



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE AZORREDUCTASAS MEDIANTE TÉCNICAS MOLECULARES Y BIOQUÍMICAS EN UNA COMUNIDAD MICROBIANA CAPAZ DE DEGRADAR AZOCOLORANTES

Enrique Aarón López Muñoz⁽¹⁾, David Eduardo Ávila Nieto⁽¹⁾, Nora Ruíz Ordaz⁽²⁾, Juvencio Galíndez Mayer⁽²⁾. Laboratorio de Bioingeniería, Departamento de Ingeniería Bioquímica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Prolongación de Carpio y Plan de Ayala, Col. Casco de Santo Tomás, México D.F., C.P. 11340. Correo electrónico: mcnabb587@hotmail.com

(1) Becario CONACyT; PIFI, I.P.N. (2) Becario SNI, CONACyT; COFAA, I.P.N.; EDI, I.P.N.

Palabras clave: Azorreductasa, azocolorante, comunidad microbiana.

Introducción. Algunos de los contaminantes presentes en los efluentes son los colorantes, utilizados principalmente por la industria textil, de alimentos, cosmética y farmacéutica. Entre ellos se encuentran los azocolorantes, que son sustancias que poseen uno o más enlaces azo (-N=N-) en su estructura, y generalmente sustituyentes aromáticos. El grado de fijación de los colorantes nunca es completo, resultando en la contaminación de los efluentes. La remoción de colorantes de estos efluentes es deseable, no sólo por razones estéticas, sino debido a que muchos azocolorantes y los productos del rompimiento del colorante son tóxicos para la vida acuática y mutagénicos para los humanos. La ruptura del enlace azo es llevado a cabo por azorreductasas, las cuales catalizan el rompimiento del enlace azo mediante reducción y es la enzima clave expresada en las bacterias degradadoras de azocolorantes.

Metodología. La determinación de la presencia de algunas azorreductasas en una comunidad bacteriana, previamente aislada, que es capaz de degradar los azocolorantes Naranja ácido 7 y Rojo ácido 88, se realizó mediante PCR utilizando los iniciadores de genes que codifican a las azorreductasas descritas por Blümel (1), Chen (2), Macwana (3) y Suzuki (4). Por otro lado se llevó a cabo el ensayo enzimático utilizando extractos crudos libres de células de dicha comunidad, NADH 0.1 mM como cofactor y la solución de azocolorantes en una concentración de 20 µM en regulador de fosfatos pH 7.0, en un volumen final de reacción de 3 mL, midiendo la decoloración a la máxima longitud de onda de absorción para cada azocolorante.

Resultados. Después de extraer y purificar el DNA de la comunidad inmovilizada en un reactor horizontal de lecho fijo se realizó la PCR con cada uno de los pares de iniciadores seleccionados y los resultados mostraron que la amplificación fue positiva cuando se utilizaron los iniciadores de genes de azorreductasas de cepas de: *Enterococcus faecium*, de *Bacillus* sp. y de *Xenophillus azovorans* (Figura 1). En lo referente a la actividad en forma comparativa se muestran en la Tabla 1 los

resultados de actividad específica cuando se utilizan diferentes azocolorantes como sustratos.

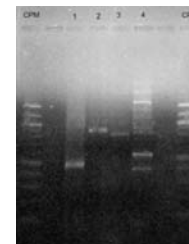


Figura 1. Amplificados positivos: (1) Fragmento 16S rDNA (U968 y L1401); (2) iniciadores de *Bacillus* sp.; (3) iniciadores de *Xenophilus azovorans*; (4) iniciadores de *Enterococcus faecium*; (CPM) Control de peso molecular.

Tabla 1. Actividad específica global de las azorreductasas presentes en la comunidad cuando se utilizan diferentes sustratos.

Azocolorante	Actividad específica $\left(\frac{\mu\text{M azocolorante}}{\text{mg proteína} \cdot \text{min}}\right)$
Naranja ácido 7	0.99
Rojo ácido 88	0.97
Rojo de metilo	0.0478
Rojo ácido 18	2.31
Rojo Congo	0.049

Conclusiones. Se detectó la presencia de al menos 3 azorreductasas en la comunidad, que son capaces de llevar a cabo la reducción de los azocolorantes Naranja ácido 7, Rojo ácido 88 y Rojo ácido 18, y en menor medida el Rojo de metilo y Rojo Congo.

Bibliografía. (1) Blümel, S., Knackmuss, H. J., Stolz, A. (2002) *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (8): 3948-3955. (2) Chen, H., Hopper, S., Cerniglia, C. (2005) *Microbiology*, 151, 1433-1441. (3) Macwana, S., Punj, S., Cooper, J., Schwenk, E., John, G. (2010). *Curr. Issues Mol. Biol.* 12: 43-48. (4) Suzuki, Y., Yoda, T., Ruhul, A., Sugiura, W. (2001). *The Journal of Biological Chemistry*, 276 (12), 9059-9065.