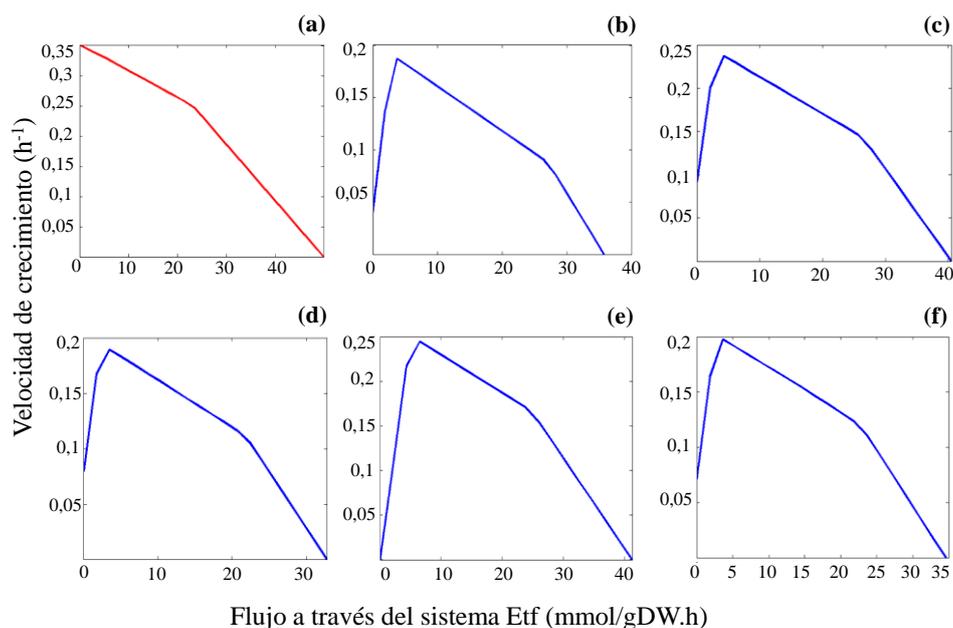


Fig. 12. Análisis de robustez de la reacción ETF en distintas fuentes de carbono. Se ilustra el efecto de la alteración del flujo de la reacción llevada a cabo por el sistema ETF, en la velocidad de crecimiento de *i*LA772. En rojo se muestran como fuente de carbono control el piruvato (a); y en azul se muestran los compuestos aromáticos: fenol (b), benzoato (c), fenilacetato (d), tolueno (e) y *p*-cresol (f).

V. DISCUSIÓN

La incipiente actividad industrial humana ha incrementado significativamente el número de compuestos aromáticos en los ecosistemas naturales, los cuales persisten en ellos durante largos periodos de tiempo (Chee-Sanford *et al.*, 1996; Navia & Seeger, 2006). Es por ello que la posibilidad de eliminar estos compuestos mediante procesos de biodegradación ha suscitado un alto interés en los últimos años. La capacidad de *Azoarcus* sp. CIB de degradar, tanto aeróbica como anaeróbicamente una gran cantidad de estos compuestos lo convierte en un organismo modelo en estos procesos de biorremediación. No obstante, cualquier proceso biotecnológico requiere de un conocimiento profundo de las capacidades metabólicas del biocatalizador de interés, haciendo por tanto necesario incrementar nuestro actual entendimiento del metabolismo a nivel de sistemas de la cepa CIB. En los últimos años, la posibilidad de reconstruir y analizar el metabolismo de un organismo a escala genómica ha permitido incrementar enormemente el entendimiento funcional de los sistemas vivos (Lewis *et al.*, 2012; Monk *et al.*, 2014). Por ello, para ampliar el estudio de los procesos de biodegradación llevados a cabo por *Azoarcus* sp. CIB nos planteamos como primer objetivo la reconstrucción y análisis de su metabolismo a escala genómica.

1. *iLA772* representa con alto grado de fidelidad las capacidades metabólicas de *Azoarcus* sp. CIB

Tras la primera reconstrucción de un modelo a escala genómica de la bacteria *Haemophilus influenza* en 1999 (Edwards & Palsson, 1999), que demostró que la relación genotipo-fenotipo podría comprenderse a escala genómica, el número de microorganismos modelados ha aumentado considerablemente. El desarrollo de técnicas de secuenciación y anotación del genoma, así como el incremento de los datos experimentales de una amplia cantidad de microorganismos ha sido la base para el aumento de las reconstrucciones a escala genómica de modelos metabólicos (Monk *et al.*, 2014). De estas especies ya reconstruidas hasta la fecha, un 41% (32 especies) pertenecen al grupo de las proteobacterias. No obstante, sorprende la baja representatividad del grupo de las β -proteobacterias donde tan sólo cuatro especies han sido modeladas: *Burkholderia cenocepacia* (Fang *et al.*, 2011), *Cupriavidus necator* (Park *et al.*, 2011), *Rhodoferax ferrireducens* (Risso *et al.*, 2009) y *Neisseria meningitidis* (Baart *et al.*, 2007). Por tanto, el modelo metabólico *iLA772* de *Azoarcus* sp. CIB amplía el reducido número de β -proteobacterias modeladas y se convierte en el primero de una bacteria desnitrificante degradadora de compuestos aromáticos en condiciones anaeróbicas (Lewis *et al.*, 2012; Monk *et al.*, 2014).

La mayor conservación del metabolismo central frente al metabolismo secundario entre especies y la existencia de un número mayor de datos experimentales sobre el metabolismo

central explican que *iLA772* comprenda mayoritariamente el metabolismo central de la cepa *Azoarcus* sp. CIB (Fig. 6), puesto que el conocimiento de este tipo de metabolismo ha sido estudiado en otras bacterias relacionadas, tales como *A. aromaticum* EbN1 (Rabus & Widdel, 1995; Rabus *et al.*, 2005). No obstante, *iLA772* contiene también características metabólicas específicas de la cepa CIB, tales como su gran versatilidad metabólica frente a compuestos aromáticos tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas, lo que convierte a *iLA772* en una herramienta computacional muy útil para el estudio de estas capacidades metabólicas de *Azoarcus* sp. CIB.

Por otro lado, la revisión de la anotación del genoma de la cepa CIB durante el proceso de modelado ha revelado ciertas capacidades de esta bacteria no descritas con anterioridad, como i) la existencia de la ruta *bad* de degradación anaeróbica del benzoato vía benzoil-CoA, única ruta de catabolismo anaeróbico del benzoato presente en la bacteria *Rhodopseudomonas palustris* (α -proteobacteria) (Egland *et al.*, 1995), como posible alternativa a la ruta *bzd* previamente descrita (López-Barragán *et al.*, 2004), o ii) la capacidad de fijar nitrógeno, descrita previamente en otras especies del género (Reinhold & Hurek, 1993) como *Azoarcus* sp. KH32C (Nishizawa *et al.*, 2012), *Azoarcus olearius* (Chen *et al.*, 2013), *Azoarcus* sp. BH72 o *Azoarcus tolulyticus* (Zhou *et al.*, 1995). Estos hallazgos demuestran el potencial del proceso de reconstrucción y análisis para identificar capacidades metabólicas no conocidas en la especie sujeta a estudio y evidencian la plasticidad metabólica de la cepa CIB.

2. Estudio del proceso de desnitrificación en *Azoarcus* sp. CIB utilizando *iLA772*.

El modelo *iLA772* de la cepa *Azoarcus* sp. CIB presenta capacidades metabólicas únicas nunca antes modeladas tales como la capacidad de desnitrificar en presencia de compuestos aromáticos como única fuente de carbono (Monk *et al.*, 2014). Existe otra bacteria modelada capaz de degradar compuestos aromáticos utilizando NO_3^- como aceptor de electrones, *Geobacter metallireducens* (Sun *et al.*, 2009), no obstante no posee la capacidad de desnitrificar ya que carece del proceso de reducción de NO_2^- a N_2 .

El estudio de la desnitrificación en presencia de compuestos aromáticos ha sido estudiado en detalle en especies del género *Azoarcus* (Ziegler *et al.* 1987; Reinhold & Hurek, 1993; López-Barragán *et al.*, 2004). El análisis en *iLA772* muestra que el proceso de desnitrificación ocurre secuencialmente con una etapa inicial de reducción de nitrato a nitrito y una posterior reducción del nitrito excretado a N_2 (Fig. 7). El proceso de desnitrificación *per se*, comienza en el momento en el que el nitrato se agota en el medio de cultivo (Fig. 7). En este momento el nitrito previamente secretado es utilizado como aceptor final de electrones y el proceso de desnitrificación concluye con la producción estequiométrica de nitrógeno molecular (Fig. 7). Este mismo comportamiento ha sido descrito *in vivo* en bacterias como *A. evansii* (Fig. 13)

(Ziegler *et al.* 1987) o en *Azoarcus tolulyticus* Tol-4 con tolueno como única fuente de carbono (Chee-Sanford *et al.*, 1996). Tomado en su conjunto, el estudio del proceso de desnitrificación en CIB utilizando iLA772 no sólo demuestra la capacidad predictiva de este modelo sino que sugiere que el proceso de desnitrificación sólo se completa en condiciones de limitación de nitrato, un aceptor de electrones más energético que el nitrito (Tabla 6).

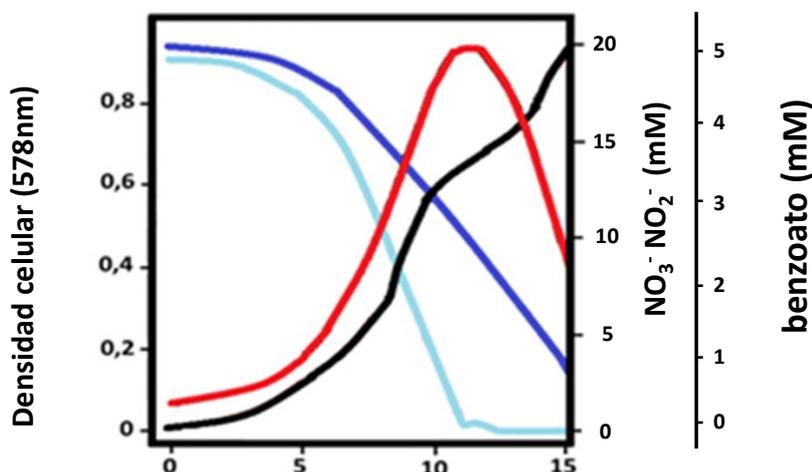


Fig. 13. Proceso de desnitrificación en *Azoarcus evansii* utilizando benzoato 5 mM como única fuente de carbono. Se muestra la densidad celular (línea negra), las concentraciones de benzoato (línea azul oscuro), así como la concentración de nitrato (20 mM; línea azul claro) y nitrito (línea roja), en función del tiempo. Modificado de Ziegler *et al.* (1987).

Puesto que se ha considerado que las bacterias optimizan su crecimiento en función de los recursos que hay en el medio, en condiciones limitantes de fuente de carbono deben aprovechar al máximo el poder reductor generado en la oxidación de estos compuestos. Así, las bacterias en estas condiciones priman la reducción de NO_3^- a NO_2^- . Sólo en condiciones limitantes de NO_3^- la reducción de NO_2^- a N_2 tiene lugar (Figs. 7 y 13). Esto indica que las bacterias desnitrifican en presencia de compuestos aromáticos cuando existe una alta concentración de los mismos o en condiciones limitantes de NO_3^- , una situación previamente descrita (Chee-Sanford *et al.*, 1996).

Tabla 6. Análisis energético del proceso de desnitrificación. Producción de ATP (mmol/gDW.h) y velocidad de crecimiento (h^{-1}) de *Azoarcus* sp. CIB. Se simularon condiciones limitantes de carbono permitiendo únicamente un consumo de 1mmol/gDW.h de benzoato y 2 mmol/gDW.h de piruvato frente a 25 mmoles/gDW.h de NO_3^- o NO_2^- como aceptor de electrones.

Fuente de carbono	Aceptor de electrones			
	NO_3^-		NO_2^-	
	ATP (mmol/gDW.h)	Velocidad de crecimiento (h^{-1})	ATP (mmol/gDW.h)	Velocidad de crecimiento (h^{-1})
Benzoato	15,8	0,08	13,3	0,07
Piruvato	13	0,07	11,3	0,06

3. Análisis del potencial metabólico de *Azoarcus* sp. CIB usando *iLA772*

Muchos estudios microbiológicos están basados en observaciones experimentales en los que el microorganismo de estudio se cultiva en condiciones de laboratorio muy controladas. Estas aproximaciones experimentales no muestran el verdadero potencial metabólico de ese organismo puesto que dichas condiciones pueden no ser las óptimas y podrían estar limitando en gran medida su capacidad de crecimiento. Por el contrario, el análisis del potencial metabólico de un organismo dado mediante la utilización de modelos metabólicos tiene la ventaja de poder explorar todo el potencial metabólico codificado en el genoma de una manera sistemática aboliendo efectos adversos debido a condiciones ambientales no óptimas.

En los últimos años, en nuestro grupo se han llevado a cabo numerosos estudios centrados en la identificación del potencial metabólico de *Azoarcus* sp. CIB y se han probado un total de 53 fuentes de carbono distintas (López-Barragán *et al.*, 2004; Barragán *et al.*, 2005; Durante-Rodríguez *et al.*, 2006, Valderrama *et al.*, 2014, entre otros). La gran capacidad predictiva de *iLA772* a la hora de identificar fuentes de carbono confirmadas experimentalmente para la cepa CIB (Fig. 6), reafirma la alta conectividad y robustez que presenta el modelo metabólico *iLA772*, así como la utilidad de este abordaje computacional para identificar nutrientes utilizables por *Azoarcus* sp. CIB.

No obstante, hay un grupo de compuestos con los cuales se predijo crecimiento *in silico* pero no se observó crecimiento *in vivo* (Fig. 6). Algunos de estos casos lo constituyen compuestos aromáticos, como el *p*-cresol o fenol, que son fuente de carbono para otras especies del género *Azoarcus* (Lee *et al.*, 2014). Puesto que ciertas funciones biológicas se adquieren tras un proceso evolutivo y/o adaptativo, los resultados obtenidos con el análisis *in silico* sugieren una incompleta adaptación evolutiva de la cepa CIB para utilizar *p*-cresol o fenol bajo las condiciones impuestas en el laboratorio (Ibarra *et al.*, 2002; Lewis *et al.*, 2010). Estas discrepancias se encuentran a menudo en las predicciones de los modelos metabólicos, y sugieren que los organismos presentan el potencial metabólico para poder crecer en determinadas condiciones pero este potencial se encuentra silenciado *in vivo*, configurando lo que se denominan rutas metabólicas latentes. Estas rutas sólo se activarían ante ciertas perturbaciones o tras un proceso de adaptación evolutiva en el laboratorio (Fong *et al.*, 2006; Lewis *et al.*, 2010). Por esta razón, como experimentos futuros, se plantea llevar a cabo experimentos de adaptación en el laboratorio que propicien la activación de estas rutas latentes detectadas en la cepa CIB, con objeto de ampliar las capacidades biodegradativas de esta cepa.

Por último, se observó que *iLA772* era incapaz de predecir crecimiento en fuentes de carbono validadas experimentalmente en la cepa CIB. Estas discrepancias pueden venir impuestas por la falta de información sobre la ruta de degradación de algunos de estos

compuestos o simplemente por la ausencia de la ruta de degradación en el modelo. Por tanto, representan subsistemas metabólicos a revisar con vistas a la expansión del modelo en futuras versiones.

4. Efecto de la disponibilidad de oxígeno en la degradación de compuestos aromáticos por *Azoarcus* sp. CIB.

La capacidad de degradación del benzoato en algunas bacterias del género *Azoarcus/Aromatoleum*, tanto aeróbica como anaeróticamente, ha sido estudiada en cierto detalle (López-Barragán *et al.*, 2004, Rabus *et al.*, 2005; Carmona *et al.*, 2009, Valderrama *et al.*, 2014). Teniendo en cuenta que *Azoarcus* sp. CIB es un organismo anaerobio facultativo, y dispone de rutas de degradación de benzoato tanto aeróbicas como anaeróbicas, es razonable pensar que la disponibilidad de oxígeno podría jugar un papel importante a la hora de utilizar diferencialmente estas diferentes vías.

La expresión de los genes de la ruta híbrida box de degradación aeróbica del benzoato en condiciones anaeróbicas ha sido previamente observado en la cepa CIB. No obstante no se ha podido dar hasta ahora una explicación al porqué de esta expresión en condiciones en las cuales aparentemente la ruta aeróbica no tendría ningún papel fisiológico (Valderrama *et al.*, 2012).

Para intentar entender mejor este proceso, y tratar de explicar la co-existencia de ambas rutas bajo condiciones anaeróbicas, el modelo *iLA772* fue utilizado para estudiar el metabolismo del benzoato en función de la disponibilidad de oxígeno en términos energéticos. El análisis *in silico* evidenció la co-activación tanto de la ruta aeróbica como anaeróbica en condiciones de baja disponibilidad de oxígeno, en buena concordancia con los datos experimentales (Fig. 8).

Fue interesante que en estas condiciones, el oxígeno no fuera utilizado como aceptor final de electrones, papel que era desempeñado por el nitrato, sino como co-sustrato requerido por las oxigenasas que participan en la ruta box. Dado que la actividad de la ruta aeróbica aumentaba proporcionalmente al consumo de oxígeno mientras que el nitrato era usado como aceptor final de electrones, se puede concluir que esta ruta es más eficiente que la ruta anaeróbica. Esta hipótesis se confirmó con los datos energéticos aportados en el análisis del crecimiento utilizando benzoato en presencia o ausencia de oxígeno (Tabla 4). Así, la ruta box mostro ser más eficiente energéticamente para el crecimiento de esta bacteria que las rutas anaeróbicas bzd o bad, independientemente del aceptor final de electrones (Tabla 4). La co-expresión observada *in silico* e *in vivo* en condiciones anaeróbicas, podría deberse por tanto a una estrategia evolutiva en respuesta a variaciones en la disponibilidad de oxígeno durante el metabolismo del benzoato. Así, aun en condiciones estrictamente anaeróbicas, la expresión de la ruta aeróbica, al ser mucho más energética, podría proporcionar una ventaja evolutiva si las condiciones ambientales

cambian transitoriamente y pequeñas trazas de oxígeno aparecen en el sistema. En estas condiciones la ruta aeróbica, ya expresada, proporcionaría un mejor aprovechamiento del benzoato disponible actuando a la vez como mecanismo de detoxificación de oxígeno al evitar que la acumulación de éste pueda inactivar a la benzoil-CoA reductasa clave en la ruta anaeróbica (Boll & Fuchs, 1995). En ausencia de esta co-expresión, pequeñas trazas de oxígeno, insuficientes para soportar un metabolismo aeróbico, podrían además inactivar la ruta anaeróbica y detener completamente el crecimiento.

Por otro lado, el análisis del metabolismo del fenilacetato utilizando a *iLA772* (Fig. 9) mostró, al igual que en la degradación de benzoato, que la ruta aeróbica es más eficiente que la ruta anaeróbica (Tabla 4). Además, también se predijo una activación tanto de la ruta aeróbica como de la anaeróbica en condiciones de bajas concentraciones de oxígeno, sugiriendo que esta co-activación podría ser una estrategia ampliamente distribuida en la degradación de compuestos aromáticos en organismos anaeróbicos facultativos.

5. Estudio del metabolismo accesorio de compuestos aromáticos en *Azoarcus* sp. CIB

Un modelo metabólico no sólo tiene la capacidad de predecir cambios en el fenotipo en respuesta a perturbaciones ambientales (e.g., fuentes de carbono), sino también puede predecir cambios en el fenotipo en respuesta a perturbaciones genéticas (e.g., mutaciones) (Lewis *et al.*, 2010). Así, estos modelos permiten evaluar sistemáticamente cambios en las capacidades metabólicas de un organismo simulando mutaciones *in silico* (Lewis *et al.*, 2012). Una de las aplicaciones de este abordaje, es la posibilidad de computar aquellas reacciones esenciales para el crecimiento en unas condiciones concretas. Aprovechando esta capacidad y con intención de estudiar el metabolismo esencial de compuestos aromáticos se procedió a analizar aquellas reacciones que son esenciales para el metabolismo del benzoato y fenilacetato y no para el metabolismo de ácidos orgánicos no aromáticos tales como el piruvato (Fig. 10, Tabla 5). El análisis realizado mostró que existen al menos 13 reacciones que son esenciales, o cuya ausencia causa un efecto negativo severo, en el crecimiento anaeróbico de *iLA772*, durante la degradación de benzoato o fenilacetato, y que sin embargo son dispensables para el metabolismo del piruvato (Tabla 5).

Entre éstas, cabe destacar el papel de la enzima glutaril-CoA deshidrogenasa (GcdH). Esta enzima convierte el glutaril-CoA en crotonil-CoA en la ruta baja de degradación anaeróbica de compuestos aromáticos vía benzoil-CoA (Fig. 14), y su papel esencial en el metabolismo del benzoato ya había sido observado en *Azoarcus* sp. CIB (Blázquez *et al.*, 2008). De igual modo, se ha demostrado que esta enzima juega un papel importante también en el catabolismo de la lisina, hidroxilisina y triptófano en muchos organismos, así como en el metabolismo del

ciclohexanocarboxilato y los ácidos dicarboxílicos de cadena media-larga como el pimelato o el glutarato (Carmona *et al.*, 2009; Wischgoll *et al.*, 2009). Estos resultados confirman la capacidad de iLA772 de predecir con alto grado de fiabilidad efectos en el fenotipo en respuesta a perturbaciones genéticas.

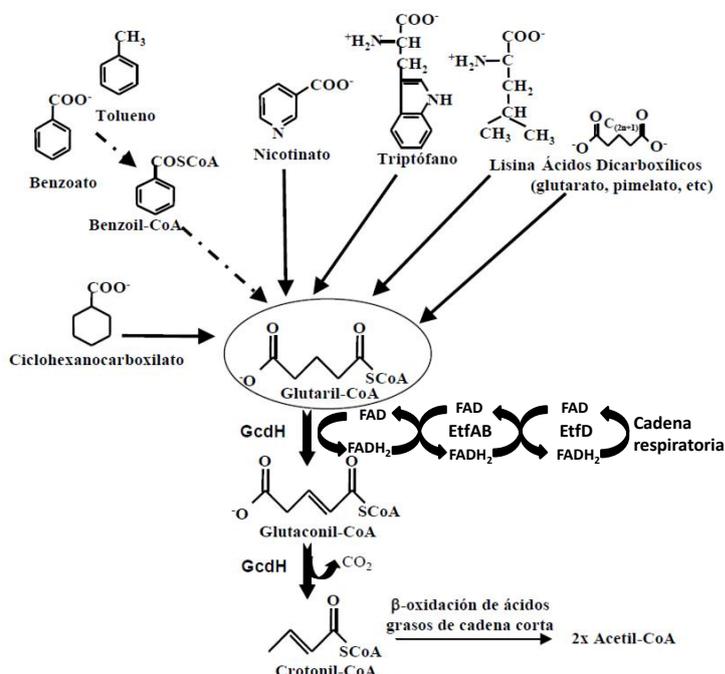


Fig. 14. Esquema del catabolismo de diferentes fuentes de carbono que convergen en el intermediario glutaril-CoA, y posterior metabolismo de éste. Se representan con líneas discontinuas las rutas anaeróbicas y con líneas continuas las rutas aeróbicas que en algunos casos, e. g. ciclohexanocarboxilato y ácidos dicarboxílicos, son también funcionales en anaerobiosis. Las enzimas representadas son la glutaril-CoA deshidrogenasa (GcdH), la flavoproteína transferidora de electrones (EtfAB), y flavoproteína transferidora de electrones deshidrogenasa (EtfD), que requieren flavín adenín dinucleótido (FAD) como cofactor y que ceden los electrones finalmente a ubiquinonas oxidadas de la cadena respiratoria como Q8, la cual es reducida a Q8H₂. Modificado de Blázquez *et al.*, 2008.

Por otro lado, también se identificó al sistema de flavoproteína transferidora de electrones (ETF) como reacción crítica en el metabolismo de compuestos aromáticos en condiciones anaeróbicas (Tabla 5). El sistema ETF actúa aceptando los electrones de la glutaril-CoA deshidrogenasa vía FADH₂ (Fig. 14). La relación de esta enzima con el sistema ETF ha sido estudiada en diversos microorganismos tales como *Paracoccus denitrificans* (Husain & Steenkamp, 1985) y *Geobacter metallireducens* (Heintz *et al.*, 2009), pero hasta la fecha no se había estudiado en la cepa CIB. Corroborando las predicciones *in silico*, datos de expresión génica disponibles en nuestro grupo (datos no publicados y que forman parte de una Tesis Doctoral en curso) revelan que genes de la cepa CIB que codifican el sistema ETF (AzCIB_3039 (EtfA); AzCIB_3040 (EtfB); y AzCIB_1979 (EtfD)) se expresan hasta 5, 3, y 2 veces más, respectivamente, cuando la cepa CIB se cultiva con benzoato frente a piruvato como fuente de carbono control. La presencia de varios sistemas ETF en el genoma de la cepa CIB

observados durante la revisión de la anotación genómica sugiere que su participación en el metabolismo de compuestos no aromáticos como el piruvato no sea esencial, tal y como predicen los resultados obtenidos utilizando *iLA772* (Fig. 10). Por lo tanto, la mayor expresión de los genes que codifican el sistema ETF en presencia de benzoato en comparación con un compuesto no aromático como el piruvato sugiere que el sistema ETF es importante en la degradación anaeróbica de compuestos aromáticos en *Azoarcus* sp. CIB.

Tomados en su conjunto, se puede concluir que el análisis del metabolismo accesorio de compuestos aromáticos en anaerobiosis utilizando *iLA772* sugiere por primera vez en *Azoarcus* sp. CIB que la acción sinérgica de la gutaril-CoA deshidrogenasa y el sistema ETF es vital para un proceso de biodegradación óptimo en condiciones anaeróbicas. Futuros experimentos orientados a incrementar la actividad del sistema ETF en *Azoarcus* sp. CIB serían muy interesantes con objeto de optimizar, aún más, los procesos de biodegradación en condiciones anaeróbicas en esta cepa.

VI. CONCLUSIONES

1. Se ha construido el primer modelo metabólico a escala genómica de una bacteria capaz de desnitrificar utilizando compuestos aromáticos como única fuente de carbono. *iLA772* representa además el primer modelo metabólico que se describe en el orden Rhodocyclales, β -proteobacteria de gran relevancia medioambiental.
2. El proceso de reconstrucción y análisis del metabolismo de *Azoarcus* sp. CIB ha permitido ampliar el conocimiento disponible del metabolismo central y secundario de esta bacteria. Así, se ha identificado la ruta *bad* como posible alternativa a la ruta central *bzd* para la degradación anaeróbica del benzoato vía benzoil-CoA.
3. *iLA772* ha mostrado ser una herramienta computacional muy útil a la hora de predecir el potencial metabólico de *Azoarcus* sp. CIB, sugiriendo no sólo nuevas fuentes de carbono potenciales, sino también la presencia de rutas latentes de degradación de compuestos aromáticos, lo que abre la posibilidad de ampliar la versatilidad metabólica de esta cepa mediante procesos de evolución adaptativa en el laboratorio.
4. El análisis del metabolismo de compuestos aromáticos en función de la disponibilidad de oxígeno utilizando *iLA772* ha permitido concluir que las rutas aeróbicas son más energéticas y sugiere que la co-expresión de rutas aeróbicas y anaeróbicas en anaerobiosis podría aportar una ventaja adaptativa frente a condiciones ambientales en las que la concentración de oxígeno es cambiante.
5. El estudio del metabolismo accesorio esencial para la degradación de compuestos aromáticos utilizando *iLA772* ha revelado nuevas reacciones clave para la eficiente utilización de dichas fuentes de carbono, e.g., la relación de la enzima glutaril-CoA deshidrogenasa con el sistema ETF. La identificación del sistema ETF como posible cuello de botella en el proceso de biodegradación anaeróbica abre una nueva vía para el diseño y optimización de este proceso biotecnológico basada en el incremento de la expresión génica de los genes *etf*.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Alhapel, A., Darley, D. J., Wagener, N., Eckel, E., Elsner, N., Pierik, A. J.** (2006). Molecular and functional analysis of nicotinate catabolism in eubacterium barkeri. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103(33): 12341-12346.
- Anders, H. J., Kaetzke, A., Kampfer, P., Ludwig, W., Fuchs, G.** (1995). Taxonomic position of aromatic-degrading denitrifying Pseudomonad strains K 172 and KB 740 and their description as new members of the genera *Thauera*, as *Thauera aromatica* sp. nov., and *Azoarcus*, as *Azoarcus evansii* sp. nov., respectively, members of the beta subclass of the proteobacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45(2): 327-333.
- Baart, G. J., Zomer, B., de Haan, A., van der Pol, L. A., Beuvery, E. C., Tramper, J., Martens, D. E.** (2007). Modeling *Neisseria meningitidis* metabolism: from genome to metabolic fluxes. *Genome Biol.* 8 (7): R136.
- Barragán, M. J., Blázquez, B., Zamarro, M. T., Mancheno, J. M., García, J. L., Díaz, E., Carmona, M.** (2005). BzdR, a repressor that controls the anaerobic catabolism of benzoate in *Azoarcus* sp. CIB, is the first member of a new subfamily of transcriptional regulators. *J. Biol. Chem.* 280(11): 10683-10694.
- Blázquez, B., Carmona, M., García, J. L., Díaz, E.** (2008). Identification and analysis of a glutaryl-CoA dehydrogenase-encoding gene and its cognate transcriptional regulator from *Azoarcus* sp. CIB. *Environ. Microbiol.* 10(2): 474-482.
- Boll, M., Fuchs, G.** (1995). Benzoyl-coenzyme A reductase (dearomatizing), a key enzyme of anaerobic aromatic metabolism. ATP dependence of the reaction, purification and some properties of the enzyme from *Thauera aromatica* strain K172. *Eur. J. Biochem.* 234(3): 921-933.
- Butler, J. E., He, Q., Nevin, K. P., He, Z., Zhou, J., Lovley, D. R.** (2007). Genomic and microarray analysis of aromatics degradation in *Geobacter metallireducens* and comparison to a *Geobacter* isolate from a contaminated field site. *BMC Genomics* 8: 180.
- Carmona, M., Zamarro, M. T., Blázquez, B., Durante-Rodríguez, G., Juárez, J. F., Valderrama, J. A., Barragán, M. J., García, J. L., Díaz, E.** (2009). Anaerobic catabolism of aromatic compounds: A genetic and genomic view. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 73(1): 71-133.
- Cesarino, I., Araújo, P., Domingues-Júnior, A. P., Mazzafera, P.** (2012). An overview of lignin metabolism and its effect on biomass recalcitrance. *Braz. J. Bot.* 35(4): 303-311.
- Chee-Sanford, J. C., Frost, J. W., Fries, M. R., Zhou, J., Tiedje, J. M.** (1996). Evidence for acetyl coenzyme A and cinnamoyl coenzyme A in the anaerobic toluene mineralization pathway in *Azoarcus toluolyticus* tol-4. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(3): 964-973.

- Chen, M. H., Sheu, S. Y., James, E. K., Young, C. C., Chen, W. M.** (2013). *Azoarcus olearius* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from oil-contaminated soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63(Pt 10): 3755-3761.
- Denef, V. J., Klappenbach, J. A., Patrauchan, M. A., Florizone, C., Rodrigues, J. L., Tsoi, T. V., Verstraete, W., Eltis, L. D., Tiedje, J. M.** (2006). Genetic and genomic insights into the role of benzoate-catabolic pathway redundancy in *Burkholderia xenovorans* LB400. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(1): 585-595.
- Díaz, E.** (2004). Bacterial degradation of aromatic pollutants: A paradigm of metabolic versatility. *Int. Microbiol.* 7(3): 173-180.
- Díaz, E., Jiménez, J. I., Nogales, J.** (2013). Aerobic degradation of aromatic compounds. *Curr. Opin. Biotechnol.* 24(3): 431-442.
- Durante-Rodríguez, G., Valderrama, J. A., Mancheno, J. M., Rivas, G., Alfonso, C., Arias-Palomo, E., Llorca, O., García, J. L., Díaz, E., Carmona, M.** (2010). Biochemical characterization of the transcriptional regulator BzdR from *Azoarcus* sp. *CIB. J. Biol. Chem.* 285(46): 35694-35705.
- Durante-Rodríguez, G., Zamarro, M. T., Garcia, J. L., Díaz, E., Carmona, M.** (2006). Oxygen-dependent regulation of the central pathway for the anaerobic catabolism of aromatic compounds in *Azoarcus* sp. strain CIB. *J. Bacteriol.* 188(7): 2343-2354.
- Durante-Rodríguez, G., Zamarro, M. T., García, J. L., Díaz, E., Carmona, M.** (2008). New insights into the BzdR-mediated transcriptional regulation of the anaerobic catabolism of benzoate in *Azoarcus* sp. *CIB. Microbiology* 154(Pt 1): 306-316.
- Edwards, J. S., Palsson, B. O.** (1999). Systems properties of the *Haemophilus influenzae* rd metabolic genotype. *J. Biol. Chem.* 274(25): 17410-17416.
- Edwards, J. S., Palsson, B. O.** (2000). Robustness analysis of the *Escherichia coli* metabolic network. *Biotechnol. Prog.* 16(6): 927-939.
- Egland, P. G., Gibson, J., Harwood, C. S.** (1995). Benzoate-coenzyme A ligase, encoded by badA, is one of three ligases able to catalyze benzoyl-coenzyme A formation during anaerobic growth of *Rhodospseudomonas palustris* on benzoate. *J. Bacteriol.* 177 (22): 6545-6551.
- Fang, K., Zhao, H., Sun, C., Lam, C. M., Chang, S., Zhang, K., Panda, G., Godinho, M., Martins dos Santos, V. A., Wang, J.** (2011). Exploring the metabolic network of the epidemic pathogen *Burkholderia cenocepacia* J2315 via genome-scale reconstruction. *BMC Syst. Biol.* 5: 83, doi: 10.1186/1752-0509-5-83.

- Feist, A. M., Henry, C. S., Reed, J. L., Krummenacker, M., Joyce, A. R., Karp, P. D., Broadbelt, L. J., Hatzimanikatis, V., Palsson, B.O.** (2007). A genome-scale metabolic reconstruction for *Escherichia coli* K-12 MG1655 that accounts for 1260 ORFs and thermodynamic information. *Mol. Syst. Biol.* 3: 121.
- Feist, A. M., Herrgard, M. J., Thiele, I., Reed, J. L., Palsson, B. O.** (2009). Reconstruction of biochemical networks in microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 7(2): 129-143.
- Feist, A. M., Palsson, B. O.** (2010). The biomass objective function. *Curr. Opin. Microbiol.* 13(3): 344-349.
- Fong, S. S., Marciniak, J. Y., Palsson, B. O.** (2003). Description and interpretation of adaptive evolution of *Escherichia coli* K-12 MG1655 by using a genome-scale *in silico* metabolic model. *J. Bacteriol.* 185(21): 6400-6408.
- Fries, M. R., Zhou, J., Chee-Sanford, J., Tiedje, J. M.** (1994). Isolation, characterization, and distribution of denitrifying toluene degraders from a variety of habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(8): 2802-2810.
- Fuchs, G., Boll, M., Heider, J.** (2011). Microbial degradation of aromatic compounds - from one strategy to four. *Nat. Rev. Microbiol.* 9(11): 803-816.
- Gibson, J., Harwood, C. S.** (2002). Metabolic diversity in aromatic compound utilization by anaerobic microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* 56: 345-369.
- Harrison, F. H., Harwood, C. S.** (2005). The pimFABCDE operon from *Rhodopseudomonas palustris* mediates dicarboxylic acid degradation and participates in anaerobic benzoate degradation. *Microbiology* 151(Pt 3): 727-736.
- Harwood, C. S., Parales, R. E.** (1996). The beta-ketoadipate pathway and the biology of self-identity. *Ann. Rev. Microbiol.* 50: 553-590.
- Heider, J.** (2007). Adding handles to unhandy substrates: Anaerobic hydrocarbon activation mechanisms. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 11(2): 188-194.
- Heider, J., Fuchs, G.** (1997). Anaerobic metabolism of aromatic compounds. *Eur. J. Biochem.* 243(3): 577-596.
- Heintz, D., Gallien, S., Wischgoll, S., Ullmann, A. K., Schaeffer, C., Kretzschmar, A. K., van Dorselaer, A.; Boll, M.** (2009). Differential membrane proteome analysis reveals novel proteins involved in the degradation of aromatic compounds in *Geobacter metallireducens*. *Mol. Cell. Proteomics* 8(9): 2159-2169.

- Husain, M., Steenkamp, D. J.** (1985). Partial purification and characterization of glutaryl-coenzyme A dehydrogenase, electron transfer flavoprotein, and electron transfer flavoprotein-Q oxidoreductase from *Paracoccus denitrificans*. *J. Bacteriol.* 163(2): 709-715.
- Hyduke, D., Schellenberger, J., Que, R., Fleming, R., Thiele, I., Orth, J., Feist, A., Zielinski, D., Bordbar, A., Lewis, N., Rahmanian, S., Kang, J., Palsson, B.** (2011). COBRA toolbox 2.0. *Protocol Exchange – Nature*.
- Ibarra, R. U., Edwards, J. S., Palsson, B. O.** (2002). *Escherichia coli* K-12 undergoes adaptive evolution to achieve *in silico* predicted optimal growth. *Nature* 420(6912): 186-189.
- Janssen, P., Goldovsky, L., Kunin, V., Darzentas, N., Ouzounis, C. A.** (2005). Genome coverage, literally speaking. The challenge of annotating 200 genomes with 4 million publications. *EMBO Rep.* 6(5): 397-399.
- Kanehisa, M., Goto, S., Hattori, M., Aoki-Kinoshita, K. F., Itoh, M., Kawashima, S., Katayama, T., Araki, M., Jirakawa, M.** (2006). From genomics to chemical genomics: New developments in KEGG. *Nucleic Acids Res.* 34(Base de datos): D354-7.
- Larimer, F. W., Chain, P., Hauser, L., Lamerdin, J., Malfatti, S., Do, L., Land, M. L., Pelletier, D. A., Beatty, J. T., Lang, A. S., Tabita, F. R., Gibson, J. L., Hanson, T. E., Bobst, C., Torres, J. L., Peres, C., Harrison, F. H., Gibson, J., Harwood, C. S.** (2004). Complete genome sequence of the metabolically versatile photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas palustris*. *Nat. Biotechnol.* 22(1): 55-61.
- Lee, D. J., Wong, B. T., Adav, S. S.** (2014). *Azoarcus taiwanensis* sp. nov., a denitrifying species isolated from a hot spring. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98(3): 1301-1307.
- Lewis, N. E., Hixson, K. K., Conrad, T. M., Lerman, J. A., Charusanti, P., Polpitiya, A. D., Adkins, J. N., Schramm, G., Purvine, S. O., López-Ferrer, D., Weitz, K. K., Eils, R., König, R., Smith, R. D., Palsson, B. O.** (2010). Omic data from evolved *E. coli* are consistent with computed optimal growth from genome-scale models. *Mol. Syst. Biol.* 6: 390.
- Lewis, N. E., Nagarajan, H., Palsson, B. O.** (2012). Constraining the metabolic genotype-phenotype relationship using a phylogeny of *in silico* methods. *Nat. Rev. Microbiol.* 10(4): 291-305.
- Liao, Y. C., Tsai, M. H., Chen, F. C., Hsiung, C. A.** (2012). GEMSiRV: A software platform for GENome-scale metabolic model simulation, reconstruction and visualization. *Bioinformatics* 28(13): 1752-1758.
- López-Barragán, M. J., Carmona, M., Zamorro, M. T., Thiele, B., Boll, M., Fuchs, G., García, J. L.; Díaz, E.** (2004). The *bzd* gene cluster, coding for anaerobic benzoate catabolism, in *Azoarcus* sp. strain CIB. *J. Bacteriol.* 186(17): 5762-5774.

- Lovley, D. R.** (2003). Cleaning up with genomics: Applying molecular biology to bioremediation. *Nat. Rev. Microbiol.* 1(1): 35-44.
- Matilla, M. A., Espinosa-Urgel, M., Rodríguez-Herva, J. J., Ramos, J. L., Ramos-González, M. I.** (2007). Genomic analysis reveals the major driving forces of bacterial life in the rhizosphere. *Genome Biol.* 8(9): R179.
- McCloskey, D., Palsson, B. O., Feist, A. M.** (2013). Basic and applied uses of genome-scale metabolic network reconstructions of *Escherichia coli*. *Mol. Syst. Biol.* 9: 661.
- Mechichi, T., Stackebrandt, E., Gad'on, N., Fuchs, G.** (2002). Phylogenetic and metabolic diversity of bacteria degrading aromatic compounds under denitrifying conditions, and description of *Thauera phenylacetica* sp. nov., *Thauera aminoaromatica* sp. nov., and *Azoarcus buckelii* sp. nov. *Arch. Microbiol.* 178(1): 26-35.
- Monk, J., Nogales, J., Palsson, B. O.** (2014). Optimizing genome-scale network reconstructions. *Nat. Biotechnol.* 32(5): 447-452.
- Navia, R., Seeger, M.** (2006). *Biorremediación de suelos contaminados con compuestos orgánicos persistentes (COPs)*. U. La Frontera, Temuco.
- Nishizawa, T., Tago, K., Oshima, K., Hattori, M., Ishii, S., Otsuka, S., Senoo, K.** (2012). Complete genome sequence of the denitrifying and N₂O-reducing bacterium *Azoarcus* sp. strain KH32C. *J. Bacteriol.* 194(5): 1255-11.
- Nogales, J., Palsson, B. O., Thiele, I.** (2008). A genome-scale metabolic reconstruction of *Pseudomonas putida* KT2440: iJN746 as a cell factory. *BMC Syst. Biol.* 2: 79.
- Oberhardt, M. A., Puchalka, J., Fryer, K. E., Martins dos Santos, V. A., Papin, J. A.** (2008). Genome-scale metabolic network analysis of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* 190(8): 2790-2803.
- Oh, Y. K., Palsson, B. O., Park, S. M., Schilling, C. H., Mahadevan, R.** (2007). Genome-scale reconstruction of metabolic network in *Bacillus subtilis* based on high-throughput phenotyping and gene essentiality data. *J. Biol. Chem.* 282(39): 28791-28799.
- Orth, J. D., Conrad, T. M., Na, J., Lerman, J. A., Nam, H., Feist, A. M., Palsson, B. O.** (2011). A comprehensive genome-scale reconstruction of *Escherichia coli* metabolism--2011. *Mol. Syst. Biol.* 7: 535.
- Orth, J. D., Thiele, I., Palsson, B. O.** (2010). What is flux balance analysis?. *Nat. Biotechnol.* 28(3): 245-248.

- Park, J. M., Kim, T. Y., Lee, S. Y.** (2011). Genome-scale reconstruction and *in silico* analysis of the *Ralstonia eutropha* H16 for polyhydroxyalkanoate synthesis, lithoautotrophic growth, and 2-methyl citric acid production. *BMC Syst. Biol.* 5: 101.
- Porter, A. W., Young, L. Y.** (2014). Benzoyl-CoA, a universal biomarker for anaerobic degradation of aromatic compounds. *Adv. Appl. Microbiol.* 88: 167-203.
- Rabus, R., Kube, M., Heider, J., Beck, A., Heitmann, K., Widdel, F., Reinhardt, R.** (2005). The genome sequence of an anaerobic aromatic-degrading denitrifying bacterium, strain EbN1. *Arch. Microbiol.* 183(1): 27-36.
- Rabus, R., Widdel, F.** (1995). Anaerobic degradation of ethylbenzene and other aromatic hydrocarbons by new denitrifying bacteria. *Arch. Microbiol.* 163(2): 96-103.
- Rather, L. J., Bill, E., Ismail, W., Fuchs, G.** (2011). The reducing component BoxA of benzoyl-coenzyme A epoxidase from *Azoarcus evansii* is a [4Fe-4S] protein. *Biochim. Biophys. Acta* 1814(12): 1609-1615.
- Reinhold-Hurek, B., Hurek, T., Gillis, M., Hoste, B., Vancanneyt, M., Kersters, K., de Ley, J.** (1993). *Azoarcus* gen. nov., nitrogen-fixing proteobacteria associated with roots of kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) kunth), and description of two species, *Azoarcus indigenus* sp. nov. and *Azoarcus communis* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43(3): 574-584.
- Revelles, O., Espinosa-Urgel, M.** (2004). Proline and Lysine Metabolism. En: Ramos, J. L. (ed.), *Pseudomonas*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Riley, M., Abe, T., Arnaud, M. B., Berlyn, M. K., Blattner, F. R., Chaudhuri, R. R., Glasner, J. D., Horiuchi, T., Keseler, I. M., Kosuge, T., Mori, H., Perna, N. T., Plunkett, G., Rudd, K. E., Serres, M. H., Thomas, G. H., Thomson, N. R., Wishart, D., Wanner, B. L.** (2006). *Escherichia coli* K-12: A cooperatively developed annotation snapshot--2005. *Nucleic Acids Res.* 34(1): 1-9.
- Risso, C., Sun, J., Zhuang, K., Mahadevan, R., DeBoy, R., Ismail, W., Shrivastava, S., Huot, H., Kothari, S., Daugherty, S., Bui, O., Schilling, C. H., Lovley, D. R., Methe, B. A.** (2009). Genome-scale comparison and constraint-based metabolic reconstruction of the facultative anaerobic Fe(III)-reducer *Rhodoferrax ferrireducens*. *BMC Genomics* 10: 447, doi: 10.1186/1471-2164-10-447.
- Schink, B., & Friedrich, M.** (2000). Phosphite oxidation by sulphate reduction. *Nature* 406(6791): 37.
- Schuhle, K., Jahn, M., Ghisla, S., Fuchs, G.** (2001). Two similar gene clusters coding for enzymes of a new type of aerobic 2-aminobenzoate (anthranilate) metabolism in the bacterium *Azoarcus evansii*. *J. Bacteriol.* 183(18): 5268-5278.

- Sierra-García, I. N., Correa Álvarez, J., de Vasconcellos, S. P., Pereira de Souza, A., dos Santos Neto, E. V., de Oliveira, V. M.** (2014). New hydrocarbon degradation pathways in the microbial metagenome from Brazilian petroleum reservoirs. *PLoS One* 9(2): e90087.
- Song, B., Haggblom, M. M., Zhou, J., Tiedje, J. M., Palleroni, N. J.** (1999). Taxonomic characterization of denitrifying bacteria that degrade aromatic compounds and description of *Azoarcus toluovorans* sp. nov. and *Azoarcus toluoclasticus* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49 (Pt 3): 1129-1140.
- Spormann, A. M., Widdel, F.** (2000). Metabolism of alkylbenzenes, alkanes, and other hydrocarbons in anaerobic bacteria. *Biodegradation* 11(2-3): 85-105.
- Springer, N., Ludwig, W., Philipp, B., Schink, B.** (1998). *Azoarcus anaerobius* sp. nov., a resorcinol-degrading, strictly anaerobic, denitrifying bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48 (Pt 3): 953-956.
- Sun, J., Sayyar, B., Butler, J. E., Pharkya, P., Fahland, T. R., Famili, I., Schilling, C. H., Lovley, D. R., Mahadevan, R.** (2009). Genome-scale constraint-based modeling of *Geobacter metallireducens*. *BMC Syst. Biol.* 3: 15.
- Teufel, R., Friedrich, T., Fuchs, G.** (2012). An oxygenase that forms and deoxygenates toxic epoxide. *Nature* 483(7389): 359-362.
- Thiele, I., Palsson, B. O.** (2010). A protocol for generating a high-quality genome-scale metabolic reconstruction. *Nat. Protoc.* 5(1): 93-121.
- Valderrama, J. A., Durante-Rodríguez, G., Blázquez, B., García, J. L., Carmona, M., Díaz, E.** (2012). Bacterial degradation of benzoate: Cross-regulation between aerobic and anaerobic pathways. *J. Biol. Chem.* 287(13): 10494-10508.
- Valderrama, J. A., Shingler, V., Carmona, M., Díaz, E.** (2014). AccR is a master regulator involved in carbon catabolite repression of the anaerobic catabolism of aromatic compounds in *Azoarcus* sp. CIB. *J. Biol. Chem.* 289(4): 1892-1904.
- Wischgoll, S., Taubert, M., Peters, F., Jehmlich, N., von Bergen, M., Boll, M.** (2009). Decarboxylating and nondecarboxylating glutaryl-coenzyme A dehydrogenases in the aromatic metabolism of obligately anaerobic bacteria. *J. Bacteriol.* 191(13): 4401-4409.
- Wöhlbrand, L., Kallerhoff, B., Lange, D., Hufnagel, P., Thiermann, J., Reinhardt, R., Rabus, R.** (2007). Functional proteomic view of metabolic regulation in "Aromatoleum aromaticum" strain EbN1. *Proteomics* 7(13): 2222-2239.
- Zaar, A., Eisenreich, W., Bacher, A., Fuchs, G.** (2001). A novel pathway of aerobic benzoate catabolism in the bacteria *Azoarcus evansii* and *Bacillus stearothermophilus*. *J. Biol. Chem.* 276(27): 24997-25004.

Zaar, A., Gescher, J., Eisenreich, W., Bacher, A., Fuchs, G. (2004). New enzymes involved in aerobic benzoate metabolism in *Azoarcus evansii*. *Mol. Microbiol.* 54(1): 223-238.

Zhou, J., Fries, M. R., Chee-Sanford, J. C., Tiedje, J. M. (1995). Phylogenetic analyses of a new group of denitrifiers capable of anaerobic growth of toluene and description of *Azoarcus tolulyticus* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45(3): 500-506.

Ziegler, K., Braun, K., Biickler, A., Fuchs, G. (1987). Studies on the anaerobic degradation of benzoic acid and 2-aminobenzoic acid by a denitrifying *Pseudomonas* strain. *Arch. Microbiol.* 149: 62-69.