Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar, Ciudad de México, México.
ISSN 2707-2207 / ISSN 2707-2215 (en línea), enero-febrero 2024,
Volumen 8, Número 1.

https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v8i1

ANÁLISIS Y CLONACIÓN DEL GEN CATE DE BACILLUS LICHENIFORMIS M2-7

ANALYSIS AND CLONING OF THE CATE GENE OF BACILLUS LICHENIFORMIS M2-7

Rigoberto Mozo Mejía
Comisión para la Protección Contra Riesgos Sanitarios, México

Augusto Rojas Aparicio
Universidad Autónoma de Guerrero, México

Miguel Ángel Rodríguez Barrera
Universidad Autónoma de Guerrero, México

Carlos Ortuño Pineda
Universidad Autónoma de Guerrero, México

Yanet Romero Ramírez
Universidad Autónoma de Guerrero, México

DOI: https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v8i1.9964

Análisis y Clonación del Gen catE de Bacillus Licheniformis M2-7

Rigoberto Mozo Mejía[1]
rigomosso@gmail.com
https://orcid.org/0009-0002-7620-4432
Comisión para la Protección Contra Riesgos Sanitarios del Estado de Guerrero
México

Augusto Rojas Aparicio
rojas9101@gmail.com
https://orcid.org/0009-0007-3397-8397
Universidad Autónoma de Guerrero
México

Miguel Ángel Rodríguez Barrera
rmiguel@gmail.com
https://orcid.org/0000-0002-1621-8739
Universidad Autónoma de Guerrero
México

Carlos Ortuño Pineda
ortunoc@outlook.com
https://orcid.org/0000-0002-9980-7212
Universidad Autónoma de Guerrero
México

Yanet Romero Ramírez
yanetromero7@gmail.com
https://orcid.org/0000-0002-8383-4128
Universidad Autónoma de Guerrero
México

RESUMEN

En *Bacillus licheniformis* M2-7 el gen *catE* codifica para la posible proteína catecol 2, 3-dioxigenasa, relacionada con la biodegradación de hidrocarburos, confiriéndole mecanismos de resistencia contra estos compuestos. En los últimos años, el desarrollo de organismos genéticamente modificados (OGM) y la biorremediación utilizan esta nueva tecnología potenciando las características metabólicas y logrando una degradación de agentes contaminantes más eficiente. Para establecer estrategias de biorremediación, se debe conocer los procesos metabólicos implicados y los genes que codifican las proteínas relacionadas. Este trabajo se centra en analizar y clonar el gen *catE* de *B. licheniformis* M2-7 en un plásmido para confirmar su función en la utilización de hidrocarburos. Para ello se extrajo el ADN cromosomal, se amplificó un fragmento del gen *catE* mediante PCR y se clonó en el vector pJET1.2/blunt, la transformación se realizó *E. coli* DH5. La construcción del plásmido recombinante se confirmó mediante PCR y digestión con EcoRV. Mediante esta metodología se logró diseñar el plásmido pCAT derivado del vector pJET1.2/blunt, llevando un fragmento del gen *catE* de *B. licheniformis* M2-7, plásmido que se encuentra en la cepa RMJ de *E. coli*, lo que permitirá utilizarla como herramienta molecular para generar una mutante en dicho gen en *B. licheniformis*.

Palabras clave: gen catE, bacullis licheniformis, clonación

[1] Autor principal
Correspondencia: yanetromero7@gmail.com

Analysis and Cloning of the catE Gene of Bacillus Licheniformis M2-7

ABSTRACT

In *Bacillus licheniformis* M2-7 the *catE* gene codes for the possible protein catechol 2, 3-dioxygenase, related to the biodegradation of hydrocarbons, conferring resistance mechanisms against these compounds. In recent years, the development of genetically modified organisms (GMOs) and bioremediation use this new technology, enhancing metabolic characteristics and achieving more efficient degradation of contaminating agents. To establish bioremediation strategies, one must know the metabolic processes involved and the genes that encode related proteins. This work focuses on analyzing and cloning the *catE* gene from *B. licheniformis* M2-7 in a plasmid to confirm its function in hydrocarbon utilization. To do this, the chromosomal DNA was extracted, a fragment of the *catE* gene was amplified by PCR and cloned into the pJET1.2/blunt vector, the transformation was carried out in *E. coli* DH5. The construction of the recombinant plasmid is confirmed by PCR and digestion with EcoRV. Using this methodology, it was possible to design the pCAT plasmid derived from the pJET1.2/blunt vector, carrying a fragment of the *catE* gene from *B. licheniformis* M2-7, a plasmid stored in the RMJ strain of *E. coli*, which will allow it to be used as molecular tool to generate a mutant in said gene in *B. licheniformis*.

***Keywords*:** catE gene, bacullis licheniformis, cloning

Artículo recibido 27 diciembre 2023
Aceptado para publicación: 30 enero 2024

INTRODUCCIÓN

Todos los organismos vivos estamos expuestos en la vida diaria a concentraciones mínimas de gasolina, aceite quemado, diésel, así como hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP´s). Estos se pueden encontrar de manera libre en el ambiente, en el área laboral y en los alimentos, además se generan cuando hay combustión de la materia orgánica o bosques (Alfarhani et al., 2018). En conjunto, todas estas actividades han propiciado la distribución y acumulo de estos compuestos tóxicos en los diferentes nichos, representando un grave peligro para la población y los ecosistemas por su alto nivel de toxicidad (Habe y Omori, 2003). La Agencia de Protección Ambiental (EPA, por sus siglas en inglés) ha considerado 16 Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP´s) de alto y bajo peso molecular, de los cuales el benzo[a]pireno, antraceno, naftaleno y fenantreno, son los más representativos y potencialmente dañinos para el humano y el ambiente (Mohandass et al., 2012; IARC y ONU, 2012). La cepa de *B. licheniformis* M2-7 es una bacteria resistente al calor, aislada a partir de aguas termales del Estado de Guerrero, México (Guevara-Luna et al., 2021). En la actualidad se han reportado diversas bacterias como *Microbacterium sp*, *Stenotrophomonas sp*, *Pseudomonas sp*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus viretibased* y *Bacillus licheniformis* M2-7 que pueden degradar el BaP de 50-85% en un periodo de 24 a 48 h (Hunter et al., 2005; Lily et al., 2009; Tiwari et al., 2016; Qin et al., 2017; Eskandari et al., 2017; Guevara-Luna et al., 2018), sin embargo, son muy pocos los estudios que revelan los genes que participan en dichos procesos, algunos de ellos son los genes *nah, pah, arh* y *phn* en bacterias Gram-negativas y los *nid, nir, phd* y *nar* en bacterias Gram-positivas (Song et al., 2015). Está reportado que *B. licheniformis* M2-7 tiene capacidad de usar como fuente de carbono diferentes hidrocarburos como aceite quemado, gasolina y diésel (Guevara-Luna et al., 2018), así como Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP´s) de bajo o alto peso molecular como naftaleno, fenantreno, pireno y benzo[a]pireno (Guevara-Luna et al., 2021). Se identificó que los genes *catE*, *pobA* y *fabHB* que podrían estar involucrados en la biotransformación de BaP en *Bacillus licheniformis* M2-7 (Rojas-Aparicio et al., 2018). El gen *catE* codifica para la enzima catecol 2,3-dioxigenasa (EC 1.13.11.2, 2,3-CTDs, catecol: oxígeno 2,3-oxidorreductasa [desciclación], cataliza la incorporación de dioxígeno en catecol y la escisión del anillo extradiol para formar semialdehído 2-hidroxuconato, posee un papel clave en la degradación bacteriana de moléculas aromáticas

presentes en el ambiente (Ishida et al., 2002). Debido a los antecedentes antes mencionados, se propuso como objetivo analizar y clonar el gen *catE* que codifica para la posible enzima Catecol 2,3-Dioxigenasa de *B. licheniformis* M2-7, para realizar una herramienta molecular que nos permita realizar inactivación en el gen y comprender a fondo el comportamiento de la cepa estudiada y determinar la función de *catE* en la degradación de hidrocarburos y benzoapireno.

METODOLOGÍA

Material biológico

La cepa seleccionada de *Bacillus Licheniformis* M2-7 fue proporcionada por el Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología Ambiental de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Guerrero (UAGro). Las células competentes *E. coli* XL1-Blue fueron proporcionadas por el Laboratorio de Biocatálisis e Ingeniería Celular del Instituto de Biotecnología-UNAM, campus Morelos.

Obtención de la secuencia del gen catE

La secuencia del gen *catE* se obtuvo por métodos bioinformáticos analizando el genoma de *B. licheniformis* ATCC en la plataforma NCBI utilizando BLASTn, a partir de la secuencia obtenida se diseñaron los oligonucleótidos para la amplificación del gen por medio del programa Primer3web versión 3.0.0 (http://biotools.umassmed.edu/primer3/primer3web_input.htm). Los oligonucleótidos seleccionados fueron: FC2-3d (5´GCTCGGATATGTCAAGC´3) y RC2-3d (5´GGTCTTTAACAAACCATGC´3), originando un amplicon de 797 pb. Posteriormente de la secuencia proteica hipotética obtenida se realizaron alineamientos en UniProt (https://www.uniprot.org/) contra *B. licheniformis* DMS 13 = ATCC 14580 y *B. subtilis* cepa 168.

Extracción de DNA cromosomal

Se utilizó 10 ml de un cultivo de *B. licheniformis* M2-7 en medio LB a 37 °C/24 h, se centrifugó a 800 rpm/10 min para obtener la pastilla celular y se transfirió a un tubo Eppendorf para realizar la extracción del ADN genómico siguiendo el protocolo de purificación de bacterias Gram positivas recomendado por el fabricante: GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher scientific, 2017 EE.UU., código de catálogo: K0721). El ADN genómico se visualizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% de acuerdo con lo reportado por Sambrook y Green (2012). Como marcador de peso molecular se utilizó

1 Kb plus Ladder. La electroforesis se corrió a 80 V/45-60 min en solución amortiguadora de acetatos al 1X. Posteriormente, el gel se tiñó con bromuro de etidio (0.5 µg/mL) durante 3-5 min; se lavó con agua por 5 min y después se observó en el transiluminador de luz ultravioleta (UV; SYNGENE). La cuantificación de ADN se realizó con el NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometers (Thermo Scientific) (U.S.).

Amplificación de catE

La amplificación se realizó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), preparando una mezcla con un volumen final de 25 µL, conteniendo: 13.5 µL de agua estéril, 2 µL dNTPs (2.5 mM), MgCL2 1.5 µL, 2.5 µL de Buffer 100X, 2 µL del oligonucleótido reverse (10 pmol/µL) (RC2-3d 5´GGTCTTTAACAAACCATGC´3), 2 µL del oligonucleótido forward (10 pmol/µL) (FC2-3d 5´GCTCGGATATGTCAAGC´3), 1 µL de DNA (80 ng) y 0.5 µL de Taq polimerasa (0.5u). Las condiciones usadas fueron: 1 ciclo a 94°C por 2 minutos, 58°C por 1 minutos, 72°C por 1 minutos; 1 ciclo a 72°C por 10 minutos. La reacción de la polimerasa se realizó en un termociclador GeneAmp System (AB applied Biosistems) (U.S) (Serrano-Ángel et al. 2019).

Ligación del producto de PCR al plásmido pJET1.2/blunt

Para la ligación del gen *catE* se utilizó el Kit de Clonación de PCR CloneJET de Thermo Scientific (EE. UU., código de catálogo K1231), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Obteniendo como resultado el plásmido pCAT (Figura 1B). Transformación y selección de transformantes de *Escherichia coli* XL1-Blue. Para la obtención de células competentes de *E. coli* XL1-Blue se realizó el método de cloruro de calcio (CaCl2) descrito por Sambrook y Green (2012). Para la transformación de *E. coli* XL1-Blue se utilizó el método de shock térmico propuesta por Hoffmann et al., (2010). Se tomó 2 µL de la mezcla de ligación (200 ng/µl) y se adicionaron a 100 µL de células competentes, esta mezcla fue incubada en hielo durante 30 min. Posteriormente se dio un shock de calor a 42 °C/2 min y se agregó 1 mL de caldo LB (sin antibiótico) dejando incubar 1 h/37°C/200 rpm. Posteriormente se inocularon 50 µL en cajas Petri con agar LB suplementado con ampicilina (100 µg/mL), se obtuvieron 7 cepas candidatas de *E. coli* transformantes para la purificación del plásmido.

Extracción y confirmación del plásmido pCAT

Para confirmar la construcción del plásmido pCAT se realizó la extracción de ADN plasmídico de las

7 cepas candidatas *E. coli* XL1-Blue transformadas y seleccionadas en caldo LB suplementado con ampicilina (100 µg/mL). La biomasa se cosechó y fue utilizada para la extracción del ADN plasmídico mediante el Kit Miniprep GeneJET (Thermo Scientific, EE. UU., código de catálogo # K0502) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cada ADN plasmídico se utilizó para confirmar la inserción del gen catE en el plásmido a través de la amplificación del gen por medio de PCR utilizando los oligonucleótidos antes descritos. El plásmido que amplificó el gen *catE*, fue utilizado para realizar una digestión con la enzima *Eco*RV. Las reacciones de digestión se resolvieron en una electroforesis en gel de agarosa al 1% a 85 V por tiempo de 1 hora, se añadió al bromuro de etidio por 15 minutos, visualizándose con el transluminador de luz UV (SYNGENE EE, UU) y un equipo BioRad (EE, UU).

RESULTADOS

Análisis *in silico* del marco de lectura de *catE* y construcción del plásmido pCAT

Mediante un análisis *in silico* del genoma de *B. licheniformis* DMS 13 = ATCC 14580 se determinó que el gen *catE* posee un tamaño de 861 pb y codifica para la proteína catecol 2,3-dioxigenasa, así mismo se sugiere que los genes *catD* y *catE* pertenecen al operón bld-BLi00861 (P*rokaryotic Operon DataBase: ProOpDB* (http://operons.ibt.unam.mx/OperonPredictor). El alineamiento de la secuencia de la proteína de *B. licheniformis* DMS 13 = ATCC 14580 con número de acceso Q65MB8, contra la secuencia de la proteína de *B. subtilis* cepa 168 (secuencia revisada) con número de acceso P54721 realizado en UniProt, mostró que posee una actividad de lactoil-glutation liasa y catecol 2,3-dioxigenasa. Para identificar la función proteica *in silico* se realizó la búsqueda de dominios conservados, encontrando principalmente un dominio de la familia de las enzimas quelante de oxígeno vecino (VOC por sus siglas en inglés) que incluye: dioxigenasa, glioxalasa I y dihidroxibifenil di oxigenasa (tabla 1). La estrategia para la construcción del plásmido pCAT utilizado para la futura construcción de una cepa de *B. licheniformis* con una inactivación en el gen *catE* se muestra en la figura 1. El diseño de oligonucleótidos específicos para *catE* de *B. licheniformis* M2-7, la amplificación por PCR del fragmento de 797 pb e inserción del fragmento en el vector de clonación pJET1.2/blunt, plásmido linealizado con la enzima *Eco*RV se muestran en figura 1.

Amplificación y clonación de *catE*

Para seguir el diseño de la figura 1, se realizó la extracción del ADN genómico de *B. licheniformis* M2-

7 y fue utilizado como molde para la amplificación del gen *catE*; en la figura 2 se presenta un gel de agarosa mostrando la integridad del ADN genómico purificado y la banda de aproximadamente 797 pb correspondiente a la amplificación del fragmento del gen *catE*.

Transformación y selección de transformantes de *Escherichia coli* XL1-Blue

A partir de la transformación en *E. coli* XL1-Blue (figura 3A), se obtuvieron 6 cepas candidatas (figura 3B) capaces de crecer en placas LB suplementadas con ampicilina. Se les realizó la extracción del ADN plasmídico, confirmando que solo 2 de las candidatas presentaron plásmido (figura 3C). El plásmido pCAT8 fue linealizado con EcoRV (figura 3C). Se confirmó también la construcción del plásmido pCAT, amplificando por PCR el fragmento de *catE* a partir del plásmido pCAT9 purificado (Dato no mostrado). Finalmente se resguardó la cepa de *E. coli* RMJ que lleva el plásmido pCAT, el cual fue debidamente confirmado.

DISCUSIÓN

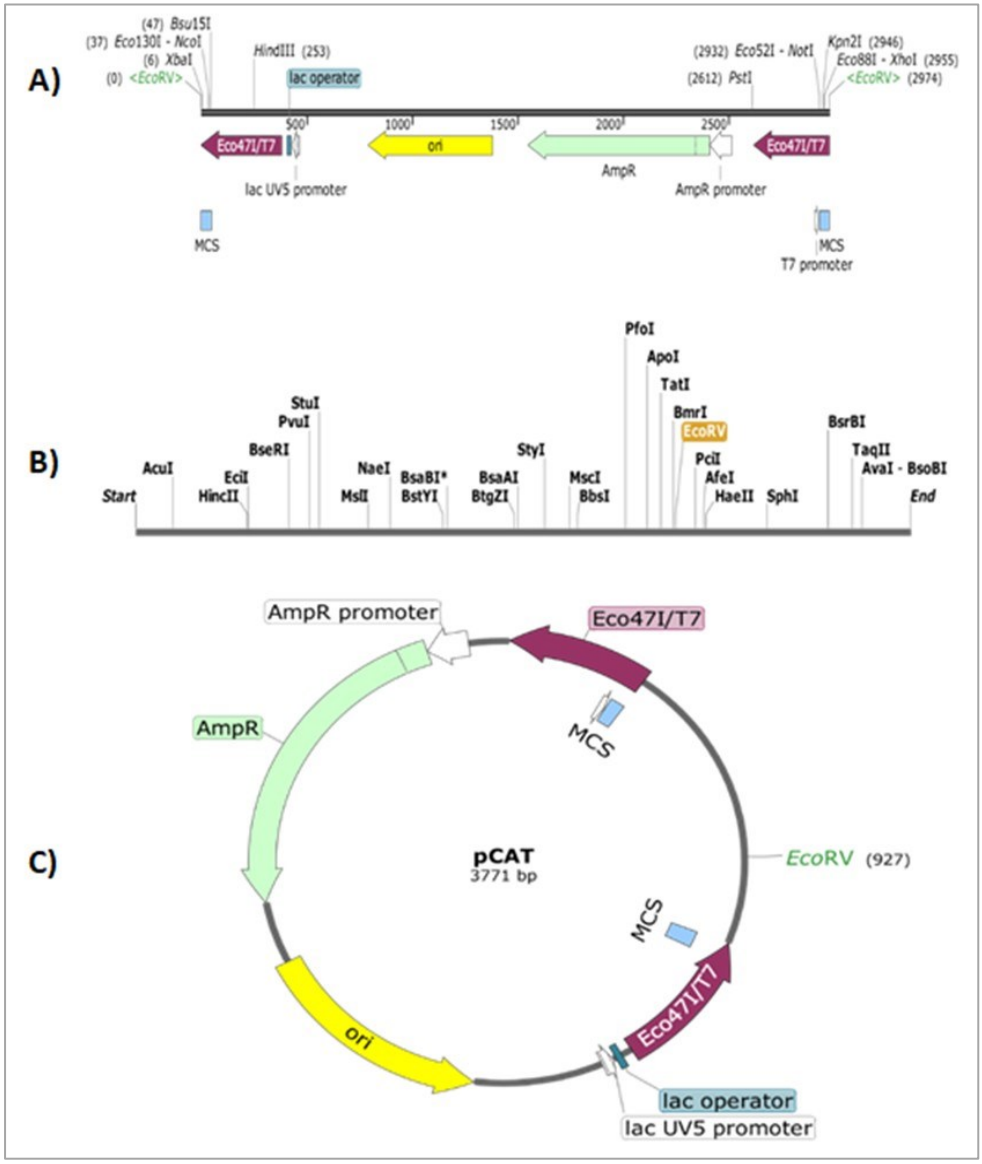
El BaP es un contaminante ambiental altamente recalcitrante con la capacidad de generar efectos dañinos a los organismos (Mohandass et al., 2012). Sin embargo, bacterias como *B. licheniformis* M2-7 poseen la capacidad de degradar o biotransformar dicho compuesto (Guevara-Luna et al., 2018). Estudios previos han señalado la importancia de conocer los genes que participan en la vía de degradación del BaP, sugiriendo que inicia con la participación de dioxigenasas y monoxigenasas (Bhatt et al., 2018). Se ha reportado que la actividad enzimática de la catecol 2,3-dioxigenasa, producto del gen *catE* está relacionada con el catabolismo de hidrocarburos en *B. subtilis*, siendo esta proteína esencial en el crecimiento y la viabilidad de esta bacteria en presencia de catecol (Tam et al., 2006). En *B. licheniformis* M2-7, se propuso una vía de transformación de BaP, de acuerdo con los resultados reportados recientemente por nuestro grupo (Guevara-Luna et al., 2018) y junto con la identificación y el análisis de expresión de los genes *catE, pobA* y *fabHB* (Rojas-Aparicio et al., 2018). Las reacciones comenzarían con la incorporación de oxígeno molecular en los carbonos 9 y 10 del BaP a través de la enzima catecol 2, 3-dioxigenasa, generando el benzo[a]pireno cis-9,10-dihidrodiol (Guevara-Luna et al., 2018), este último metabolito sufre otra dioxigenación a través de la catecol 2,3-dioxigenasa produciendo el ácido cis-4-(hidroxipireno-8-il)-2-oxobut-3-enoico vía meta (Schneider et al., 1996). A esto le sigue la formación de ácido 7,8-pireno-dihidro-7-carboxílico

(Schneider et al., 1996), a través de la ruta de degradación de los HAPs de alto peso molecular descrita previamente (Mahaffey et al., 1988), que implica a varias enzimas y metabolitos intermediarios. Habría una segunda etapa, donde participarían las enzimas 4-hidroxibenzoato 3-monooxigenasa y la cetoacil-ACP sintasa III, productos de los genes *pobA* y *fabHB*, respectivamente (Rojas-Aparicio et al., 2018) en la formación de protocatecuato bajo la vía del β-cetoadipato para finalmente generar ácido ftálico, hasta que los intermediarios que pueden entrar en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Sim et al., 2013). Dado a este antecedente, el estudio fue diseñado para llevarse a cabo la construcción del plásmido pCAT, llevando gen *catE* de *B. licheniformis* M2-7, por lo cual se amplificó el gen *catE* de una longitud de 797 pb (figura 2) y utilizarla posteriormente para determinar el papel que juega el gen *catE*, que codifica para catecol 2,3-dioxigenasa, una de las primeras enzimas involucradas en la vía degradación del BaP de *B. licheniformis* M2-7. Los resultados del análisis bioinformático muestran que el producto del gen *catE* pertenece a la superfamilia de proteínas quelantes de oxígeno vecina, compartiendo similitudes con las glioxalasas y las estradiol dioxigenasa que incluye a las catecol 2,3-dioxigenasa, proteínas involucradas en la escisión del anillo extradiol de compuestos aromáticos monocíclicos (Tam et al., 2006; Töwe et al., 2007). Adicionalmente, se determinó que este gen pertenece al operón que recibe el nombre de *catE*, y que al igual que en *B. subtilis*, podría encontrarse bajo regulación negativa (Pi and Helmann, 2018). El presente estudio describe la realización de un vector que permitirá el bloqueo de un gen en la cepa silvestre *B. licheniformis* M2-7 (figura 1), por medio de la clonación de un fragmento del gen de interés (*catE*) en el vector pJET1.2/blunt, linealizado con la enzima *EcoR*V. Dentro de sus principales características posee el gen de la β-lactamasa que confiere la resistencia a la ampicilina, siendo utilizado para la selección y mantenimiento de células de *E. coli* recombinantes y un gen letal eco471R que se activa en caso del que el vector se circularice permitiendo la selección positiva de cepas que poseen el plásmido recombinante (Hoseini and Sauer, 2015). El plásmido con el fragmento del gen *catE* (pCAT) fue clonado exitosamente en *E. coli*.

Tabla 1. Dominios conservados de la proteína catecol 2,3-dioxigenasa

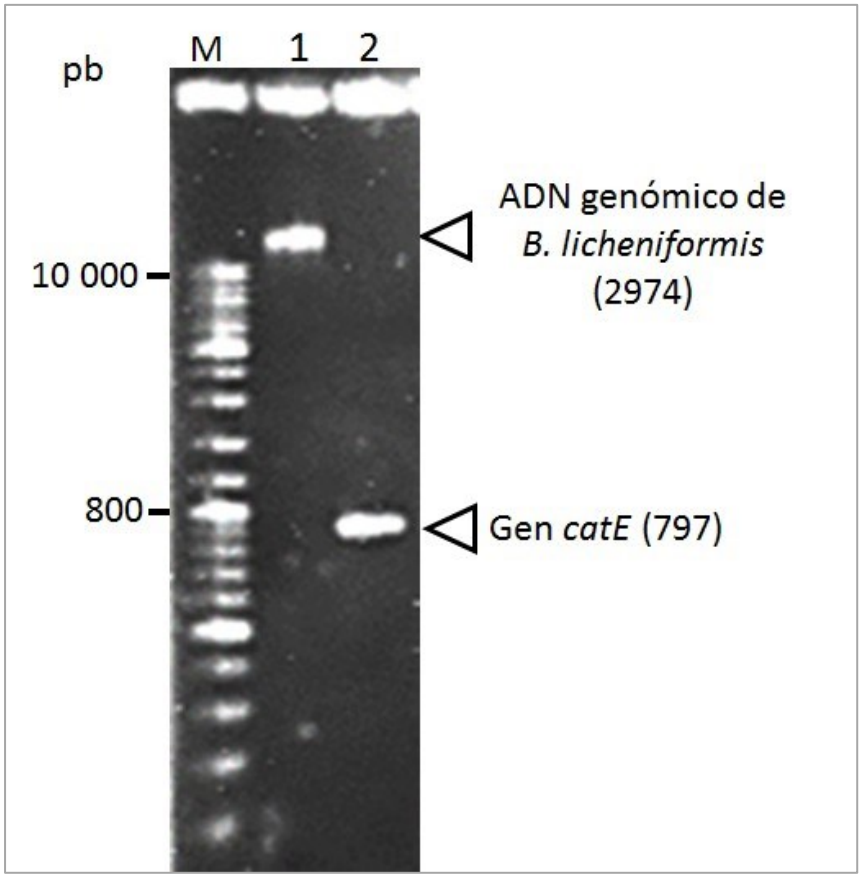
Gen	Proteína	Fuente	Inicio	Fin	Dominios	ID de acceso
catE	Catecol 2,3-dioxigenasa	PROSITE patterns	173	194	Sitio conservado Glioxilasa	PS00934
		Superfamily Gene 3D	3	284	Resistencia a Bleomicina/Dihidroxibifenil dioxigenasa	SSF54593 G3DSA:3.10.18 0.10 SSF54593
		Pfam	11 170	124 266	Resistencia/fosfomicina	PF00903

Figura 1. Diseño del plásmido pCAT



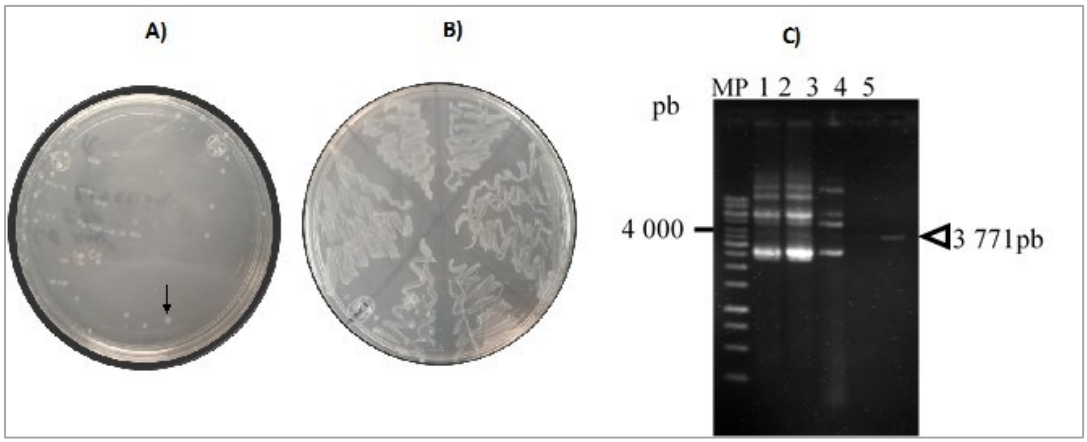
A) Estructura linearizada del plasmido pJET1.2/blunt donde se muestran todos sus elementos de secuencia importantes.
B) Mapa de restricción del gen *catE.*
C) Diseño de la inserción del gen *catE* en el plasmido pJET1.2/blunt para generar el plasmido pCAT.

Figura 2. Monitoreo del ADN genómico extraido y amplificación del gen *catE*



Se muestra ADN genómico extraido y 100 ng del gen *catE* amplificado por PCR. La electroforesis se realizo en gel de agarosa al 1% y se tiñó con bromuro de etidio por 15 minutos.

Figura 3. transformación de *E. coli* XL1-*Blue* y confirmación del plasmido pCAT.



A) crecimiento de las cepas transformadas con el plásmido pCAT. La flecha indica el tipo de colonias seleccionadas,
B) selección de 6 cepas candidatas.
C) **Confirmación del plásmido pCAT y su linealización con** *EcoR*V. Gel de agarosa (1%) sometido en un campo de 95 V. Carril MP: marcador de peso molecular de 1 kb; carril 1: ADN plasmídico pCAT8; carril 2: ADN plasmídico pCAT9; carril 3: control positivo ADN plasmídico pUC18; carril 4: carril vacío; carril 5: linealización del plásmido pCAT8 con la enzima *EcoR*V obteniendo una banda de aproximadamente 3,771 pb.

CONCLUSIONES

En esta investigación se logró la construcción y confirmación del plásmido pCAT, llevando el

fragmento del gen *catE* de *Bacillus licheniformis* M2-7, siguiendo una estrategia convencional que involucra la práctica de herramientas moleculares desde la amplificación genetica por PCR, la clonación del gen en el vector pJET1.2/blunt, la transformación y selección de cepas de *E. coli* recombinantes y la confirmación del plásmido mediante reacción de digestión. El plásmido pCAT podrá ser utilizado para la generación de una cepa de *B. licheniformis* bloqueada en el gen *catE* y demostrar su participación y función en la degradación de hidrocarburos, esta información es de gran relevacia para el diseño de nuevos microorganismos o estrategias de biorremediación buscando un mayor beneficio a la salud de la flora, fauna y sobre todo a la salud humana.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la M. BC. Giselle Yamileth Morales Blancas y M. BC. Daniel Reyna por la dirección técnica del proyecto desarrollado, al Dr. Arturo Ramírez Peralta y Dr. Gerardo Huerta Beristain por la asesoría en la redacción y a la UAGro por el financiamiento Proyectos de Investigación Semilla 2018.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Alfarhani, B., Al-Tameemi, M., Goicoechea, H.C., Barbosa, F. and Campiglia, A.D. (2018). Direct analysis of benzo[a]pyrene metabolites with strong overlapping in both the spectral and lifetime domains. *Microchemical Journal*, 137, 51–61. https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.09.022

Bhatt, K.K., Lily, M.K., Joshi, G. and Dangwal, K. (2018). Benzo(a)pyrene degradation pathway in *Bacillus subtilis* BMT4i (MTCC 9447). *Turkish Journal of Biochemistry*, 43, 693–701. https://doi.org/10.1515/tjb-2017-0334

Eskandari, S., Hoodaji, M., Tahmourespour, A., Abdollahi, A., Baghi, T.M., Eslamian, S. and Ostad-Ali-Askari, K. (2017). Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by *Bacillus licheniformis* ATHE9 and *Bacillus mojavensis* ATHE13 as Newly Strains Isolated from Oil-Contaminated Soil. *Journal of Geography, Environment and Earth Science International,* 11, 1–11. https://doi.org/10.9734/JGEESI/2017/35447

Habe, H. and Omori, T. (2003). Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 67, 225–243. https://doi.org/10.1271/bbb.67.225

Hunter, R.D., Ekunwe, S.I.N., Dodor, D.E., Hwang, H.-M. and Ekunwe, L. (2005). *Bacillus subtilis* is a Potential Degrader of Pyrene and Benzo[a]pyrene. *Int J Environ Res Public Health,* 2, 267–271. https://doi.org/10.3390/ijerph2005020010

Guevara-Luna, J., Alvarez-Fitz, P., Ríos-Leal, E., Acevedo-Quiroz, M., Encarnación-Guevara, S., Moreno-Godinez, M.E., Castellanos-Escamilla, M., Toribio-Jiménez, J. and Romero-Ramírez, Y. (2018). Biotransformation of benzo[a]pyrene by the thermophilic bacterium *Bacillus licheniformis* M2-7. *World J Microbiol Biotechnol*, 34, 88. https://doi.org/10.1007/s11274-018-2469-9

Hoffmann, K., Wollherr, A., Larsen, M., Rachinger, M., Liesegang, H., Ehrenreich, A. and Meinhardt, F. (2010). Facilitation of Direct Conditional Knockout of Essential Genes in *Bacillus licheniformis* DSM13 by Comparative Genetic Analysis and Manipulation of Genetic Competence. *Applied and Environmental Microbiology,* 76, 5046–5057. https://doi.org/10.1128/AEM.00660-10

Hoseini, S.S. and Sauer, M.G. (2015). Molecular cloning using polymerase chain reaction, an educational guide for cellular engineering. *J Biol Eng*, 9. https://doi.org/10.1186/1754-1611-9-2

International Agency for Research on Cancer, Weltgesundheitsorganisation (Eds.), 2012. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, volume 100 F, chemical agents and related occupations: this publication represents the views and expert opinions of an IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, which met in Lyon, 20 - 27 October 2009. IARC, Lyon.

Ishida, T., Kita, A., Miki, K., Nozaki, M. and Horiike, K. (2002). Structure and reaction mechanism of catechol 2,3-dioxygenase (metapyrocatechase). Int. Congr. Ser., Oxygen and life: Oxygenases, oxidase and lipid mediators 1233, 213–220. https://doi.org/10.1016/S0531-5131(02)00149-8

Lily, M.K., Bahuguna, A., Dangwal, K. and Garg, V. (2009). Degradation of Benzo [a] Pyrene by a novel strain *Bacillus subtilis* BMT4i (MTCC 9447). *Brazilian Journal of Microbiology,* 40, 884–892. https://doi.org/10.1590/S1517-83822009000400020

Mahaffey, W.R., Gibson, D.T. and Cerniglia, C.E. (1988). Bacterial oxidation of chemical carcinogens: formation of polycyclic aromatic acids from benz[a]anthracene. *Appl Environ Microbiol,* 54, 2415–2423. https://doi.org/10.1128/aem.54.10.2415-2423.1988

Mohandass, R., Rout, P., Jiwal, S. and Sasikala, C. (2012). Biodegradation of benzo[a]pyrene by the mixed culture of *Bacillus cereus* and Bacillus vireti isolated from the petrochemical industry. *J Environ Biol*, 33, 985–989.

Schneider, J., Grosser, R., Jayasimhulu, K., Xue, W. and Warshawsky, D. (1996). Degradation of pyrene, benz[a]anthracene, and benzo[a]pyrene by *Mycobacterium sp*. strain RJGII-135, isolated from a former coal gasification site. *Appl Environ Microbiol*, 62, 13–19. https://doi.org/10.1128/aem.62.1.13-19.1996

Sim, H.W., Jung, M. and Cho, Y.K. (2013). Purification and characterization of protocatechuate 3,4-dioxygenase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707. *J Korean Soc Appl Biol Chem*, 56, 401–408. https://doi.org/10.1007/s13765-013-3080-2

Tam, L.T., Eymann, C., Albrecht, D., Sietmann, R., Schauer, F., Hecker, M. and Antelmann, H. (2006). Differential gene expression in response to phenol and catechol reveals different metabolic activities for the degradation of aromatic compounds in *Bacillus subtilis*. *Environ. Microbiol,* 8, 1408–1427. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01034.x

Tiwari, B., Manickam, N., Kumari, S. and Tiwari, A. (2016). Biodegradation and dissolution of polyaromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas sp. Bioresource Technology*, 216, 1102–1105. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.047}

Pi, H. and Helmann, J.D. (2018). Genome-Wide Characterization of the Fur Regulatory Network Reveals a Link between Catechol Degradation and Bacillibactin Metabolism in *Bacillus subtilis*. *mBio*, 9. https://doi.org/10.1128/mBio.01451-18

Qin, W., Zhu, Y., Fan, F., Wang, Y., Liu, X., Ding, A. and Dou, J. (2017). Biodegradation of benzo(a)pyrene by *Microbacterium sp*. strain under denitrification: Degradation pathway and effects of limiting electron acceptors or carbon source. *Biochemical Engineering Journal*, 121, 131–138. https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.02.001

Rojas-Aparicio, A., Rojas-Aparicio, A., Hernández-Eligio, J.A., Hernández-Eligio, J.A., Toribio-Jiménez, J., Toribio-Jiménez, J., Rodríguez-Barrera, M.Á., Rodríguez-Barrera, M.Á., Castellanos-Escamilla, M., Castellanos-Escamilla, M. and Romero-Ramírez, Y. (2018). Research Article Genetic expression of pobA and fabHB in *Bacillus licheniformis* M2-7 in the presence of benzo[a]pyrene. *Genet. Mol. Res,* 17. https://doi.org/10.4238/gmr16039916

Sambrook, J. and Green, M.R. (2012). Molecular cloning: a laboratory manual, 4th ed. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Serrano-Ángel, L.I., Segura, D., Jiménez, J.T., Barrera, M.A.R., Pineda, C.O. and Ramirez, Y.R. (2020). Carbon Storage Regulator A (*csrA*) Gene Regulates Motility and Growth of *Bacillus licheniformis* in the Presence of Hydrocarbons. *Microbiol. Biotechnol. Lett,* 48, 185–192. https://doi.org/10.4014/mbl.1909.09014

Song, M., Luo, C., Jiang, L., Zhang, D., Wang, Y. and Zhang, G. (2015). Identification of Benzo[a]pyrene-Metabolizing Bacteria in Forest Soils by Using DNA-Based Stable-Isotope Probing. *Appl. Environ. Microbiol,* 81, 7368–7376. https://doi.org/10.1128/AEM.01983-15