



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SECCIÓN DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA**



Diversidad microbiana y de oxigenasas de hidrocarburos en las rizosferas de plantas pioneras que crecen en suelos contaminados con petróleo

Tesis

Para obtener el grado de Maestría en Ciencias

Presenta

M.I. Diana Katherine Ortega González

Directores

Dra. Janet Jan Roblero
Dr. César Hugo Hernández Rodríguez

México, DF

Junio, 2010.

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología General, del departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la Dra. Janet Jan Roblero y el Dr. César Hugo Hernández Rodríguez.

Este trabajo fue financiado por la Secretaría de Investigación y Posgrado del IPN, como parte de los proyectos:

SIP20090942: Diversidad microbiana de oxigenasas de hidrocarburos en las rizosferas de plantas que crecen en suelos contaminados con hidrocarburos.

SIP20100237: Identificación y filogenia molecular de bacterias asociadas a las rizosferas de plantas que crecen en suelos contaminados con petróleo.

Además, recibió financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través del proyecto SEP-CONACYT 2007 Clave 81375: Diversidad microbiana de oxigenasas de hidrocarburos en la rizosferas de plantas pioneras que crecen en suelos contaminados con hidrocarburos.

La sustentante fue becaria CONACYT y becaria PIFI en el periodo de Agosto 2008 a Junio de 2010.

Dedicado A:

Mi familia y mi país....

Agradecimientos

A Dios por indicarme el camino y nunca dejarme sola.

A mis padres Yolanda y José y a mi hermana Adriana, por darme todo su amor y por nunca dejar de creer en mí.

Al Dr. César H. Hernández por darme la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación, y a la Dra. Janet Jan por su apoyo incondicional y su amistad.

Al Dr. Jorge Mendoza y al Dr. Hugo César Ramírez Saad por su apoyo en el desarrollo experimental y a todos mis sinodales por sus aportes y asesorías.

A mis comadres Yendi Navarro, Liliana Dondiego y Aurea Morales por su sincera amistad y por brindarme tantos gratos momentos en instantes difíciles.

A Greta Reynoso y Aura Olicón por su amistad, cariño y ayuda en el trabajo experimental.

A todos mis compañeros y amigos de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas y especialmente del Laboratorio de Microbiología General por sus palabras, enseñanzas, paciencia, apoyo y sonrisas...especialmente a Jesús, Marijo, Eric, Víctor, Arturito, Carlitos, Margarita, Lucerito, Bere, Mariela, Laurita, Paty, Ale, Faustino...

A mí querida familia y amigos por amarme tanto, por nunca dejarme desfallecer y por estar a mi lado a pesar de la distancia.

A cada una de las personas que han pasado y pasan por mi vida, porque gracias a ellas he aprendido a vivir...

A México lindo y querido por abrirme las puertas...

*Por enseñarme a no rendirme
Por enseñarme a no llorar
Por enseñarme a reír
Por decir las palabras adecuadas
Por enseñarme a olvidar
Por enseñarme a confiar
Por regresarme la esperanza
Por enseñarme a vivir
Por acompañarme en largas noches
Por compartir grandes momentos
Por abrazarme
Por secar mis lágrimas
Por llegar a mi lado
Por creer en mí
Por todo esto y mucho más...*

Gracias!!!

Índice

Resumen	XIII
Abstract	XIV
1. Introducción	XV
1.1 Contaminación por hidrocarburos.....	1
1.2 Hidrocarburos aromáticos.....	2
1.3 Remoción de hidrocarburos.....	3
1.3.1 Biorremediación.....	3
1.3.2 Fitorremediación.....	4
1.4 Microorganismos degradadores de hidrocarburos.....	6
1.5 Enzimas involucradas en el proceso de degradación de hidrocarburos...	8
1.5.1 Benceno 1,2 dioxigenasa.....	9
1.5.2 Tolueno dioxigenasa.....	10
1.5.3 Xileno monooxigenasa.....	11
1.5.4 Naftaleno 1,2 dioxigenasa.....	12
1.5.5 Bifenil 2,3 dioxigenasa.....	13
2. Justificación	16
3. Objetivos	18
4. Material y Métodos	19
4.1 Obtención de muestras de suelo.....	20
4.2 Enriquecimientos de consorcios en medios específicos.....	21
4.3 Extracción de DNA metagenómico.....	21
4.4 PCR- DGGE de la región V6-V8 del gen 16S rRNA.....	21
4.5 Aislamiento de bacterias degradadoras de hidrocarburos.....	23
4.6 Utilización de hidrocarburos como fuente de carbono por las cepas aisladas	
4.7 Extracción de DNA de las cepas aisladas.....	23
4.8 Análisis RAPD (Randomly amplified polymorphic DNA).....	23
4.9 Identificación molecular mediante el análisis del gen 16S rRNA.....	24
4.10 Diversidad de genes que codifican para oxigenasas.....	25
5. Resultados	27
5.1 Evaluación de la diversidad bacteriana y la estabilización de los consorcios..	28
5.2 Aislamiento e identificación de bacterias degradadoras de hidrocarburos...	32

5.3 Distribución de géneros microbianos en los diferentes suelos.....	40
5.4 Crecimiento en BTX (benceno, tolueno y xileno).....	41
5.5 Detección de genes que codifican para enzimas tipo oxigenasas.....	43
6. Discusión.....	49
7. Conclusiones.....	57
8. Prospectivas.....	59
9. Bibliografía.....	60

Índice de Tablas

Tabla 1. Especies bacterianas reportadas en suelos contaminados con hidrocarburos.....	7
Tabla 2. Condiciones de la PCR para amplificar la región hipervariable V6-V8 del gen 16S rRNA.....	22
Tabla 3. Soluciones para preparar geles de poliacrilamida.....	22
Tabla 4. Condiciones de PCR para el análisis RAPD.....	24
Tabla 5. Condiciones de PCR para amplificar el gen 16S rRNA.....	24
Tabla 6. Número de aislados y morfotipos en los suelos.....	32
Tabla 7. Clasificación de los aislados por perfiles RAPD.....	34
Tabla 8. Aislados obtenidos a partir de suelos rizosféricos de plantas que crecen en sitios contaminados con hidrocarburos.....	36
Tabla 9. Crecimiento de aislados con hidrocarburos aromáticos como única fuente de carbono.....	42
Tabla 10. Iniciadores diseñados en este trabajo para genes que codifican para enzimas oxigenasas.....	44

Índice de Figuras

Figura 1. Mecanismo de acción de las enzimas tipo oxigenasas.....	8
Figura 2. Estructura cuaternaria de la enzima bifenil 2,3 dioxigenasa.	9
Figura 3. Oxidación inicial del benceno.....	10
Figura 4. Oxidación inicial del tolueno.....	11
Figura 5. Oxidación inicial del xileno.....	11
Figura 6. Oxidación inicial del naftaleno.....	12
Figura 7. Oxidación inicial del bifenil.....	13
Figura 8. Diagrama general de trabajo.....	20
Figura 9. Metodologías para evaluar el crecimiento en hidrocarburos aromáticos.....	20
Figura 10. Extracción del DNA metagenómico a partir del primer cultivo de enriquecimiento con petróleo refinado.....	28
Figura 11. Amplificación de la región hipervariable V6-V8 de los genes 16S rRNA a partir de DNAs metagenómicos.....	29
Figura 12. DGGE de la región V6-V8 de los cultivos de enriquecimiento de las diferentes muestras de suelo	31
Figura 13. Perfiles RAPD de las bacterias aisladas.....	33
Figura 14. Amplificación del gen 16S rRNA de los aislados obtenidos a partir de los suelos rizosféricos y no rizosféricos asociados a <i>Cyperus</i> sp.....	35
Figura 15. Filograma de las secuencias parciales del gen 16S rRNA de las cepas aisladas (α - proteobacterias).	37
Figura 16. Filograma de las secuencias parciales del gen 16S rRNA de las cepas aisladas (Actinobacterias).	38

Figura 17. Filograma de las secuencias parciales del gen 16S rRNA de las cepas aisladas (β -proteobacterias).	39
Figura 18. Distribución de las bacterias aisladas en los diferentes suelos....	40
Figura 19. Pruebas de crecimiento en hidrocarburos aromáticos.....	41
Figura 20. PCR en gradiente de temperatura para determinar la temperatura de alineamiento de los iniciadores de la tolueno dioxigenasa.....	43
Figura 21. Amplificación parcial de la subunidad α de las enzimas bifenil monooxigenasas.....	45
Figura 22. Amplificación parcial de la subunidad α de la enzima tolueno dioxigenasa.	45
Figura 23. Amplificación de la subunidad α de la enzima benceno 1,2 dioxigenasa.....	46
Figura 24. Filograma de las secuencias aminoacídicas parciales de la subunidad α de la bifenil monooxigenasa y la benceno 1,2-dioxigenasa (BphA y BenC, respectivamente) de las cepas aisladas.	47

Resumen

La contaminación por hidrocarburos en suelos, como resultado de fugas o descargas accidentales de petróleo, conduce a daños a nivel del subsuelo y de los mantos freáticos generando un fuerte problema ambiental debido a su toxicidad hacia la vida terrestre. En la mayoría de los casos el saneamiento de los suelos es complejo debido a que los contaminantes se presentan en forma de mezclas. La fitorremediación es una alternativa para disminuir la toxicidad de los contaminantes de los suelos, que utiliza plantas pioneras o introducidas y los microorganismos asociados con sus raíces. En este proceso, el área de influencia de la raíz o rizosfera tiene un efecto significativo en los procesos de la fitorremediación, ya que se amplía significativamente el potencial metabólico de las plantas y estimula las poblaciones microbianas por la producción de exudados, además de contribuir al crecimiento de la propia planta. Sin embargo, los microorganismos rizosféricos tienen el papel más importante en los procesos de la fitorremediación, ya que tienen la capacidad de modificar la biodisponibilidad de los hidrocarburos del petróleo y de participar de manera muy importante en la adaptación de las plantas. En este trabajo, se aislaron bacterias que degradan hidrocarburos aromáticos a través de cultivos de enriquecimiento, de suelo rizosférico asociado a *Cyperus* sp. y suelo no rizosférico, una planta que completa su ciclo de vida y que crece en suelos contaminados en Poza Rica, Veracruz. Se obtuvieron cultivos de enriquecimiento por transferencias sucesivas en medio mineral adicionado con petróleo refinado al 1% y se analizó la estabilidad de la comunidad bacteriana por PCR-DGGE de la región V6-V8 del gen 16S rRNA a lo largo de las transferencias. A partir de la 4ª transferencia se aislaron microorganismos degradadores de hidrocarburos que fueron identificados por la secuenciación de sus genes 16S rRNA. Se obtuvieron 22 bacterias que se agruparon dentro de los géneros: *Serratia* sp., *Ralstonia insidiosa*, *Caulobacter* sp., *Cellulomonas* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia brasilensis*, entre otras. Además, se realizaron pruebas de crecimiento empleando benceno, tolueno y xileno, como única fuente de carbono. Así, la mayoría de los microorganismos aislados crecieron en benceno y tolueno, y en menor proporción en xileno. Las especies *Serratia* sp., *Burkholderia brasilensis* y *Ralstonia insidiosa* fueron los que presentaron mayor capacidad metabólica para degradar hidrocarburos aromáticos. También se diseñaron iniciadores específicos para amplificar la subunidad α de enzimas tipo oxigenasas: benceno 1, 2 dioxigenasa, tolueno dioxigenasa, naftaleno monooxigenasa, xileno monooxigenasa y bifenil 2,3-dioxigenasa. Logrando la detección de genes relacionados con las enzimas benceno 1,2 dioxigenasa, y bifenil 2,3 dioxigenasa pertenecientes a los géneros *Ralstonia* y *Burkholderia*.

Este estudio demuestra que existen bacterias cultivables asociadas a la rizosfera de *Cyperus* sp. que tienen capacidad para degradar hidrocarburos aromáticos del petróleo.

Abstract

Oil pollution in soils, as result of leaks or accidental discharges of petroleum, has caused damage at subsoil and groundwater generating a strong environmental problem due to its toxicity towards terrestrial life. Most of cases recovery of soil is complex due to the pollutants are present as mixtures. Phytoremediation an alternative to decrease the toxicity of contaminant in soils, which uses pioneering or introduced plants and microorganisms associated with their roots. In this process, the area of influence of the root or rhizosphere has a significant effect on phytoremediation processes, since they significantly extend the metabolic potential of plants and contribute to the growth of the plant. The microorganisms also have the main significant effect on phytoremediation processes, by modification the bioavailability and degradation of petroleum hydrocarbons and contribute to plant adaptation. In this work, bacteria that degrade aromatic hydrocarbons through enrichment cultures were isolated, from rhizospheric and rhizoplane associated with *Cyperus* sp., a plant able to complete its life cycle and grow in soils contaminated with petroleum at Poza Rica, Veracruz. Culture enrichments were obtained successive transfers were realized in mineral medium and the evolution of the bacterial community was analyzed by PCR-DGGE of the region V6-V8 of the gene 16S rRNA. Along the transference steps. Degrading bacteria were isolated and were identified by the sequence of their 16S rRNA gene sequence analysis. A total of 22 bacteria were obtained and grouped within the genus: *Ralstonia insidiosa*, *Caulobacter* sp, *Cellulomonas* sp, *Pseudomonas auruginosa*, *Burkholderia brasiliensis*, among others. In addition, growth tests were carried out using benzene, toluene and xylene, as the sole carbon source. Most of the isolates-grew in benzene and toluene, and in minor proportion in xylene. *Serratia*, *Burkholderia* and *Ralstonia* genus had the higher metabolic capacity to degrade aromatic hydrocarbons. Besides, specific primers were designed to amplify the α subunit of oxygenases enzymes: benzene 1, 2 dioxygenase, toluene dioxygenase, naphthalene monooxygenase, xylene monooxygenase and biphenyl 2,3-dioxygenase. We were able to detect genes related to benzene 1,2 dioxygenase, and biphenyl 2,3 dioxygenase belonging to the genera *Ralstonia* and *Burkholderia*. This study showed that there are bacteria associated with the rhizosphere of *Cyperus* sp. capable to degrading aromatic hydrocarbons from petroleum.

1. Introducción

1.1 Contaminación por hidrocarburos

La contaminación del suelo es causada por la presencia de compuestos químicos hechos por el hombre u otra alteración del ambiente natural del suelo. Los químicos más comunes incluyen hidrocarburos de petróleo, solventes, pesticidas y metales pesados. Este fenómeno está estrechamente relacionado con el grado de industrialización e intensidad del uso de químicos. En lo concerniente a la contaminación de suelos su riesgo es primariamente de salud, de forma directa o al entrar en contacto con fuentes de agua potable.

Los hidrocarburos son una importante fuente de energía en muchas industrias, provienen de combustibles fósiles y tienen una composición muy diversa, desde alcanos alifáticos saturados simples hasta complejos componentes aromáticos (Alper, 1993). El derrame de hidrocarburos en suelos impide que el intercambio gaseoso con la atmósfera se lleve a cabo, propiciando una serie de procesos de penetración y evaporación que varían según el tipo de hidrocarburo y la cantidad vertida; así como también, la textura, humedad y temperatura del suelo (Randy *et al.*, 2002).

En México existe un considerable número de sitios contaminados con hidrocarburos como resultado de fugas o descargas accidentales de petróleo crudo, combustóleo, gasóleo, gasolina, diesel y turbosina. En general, los derrames representan un problema ambiental debido a que dañan el subsuelo y el agua subterránea, por su toxicidad hacia la vida terrestre, y porque su saneamiento es complejo debido a que los contaminantes se presentan en forma de mezclas (Ortínez-Brito *et al.*, 2003).

1.2 Hidrocarburos aromáticos

De las fracciones del petróleo, los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son los más tóxicos y difíciles de degradar mediante métodos convencionales de remediación. A este grupo pertenecen compuestos de dos o más anillos de benceno con diferentes grupos de sustituyentes; se originan a partir de reacciones geológicas como fosilización de plantas o por síntesis química en la industria (Park *et al.*, 1990; Cerniglia, 1993; Wilson & Jones, 1993). La degradación de estos hidrocarburos es variable y no depende únicamente de su estructura, sino de las condiciones físicas y químicas del sitio, y de la cantidad y variedad de microorganismos presentes (Volkerling *et al.*, 1992).

Benceno, tolueno, etilbenceno y xileno (BTEX) son hidrocarburos monoaromáticos y se consideran contaminantes importantes en el suelo y en el agua por la EPA (Environmental Protection Agency) (Cicciolo, 1993). Estos compuestos poseen bajo peso molecular, son poco solubles en agua y por sus elevadas presiones de vapor pasan con facilidad a la fase gaseosa. Los BTEX se emplean generalmente como disolventes en la preparación de pinturas, aceites, resinas adhesivos y en la síntesis de diversos compuestos. Particularmente, el benceno y el tolueno se utilizan como aditivos en la gasolina para incrementar el octanaje (Cline *et al.*, 1991). Debido a que los BTEX son compuestos neutros, solubles en lípidos y de bajo peso molecular se absorben rápidamente por el organismo una vez que son inhalados o ingeridos. Al ser muy solubles en lípidos tienden a acumularse en los tejidos grasos; de hecho, una exposición prolongada a niveles elevados de BTEX produce efectos nocivos sobre la salud, como desórdenes del sistema nervioso central, cáncer, irritación de la piel, entre otros (Ware, 1988).

1.3 Remoción de hidrocarburos por métodos químicos y físicos

Algunas estrategias físicas y químicas consisten en la aplicación de productos a base de detergentes con el fin de hacer un lavado del suelo y separar la matriz (suelo, sedimento o agua) del hidrocarburo. Los surfactantes que se usan en el lavado del suelo, debido a su alta solubilidad, movilizan contaminantes orgánicos adsorbidos o no absorbidos al suelo. Sin embargo, éstos en altas concentraciones inhiben la actividad microbiológica sobre las moléculas del contaminante (Ortínez-Brito *et al.*, 2003). Otras alternativas incluyen la incineración, desorción térmica, extracción con vapor o vitrificación; sin embargo, son costosas o ecológicamente incompatibles por lo que su aplicación se ha limitado a casos muy particulares.

1.3.1 Biorremediación

La biorremediación es un proceso donde intervienen plantas, hongos o bacterias que transforman los contaminantes a sustancias menos tóxicas e inofensivas para el medio ambiente y la salud (Plaza *et al.*, 2001). En suelos contaminados con petróleo, la biorremediación constituye una buena alternativa por su bajo costo y viabilidad frente a métodos comunes como la adición de químicos para la remoción física y lavado de suelos (Cookson, 1995; Mesarch *et al.*, 2004).

La biorremediación se clasifica en métodos *in situ*, *ex situ* y atenuación natural. Los métodos *in situ* se efectúan en el mismo lugar y no se requieren excavaciones o traslado del suelo contaminado (Bongkeun *et al.*, 2000); y los métodos *ex situ* se llevan a cabo removiendo el material contaminado a un lugar bajo condiciones controladas como algún reactor o celda de “landfarming” (Drydale *et al.*, 1999). El landfarming se puede aplicar sólo cuando el contaminante esté en una capa aproximada de 0.5 m. También se puede recurrir a la estimulación de la actividad

de las comunidades nativas a través de la adición de nutrientes y/o aceptores de electrones o por bioaumentación (Timmis & Pieper, 1999).

Por otra parte, la atenuación natural es un mecanismo donde los microorganismos presentes en el ecosistema degradan los compuestos contaminantes, estos contaminantes son utilizados por los microorganismos como fuente de energía y carbono, transformándolos CO₂ y agua o en moléculas más sencillas que las originales. En la atenuación natural, los microorganismos pueden degradar contaminantes por un proceso denominado cometabolismo donde ocurre la transformación de un compuesto llamado co-sustrato o cometabolito en presencia obligada de un sustrato de crecimiento o por células en reposo en ausencia del sustrato de crecimiento. El co-sustrato no aporta energía, fuente de carbono, o algún otro nutriente y en consecuencia es incapaz de soportar la replicación celular (Perry, 1979).

La habilidad de los microorganismos para mineralizar contaminantes se puede adquirir a través de la transferencia de genes que ocurre naturalmente por conjugación, transducción o transformación. La transferencia de plásmidos facilita la rápida adaptación de las bacterias a los cambios en el ambiente por diseminación de la información genética para la síntesis de enzimas necesarias para degradar sustratos nuevos (Todd & Joel, 1993). El monitoreo de genes involucrados en la degradación de contaminantes es una herramienta adecuada para conocer los procesos metabólicos que pueden estar activos durante la atenuación natural (Baldwin *et al.*, 2003).

1.3.2 Fitorremediación

El uso de plantas nativas es otra opción importante para la remediación debido a que se preserva la integridad y textura del suelo; además las plantas interactúan con los microorganismos estimulando el aumento de la biomasa (Glass, 1998; Suthersan, 2002). Asimismo, pueden remover contaminantes por absorción y translocación a sus partes aéreas para su posterior recuperación; como en el caso

de los metales pesados en un proceso denominado fitoextracción o en el caso de la fitoestabilización, donde la planta acumula e inmoviliza los contaminantes en sus raíces reduciendo así su movilidad en el ambiente (Wong, 2003); o pueden transformar ciertos contaminantes hacia formas menos tóxicas (Todd & Joel, 1993; Cunningham & Berti, 1993). La rizosfera es el área de influencia de la raíz de la planta y constituye un espacio donde hay nutrientes abundantes y exudados secretados de la planta que propician la estimulación de la comunidad microbiana rizosférica (Walton & Anderson, 1990). El impacto de la rizosfera sobre las comunidades microbianas y sobre la degradación de contaminantes varía entre las especies de plantas. Algunos genotipos de plantas producen aminoácidos, carbohidratos, ácidos orgánicos y otros factores críticos que benefician a la comunidad rizosférica (April & Sims, 1990; Anderson *et al.*, 1993; Lugtenberg *et al.*, 1997). Adicionalmente, las raíces de las plantas pueden influir directa o indirectamente sobre algunos parámetros del suelo; como el pH, la presión parcial de O₂/CO₂ y de otros gases, la humedad relativa, entre otros (Schwab & Banks, 1994).

Para lograr una fitorremediación exitosa se requiere que la planta colonice el suelo contaminado de manera eficiente y complete su ciclo de vida (White *et al.*, 2000). Las plantas con sistemas de raíces fibrosas de gran superficie de área, particularmente las monocotiledóneas, son adecuadas porque favorecen el establecimiento de poblaciones activas de microorganismos (April & Sims, 1990). Las plantas nativas de un sitio contaminado frecuentemente se emplean con fines de fitoestabilización (Kremer *et al.*, 2005), y tienen la ventaja de que ya están adaptadas a las condiciones medioambientales del sitio contaminado y su supervivencia puede asegurarse. La comunidad rizosférica también tiene un papel importante en los procesos de fitodegradación; como en el caso del fenantreno, que fue degradado en mayor proporción por microorganismos rizosféricos aislados de cinco tipos de pastos, contrario a los microorganismos aislados de suelos no rizosféricos (Fang *et al.*, 2001).

1.4 Microorganismos degradadores de hidrocarburos

Se utilizan diversos métodos para caracterizar las poblaciones degradadoras de hidrocarburos y su actividad en el suelo, como medir la tasa de respiración, la actividad enzimática y el conteo microbiano; proporcionando información acerca de las poblaciones microbianas con capacidad de vivir en esos ambientes y del impacto que tienen las concentraciones de hidrocarburos del petróleo sobre las actividades metabólicas (Margesin *et al.*, 2000a; Margesin *et al.*, 2000b; Kiss, 2001).

Así, las técnicas tradicionales de cultivo nos permiten aislar cepas bacterianas y con ellas llevar a cabo experimentos de degradación (Seo *et al.*, 2007), análisis de expresión (Kim *et al.*, 2006) y finalmente poder utilizarlas en procesos de biorremediación (Wolicka *et al.*, 2009). Por otra parte, las técnicas independientes del cultivo, como la detección de genes microbianos involucrados en la degradación de contaminantes o los genes ribosomales, son importantes para estudiar la función y la estructura de las comunidades microbianas en muestras ambientales (Atlas *et al.*, 1992; Coates *et al.*, 1998).

Dentro de los géneros de bacterias de importancia en la remediación de suelos (Tabla 1) está *Rhodococcus*, que son aerobios, Gram positivos, inmóviles que pueden filamentosar, con una amplia capacidad metabólica, que incluye la presencia de enzimas dioxigenasas y monooxigenasas, que tienen actividad sobre compuestos aromáticos. Estos microorganismos pueden crecer en medios con escasos nutrientes y resisten condiciones ambientales variadas. *Pseudomonas* representa otro género de interés que utiliza diversos sustratos como fuente de carbono, entre ellos hidrocarburos del petróleo. Los miembros de este género son bacterias Gram negativas, ubicuas, pertenecientes a las gamma-proteobacterias; producen biosurfactantes, como los ramnolípidos involucrados en procesos de remoción de aceites (Flavio *et al.*, 1999). *Burkholderia*, un bacilo Gram negativo no

fermentador, es otra bacteria de importancia en la remoción de herbicidas, pesticidas recalcitrantes e hidrocarburos aromáticos; tiene gran capacidad de adaptación y amplia distribución, además posee resistencia a varios antibióticos (Svenja *et al.*, 1999)(Tabla 1).

Tabla 1. Especies bacterianas reportadas en suelos contaminados con hidrocarburos

Especies Bacterianas Aisladas	Método de detección	Sitio de aislamiento	Referencia
<i>Pseudomonas</i> <i>Flavobacterium alcaligenes</i> <i>Rhodococcus</i> <i>Micobacterium</i> <i>Cellulomonas</i> <i>Arthrobacter</i> <i>Brevibacterium</i>	Aislamiento tradicional	Suelos contaminados con aguas industriales de una planta química	Plotnikova <i>et al.</i> , 2006
<i>Burkholderia cepacia</i> 2A-12	Aislamiento tradicional	Suelo contaminado con aceite	Jung <i>et al.</i> , 2003
<i>Enterobacter</i> sp. SA-2 <i>Ralstonia</i> sp. SA-4 <i>Pseudomonas</i> sp.	Aislamiento tradicional	Basurero Industrial, Nigeria	Adebusoye <i>et al.</i> , 2008
<i>Burkholderia</i> sp. <i>Polaromonas naphthalenivorans</i> <i>Ralstonia</i> sp.	Detección de genes <i>ndo</i> , <i>phnAc</i>	Manglares contaminados con hidrocarburos, Brasil	Gómes-Marcial <i>et al.</i> , 2007
Acetobacteraceae Rhizobiales Alphaproteobacteria <i>Burkholderia</i> Acetobacteraceae	Construcción de librerías de genes ribosomales	Microcosmos empleando turba no tratada, Finlandia	Sipilä <i>et al.</i> , 2008
<i>Mycobacterium</i>	Aislamiento tradicional	Gasolina	Floriane <i>et al.</i> , 2000
<i>Flavobacterium</i> <i>Rhodanobacter lindaniclasticus</i> <i>Thermomonas heamolytica</i> <i>Stenotrophomonas</i> <i>Xanthomonas</i>	Construcción de librerías de genes ribosomales	Campo petrolero Guadalupe, Costa de Baja California	Christopher <i>et al.</i> , 2004

1.5 Enzimas involucradas en el proceso de degradación de hidrocarburos

La degradación aeróbica de los hidrocarburos aromáticos se inicia por oxigenasas que contienen un centro Rieske con hierro (tipo no hemo) y catalizan la incorporación de dos átomos de oxígeno en el anillo aromático para formar areno *cis*-diol (Gibson & Parales, 2000), seguido por una reacción de dehidrogenación catalizada por una *cis*-dihidrodiol dehidrogenasa para obtener catecol o catecol con sustituyentes; sustratos que facilitan la ruptura del anillo aromático por otras oxigenasas (Butler & Mason, 1997) (Figura 1).

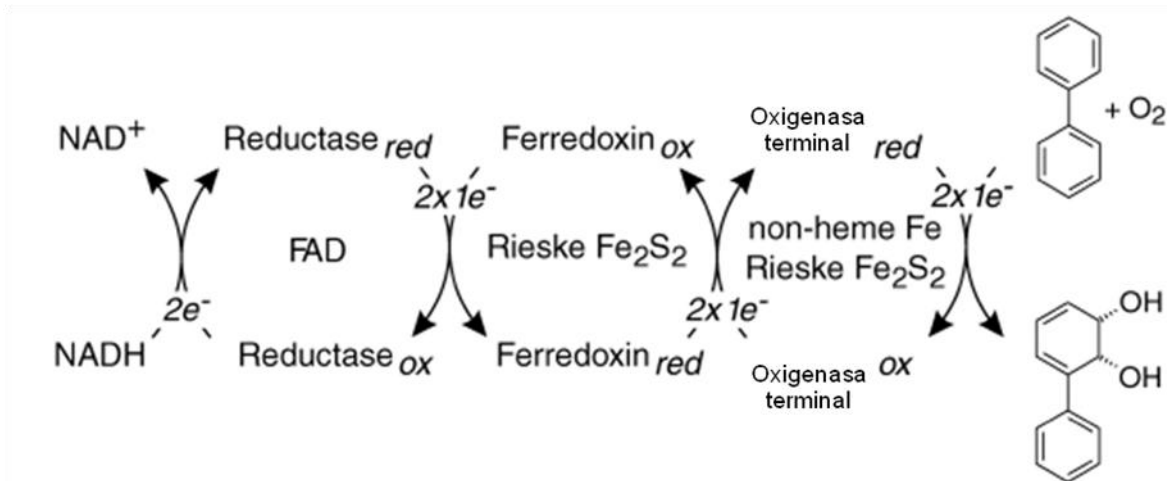


Figura 1. Flujo de electrones asociados a la oxidación de hidrocarburos. Tomado de Haddock *et al.* (1997). Los electrones del NADH se transfieren a través de los diferentes componentes de la enzima hasta la oxigenasa terminal que contiene un “Rieske” FeS, para finalmente incorporar dos átomos de oxígeno y así oxidar al compuesto aromático (bifenilo).

Las oxigenasas son complejos enzimáticos que tienen una oxigenasa terminal (una proteína hierro sulfuro {ISP}) y diferentes proteínas transportadoras de electrones (una ferredoxina y una reductasa o una ferredoxina-NADH-reductasa combinada). Las proteínas catalíticas hierro-sulfuro son heterodímeros que contienen una subunidad pequeña (β) y una subunidad larga (α) con un centro de activación mononuclear con hierro “Rieske” tipo {2Fe-2S}, y un centro de sitio de

ligando (Butler & Mason, 1997; Furusawa *et al.*, 2004) que son responsables de la especificidad del sustrato (Gibson & Pareles, 2000) (Figura 2).

La comparación de secuencias aminoacídicas de las subunidades α de las oxigenasas terminales (ISP α) muestra que estas forman una familia diversa pero con secuencias relacionadas, y 4 linajes distintos identificados (Gibson & Parales, 2000).

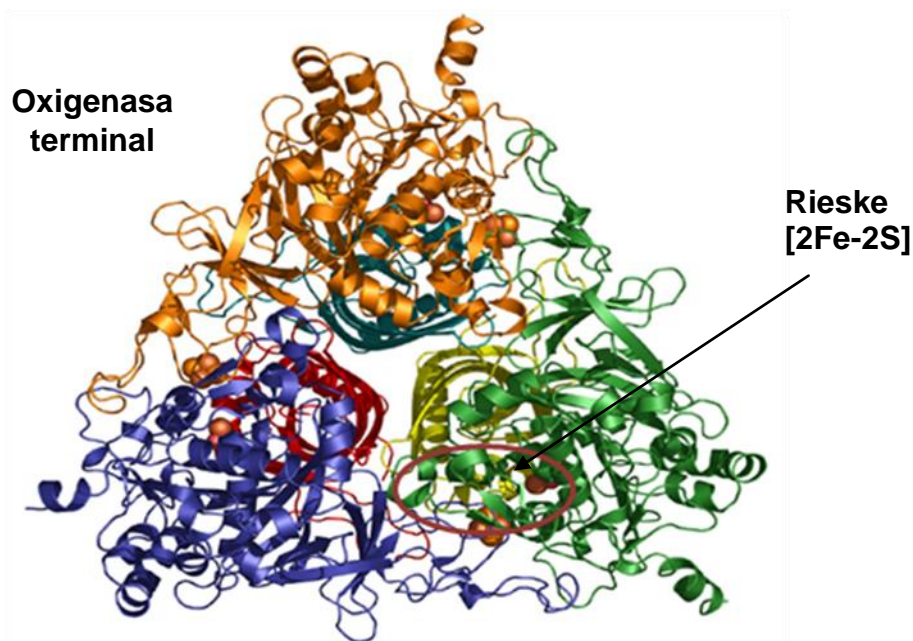


Figura 2. Estructura cuaternaria de la enzima bifenil 2,3 dioxigenasa. Tomado de Ferraro *et al* (2007). En la figura se destaca la oxigenasa terminal y sus dos subunidades α y β , además del Rieske FeS.

Estas enzimas no son completamente específicas, tienen una amplia diversidad de acción sobre sustratos diferentes como tolueno, bifenilo, naftaleno o benzoato. Sin embargo, varios estudios han demostrado que pequeñas diferencias en las secuencias aminoacídicas de la subunidad α pueden asociarse con cambios dramáticos en la especificidad de sustrato o regioespecificidad (Parales *et al.*, 2000; Zielinski *et al.*, 2002).

1.5.1 Benceno 1,2 dioxigenasa

Entre las enzimas implicadas en la degradación de hidrocarburos se encuentra la benceno 1,2 dioxigenasa (1.14.12.3) que cataliza la siguiente reacción (Figura 3):

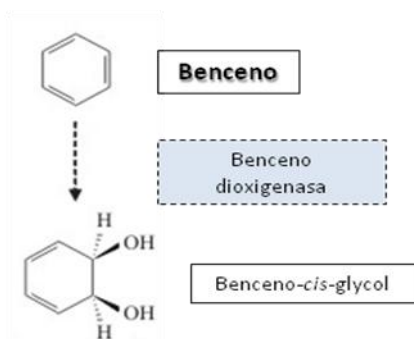


Figura 3. Oxidación inicial del benceno por la benceno dioxigenasa. Tomado de Lee *et al.* (1994)

Esta enzima se purificó por primera vez de *Pseudomonas* sp. ML2 por Axcell y Geary (1973), quienes demostraron que estaba formada por tres proteínas. Posteriormente, se demostró que una de las proteínas estaba formada por un complejo de dos subunidades diferentes (Zamanian & Mason, 1987). Los genes que codifican para las 4 proteínas se localizan en el plásmido pHMT 112, ya se clonaron y secuenciaron (Tan *et al.*, 1993).

El primer componente del complejo de la benceno 1,2 dioxigenasa es una ferredoxina reductasa que transfiere electrones del NADH a un segundo componente del sistema, una ferredoxina. La ferredoxina a su vez transfiere electrones a un tercer componente, una oxidoreductasa (oxigenasa terminal) de dos subunidades que contiene flavina y hierro. Finalmente, la oxigenasa terminal reducida cataliza la oxidación de benceno a cis-1,2-dihidrobenceno 1,2 diol (Tan *et al.*, 1993). Los componentes de esta enzima son: la subunidad α codificada por el

gen **bedC1**, la subunidad β codificada por el Gen **bedC2**, la subunidad reductasa codificada por el gen **bedA** y la subunidad ferredoxina codificada por el gen **bedB**.

1.5.2 Tolueno dioxigenasa

Otra enzima importante es la tolueno dioxigenasa (1.14.12.11), también llamada tolueno 1,2- monooxigenasa y cataliza la siguiente reacción (Figura 4):

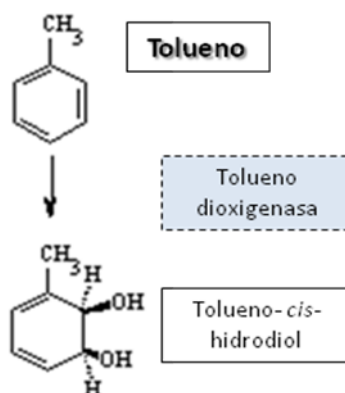
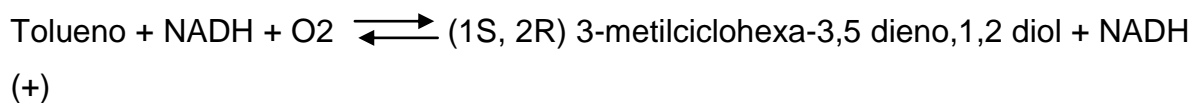


Figura 4. Oxidación inicial del tolueno por la tolueno dioxigenasa. Tomado de Lee *et al.* (1994)

La tolueno dioxigenasa es un sistema enzimático de multisubunidades que contiene un componente de oxigenasa (ISP_{tol}), con dos subunidades en un arreglo $\alpha\beta_2$. También hay una subunidad reductasa_{tol} y una subunidad ferredoxina_{tol}. Las subunidades α , β , reductasa y ferredoxina están codificadas por los genes *todC1*, *todC2*, *todA* y *todB*, respectivamente (Wackett, 1990).

1.5.3 Xileno monooxigenasa

La enzima xileno monooxigenasa cataliza la siguiente reacción (Figura 5.):

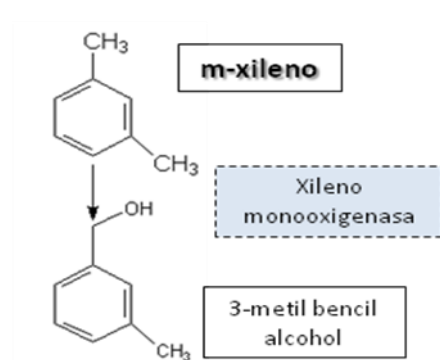


Figura 5. Oxidación inicial del xileno por la xileno monooxigenasa. Tomado de Lee *et al.* (1994)

Esta enzima no tiene especificidad de sustratos y también oxida alcoholes bencílicos e indol a indoxil. Es la primera enzima en la ruta de oxidación del tolueno y del xileno que genera alcohol bencílico. Consta de dos diferentes subunidades codificadas por *xyM* y *xyA* (Harayama *et al.*, 1989). XyM por similitud de función puede ser una hidroxilasa que cataliza la incorporación de un átomo de oxígeno dentro del grupo metil del tolueno o xileno. XyA contiene dos dominios funcionales: una ferredoxina y una reductasa, que transfieren los electrones a la subunidad XyM (Maruyama *et al.*, 2005).

1.5.4 Naftaleno 1,2 dioxigenasa

La enzima naftaleno 1,2 dioxigenasa (1.14.12.12) cataliza la siguiente reacción (Figura 6):

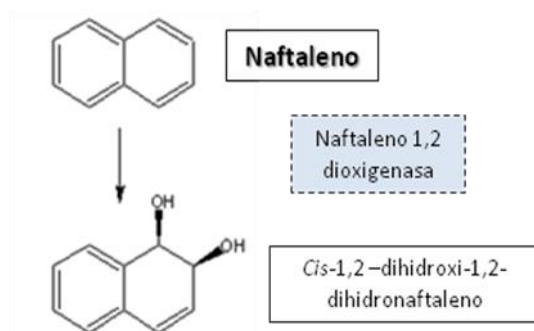
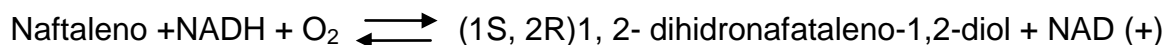


Figura 6. Oxidación inicial del naftaleno por la naftaleno 1,2 dioxigenasa . Tomado de Lee *et al.* (1994)

La reacción se lleva a cabo cuando el primer componente (flavina oxidorreductasa) que contiene hierro (reductasa_{NAP}) transfiere electrones de NADH a un segundo componente en el sistema, una ferredoxina (ferredoxina_{NAP}) (Haigler & Gibson, 1990).

La ferredoxina transfiere los electrones al tercer componente, un heterohexámero compuesto de un complejo $\alpha\beta_3$. El tercer componente fue llamado ISP_{NAP} (por proteína hierro-sulfuro) o más recientemente simplificado como NDO. Este componente reacciona con el naftaleno y con ambos átomos de oxígeno molecular para formar el producto oxidado.

La enzima no tiene especificidad de sustrato y adicionalmente a la actividad dioxigenasa, la naftaleno 1,2 dioxigenasa puede catalizar insaturaciones y actividad monooxigenasa (Gibson *et al.*, 1995). Los componentes de esta enzima son la subunidad α codificada por el gen *ndoB*, la subunidad β codificada por el gen *ndoC*, la subunidad reductasa codificada por el gen *ndoR* y la subunidad ferredoxina codificada por el gen *ndoA* (Kauppi, 1998).

1.5.5 Bifenil 2,3 dioxigenasa

La enzima bifenil 2,3 dioxigenasa cataliza la siguiente reacción (Figura 7):

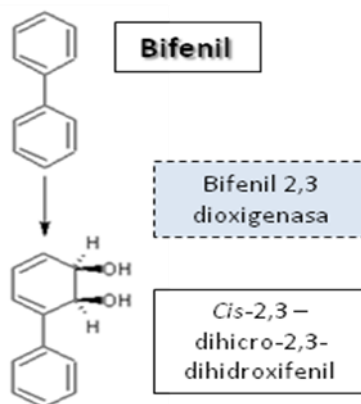


Figura 7. Oxidación inicial del bifenil por la bifenil 2,3 dioxigenasa. Tomado de Lee *et al.* (1994).

Es un complejo multienzimático involucrado en la degradación de bifenil policlorado, el paso inicial en la degradación es la hidroxilación de un anillo aromático, esta enzima pertenece a la familia de las dioxigenasas que actúan sobre anillos aromáticos (RHDOs). El 3-fenolciclohexa-3,5-dieno-1,2-diol (componente dihidrodiol) generado en el primer paso de la degradación se transforma a benzoato y 2-hidroxipentano-2,4-dienoato via 2,3-dihidroxibifenil (Masai *et al.*, 1997; Kitagawa *et al.*, 2001).

El complejo consiste de un componente de oxigenasa terminal que tiene una subunidad grande y una pequeña, una ferredoxina reductasa, y una ferredoxina que contiene un “Rieske” tipo {2Fe-2S} y un hierro mononuclear, que cataliza la hidroxilación de los anillos aromático. Los electrones son transferidos del NADH al cluster {2Fe-2S} en la subunidad grande de la oxigenasa terminal vía FAD del componente ferredoxina reductasa.

La subunidad α está codificada por el gen *bphA1f*, la subunidad β , por el gen *bphA2f*; la subunidad reductasa, por el gen *bphA4*; y la subunidad ferredoxina, por el gen *bphA3* (Batie *et al.*, 1992).

2. Justificación

El derrame de petróleo en el suelo causa un fuerte impacto en las comunidades microbianas presentes porque impide el intercambio gaseoso con la atmósfera y modifica los parámetros físico-químicos del suelo; además la fracción de hidrocarburos aromáticos es de difícil degradación y tiene efectos tóxicos para el ser humano. Sin embargo, algunas especies de plantas crecen y completan su ciclo de vida en suelos contaminados con hidrocarburos, en asociación con microorganismos presentes en la rizósfera. Estas plantas favorecen el aumento de la biomasa microbiana por la producción de exudados y los microorganismos a su vez poseen la capacidad metabólica para degradar o hacer menos tóxicos los hidrocarburos. Es así como el estudio de consorcios implicados en la degradación y la detección de genes que codifican para enzimas tipo oxigenasas es una herramienta para estimar la capacidad de un suelo en la eliminación de los contaminantes y permite establecer las medidas necesarias que incrementen los procesos que se llevan a cabo en menor tiempo y con la mayor eficacia posible.



3. Objetivos

General

Estudiar la diversidad de bacterias hidrocarbonoclastas cultivables a partir de las rizosferas de plantas que crecen en suelos contaminados con petróleo y sus genes de oxigenasas.

Específicos

- Establecer cultivos mixtos o consorcios bacterianos con capacidad de degradar hidrocarburos aromáticos.
- Evaluar el uso del DGGE en la estabilización de consorcios microbianos de los cultivos de enriquecimientos.
- Identificar bacterias degradadoras de hidrocarburos en los consorcios estabilizados.
- Identificación de los genes benceno 1, 2 dioxigenasa, tolueno dioxigenasa, naftaleno monooxigenasa, xileno monooxigenasa y bifenil 2, 3- dioxigenasa en los DNAs cromosomales de las bacterias degradadoras de hidrocarburos y en los DNA metagenómicos provenientes de los consorcios.
- Determinar la capacidad de los microorganismos aislados para crecer en hidrocarburos aromáticos como única fuente de carbono.

4. Material y Métodos

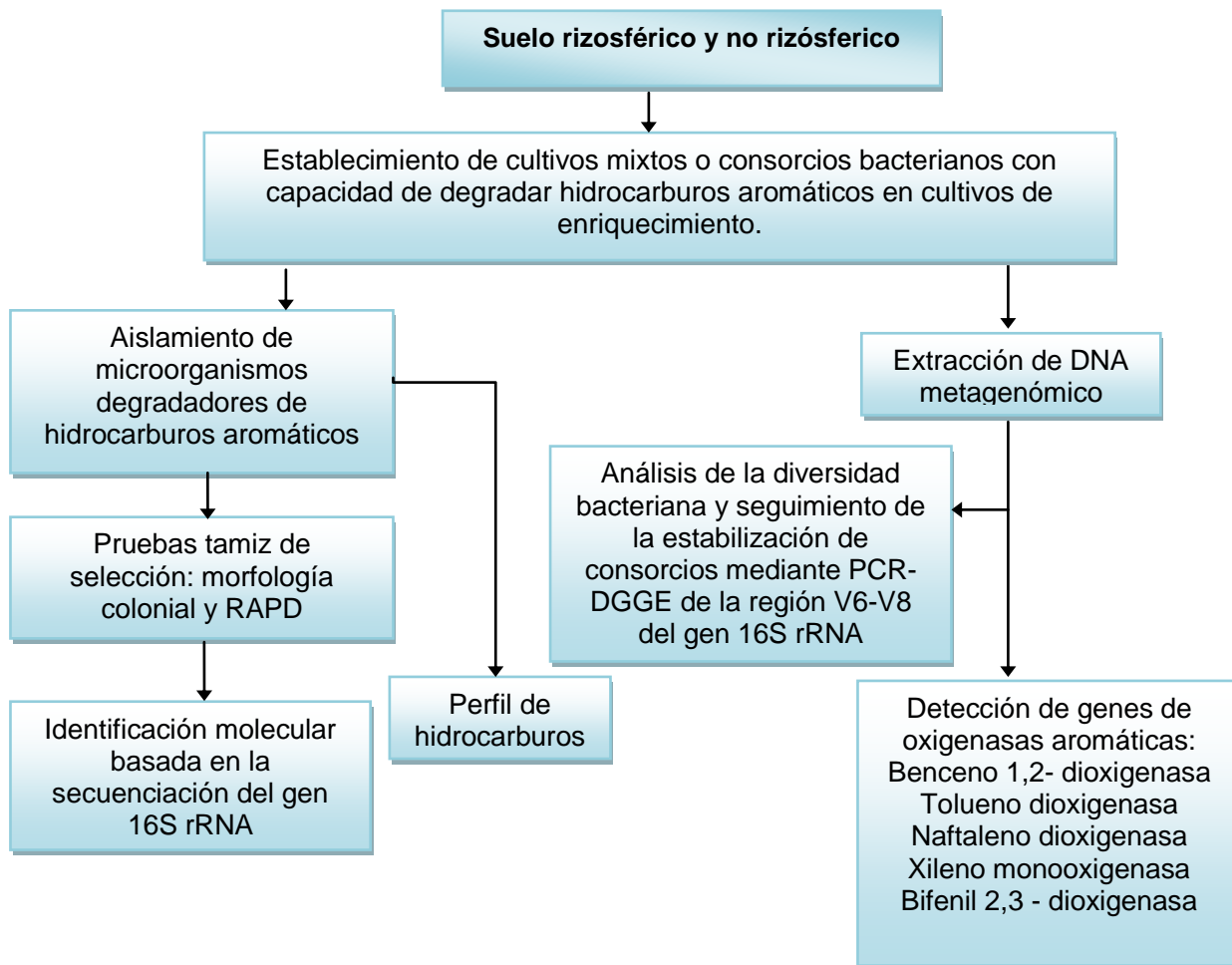


Figura 8. Diagrama general de trabajo

4.1 Obtención de muestra de suelo

En la figura 8 se representan las etapas experimentales del presente trabajo. Básicamente se obtuvieron consorcios bacterianos que utilizan hidrocarburos aromáticos como única fuente de carbono. A partir de esos consorcios se realizaron estudios basados e independientes del cultivo.

Muestras de suelo se colectaron a partir de la rizosfera de la planta *Cyperus* sp. creciendo en suelos contaminados con hidrocarburos y en suelos no contaminados y muestras de suelos no rizosféricos. Se colectaron en Poza Rica,

Veracruz (20°, 32 min al norte y 97°, 25 min al oeste) en el mes de agosto del 2007. En el lugar había una capa de crudo intemperizado de 50 cm aproximadamente. Se colectaron plantas de *Cyperus* sp., distribuidas de forma irregular en el terreno, se tomaron plantas al azar; cada muestra de rizósfera provenía de una planta colectada de forma independiente y fueron obtenidas tomando el suelo adherido a la raíz. Posteriormente, se trasladaron al Distrito Federal, mantenidas a temperatura ambiente y al arribar al laboratorio se conservaron a 4°C hasta su procesamiento. Las muestras se nombraron: **NRN1**, Suelo no rizosférico no contaminado 1; **RN1**, Rizosfera no contaminada 1; **NRC**, Suelo no rizósferico contaminado; **NRN2**, Suelo no rizósferico 2; **RC**, Rizósfera contaminada; **RN2**, Rizósfera no contaminada 2.

4.2 Selección de microorganismos en medios específicos

De las muestras de suelo se inoculó 0.5 g en 100 ml de medio mineral que contenía por litro: KH_2PO_4 (0.68 g), Na_2HPO_4 (1.79 g), MgSO_4 (0.35 g), NO_3NH_4 (1 g), CaCl_2 (0.8 g), FeSO_4 (0.4 mg), y 0.1 ml de una solución de 100 mg L⁻¹ de H_3BO_4 , MnSO_4 , ZnSO_4 , CuSO_4 , y CoCl_2 (Chaillan *et al.*, 2004). Se adicionó petróleo refinado a una concentración de 1%, como única fuente de carbono. Los matraces se incubaron a 28°C y agitación a 120 rpm. El crecimiento se evaluó mediante turbidez del medio. Se realizaron transferencias sucesivas a medios frescos cuando la turbidez fue evidente hasta alcanzar la estabilización del cultivo, analizado mediante PCR-DGGE de la región V6-V8 del gen 16S rRNA.

4.3 Extracción de DNA metagenómico

Se extrajo el DNA total de los cultivos de enriquecimiento a partir de la cosecha de 5 ml de cada medio, por la técnica descrita previamente por Cullen & Hirsch (1988) (Anexo A). La calidad del DNA de cada muestra se valoró mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% en regulador TAE 1X, a 80 V. El DNA se

tiñó con bromuro de etidio a $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ y se observaron en un transiluminador con luz ultravioleta (Sambrook *et al.*, 2002).

4.4 PCR-DGGE de la región V6-V8 del gen 16S rRNA

Con el propósito de dar seguimiento en la estabilización bacteriana determinada a través de la observación de la migración relativa, el número y la intensidad de las bandas a través de las transferencias, se realizó la amplificación de la región hipervariable V6-V8 del gen 16S rRNA mediante PCR, utilizando los iniciadores descritos por Muyzer & Smalla (1998) cuyas secuencias son: Derecho 2 (5'- **GCC CGG GGC GCG CCC CGG GCG GGG CGG GGG GAC GGG** GGA ACG CGA AGA ACC TTA CC-3', en negritas el broche de GC) y Reverso (5'- CGG TGT GTA CAA GAC CC-3').

La mezcla de reacción se preparó con 2.5 μl de buffer de reacción 10X (5 mM KCl, 1 mM Tris-HCl, pH 9), 0.2 μM de cada deoxinucleótido trifosfato (dNTP's), 10 pM de cada iniciador, 1.5 U de *Taq* DNA polimerasa, 4 ηg de DNA molde, y se ajustó a un volumen de 25 μl con agua destilada estéril.

Las condiciones de reacción fueron las siguientes (Tabla 2):

Tabla 2. Condiciones de la PCR para amplificar la región V6-V8 del gen 16S rRNA

Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	No. de ciclos
Desnaturalización inicial	94	7	1
Desnaturalización	94	1	35
Hibridación	55	1	
Polimerización	72	1	
Extensión final	72	7	1

4.4.1 Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE)

Se prepararon las siguientes soluciones (Tabla 3.):

Tabla 3. Soluciones para preparar geles de poliacrilamida

	Solución A	Solución B
Capacidad desnaturalizante relativa	100%	0%
	50 ml	50 ml
Acrilamida – bis acrilamida (37.5:1) 40%		
TAE 50X	2.5 ml	2.5 ml
Glicerol	5 ml	5 ml
Urea	105.4 g	-
Formamida	100 ml	-
Agua desionizada estéril	Aforar a 250 ml	

La urea y la formamida se usaron en proporción al gradiente 20-80%. Se empleó un gradientador de vasos comunicantes para la formación del gradiente de desnaturalización. La electroforesis se llevó a cabo a 60 °C durante 16 h a 85 V. La tinción del gel se realizó con sales de plata: el gel se fijó usando 200 ml de una solución de fijación y se mantuvo en agitación durante 3 min a 26 rpm, luego se colocó en 200 ml de una solución de tinción y se mantuvo en agitación durante 10 min a 26 rpm, después se lavó con agua destilada durante 2 min. Para revelar se utilizó un recipiente diferente, primero se lavo el gel con 10 ml de solución de revelación, y después se adicionaron 200 ml de la misma solución y se mantuvo en agitación hasta observar la aparición de las bandas, luego se fijó con 200 ml de una solución de fijación y finalmente se lavó con agua destilada durante 5 min. Para preservar se adicionaron 200 ml de una solución de preservación y se agitó durante 10 min. El gel se documentó en un trasiluminador de luz blanca (Anexo C).

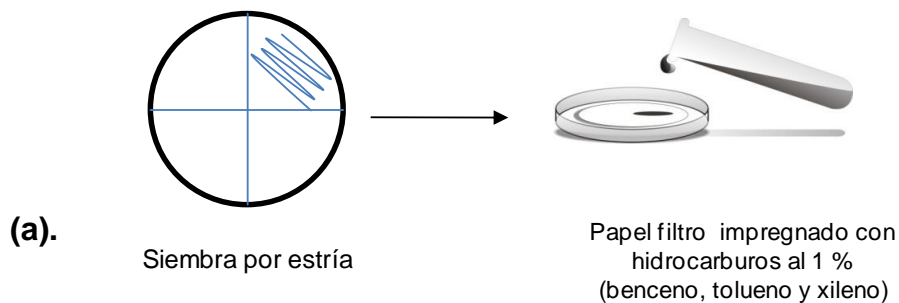
4.5 Aislamiento de bacterias a partir del consorcio

Se realizaron diluciones decimales seriadas hasta 10^{-6} y se inoculó 100 μ l de las últimas tres diluciones en agar mineral suplementado con 0.5 g L⁻¹ de extracto de levadura y se incubó a 28°C durante 24 h. Posteriormente, se distinguieron diferentes morfologías coloniales en cada uno de los suelos evaluados; se

seleccionaron de 2 a 3 colonias correspondientes a cada morfología y se resembraron nuevamente en agar mineral con extracto de levadura. Adicionalmente, se realizó la tinción de Gram para su observación microscópica.

4.6 Utilización de hidrocarburos como fuente de carbono por las cepas aisladas

Las cepas se sometieron a pruebas de degradación de los hidrocarburos aromáticos benceno, tolueno y xileno mediante dos metodologías. En la primera, las cepas se sembraron en medio mineral por estría abierta en cuadrantes y en la tapa se colocó un papel filtro estéril impregnado con 200 μ l de cada uno de los hidrocarburos (Figura 9a) (Chikere, 2009). En la segunda metodología, las cepas sembradas se incubaron en una atmósfera de hidrocarburos en una jarra de Gas Pack o frasco hermético de 5 L (Figura 9b)(comunicación personal César Hernández Rodríguez) durante 5 días a 28 °C.



(b).



Figura 9. Metodologías para evaluar el crecimiento en hidrocarburos aromáticos (a) Metodología de papel filtro en placa, (b) Incubación en atmósfera de tolueno de aislados

4.7 Extracción de DNA de cepas aisladas

Con el propósito de reconocer diferentes especies bacterianas de morfología colonial similar, se realizó el RAPD como una técnica de genotipificación.

Se extrajo el DNA genómico de las cepas aisladas a partir de un cultivo de 24 h por la técnica de CTAB (Murray *et al.*, 1980)(AnexoB). La calidad del DNA de cada muestra se valoró mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

4.8 Selección de genotipos mediante análisis RAPD (Randomly amplified polymorphic DNA)

Los perfiles RAPD se obtuvieron utilizando la siguiente mezcla de reacción: 20 ng/ μ l de DNA molde, 2.5 μ l de buffer 10X (5 mM KCl, 1 mM Tris-HCl, pH 9), 25 mM MgCl₂, 10 mM, de dNTP's, 50 pM del iniciador, 2 U de *Taq* polimerasa, ajustando la reacción a 25 μ L con agua destilada. Se empleó el iniciador OPB – 01 (5' – GTT TCG CTC C – 3') (Williams *et al.*, 1990). Las condiciones de PCR fueron las siguientes (Tabla 4):

Tabla 4. Condiciones de PCR para el análisis RAPD

Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	No. de ciclos
Desnaturalización inicial	94	5	1
Desnaturalización	94	1	
Hibridación	40	1	35
Polimerización	72	1	
Extensión final	72	5	1

4.9 Identificación molecular mediante la secuenciación y análisis del gen 16S rRNA

Los aislados seleccionados, tanto por morfología colonial como por el análisis RAPD, fueron identificados mediante el análisis de las secuencias del gen 16S rRNA. Para la amplificación del gen se empleó la siguiente mezcla de reacción: 4 ng de DNA molde, 2.5 µl de buffer 10X, 50 mM MgCl₂, 0.25 mM de cada dNTP, 10 pM de cada iniciador, 1 U de Taq polimerasa, ajustando la reacción a 25 µl con agua destilada. Los iniciadores que se utilizaron fueron 8 (5'-GCG GAT CCG CGG CCG CTG CAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3') y 1492 (5'-GGC TCG AGC GGC CGC CCG GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') (Relman, 1993). Las condiciones de PCR fueron las siguientes (Tabla 5):

Tabla 5. Condiciones de PCR para amplificar el gen 16S rRNA

	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	No. de ciclos
Desnaturalización inicial	94	7	1
Desnaturalización	94	1	
Hibridación	55	1	35
Polimerización	72	1	
Extensión final	72	7	1

Los fragmentos se purificaron a partir de un gel de agarosa utilizando el juego de reactivos comercial "QIAquick Gel Extraction Kit" (QIAGEN), siguiendo las

instrucciones del fabricante. Se confirmó la pureza mediante un nuevo corrimiento en gel de agarosa al 1%.

La secuenciación se realizó en un secuenciador ABI PRISM 310 Genetic Analyzer PE (Applied Biosystems) servicio realizado por la Dra. Laura Márquez del Instituto de Biología de la UNAM.

Las secuencias nucleotídicas obtenidas se compararon en la base de datos de NCBI mediante análisis blast en la página del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Se bajaron secuencias relacionadas y se realizó un alineamiento en el programa Clustal X versión 2.0 (Larkin *et al.*, 2007), con los parámetros de lento/seguro, 15 para apertura de gaps, 6.66 para extensión, eliminación de secuencias divergentes en 30% o más, peso de 0.5 para las transiciones y la matriz IUB para peso del DNA, no se utilizó matriz negativa. Las secuencias se editaron manualmente con el programa "SeaView" (Galtier *et al.*, 1996). Se empleó el método de distancia, para obtener los árboles filogenéticos se empleó el paquete de programas computacionales MEGA versión 2.1, se empleó el método de agrupamiento de Neighbor Joining y se realizó un análisis de remuestreo ("bootstrap") con 10,000 aleatorizaciones.

La afiliación filogenética se hizo tomando como criterio general los límites de género propuestos por Rosello-Mora y Amann (2001). En su trabajo, ellos consideran <95, 95>97.5 y >97.5% como límites para definir los niveles taxonómicos de familia, género y especie respectivamente.

4.10 Amplificación de genes que codifican para oxigenasas

4.10.1 Diseño de Iniciadores

Se diseñaron oligonucleótidos para las 5 enzimas tipo oxigenasas a partir de un alineamiento múltiple de secuencias completas de los genes que codifican para cada enzima disponibles en el banco de genes (GenBank); el número de secuencias fue diferente para cada enzima. Las secuencias se alinearon con el programa CLUSTAL X versión 2.0 (Larkin *et al.* 2007); con los parámetros de

lento/seguro, 15 para apertura de gaps, 6.66 para extensión, eliminación de secuencias divergentes en 30% o más, peso de 0.5 para las transiciones y la matriz IUB para peso del DNA, no se utilizó matriz negativa. Las secuencias se editaron manualmente con el programa “SeaView” (Galtier et al., 1996). Se eligieron regiones conservadas que permitieran diseñar oligonucleótidos con al menos 20 bases que incluyeron con el menor número de degeneraciones.

Para las secuencias en aminoácidos se empleó el programa ProtTest versión 2.4 como una herramienta para llevar a cabo la selección estadística del mejor modelo de evolución de proteínas entre un grupo de modelos candidatos. Se aplicó el método de distancia usando el parámetro 2 de kimura.



5. Resultados

5.1 Evaluación de la diversidad bacteriana y la estabilización de consorcios por PCR-DGGE de la región V6-V8 del gen 16S rRNA

Las muestras de suelos colectadas, rizosféricas y no rizosféricas, fueron inoculadas en medio mineral adicionado con hidrocarburo al 1%. Inicialmente se trabajó con una mezcla de compuestos alifáticos, pero debido al escaso crecimiento observado y los largos tiempos de incubación requeridos, se decidió cambiar a petróleo refinado, donde se observó un mayor crecimiento (datos no mostrados). Se realizaron pases sucesivos en medio mineral hasta alcanzar la estabilización del consorcio, misma que se observó en el quinto pase, evaluado a través de un PCR-DGGE del gen 16S rRNA (V6-V8).

A cada uno de los enriquecimientos sucesivos, del tratamiento con petróleo refinado, se extrajo el DNA (figura 10).

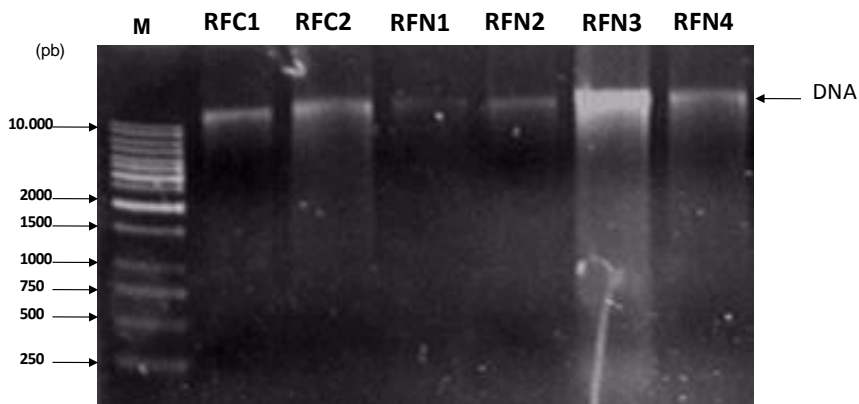


Figura 10. Extracción del DNA metagenómico del primer cultivo de enriquecimiento con petróleo refinado. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. M, marcador de talla molecular y suelos rizosféricos y no rizosféricos (RFC1-rizosfera contaminada 1, RFC2-rizosfera contaminada 2, RFN1- rizofera no contaminada 1, RPN2- rizofera no contaminada 2, RFN3-rizofera no contaminada 3, RFN4- rizofera no contaminada 4).

A partir de los DNA metagenómicos de cada cultivo de enriquecimiento, se amplificó la región V6-V8 del gen 16S rRNA, obteniéndose fragmentos con un tamaño de 500 pb (Figura 11).



Figura 11. Amplificados de la región V6-V8 del gen 16S rRNA a partir de DNA metagenómico. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, M marcador de talla molecular 100 pb, carril 2-7 amplificados de la región V6-V8 correspondientes al pase II de los suelos. RPC-rizoplano contaminado, RFC-rizosfera contaminada, RPN1-rizoplano no contaminado 1, RPN2-rizoplano no contaminado 2, RFN1- rizofera no contaminada 1, RFN2- rizofera no contaminada 2.

El DGGE permitió ver diferencias entre la diversidad bacteriana de las muestras de rizoplanos y rizosferas (Figura 12). Se observó que 5 de las bandas se conservaban en todos los suelos, tanto en la rizosferas como en los rizoplanos contaminados y no contaminados. Sin embargo, en los suelos no contaminados la intensidad y el número de la bandas fue mayor, observándose una disminución de bandas en los suelos rizosféricos contaminados. Mientras que en los suelos correspondientes a los rizoplanos contaminados y no contaminados se conservaron 3 bandas y en las rizosferas solo se observó una banda, indicando un efecto negativo de los hidrocarburos sobre la diversidad y densidad de las poblaciones microbianas presentes en los suelos contaminados. Aunque en el rizoplano contaminado hubo reducción en el número de bandas, se observó un aumento en la intensidad de las restantes, tal vez por aumento en la población de los microorganismos hidrocarbonoclastas. Asimismo se observó una cantidad mayor de bandas presentes en los rizoplanos en comparación con los suelos rizosféricos, indicando una diversidad microbiana mayor en los rizoplanos. En

cuanto a la sucesión del consorcio a lo largo del tiempo, se observó que entre el 4° pase hubo estabilización de la mayoría de bandas de las diferentes muestras, indicando que la estabilización del consorcio se alcanzó durante el 4° y 5° pase.

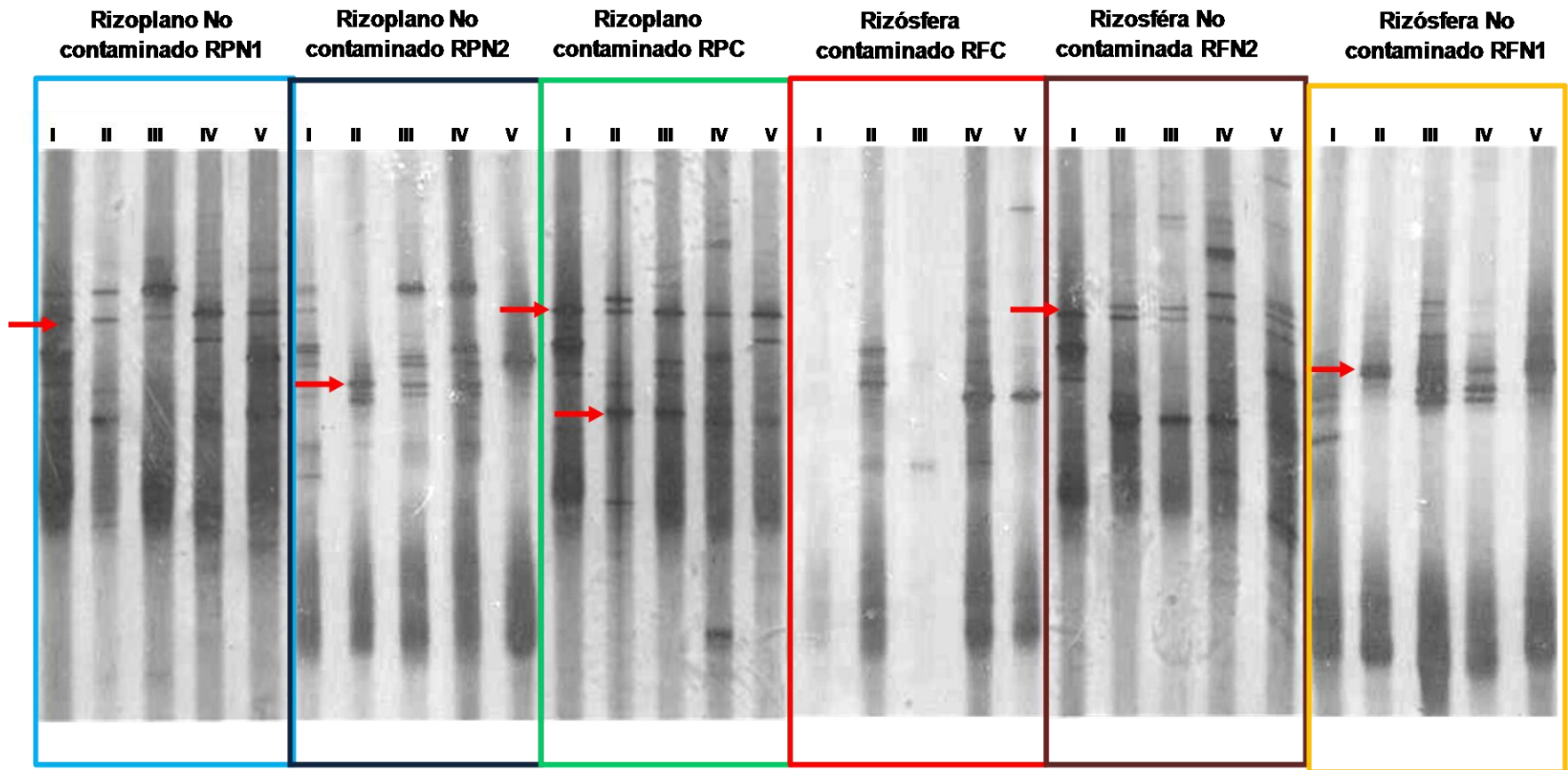


Figura 12. DGGE de la región V6-V8 de los cultivos de enriquecimiento de las diferentes muestras de suelos. I, II, III, IV y V corresponden al número de pase. Se usó un gradiente 20-80%. Las flechas rojas indican las bandas conservadas durante los 5 pases de enriquecimiento.

5.2 Aislamiento e identificación de bacterias en el consorcio

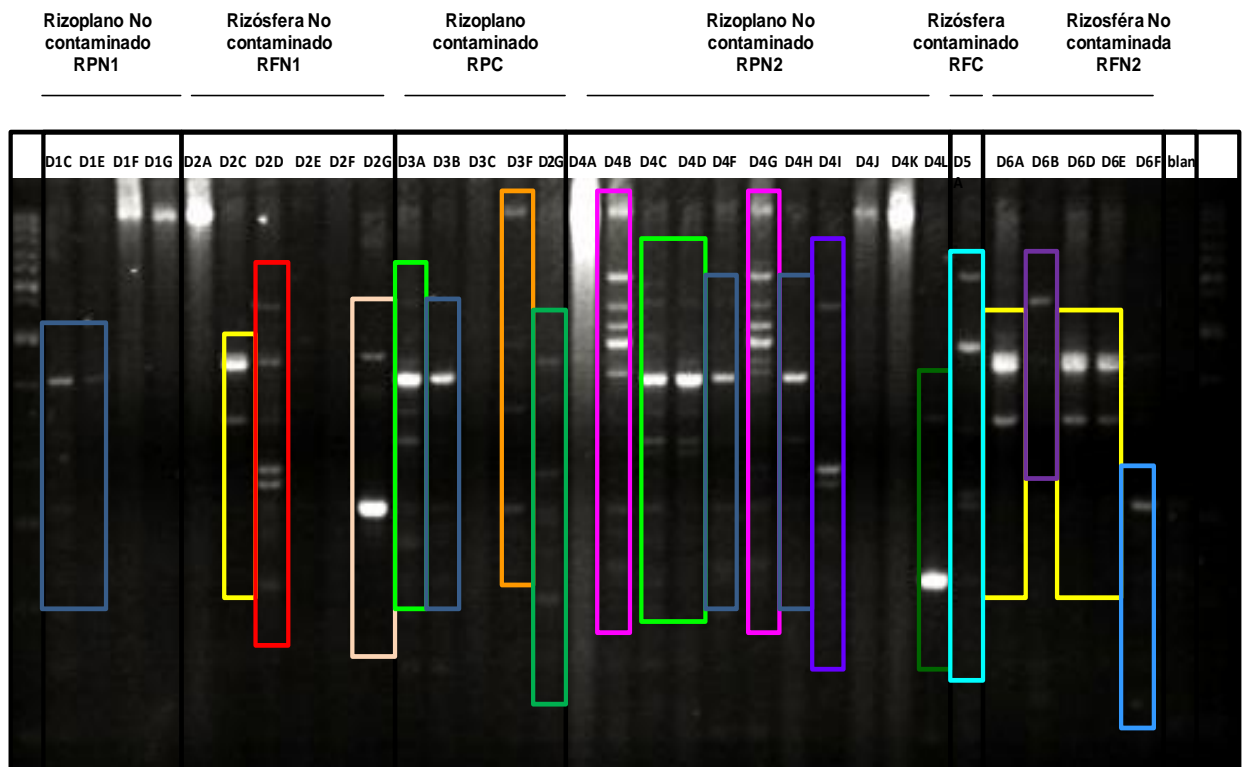
Una vez que se alcanzó la estabilización del consorcio, a través de los cultivos de enriquecimiento, en el cuarto pase, se procedió al aislamiento de microorganismos a partir de este pase. Se aislaron microorganismos con capacidad para crecer en hidrocarburos como única fuente de carbono. Encontrando una mayor diversidad de morfologías coloniales en los suelos no contaminados (Tabla 6). El morfotipo de distribución más amplia en los suelos evaluados correspondió a colonias de 0.4 cm de diámetro, cafés, con centro oscuro. Distribuidos en los cinco suelos se observaron 7 morfotipos diferentes, y en total 32 bacterias fueron obtenidas a partir del IV pase o cultivo de enriquecimiento.

Tabla 6. Número de aislados y morfotipos en los suelos

	Rizofera Contaminada 1	Rizósfera No contaminada 2	Rizósfera No contaminada 1	Rizosfera No contaminada 3	Rizósfera Contaminada 2	Rizósfera No contaminada 4
No. Aislados	6	6	4	11	1	5
No. Morfotipos	2	5	3	4	1	3

Morfotipo	1	2	3	4	5	6	7
Tamaño	3 mm	3 mm	5 mm	1mm	1 mm	5 mm	5 mm
Color	Café	Roja	Amarillo	Café	Rosada	Amarillas oscuros	Amarillas oscuras
Forma	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular
Consistencia	Mucosa	Mucosa	Mucosa	Blanda	Blanda	Mucosa	Mucosa
Luz transmitida	Traslúcida	Opaca	Traslúcida	Opaca	Opaca	Traslúcida	Traslúcida
Luz reflejada	Brillante	Brillante	Brillante	Brillante	Brillante	Brillante	Brillante
Elevación	Plana convexa	Plana	Plana	Plana	Plana	Plana	Plana
Borde	Irregular	Regular	Irregular	Regular	Regular	Regular	Regular
Gram	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Morfología microscópica	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo
Clave	CAF	ROJ	AMA	CAE	ROS	AMO	AMV

Con la finalidad de identificar molecularmente los aislados, se extrajo el DNA cromosomal de todos los aislados. Posteriormente, se realizó un RAPD, como prueba tamiz para establecer si existían clonas que correspondían al mismo aislado, como se describió en la sección de materiales y métodos. Así, se obtuvieron 13 perfiles diferentes en el análisis RAPD (Figura 13.). De los aislados que compartieron perfiles RAPD en un mismo suelo se tomó un representante para realizar las pruebas posteriores resultando un total 22 aislados (Tabla 7.).



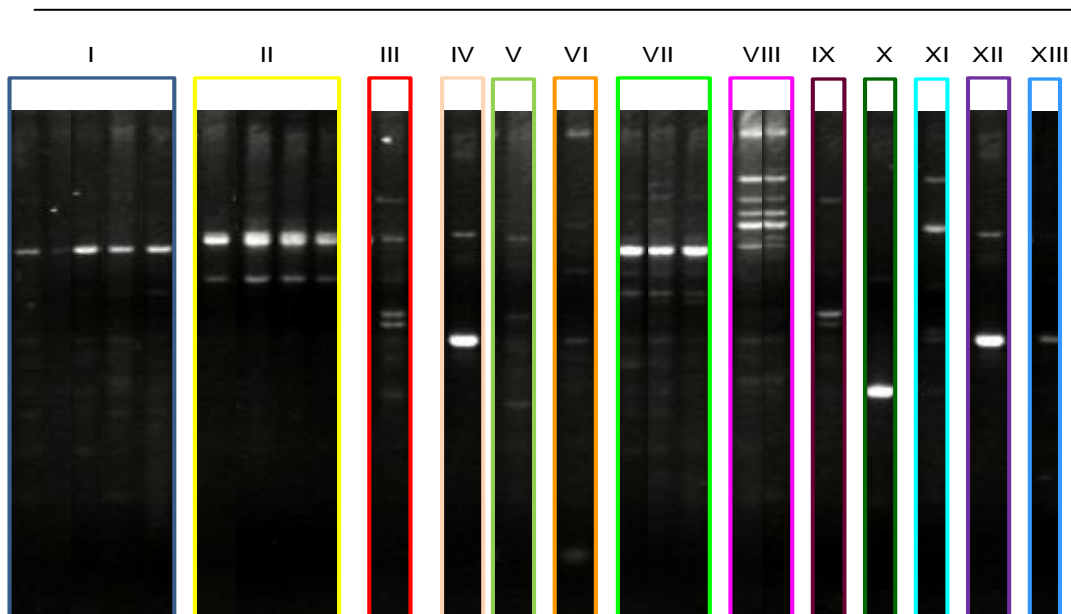


Figura 13. Perfiles RAPD de las bacterias aisladas. Cada color indica un perfil RAPD diferente, en total 13 en los diferentes suelos.

Tabla 7. Clasificación de los aislados por perfiles RAPD

Perfil RAPD	Aislados	Morfotipo	Suelo
I	D1C, D1E, D3B, D4F, D4H	CAF	RFN1, RFC1, RFN3
II	D2C, D6A, D6D, D6E	AMA	RFN1, RFC 2
III	D2D	ROJ	RFN1
IV	D2G	ROS	RFN1
V	D3A, D4C, D4D	CAF	RFN2, RFN3
VI	D3F	CAE	RFC1
VII	D3G	ROS	RFC1
VIII	D4B, D4G	ROJ	RFC1
IX	D4I	ROJ	RFN3
X	D4L	AMO	RFN3
XI	D5A	AMV	RFC2
XII	D6B	AMV	RFC4
XIII	D6F	ROS	RFC4

*Sp: Sin perfil RAPD

Se amplificó el gen 16S rRNA de cada uno de los 22 aislados para la posterior secuenciación e identificación (Figura 14).

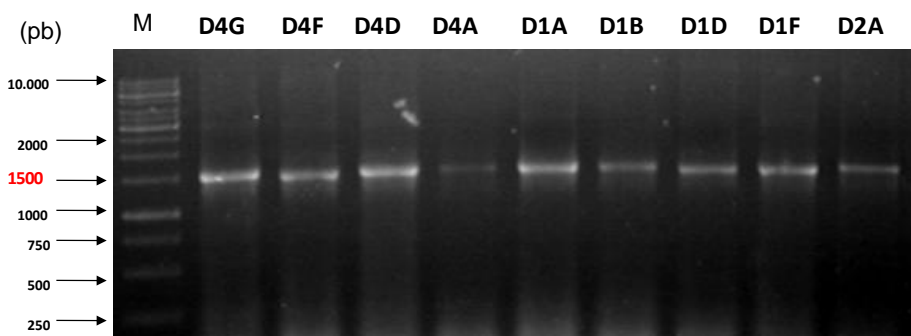


Figura 14. Amplificación del gen 16S rRNA de los aislados obtenidos a partir de los suelos rizosféricos y no rizosféricos de plantas que crecen en sitios contaminados con hidrocarburos. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. M, marcador de talla molecular; D4G, D4F, D4D, D4A, D1A, D1B, D1D, D1F Y D2A corresponden a los productos de PCR del gen 16S rRNA obtenidos a partir del DNA genómico de los aislados.

Los aislados se identificaron molecularmente mediante la secuenciación del gen 16S rRNA. Se secuenció un fragmento de 1500 pb. Se identificaron 9 diferentes especies bacterianas (Figuras 15, 16 y 17 y Tabla 8). Todas las secuencias tienen una similitud mayor al 90% con secuencias reportadas en la base de datos del NCBI (Tabla 8). De los microorganismos identificados 7 fueron relacionados con el género *Ralstonia*, 5 con *Burkholderia* y 2 con *Achromobacter* todos pertenecientes al grupo de las β -proteobacterias; dentro de las γ -proteobacterias se identificó a *Pseudomonas* y 3 aislados se identificaron como *Serratia*, dentro de la actinobacterias se identificó a *Cellulomonas* y a *Arthobacter* y finalmente en las α -proteobacterias dos bacterias se identificaron dentro del género *Caulobacter*.

Tabla 8. Aislados obtenidos a partir de suelos rizosféricos de plantas que crecen en sitios contaminados con hidrocarburos

Secuencia con mayor homología (No. de acceso al GenBank)	Porcentaje de Similitud	Identificación
<i>Ralstonia insidiosa</i> (FJ772078)	99.8	<i>Ralstonia insidiosa</i>
<i>Cellulomonas gélida</i> (X83800)	91.38	<i>Cellulomonas</i> sp.
<i>Burkholderia brasilensis</i> (AJ238360)	98.7	<i>Burkholderia brasilensis</i>
<i>Serratia rubidaea</i> (EF693785)	91.08	<i>Serratia</i> sp.
<i>Caulobacter vibrioides</i> (EU730915)	97.4	<i>Caulobacter</i> sp.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (EF683087)	98.18	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Achromobacter xylosoxid</i> (DQ466568)	99.5	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>
<i>Burkholderia caribensis</i> (NR 026462)	98.02	<i>Burkholderia caribensis</i>
<i>Arthrobacter agilisstra</i> (FJ999936)	97.7	<i>Arthrobacter</i> sp.

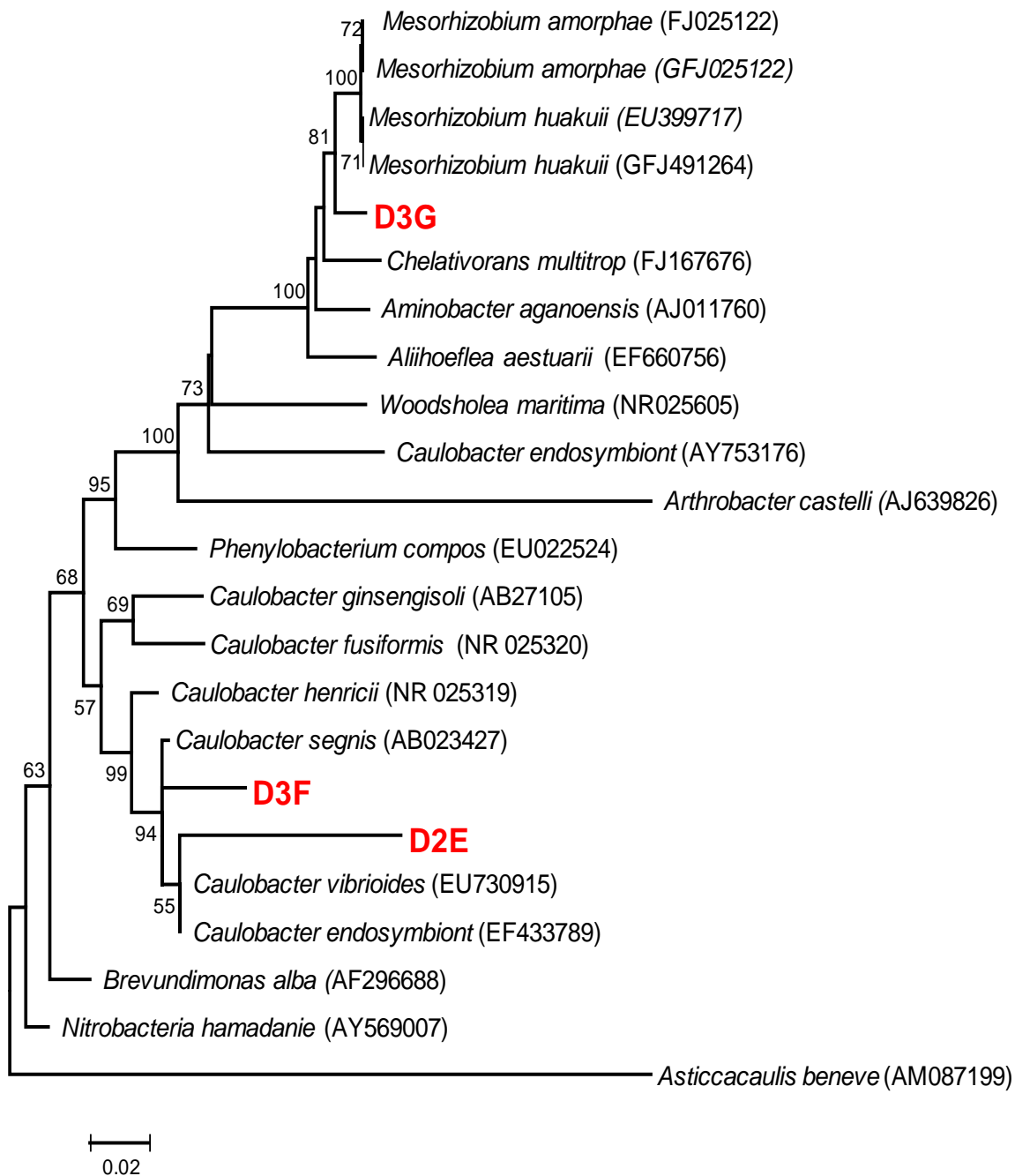


Figura 15. Filograma de las secuencias parciales del gen 16S rRNA de las cepas aisladas (α -proteobacterias). Análisis basado en los datos de las secuencias parciales del gen 16S rRNA con 10,000 aleatorizaciones tipo “Bootstrap”, por el método de agrupamiento “Neighbor Joining” usando el índice de distancia Kimura 2 Parámetros. *Asticcacaulis beneve* se utilizó como grupo externo. La barra indica el número de cambios en toda la secuencia.

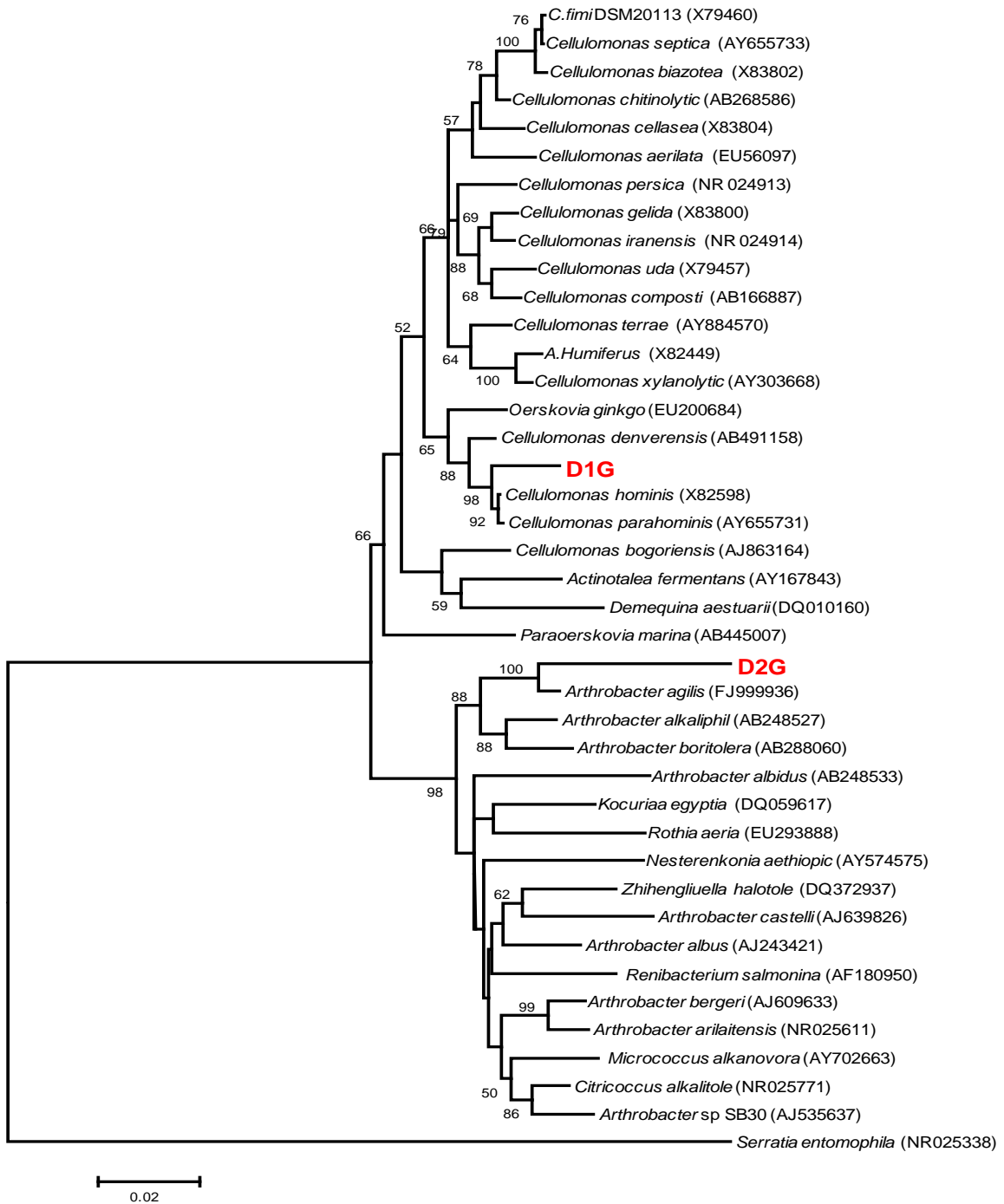


Figura 16. Filograma de las secuencias parciales del gen 16S rRNA de las cepas aisladas (Actinobacterias). Análisis basado en los datos de las secuencias parciales del gen 16S rRNA con 10,000 aleatorizaciones tipo “Bootstrap”, por el método de agrupamiento “Neighbor Joining” usando el índice de distancia Kimura 2 Parámetros. *Serratia entomophila* se utilizó como grupo externo. La barra indica el número de cambios en toda la secuencia.

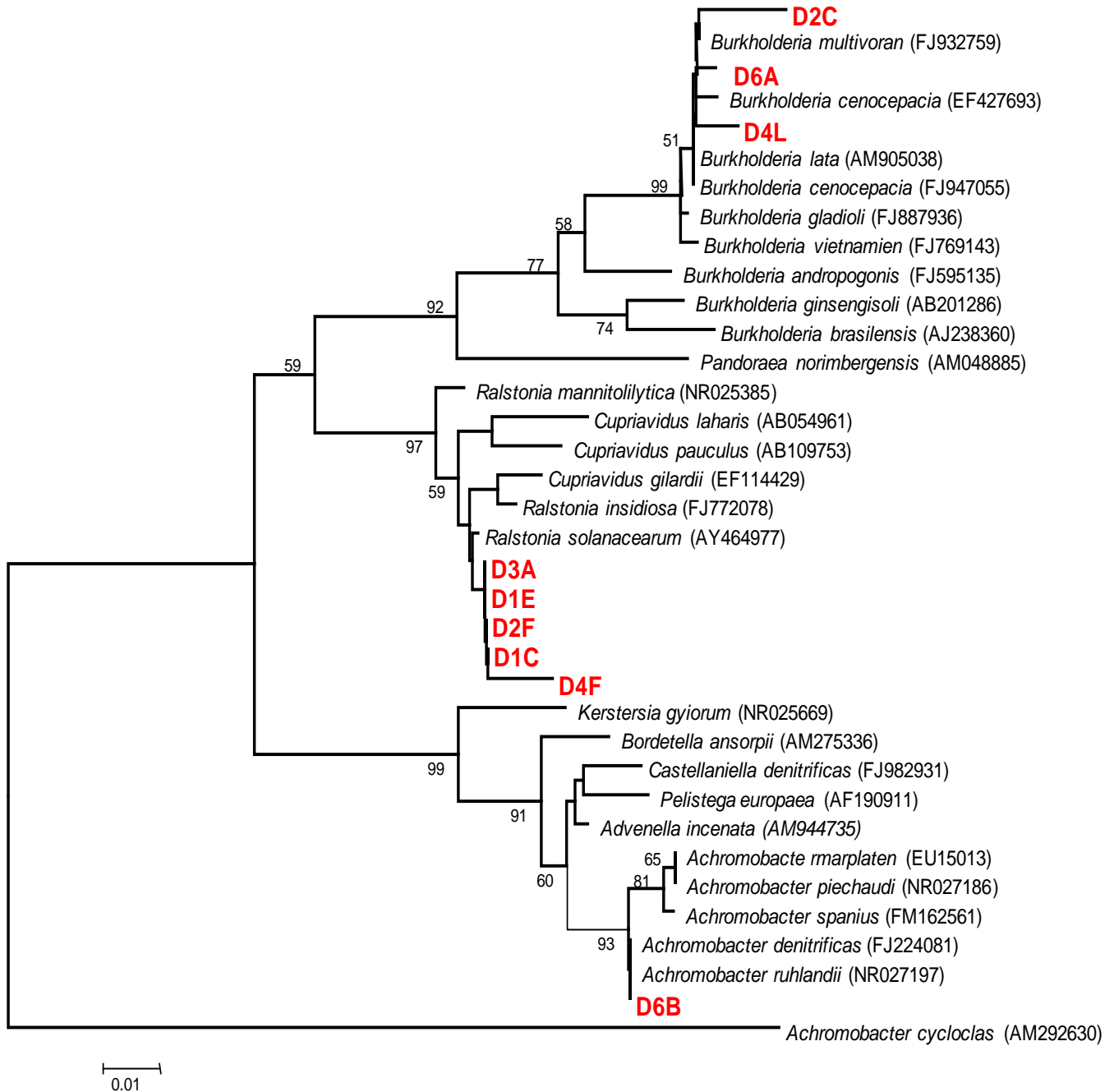


Figura 17. Filograma de las secuencias parciales del gen 16S rRNA de las cepas aisladas (β -proteobacterias). Análisis basado en los datos de las secuencias parciales del gen 16S rRNA con 10,000 aleatorizaciones tipo “Bootstrap”, por el método de agrupamiento “Neighbor Joining” usando el índice de distancia Kimura 2 Parámetros. *Achromobacter cycloclas* fue utilizado como grupo externo. La barra indica el número de cambios en toda la secuencia.

5.3 Distribución de géneros microbianos en los diferentes suelos.

Se observó que el género microbiano de más amplia distribución en los suelos fue *Ralstonia*. Además se determinó que el género *Pseudomonas* solo fue aislado del suelo rizosférico contaminado. El suelo donde se aisló la mayor cantidad de géneros microbianos fue la rizósfera concontaminada 1.

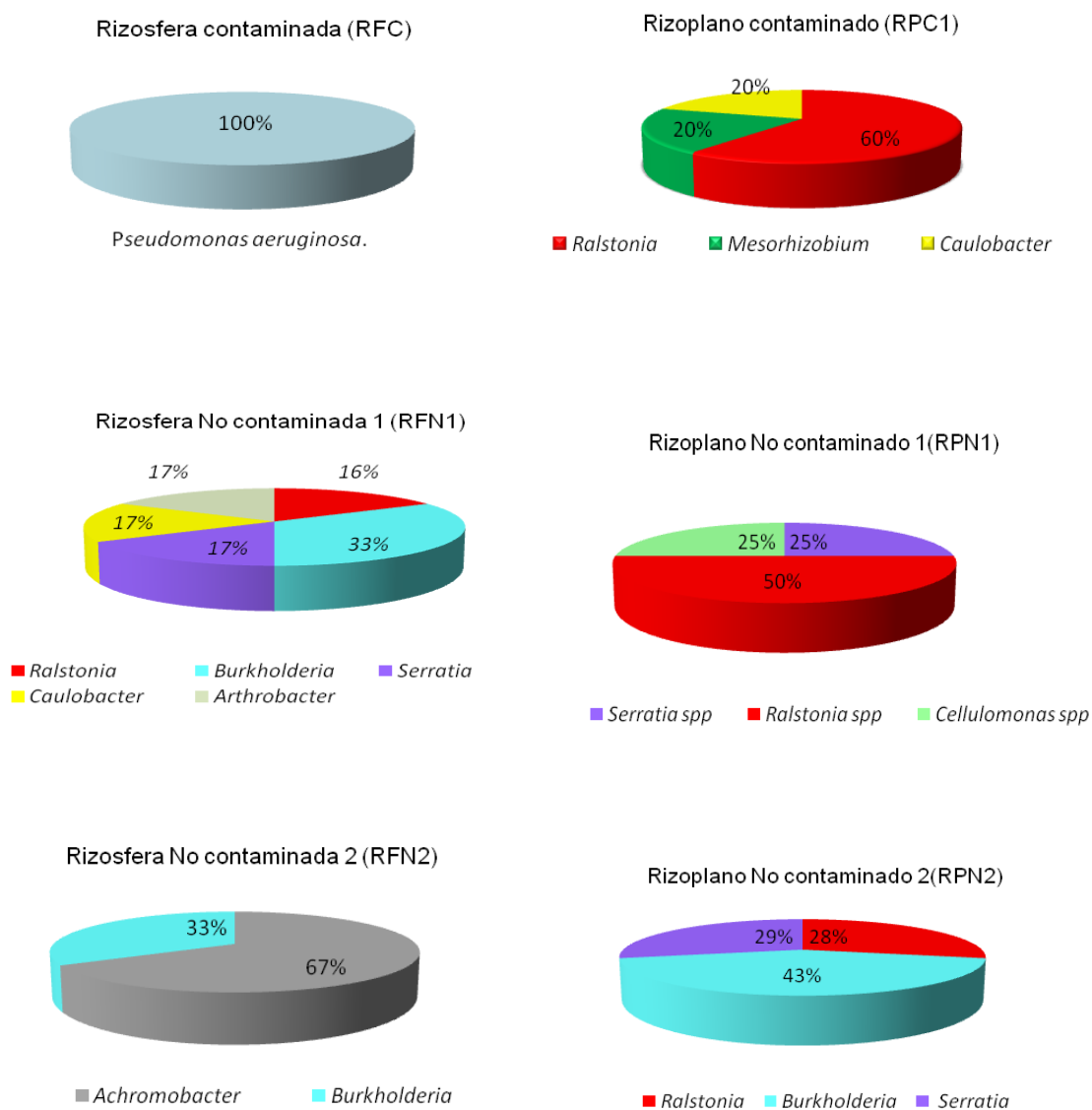


Figura 18. Distribución de las bacterias aisladas en los diferentes suelos.

5.4 Crecimiento en BTX (benceno, tolueno y xileno)

Las bacterias identificadas se sometieron a pruebas de crecimiento en medio mineral con la adición de benceno, tolueno y xileno de forma independiente; observándose que la mayor parte de los microorganismos crecieron en benceno y tolueno, a diferencia del xileno donde crecieron muy pocos.

Los géneros con mayor capacidad para crecer en dichos medios fueron *Ralstonia*, *Burkholderia* y *Serratia* (Tabla 9).

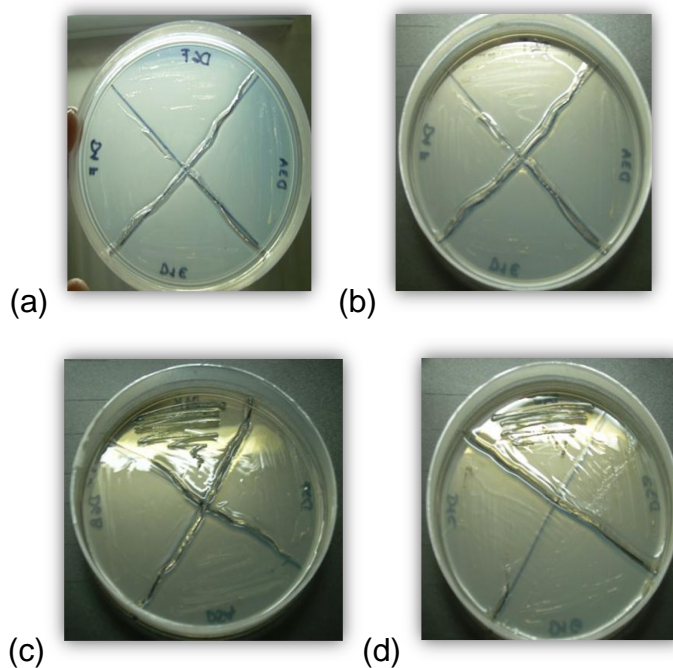


Figura 19. Pruebas de crecimiento en hidrocarburos aromáticos (a). Crecimiento en tolueno de *Cellulomonas* (b) Crecimiento en xileno de *Ralstonia* (c,d) Crecimiento en benceno de *Burkholderia* y *Ralstonia* respectivamente; se usó la técnica del papel filtro impregnado con hidrocarburos.

Tabla 9. Crecimiento de aislados con hidrocarburos aromáticos como única fuente de carbono.

	RPN1		RFN1		RPC		RPN2		RFC		RFN2	
	Cepa	Afiliación	Cepa	Afiliación	Cepa	Afiliación	Cepa	Afiliación	Cepa	Afiliación	Cepa	Afiliación
Benceno	D1G	<i>Cellulomonas</i>	D2D	<i>Serratia</i>	D3F	<i>Caulobacter</i>	D4K	<i>Bulkholderia</i>			D6A	<i>Bulkholderia</i>
	D1F	<i>Serratia</i>	D2E	<i>Caulobacter</i>	D3B	<i>Bulkholderia</i>	D4L	<i>Bulkholderia</i>			D6B	<i>Achromobacter</i>
	D1C	<i>Ralstonia</i>	D2G	<i>Arthobacter</i>	D3C	<i>Ralstonia</i>	D4A	<i>Bulkholderia</i>				
	D1E	<i>Ralstonia</i>			D3A	<i>Ralstonia</i>	D4G	<i>Serratia</i>				
Tolueno	D1G	<i>Cellulomonas</i>	D2D	<i>Serratia</i>	D3B	<i>Bulkholderia</i>	D4J	<i>Bulkholderia</i>	D5A	<i>Pseudomonas</i>	D6A	<i>Bulkholderia</i>
	D1C	<i>Ralstonia</i>	D2F	<i>Ralstonia</i>	D3C	<i>Ralstonia</i>	D4F	<i>Ralstonia</i>				
			D2C	<i>Bulkholderia</i>	D3F	<i>Caulobacter</i>	D4L	<i>Bulkholderia</i>				
			D2A	<i>Bulkholderia</i>	D3A	<i>Ralstonia</i>	D4K	<i>Bulkholderia</i>				
							D4G	<i>Serratia</i>				
Xileno	D1C	<i>Ralstonia</i>	D2D	<i>Serratia</i>	D3C	<i>Ralstonia</i>	D4L	<i>Bulkholderia</i>	D5A	<i>Pseudomonas</i>	D6F	<i>Achromobacter</i>
	D1F	<i>Serratia</i>			D3A	<i>Ralstonia</i>	D4J	<i>Bulkholderia</i>			D6B	<i>Achromobacter</i>
							D4K	<i>Bulkholderia</i>				
							D4I	<i>Serratia</i>				

5.5 Detección de genes que codifican para enzimas tipo oxigenasas

En literatura se han reportan varios iniciadores para amplificar genes de las diferentes familias de oxigenasas, sin embargo en este trabajo se decidió diseñar nuevos iniciadores debido a que se quería abarcar la mayor cantidad de familias de enzimas presentes. Así, se sintetizaron iniciadores para 5 enzimas tipo oxigenasas: naftaleno dioxigenasa, benceno monooxigenasa, tolueno dioxigenasa y bifeníl monooxigenasa, buscando amplificar una mayor diversidad de géneros microbianos (Tabla 10). Además, se llevó a cabo una PCR en gradiente de temperatura para establecer la T_m de cada par de oligonucleótidos (Figura 20).

Se lograron amplificar 4 secuencias que codifican para la subunidad alfa de la enzima bifeníl dioxigenasa (Figura 21) en los géneros *Ralstonia* y *Burkholderia*. Así mismo se obtuvo una clona a partir del amplificado del DNA metagenómico de la rizosfera contaminada, y una secuencia más se amplificó para la enzima benceno 1,2 dioxigenasa para *Burkholderia* sp. (Figura 23). También se obtuvo un amplificado del tamaño esperado para la enzima tolueno dioxigenasa, sin embargo al secuenciarse no se logró identificar.

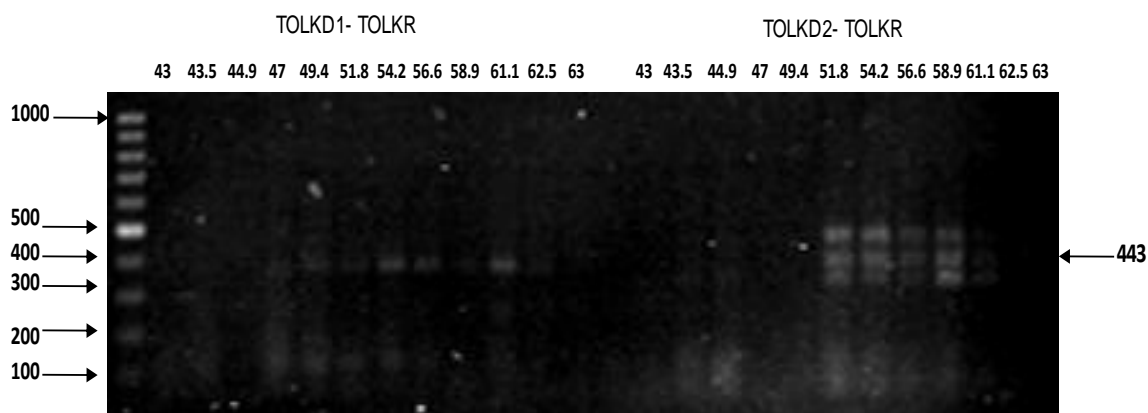


Figura 20. PCR en gradiente de temperatura para determinar la T_m adecuada para los iniciadores de la tolueno dioxigena. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. M, marcador de talla molecular. Los carriles 2-13 y 15-26 corresponden a las temperaturas probadas en el PCR en gradiente para los dos pares de oligonucleótidos diseñados (TOLKD1-TOLKR y TOLKD2-TOLKR).

Tabla 10. Iniciadores diseñados en este trabajo para genes que codifican para enzimas oxigenasas

Primer	Enzima	Secuencia	Posición	Oligo	Tm (°C)	N° Nucleótidos	Tamaño esperado (pb)
NAFAKD NAFAKR	Naftaleno dioxigenasa familia A	AB066446 <i>Ralstonia sp.</i>	136 771	5' CTATGCGCAGTCGAAGCG 3' 5' CGGTACATTTGAATGGAACC 3'	56	18 21	635
NAFBKD NAFBKR	Naftaleno dioxigenasa familia B	AF039533 <i>Pseudomonas stutzeri</i>	47 1071	5' AAAARCACCTGATTYATGGCG 3' 5' CTGGGAAAGCGACGACAA 3'	54	21 18	1024
NAFCKD NAFCKR	Naftaleno dioxigenasa familia C	AF053737 <i>Cycloclasticus sp</i>	65 511	5' TGGATAGAGATTCGTTAAGC 3' 5' CAAGGTGGCAGAGAATTGG 3'	53	20 19	446
BENKD BENK1R BENK2R	Benceno monooxigenasa	AY205602 <i>Pseudomonas sp.</i>	167 834 834	5' TGACCATGGAYGCSTACTGG 3' 5' GATGATGGAYTACATGCTGCC 3' 5' GATGCAGGAYTACATGCTGCC 3'	51.8	20 21 21	667
TOLK1D TOLK2D TOLKR	Tolueno dioxigenasa	EU825676 <i>Bordetella sp.</i>	400 400 843	5' TACGAGGCCGAATCCTTC 3' 5' TTCGAGGCTGAATCCTTC 3' 5' CACCAGCTACTGGACCGAA 3'	52	18 18 19	443
XILKD1 XILKD2 XILKR	Xileno monooxigenasa	AF01935 <i>Pseudomonas putida</i>	1 1 1057	5' ATGGACACGCTTCGTTATTACC 3' 5' ATGGATACGGTTCGTTACTACC 3' 5' GATGGCCACTGTGGTGTGAAA 3'	54.2	22 22 21	1057
BIFKD1 BIFKR1 BIFKD2 BIFKR2	Bifenil monooxigenasa	GU991852 <i>Pandoraea pnomenusa</i>	568 1147 288 1236	5' GCGAAGTTCTACATGGACCACATG 3' 5' GAKCAGGACGACGGSGAGAACTG 3' 5' CCTRAACCAGTGCCGSCACCG 3' 5'GGCGAGAACTGGGTSGAGATCCAG 3'	62.5	24 23 21 24	576 948

Con los oligonucleótidos diseñados para la bifenil 2,3 dioxigenas, se obtuvieron bandas inespecíficas entre ellas la esperada de 948 pb (Figura 21) por tanto se realizó un corte de banda del gel de agarosa y luego se purificó y se envío a secuenciar.

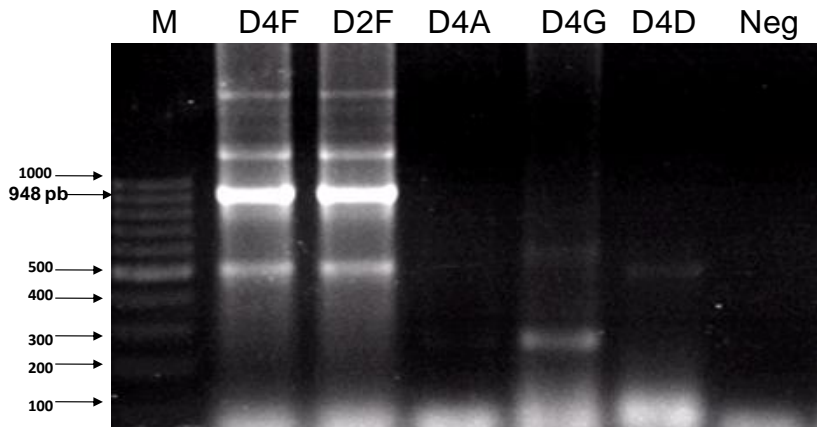


Figura 21. Productos obtenidos con los oligonucleótidos BIFKD2 Y BIFKR2 correspondiente a la subunidad α de la enzimas bifenil 2,3 dioxigenasa. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. M marcador de talla molecular 100 pb. D4F, D2F, D4A, D4G, D4D cepas aisladas.

Los amplificados obtenidos con los oligonucleótidos diseñados para la tolueno dioxigenasa correspondían al tamaño esperado (443 pb) (Figura 22), sin embargo tenían poca intensidad y al ser secuenciados no se lograron asociar con ninguna secuencia disponible en las bases de datos.

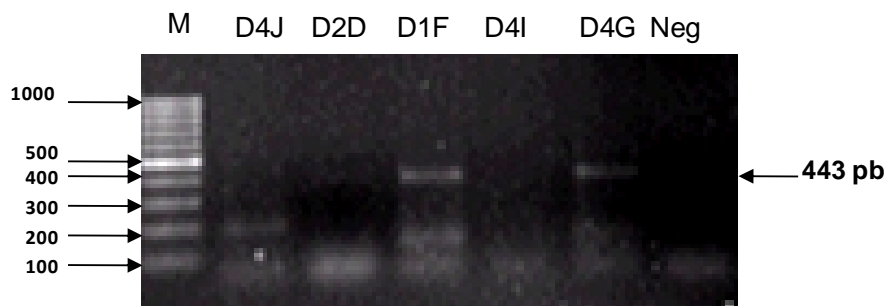


Figura 22. Productos obtenidos con los oligos TOLKD2 Y TOLKR correspondiente a la subunidad α de la enzimas tolueno dioxigenasa. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. M marcador de talla molecular 100 pb; D4J, D2D, D1F, D4I, D4G cepas aisladas.

La detección de la enzima benceno 1,3 dioxigenasa solo se logró para una de las cepas identificadas como *Burkholderia* sp., para las restantes no se obtuvo ningún amplificado (Figura 23).

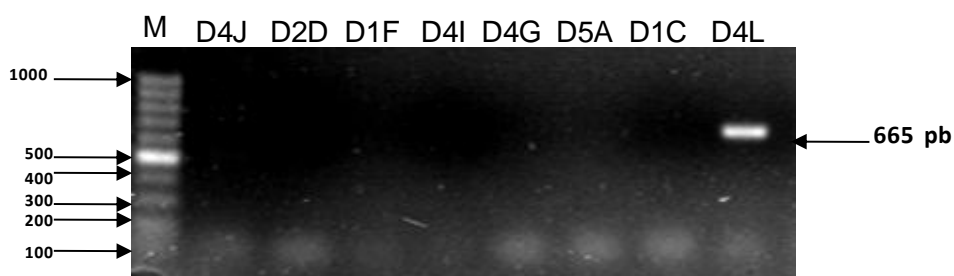


Figura 23. Productos obtenidos con los oligos BENKD y BENKR1 correspondiente a la subunidad α de la enzimas benceno 1,2 dioxigenasa. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. M marcador de talla molecular 100 pb; D4J, D2D, D1F, D4I, D4G cepas aisladas.

A partir de la secuencias de aminoácidos de las enzimas detectas y de secuencias reportadas en bases de datos para cada uno de los genes que codifican para la subunidad α de la bifenil 2,3 dioxigenasa y la benceno 1,2 dioxigenasa, se construyó una árbol filogenético para establecer la relación de las enzimas encontradas y se observó que las enzimas bifenil detectadas están muy relacionadas entre sí, a pesar de ser identificadas en 2 géneros diferentes, suponiendo una posible transferencia de genes entre especies. La enzima benceno 1,2 dioxigenas detectada se agrupada con otras enzimas benceno dioxigenasas de otros géneros, y con enzimas del grupo de la fenol y tolueno monooxigenasas.

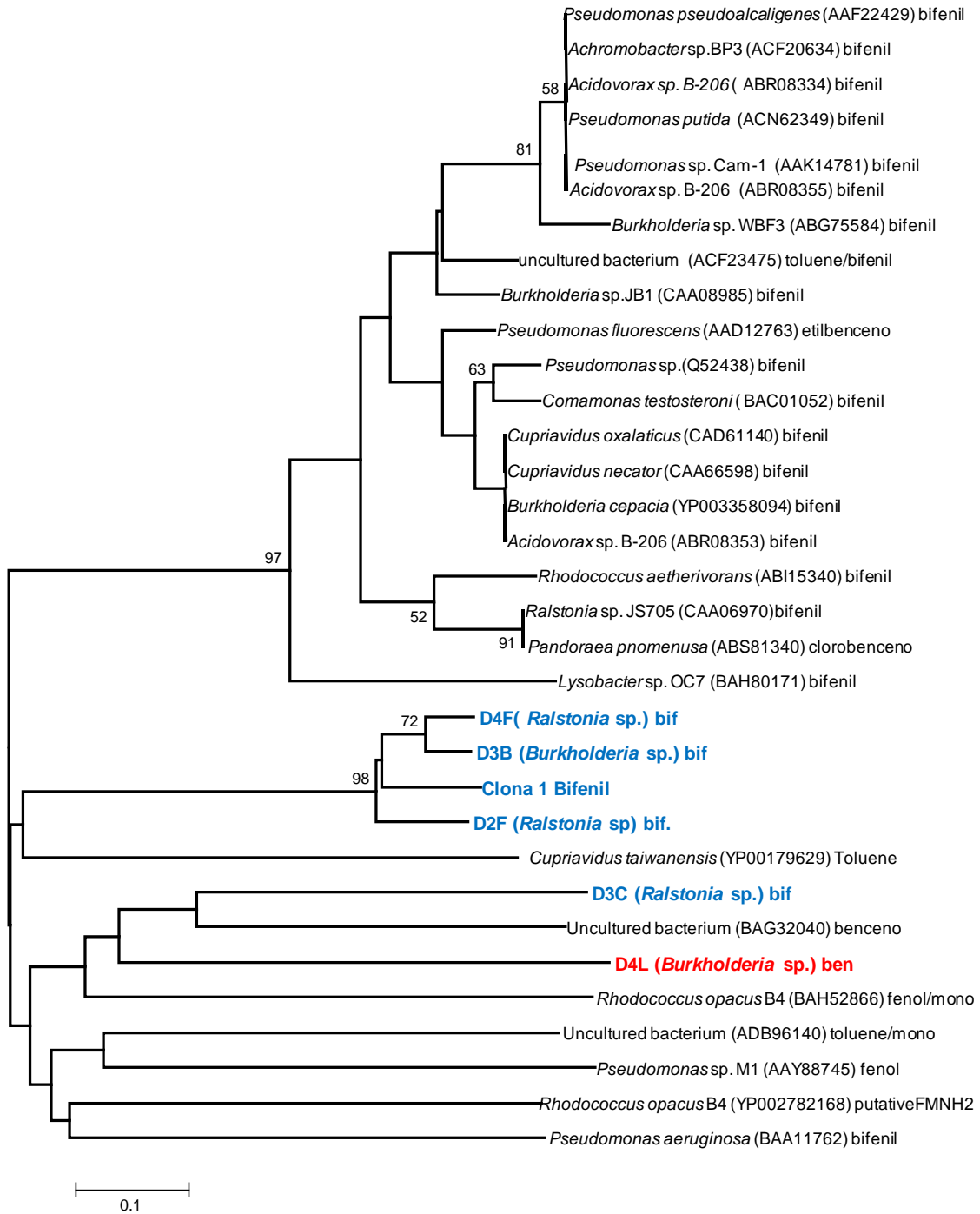


Figura 24. Filograma de las secuencias aminoácidas parciales de los genes *bphA* y *bedC* que codifica para la subunidad α de la bifenil monooxigenasa de las cepas aisladas. Análisis basado en los datos de las secuencias de aminoácidos parciales de los genes *bphA* y *bedC* por el método de distancia. La barra indica el número de cambios en toda la secuencia.

6. Discusión

Actualmente, el estudio e implementación de plantas y microorganismos asociados a sus raíces en suelos contaminados con hidrocarburos es una alternativa en la eliminación o reducción de dichos contaminantes; las poblaciones microbianas varían en la diversidad y distribución de especies, dependiendo de numerosos factores bióticos y abióticos. Esos factores incluyen la edad de la planta, la disponibilidad de nutrientes y exudados y las interacciones entre las poblaciones de diferentes microorganismos (Baker *et al.*, 2002).

En este trabajo, se estudio la comunidad de bacterias cultivables capaces de utilizar compuestos BTX como fuente de carbono a partir de cultivos de enriquecimiento inoculados con suelo rizosférico de *Cyperus* sp., plantas que crecían en suelos contaminados con petróleo. Estas plantas de la familia Cyperaceae comprenden a 600 especies que tienen una amplia distribución (Muasya *et al.*, 2002).

Se han reportado trabajos que emplearon el PCR-DGGE como una herramienta para determinar la diversidad de genes implicados en procesos de degradación de hidrocarburos en muestras ambientales. Además, de ayudar a establecer diferencias en la dinámica de poblaciones, como respuesta a modificaciones en parámetros ambientales y en estudios de monitoreo espacial o temporal de un sitio contaminado (Hendrickx *et al.*, 2005; Yoshida *et al.*, 2005). Otros trabajos, muestran el uso del PCR-DGGE en la determinación del cambio de poblaciones microbianas durante la implementación de diferentes tratamientos de biorremediación (Baek *et al.*, 2007). En este trabajo se utilizó el PCR-DGGE para analizar la estabilización de poblaciones hidrocarbonoclastas obtenidas a través de pases sucesivos de cultivos de enriquecimiento en medio mineral adicionado con petróleo refinado como única fuente de carbono y energía. En algunos casos, se observó una disminución de las bandas conforme procedió el número de enriquecimientos; en otros casos, las bandas se conservaron, mostrando una

posible selección de microorganismos con capacidad para crecer en petróleo refinado. A partir del cuarto pase se observó la estabilización de las bandas desplegadas en el PCR-DGGE, por tanto se decidió aislar los microorganismos a partir del cuarto pase o cultivo de enriquecimiento.

Se obtuvieron 32 aislados, que desplegaron 13 perfiles RAPD; sin embargo, 9 de los aislados no desplegaron ningún patrón bajo las condiciones probadas. Por lo que se decidió continuar con 22 aislados, que fueron identificados mediante la secuenciación de sus genes ribosomales. Se observó que algunos aislados estaban presentes en diferentes suelos, exhibidos mediante sus perfiles RAPD repetidos; así los aislados de las rizosferas no contaminadas compartieron un perfil, y en el caso de los aislados de los rizoplanos contaminados y no contaminados también hubo un perfil RAPD repetido. Mostrando la prevalencia de algunos microorganismos en diferentes suelos a pesar de las condiciones generadas por el contaminante.

Los consorcios provenientes de la rizofera no contaminada (RFN2) y del suelo no rizósferico (RFC1) exhibieron la mayor y la menor cantidad de perfiles RAPD respectivamente, de forma similar a lo observado en el DGGE. Las plantas pueden responder al estrés químico en el suelo con cambios en los exudados que modifican la composición o actividad de la microbiota rizósferica (Walton *et al.*, 1994). Esto puede explicar las diferencias en la diversidad de bacterias hidrocarbonoclastas observadas en este trabajo entre los diferentes suelos no rizosféricos y las rizosferas de *Cyperus* sp. Los exudados de las raíces de la planta *Sorghum bicolor* incrementan el número de microorganismos degradadores de hidrocarburos en el rizoplano comparado al recuento en la rizosfera donde la producción de exudados es menor (Muratova *et al.*, 2009).

Al parecer, en este trabajo se observó un efecto equivalente entre las rizósferas y los suelos no rizosféricos tanto en los contaminados como en los no contaminados, ya que se observó una menor diversidad de bacterias hidrocarbonoclastas cultivables y bandas en el DGGE.

Se observó que la bacteria *Ralstonia insidiosa* con la distribución más amplia en los diferentes suelos, observación que coincide con la rizosfera de *Festuca arundinacea* donde.(Siciliano *et al.*, 2003) de manera similar a lo reportado por Adebuseye *et al.* (2008), quienes aislaron a partir de desechos de basura microorganismos de los géneros *Ralstonia* y *Pseudomonas*, con capacidad para metabolizar bifenilos clorados y usarlos como única fuente de carbono.

En el suelo no rizosférico cotaminado, la única bacteria que se aisló fue *Pseudomonas auroginosa*. Pero no se detectó en el resto de las muestras. Este género es de gran importancia en la degradación de una amplia gama de contaminantes, en especial de hidrocarburos aromáticos, la cepa estudiada en este trabajo degradó tolueno y xileno. Existen muchos trabajos que reportan este género en ambientes contaminados con hidrocarburos, aunque hay pocos ejemplares de la rizósfera de plantas. De la rizosféra de *Lolium multiflorum* se aisló *Pseudomonas putida*, capaz de colonizar la raíz, promover la degradación de naftaleno y el crecimiento de la planta. En ecosistemas contaminados con hidrocarburos las comunidades microbianas tienden a ser dominadas por microorganismos con capacidad para sobrevivir a los compuestos tóxicos (MacNaughton *et al.*, 1999), generando una menor diversidad frente a los ambientes naturales no contaminados, efecto que se observó en este trabajo. Además, la diversidad también puede estar influenciada por la naturaleza de los compuestos presentes y por el tiempo de exposición (Whiteley *et al.*, 2000).

En un trabajo similar al nuestro, Díaz-Ramírez *et al.* (2003) aislaron bacterias degradadoras de hidrocarburos de la rizosfera de la planta *Cyperus laxus*, entre los géneros reportados estuvieron *Pseudomonas* sp. y *Arthobacter oxydans*, mostrando concordancia con los resultados obtenidos en este trabajo. Dichos microorganismos fueron reinoculados en consorcio a *C. laxus*, en un microcosmos contaminado con una mezcla de hidrocarburos, obteniéndose mayor remoción del hidrocarburo y un aumento de la producción de biomasa vegetal (75%) comparado con el testigo.

Gran parte de los microorganismos aislados en el presente trabajo crecieron en benceno y tolueno, y solamente *Pseudomonas aeruginosa* y *Arthrobacter xylosoxidans* fueron capaces de crecer en xileno. Las especies *Serratia marcescens*, *Bulkholderia brasiliensis* y *Ralstonia insidiosa* fueron los que presentaron mayor capacidad metabólica para degradar hidrocarburos aromáticos (BTX). Además Valderrama y Téllez (2004), entre otros autores, han descrito el importante papel de *Bulkholderia* en la degradación de contaminantes y su amplia capacidad metabólica. El género *Bulkholderia* tiene gran importancia en el sector agrícola debido a que se utiliza como control biológico (Cain *et al.*, 2000), además que tiene capacidad de fijar nitrógeno (Estrada-de los Santos *et al.*, 2001), de promover el crecimiento vegetal (Trañ Van *et al.*, 2000) y por su potencial en la biorremediación (Master *et al.*, 2002), se aísla con frecuencia de la rizosfera y de los tejidos de algunas plantas.

Las especies *cartae* y *turbata* del género *Cellulomonas* fueron aisladas por Liste y Prutz. (2006) en un estudio de la expresión de dioxigenasas en la rizósfera de diferentes plantas y su papel en la degradación de hidrocarburos. Así mismo, *Arthrobacter* sp. se ha reportado como degradador de 4-nitrofenol (Jain *et al.*, 1994) y *Arthrobacter protophormiae* de o- nitrobenzoato (Chauhan *et al.*, 2000). Particularmente, *Achromobacter xylosoxidans*, la misma especie encontrada en este trabajo, fue aislada aislada de un suelo contaminado con gasolina, y fue capaz de dedradar MTBE (metil terbutil éter) (Eixarch & Constantí, 2010). Sin embargo, hasta nuestro conocimiento este trabajo no se le ha asociado a la degradación de BTXs.

Nakamura *et al.* (2007) detectaron bacterias que degradaron hidrocarburos en un derrame de petróleo en Narhodka (Japón), y entre ellas a *Caulobacter* sp., una bacteria Gram negativa, conocida por ser ubicua en ambientes acuáticos. Además determinaron su capacidad para degradar hidrocarburos aromáticos, saturados, resinas y asfaltenos. Aunado a ello, cuando crecieron a *Caulobacter* en cultivos mixtos con *Alcanivorax* sp. se incrementaron las tasas de degradación. Se propuso que *Caulobacter* sp. produjo exopolisacáridos (EPS) que pudieran

emulsificar diferentes hidrocarburos y por tanto promover el crecimiento de bacterias hidrocarbonoclastas (Ravenscroft *et al.*, 1991).

Por otra parte, el género *Serratia* es comúnmente aislado de diversos ambientes entre ellos suelo y agua, pero hay pocos trabajos sobre su capacidad para biodegradar compuestos orgánicos. En particular, *S. marcescens* es capaz de degradar por cometabolismo el pentaclorofenol y al DDT, pero no puede utilizarlos como única fuente de carbono (Chandra *et al.*, 2006; Bidlan & Manonmani, 2002). Sin embargo, si es capaz de utilizar el hexacloro butadieno, un dieno alifático saturado con átomos de cloro, como fuente de carbono (Li *et al.*, 2008).

También *Serratia* sp. puede usar como sustrato una mezcla de gasolina con etanol y producir un surfactante (Cunha *et al.*, 2004). *Serratia plymuthicade* aislada de una planta de tratamiento de residuos exhibía capacidad para degradar fenol orto-, meta- y para cresol, protocatecuato, catecol y se detectaron en un extracto crudo la enzima catecol 1,2 dioxigenasa (Nilotpala & Ingle., 2007).

Es así como el uso de técnicas moleculares ha aumentado la capacidad para caracterizar las poblaciones microbianas implicadas en la degradación de contaminantes, dando lugar a una evaluación más precisa de los mecanismos que se llevan a cabo. Por tanto, el diseño de iniciadores basados en regiones conservadas dentro del gen de interés permite identificar diversos géneros relacionados (Baldwin *et al.*, 2003). El gen que codifica para la subunidad α de las enzimas tipo oxigenasas fue una elección para el diseño de oligonucleótidos por su papel en la especificidad del sustrato, además de ser uno de los pasos limitantes en la biodegradación de hidrocarburos, las secuencias de DNA son conservadas para las oxigenasas que tienen la misma especificidad de sustrato (Furukawa *et al.*, 1993). Con los iniciadores diseñados en este trabajo sólo se amplificaron 2 grupos de enzimas: la bifenil 2,3 dioxigenasa, que pertenece al segundo tipo de enzimas oxigenasas compuesto por la familia de las bifenil y las dioxigenasas aromáticas (Baldwin *et al.*, 2003). En *Burkholderia* y *Ralstonia*, microorganismos Gram negativos aislados en este trabajo, la detección de genes oxigenasas fue posible, y la benceno 1,2-diooxigenasa que pertenece a la

subfamilia compuesta por dioxigenasas del tolueno, benceno y clorobenceno, la cual fue detectada también para *Burkholderia*. Adicionalmente, se observó una estrecha relación entre las secuencias de aminoácidos identificadas, mostrando una posible transferencia horizontal de genes, entre los géneros *Burkholderia* y *Ralstonia* mecanismo muy común entre bacterias endofíticas (Wang *et al.*, 2010)

Además Dunbar *et al.* (1997) afirman que el aislamiento de microorganismos degradadores de hidrocarburos por técnicas tradicionales o enriquecimiento selectivo reduce la diversidad ya sea por las concentraciones de los contaminantes empleados o por cambios en los factores ambientales y no permite la estimación real de las poblaciones del entorno natural. Es posible que las enzimas implicadas en la degradación de hidrocarburos en los suelos analizados en este trabajo, no se hayan detectado porque son diferentes a las reportadas, o tengan modificaciones importantes en los genes que codifican para la subunidad α . Además es importante tener en cuenta que el diseño de oligonucleótidos se realizó con la información disponible en su momento con el fin de amplificar la mayor diversidad posible de genes de oxigenasas pero que, como ha ocurrido en muchas ocasiones, la diversidad en la naturaleza es muchísimo mayor que la que se encuentra representada actualmente en las bases de datos.

El estudio de la diversidad bacteriana asociada a las rizosferas de plantas que crecen y completan su ciclo de vida en ambientes contaminados con petróleo nos permite hacer una estimación del potencial microbiológico que tiene un suelo para lograr la recuperación y remoción de contaminantes de forma natural. Así mismo, los microorganismos aislados pueden ser de interés por su potencial para degradar compuestos recalcitrantes y permitir el estudio de nuevos mecanismos y rutas metabólicas en géneros aún no estudiados. Debido a que hay pocos estudios que comprendan diversos enfoques en el estudio de la biodegradación es importante establecer todos los mecanismos posibles que intervienen, abordando la identificación de microorganismos, la expresión de genes, la cuantificación de la actividad enzimática y la cuantificación de la degradación de contaminantes con el

fin de implementar estrategias adecuadas logrando el aumento y funcionamiento eficaz de los procesos de biorremediación en los ambientes contaminados.

7. Conclusiones

-
- Se estableció un consorcio de microorganismos con diferentes capacidades para degradar hidrocarburos.
 - Se estableció el uso del DGGE en la determinación de la estabilización de un consorcio estableciendo número de bandas, intensidad relativa y tipo de migración.
 - Se aislaron e identificaron bacterias asociadas a la degradación de hidrocarburos como *Serratia* sp, *Burkholderia brasilensis*, *Ralstonia insidiosa* y *Pseudomonas aeruginosa*; y otros géneros poco reportados en rizósferas e implicados en la degradación de hidrocarburos como *Cellulomonas* sp, y *Caulobacter* sp.
 - Se detectaron e identificaron genes que codifican para las enzimas bifenil 2,3 dioxigenasa y benceno 1,2 dioxigenasa en las bacterias *Burkholderia brasilensis*, y *Ralstonia insidiosa*.
 - Se determinó la capacidad de las bacterias aisladas *Serratia* sp, *Burkholderia brasilensis*, *Ralstonia insidiosa* para usar los hidrocarburos aromáticos como única fuente de carbono.

8. Perspectivas

-
- Realizar cinéticas de degradación de los hidrocarburos aromáticos benceno, tolueno y xileno; empleando las bacterias aisladas y un consorcio que incluya las bacterias con mayor crecimiento en los medios evaluados.
 - Diseñar oligonucleótidos específicos para detectar genes que codifiquen para enzimas tipo oxigenasas en los géneros aislados.
 - Realizar análisis de expresión de los genes que codifican para enzimas tipo oxigenasas en las cinéticas de degradación.
 - Determinar las condiciones de expresión de los genes que codifican para las enzimas tipo oxigenasas en microcosmos.
 - Reinocular en *Cyperus* sp. las bacterias aisladas y el consorcio para evaluar la degradación de hidrocarburos en un microcosmos.

9. Bibliografía

-
- Adebusoye S, Ilori M, Picardal F, Amund O (2008) Metabolism of chlorinated biphenyls: Use of 3,3'- and 3,5- dichlorobiphenyl as sole sources of carbon by natural species of *Ralstonia* and *Pseudomonas*. *Chemosphere* 70: 635-663.
 - Alper J (1993) Biotreatment firms rush to marketplace. *Nat Biotechnol* 11: 973- 975.
 - Anderson T, Guthrie E, Walton B (1993) Bioremediation in the rhizosphere. *Environ Sci Technol* 27: 2630–2636.
 - April W, Sims R (1990) Evaluation of the use of prairie grasses for stimulating polycyclic aromatic hydrocarbon treatment in soil. *Chemosphere* 20: 253–265.
 - Atlas R, Saylor G, Burlage R, Bej A (1992) Molecular approaches for environmental monitoring of microorganisms. *Bio Techniques* 12: 706–717.
 - Axcell B, Geary P (1973) The metabolism of benzene by bacteria. Purification and some properties of the enzyme cis-1,2-dihydroxycyclohexa-3,5-diene (nicotinamide adenine dinucleotide) oxidoreductase (cis-benzene glycol dehydrogenase). *Biochem J* 136: 927-34.
 - Baek KH, Yoon BD, Kim BH, Cho DH, Lee IS, Oh HM, Kim HS. (2007) Monitoring of microbial diversity and activity during bioremediation of crude oil-contaminated soil with different treatments. *J Microbiol Biotechnol* 17: 67-73.
 - Baldwin B, Nakatsu C, Nies L (2003) Detection and enumeration of aromatic oxygenase genes by multiplex and real-time PCR. *Appl Environ Microbiol* 69: 3350–3358.
 - Bakker GR, Frampton CM, Jaspers MV, Stewart A, Walter M (2002). Assessment of phylloplane microorganisms populations in Canterbury apple orchards. *NZ Plant Prot* 55: 129-134.
 - Batie C, Ballou D, Correll C (1992) Phthalate dioxygenase reductase and related flavin-iron-sulphur containing electron transferase. *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes*. Ed Muller, F. CRC Press, Boca Ratón, pp 544-554.
 - Bidlan R, Manonmani HK (2002) Aerobic degradation of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) by *Serratia marcescens* DT-1P. *Process Biochem* 38: 49–56.
 - Bongkeun S, Norberto J, Palleroni M (2000) Isolation and characterization of diverse halobenzoate degrading denitrifying bacteria from soils and sediments. *Appl Environ Microbiol* 66: 3446-3453.
 - Butler C, Mason J (1997) Structure-function analysis of the bacterial aromatic ring-hydroxylating dioxygenases. *Adv Microb Physiol* 38: 47–84.
 - Cain CC, Henry AT, Waldo RH, Casida LJ, Falkinham JO (2000) Identification and characteristics of a novel *Burkholderia* strain with broad-spectrum antimicrobial activity. *Appl Environ Microbiol* 66: 4139–4141.
 - Cerniglia C (1993) Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation* 3: 351-368.
 - Chaillan F, Flèche AL, Bury E, Phantavong Y, Grimont P, Saliot A, Oudot J (2004) Identification and biodegradation potential of tropical aerobic bichydrocarbon-degrading microorganisms. *Res Microbiol* 155: 587–595.

-
- Chandra R, Ghosh A, Jain RK, Singhs (2006) Isolation and characterization of two potential pentachlorophenol degrading aerobic bacteria from pulp paper effluent sludge. *J Gen Appl Microbiol* 52: 125-130.
 - Chao WL, Hsu SF (2004) Response of the soil bacterial community to the addition of toluene and toluene-degrading bacteria. *Soil Biol Biochem* 36: 479–487
 - Chauhan A, Chakraborti A, Jain R (2000) Plasmid encoded degradation of p-nitrophenol and 4-nitrocatechol by *Arthrobacter protophormiae*. *Biochem Bioph Res Co* 270: 733–740.
 - Chikere CB, Okpokwasili GC, Ichiakor O (2009) Characterization of hydrocarbon utilizing bacteria in tropical marine sediments. *Afr J Biotechnol* 8: 2541-2544.
 - Christopher W, Kaplan R, Christopher L (2004) Bacterial succession in a petroleum land treatment unit. *Appl Environ Microbiol* 70: 1777-1786.
 - Cicciolo P (1993) VOCs and air pollution. In: Bloemen HJ, Burn J (eds) *Chemistry and analysis of volatile organic compounds in the environment*. Ed Blackie. Academic & Professional, pp 92-174.
 - Cline PV, Delfino JJ, Rao PSC (1991) Partitioning of aromatic constituents into water from gasoline and other complex solvent mixtures. *Environ Sci Technol* 25 914–920.
 - Coates J, Ellis D, Blunt-Harris E, Gaw C, Roden E, Lovley D (1998) Recovery of humic-reducing bacteria from a diversity of environments. *Appl Environ Microbiol* 64: 1504–1509.
 - Cookson J (1995) *Bioremediation Engineering: Design and Application*. McGraw-Hill Inc, New York, USA.
 - Cullen D, Hirsch P (1988) Simple and rapid method for direct extraction of microbial DNA from soil to PCR. *Soil Biol Biochem* 30: 983-993.
 - Cunha CD, Do Rosário M, Rosado AS, Leite SGF (2004) *Serratia* sp. SVGG16: a promising biosurfactant producer isolated from tropical soil during growth with ethanol-blended gasoline. *Process Biochem* 39: 2277–2282
 - Cunningham S, Berti W (1993) The remediation of contaminated soils with green plants: An overview. *In Vitro Cell Dev Biol* 29: 207–212.
 - Da Silva KR, Salles JF, Seldin L, Van Elsas JD (2003) Application of a novel *Paenibacillus*-specific PCR-DGGE method and sequence analysis to assess the diversity of *Paenibacillus* spp. in the maize rhizosphere. *J Microbiol Methods* 54: 213-31
 - Díaz-Ramírez H, Ramírez-Saad M, Gutierrez-Rojas M, Favela-Torres E (2003) Biodegradation of Maya crude oil fractions by bacterial strains and a defined mixed culture isolated from *Cyperus laxus* rhizosphere soil in a contaminated site. *Can J Microbiol* 49: 755-761.
 - Drysdale G, Kusan H, Bux F (1999) Denitrification bacteria during activated sludge treatment. *Water SA* 25: 357-362.
 - Dunbar J, White S, Forney LJ (1997). Genetic diversity through the looking glass: effect of enrichment bias. *Appl Environ Microbiol* 63:1326–1331.

-
- Eixarch H, Constantí M (2010) Biodegradation of MTBE by *Achromobacter xylosoxidans* MCM1/1 induces synthesis of proteins that may be related to cell survival. *Process Biochem* 45: 794–798
 - Estrada-De los Santos P, Bustillos-Cristales R, Caballero-Mellado J (2001) *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. *Appl Environ Microbiol* 67: 2790–2798.
 - Erickson B, Mondello F (1993) Enhanced biodegradation of polychlorinated biphenyls after site-directed mutagenesis of a biphenyl dioxygenase gene. *Appl Environ Microbiol* 59: 3858–3862.
 - Fang C, Radosevich M, Fuhrmann J (2001) Atrazine and phenanthrene degradation in grass rhizosphere soil. *Soil Biol Biochem* 33: 671–678.
 - Ferraro DJ, Brown EN, Yu CL, Parales RE, Gibson DT, Ramaswamy S. (2007) Structural investigations of the ferredoxin and terminal oxygenase components of the biphenyl 2,3-dioxygenase from *Sphingobium yanoikuyae* B1. *BMC Struct Biol* 9:7-10.
 - Flavio B, Leonardo F, Zachia M (1999) Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus erythropolis*. *Rev Microbiol* 30: 231-236.
 - Floriane S, Marchal R, Serge C, Christelle V, Lebeault J, Vandecasteele J (2000) A *Mycobacterium* strain with extended capacities for degradation of gasoline hydrocarbons. *Appl Environ Microbiol* 66: 2392-2399.
 - Furusawa Y, Nagarajan V, Tanokura M, Masai E, Fukuda M, Senda T (2004) Crystal structure of the terminal oxygenase component of biphenyl dioxygenase derived from *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *J Mol Biol* 342: 1041–1052.
 - Furukawa K, Hirose J, Suyama A, Zaiki T, Hayashida S (1993). Gene components responsible for discrete substrate specificity in the metabolism of biphenyl (bph operon) and toluene (tod operon). *J Bacteriol* 175:5224–5232.
 - Galtier N, Gouy M, Gautier C (1996) SeaView and Phylowin, two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput Applic Biosci* 12: 543-548.
 - Gibson D, Parales R (2000) Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* 11: 236–243.
 - Gibson D, Resnick S, Lee K, Brand J, Torok D, Wackett L, Schocken M, Haigler B (1995) Desaturation, dioxygenation, and monooxygenation reactions catalyzed by naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain 9816-4. *J Bacteriol* 177: 2615-21.
 - Gilligan P, Lum G, Vandamme P, Whittier S (2003) *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Ralstonia*, *Brevundimonas*, *Comamonas*, *Delftia*, *Pandoraea* and *Acidovorax*. In Baron PR, Jorgensen EJ, Pfaller JH, Tenover FC, Archer G (eds). *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed. Murray. Washington, DC: ASM. pp. 729–748.
 - Glass D (1998) The 1998 United State Market for Phytoremediation. D. Glass Associates Inc. Needham. MA, USA.
 - Gomes Marcial N, Borges LR, Paranhos R, Pinto FN, Krogerrecklenfort E, Mendonca-Hagler L, Smalla K (2007) Diversity of ndo genes in mangrove sediments exposed to different sources of polycyclic aromatic hydrocarbon pollution. *Appl Environ Microbiol* 73: 7392–7399

-
- Haigler B, Gibson D (1990) Purification and properties of NADH-ferredoxinNAP reductase, a component of naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain NCIB 9816. *J Bacteriol* 172: 457-64.
 - Haddock JD, Pelletier DA, Gibson DT (1997) Purification and properties of ferredoxin BPH, a component of biphenyl 2,3-dioxygenase of *Pseudomonas* sp strain LB400. *J Ind Microbiol Biotechnol* 19: 355–359.
 - Harayama S, Rejik M, Wubbolts K, Rose R, Leppik R, Timmis K (1989) Characterization of five genes in the upper-pathway operon of TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida* and identification of the gene products. *J Bacteriol* 171: 5048–5055.
 - Hendrickx B, Dejonghe W, Faber F, Boenne W, Bastiaens L, Verstraete W, Top E, Springael D (2006) PCR-DGGE method to assess the diversity of BTEX mono oxygenase genes at contaminated sites. *FEMS Microbiol Ecol* 55: 262–273.
 - Hsu T, Bartha R (1979) Accelerated mineralization of two organophosphate insecticides in the rhizosphere. *Appl Environ Microbiol* 37: 36-40.
 - Jain R, Dreisbach J, Spain J (1994) Biodegradation of p-nitrophenol via 1,2,4-benzenetriol by an *Arthrobacter*. *Appl Environ Microbiol* 59: 340–343.
 - Jung TK, Young EL, Jung YK, Cho KS, Hee WR (2003) Degradation of polyaromatic hydrocarbons by *Burkholderia cepacia* 2A-12. *Word J Microb Biotechnol* 19: 411-417.
 - Kaiser O, Puhler O, Selbitschka W (2001) Phylogenetic analysis of microbial diversity in the rhizosphere of oilseed rape (*Brassica napus* cv Westar) employing cultivation-dependent and cultivation-independent approaches. *Microb Ecol* 42: 136-149
 - Kauppi Lee, Carredano E, Parales R, Gibson D, Eklund H, Ramaswamy S (1998) Structure of an aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase—naphthalene 1,2-dioxygenase. *Structure* 6: 571-586.
 - Kim SI, Kukor JJ, Oh KH, Kahng HY (2006) Evaluation the genetic diversity of dioxygenases for initial catabolism of aromatic hydrocarbons in *Pseudomonas rhodesiae* KK1 *Enzyme Microb Technol* 40 : 71-78.
 - Kiss S (2001) Advances in soil enzymology, I to III. *Stud. Univ. Babes Bolyai Biol* 46: 1–48.
 - Kitagawa W, Miyauchi K, Masai E, Fuduka M (2001) Cloning and characterization of benzoate catabolic genes in the gram-positive polychlorinated byphenyl degrader *Rhodococcus* sp. Strain RHA1. *J Bacteriol* 183: 6598-6606.
 - Kremer U (2005) Phytoremediation: novel approaches to cleaning up polluted soils. *Curr Opin Biotechnol* 16: 133–141
 - Kuiper I, Kravchenko L, Bloemberg V, Guido V, Lugtenberg J (2002) *Pseudomonas putida* Strain PCL1444, selected for efficient root colonization and naphthalene degradation, effectively utilizes root exudate components. *Mol Plant Microbe Interact.* 15: 734-741.
 - Larkin M, Blackshields G, Brown N, Chenna R, McGettigan P, McWilliam H, Valentin F, Wallace I, Wilm A, Lopez R, Thompson J, Gibson T, Higgins D (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 21: 2947-8.

-
- Lee J-Y, Roh JR, Kim HS (1994) Metabolic engineering of *Pseudomonas putida* for the simultaneous biodegradation of benzene, toluene, and p-xylene mixture. *Biotech. Bioengin* 43: 1146-1152.
 - Li MT, Hao LL, Sheng LX, Xu JB (2008) Identification and degradation characterization of hexachlorobutadiene degrading strain *Serratia marcescens* HL1. *Bioresour Technol*.15: 6878-84.
 - Liste H-H, Prutz I (2006) Plant performance, dioxygenase expressing rhizosphere bacteria, and biodegradation of weathered hydrocarbons in contaminated soil. *Chemosphere* 62: 1411–1420.
 - Lugtenberg B, Van der Bij A, Bloemberg G, Woeng T, Dekkers L, Kravchenko L, Mulders I, Phoelich C, Simons M, Tikhonovich I, Weger L, Wijffelman C (1997) Towards the molecular basis of plant root colonization by *Pseudomonas* bacteria. In *Pseudomonas '97*. VI International Congress on *Pseudomonas*: Molecular Biology and Biotechnology, Madrid, España.
 - MacNaughton SJ, Stephen JR, Venosa AD, Davis GA, Chang YG, White DC (1999) Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Appl Environ Microbiol* 65:3566-3574.
 - Margesin R, Walder G, Schinner F (2000a) The impact of hydrocarbon remediation (diesel oil and polycyclic aromatic hydrocarbons) on enzyme activities and microbial properties of soil. *Acta Biotechnol* 20: 313–333.
 - Margesin R, Zimmerbauer A, Schinner F (2000b) Monitoring of bioremediation by soil biological activities. *Chemosphere* 40: 339–346.
 - Maruyama T, Ishikura M, Taki H, Shindo K, Kasai H, Haga M, Inomata Y, Misawa N (2005) Isolation and characterization of o-xylene oxygenase genes from *Rhodococcus opacus* TKN14. *Appl Environ Microbiol* 71: 7705-15.
 - Masai E, Sugiyama K, Iwashita N, Shimizu S, Hauschild J, Hatta E, Kimbara T, Yano K, Fuduka K (1997) The bphDEFk meta-cleavage pathway genes involved in biphenyl/polychlorinated biphenyl degradation are located on a linear plasmid and separated from the initial bphABC genes in *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *Gene* 187: 141-149.
 - Master ER, Lai VWM, Kuipers B, Cullen WR, Mohn WW (2002) Sequential anaerobic-aerobic treatment of soil contaminated with weathered aroclor 1260. *Environ Sci Technol* 36: 100–103.
 - Mahenthiralingam E, Baldwin A, Vandamme P (2002) *Burkholderia cepacia* complex infection in patients with cystic fibrosis. *J Med Microbiol* 51: 533–538.
 - Mesarch M, Nakatsu C, Nies L (2004) Development of catechol 2,3 dioxygenase-specific primers for monitoring bioremediation by competitive quantitative PCR. *Appl Environ Microbiol* 2: 678–683.
 - Muasya AM, Simpson DA, Chase MW (2002) Phylogenetic relationships in *Cyperus* L. s.l. (*Cyperaceae*) inferred from plastid DNA sequence data. *Bot J Linn Soc* 138: 145–153.
 - Muratovaa A, Golubeva S, Wittenmayer L, Dmitrievaa T, Bondarenkovaa A, Hircheb F, Merbachb W, Turkovskayaa O (2009) Effect of the polycyclic aromatic hydrocarbon

phenanthrene on root exudation of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Environ Exper Bot* 66: 514-521.

- Murray MG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* 8: 4321–4325.
- Muyzer G, Smalla K (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *A van Leeuw* 73: 127-141.
- Nakamura S, Sakamoto Y, Ishiyama M, Tanaka D, Kunii K, Kubo K, Sato C (2007) Caracterización de two oil-degrading bacterial groups in the Nakhodka oil spill. *Int Biodeterior Biodegrad* 60: 202-207
- Nilotpala P, Ingle AO (2007) Mineralization of phenol by a *Serratia plymuthica* strain GC isolated from sludge sample. *Int Biodeter Biodegr* 60: 103–108
- Ortíz-Brito O, Lema-Irina I, Gavilán-García A (2003) La restauración de suelos contaminados con hidrocarburos en México. *Gaceta Ecológica. INE-SEMARNAT México* 20: 83-92.
- Parales R, Resnick S, Yu C, Boyd D, Sharma N, Gibson D (2000) Regioselectivity and enantioselectivity of naphthalene dioxygenase during arene cis-dihydroxylation: control by phenylalanine 352 in the subunit. *J Bacteriol* 182: 5495–5504.
- Park K, Sims R, Dupont R (1990) Transformation of PAHs in soil systems. *J Environ Eng* 116: 632-641.
- Perry JP (1979) Microbial Cooxidations involving hydrocarbons *Microbiol. Rev* 43:59–72.
- Plaza G, Otero M, Torres N, Velásquez M, Corbalan E, Rodríguez T (2001) Biorremediación en suelos contaminados con hidrocarburos. *AVERMA* 5: 163-167.
- Plotnikova EG, Rybkina DO, Ananina LN, Yastrebova OV, Demakov VA (2006) Characteristics of microorganisms isolated from technogenic soils of the Kama region. *Russ J Ecol.* 37: 233-240
- Randy H, Schroeder A, Domínguez V, García L (2002) Potencial de la biorremediación de suelo y agua impactados por petróleo en el trópico de México. *Terra* 17: 159-174.
- Ravenscroft N, Walker SG, Dutton GG, Smit J (1991) Identification, isolation, and structural studies of extracellular polysaccharides produced by *Caulobacter crescentus*, *J Bacteriol* 173: 5677–5684
- Relman D (1993) Universal bacterial 16S rDNA amplification and sequencing. In: D.H. Persing, T.F. Smith, F.C. Tenover and T.J. White (eds) *Diagnostic Molecular Microbiology, Principles and Applications*, ASM, Washington DC. pp. 489–495.
- Rossello-Mora R, Amann R (2001) The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* 25:39–67.
- Sambrook J (2002) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2ª ed. Cold Spring Harbor press. Cap 1.

-
- Seo JS, Keum YS, Hu Y, Lee SE, Li QX (2007) Degradation of phenanthrene by *Burkholderia* sp. C3: initial 1,2- and 3,4-dioxygenation and meta- and ortho-cleavage of naphthalene-1,2-diol. *Biodegrad* 18:123-31.
 - Siciliano S, Germida J, Banks K, Creer C (2003) Changes in microbial community composition and function during a polyaromatic hydrocarbon. *Appl Environ Microbiol* 69: 483-489.
 - Singh S, Singh BB, Chandra R, Patel DK, Rai V (2007) Synergistic biodegradation of pentachlorophenol by *Bacillus cereus* (DQ002384), *Serratia marcescens* (AY927692) and *Serratia marcescens* (DQ002385). *World J Microbiol Biotechnol* 25: 1747-1754.
 - Schwab A, Banks M (1994) Bioremediation through rhizosphere technology. In: Anderson TA, Coats JR (eds) *American Chemical Society, Washington*, pp.132-141.
 - Sipilä TP, Keskinen AK, Åkerman ML, Fortelius C, Haahtela K, Yrjälä K (2008) High aromatic ring-cleavage diversity in birch rhizosphere: PAH treatment-specific changes of I.E.3 group extradiol dioxygenases and 16S rRNA bacterial communities in soil. *ISME J* 2: 968–981.
 - Speert DP, Henry D, Vandamme P, Corey P, Mahenthiralingam E (2002) Epidemiology of *Burkholderia cepacia* complex in patients with cystic fibrosis, Canada. *Emerg Infect Dis* 8: 181–187.
 - Suthersan S (2002) *Natural and Enhanced Remediation Systems*. Arcadis/Lewis Publishers, London.
 - Svenja R, Alexander N, Ulf S, Peter K (1999) Differential detection of key enzymes of polyaromatic-hydrocarbon-degrading bacteria using PCR and gene probes. *Microbiology* 145: 1731-1741.
 - Tan H, Tang H, Joannou C, Abdel-Wahab N, Mason J (1993) The *Pseudomonas putida* ML2 plasmid-encoded genes for benzene dioxygenase are unusual in codon usage and low in G+C content. *Gene* 130: 33-9.
 - Timmis K, Pieper D (1999) Bacteria designed for bioremediation. *Trends Biotechnol* 17: 201–204.
 - Tra Van V, Berge O, Balandreau J, Ke SN, Heulin T (1996) Isolation and nitrogenase activity of *Burkholderia vietnamiensis*, a nitrogenfixing bacterium associated with rice (*Oryza sativa* L.) on a sulphate acid soil of Vietnam. *Agronomie* 16: 479–491.
 - Todd A, Joel R (1993) (eds) *Biorremediation through rhizosphere technology*. Developed from a symposium sponsored by the division of agrochemicals and the division of environmental chemistry of the 206 the national meeting of the American Chemical Society. Chicago. Illinois. pp 2- 26.
 - Valderrama B, Téllez Sosa J (2004) *Microbiología del petróleo y sus derivados*. En: *Microbios en línea*. Instituto de Biotecnología. UNAM. Cuernavaca, Mor. México.
 - Volkerling F, Breure A, Sterkenbufg A, Van Andel J (1992) Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: Effect of substrate availability on bacterial growth kinetics. *Appl Microbiol Biotechnol* 36: 548-552.
 - Wackett L (1990) Toluene dioxygenase from *Pseudomonas putida* F1. *Methods Enzymol* 188: 39-45.

-
- Wang Y, Li H, Zhao W, He X, Chen J, Geng X, Xiao M (2010) Induction of toluene degradation and growth promotion in corn and wheat by horizontal gene transfer within endophytic bacteria. *Soil Biol Biochem* 42: 1051-1057.
 - Walton BT, Hoylman AM, Perez MM, Anderson TA, Johnson TR, Guthrie EA, Christman RF (1994) Rhizosphere microbial communities as a plant defense against toxic substances in soils. In: Anderson, T.A., Coats, J.R. (Eds.), *Bioremediation Through Rhizosphere Technology*. ACS Symposium Series, 563. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 82–92.
 - Walton B, Anderson T (1990) Microbial degradation of trichloroethylene in the rhizosphere: potential application to biological remediation of waste site. *Appl Environ Microbiol* 56: 1012-1016.
 - Ware GW (1988) *Reviews of environmental contamination and toxicology* 106: 1-19.
 - White Jr, Kirkpatrick WD, Thoma GJ, Wolf DC (2000) Using plants to remediate crude oil-contaminated soil. In: *Proc. of the 7th Int. Petroleum Environmental Conference*, Albuquerque, Nuevo México.
 - Whiteley AS, Bailey MJ (2000) Bacterial community structure and physiological state within an industrial phenol bioremediation system. *Appl Environ Microbiol* 66:2400-2407.
 - Williams J, Kubelik A, Livak K, Rafalsky J, Tingey S (1990) DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18: 6531-6535.
 - Wilson S, Jones K (1993) Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Environ Pollut* 80: 229-249.
 - Wolicka D, Suszek A, Borkowski A, Bielecka A (2009) Application of aerobic microorganisms in bioremediation in situ of soil contaminated by petroleum products. *Bioresour Technol* 13: 3221-7.
 - Wong MH (2003) Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils. *Chemosphere* 50: 775-780.
 - Yoshida N, Yagi K, Sato D, Watanabe N, Kuroishi T, Nishimoto K, Yanagida A, Katsuragi T, Kanagawa T, Kurane R, Tani Y (2005) Bacterial communities in petroleum oil in stockpiles. *Biosci Bioeng* 99: 143-9.
 - Zamanian M, Mason J (1987) Benzene dioxygenase in *Pseudomonas putida*. Subunit composition and immuno-cross-reactivity with other aromatic dioxygenases. *Biochem J* 244: 611-6.
 - Zielinski M, Backhaus S, Hofer B (2002) The principal determinants for the structure of the substrate-binding pocket are located within a central core of a biphenyl dioxygenase alpha subunit. *Microbiology* 148: 2439–2448.

10. Anexos

Anexo A.

Método de extracción de DNA (Cullen & Hirsch., 1988)

Las muestras de suelo, 3 g, se mezclaron con 500 mL de regulador de fosfatos [(monobásico y dibásico) 120 mM pH 8 suplementado con SDS al 1%] y homogenizaron en vortex. Luego, se agregó 1 g de perlas de vidrio de diferentes diámetros (0.5 y 2.0 mm), y se agitó vigorosamente durante 15 min en dos periodos. Las muestras se centrifugaron a 2,800 x *g* durante 15 min a 10°C y los sobrenadantes se transfirieron a tubos limpios, donde se les adicionó EDTA 500 mM, pH 8.0 hasta una concentración final de 100 mM. Posteriormente, se les añadió acetato de potasio 5M, pH 5.5 hasta alcanzar una concentración final de 500 mM. Las muestras se incubaron en hielo por 20 min y se centrifugaron a 2,800 x *g* durante 5 min a 4°C. Los sobrenadantes se recuperaron y el DNA se precipitó con la adición de un volumen de isopropanol, la mezcla se mantuvo durante toda la noche a -20°C. El DNA correspondiente a cada muestra, se recuperó por centrifugación a 14,000 rpm durante 5 min a 4°C, finalmente, el remanente de isopropanol en la pastilla se evaporó y el DNA se resuspendió en 400 mL de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8.0; EDTA 1mM, pH 8.0).

Anexo B

Método de extracción por CTAB (Murray & Thompson., 1980)

1. Cultivo de toda la noche
2. Cosechar por centrifugación y resuspender el pellet en 250 μ L de TES. Adicionar 6.25 μ L de lisozima (20 mg/mL), 2.5 μ L de RNAsa (10 mg/mL) e incubar a 37°C, por 20 min.
3. Adicionar 250 μ L de TES, 1.24 μ L de proteinasa K (20mg/mL) y 20 μ L de SDS al 20%. Incubar a 37°C, 30 min.
4. Adicionar 90 μ L de NaCl 5 M. Mezclar
5. Agregar 72 μ L de CTAB/NaCl. Mezclar e incubar a 65°C, 10 min
6. Extraer con 700 μ L de cloroformo/alcohol isoamilico (24:1). Centrifugar por 5 min
7. Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo. Extraer con 700 μ L de fenol. Centrifugar por 5 min.
8. Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo. Extraer con 700 μ L de cloroformo. Centrifugar por 5 min
9. Transferir la fase acuosa y precipitar con 1 mL de alcohol isopropilico. Centrifugar 10 min.
10. Lavar el pellet con EtOH al 80%. Centrifugar 5 min. Secar al vacio
11. Resuspender el pellet con 50 μ L de TE o agua.

Anexo C
Soluciones Stock para el DGGE

1. Solución de Carlos 8X

Composición	
Etanol	200 mL
Ácido acético	10 mL
Agua destilada	40 mL

2. Solución de fijación

Composición	
Solución de Carlos 8X	50 mL
Agua destilada	350 mL

3. Solución de tinción de plata

Composición	
AgNO₃	0.4 g
Solución de Carlos 1X	200 mL

4. Solución de revelación

Composición	
NaBH₄	10 mg
Formaldehído	750 µL
NaOH 1.5%	200

5. Solución de preservación

Composición	
Etanol	50 mL
Glicerol	20 mL
Agua destilada	130 mL
