

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA  
*UNIDAD IZTAPALAPA.*  
DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y DE LA SALUD.



**Casa abierta al tiempo**

**BIOMONITOREO:  
SEGUIMIENTO DE POBLACIONES MICROBIANAS EN  
PROCESOS DE BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS  
CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS.**

TESIS  
PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA**

P R E S E N T A:

**Q.F.B. Aída Hamdan Partida**

**COMITE TUTORAL**

DR. OCTAVIO LOERA CORRAL	Director de tesis
DR. LUIS FERNANDEZ LINARES	Asesor
DR. HUGO RAMIREZ SAAD	Asesor

**MEXICO, D.F**

**JULIO DEL 2004.**

Iztapalapa, D.F., a 30 de julio del 2004.

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la unidad  
Iztapalapa aprobó la comunicación de resultados.

**BIOMONITOREO:  
SEGUIMIENTO DE POBLACIONES MICROBIANAS EN PROCESOS DE  
BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS**

Que presentó

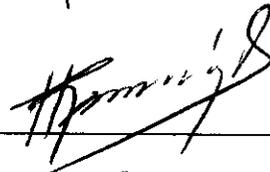
Q.F.B. Aída Hamdan Partida

Director de Tesis: **Dr. Octavio Loera Corral**



**Jurado:**

**Dr. Hugo César Ramírez Saad** (Presidente)



**Dr. Luis Fernández Linares** (Secretario)



**Dr. Cesar Hugo Hernández Rodríguez** (Vocal)



**Dra. Tania Lorena Volke Sepúlveda** (Vocal)



---

LA MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA ESTA INCLUIDA EN EL PADRON NACIONAL DE POSGRADOS DE CONACYT Y ADEMÁS CON EL APOYO DEL MISMO CONSEJO, CON EL CONVENIO No. 3548-B, ECOLOGIA MICROBIANA DE PROCESOS DE REMEDIACIÓN DE SUELOS Y TRATAMIENTOS DE AGUAS: UN ENFOQUE MOLECULAR Y AL INSTITUTO MEXICANO DEL PETROLEO CON EL PROYECTO FIES 98-30-VI.

---

Iztapalapa, D.F., a 30 de julio del 2004.

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la unidad  
Iztapalapa aprobó la comunicación de resultados.

**BIOMONITOREO:  
SEGUIMIENTO DE POBLACIONES MICROBIANAS EN PROCESOS DE  
BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS**

Que presentó

**Q.F.B. Aída Hamdan Partida**

Director de Tesis: **Dr. Octavio Loera Corral** \_\_\_\_\_

**Jurado:**

**Dr. Hugo César Ramírez Saad** (Presidente) \_\_\_\_\_

**Dr. Luis Fernández Linares** (Secretario) \_\_\_\_\_

**Dr. Cesar Hugo Hernández Rodríguez**(Vocal) \_\_\_\_\_

**Dra. Tania Lorena Volke Sepúlveda** (Vocal) \_\_\_\_\_

---

## **DEDICATORIAS**

*A mis hijas Anaid y Karime: Gracias por compartir este trabajo conmigo y alentarme cuando lo necesitaba.*

*A mi esposo Jaime Bustos: Por estar a mi lado en todo momento, por ayudarme incondicionalmente en esta meta.*

*A mi madre, tías y hermanos.*

*A toda mi familia.*

*A todos mis amigos y compañeros de la maestría en Biotecnología.*

*A todos mis amigos y compañeros del Lab. de Ecología Molecular en especial a Ildefonso, Mónica, Damaris, Luis Mario, José, Ninfa, Laura, Félix, por su compañerismo y agradables pláticas, en especial a las niñas del equipo FMTS (Fiore, Trini y Susana) con mucho cariño por ser parte de mi familia de la UAM.*

*A todas mis amigas por alentarme a continuar en esta meta.*

*A todos aquellos amigos que caminaron conmigo alguna senda en el camino de la vida.*

*A todas aquellas personas que hicieron posible la realización de esta tesis.*

*Pongo un grano de arena en cada vida, al transcurso de las vidas se habrá construido un planeta.*

---

## AGRADECIMIENTOS.

Al Dr. Octavio Loera Corral por su invaluable guía y consejos impartidos y sobre todo por su amistad.

Al Dr. Hugo Ramírez Saad, Jefe del Laboratorio de Ecología Molecular, de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, mi agradecimiento por el apoyo incondicional y acertados comentarios para la realización de esta tesis y por la experiencia que adquirí en el Laboratorio que dirige, en el cual realice la parte experimental de este trabajo.

A la Dra. Tania Volke Sepúlveda, Dr. Cesar Hugo Hernández Rodríguez y al Dr. Luis Fernández Linares por la revisión de este trabajo, así como sus recomendaciones, sugerencias y comentarios.

A la Dra. Maria Trejo Hernández, por colaborar en la realización de este trabajo.

**Al Consejo de Nacional de Ciencia y Tecnología** por el apoyo financiero durante la realización del presente trabajo, a través de la beca otorgada con No. de Reg. 168604.

A la Universidad Autónoma Metropolitana por cobijarme en sus aulas.

## INDICE GENERAL

INDICE GENERAL.....	i
RESUMEN.....	v
INTRODUCCION.....	vi
1. Revisión Bibliográfica.....	1
1.1. Panorama general de contaminación por hidrocarburos en México. ....	1
1.2. Composición química del petróleo. ....	2
1.3. Biodegradación de hidrocarburos del petróleo. ....	3
1.4. Biorremediación. ....	8
1.5. Características generales de los suelos. ....	11
1.6. Suelo biótico. ....	11
1.7. Biomonitoreo. ....	12
1.8. DNA de bacterias del suelo. ....	13
1.9. Extracción y purificación de ácidos nucleicos del suelo. ....	14
1.9.1. Métodos Directos. ....	14
1.9. Métodos Indirectos. ....	16
1.10. Pureza del DNA bacteriano de muestras de suelo. ....	17
1.11. Amplificación por PCR de ácidos nucleicos de muestras del suelo.....	17
1.12. Marcadores moleculares: 16S rDNA.....	18
1.13. Determinación de la diversidad genética de comunidades microbianas por técnicas de biología molecular. ....	20
1.14. Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE). ....	21
1.14.1. Ventajas del DGGE. ....	23
1.14.2. Desventajas del DGGE.....	23
1.15. Tipificación de bacterias por técnicas de biología molecular. ....	24
1.16. Análisis del espacio intergénico de bacterias (ITS) del 16S-23S rDNA.....	24
1.17. Longitud del espacio intergénico ITS del 16S rDNA al 23S. ....	25
1.18. Análisis de Restricción Enzimática (REA) del operón <i>rrn</i> . ....	26
2.- JUSTIFICACION.....	27
3.- HIPOTESIS.....	28
4.- OBJETIVO.....	29
4.1. OBJETIVO GENERAL.....	29
4.1.1. OBJETIVOS PARTICULARES.....	29
5.- ESTRATEGIA DE TRABAJO.....	30
6.- MATERIALES Y METODOS.....	31
6.1. Características del suelo y de la biopila. ....	31
6.2. Cuenta en placa de microorganismos. ....	32
6.3. Extracción de DNA de suelo. ....	34
6.3.1. Extracción de DNA por método Bead-Beater. ....	35
6.3.2. Extracción de DNA por método Omnimixer. ....	36
6.3.3. Extracción de DNA por el método Bead-Beater-Lisozima-SDS. ....	37
6.3.4. Extracción y purificación de DNA Wizard (Promega). ....	38
6.4. Purificación de DNA de muestras de suelo.....	39
6.4.2 Método de Cloruro de Cesio y Acetato de Potasio. ....	40
6.5. Electroforesis en gel de agarosa al 1%.....	40
6.6. Cuantificación de DNA método espectrofotométrico. ....	41

6.7.	Amplificación por PCR.....	41
6.7.1.	Amplificación por PCR del gen 16S rRNA.....	41
6.7.2.	Amplificación por PCR para la región V6-V8 del gen 16S rRNA.....	42
6.7.3.	Amplificación por PCR para el ITS del operón <i>rrn</i> .....	42
6.8.	Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE).....	43
6.8.1.	Gel de poliacrilamida.....	44
6.8.2.	Tinción de plata del gel de poliacrilamida.....	45
6.9.	Galerías API 20 NE.....	46
6.10	Restricción con enzimas.....	47
7.	RESULTADOS Y DISCUSION.....	49
7.1.	Microbiología.....	49
7.1.1.	Cuenta microbiana.....	49
7.1.2.	Cuenta microbiana en placa del suelo de Huimanguillo, Tabasco.....	49
7.1.3.	Cuenta microbiana en placa del suelo de Poza Rica, Veracruz.....	49
7.2.	Aislamiento de Bacterias Hidrocarbonoclastas.....	52
7.1.3.	Caracterización e Identificación de bacterias por API 20NE.....	53
7.3.	Tipificación por PCR-REA del espacio intergénico del 16S-23S del operón <i>rrn</i> .....	54
7.4.	Extracción y purificación de DNA.....	58
7.4.1.	Estandarización del aislamiento de DNA de suelos contaminados con hidrocarburos.....	58
7.4.1.1	Método Bead-Beater.....	58
7.4.1.2.	Método de extracción Omnimixer.....	59
7.4.1.3.	Método Bead Beater-Lisozima-SDS.....	59
7.4.2.	Extracción de DNA del suelo de Huimanguillo, Tabasco.....	60
7.4.3.	Extracción del DNA del Suelo de Poza Rica, Veracruz.....	61
7.4.4.	Extracción de DNA de las cepas hidrocarbonoclastas.....	63
7.4.4.1.	Cepas degradadoras de hidrocarburos del suelo de Huimanguillo, Tabasco.....	63
7.4.4.2.	Cepas degradadoras de hidrocarburos del Suelo de Poza Rica, Veracruz y de la biopila.....	63
7.5.	Amplificación por PCR.....	64
7.5.1.	Amplificación por PCR de las muestras del suelo y cepas hidrocarbonoclastas del suelo de Tabasco.....	64
7.5.2.	Amplificación por PCR de muestras de suelo, de la biopila y de las cepas hidrocarbonoclastas del suelo Veracruz.....	66
7.6.	Dinámica de poblaciones en la biopila mediante (DGGE).....	68
8.	CONCLUSIONES.....	74
9.	BIBLIOGRAFIA.....	75

**Índice de Figuras.**

Fig. 1.	Configuración secundaria del 16S rRNA de <i>E. coli</i> .....	20
Fig. 2.	Principio del DGGE (Electrofóresis en Gel con Gradiente de Desnaturalización).....	23
Fig. 3.	Organización del operón <i>rrn</i> mostrando los diferentes espacios intergénicos.....	25
Fig. 4.	Mezcla de suelo contaminado de Poza Rica, tamizado con bagazo de caña.....	32
Fig. 5.	Biopila experimental con la mezcla de suelo con el bagazo de caña.....	32

Fig. 6. Caja con agar medio mineral para bacterias hidrocarbonoclastas.....	34
Fig. 7. Cinética de crecimiento bacteriano y de biodegradación de HTP's de los diferentes tiempos de la biopila, Poza Rica. ....	51
Fig. 8. Perfiles genómicos del espacio intergénico del operón <i>rrn</i> de las cepas hidrocarbonoclastas. ....	55
Fig. 9. Perfiles genómicos de la restricción con <i>Hha</i> I del operón <i>rrn</i> de las cepas hidrocarbonoclastas. ....	55
Fig. 10. Perfiles genómicos de la restricción con <i>Hae</i> III del operón <i>rrn</i> de las cepas hidrocarbonoclastas. ....	56
Fig. 11. Perfiles genómicos de la restricción con <i>Msp</i> I del operón <i>rrn</i> de las cepas hidrocarbonoclastas. ....	56
Fig. 12. Aislamiento de DNA del suelo contaminado. ....	60
Fig. 13. Purificación de DNA. ....	60
Fig. 14. Extracción de DNA de suelo Huimanguillo, Tabasco. ....	61
Fig. 15. Extracción de DNA del suelo de Poza Rica, Veracruz. ....	62
Fig. 16. Extracción de DNA de muestras del suelo de los diferentes tiempos de la biopila. ....	62
Fig. 17. DNA de cepas hidrocarbonoclastas del suelo Huimanguillo, Tabasco. ....	63
Fig. 18. DNA de las cepas hidrocarbonoclastas del suelo de Poza Rica, Veracruz. ....	64
Fig. 19. Amplicones del gen 16S rRNA de los suelos y cepas de Huimanguillo, Tabasco. ....	65
Fig. 20. Amplicones de la región V6-V8 del gen 16S rDNA, de los puntos del suelo de Huimanguillo, Tabasco. ....	66
Fig. 21. Productos de Amplificación del 16S rDNA del suelo de Poza Rica. ....	67
Fig. 22. Amplificación de la región V6-V8 del gen 16S rRNA del suelo de Poza Rica. ....	67
Fig. 23. Amplicones de la región V6-V8 del 16S rDNA, de las cepas hidrocarbonoclastas de Poza Rica. ....	68
Fig. 24. DGGE con un gradiente de desnaturalización del 42-54% de las cepas hidrocarbonoclastas aisladas del suelo de Poza Rica, Veracruz. ....	69
Fig. 25. DGGE con un gradiente de desnaturalizantes del 42-54% de las muestras de suelo y de los tiempos de muestreo de la biopila. ....	70
Fig. 26. DGGE con un gradiente de desnaturalizantes del 44-56% de los tiempos de la biopila. ....	72
<b>Índice de Tablas.</b>	
Tabla 1. Características de las diferentes tecnologías de biorremediación. ....	9
Tabla 2. Características del espacio ITS de diferentes bacterias. ....	26
Tabla 3. Características de los suelos y hidrocarburos totales del petróleo HTP. ....	31
Tabla 4. Porcentajes de desnaturalización de urea y formamida. ....	44
Tabla 5. Cuenta de bacterias totales e hidrocarbonoclastas del suelo de Huimanguillo, Tabasco. ....	49

Tabla 6. Cuenta de bacterias totales e hidrocarbonoclastas del suelo de Poza Rica, Ver. ...	50
Tabla 7. Características coloniales y celulares de las cepas hidrocarbonoclastas de los suelos de Tabasco y Poza Rica, Veracruz. ....	52
Tabla 8. Identificación con API 20 NE de las bacterias hidrocarbonoclastas. ....	53
Tabla 9. Tamaño del ITS y grupos identificados con la restricción con enzimas de las cepas hidrocarbonoclastas aisladas de Poza Rica, Ver. ....	57

## RESUMEN.

Los suelos están constituidos por una microbiota compleja difícil de cultivar mediante el uso de métodos convencionales. La ecología molecular microbiana permite el estudio de la diversidad de las interacciones entre las comunidades microbianas y su ambiente. Existen determinadas alternativas para conocer la estructura microbiana, una de ellas consiste en aislar los microorganismos y tipificarlos mediante técnicas de biología molecular. Para incluir la detección de microorganismos no cultivables o aún no cultivados, se utilizan métodos en los que se extraen los ácidos nucleicos directamente de los suelos y a partir de éstos se determina la diversidad microbiana.

En este trabajo se estudiaron muestras de suelos contaminados con petróleo de Huimanguillo, Tabasco y de Poza Rica, Veracruz; se cuantificó la cantidad de UFC/g de suelo de las bacterias totales y de las bacterias hidrocarbonoclastas, de estas últimas se aislaron algunas cepas. A partir del suelo de Tabasco se aislaron 7 cepas degradadoras de hidrocarburos y 21 cepas hidrocarbonoclastas del suelo de Poza Rica, Ver. Estas últimas se identificaron por galerías API 20 NE y se encontraron los siguientes microorganismos: 3 cepas de *Stenotrophomonas maltophilia*; 3 cepas de *Sphingomonas paucimobilis*; dos cepas de *Chryseomonas luteola*; 3 cepas de *Burkholderia cepacia* y dos cepas de *Agrobacterium radiobacter*.

Se extrajo DNA de los suelos contaminados y se obtuvieron productos de amplificación por PCR para el gen completo 16S rRNA, así como para la región V6-V8 de este mismo gen y para la región intergénica del operón *rrn*. Se realizó el análisis de restricción enzimática (REA) del espacio intergénico del operón *rrn*, a las 21 cepas degradadoras de Poza Rica, Veracruz. La tipificación PCR-REA permitió agrupar en 18 grupos diferentes a las cepas hidrocarbonoclastas aisladas.

Del suelo de Poza Rica, se montó una biopila de biorremediación y a lo largo de 2 meses, se analizaron los patrones de bandas de DNA de las poblaciones presentes por el método de DGGE. Con estos resultados se estudió el dinamismo, estructura y diversidad de la comunidad bacteriana presente en la biopila.

## **INTRODUCCION.**

Entre el 90 y 99% de las especies bacterianas que oxidan hidrocarburos no pueden ser cultivadas por métodos convencionales de laboratorio. A pesar de que algunos medios de cultivos selectivos y enriquecidos pueden imitar las condiciones que los microorganismos requieren para su proliferación, las poblaciones microbianas que logran crecer en estos medios no son representativas de las que proliferan en su hábitat natural (Roszak y Colwell, 1987). Las técnicas de biología molecular ofrecen nuevas oportunidades para el análisis de la estructura y composición de las comunidades microbianas (Torsvik y col. 1994). El conocimiento de la diversidad microbiana en ambientes naturales, ha sido revelado por el estudio con biomarcadores moleculares de los microorganismos como el gen del 16S rRNA. Los biomarcadores pueden ser los ácidos nucleicos o proteínas funcionales que poseen estructuras que se han conservado durante el transcurso de la evolución. Estos biomarcadores moleculares permiten conocer de manera más directa la estructura de las comunidades microbianas, incluyendo a especies no cultivables por métodos convencionales (Amman, 1994).

La biorremediación de suelos contaminados con petróleo es desarrollada para degradar, transformar, remover, limpiar y/o disminuir el contenido de hidrocarburos, presentes en los suelos; son numerosas las metodologías biológicas que se utilizan con este propósito, pero casi todas están basadas en la capacidad de los microorganismos de catabolizar o biotransformar compuestos orgánicos, por lo general hacia productos menos tóxicos o de más fácil degradación (Trejo y Quintero, 2000).

El composteo es un proceso biológico controlado, por el cual pueden tratarse suelos contaminados con hidrocarburos. Entre los sistemas de composteo se tiene la biopila.

Bajo este enfoque, en el presente trabajo se analizaron muestras de suelo de dos sitios contaminados: Poza Rica, Veracruz y Huimanguillo, Tabasco. En una primera etapa se realizó la cuenta microbiana de cada uno, tanto de bacterias totales como de bacterias hidrocarbonoclastas para cada muestra. Se realizó también la extracción de ácidos nucleicos probando y comparando distintos métodos. Posteriormente los ácidos nucleicos extraídos se amplificaron por PCR y se realizó el análisis del patrón de bandas por geles con gradiente de desnaturalización (DGGE) de las comunidades microbianas presentes en dichos suelos.

El suelo de Poza Rica, fue monitoreado en una biopila y se estudió el dinamismo y estructura de la comunidad bacteriana presente en este suelo.

## **1.- Revisión Bibliográfica.**

### **1.1. Panorama general de contaminación por hidrocarburos en México.**

El desarrollo tecnológico industrial ha incrementado la introducción en el ambiente de compuestos químicos tóxicos provenientes de diversas fuentes, como son la industria farmacéutica, petroquímica, la actividad minera, etc. En nuestro país, debido a la explotación, comercialización, almacenamiento y transporte de petróleo y sus derivados, muchos sitios se encuentran contaminados.

De acuerdo con información de PEMEX, dos de los lugares más contaminados por hidrocarburos a nivel nacional son la refinería "Lázaro Cárdenas" y el pantano de "Santa Alejandrina", ambos ubicados en el sureste de México. PEMEX en el 2004 reportó que el aumento en el proceso de crudo y en la producción de hidrocarburos fue de 10.4 millones de toneladas, es decir, 3.1 por ciento más respecto al año anterior. Similarmente, la generación de residuos peligrosos se incrementó 25.3 por ciento en relación al año anterior, pasando de 380 mil a 480 mil toneladas. Aproximadamente el 86% del volumen total de estos residuos, corresponde a lodos y recortes de perforación (72%), lodos aceitosos (8%) y aceites gastados (6%). En el Informe sobre Seguridad, Salud y Medio Ambiente de PEMEX correspondiente al 2003, se indica que las emisiones y descargas totales de la paraestatal aumentaron 18.9 por ciento en relación al 2002, al pasar de 1.2 a 1.4 millones de toneladas (PEMEX, 2004).

En los estados de Campeche, Tabasco, Veracruz y Chiapas se encuentran las reservas de petróleo más grandes de nuestro país, las características climáticas y geográficas que representa cada zona de extracción determina que cada sitio tenga características de suelo diferente, por ejemplo: contenido de materia mineral, materia orgánica, agua, aire y poblaciones de microorganismos. La complejidad y especificidad que presenta cada suelo contaminado, por su estructura, características fisicoquímicas y biológicas, así como por la gran variedad de contaminantes, requiere por lo general, de trenes de tratamiento específicos para su limpieza. Los métodos tradicionales de remediación para estos sitios, se basan en tecnologías que se han desarrollado en los últimos 20 años, tratamientos biológicos, físicos, químicos y térmicos. La biorremediación es un proceso que involucra microorganismos o procesos biológicos para transformar y/o eliminar contaminantes del

ambiente. En este sentido, la biodegradación se define como el cambio, en la estructura química de un compuesto, catalizado biológicamente (Madsen, 1991).

En el caso de compuestos orgánicos, la biodegradación frecuentemente, permite la conversión del compuesto orgánico a CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O, esta conversión es conocida como mineralización (Rosenberg y col. 1992). Los microorganismos son los principales responsables del cambio geoquímico, puesto que su amplia distribución, elevada actividad metabólica, capacidad de adaptación fisiológica, maleabilidad genética, así como su diversidad enzimática y nutricional son factores que los colocan como agentes recicladores en la biosfera.

La contaminación de mantos acuíferos y suelos por compuestos orgánicos provoca daños al ambiente. En el Instituto Mexicano del Petróleo (IMP), a través de colaboraciones con instituciones de educación superior, tales como la Universidad Autónoma Metropolitana y la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, se ha propuesto el desarrollo e integración de tecnologías fisicoquímicas y biológicas aplicables a suelos mexicanos contaminados con hidrocarburos, a fin de promover su remediación. Se planteó implementar dos procesos de remediación basados en biorreactores y biopilas (composteo). El estudio de las poblaciones bacterianas involucradas en estos procesos, se abordó con un doble enfoque disciplinario, desde la microbiológica tradicional y también mediante la utilización de técnicas de biología molecular. Con el segundo enfoque se puede establecer la presencia y dinamismo de las poblaciones microbianas presentes en ambos procesos, todo basado en la detección de biomarcadores. En cada una de ellas es necesario estudiar el dinamismo de las poblaciones bacterianas presentes a través del biomonitoreo, que es un seguimiento de poblaciones microbianas por técnicas de biología molecular. Este conocimiento permite el establecimiento de tecnologías que pueden ser utilizadas en propuestas de trenes de tratamiento, que ataquen diferentes problemas de sitios contaminados con hidrocarburos en la región tropical (diferentes tipos de suelos y contaminantes).

## **1.2. Composición química del petróleo.**

El petróleo es una mezcla compleja de hidrocarburos que contiene principalmente carbono e hidrogeno en cantidades que varían entre 83-86% y 11-13%, respectivamente, en la

mezcla que lo constituye, los hidrocarburos coexisten en fase sólida, líquida y gaseosa y pueden presentar además en su composición, pequeñas proporciones de heterocompuestos con presencia de nitrógeno, azufre, oxígeno y algunos metales. El petróleo varía mucho en su composición, la cual depende principalmente del tipo de yacimiento de donde provenga (Chow, 1987).

Los hidrocarburos que componen al petróleo pueden agruparse en cuatro categorías: alifáticos, aromáticos, polares o resinas y asfaltenos. La proporción de cada una de estas fracciones depende de muchos factores como la zona geográfica, historia geológica, edad, migración y alteración del petróleo crudo.

- **Alifáticos:** La fracción de los compuestos alifáticos incluye alcanos lineales, alcanos ramificados (isoparafinas), alcanos cíclicos (naftenos), alquenos y alquinos.
- **Aromáticos:** La fracción de los aromáticos contiene hidrocarburos como el benceno, tolueno, xileno, etc., e hidrocarburos poliaromáticos, como los naftenoaromáticos y compuestos aromáticos de sulfuro como el tiofeno y dibenzotiofeno. La fracción de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) contiene compuestos cancerígenos como el benzopireno.
- **Polares:** La fracción de polares, o resinas que contienen compuestos polares con N, S y O, con una gran variedad de componentes como piridinas, quinoleinas, carbazoles, tiofenos, sulfóxidos y amidas, que pueden ser sólidos amorfos que difícilmente se disuelven en el petróleo.
- **Asfaltenos:** Son compuestos de moléculas grandes que se dispersan en el petróleo como compuestos poliaromáticos, ácidos nafténicos, sulfuros, fenoles polihídricos, ácidos grasos y metaloporfirinas.

### **1.3. Biodegradación de hidrocarburos del petróleo.**

Diferentes géneros de microorganismos están involucrados en procesos de degradación de compuestos del petróleo. Se encuentran microorganismos con diferentes metabolismos como quimiorganotrófico, fotolitótrofo, quimiolitotrofo, organótrofo y heterótrofo (Atlas y Bartha 1998).

En la degradación de los hidrocarburos del petróleo, se involucran consorcios de microorganismos, incluyendo procariontes y eucariontes. Las bacterias y levaduras son los organismos dominantes en la degradación de compuestos del petróleo en ecosistemas acuáticos, mientras que bacterias y hongos son los que dominan en muestras de suelo. Los microorganismos más comunes que son responsables de la degradación del petróleo comprenden principalmente géneros bacterianos como: *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Arthobacter*, *Corynebacterium*, *Achromobacter*, *Rhodococcus*, *Alcaligenes*, *Mycobacterium* y *Bacillus*. Los géneros más comunes de hongos son: *Aspergillus*, *Mucor*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhodotorula*, *Candida* y *Sporobolomyces* (Atlas, 1981; Bossert y Bartha, 1984).

Durante la biodegradación, los microorganismos están equipados con la maquinaria metabólica para utilizar al contaminante como fuente de carbono y energía para su crecimiento, produciendo biomasa, subproductos, dióxido de carbono y agua (Eweis, 1998).

El grado de eficiencia de los procesos de degradación se encuentra íntimamente relacionado con factores ambientales que rodean al sistema microorganismo-contaminante (Fernández, 1995). Entre los más importantes se encuentra el pH, la concentración de nutrientes, la temperatura, el tamaño y características de las partículas de suelo, la biodisponibilidad y concentración del contaminante, la toxicidad, la presencia de otros nutrientes, etc. La persistencia de un contaminante en el ambiente depende de las características físicas y químicas del compuesto químico, como la baja solubilidad y la toxicidad que presenta hacia los microorganismos degradadores (Alexander, 1994).

La mayoría de los microorganismos que oxidan hidrocarburos llevan a cabo por vía aerobia las reacciones de oxido-reducción, teniendo como último aceptor de electrones al oxígeno, aunque también se encuentran microorganismos que requieren condiciones anaerobias para la oxidación de estos compuestos. Sin embargo, para la mayoría de los compuestos, la degradación más rápida y completa ocurre en condiciones aerobias (Cookson, 1995).

Tanto la vía aerobia como la anaerobia producen subproductos derivados de la oxidación incompleta del hidrocarburo, tales como alcoholes, dioles y cetonas. También pueden

producirse ácidos orgánicos, como pirúvico, cítrico y oxálico. La degradación microbiana de los compuestos orgánicos no siempre conduce a la mineralización sino a una biotransformación y los compuestos que se producen pueden ser, en algunos casos, más tóxicos que el original (King, 1992).

La capacidad de los sistemas biológicos para degradar componentes de petróleo es muy generalizada, puesto que ciertos microorganismos en el suelo pueden adaptarse a los constituyentes del petróleo.

Los mecanismos de degradación del petróleo y sus fracciones dependen de la fracción química dominante y de los microorganismos involucrados. En la biodegradación microbiana de hidrocarburos se conocen genes involucrados en la metabolización de las diferentes fracciones del petróleo en donde múltiples vías metabólicas interaccionan para oxidarlos, dichos genes codifican para la síntesis de enzimas como monoxigenasas, dioxigenasas, deshidrogenasas, etc. También se presentan procesos de cometabolismo en donde el co-metabolito, en este caso el compuesto contaminante, puede ser transformado sólo en presencia de un sustrato utilizado por el microorganismo para su crecimiento o en presencia de otro compuesto transformable (Dalton y Stirling, 1982).

Por otro lado, se ha visto que muestras de suelos no contaminados, contienen poblaciones de alrededor de  $10^7$ – $10^9$  UFC por gramo de suelo, en donde tan sólo el 1% puede degradar componentes del petróleo. En un suelo contaminado con hidrocarburos, cambia el número de microorganismos capaces de degradar petróleo, éste se incrementa de  $10^3$  - $10^6$  UFC por gramo de suelo (Agteren, 1998). Esto es posible debido a que los microorganismos pueden obtener su fuente de carbono de los hidrocarburos, y con ello obtener energía para crecer y multiplicarse.

En la biodegradación del petróleo interviene otro factor relevante: la disponibilidad de los hidrocarburos para el microorganismo, ya que algunos compuestos presentan una baja solubilidad, lo que dificulta su transporte al interior de la célula a través de las membranas celulares, además de la adsorción que presentan algunos compuestos hacia el propio suelo. Los microorganismos pueden producir compuestos tensoactivos a fin de emulsionar el hidrocarburo y mejorar así su disponibilidad (Reylli y col. 1996). Se conoce poco de los

mecanismos involucrados en el transporte de hidrocarburos a través de la membrana celular. Se cree que la proteína alkL que está involucrada en el transporte a través de la membrana externa de hidrocarburos y que posiblemente también la proteína alkN esté involucrada en procesos de quimiotaxis de hidrocarburos, dicha proteína se encuentra en la membrana interna (Van Hamme y col. 2003). Durante un largo período se creyó que el transporte de hidrocarburos era un proceso pasivo; sin embargo, hay evidencia de un requerimiento de energía para la captación de hidrocarburos. En las levaduras degradadoras la presencia de poros en las membranas celulares permite el paso de hidrocarburos (Morgan y Watkinson, 1994).

La oxidación de hidrocarburos alifáticos, tanto por bacterias como por hongos, consiste en convertir la cadena hidrocarbonada del alcano en el ácido graso correspondiente mediante la oxidación del grupo metilo terminal. En presencia de oxígeno la cadena del alcano puede ser atacada por monoxigenasas o dioxigenasas (Bouwer y Zehnder, 1993), las cuales introducen uno o dos átomos de oxígeno en la molécula, formándose así un alcohol. Posteriormente, el alcohol es oxidado a un aldehído y después al ácido graso correspondiente. Una vez que el hidrocarburo se encuentra en forma de ácido graso, es utilizado en la ruta catabólica de la  $\beta$ -oxidación, donde se remueven unidades de dos carbonos para la formación de acetyl-CoA, éste es llevado hasta  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  por el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, la oxidación de  $\text{NADH} + \text{H}^+$  y  $\text{FADH}_2$  generados por la oxidación de nutrientes se lleva a cabo en cadena respiratoria y como subproducto se produce ATP (Wackett y col. 1989).

Los compuestos alifáticos insaturados (alquenos y alquinos) son oxidados por vía aerobia por mecanismos similares a los utilizados para los alcanos. Sin embargo, los enlaces dobles o triples son más reactivos químicamente y pueden experimentar otro tipo de reacciones tales como epoxidación e hidratación (Bouwer y Zehnder, 1993). Existen un sin número de rutas catabólicas de los hidrocarburos que generalmente pueden llegar a intermediarios menos tóxicos para el ambiente (Smit, 1994).

Los compuestos polares como las resinas y los asfaltenos, poseen estructuras químicas muy complejas que los convierten en compuestos recalcitrantes a la biodegradación, debido a su

insolubilidad y a que presentan grupos funcionales que se encuentran protegidos del ataque microbiano, además de estar constituidos por un gran número de anillos aromáticos (Atlas, 1991; Baker y Herson, 1994). Sin embargo, algunos estudios han reportado la degradación de asfaltenos por cometabolismo, en presencia de alcanos alifáticos de 12 a 18 átomos de carbono (Leahy y Colwell, 1990).

Los compuestos aromáticos que poseen como estructura primaria la molécula de benceno, denominados BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos), se encuentran como contaminantes frecuentes y constituyen un porcentaje elevado de la composición del petróleo. Su degradación se lleva a cabo mediante dos vías oxidativas: la activación del anillo y su ruptura. La activación involucra la incorporación de oxígeno en el anillo, esto es, una dihidroxilación del núcleo aromático. Esta activación se lleva a cabo también por la acción de las enzimas mono o dioxigenasas (Cerniglia, 1992). En la segunda fase, los dihidrodioles sufren una oxidación para formar derivados dihidroxilados, como el catecol, los cuales son precursores de la ruptura del anillo por oxidación vía *meta* u *orto*, produciendo el semialdehído 2-hidroximucónico y el ácido mucónico, respectivamente. Posteriormente, estos compuestos son oxidados para formar ácidos grasos que pueden ser utilizados por los microorganismos para la síntesis celular y la producción de energía (Eweis y col. 1998).

Se sabe que los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) son degradados, un anillo a la vez, por mecanismos similares a los de la degradación de los hidrocarburos aromáticos. Sin embargo, la biodegradabilidad de los HAP) tiende a disminuir conforme se incrementa el número de anillos que los constituyen y conforme se incrementa el número de radicales alquilo que poseen (Park y col. 1990). El metabolismo microbiano del naftaleno, fenantreno y antraceno ha sido estudiado ampliamente (Gibson y Subramanian, 1984; Bouwer y Zehnder, 1993). La solubilidad que presentan en compuestos polares influye mucho en la biodegradación de estos compuestos.

Al utilizar cepas puras pueden formarse intermediarios tóxicos, pero el uso de cultivos mixtos o consorcios microbianos permite degradar estos intermediarios, favoreciendo la mineralización completa de los contaminantes (Singleton, 1994). El sinergismo entre

bacterias, hongos y levaduras provoca un incremento en la velocidad de oxidación de los hidrocarburos (Riser-Roberts 1998).

### **1.3.1. Mecanismos Genéticos en la degradación de hidrocarburos.**

Los microorganismos pueden oxidar diferentes sustratos derivados de petróleo por diversas vías catabólicas, como la vía *alk* (alcanos de C<sub>5</sub> a C<sub>12</sub>), vía *nah* (naftaleno) y vía *xyl* (xileno), además, se han caracterizado y localizado un gran número de plásmidos relacionados con estas vías, por ejemplo, plásmidos como OCT, NAH y TOL se han encontrado en *Pseudomonas* sp. (Sayler y col, 1990). Lo anterior indica que la capacidad degradadora de algunos microorganismos está codificada en ciertas regiones de su cromosoma y en plásmidos. Un modelo del metabolismo de los alcanos incluye la localización de las proteínas Alk (transporte de hidrocarburos) y la regulación de los genes *alk*. El operón *alkBFGHJKL*, codifica las enzimas necesarias para convertir los alcanos en acetyl-CoA. Por otro lado, el gen *alkST* codifica a la enzima rubredoxina reductasa (que es una proteína hierro-azufrada que funciona como transportadora de electrones), mientras que el gen *alkS* es el regulador positivo del operón *alkBFGHJKL*. El operón *alkBFGHJKL* y su regulador positivo están separados por 9.7 Kb de DNA. El gen *alkN* codifica para la proteína alkN, que puede estar involucrada en la quimiotaxis de hidrocarburos. La mayoría de la información genética del metabolismo de los HAP ha sido estudiada en *P. putida* cepa G7 la cual tiene la información para el catabolismo en los plásmidos. El primer operón *nahAaAbAcAdBFCED* codifica la vía de conversión del naftaleno en salicilato (vía superior) y el segundo operón *nahGTHINLOMKJ* codifica la conversión de salicilato vía meta-catecol a acetaldehído y piruvato (vía inferior). El regulador de estos operones es codificado en un tercer gen *nahR* que es inducido por salicilato (Van Hamme y col. 2003).

### **1.4. Biorremediación.**

La biorremediación se define como el uso de sistemas biológicos para degradar, transformar, eliminar o reducir la concentración de compuestos orgánicos tóxicos a productos metabólicos inocuos o menos tóxicos. Es una tecnología que emplea procesos biológicos, mediados principalmente por microorganismos, para transformar, detoxificar y/o mineralizar contaminantes del ambiente (Cookson, 1995). En la biorremediación se

busca acelerar la degradación de los microorganismos a través de la manipulación del medio contaminado, con la aplicación de diversas tecnologías (Van Deuren y col., 1997).

Se han desarrollado diferentes tecnologías de biorremediación cuyas principales diferencias estriban en las condiciones en las que se lleva a cabo el proceso, en los parámetros que son controlados o modificados, así como en el lugar en que se apliquen (Cookson, 1995, Riser-Roberts, 1998). En la Tabla 1 se muestran las diversas tecnologías utilizadas frecuentemente para la biorremediación de suelos, así como su aplicación y características.

**Tabla 1.** Características de las diferentes tecnologías de biorremediación (Riser-Roberts, 1998).

<b>Tecnología</b>	<b>Aplicación</b>	<b>Características</b>
Bioventeo	Suelos contaminados. Tratamiento <i>in situ</i> .	Introducción de oxígeno a través del suelo, por bombeo, para estimular el crecimiento microbiano y su actividad.
Biopilas	Suelos contaminados. Se aplica <i>on site</i> , pero puede aplicarse <i>ex situ</i> .	El material contaminado se coloca sobre la superficie del terreno en formas de pilas. Estas pilas se mezclan periódicamente para favorecen la aireación. Se puede agregar desechos agroindustriales.
Bioestimulación	Suelos contaminados. Tratamientos <i>in situ</i> .	Aplicación de soluciones con nutrientes y/u oxígeno, a través del suelo contaminado, para estimular la actividad de los microorganismos autóctonos.
Biolabranza	Suelos contaminados. Tratamientos <i>in situ</i> .	Durante el proceso este proceso la superficie del suelo contaminado es tratado en el mismo sitio por medio del arado.
Composteo	Suelos contaminados. Tratamiento <i>on site</i> , y <i>ex situ</i> . Pueden utilizarse biorreactores.	Proceso biooxidativo controlado, que involucra lodos activados y sustratos orgánicos heterogéneos en estado sólido, el cual evoluciona incluyendo una fase termófila, produciendo CO <sub>2</sub> , agua, minerales y un material orgánico (composta).
Biorreactores	Suelos, sedimentos y acuíferos contaminados. Tratamiento <i>on site</i> y <i>ex situ</i> .	Uso de reactores para el cultivo microbiano en fase líquida o semisólida.
Fitorremediación	Suelos contaminados. Aplicación <i>in situ</i> y <i>on site</i> .	Utilización de plantas para la remoción de contaminantes.
Landfarming	Suelos, sedimentos y acuíferos contaminados.	Uso de poblaciones microbianas nativas y suplementados con nutrientes minerales.

Dependiendo del lugar de realización del proceso de biorremediación se pueden encontrar dos tipos de tecnología: *in situ*, el suelo contaminado es tratado en el mismo sitio en donde se encuentra la contaminación y *ex situ*, requieren de un proceso en donde el suelo

contaminado, antes del tratamiento, es removido por excavación o dragado y puede realizarse en el mismo sitio (*on site*) o fuera de él (*off site*) (EPA, 2001).

En los procesos de biorremediación se utilizan diversas estrategias para acelerar la biodegradación de los contaminantes que se encuentran en un sitio contaminado: dos de estas estrategias es la bioaumentación y la bioestimulación.

La bioaumentación se define como la adición o introducción de microorganismos endógenos o exógenos en un sitio determinado, para promover y acelerar una actividad biológica específica, como puede ser la degradación de un contaminante. El uso de la bioaumentación generalmente se considera conveniente cuando el número de microorganismos degradadores de hidrocarburos en el sitio contaminado es muy bajo (menor a  $10^5$  UFC por gramo en peso seco) o cuando éstos no tienen la capacidad de degradación suficiente (Vogel, 1996).

La bioestimulación consiste en la adición de nutrientes y/o la introducción de oxígeno y aceptores de electrones al sitio contaminado, favoreciendo o intensificando la actividad biológica de los microorganismos. Su uso se recomienda cuando el sitio contaminado carece de los nutrientes necesarios para soportar el crecimiento microbiano. Básicamente, los nutrientes que se introducen al medio son aquellos que pueden ser limitantes para la actividad bacteriana, principalmente los denominados macronutrientes, como nitrógeno y fósforo. La naturaleza de la fuente de nutrientes y sus características fisicoquímicas deberán estar en función del tipo de contaminante que se desea biodegradar, del tipo de tratamiento que se elija y de las características propias del suelo (Bajpai y col, 1991). La presencia de macronutrientes es necesaria para el crecimiento bacteriano: el nitrógeno es necesario para la síntesis de proteínas, componentes de la pared celular y ácidos nucleicos. Por otro lado el fósforo se requiere para la síntesis de ácidos nucleicos, componentes de las membranas celulares y ATP (Baker y Herson, 1994).

La tecnología de las biopilas es una alternativa para la remediación *ex situ* de suelos contaminados con hidrocarburos y/o productos derivados del petróleo, debido a su bajo costo de operación y eficiencia. La adición de residuos agrícolas y nutrientes da como resultado una buena estrategia para mejorar las condiciones del suelo y, en consecuencia, la

actividad microbiana responsable de la remoción de los hidrocarburos. Al adicionar residuos agrícolas tales como paja, bagazo de caña, cáscaras de frutas, etc., se incrementa la porosidad y se evita la compactación del suelo, favoreciendo la aireación del sistema (Pérez-Armendáriz, y col., 2004).

### **1.5. Características generales de los suelos.**

El suelo se define como el material exterior de la superficie terrestre, un estrato característicamente diferente del lecho rocoso subyacente (Sylvia y col. 1998). La estructura del suelo está conformada por cinco componentes principales, que incluyen la materia orgánica, los minerales, el agua, el aire y organismos vivos, en un estado de equilibrio. Los suelos son heterogéneos y varían en cuanto a su composición química, y a las características y propiedades que dependen de la geografía, geología, clima, vegetación, fauna e influencias antropogénicas de un sitio a otro e inclusive dentro de un mismo sitio (Cookson, 1995).

Las capas superiores del suelo generalmente son ricas en materia orgánica y su concentración disminuye rápidamente conforme la profundidad del suelo se incrementa. La materia orgánica está compuesta básicamente de humus, producto de la descomposición de las plantas.

Los minerales del suelo están constituidos por aluminosilicatos hidratados, carbonatos, fosfatos, nitratos, nitritos e iones metálicos, incluyendo un gran número de grupos funcionales, que en conjunto participan en los procesos de adsorción/desorción e intercambio de iones en el suelo. Las cantidades de agua y aire que posee un suelo presentan fluctuaciones, pero se sabe que constituyen aproximadamente el 50 % del volumen total del suelo.

Las propiedades que definen el tipo de suelo, son la capacidad del intercambio iónico, el contenido de materia orgánica, el pH, la porosidad, el tamaño de partícula y la textura del suelo, que determinan su comunidad microbiana puesto que son factores que establecen cada nicho ecológico (Tan, 1994).

### **1.6. Suelo biótico.**

La población microbiana en el suelo consiste de miembros de las tres mayores ramas de la vida:

- 1.-Bacterias (dominio Bacteria).
- 2.- Arqueas (dominio Arquea).
- 3.- Hongos, microalgas y protozoarios (dominio Eukarya).

Estos grupos constituyen el 90% o más del total de la microbiótica del suelo y la microfauna (nemátodos, artrópodos, moluscos) el otro 10%. Los miembros de los dominios Bacteria y Arquea predominan en suelos pantanosos, mientras que los hongos se encuentran en suelos con ambiente aerobio. En la superficie del suelo se encuentra un gran número de microorganismos, pero este número puede cambiar por a la introducción de contaminantes (Riser-Roberts, 1998; van Elsas y Smalla, 1995).

La distribución de las poblaciones microbianas no es uniforme en el suelo y refleja la estructura del mismo y la disponibilidad de nutrientes. La actividad de los microorganismos en la superficie del suelo requiere de la presencia de nutrientes, mismos que se encuentran normalmente en cantidad suficiente en los suelos no contaminados (Bajpai y col. 1991), por lo que normalmente se encuentran cuentas microbianas del orden de  $10^7$  a  $10^9$  UFC por gramo de suelo. En suelos bien aireados, se encuentran hongos, pero si hay limitación en la transferencia del oxígeno, se encontrará un mayor número de bacterias (Nyer y col. 1996). La diversidad observada en los microorganismos del suelo es sorprendente, pues más de 10 000 especies diferentes de bacterias han sido encontradas por gramo de suelo, aunque muchas no se han podido ser identificar, en suelos contaminados se encuentran de 350 a 1500 poblaciones (Torsvik y Overas 2002).

### **1.7. Biomonitorio.**

El biomonitorio es una técnica que permite realizar un seguimiento de diversas poblaciones microbianas en muestras ambientales. Permite conocer y estudiar, la estructura, composición y dinámica de las diferentes de poblaciones microbianas presentes en procesos de biorremediación de suelos contaminados. Este seguimiento se puede realizar a través de genes estructurales como el 16S rDNA, o de proteínas como el citocromo C de cadena respiratoria. En la actualidad, la cuantificación e identificación de géneros microbianos se hace por análisis del crecimiento de los microorganismos en medios selectivos, estos métodos a veces no discriminan entre cepas de la misma especie; además existe un gran número de especies no cultivables, por lo cual se puede realizar el seguimiento a través de

técnicas moleculares (Roszak y Colwell, 1987; Amanm y col. 1995). Esto es especialmente importante en estudios de ecología microbiana, en los que la población está integrada de manera más compleja a lo que se había considerado (Torsvik y col. 1994). La biología molecular, por su parte, hace posible la detección e identificación de microorganismos a nivel de genotipo, en vez de analizar el fenotipo de las células. La ubiquidad de moléculas ribosomales como el 16S y 23S del rDNA y algunos genes estructurales de proteínas, los hace candidatos para este tipo de estudios.

### **1.8. DNA de bacterias del suelo.**

El número de bacterias del suelo puede determinarse por técnicas de conteo en placa, pero el número de éstas puede variar considerablemente, ya que se modifica cuando se utilizan medios de cultivo especiales (Olsen y col., 1987). Un número más preciso es obtenido al teñir a las células con un sustrato cromogénico y realizar el conteo con el microscopio de fluorescencia, pero al utilizar esta técnica se ha observado que no todas las bacterias pueden ser observadas ya que se pueden ocultar en los mismos gránulos del suelo.

Una estrategia alternativa, es el aislamiento colonias en placas de agar para caracterizar a la comunidad microbiana fenotípicamente y comparar con la comunidad microbiana de los aislados de DNA del suelo y tener sus características genotípicas. Torsvik y col. (1990) encontraron que se obtiene cerca de 1 mg de DNA purificado a partir de 150 a 200 g de suelo y que éste contiene alrededor de  $10^{10}$  a  $10^{11}$  bacterias por gramo de suelo seco.

Para desarrollar un procedimiento de aislamiento de DNA bacteriano a partir de suelo se deben encontrar las soluciones óptimas para resolver los siguientes problemas:

- Liberación de las bacterias a partir de los residuos del suelo y del material húmico coloidal. Sin involucrar numerosos pasos, el método no debe ser selectivo y debe dar un rendimiento razonable.
- Encontrar un procedimiento de lisis el cual rompa todas las bacterias con la misma eficiencia.
- Desarrollar un procedimiento de purificación que separe el DNA, principalmente de las sustancias húmicas residuales.

## **1.9. Extracción y purificación de ácidos nucleicos del suelo.**

Se ha publicado un gran número de métodos para extracción del DNA de comunidades microbianas totales de muestras de suelos y sedimentos (Sayler y col. 1990; Smalla y col. 1993; Zhou y col. 1996; Ogram y col. 1987; Torsvik, 1980). Los diferentes métodos probablemente reflejan la heterogeneidad de los suelos y su subsiguiente análisis de DNA. La variación en la eficiencia de lisis, el rendimiento y pureza son fundamentales para utilizar el DNA en diferentes técnicas como PCR, hibridación, clonación, etc. (Leff y col. 1995). Estos procesos deben considerar la obtención del DNA de toda la comunidad microbiana, con un rendimiento alto y una pureza que permita llevar a cabo las técnicas moleculares.

Durante la extracción de DNA del suelo, se pueden variar los tratamientos de extracción y purificación, lo que afecta al final el rendimiento y pureza del DNA (Krsek y Wellington col. 1999). El rendimiento de la extracción se puede mejorar al incrementar la concentración de EDTA o iones monovalentes en las soluciones de aislamiento, así como si se varían los tratamientos de lisis y el uso de etanol en la precipitación de los ácidos nucleicos. Las diferentes técnicas de extracción del DNA de la microbiota de una muestra suelo se pueden dividir en métodos directos y métodos indirectos.

### **1.9.1. Métodos Directos.**

Muchas técnicas están basadas en la acción lítica de agentes químicos y físicos de las células en la propia matriz del suelo. Entre los primeros agentes se incluyen el dodecil sulfato de sodio (SDS) y la lisozima, entre los físicos está la desintegración balística de las células con perlas de vidrio o el rompimiento térmico (-70°C a 65°C) (Steffan y Atlas 1988). La extracción directa del DNA donde se emplea una desintegración balística de las células involucra el uso de un homogenizador como "Bead-Beater" y una disolución de SDS seguido por una extracción y centrifugación, para posteriormente purificar el DNA. Con este procedimiento se asume que el 100% de las células son lisadas.

El rendimiento del DNA recuperado suele ser bajo, Trevors y Cook (1992) compararon diferentes métodos directos de extracción de DNA a partir de un gramo de suelo y encontraron que se recuperó de 2.1 a 19.5 µg/g gramo de suelo seco, dependiendo del

método usado. Los rendimientos de DNA y el promedio del tamaño del DNA dependen de los diferentes métodos de extracción. En teoría, se ha encontrado que aproximadamente  $10^{10}$  células bacterianas por gramo de suelo producen, de 30–50  $\mu\text{g}$  de DNA (Torsvik, 1980; Ogram y col. 1987).

Algunos autores reportan la inoculación microorganismos aislados del suelo, a una muestra de suelo, para determinar el rendimiento de recuperación del DNA de estos microorganismos, al utilizar diferentes métodos de extracción, se ha encontrado una diferencia significativa en la recuperación del DNA, mientras que Torsvik y col. (1990) encontraron 90–187  $\mu\text{g}$  de DNA/g de suelo, Ogram y col. (1987) recobran solamente 0.4 a 1.0  $\mu\text{g}$  de DNA/g de suelo. El tamaño de DNA suele variar, pero Faegri y col. (1977) reportan un método de extracción indirecta (extracción celular) en donde se obtienen fragmentos de hasta 48 Kb; Smalla y col. (1993) reportan que el tamaño del DNA obtenido en estudios comparativos de extracción directa oscila entre 10-40 Kb.

El utilizar SDS en la lisis celular permite un mayor rendimiento de DNA, comparado con otros métodos de lisis. Sin embargo, algunos agentes químicos como el SDS pueden resultar inhibitorios para la actividad de la *Taq* polimerasa. Se debe mencionar que en la extracción directa del DNA se obtienen mucho más contaminantes, como las sustancias húmicas, en comparación con la extracción indirecta del DNA.

Una ventaja de la extracción directa de DNA es que hay una diferenciación entre el DNA plasmídico y el cromosómico. Antes de la lisis directa de células de la matriz del suelo, se debe hacer una extracción alcalina del suelo, que sirve para recobrar DNA plasmídico, las células que están en el suelo se lisan y se recobra el DNA cromosomal.

Para realizar el biomonitoreo de las poblaciones microbianas involucradas en un proceso de biorremediación es importante tener DNA en suficiente cantidad y pureza, que además sea representativo de los microorganismos existentes (Parkin, 1993). Por ejemplo, Lamé y Defize (1993), determinaron el efecto del tamaño de la muestra en la variación asociada a la concentración de contaminantes, determinando que un tamaño de muestra por debajo de 10 gramos tiene como resultado un error muy grande, ya que puede resultar no homogénea.

Una de las técnicas de aislamiento del DNA del suelo, en donde se obtiene un mayor rendimiento, en el tamaño de DNA y pureza, se basa en la homogenización y

fraccionamiento por centrifugación de las células bacterianas y micelio de hongos del suelo. Es decir, las células son lisadas y el DNA se recupera posteriormente (Torsvik y col. 1994). La extracción directa de DNA por homogenización con Bead-Beater tiene como objetivo una lisis de todas las células, este método es el mejor para aislar DNA de muestras ambientales. Sin embargo, se ha mostrado que la homogenización con Bead-Beater para la lisis directa al recobrar DNA no es tan eficiente para lisar las bacterias de tamaño pequeño, (1.2 a 0.3  $\mu$  de largo) que consisten principalmente de cocos Gram positivos (Tien, 1999).

La solución del DNA extraído contiene también ácidos húmicos, compuestos fenólicos, proteínas y polisacáridos. Esta solución de DNA del suelo requiere algunos pasos adicionales de purificación, ya que los ácidos húmicos y compuestos fenólicos presentes en estas soluciones pueden causar inhibición en técnicas como PCR, además de que puede disminuir la especificidad de la hibridación.

El DNA puede ser purificado posteriormente por diferentes métodos; por ejemplo la cromatografía de hidroxapatita que remueve los ácidos húmicos. Holben y col. (1988) utilizaron polivinilpolipirrolidona (PVP) para remover materia orgánica del suelo. Otras técnicas como la ultracentrifugación en gradientes de cloruro de cesio, la separación por afinidad en columnas utilizando Sephadex, o de intercambio iónico como Elutip (Millipore), producen DNA más puro, de manera que puede ser utilizado en técnicas posteriores como restricción, PCR, hibridación, etc.

### **1.9.2. Métodos Indirectos.**

Se basan en la separación de las células de las partículas del suelo por tratamientos mecánicos como lo homogenización y/o ultrasonicación. Las células son purificadas y concentradas en centrifugaciones sucesivas (Holben y col. 1988; Steffan y Atlas, 1988). La extracción del DNA se obtiene por lisis de las células con lisozima y detergentes, estos métodos indirectos tiene el propósito de separar a las bacterias de los agregados que se dan en las partículas del suelo. Para propósitos rutinarios éstos métodos tienen diferentes desventajas, como el bajo rendimiento de recuperación del DNA además del tiempo que se invierte.

Otra cosa que debe de considerarse es que algunas técnicas de extracción pueden resultar menos laboriosas que otras, además del tiempo adicional para el procedimiento de

purificación del DNA, lo que se convierte en un inconveniente que debe considerarse.

### **1.10. Pureza del DNA bacteriano de muestras de suelo.**

Un método para analizar la pureza del DNA es la espectrofotometría, a una  $\lambda$  de 260 nm donde éste presenta la mayor absorbancia. Las proteínas suelen tener absorbancia a 280 nm y los ácidos húmicos a 230 nm (Marmur, 1963). Esto permite tener un valor de la pureza del DNA, se puede estimar obteniendo los cocientes entre las absorbancias de las proteínas y los ácidos húmicos. Se ha establecido un valor de 1.5 a 2.0 para el cociente de las  $A_{260}/A_{280}$  y de 1.8 a 2.3 para el cociente de las  $A_{260}/A_{230}$ , para garantizar una pureza adecuada.

Diferentes métodos se han reportado para la purificación de extractos crudos de DNA, como son columnas de Sephadex G 200, purificación con polivinilpirrolidona (PVP), sistema de purificación Clean Up (Promega). A continuación se describen brevemente los principios de cada método.

- Columnas de Sephadex G 200. Este método se basa en atrapar en red del Sephadex a las partículas contaminantes y dejar eluir a la solución de DNA.
- Purificación con PVP. En este método se utiliza una solución que tiene el polímero PVP el cual atrapa a las sustancias húmicas contenidas en la solución del extracto crudo de DNA (Holben, 1988, Ramírez, 1996).
- Sistema de purificación Clean Up (Promega). Este sistema está basado en la filtración del DNA en una resina adsorción de tiocianato de guanidina 6 M.
- Purificación con Cloruro de Cesio. Este método purifica extractos crudos de DNA mediante una ultracentrifugación con cloruro de cesio

Los rendimientos de los diferentes métodos de purificación varían de acuerdo al método utilizado, se han reportado pérdidas de hasta el 40% de DNA usando el método de columnas de Sephadex (Tien y col. 1999).

### **1.11. Amplificación por PCR de ácidos nucleicos de muestras del suelo.**

El método de PCR puede mejorar la detección de microorganismos en el ambiente al aumentar en varias órdenes de magnitud las secuencias de un gen de un microorganismo. La reacción de PCR permite amplificar genes o fragmentos de genes que se pueden utilizar

para la identificación de microorganismos del suelo (Bruce y col. 1992). Diferentes parámetros deben de ser considerados, como la temperatura de desnaturalización, la temperatura óptima del alineamiento de los iniciadores, así como la temperatura de fusión de los iniciadores y temperaturas de extensión de las cadenas. Otros factores que se deben de considerar es la concentración de sales como  $MgCl_2$ , nucleótidos, y el número de ciclos para la reacción. En extractos de DNA del suelo, los compuestos fenólicos y ácidos húmicos suelen inhibir a las polimerasas usadas en la reacción de PCR.

Para la reacción de PCR, el tamaño del DNA suele ser importante, preferencialmente se recomienda de un tamaño mayor a 10 Kb. En algunos estudios se ha encontrado que la adición de albúmina sérica bovina en la reacción de PCR, atrapa contaminantes como los ácidos húmicos (Romanowski, 1993).

### **1.12. Marcadores moleculares: 16S rDNA.**

Un biomarcador es cualquier compuesto biológico que puede ser utilizado como indicador de la presencia y/o la actividad de un grupo microbiano en particular. Por sus propiedades, los ácidos nucleicos pueden ser utilizados como biomarcadores. Debido a la ubicuidad entre los seres vivos, así como su diferencia en la secuencia de la estructura primaria permite utilizarlos como cronómetros evolutivos para una detección altamente especializada de microorganismos en muestras ambientales (Ramírez, 1999).

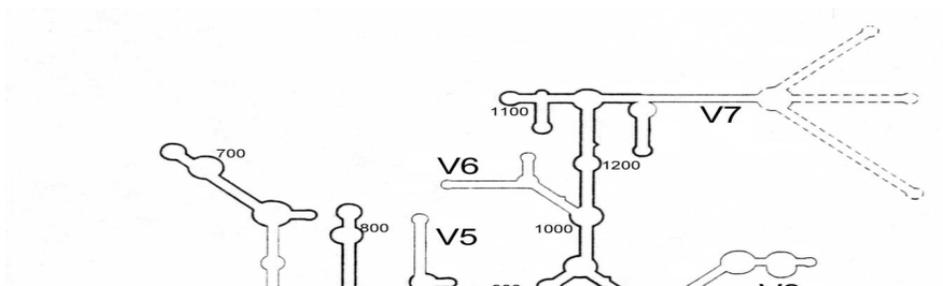
Los tres genes ribosomales en bacterias codifican a tres moléculas de RNA (16S, 23S y 5S) y constituyen parte de la estructura del ribosoma. Debido a su estructura plegada, las curvas de tallo y asa, así como las interacciones con proteínas ribosomales, hacen que la estructura primaria del gen ribosomal se encuentra bien conservada en todos los organismos y se ha utilizado como un biomarcador molecular para establecer relaciones filogenéticas entre los microorganismos. Los genes ribosomales contienen dominios muy conservados y variables, lo que permite su utilización en la clasificación de los microorganismos y la diferenciación entre grupos taxonómicos (Ramírez y col., 2000).

El RNA ribosomal y particularmente la subunidad pequeña del ribosoma que contiene al 16S rRNA, a su vez que está codificada en el gen (16S rDNA) es muy utilizado como marcador en estudios de ecología microbiana (Liesack y col. 1997). Varias razones soportan

la utilización del rRNA (en la subunidad pequeña y en la subunidad grande del ribosoma) como genes biomarcadores y cronómetros evolutivos:

- Están presentes en todos los organismos realizando la misma función, síntesis de proteínas.
- Su estructura secundaria y terciaria es altamente conservada.
- La estructura primaria consiste de regiones conservadas y variables alternadas, ofreciendo posibilidades únicas para detección, amplificación y secuenciación.
- La cantidad de secuencias de información presente en ambas moléculas (16S y 23S rRNA) es suficiente para realizar comparaciones estadísticamente significativas.
- Los genes del rRNA están libres de artefactos o de la transferencia lateral de otros genes.

Por lo tanto las relaciones establecidas por la comparación de secuencias representan relaciones filogenéticas verdaderas (Pace y col. 1986). El gen 16S rRNA contiene 1542 nucleótidos en *E. coli*, el tamaño de éste gen nos permite hacer la diferenciación filogenética. Por otro lado, el gen 5S rRNA es de aproximadamente 120 nucleótidos la longitud de este gen limita la información que da y el gen 23S rRNA es de 2900 bases, es también usado para establecer relaciones filogenéticas, al ser un gen más grande se complica la amplificación, por lo que el más utilizado es el 16S rRNA en procariontes y en el 18S rRNA en eucariontes (Fig. 1).



**Fig. 1.** Configuración secundaria del 16S rRNA de *E. coli*.

Aparecen las regiones variables (V1 a V9) usadas en distintos estudios.

Entre otros biomarcadores moleculares que se utilizan en el estudio de grupos de bacterias relacionadas fisiológicamente o filogenéticamente se utilizan genes funcionales, por ejemplo, genes involucrados en la fijación de nitrógeno o degradación de algunos compuestos xenobióticos, proteínas de membrana externa, etc. (Simonet y col. 1991).

### **1.13. Determinación de la diversidad genética de comunidades microbianas por técnicas de biología molecular.**

Las comunidades microbianas contienen un gran número de especies bacterianas diferentes. Estas comunidades están dominadas por interacciones complejas entre los diferentes microorganismos, sin embargo, cada una de las especies juega un papel específico en el mantenimiento del sistema. Las comunidades activas pueden obtener nutrientes eficientemente a partir del medio, eliminando los compuestos tóxicos. Sin embargo, no todas las especies están activas; muchas de ellas están inactivas hasta que las condiciones del ambiente cambian favoreciendo su crecimiento. Debido a la gran diversidad metabólica y flexibilidad de su organización, las comunidades microbianas se pueden encontrar en todas partes, por ejemplo, en los suelos contaminados, biopelículas, lodos bacterianos en reactores de aguas residuales, o en ambientes hipersalinos y extremófilos (Muyzer y col.

1993). El estudio de comunidades microbianas da información acerca de la composición, estructura y estabilidad, así como de la actividad y función de las especies individuales.

Diferentes métodos de biología molecular se han utilizado para determinar la diversidad genética de comunidades microbianas. Los ácidos nucleicos, tanto el DNA como RNA se extraen de comunidades microbianas y se utilizan para determinar la complejidad de las poblaciones e identificar a cada uno de sus miembros. Análisis directos de DNA utilizando experimentos de reasociación de DNA o hibridación DNA/DNA o la clonación y secuenciación representan otras técnicas que ofrecen posibilidades para identificación filogenética (Torsvik y col. 1990).

Otras estrategias para analizar la diversidad de comunidades microbianas complejas son la electroforesis en geles de poliacrilamida con un gradiente lineal de desnaturalización (DGGE) (Muyzer, 1993) o la electroforesis en gradiente de temperatura (TGGE) (Felske y col. 1996), en donde se amplifica el gen 16S rRNA por PCR para posteriormente tener los patrones electroforéticos de comunidades bacterianas. Técnicas como el DGGE o el TGGE permiten visualizar directamente la diversidad genética de comunidades microbianas complejas en muestras ambientales (Höfle, 1992).

#### **1.14. Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE).**

El DGGE permite estudiar comunidades microbianas en muestras ambientales, al utilizar regiones del gen del 16S rRNA, que fueron previamente amplificadas por PCR y cuyos amplicones representan a la comunidad completa en la muestra. Este gen es ideal porque se cuenta con una base de datos (Ribosomal Database Project II) y porque no se transfiere lateralmente y conserva su función como se mencionó. Se utiliza como ayuda filogenética al poder identificar y relacionar diversas secuencias de poblaciones microbianas (Muyzer y col. 1993).

En el (DGGE), los fragmentos de DNA que tienen el mismo tamaño, pero diferentes secuencias, pueden ser separados en el gel. Se ha demostrado que el DGGE puede detectar diferencias en los fragmentos de DNA (200-700 pb) de un par de nucleótidos (Muyzer y col. 1993).

La separación en el DGGE se basa en la movilidad electroforética de la cadena de la molécula de DNA parcialmente desnaturizada en los geles de poliacrilamida, las cuales son menores en comparación con la forma helicoidal completa de molécula.

La teoría detrás de DGGE es muy simple, los dos filamentos de una molécula de DNA se separan, cuando se aplica calor o un desnaturizante químico. La temperatura en la cual una doble cadena de DNA se empieza a separar es influenciada por dos factores:

1. Los enlaces del hidrógeno formados entre los pares de bases, en donde las regiones ricas en contenido GC se separan a temperaturas más altas que las regiones que tienen un mayor contenido de AT.
2. La atracción entre las bases vecinas del mismo filamento en la cadena de DNA.

Por lo tanto, una molécula de la DNA puede tener varias zonas que se separan con la temperaturas ( $T_m$ ) determinadas por la secuencia de los nucleótidos.

Cuando es separada por electroforesis con un gradiente lineal de desnaturizantes químicos (generalmente formamida y urea), la movilidad de la molécula se retarda, a partir de que los filamentos de DNA se empiezan a disociar. La estructura ramificada de la molécula se detiene en la matriz del gel. La separación completa del filamento es prevenida por la incorporación de una región broche en un extremo de uno de los iniciadores, esto se logra durante la amplificación por PCR utilizando una cola 5' que consiste en una secuencia de aproximadamente 40 nucleótidos de secuencia G-C (Fig. 2).

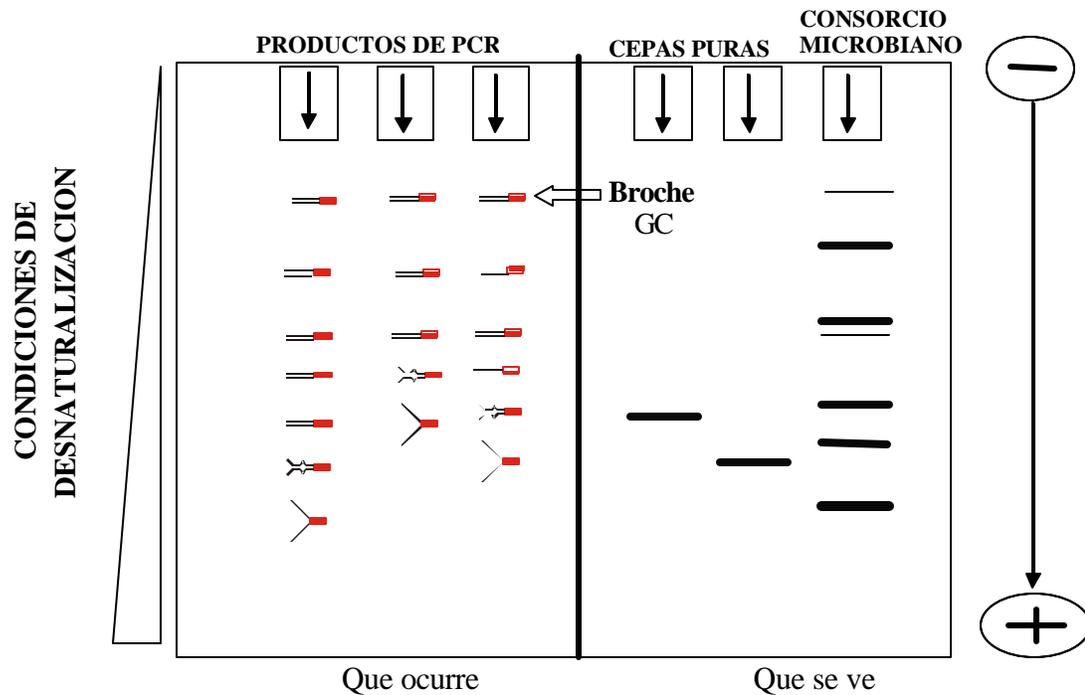


Fig. 2. Principio del DGGE (Electroforesis en Gel con Gradiente de Desnaturalización).

El análisis por DGGE de los fragmentos amplificados por PCR del 16S rDNA ayuda a diferenciar comunidades microbianas en birreactores experimentales, en muestras de suelos y sedimentos, etc. Esta técnica de biología molecular demuestra la presencia de varias bandas distinguibles en el patrón de separación, en donde se puede también visualizar por la intensidad de las bandas, las especies predominantes en las comunidades microbianas.

#### 1.14.1. Ventajas del DGGE.

1. Alto Rango de detección y sensibilidad.
2. El método es relativamente simple y no se utiliza en la detección algún isótopo radiactivo.
3. Los fragmentos amplificados por PCR pueden ser aislados del gel y usados en reacciones de secuenciación.

#### 1.14.2. Desventajas del DGGE.

1. El equipo de DGGE es requerido.

2. Los iniciadores pueden ser más caros por que tiene fragmentos de la región broche que tiene 40 bases de GC. Adicionalmente, pueden ser requeridos otros iniciadores para secuenciación de los fragmentos.
3. El análisis de los fragmentos de PCR mayores de 600 pb es menos eficiente.
4. Los genes que son ricos en GC no son fácilmente analizados por DGGE.
5. El método utiliza formamida que es muy tóxica.

### **1.15. Tipificación de bacterias por técnicas de biología molecular.**

La tipificación permite discriminar cepas con características fenotípicas similares y realizar una agrupación genotípica rápida en un grupo de bacterias. Las técnicas convencionales de microbiología, como características coloniales y celulares, pruebas bioquímicas, en muchos casos no dan información suficiente acerca de los microorganismos aislados. Las técnicas de biología molecular proporcionan una mayor información genotípica de los microorganismos, además de que minimizan problemas en los resultados, son técnicas altamente discriminatorias y reproducibles, además en la mayoría de casos se tienen bases de datos que permiten identificar a los microorganismos. Algunos métodos, como el de DNA fingerprinting, permiten tipificar a bacterias de comunidades en muestras ambientales sin la necesidad de aislar o cultivar a los microorganismos (Ranjar y col. 2000).

### **1.16. Análisis del espacio intergénico de bacterias (ITS) del 16S-23S rDNA.**

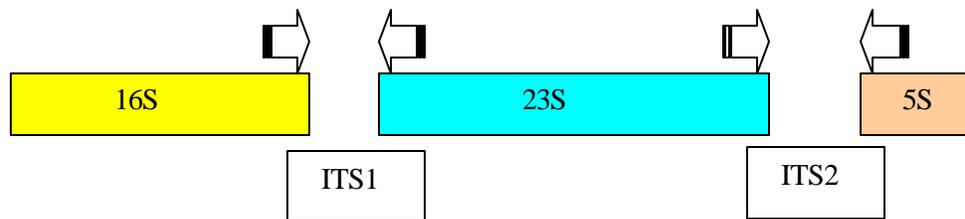
En procariontes, diferentes genes con funciones relacionadas están arreglados en grupos con espacios intergénicos de longitudes variables (IGS). Los espacios intergénicos del operón ribosomal son transcritos y por esta razón son llamados ITS, por sus siglas en inglés.

Las regiones IGS e ITS están poco sujetas a presiones de selección y pueden acumular más mutaciones que los propios genes. Por lo tanto, estas secuencias son buenas candidatas para usarse como marcador molecular para discernir entre cepas relacionadas cercanamente. Para la caracterización de cepas que están relacionadas muy cercanamente, las regiones ribosomales pueden ser inadecuadas, ya que exhiben secuencias altamente similares entre las cepas. Sin embargo, hay segmentos más variables que se encuentran en el espacio intergénico ITS, el cual separa los genes 5S, 16S y 23S del RNA ribosomal (Fig. 3) (Navarro y col. 1992). Estos dos espacios intergénicos son transcritos en los genes del

rRNA, tienen longitud variable de acuerdo a las especies, además muestran un alto grado de variabilidad en la secuencia nucleotídica y en ocasiones ayudan a clasificar a los microorganismos en género y especie (Jensen y Webster, 1993).

El primer espacio llamado ITS1 localizado entre los genes del 16S y 23S varía en longitud de 169 a 1200 pares de bases o más (Tabla 2) y contiene 2 RNATs. Sin embargo, hay excepciones a esta regla, en *Thermoplasma acidophilum* se encontró que no tenía ningún espacio entre los genes 16S y 23S (Tu y Zilling, 1982) (Fig. 3).

Los diferentes operones parecen tener una evolución concertada ya que los genes suelen ser diferentes. Sin embargo, la evolución de los diferentes espacios intergénicos es diferente.



**Fig. 3.** Organización del operón *rrn* mostrando los diferentes espacios intergénicos.

### 1.17. Longitud del espacio intergénico ITS del 16S rDNA al 23S.

La longitud del ITS puede usarse para tipificar a las bacterias. Usando condiciones especiales de PCR para la región ITS se han logrado amplificar genes de alrededor de 300 cepas bacterianas incluyendo géneros como *Escherichia*, *Salmonella* y *Listeria* (Jensen y Webster, 1993). La amplificación de los productos del ITS se puede resolver por electroforesis, dando como resultado bandas que permiten distinguir las cepas a nivel de especies, mientras algunas características de género relacionadas también pueden identificarse. Este método es conocido como ITS-PCR (Uemori y col. 1992). En la Tabla 2 se muestra el tamaño del espacio intergénico de diferentes cepas.

**Tabla 2.** Características del espacio ITS de diferentes bacterias. (Normand, 1996).

	ITS 1 (pb)	ITS 2 (pb)	Número de operones	Posición Taxonómica
<b>Eubacteria</b>				
<i>Agrobacterium</i> sp.	1000-1200	n.d	n.d.	a -Proteobacteria.
<i>Anacystis nidulans</i>	540	<100	2	Cianobacteria
<i>Bacillus subtilis</i>	169	55	10	Gram + bajo GC
<i>Clostridium perfringens</i>	185	n.d	10	Gram + bajo GC
<i>Escherichia coli</i>	440	92	7	?- Proteobacteria.
<i>Frankia</i> sp.	411	68	2	Gram + alto GC
<i>Nitrobacter</i> sp.	1200	n.d.	1	a -Proteobacteria
<i>Rhizobium</i> sp.	800-1150	n.d.	n.d	a -Proteobacteria
<i>Streptomyces ambofaciens</i>	303	82	4	Gram + alto GC
<i>Xanthomonas populi</i>	370	n.d.	2	?- Proteobacteria
<b>Arqueas</b>				
<i>Desulfurococcus mobilis</i>	202	>4000	1	Thermoacidophilus
<i>Halococcus morrhuae</i>	428	<100	1	Halophilos
<i>Methanococcus vanniellii</i>	240/200	Cerca 100	2	Methanogenas

### 1.18. Análisis de Restricción Enzimática (REA) del operón *rrn*.

Diferentes métodos de biología molecular ofrecen la posibilidad de tipificar microorganismos de una manera más rápida y sensible que los métodos tradicionales de microbiología. Uno de estos métodos es el Análisis de Restricción Enzimática (REA), que se puede aplicar al espacio intergénico (ITS) que separa los genes 16S y 23S del operón *rrn*, es una técnica en que los organismos pueden ser diferenciados según los patrones de bandas de DNA, derivados de la distancia entre los sitios de corte de una endonucleasa de restricción. Dado que las regiones ITS tienen mayor variabilidad en su secuencia nucleotídica que los genes ribosomales, permite realizar tipificaciones más específicas (Normand y col. 1996; Gürtler y Stanisch, 1996). El análisis del ITS se lleva a cabo con enzimas de restricción que reconozcan sitios de 4 o 6 pares de nucleótidos de longitud en el corte generando un patrón de bandas que puede estudiarse a través de un gel de agarosa (Roberts y Macelis, 1999).

## **2.- JUSTIFICACION.**

La biorremediación es una alternativa que utiliza sistemas vivos (plantas, consorcios microbianos) para lograr una degradación más eficiente, limpia y completa de diversos contaminantes orgánicos como los hidrocarburos. En el tratamiento en biopilas de suelos contaminados con hidrocarburos, las comunidades microbianas involucradas no están definidas. Se desconoce tanto la composición inicial de las poblaciones microbianas como la dinámica de las mismas a lo largo del tratamiento de biorremediación. Este conocimiento es básico si se trata de proponer trenes de tratamiento adecuados, en los que en adición a los parámetros fisicoquímicos determinados durante el proceso. La información sobre la comunidad microbiana y su dinamismo se pueda obtener mediante biomonitorio.

### **3.- HIPOTESIS.**

Durante el tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos, en un sistema de biopilas, la dinámica de las poblaciones bacterianas involucradas puede cambiar con respecto al tiempo y componentes del sistema.

## **4.- OBJETIVO**

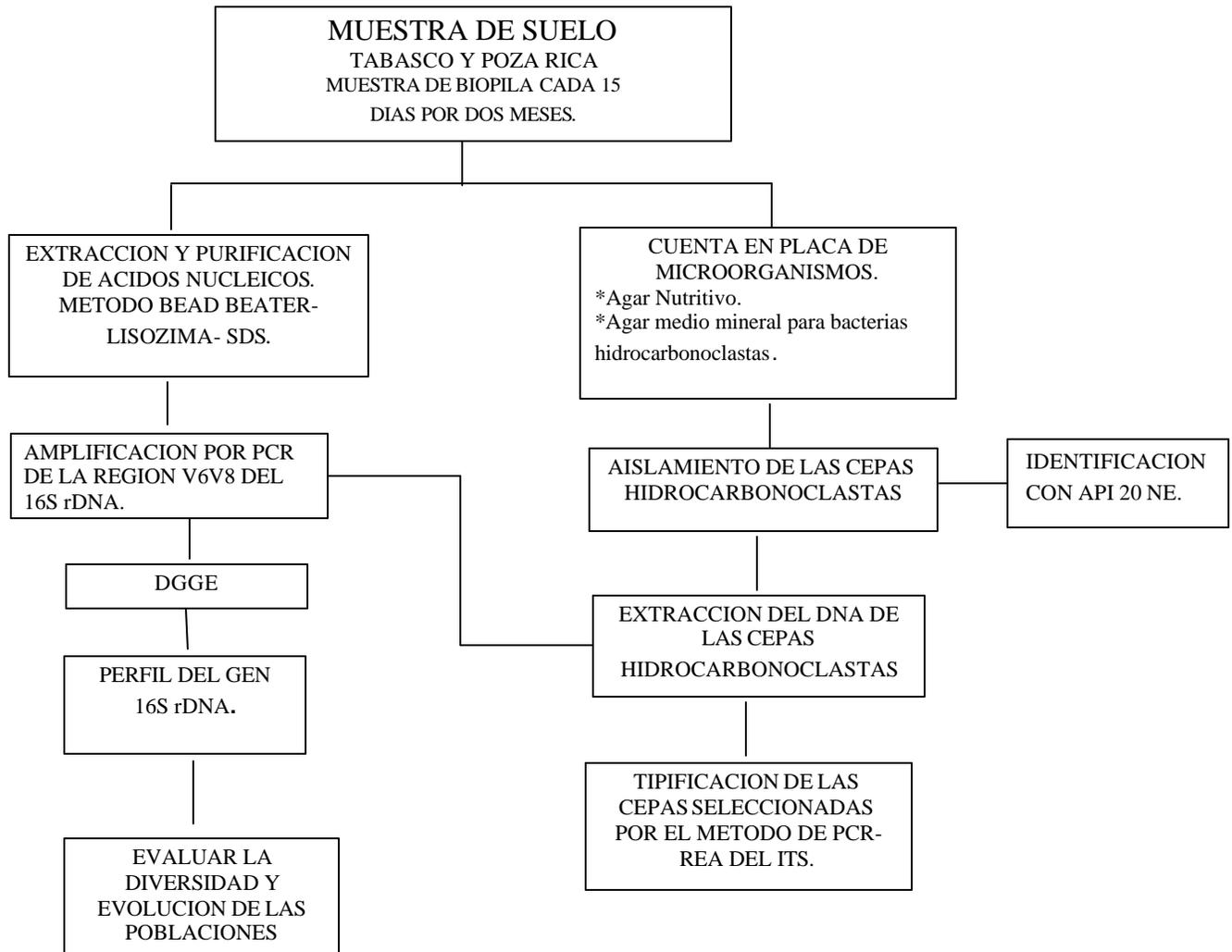
### **4.1. OBJETIVO GENERAL.**

Determinar los cambios en las comunidades bacterianas presentes en una biopila para biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos.

#### **4.1.1. OBJETIVOS PARTICULARES**

- Cuantificar el número de bacterias totales e hidrocarboclastas (UFC/g) en suelos contaminados con hidrocarburos.
- Aislar bacterias hidrocarbonoclastas de los suelos en tratamiento y la biopila.
- Identificar las bacterias aisladas mediante la técnica de API 20NE.
- Tipificar las bacterias aisladas mediante PCR-REA del ITS.
- Comparar métodos de extracción y purificación de ácidos nucleicos de suelos contaminados con hidrocarburos.
- Seguimiento de comunidades microbianas durante un proceso de biorremediación por biopilas mediante el análisis por DGGE.

## 5.- ESTRATEGIA DE TRABAJO.



## 6.- MATERIALES Y METODOS.

### 6.1. Características del suelo y de la biopila.

Las muestras de suelo fueron colectadas en un área contaminada en Huimanguillo, en el estado de Tabasco y otra en Poza Rica, Veracruz, en suelos aledaños a pozos de extracción (fosas). Dichos suelos tienen un tiempo de contaminación e interperización de más de 20 años. Las características de estos suelos se muestran en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Características de los suelos y hidrocarburos totales del petróleo HTP.

	<b>Características del suelo</b>	<b>Concentración de HTPs (ppm)</b>	<b>Humedad %</b>
<b>Huimanguillo, Tabasco</b>	Limoso	52 233	40
<b>Poza Rica, Veracruz</b>	Arcilloso arenoso	75 000	----

Datos proporcionados por el Lab. de Biotecnología, del Instituto Mexicano del Petróleo.

Tanto en Poza Rica, Ver., como en Huimanguillo, Tabasco se muestrearon suelos cercanos a la zona que no estaban contaminados, a los cuales se les llamó suelos control, todos los suelos se muestrearon a una profundidad de 0–20 cm. El suelo de Huimanguillo, se muestreó en diferentes zonas del terreno, teniendo 3 puntos de muestreo y una cuarta muestra que se obtuvo mezclando homogéneamente el suelo de las tres muestras anteriores. Las muestras de Huimanguillo fueron proporcionadas por el Instituto Mexicano del Petróleo. Todas las muestras fueron conservadas en congelación.

El suelo de Poza Rica fue secado al sol y posteriormente tamizado por malla No. 15. El suelo se mezcló con bagazo de caña en un porcentaje del 5% y se adicionó agua en un porcentaje de 25% como se muestra en la Fig. 4. En el presente trabajo se montó la biopila de 1.5 Kg de capacidad, la cual se mantuvo con un sistema de aireación en donde el flujo de aire, se controló a lo largo de todo el proceso (100 ml/min) como se ve en la Fig. 5. La biopila se mantuvo a temperatura ambiente. La biopila fue montada y monitoreada cada 15 días durante 2 meses, para determinar bacterias totales e hidrocarbonoclastas, así como HTP. Los hidrocarburos se cuantificaron en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard, mod. HP5890 Series II, con un detector de ionización a la flama (FID), la columna es ultra crosslinked/metilsilicone (25.5 m de largo X 0.32 mm de diámetro interno; proporción de fase 150 y un espesor de 0.52 µm) marca Hewlett Packard, la temperatura del detector fue 300°C, la del inyector 270°C; la velocidad de flujo del gas auxiliar fue de 1.29 ml/min y la

velocidad de flujo de hidrógeno de 30-35 ml/min. La operación y los datos biodegradación de la biopila se realizaron en el laboratorio de Biotecnología Ambiental del Centro de Biotecnología, de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.



**Fig. 4.** Mezcla de suelo contaminado de Poza Rica, tamizado con bagazo de caña.



**Fig. 5.** Biopila experimental con la mezcla de suelo con el bagazo de caña.

## **6.2. Cuenta en placa de microorganismos.**

### **Reactivos.**

- 1.- Solución fisiológica (NaCl al 0.85%). Esterilizar a 15 PSI por 15 min.
- 2.- Medio mineral para bacterias hidrocarbonoclastas.

Composición	g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.4
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.6
NH <sub>4</sub> Cl	1.5
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.17
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.609
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.045
Solución Mineral	1 ml

Esterilizar a 15 PSI por 15 min.

### 3.- Solución mineral.

Composición	g/ L
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	5.1
MnCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.66
NaCl	1.0
FeCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O	1.0
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.1
CuCl <sub>2</sub>	0.01
ZnCl <sub>2</sub>	0.06
AlCl <sub>3</sub>	0.05
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.01
NaMo O <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.04

Esterilizar a 15 PSI por 15 min.

### 4.- Agar nutritivo.

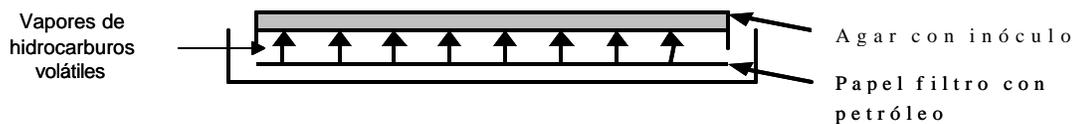
Composición	g/L
Peptona de carne	5.0
Extracto de carne	3.0
Agar- Agar	12

Esterilizar a 15 PSI durante 15 min.

La cuenta en placa de microorganismos se refiere al número de células viables en una muestra capaces de crecer en un medio de cultivo sólido. Se reporta el número de *unidades formadoras de colonias* por gramo de suelo (UFC/g). Los medios utilizados fueron agar medio mineral para bacterias hidrocarbonoclastas y agar nutritivo para la cuenta total de bacterias. Se utilizó la técnica de diluciones seriadas.

1. Pesar un gramo de suelo control (sin hidrocarburos) y de suelo contaminado (con hidrocarburos) y colocar en un frasco que contiene 99 ml de solución isotónica (NaCl al 0.85%).
2. Agitar 10 min.

3. Tomar 1 ml de esta solución y agregar a el primer tubo con 9 ml de solución isotónica, agitar por un minuto en vortex, de esta solución se toma 1 ml y se colocó en el segundo tubo con 9 ml de solución isotónica y así hasta la dilución de  $10^{-9}$  (en el último tubo).
4. Se prepararon cajas Petri de cada medio por triplicado y se inocularon con 100  $\mu$ l de las diluciones seriadas. Con ayuda de una varilla de vidrio en forma de "L" se distribuyó el inóculo sobre el medio de cultivo. A las cajas con agar medio mineral para bacterias hidrocarbonoclastas inoculadas se les colocó en un papel filtro esterilizado impregnado de petróleo en la parte posterior de la caja Petri, como lo muestra la Fig. 6. El petróleo previamente esterilizado por 1 hora a 10 PSI, dos veces, fue utilizado como fuente de C. El conteo de las colonias se realizó a las 48 horas en el caso de agar nutritivo y a las 96 horas en agar medio mineral para bacterias hidrocarbonoclastas.



**Fig. 6.** Caja con agar medio mineral para bacterias hidrocarbonoclastas.

### **6.3. Extracción de DNA de suelo.**

#### **Reactivos.**

- 1.- Solución Tris-EDTA. (TE) pH 8. Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM a pH 8.
- 2.- Amortiguador de fosfato de sodio 120 mM pH.8.
- 3.- Solución de NaCl 5 M.
- 4.- Solución de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico a pH 8. (25:24:1).
- 5.- Cloroformo-alcohol isoamílico (24:1).
- 6.- Solución de fenol pH 8.
- 7.- Amortiguador TAE 50 X. Pesar 242 g de TRIS base, agregar 100 ml de EDTA 0.5 M a pH 8 y 57.1 ml de ácido acético glacial aforar con agua destilada a 1 L.
- 8.- Amortiguador TAE 1X. Tomar 20 ml del amortiguador TAE 50 X y aforar con agua destilada a 1 L.
- 9.- Solución de EDTA 50 mM.
- 10.- Lisozima 10 mg/ml.
- 11.- Solución de acetato de sodio 2M pH 5.2.
- 12.- Solución de Bromuro de Etidio 10 mg/ml.

13.- Dodecil sulfato de sodio (SDS) al 20%.

14- Amortiguador de carga. (Azul de bromofenol al 0.25% p/v, sacarosa al 40% p/v y xileno cianol al 0.25% p/v).

15.- Etanol al 96%.

### **6.3.1. Extracción de DNA por método Bead-Beater.**

1.-Pesar 600 mg de suelo y adicionar 600 mg de perlas zirconia/sílica de 0.1 mm de diámetro.

2.-Agregar 750 µl de amortiguador TE y homogenizar.

3.-Agregar 750 µl de fenol pH 8.0, homogenizar durante 6 ciclos de 30 s a 5000 rpm en un mini Bead-Beater, enfriando a 4°C entre cada uno de los ciclos.

4.-Centrifugar a 13 000 rpm durante 3 min, separar el sobrenadante y transferir a un tubo de microcentrífuga la fase acuosa.

5.-Añadir 750 µl de fenol-cloroformo-álcool isoamílico (25:24:1), centrifugar a 13 000 rpm durante 3 min.

6.-Repetir el procedimiento del paso 5 unas tres veces hasta que no se forme una natilla blanca en la interfase. Se recupera la fase acuosa.

7.-Agregar al sobrenadante, 700 µl de cloroformo-álcool isoamílico (24:1), agitar y centrifugar a 13 000 rpm durante 4 min.

8.-Recuperar el sobrenadante y agregar 1/10 parte de acetato de sodio 3 M pH 5.2.

9.-Se añade el doble del volumen de la muestra de etanol frío.

10.-Dejar reposar 1 hr a -70°C, o en el congelador toda la noche a -20°C.

11.-Centrifugar a 14 000 rpm 15 min a 6°C y eliminar el sobrenadante.

12.-Adicionar etanol al 70% para eliminar las sales presentes (aprox. de 500 a 700 µl).

13.- Centrifugar a 13 000 rpm durante 5 min. Retirar el sobrenadante cuidadosamente.

14.-Evaporar el etanol restante en un flujo de aire por 15 min.

15.- Resuspender en 100 µl de amortiguador TE pH 8.0.

16.- Visualizar en un gel de agarosa al 1% que contiene 1 µl solución de bromuro de etidio (10mg/ml), la muestra de DNA (5 µl de DNA con 1 µl de amortiguador de carga), en un transiluminador de UV.

### **6.3.2. Extracción de DNA por método Omnimixer.**

- 1.- Pesar 50 g de suelo y colocar en el recipiente del aparato Omnimixer (Dupont).
- 2.- Pesar 25 g de perlas de zirconia/sílica de 0.1 mm de diámetro y 25 g de perlas de vidrio de 0.1 mm de diámetro. Agregar todo en el contenedor del Omnimixer
- 3.- Agregar 37.5 ml de amortiguador TE pH 8.0 y 37.5 ml de solución de fenol pH 8.0 a la muestra de suelo.
- 4.- Homogenizar a máxima velocidad por 1 minuto durante 3 ciclos dejando enfriar a 4°C entre cada uno de los ciclos.
- 5.- Vaciar el contenido del recipiente en tubos de centrífuga de 50 ml de polipropileno, tratando de igualar los pesos de los dos tubos. Centrifugar a 10 000 rpm durante 10 min.
- 6.- Recuperar la fase acuosa obtenida en los tubos y pasar ésta a otro tubo de centrífuga de 50 ml. de polipropileno. Agregar 25 ml de solución de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1).
- 7.- Agitar en un vortex durante 5 min.
- 8.- Centrifugar a 10 000 rpm durante 10 min..
- 9.- Separar la fase acuosa y colocar en un tubo de centrífuga de 50 ml de polipropileno. Repetir del paso 9 al 12, hasta que no aparezca una nata en la interfase.
- 10.- Agregar a la fase acuosa recuperada 25 ml de solución cloroformo-alcohol isoamílico (24:1).
- 11.- Mezclar en un vortex durante 5 min.
- 12.- Centrifugar a 10 000 rpm durante 10 min.
- 13.-Tomar la fase acuosa y agregar 1/10 parte de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y dos volúmenes de etanol al 96%, y dejar toda la noche a -20°C o una hora a -70°C.
- 14.-Centrifugar a 10 000 rpm durante 10 min y decantar el sobrenadante.
- 15.-Agregar 30 ml de etanol al 70% y agitar en el vortex durante 5 min.
- 16.-Centrifugar a 10 000 rpm durante 10 min.
- 17.-Decantar el sobrenadante y dejar evaporar el resto del etanol en una corriente de aire por 15 min.
- 18.-Agregar 1 ml de amortiguador TE pH 8.0 y dejar reposar durante 1 noche a 4°C.

19.-Visualizar en un gel de agarosa al 1% que contiene 1 µl solución de bromuro de etidio (10 mg/ml), la muestra de DNA (5 µl de DNA con 1 µl de amortiguador de carga), en un transiluminador de UV.

### **6.3.3. Extracción de DNA por el método Bead-Beater-Lisozima-SDS.**

Este método está basado en la extracción de 10 g de suelo. Se puede variar la cantidad de suelo de 1 a 5 g de muestra.

- 1.-Pesar 1.0 g de suelo y resuspender en 1.0 ml de amortiguador de fosfato de sodio 120 mM pH 8.0 en un tubo de polipropileno del Bead Beater. Homogenizar en el mini Bead-Beater la muestra de suelo por 10 segundos.
- 2.-Adicionar 60 µl de una solución de 10 mg/ml de lisozima a la suspensión del suelo, homogenizar e incubar durante 15 min a 37°C.
- 3.-Conservar en hielo.
- 4.-Adicionar 1.0 g de perlas zirconia/sílica de 0.1mm de diámetro. Homogenizar 3 veces por 30 s en el mini Bead-Beater a 4000 rpm con intervalos de 15 a 30 s en cada tiempo.
- 5.-Adicionar 90 µl de solución de SDS al 20% y mezclar.
- 6.-Conservar en hielo por una hora para la lisis o 15 min a temperatura ambiente.
- 7.-Adicionar 600 µl de una solución de fenol pH 8.0 al lisado obtenido en el paso 5.
- 8.-Mezclar en el vortex y centrifugar durante 5 min a 14 000 rpm.
- 9.-Recuperar la fase acuosa en un tubo limpio.
- 10.-Regresar a la mezcla de suelo con fenol y adicionar 1 ml de amortiguador de fosfato de sodio 120 mM pH.8.
- 11.-Centrifugar a 14 000 rpm durante 5 min y recuperar la fase acuosa en el tubo que contiene la fase acuosa anterior.
- 12.-Mezclar las dos fases acuosas.
- 13.-Extraer la fase acuosa con 600 µl de solución de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico saturado 10 mM a pH. 8. (25:24:1).
- 14.-Recuperar la fase acuosa. Si en la interfase se observa una nata blanca, volver a extraer la fase acuosa con igual volumen de solución de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1).
- 15.-Adicionar 0.1 volumen de solución de NaCl 5 M y dos volúmenes de etanol al 100%.
- 16.-Conservar a -80°C durante 20 min ó a -20°C toda la noche.

- 17.-Centrifugar a 14 000 rpm durante 10 min a 4°C.
- 18.-Descartar el sobrenadante y lavar el botón con etanol al 70% frío y dejar secar el botón al aire.
- 19.-Resuspender el botón en 100 µl de amortiguador TE pH 8.0 estéril. A esta solución se le llama extracto crudo.
- 20.-Visualizar en un gel de agarosa al 1%, que contiene 1µl solución de bromuro de etidio (10mg/ml). La muestra del DNA (5 µl de DNA con 1µl de amortiguador de carga), se visualiza en un transiluminador de UV.

#### **6.3.4. Extracción y purificación de DNA Wizard (Promega).**

- 1.-Adicionar 1 ml de cultivo de 12 horas a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml.
- 2.-Centrifugar de 13 000 rpm por 2 min. Descartar el sobrenadante. Si son bacterias Gram positivas, proceder del paso 3, para bacterias Gram negativas ir directamente al paso 6.
- 3.-Resuspender el paquete celular en 480 µl de solución de EDTA 50 mM.
- 4.-Adicionar 60µl de solución de lisozima a 10 mg/ml y mezclar.
- 5.-Incubar la muestra a 37° C de 45 min. Centrifugar por 2 minutos a 13 000 rpm y remover el sobrenadante.
- 6.-Adicionar 600 µl de solución de lisis nuclear Cat. Promega A7943. Agitar la muestra resuspendiendo el total de las células.
- 7.-Incubar a 80 °C por 5 minutos y lisar las células, enfriar a temperatura ambiente.
- 8.-Adicionar 3µl de solución de RNAsa (4 mg/ml) Cat. Promega a7973, al lisado celular. Mezclar invirtiendo el tubo de 2 a 5 veces.
- 9.-Incubar a 37°C por 45 min. Enfriar la muestra a temperatura ambiente.
- 10.-Adicionar 200 µl de solución de precipitación de proteínas Cat. Promega A7953 a la solución que contiene el lisado celular con la RNAsa. Mezclar vigorosamente a alta velocidad por 20 segundos.
- 11.-Incubar la muestra en hielo por 5 min.
- 12.-Centrifugar a 13 000 rpm por 2 min.
- 13.- Transferir el sobrenadante que contiene el DNA a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml que contiene 600 µl de isopropanol.
- 14.- Mezclar, hasta la aparición de una masa visible de DNA.

- 15.-Centrifugar a 13 000 rpm por 2 min..
- 16.- Descartar el sobrenadante. Adicionar 600 µl de etanol al 70% a temperatura ambiente y mezclar invirtiendo el tubo varias veces para lavar el botón de DNA.
- 17.-Centrifugar a 13 000 rpm por 2 min. Retirar el etanol.
- 18.-Secar el tubo con un papel absorbente y dejar secar el botón con una corriente de aire de 10 a 15 min.
- 19.-Adicionar 100 µl de solución de rehidratación de DNA Cat. Promega A7963 al tubo que contiene el botón de DNA e incubar a 65°C por 1 hora o toda la noche a 4°C. Mezclar el tubo.
- 20.- Conservar el DNA de 2 a 8°C.
- 21.- Visualizar en un gel de agarosa al 1% que contiene 1µl solución de bromuro de etidio (10mg/ml), la muestra de DNA (5 µl de DNA con 1µl de amortiguador de carga), se visualiza en un transiluminador de UV.

#### **6.4. Purificación de DNA de muestras de suelo.**

##### **6.4.1 Purificación con Polivinilpirrolidona (PVP).**

###### **Reactivos:**

- 1.- Amortiguador TE (pH 8.0). Tris-HCl 10 mM (pH 8.0) y EDTA 1mM.
- 2.- Amortiguador TPN (pH 8.0). Tris-HCl 10 mM (pH 8.0), PVP 40 (2% p/v) y NaCl 150 mM.

###### **Procedimiento.**

- 1.- Al botón extraído de DNA se le adiciona 100 µl de amortiguador TE y 100 µl de amortiguador TPN.
- 2.- Mezclar e incubar por 5 min a temperatura ambiente.
- 3.-Adicionar 200 µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), mezclar y centrifugar a 14 000 rpm por 5 min.
- 4.-Recobrar la fase acuosa y precipitar con el 10 % del volumen de acetato de sodio 3M y con el doble del volumen de etanol 100%.
- 5.-Congelar a -20 ° C por una noche.
- 6.-Centrifugar a 14 000 rpm por 5 min.
- 7.-Lavar el botón de DNA con alcohol al 70% y volver a centrifugar.
- 8.-Resuspender el botón de DNA con amortiguador de TE.

#### **6.4.2 Método de Cloruro de Cesio y Acetato de Potasio.**

- 1.-Adicionar 0.5 g de CsCl a 500  $\mu$ l de extracto crudo.
- 2.-Incubar de 1 a 3 horas a 37°C.
- 3.-Centrifugar durante 20 min a 14 000 rpm.
- 4.-Recobrar el sobrenadante ( $\approx$  500 $\mu$ l) en un tubo de 10 ml.
- 5.-Adicionar 2 ml de agua destilada y 1.5 ml de isopropanol al 100%. Mezclar e incubar cuando menos 5 min a temperatura ambiente.
- 6.-Centrifugar durante 15 min a 10 000 rpm. Observar el grado de precipitación.
- 7.-Descartar el sobrenadante y resuspender el botón en 500 $\mu$ l de amortiguador TE pH 8.0 y transferir la suspensión a un nuevo tubo.
- 8.-Adicionar 100 $\mu$ l de acetato de potasio 8 M, mezclar e incubar por 15 min a temperatura ambiente.
- 9.-Centrifugar durante 15 min a 14 000 rpm.
- 10.-Recobrar el sobrenadante y adicionar 0.6 volúmenes de isopropanol al 100%, mezclar e incubar por 5 min a temperatura ambiente.
- 11.-Centrifugar durante 15 min, a 14 000 rpm.
- 12.-Lavar el botón con etanol al 70% frío, centrifugar a 14 000 rpm y decantar el sobrenadante, secar en un flujo de aire por 15 minutos y resuspender el botón en 500  $\mu$ l de amortiguador TE pH 8.0.
- 13.- Visualizar en un gel de agarosa al 1% que contiene 1 $\mu$ l solución de bromuro de etidio (10mg/ml), la muestra de DNA (5  $\mu$ l de DNA con 1 $\mu$ l de amortiguador de carga), se visualiza en un transiluminador de UV.

#### **6.5 Electroforesis en gel de agarosa al 1%.**

- 1.-Pesar 0.25 g de agarosa y adicionar 25 ml de TAE (1x).
- 2.-Calentar en microondas hasta que se disuelve la agarosa
- 3.-Dejar enfriar hasta  $\pm$  45°C.
- 4.-Adicionar 1 $\mu$ l de bromuro de etidio (10 mg/ml), homogenizar y vaciar en el recipiente del gel. Colocar el peine en el gel.
- 5.-Esperar 30 minutos hasta que se solidifique el gel y retirar el peine
- 6.-Adicionar TAE (1x) hasta que cubra el gel.

- 7.-Hacer la mezcla de carga con 1µl de amortiguador de carga y adicionar 5 µl de la muestra, mezclar con la gota de amortiguador y ponerlos dentro del carril en el gel.
- 8.-Colocar 5µl del marcador de peso molecular en un carril.
- 9.-Aplicar 85V por ± 20 min.
- 10.-Visualizar el gel con un transiluminador de UV.

#### **6.6. Cuantificación de DNA método espectrofotométrico.**

1. Se toma 10 µl de la solución de DNA del suelo y se coloca en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml.
2. Agregar 990 µl de agua destilada. Se agita la solución en un vortex por 10 s.
3. Se ajusta utilizando el agua destilada como blanco a 260 nm.
4. Se toman las lecturas de las muestras de suelo.
5. Una unidad de absorbancia equivale a 50 µg/ml de DNA.

#### **6.7. Amplificación por PCR.**

##### **6.7.1. Amplificación por PCR del gen 16S rRNA.**

Utilizado para la amplificación de DNA del consorcio y muestras de bacterias aisladas.

##### **Iniciadores para el gen del 16S rRNA.**

**8 for.** 5' AGACTTTGATCMTGGCTCAG 3'

**1492 rev.** 5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3'

##### **Condiciones de la reacción de PCR para el gen 16S rRNA.**

<b>Volumen de reacción</b>	<b>25 ml</b>	<b>Concentración final</b>
Agua MQ	16.30 µl	Variable
Amortiguador 10X	2.5 µl	1X
MgCl <sub>2</sub>	1.50 µl	1.5 mM
dNTP's	0.5 µl	10 mM de cada dNTP
(8 for)	1.5 µl	10 pmol/µl
(1492rev)	1.5 µl	10 pmol/µl
<i>Taq</i> polimerasa 5U/µl	0.2 µl	1 U/µl
DNA de muestra	1 µl	= 0.25 µg/reacción

**Condiciones para el termociclador para la reacción de PCR para el gen 16S rRNA.**

	Temperatura	Tiempo
Pre-desnaturalización	94°C	5 min
Desnaturalización	94°C	30 s
Alineamiento	52°C	20 s
Alargamiento	68°C	40 s 35 ciclos del paso 2 al 4
Post-alargamiento	68°C	7 min

**6.7.2. Amplificación por PCR para la región V6-V8 del gen 16S rRNA.**

Utilizado para la amplificación de DNA del consorcio y muestras de bacterias aisladas.

**Iniciadores para la región V6-V8 del gen 16S rRNA.****GC 968 for**

5'-CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG AAC GCG AAG AAC CTT ACC-3'

**UNI 1401 rev**

5'-GCG TGT GTA CAA GAC CC-3'

**Condiciones de la reacción de PCR para la región V6-V8 del gen 16S rRNA.**

Volumen de reacción	25 ml	Concentración final
Agua MQ	15.30 µl	Variable
Amortiguador 10X	2.5 µl	1X
Albúmina sérica bovina	1 µl	400 ng/µl
MgCl <sub>2</sub>	1.50 µl	1.5 mM
dNTP's 10 mM para cada nucleótido	0.5 µl	10 mM de cada dNTP
iniciador for (GC 968 for)	1.5 µl	10 pmol/reacción
iniciador rev (UNI 1401 rev)	1.5 µl	10 pmol/reacción
<i>Taq</i> polimerasa 5U/µl	0.2 µl	1U/µl
DNA de muestra	1 µl	= 0.25 µg/reacción

**Condiciones para el termociclador.**

	Temperatura	Tiempo
Pre-desnaturalización	94°C	5 min
Desnaturalización	94°C	30 s
Alineamiento	55°C	20 s
Alargamiento	68°C	40 s 35 ciclos del paso 2 al 4
Post- alargamiento	68°C	7 min

**6.7.3. Amplificación por PCR para el ITS del operón *rrn*.**

Para la amplificación de DNA del consorcio y muestras de bacterias aisladas.

**Iniciadores para el ITS del operón *rrn*.**

pHr 5'- TGC GGC TGG ATC ACC TCC TT-3'

**p23SR01f** 5'- GGC TGC TTC TAA GCC ACC -3'

**Condiciones de la reacción de PCR para el ITS del operón *rrn*.**

Volumen de reacción	25 ml	Concentración final
Agua MQ	16.30 µl	Variable
Amortiguador 10X	2.5 µl	1X
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	1.50 µl	1.5 mM
dNTP's	0.5 µl	10 mM de cada dNTP
iniciador for (p23SR01)	1.5 µl	10 pmol/µl
iniciador rev (pHr)	1.5 µl	10 pmol/µl
<i>Taq</i> polimerasa 5U/µl	0.2 µl	1 U/µl
DNA de muestra	1 µl	= 0.25 µg/reacción

**Condiciones para el termociclador para la reacción de PCR para el operón *rrn*.**

	Temperatura	Tiempo
Pre-desnaturalización	94°C	5 min
Desnaturalización	94°C	30 s
Alineamiento	50°C	20 s
Alargamiento	68°C	40 s 35 ciclos del paso 2 al 4
Post- alargamiento	68°C	7 min

**6.8. . Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE).**

**Reactivos.**

1.- Amortiguador TAE 50 X.

Pesar 242 g de TRIS base, agregar aproximadamente 500 ml de agua destilada, 57.1 ml de ácido acético glacial, 100 ml de EDTA 0.5 M a pH 8 y aforar con agua destilada a 1L.

2.- Solución desnaturalizante al 0%.

Mezclar 50 ml de solución de acrilamida-bisacrilamida (37.5:1) al 40 %, agregar 2.5 ml de amortiguador TAE 50X, adicionar 5 ml. de glicerol y aforar a 250 ml de agua destilada.

3.-Solución desnaturalizante al 100%. Pesar 105.4 g de urea, agregar 50 ml de solución de acrilamida-bisacrilamida al 40 % (37.5:1), adicionar 100 ml de formamida y mezclar hasta que se disuelva la urea, agregar 5 ml de amortiguador TAE 50X, adicionar 5 ml de glicerol y aforar con agua destilada hasta 250 ml.

4.-Solución de Carlos 8X para fijar. Mezclar 200 ml de etanol al 96%, con 10 ml de ácido acético glacial y 40 ml de agua destilada.

5.-Solución Carlos de preservación. Mezclar 50 ml de etanol al 96% con 20 ml de glicerol y 130 ml de agua destilada.

- 6.-Solución para fijar. Se toma 50 ml de solución de Carlos 8X y agregar 350 ml de agua destilada.
- 7.-Solución para la tinción de plata. Pesar 0.4 g de nitrato de plata y se disuelve en 200 ml de solución para fijar.
- 8.-Solución de revelado. Pesar  $\pm$  10 mg de  $\text{NaBH}_4$  y adicionar 200 ml de NaOH al 1.5%, disolver y agregar 750  $\mu\text{l}$  de formaldehído.
- 9.-Solución de persulfato de amonio (APS) al 10%.
- 10.-Amortiguador TAE 1X. Se toman 20 ml de solución TAE 50X y se diluye a 1000 ml con agua destilada.

El equipo del DGGE es marca Bio Rad. D Code <sup>TM</sup> (Universal Mutational Detection System).

**Porcentajes de desnaturalización.**

**Tabla 4.** Porcentajes de desnaturalización de urea y formamida

<b>% Desnaturaliza nte</b>	<b>Volumen final ml</b>	<b>Solución Desnaturalizante 0 % (ml)</b>	<b>Solución Desnaturalizante 100 % (ml)</b>	<b>Temed <math>\mu\text{l}</math></b>	<b>APS <math>\mu\text{l}</math></b>
0	6	6	----	6	18
40	12	7.20	4.8	12	38
42	12	6.95	5.05	12	38
44	12	6.70	5.30	12	38
46	12	6.50	5.50	12	38
48	12	6.25	5.75	12	38
50	12	6.00	6.00	12	38
52	12	5.75	6.25	12	38
54	12	5.50	6.50	12	38
56	12	5.30	6.70	12	38

**6.8.1 Gel de poliacrilamida.**

- 1.-Limpiar los vidrios (160 mm de largo y 1 mm de espesor) y los espaciadores con etanol al 96% y con una franela que no deja pelusas.
- 2.-Poner un poco de agua al gel bond y determinar el lado hidrofóbico, este lado se pegara con el agua al vidrio más grande, la parte inferior del gel bond se ajustara a la orilla de abajo del vidrio. Eliminar toda el agua que queda entre el vidrio y el gel bond.
- 3.-Colocar los espaciadores y el vidrio pequeño. Colocar los broches de cada lado de los vidrios. Alinear los vidrios y poner vaselina en la parte baja de los vidrios y en la banda de goma, ajustar los broches con las perillas a la base.

- 4.-Preparar las soluciones de acrilamida-bisacrilamida. La solución 0 %, la baja y la alta.
- 5.-Preparadas las soluciones se ponen en tubos con hielo y mezclar.
- 6.-Adicionar el Temed (N, N, N', N'-tetrametil-etilenodiamonio) y mezclar con la punta de la pipeta.
- 7.-Asegurar que las llaves de los dos compartimientos estén cerradas y que la bomba peristáltica este parada.
- 8.-Adicionar 38  $\mu$ l de APS (persulfato de amonio al 10%) a la solución alta, mezclar y poner en el primer compartimiento.
- 9.-Adicionar 38  $\mu$ l de APS a la solución baja, mezclar y colocar en el segundo compartimiento.
- 10.-Colocar la manguera con la aguja en la parte medio de los vidrios.
- 11.-Prender la bomba peristáltica y una velocidad baja y abrir las llaves de los dos compartimientos al mismo tiempo.
- 12.-Cuando estén vacíos los compartimientos cerrar la llave.
- 13.-Adicionar 18  $\mu$ l de APS a la solución de 0% de desnaturizante, mezclar y colocar en el primer compartimiento.
- 14.-Prender la bomba peristáltica y ponerla en velocidad baja.
- 15.-Cuando ya se acabo de adicionar la solución al 0%, se coloca el peine.
- 16.-Dejar polimerizar el gel alrededor de 2 horas.
- 17.-Preparar amortiguador TAE 1X y llenar el recipiente del DGGE. Prender el DGGE alrededor de 2 h antes de utilizarlo para alcanzar la temperatura de 60°C.
- 18.-Preparar las muestras de productos de amplificación de la región de V6-V8 del 16S rDNA y cuantificar. Mezclar las muestras con amortiguador de carga.
- 19.-Colocar los vidrios con el gel de acrilamida en el recipiente del DGGE.
- 20.-Llenar cada uno de los carriles del gel con las muestras.
- 21.-Colocar los cables del DGGE a la fuente de poder y prender está a 200 V, por cinco min. Posteriormente bajar a 85 V por 16 horas.

### **6.8.2 Tinción de plata del gel de poliacrilamida.**

- 1.-Retirar los broches y los vidrios, con cuidado de no maltratar el gel.

- 2.-Con la parte del gel hacia arriba colocarlo en la charola para fijar, agregar 200 ml de solución para fijar.
- 3.-Agitar a 26 rpm por 3 min.
- 4.-Colocar la solución de fijar en un vaso de precipitado.
- 5.-Agregar 200 ml de solución de plata.
- 6.- Agitar por 10 min a 26 rpm.
- 7.-Lavar el gel y la charola con agua destilada.
- 8.-Lavar el gel con agua destilada por 2 min, tirar el agua en el recipiente de desechos de plata y volver enjuagar el gel con agua destilada.
- 9.-Colocar el gel en la charola de revelación, adicionar unos 20 ml de solución de revelación y enjuagar un poco el gel, retirar está solución.
- 10.-Adicionar el resto de la solución de revelación y agitar a 26 rpm, hasta que se observen bien las bandas de DNA.
- 11.-Agregar la solución de fijar y agitar por 5 minutos a 26 rpm.
- 12.-Tirar la solución de fijado y enjuagar el gel con agua destilada por 3 min.
- 13.-Agitar con la solución de preservación por 7 minutos a 26 rpm.
- 14.-Retirar el gel de la charola y colocarlo sobre un vidrio de soporte. Humedecer la hoja de celofán con la solución de preservación y colocar este encima del gel.
- 15.-Fijar con las pinzas la hoja de celofán sobre el vidrio, tratando de que no le queden burbujas.
- 16.-Secar el gel en un horno a 60°C por unas cinco horas.
- 17.-Retirar los broches de los vidrios y separar el gel, recortar y visualizar el gel.

## **6.9 Galerías API 20 NE.**

### **Reactivos.**

- 1.-Solución Isotónica al 0.85 %.

API 20 NE es un método que combina 8 pruebas de fermentación y 12 pruebas de asimilación. API 20 NE debe ser utilizado con bacilos Gram negativos y no enterobacterias.

- 1.- Preparación de las galerías API 20NE.

- 2.- Inóculo.

- a). Retirar de 1 a 4 colonias del microorganismo a estudiar crecido previamente en medio agar soya tripticaseína.

- b). Preparar una suspensión celular con una turbidez aproximada a 0.5 de McFarland.
- 3.- Llenar las cúpulas de las pruebas NO<sub>3</sub> a PNPG, con la suspensión celular.
- 4.- Abrir una ampolleta de medio AUX y transferir aproximadamente 200µl de la suspensión celular. Agitar la ampolleta.
- 5.- Llenar las cúpulas de las pruebas GLU a PAC y agregar parafina líquida a las cúpulas GLU, ADH, URE, para formar un menisco convexo.
- 6.- Incubar durante 24 horas a 30°C. Tomar la lectura de las galerías.
- 7.- Realizar la identificación del microorganismo con la ayuda del programa API 20 NE Index (2000).

El porcentaje de identificación es un estimado de qué tan cercano es el perfil que corresponde al taxón, en relación a todos los demás taxos en la base de datos, se refiere al porcentaje de pruebas positivas comparadas con una cepa de colección de cultivo tipo. Por otro lado, el índice T es un estimado de qué tan cerca es la correspondencia entre el perfil y el conjunto más típico de las reacciones para cada taxón. El valor puede variar entre 0 y 1 siendo inversamente proporcional al número de pruebas atípicas.

#### **6.10 Restricción con enzimas.**

Se requiere tener la muestra de DNA a una concentración de 0.2–1.5 µg/ µl.

- 1.- Adicionar 16.3 µl de agua desionizada estéril a un tubo estéril.
- 2.- Agregar amortiguador específico para la enzima que se va utilizar.
- 3.- Agregue 2 µl de albúmina sérica bovina acetilada, en una concentración de 10 µg/µl.
- 4.- Adicionar 1 µl la muestra de DNA a una concentración 1 µg/ µl.
- 5.- Mezclar y adicionar 5 U de la enzima de restricción.
- 6.- Mezclar y centrifugar a máxima velocidad en tubo que contiene el DNA con la enzima de restricción.
- 7.- Incubar a 37°C de 1 a 4 h.
- 8.- Visualizar las bandas de DNA en un gel de agarosa a una concentración de 1.5%, teñido con bromuro de etidio y visualizando en un trasiluminador de UV.

Las enzimas que se utilizaron así como sus sitios de reconocimiento se muestran a continuación:

1. ***Hae III*** GG|CC  
CC|GG
2. ***Hha I*** GCG|C  
G|CGC
3. ***MsP I*** C|CGG  
GGC|

## 7 RESULTADOS Y DISCUSION.

### 7.1. Microbiología.

#### 7.1.1. Cuenta microbiana.

#### 7.1.2. Cuenta microbiana en placa del suelo de Huimanguillo, Tabasco.

Se realizó la cuenta tanto de bacterias totales como de bacterias hidrocarbonoclastas para cada uno de los puntos y para la mezcla de suelo. La Tabla 5 muestra los resultados obtenidos.

**Tabla 5.** Cuenta de bacterias totales e hidrocarbonoclastas del suelo de Huimanguillo, Tabasco.

UFC/g suelo seco	PUNTO 1	PUNTO 6	PUNTO 7	Mezcla de suelo
<b>BACTERIAS TOTALES</b>	4.15 X 10 <sup>5</sup> D.E.: 2.2 X 10 <sup>5</sup>	1.28 x 10 <sup>6</sup> D.E.: 1.0 x 10 <sup>6</sup>	1.4 x 10 <sup>6</sup> D.E.: 2.6 x 10 <sup>5</sup>	5.2 x 10 <sup>6</sup> D.E.: 3.1 X10 <sup>5</sup>
<b>BACTERIAS HIDROCARBONOCLASTAS</b>	1.52 X 10 <sup>7</sup> D.E.: 2.1 X 10 <sup>6</sup>	1.5 X 10 <sup>7</sup> D.E.: 6.7 X 10 <sup>6</sup>	6.6 X 10 <sup>6</sup> D.E.: 4.2 X10 <sup>5</sup>	2.28 x 10 <sup>7</sup> D.E.: 4.2 X 10 <sup>6</sup>

D.E.: Desviación Estándar.

No hay una gran diferencia en cuanto las cuentas microbianas de los diferentes puntos de muestreo. Se encontró una cuenta mayor de bacterias hidrocarbonoclastas que de bacterias totales, debido a que las muestras provienen de suelo contaminado y al sesgo que presenta el propio medio de cultivo, ya que dicho medio solamente proviene de hidrocarburos volátiles de bajo peso molecular.

#### 7.1.3. Cuenta microbiana en placa del suelo de Poza Rica, Veracruz.

Para el suelo de Veracruz, se realizó la cuenta microbiana de bacterias totales y bacterias hidrocarbonoclastas, se tuvieron muestras tanto del suelo control (no contaminado) que se muestreó de una zona cercana, como del suelo contaminado. En la Tabla 6 se muestran los resultados. El suelo contaminado tuvo una cuenta total un orden de magnitud mayor que la del suelo control, posiblemente porque entre las bacterias totales también están consideradas las bacterias hidrocarbonoclastas que metabolizan los hidrocarburos presentes en dicho suelo. También en el caso de las bacterias hidrocarbonoclastas se presentó una cuenta de un orden de magnitud mayor con respecto al suelo control; al igual que en las bacterias totales, dicho aumento se puede atribuir a que las bacterias hidrocarbonoclastas

pueden oxidar a los hidrocarburos presentes en el suelo contaminado y están contenidas en la cuenta microbiana de las bacterias totales.

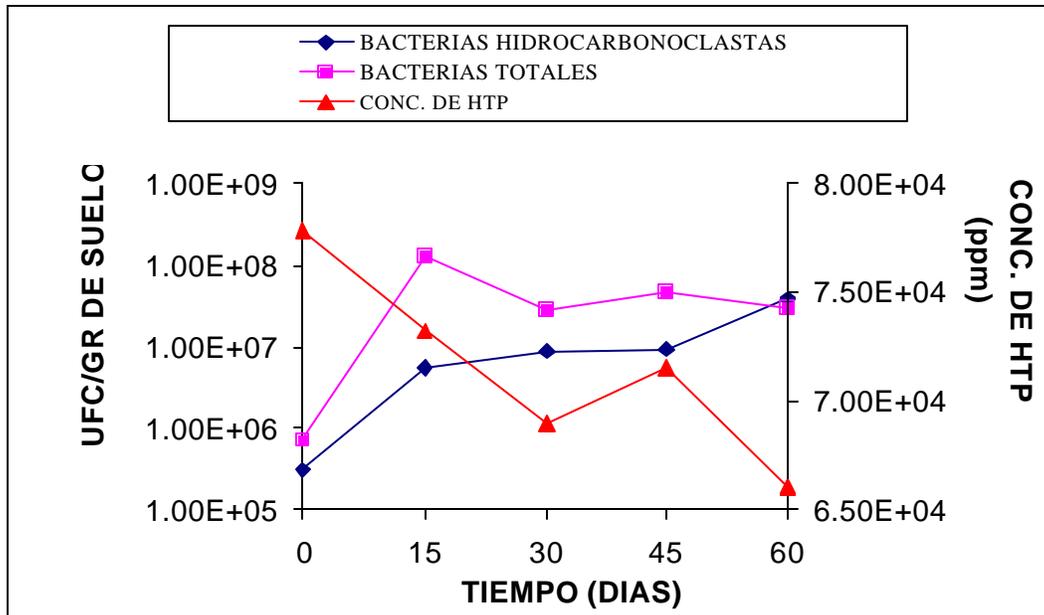
**Tabla 6 .** Cuenta de bacterias totales e hidrocarbonoclastas del suelo de Poza Rica, Ver.

UFC/g	SUELO CONTROL	SUELO CONTAMINADO
<b>BACTERIAS TOTALES</b>	4.95 X10 <sup>6</sup> D.E.:1.22 x 10 <sup>6</sup>	7.54 x 10 <sup>7</sup> D.E.:5.63 x 10 <sup>7</sup>
<b>BACTERIAS HIDROCARBONOCLASTAS</b>	1.52 x 10 <sup>6</sup> D.E.: 8.26 x 10 <sup>5</sup>	1.50 x 10 <sup>7</sup> D.E.: 2.58 x 10 <sup>6</sup>

D.E.: Desviación Estándar.

Las cuentas bacterianas de totales e hidrocarbonoclastas en los diferentes tiempos de muestreo de la biopila del suelo de Poza Rica, se presentan en la Fig. 7. En el caso de las bacterias totales, se observó un incremento de tres órdenes de magnitud a los 15 días de empezar el tratamiento de la biopila, debido posiblemente a la adición de nutrientes aportados por el bagazo de caña y a las bacterias endógenas que crecieron bajo las condiciones de la biopila, además de la aireación a la cual fue sometida. Posteriormente se observó que la cuenta bacteriana total decreció en una orden de magnitud permaneciendo constante a lo largo de todo el tiempo que duró la biopila (60 días).

De igual manera, las cuentas de bacterias hidrocarbonoclastas en los diferentes tiempos de muestreo de la biopila, presentaron un aumento de un orden de magnitud a los 15 días del tratamiento, el crecimiento pudo verse favorecido por la adición de agua al suelo de la biopila, además de que el texturizante (bagazo de caña) permitió una mejor aireación del sistema y un aumento en la porosidad del suelo, esto refleja un aumento paulatino de las bacterias permaneciendo constante durante los siguientes 30 días. Posteriormente, a los 60 días de tratamiento se observó un aumento de dos órdenes de magnitud en la cuenta microbiana, lo que se relaciona con la remoción de hidrocarburos como se muestra en la Fig. 7.



**Fig. 7.** Cinética de crecimiento bacteriano y de biodegradación de HTP's de los diferentes tiempos de la biopila, Poza Rica.

Estos resultados son muy similares a los publicados por MacNaughton (1999), para suelos contaminados con hidrocarburos, reporta que la cuenta de bacterias hidrocarbonoclastas es del orden de  $10^6$  UFC/g de suelo, y se presentan una dinámica similar, observando un incremento de estas bacterias en los primeros días de tener un derrame experimental de hidrocarburos. Stephen y col. (1999), encontraron un incremento en el número de bacterias de  $5.2 \times 10^5$  a  $3.9 \times 10^7$  bacterias/g de suelo seco en un suelo contaminado por hidrocarburos. Muñoz y col. (2003), reportan que hay un aumento de bacterias hidrocarbonoclastas en los primeros días de tratamiento de una biopila, que coincide con el periodo de mayor biodegradación de los hidrocarburos. En este trabajo, el suelo de Poza Rica, muestra un perfil muy parecido a estos resultados.

La diferencia entre las cuentas de bacterias totales e hidrocarbonoclastas del suelo analizado y del tiempo 0 de muestreo de la biopila de Poza Rica, puede deberse a que el suelo de la biopila fue secado al sol y algunas de las poblaciones decrecen con este tratamiento.

## 7.2. Aislamiento de bacterias hidrocarbonoclastas.

Las placas utilizadas para realizar el conteo de bacterias hidrocarbonoclastas, también sirvieron para obtener aislados bacterianos capaces de crecer utilizando hidrocarburos de bajo peso molecular, como única fuente de carbono. Se obtuvieron aislados de ambos suelos, que fueron seleccionados en primera instancia, por sus características coloniales. Posteriormente se determinó su morfología celular y afinidad a la tinción de Gram. (Tabla 7).

**Tabla 7.** Características coloniales y celulares de las cepas hidrocarbonoclastas de los suelos de Tabasco y Poza Rica, Veracruz.

CEPAS	MORFOLOGIA COLONIAL	MORFOLOGIA CELULAR
<b>B</b>	Incolora, transparente, mediana.	Bacilos largos Gram (-)
<b>C</b>	Blanca, opaca, pequeña.	Bacilos largos Gram (-)
<b>E</b>	Blanca, opaca, pequeña.	Bacilos largos Gram (-)
<b>G</b>	Incolora, transparente, pequeña.	Bacilos Gram (-)
<b>J</b>	Blanca, brillante, mediana.	Bacilos Gram (-)
<b>K</b>	Blanca, brillante, mediana.	Bacilos Gram (-)
<b>L</b>	Incolora, transparente, mediana.	Bacilos Gram (-)
<b>1</b>	Blanca, brillante, mediana.	Bacilos Gram (-)
<b>2</b>	Blanca, brillante, mediana.	Bacilos Gram (-)
<b>3</b>	Blanca, brillante, mediana.	Bacilos Gram (-)
<b>4</b>	Naranja, brillante, pequeña.	Bacilos Gram (-) en cadena
<b>5</b>	Blanca, transparente, pequeña.	Bacilos Gram (-)
<b>6</b>	Blanca, opaca, mediana.	Bacilos Gram (-)
<b>7</b>	Blanca-amarillenta, opaca, pequeña.	Bacilos Gram (-)
<b>8</b>	Blanca-amarillenta, brillante, pequeña	Bacilos Gram (-) en cadenas
<b>9</b>	Blanca-amarillenta, brillante, pequeña.	Bacilos Gram (-) en cadenas
<b>10</b>	Amarilla, brillante, pequeña.	Diplococos Gram (-)
<b>11</b>	Blanca-amarillenta, opaca, mediana.	Bacilos Gram (-) en cadenas
<b>12</b>	Blanca-amarillenta, opaca, mediana.	Bacilos Gram (-) en cadenas
<b>13</b>	Blanca, opaca, pequeña.	Cocos Gram (+)
<b>14</b>	Blanca amarillenta, opaca, mediana.	Bacilos Gram (-)
<b>15</b>	Blanca, brillante, pequeña.	Bacilos Gram (-)
<b>16</b>	Blanca, opaca, grande.	Bacilos Gram (+) en cadenas con esporas
<b>17</b>	Blanca, brillante, pequeña	Bacilos Gram (-)
<b>18</b>	Blanca, brillante, pequeña.	Bacilos Gram (-)
<b>19</b>	Blanca, transparente, pequeña	Bacilos Gram (-)
<b>20</b>	Amarilla, brillante, pequeña.	Bacilos Gram (-)
<b>21</b>	Blanca, brillante, grande.	Bacilos Gram (+)

(Cepas B-L suelo Tabasco y Cepas 1-21 suelo Poza Rica).

Basados en las características descritas, se distinguieron 7 cepas denominadas con letras, del suelo de Huimanguillo, Tabasco y 21 cepas, denominadas con números del suelo de Poza

Rica. Como se puede notar la mayoría (25 aislados) fueron bacterias Gram negativas, lo que coincide con lo reportado por Ovreas y Torsvik (1998) y Stephen y col. (1999), quienes observaron que alrededor del 90% de las comunidades hidrocarbonoclastas aisladas de muestras de suelo contaminado con petróleo son bacterias Gram negativas.

Dado que esta forma de caracterización es poco específica, se decidió probar técnicas basadas en la utilización de galerías API que permitieran identificar los aislados obtenidos. Posteriormente se aplicaron técnicas de “fingerprinting genómico” como PCR-REA del espacio intergénico de los genes ribosomales que son capaces de distinguir aislados muy relacionados entre sí, aún dentro de la misma especie.

### 7.1.3. Caracterización e identificación de bacterias por API 20NE.

Con la finalidad de identificar los 21 aislados que se obtuvieron del suelo de Poza Rica se analizaron mediante galerías API 20NE. En la Tabla 9 se muestra el género y especie, así como el porcentaje de identificación de las cepas aisladas. Las cepas 4, 5, 7 y 10, aunque fueron identificadas por API 20NE presentaron un porcentaje muy bajo de identificación, por lo que se decidió seguirla nombrando por su número de identificación inicial. Las cepas 13, 16, 18 y 21 no fueron identificadas por API 20NE ya que eran microorganismos Gram (+). Una de las limitaciones que presentó esta técnica es el bajo porcentaje de identificación por ser cepas aisladas de muestras ambientales, además de que la base de datos es del año 2000.

**Tabla 8.** Identificación con API 20 NE de las bacterias hidrocarbonoclastas.

CEPA	IDENTIFICACION CON API 20 NE	PORCENTAJE DE IDENTIFICACIÓN	SUBFAMILIA
1, 2, 3	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	97.8, 99.9 y 99.9	?-Proteobacteria
11, 12 y 20	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	95.8, 92.5 y 95.3	a-Proteobacteria
6, 19	<i>Chryseomonas luteola</i>	90.8, 82.5 y 90.5	?-Proteobacteria
8, 9, 14	<i>Burkholderia cepacia</i>	95.2, 97.8 y 97.5	$\beta$ -Proteobacteria
15, 17	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	99.9 y 99.9	a-Proteobacteria

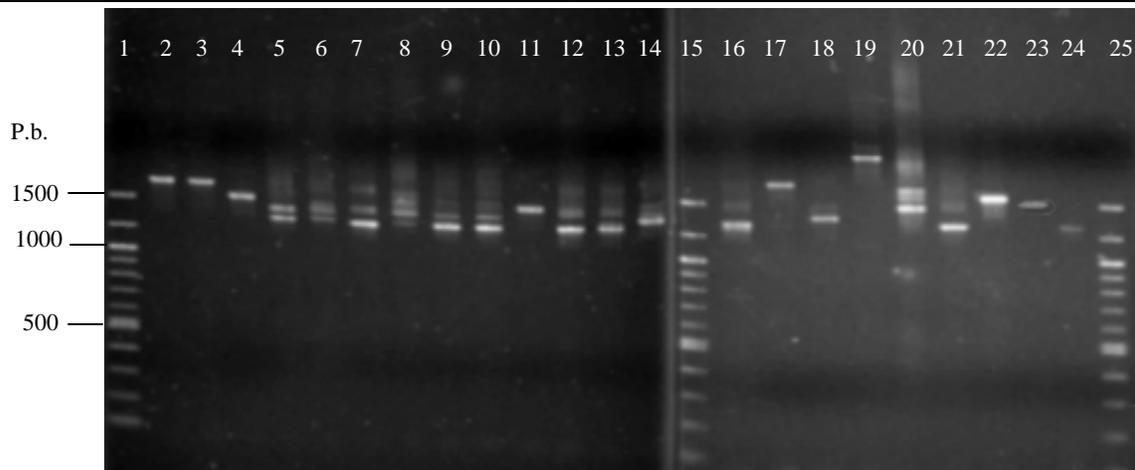
El género *Stenotrophomonas*, ha sido reportado como un microorganismo que metaboliza hidrocarburos, perteneciente al grupo de  $\gamma$ -proteobacterium (Mill y col. 2003). El género *Sphingomonas sp.* ha sido reportado como bacteria degradadora de hidrocarburos (Stephen

y col. 1999; Mill. y col. 2003), dicha bacteria pertenece al grupo de  $\alpha$ -proteobacterium. Abed y col. (2002) reportan el género *Burholderia* sp. como otro microorganismo que oxida hidrocarburos, dicho microorganismo pertenece también a  $\beta$ -proteobacterium. *Agrobacterium radiobacter*, ha sido reportado como un microorganismo del propio suelo por Ovreas y Torsvik (1998) y también es reportado como microorganismo degradador de hidrocarburos por Struthers y col. (1998).

Debido a que algunas de las cepas aisladas presentaron un bajo porcentaje de identificación y no fue posible identificarlas por el sistema API, se utilizaron técnicas moleculares para caracterizar la microbiota aislada.

### **7.3. Tipificación por PCR-REA del espacio intergénico del 16S-23S del operón *rrn*.**

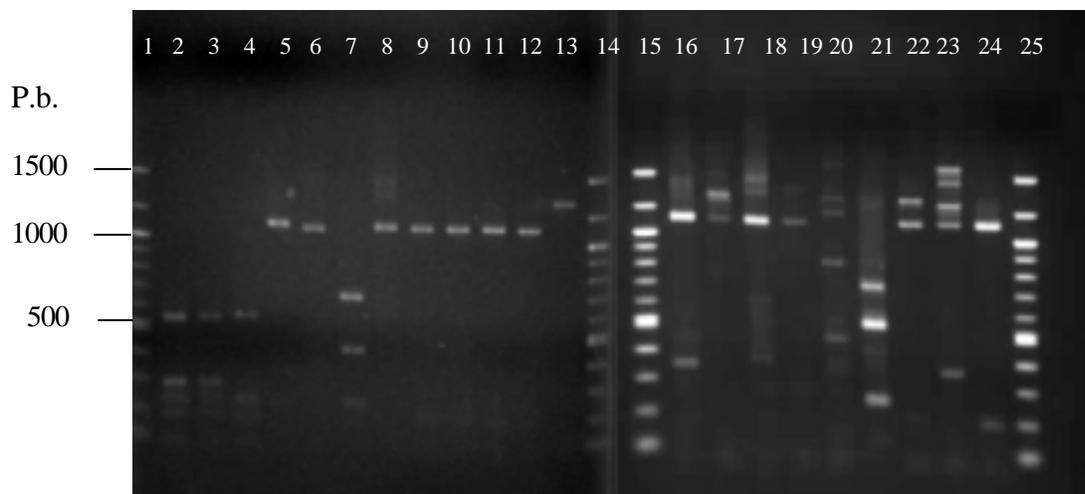
Con el propósito de establecer si los aislados de la misma especie identificados mediante galerías API 20NE corresponden a la misma cepa, se realizó una tipificación genotípica, que ofreció la posibilidad de realizar una agrupación de los aislados del suelo de Poza Rica de una manera más rápida y sensible. Del DNA extraído de acuerdo al método descrito en la sección 7.4.4.2., se amplificó el espacio intergénico del 16S al 23S del operón *rrn*, de las diferentes cepas como se muestra en la Fig.8. Jensen y Webster (1993) reportan que el tamaño del espacio intergénico del operón *rrn* permite tener una tipificación preliminar de las cepas, algunas de ellas presentan más de un amplicón, debido a la existencia de más de un operón *rrn*.



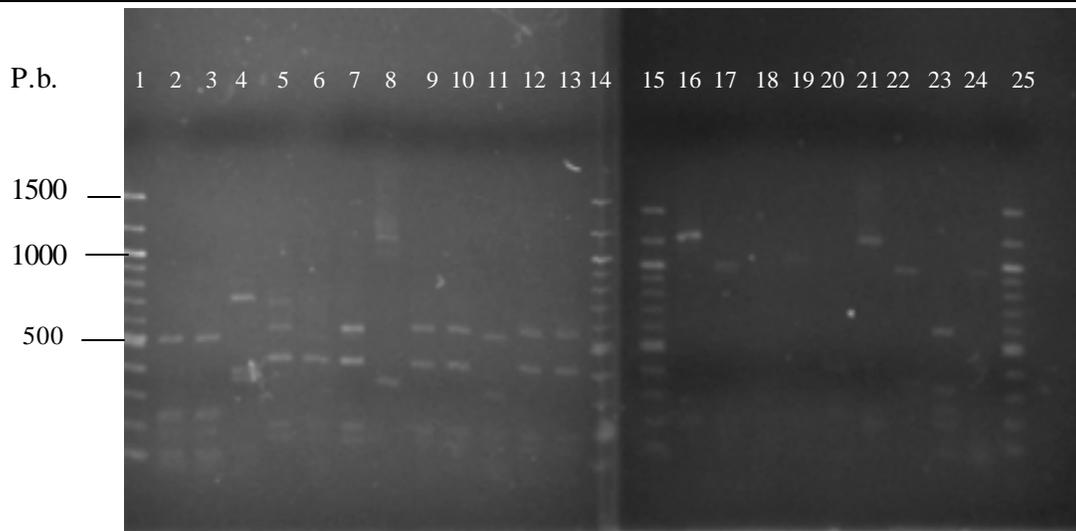
**Fig. 8.** Perfiles genómicos del espacio intergénico del operón *rrn* de las cepas hidrocarbonoclastas.

Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2, 3 y 4: *S. maltophilia*. Carril 5: Cepa 4. Carril 6: Cepa 5. Carril 7: *C. luteola*. Carril 8: Cepa 7. Carril 9 y 10: *B. cepacia*. Carril 11: Cepa 10. Carril 12 y 13: *S. paucimobilis*. Carril 14: Cepa 13. Carril 15: Marcador de peso molecular. Carril 16: *B. cepacia*. Carril 17: *A. radiobacter*. Carril 18: Cepa 16. Carril 19: *A. radiobacter*. Carril 20: Cepa 18. Carril 21: *C. luteola*. Carril 22 y 23: *S. paucimobilis*. Carril 24: Cepa 21. Carril 25: Marcador de peso molecular.

Se realizó el análisis de restricción enzimática (REA) para el espacio intergénico (ITS) que separa los genes 16S y 23S del operón *rrn* para cada una de las cepas aisladas. El producto de amplificación del ITS, se sometió a la restricción enzimática con las enzimas *Hha* I, *Hae* III y *Msp* I. Las Figuras 9, 10, y 11 muestran el patrón de bandas de las cepas con las restricciones del espacio intergénico con las enzimas *Hha* I, *Hae* III y *Msp* I respectivamente lo que nos permite hacer una tipificación de las cepas.



**Fig. 9.** Perfiles genómicos de la restricción con *Hha* I del operón *rrn* de las cepas hidrocarbonoclastas. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2, 3 y 4: *S. maltophilia*. Carril 5: Cepa 4. Carril 6: Cepa 5 Carril 7: *C. luteola*. Carril 8: Cepa 7. Carril 9 y 10: *B. cepacia*. Carril 11 y 12: *S. paucimobilis*. Carril 13: Cepa 10. Carril 14 y 15: Marcador de peso molecular. Carril 16: Cepa 13. Carril 17: *B. cepacia*. Carril 18: *A. radiobacter*. Carril 19: Cepa 16. Carril 20: *A. radiobacter*. Carril 21: Cepa 18. Carril 22: *C. luteola*. Carril 23: *S. paucimobilis*. Carril 24: Cepa 21. Carril 25: Marcador de peso molecular.



**Fig. 10.** Perfiles genómicos de la restricción con *Hae* III del operón *rrn* de las cepas hidrocarbonoclastas.

Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2, 3 y 4: *S. maltophilia*. Carril 5: Cepa 4. Carril 6: Cepa 5. Carril 7: *C. luteola*. Carril 8: Cepa 7. Carril 9 y 10: *B. cepacia*. Carril 11: Cepa 10. Carril 12 y 13: *S. paucimobilis*. Carril 14 y 15: Marcador de peso molecular. Carril 16: Cepa 13. Carril 17: *B. cepacia*. Carril 18: *A. radiobacter*. Carril 19: Cepa 16. Carril 20: *A. radiobacter*. Carril 21: Cepa 18. Carril 22: *C. luteola*. Carril 23: *S. paucimobilis*. Carril 24: Cepa 21. Carril 25: Marcador de peso molecular.



**Fig. 11.** Perfiles genómicos de la restricción con *Msp* I del operón *rrn* de las cepas hidrocarbonoclastas.

Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2, 3 y 4: *S. maltophilia*. Carril 5: Cepa 4. Carril 6: Cepa 5. Carril 7: *C. luteola*. Carril 8: Cepa 7. Carril 9 y 10: *B. cepacia*. Carril 11: Cepa 10. Carril 12 y 13: *S. paucimobilis*. Carril 14 y 15: Marcador de peso molecular. Carril 16: Cepa 13. Carril 17: *B. cepacia*. Carril 18: *A. radiobacter*. Carril 19: Cepa 16. Carril 20: *A. radiobacter*. Carril 21: Cepa 18. Carril 22: *C. luteola*. Carril 23: *S. paucimobilis*. Carril 24: Cepa 21. Carril 25: Cepa 18. Carril 26: Marcador de peso molecular.

En la Tabla 9 se muestra el tamaño del amplicón ITS para las cepas hidrocarbonoclastas aisladas así como los tamaños de los fragmentos después de su restricción con las enzimas *Hha* I, *Hae* III y *Msp* I, además se muestra la agrupación que se realizó por la restricción de

enzimas mediante el patrón de bandas que se obtiene de que permite tener una tipificación de las 21 cepas hidrocarbonoclastas aisladas de las diferentes muestras de suelo. Esta tipificación mediante PCR-REA permito tener 18 grupos diferentes de las cepas.

**Tabla 9.** Tamaño del ITS y grupos identificados con la restricción con enzimas de las cepas hidrocarbonoclastas aisladas de Poza Rica, Veracruz. (Cada una de las letras significa un patrón genómico igual).

CEPAS	IDENTIFICACIÓN CON API 20 NE	Análisis REA				Grupos
		Tamaño del ITS (Kb)	<i>Hae</i> III	<i>Hha</i> I	<i>Msp</i> I	
1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1.6	A	A	A	1
2	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1.6	A	A	A	1
3	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1.5	B	B	B	2
4	-----	1.2-1.4	C	C	C	3
5	-----	1.2-1.4	D	C	D	4
6	<i>Chryseomonas luteola</i>	>1.5, 1.4 y 1.2	E	D	E	5
7	-----	1.3, 1.4	F	C	F	6
8	<i>Burkholderia cepacia</i>	1.2	G	C	G	7
9	<i>Burkholderia cepacia</i>	1.2	G	C	G	7
10	-----	1.5	H	E	H	8
11	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	1.2	G	C	G	9
12	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	1.2	G	C	G	9
13	-----	1.3	I	F	I	10
14	<i>Burkholderia cepacia</i>	>1.6	J	G	I	11
15	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	1.3	K	H	J	12
16	-----	1.8	L	H	K	13
17	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	1.5	M	I	K	14
18	-----	1.3	N	J	L	15
19	<i>Chryseomonas luteola</i>	1.5	O	K	M	16
20	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	1.3	O	L	L	17
21	-----	1.3	P	M	J	18

Las cepas de *Stenotrophomonas maltophilia* (1, 2 y 3) mostraron características fenotípicas similares y presentaron una tipificación por PCR-REA en dos grupos, por presentar patrones de bandas de restricción enzimática diferentes. Por otro lado, las cepas de

*Burkholderia cepacia*, se agruparon en dos grupos diferentes; uno de éstos comprenden a las cepas 8 y 9 que se comportaron fenotípicamente y genotípicamente como la misma cepa, mientras que la cepa 14 tenía características fenotípicas iguales a las otras cepas, por medio de la técnica PCR-REA se tipificó en otro grupo. También las cepas de *Sphingomonas paucimobilis*, presentaron las mismas características coloniales y celulares, pero con el análisis de PCR-REA se agruparon en dos grupos. Similarmente las cepas de *Agrobacterium radiobacter* (15 y 17) se congregaron en dos grupos. Aunque algunas de las cepas no pudieron ser identificadas mediante pruebas bioquímicas, se utilizó un enfoque polifásico que incluyó métodos fenotípicos y de detección de polimorfismos por medio de PCR-REA para caracterizar a las diferentes cepas. La microdiversidad que se presentan en bacterias de la misma especie es estudiada por diferentes autores, Kostman y col. (1992) encontró en cepas de *Burkholderia cepacia* diferencias genotípicas utilizando el espacio intragénico del 16S y 23S del rDNA (ITS), Hauben y col (1999) analizó 108 cepas de *Stenotrophomonas maltophilia* usando análisis genotípicos como Polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados del DNA (AFLP), hibridación DNA/DNA y comparación de secuencias del gen *rrs*, encontrando que no se encuentran diferencias fenotípicas entre las cepas, pero que muestran una alta heterogenicidad genotípica entre las cepas.

#### **7.4. Extracción y purificación de DNA.**

Se extrajo DNA de toda la comunidad bacteriana presente en los suelos contaminados con hidrocarburos, para poder utilizarlo en la amplificación por PCR y posteriormente analizar el patrón de bandas en DGGE. Se probaron diferentes métodos de extracción procurando garantizar la lisis completa de todas las poblaciones microbianas presentes en estos suelos.

##### **7.4.1. Estandarización del aislamiento de DNA de suelos contaminados con hidrocarburos.**

###### **7.4.1.1 Método Bead-Beater.**

La técnica de extracción de DNA por el método de Bead-Beater (Sección 6.3.1) se llevó a cabo con el suelo de Poza Rica, Ver. Se probaron diferentes tamaños de muestra de 1 g hasta 10 g de suelo en condiciones normales de extracción y diferentes tiempos en los

ciclos de homogenización. Sin embargo, no fue posible obtener DNA de ninguna de las muestras del suelo.

A fin de establecer si los resultados negativos que se obtuvieron anteriormente, se relacionaban con la carga microbiana en los suelos tratados, se procedió a inocular a los suelos con una suspensión de  $10^8$  bacterias/ml de bacterias Gram (+) y (-), ya que estos microorganismos muestran una diferencia en su pared celular. Se encontró que la obtención de DNA por este método de extracción no dependía de las diferencias en la pared celular de las cepas utilizadas, sino que el mayor efecto lo tienen las características fisicoquímicas de los suelos. Varios autores (Holben y col. (1988), Tien y col. (1999) y Leff y col. (1995), reportan diferencias en los protocolos de extracción de varios tipos de bacterias presentes en comunidades bacterianas del suelo. Aunado a esto los hidrocarburos presentes en las muestras de suelo también aumentan la dificultad de extracción.

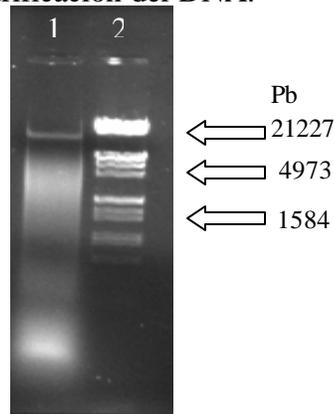
#### **7.4.1.2. Método de extracción Omnimixer.**

Usando este método de extracción (Sección 6.3.2) se probaron diferentes ciclos de homogenización (rpm). Debido al diseño que presenta el Omnimixer, no lo hace adecuado para la extracción del DNA de muestras de suelo.

#### **7.4.1.3. Método Bead Beater-Lisozima-SDS.**

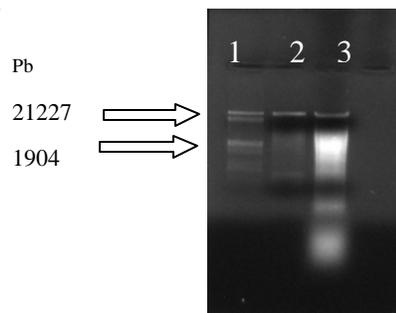
Al no tener resultados positivos con los anteriores métodos físicos de ruptura, se probó una combinación de métodos químicos, físicos y enzimáticos, buscando una lisis celular más eficiente. Se utilizó SDS, lisozima y la desintegración balística de las células por las perlas de zirconia/sílica (bead beating). Aunque se pudo realizar la extracción del DNA (Fig. 12), la solución resultante tuvo una coloración café, indicando mucha contaminación por ácidos húmicos, por lo que fue importante purificarla para su utilización en otras técnicas de biología molecular como la amplificación por PCR. Para ello se probaron dos métodos de purificación, uno con polivinilpirrolidona (PVP) y otro con cloruro de cesio. La solución obtenida después de la purificación con PVP aún siguió dando una coloración café, aunque con este método se encontró una menor pérdida de DNA como se muestra en la Fig. 13. Sin embargo, cuando se utilizó la purificación con cloruro de cesio, se vio que existía una pérdida del 60% del DNA con respecto a la concentración inicial de DNA.

Tien y col. (1999) reportan una mayor eficiencia de la extracción por métodos químicos y físicos combinados y concuerda con la importancia en el rendimiento de recuperación del DNA de las muestras de suelo, así como su pureza, además que dicha recuperación sea representativa del total de comunidades bacterianas del suelo. Por los resultados obtenidos este fue el método que se eligió para la purificación del DNA.



**Fig. 12.** Aislamiento de DNA del suelo contaminado.

Carril 1: Muestra de suelo contaminado con hidrocarburos. Carril 2: Marcador de peso molecular (Fago ?, digerido con *Hind* III y *Eco* RI).

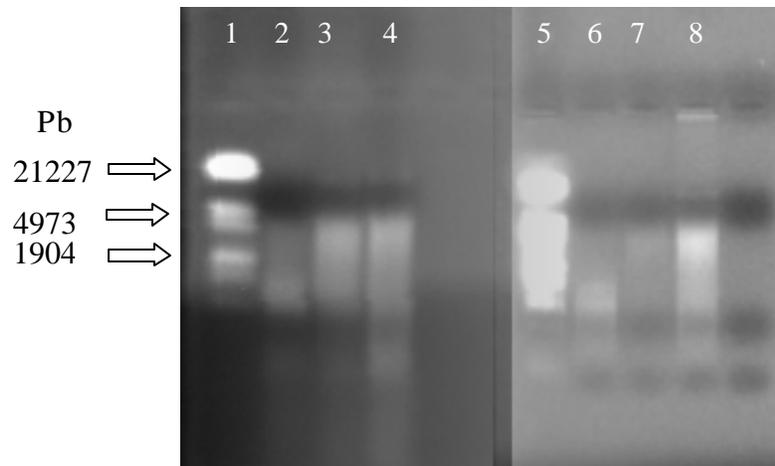


**Fig. 13.** Purificación de DNA.

Carril 1. Marcador de peso molecular (Fago ?, digerido con *Hind* III y *Eco* RI). Carril 2: Purificación con CsCl. Carril 3: Purificación con PVP.

#### **7.4.2. Extracción de DNA del suelo de Huimanguillo, Tabasco.**

Tomando en cuenta la dificultad de la extracción del DNA de los suelos, se realizó la extracción del suelo de Huimanguillo, Tabasco; de acuerdo al protocolo de Bead-Beater-lisozima-SDS. Se obtuvo DNA fragmentado de diferentes pesos moleculares, en baja concentración como se presentan en la Fig. 14.



**Fig. 14.** Extracción de DNA de suelo Huimanguillo, Tabasco.

Carril 1: Marcador de peso molecular (Fago  $\lambda$ , digerido con *Hind* III y *Eco* RI). Carril 2: Punto 1. Carril 3: Punto 7. Carril 4: Mezcla de suelo Carril 5: Marcador. Carril 6: Punto 1 Carril 7: Punto 6. Carril 8: Mezcla de suelo de los tres puntos.

Se realizó la purificación de las soluciones con cloruro de cesio, sin embargo, no se logró recuperar DNA en dos de las tres muestras, solamente en el punto 6 se obtuvo DNA en baja cantidad, debido a que desde la extracción no se obtenía una gran cantidad de DNA.

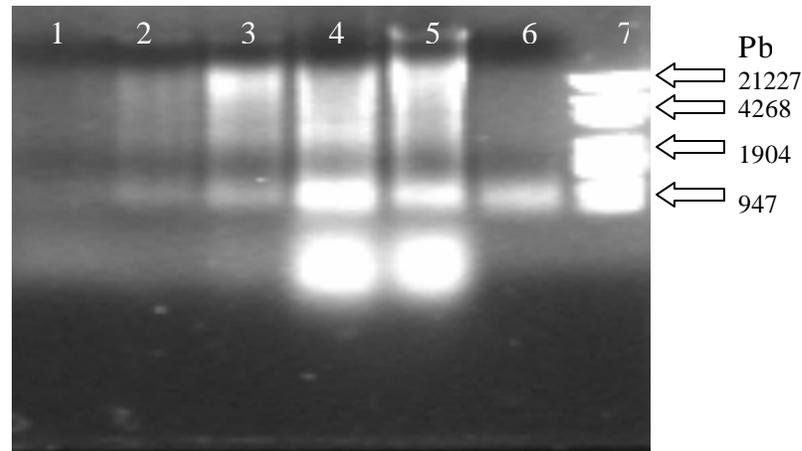
#### 7.4.3. Extracción del DNA del Suelo de Poza Rica, Veracruz.

En esta extracción se utilizó el método de Bead Beater-lisozima-SDS ya que en este trabajo se detectó una mayor eficiencia en la extracción de DNA con esta técnica, aunque la cantidad de la muestra se disminuyó a 1 g de suelo, para utilizar el homogenizador mini Bead Beater.

Se hizo una segunda modificación a esta técnica de extracción de DNA, consistente en que además de los tres ciclos de homogenización del método, cada vez que se agregó alguno de los reactivos, se homogenizó por 10 s a 3000 rpm en el mini Bead Beater. Esto ayudó a la homogenización de la muestra con cada uno de los reactivos y permitió obtener mayor cantidad de DNA de todas las células contenidas en la muestra. En todas las muestras de suelo y en los diferentes tiempos de muestreo de la biopila se obtuvo DNA en diferentes cantidades.

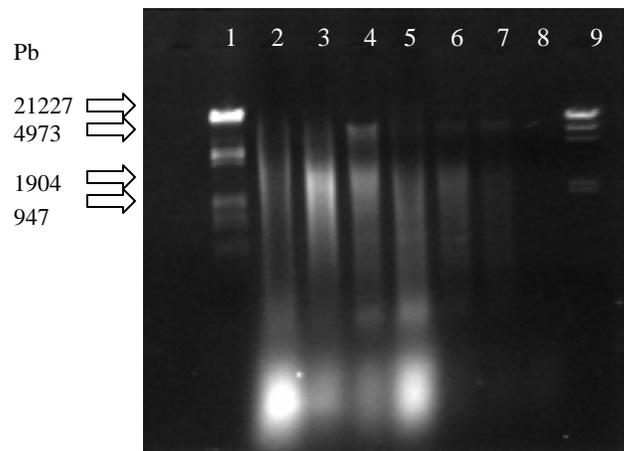
Del suelo control (sin contaminantes) con una cuenta viable de  $1.5 \times 10^6$  UFC/g de suelo se obtuvo una cantidad de 4.4  $\mu$ g de DNA/ g de suelo, así mismo el suelo contaminado con una cuenta microbiana  $1.5 \times 10^7$  UFC/g de suelo se obtuvo una concentración de 5.1  $\mu$ g de

DNA/g de suelo. Miller y col. (1999) encontraron concentraciones entre 1.5 y 8  $\mu\text{g}$  de DNA/g, en un suelo agrícola con una carga bacteriana de  $1.9 \times 10^9$  células por g de suelo. En la Fig. 15 se muestran las extracciones obtenidas para muestras directas del suelo y para el bagazo de caña. Similarmente, se presentan las extracciones de DNA a diferentes tiempos de muestreo (T0 a T4) de la biopila (Fig.16). En dichas extracciones se obtuvo DNA de peso molecular mayor de 21 000 pares de bases, lo cual asegura la presencia del gen 16S rRNA.



**Fig. 15.** Extracción de DNA del suelo de Poza Rica, Veracruz.

Carril 1: Suelo control. Carril 2: Suelo contaminado. Carril 3: Suelo contaminado seco. Carril 4: Mezcla de suelo con bagazo de caña (T0). Carril 5: Mezcla de suelo con bagazo de caña (T1). Carril 6: Bagazo de Caña Carril 7: Marcador de peso molecular (Fago ?, digerido con *Hind* III y *Eco* RI).



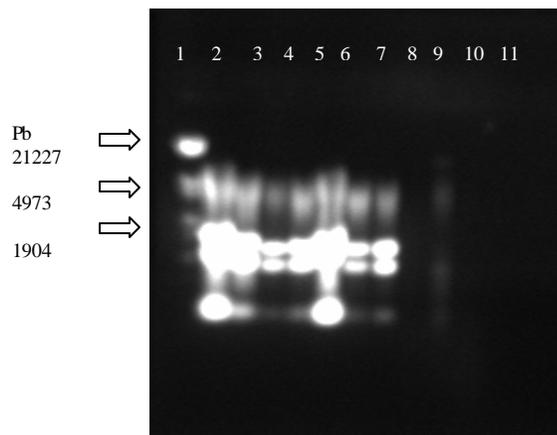
**Fig. 16.** Extracción de DNA de muestras del suelo de los diferentes tiempos de la biopila.

Carril 1: Marcador de peso molecular (Fago ?, digerido con *Hind* III y *Eco* RI). Carril 2: Mezcla de suelo con bagazo de caña (T0). Carril 3: Mezcla de suelo con bagazo de caña (T1). Carril 4: Mezcla de suelo con bagazo de caña (T2). Carril 5: Mezcla de suelo con bagazo de caña (T3). Carril 6: Mezcla de suelo con bagazo de caña (T4). Carril 7: Suelo control. Carril 8: Suelo contaminado seco. Carril 9: Marcador de peso molecular (Fago ?, digerido con *Hind* III y *Eco* RI).

#### 7.4.4. Extracción de DNA de las cepas hidrocarbonoclastas .

##### 7.4.4.1. Cepas degradadoras de hidrocarburos del suelo de Huimanguillo, Tabasco.

A partir de las cepas hidrocarbonoclastas aisladas, se obtuvo DNA de diferentes tamaños, el cual permite amplificar la región V6-V8 del gen 16S rRNA de dichas cepas, permitiendo ubicar la banda de estos microorganismos en un patrón electroforético de DGGE. En estas muestras también se observó rRNA tanto el 16S como el 23S, indicando el estado fisiológico de los cultivos, esto se observa en cultivos de 24 horas (Fig. 17).

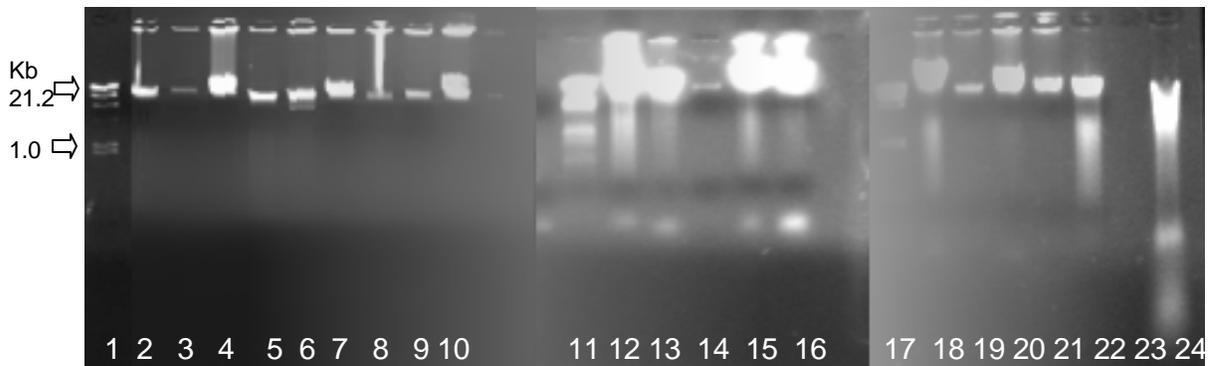


**Fig. 17.** DNA de cepas hidrocarbonoclastas del suelo Huimanguillo, Tabasco.

Carril 1: Marcador de peso molecular (Fago *?*, digerido con *Hind* III y *Eco* RI). Carril 2: Cepa B. Carril 3: Cepa C. Carril 4: Cepa E. Carril 5: Cepa G. Carril 6: Cepa J. Carril 7: Cepa K. Carril 8: Cepa L. Carril 9: Punto 1. Carril 10: Punto 6. Carril 11: Punto 7.

##### 7.4.4.2. Cepas degradadoras de hidrocarburos del Suelo de Poza Rica, Veracruz y de la biopila.

Se extrajo el DNA de las cepas hidrocarbonoclastas aisladas del suelo de Poza Rica y de la biopila. Para todas se obtuvo DNA de alto peso molecular mayor a 21 Kb (Fig. 18). La solución de DNA posteriormente se utilizó para la amplificación por PCR.



**Fig. 18.** DNA de las cepas hidrocarbonoclastas del suelo de Poza Rica, Veracruz.

Carril 1: Marcador de peso molecular (Fago  $\phi$ , digerido con *Hind* III y *Eco* RI). Carril 2, 3 y 4: *S. maltophilia*. Carril 5: Cepa 4. Carril 6: Cepa 5. Carril 7: *C. luteola*. Carril 8: Cepa 7. Carril 9 y 10: *B. cepacia*. Carril 11: Marcador de peso molecular (Fago  $\phi$ , digerido con *Hind* III y *Eco* RI). Carril 12: Cepa 10. Carril 13 y 14: *S. paucimobilis*. Carril 15: Cepa 13. Carril 16: *B. cepacia*. Carril 17: Marcador de peso molecular (Fago  $\phi$ , digerido con *Hind* III y *Eco* RI). Carril 18: *A. radiobacter*. Carril 19: Cepa 16. Carril 20: *A. radiobacter*. Carril 21: Cepa 18. Carril 22: *C. luteola*. Carril 23: *S. paucimobilis*. Carril 24: Cepa 21.

### 7.5. Amplificación por PCR.

Con el propósito de probar la pureza del DNA extraído así como su utilidad en procesos de biología molecular, se establecieron las condiciones para la amplificación por PCR del gen 16S rRNA, del DNA extraído de las comunidades bacterianas presentes en los suelos analizados, así como de los aislados de estos suelos.

#### 7.5.1. Amplificación por PCR de las muestras del suelo y cepas hidrocarbonoclastas del suelo de Tabasco.

Para realizar la amplificación por PCR del gen 16S rRNA del suelo de Tabasco, se utilizó el extracto de DNA purificado con cloruro de cesio. Se obtuvieron productos de PCR de aproximadamente 1500 pb. Con esto se comprobó que los ácidos nucleicos extraídos y purificados por el método de cloruro de cesio, pueden ser utilizados para la amplificación por PCR sin la interferencia de los contaminantes propios del suelo.

Diversos factores pueden afectar las condiciones de los productos de amplificación para la región V6-V8 del 16S rDNA, ya que dichos amplicones tienen una región de aproximadamente 40 nucleótidos rica en guanina-citosina. Se adicionó albúmina sérica bovina (ASB) a las reacciones de amplificación por PCR con el objeto de atrapar inhibidores de dicha reacción. Un factor era la concentración de la solución de  $MgCl_2$  por lo que se titularon las muestras de suelo con esta solución y se encontró que la mejor concentración para obtener productos de amplificación era 1.5 mM.

Se realizó un gradiente de temperatura (48-56°C) para ver cual era la temperatura óptima de alineamiento de los iniciadores, encontrando que la temperatura donde se tenían amplicones de mayor concentración fue a 52°C.

Otro factor importante para obtener resultados positivos en reacciones de PCR en poblaciones bacterianas del suelo es la calidad de la enzima *Taq* polimerasa, por lo que se probaron enzimas de Quiagen y Promega. Se encontró que al utilizar la enzima de Quiagen se obtuvieron productos de amplificación en la mayoría de las muestras de suelo además de tener mayores productos de amplificación (Romanowski y col. (1993), Suzuki y Giovannoni (1996) y Leeflang y Smit (1997)).

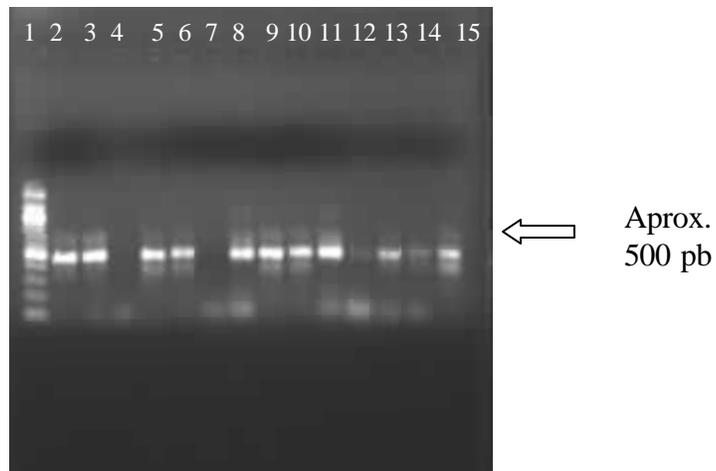
Se obtuvieron productos de amplificación por PCR del gen 16S rRNA de aproximadamente 1.5 Kb, de las cepas C, E, J, K y L y de las muestras de suelo de acuerdo al Sección 6.7.1. como se muestra en la Fig. 19.



**Fig. 19.** Amplicones del gen 16S rRNA de los suelos y cepas de Huimanguillo, Tabasco.

Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Punto 6. Carril 3: Punto 7. Carril 4: Punto 1. Carril 5: Punto 6. Carril 6: Punto 7. Carril 7: Mezcla de suelo. Carril 8: Cepa C 1/100. Carril 9: Cepa E 1/10. Carril 10: Cepa E 1/100. Carril 11: Cepa J 1/10, Carril 12: Cepa J. 1/100. Carril 13: Cepa K 1/10. Carril 14: Cepa K1/100. Carril 15: Cepa L 1/10. Carril 16: Cepa L 1/100. Carril 17: Control positivo (cepa 5).

Se obtuvieron productos de la amplificación vía PCR de la región V6-V8 del gen del 16S rDNA, de alrededor de 500 pb. Esta amplificación fue de gran importancia debido a que uno de los iniciadores utilizados tiene una cola de 40 nucleótidos y esto pudiera interferir en el acoplamiento de los iniciadores al DNA. En la Fig. 20 se muestran los amplicones de aproximadamente 500 pb. obtenidos de las diferentes muestras de suelo y de los aislados. El suelo de Tabasco no pudo ser monitoreado posteriormente.

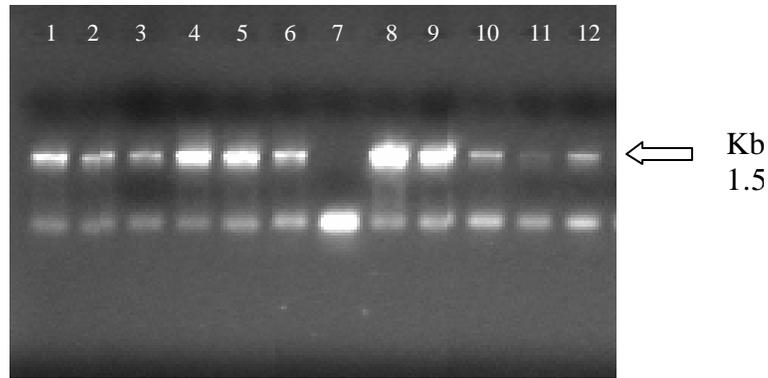


**Fig. 20.** Amplicones de la región V6-V8 del gen 16S rDNA, de los puntos del suelo de Huimanguillo, Tabasco.

Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Punto 1. Carril 3: Punto 6. Carril 4: Punto 7. Carril 5: Mezcla de Suelo. Carril 6: Punto 1. Carril 7: Punto 6. Carril 8: Punto 7. Carril 9: Mezcla. Carril 10: Cepa C. Carril 11: Cepa E. Carril 12: Cepa G. Carril 13: Cepa L. Carril 14: Control positivo (cepa 5). Carril 15: Control negativo (sin DNA).

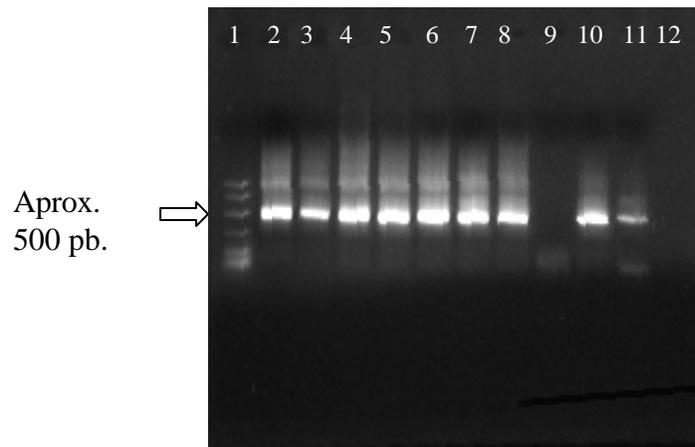
#### **7.5.2. Amplificación por PCR de muestras de suelo, de la biopila y de las cepas hidrocarbonoclastas del suelo Veracruz.**

De las muestras de DNA obtenidas de suelo y de las cepas hidrocarbonoclastas se realizó la amplificación por PCR. Debido a los resultados antes obtenidos se trató de estandarizar la cantidad de DNA, se ajustó la concentración de DNA = 0.25 µg por reacción para ver si tenía una mejor reacción de PCR. En la Fig. 21 se muestran los amplicones de las diferentes muestras de los suelos del 16S rDNA. Esta amplificación tenía como objetivo ver que las soluciones de DNA no tuvieran sustancias inhibitorias de la PCR como ácidos húmicos y contaminantes del petróleo.



**Fig. 21.** Productos de Amplificación del 16S rDNA del suelo de Poza Rica. Carril 1: Suelo control. Carril 2: Suelo contaminado. Carril 3: Suelo contaminado seco. Carril 4: Suelo contaminado. Carril 5: Suelo contaminado seco. Carril 6: Tiempo 0 de biopila (0 días). Carril 7: Control Negativo (Sin DNA). Carril 8: Tiempo 1 de la biopila (15 días). Carril 9: Tiempo 2 de la biopila (30 días). Carril 10: Tiempo 3 de la biopila (45 días). Carril 11: Tiempo 4 de la biopila (60 días). Carril 12: Control Positivo (con DNA).

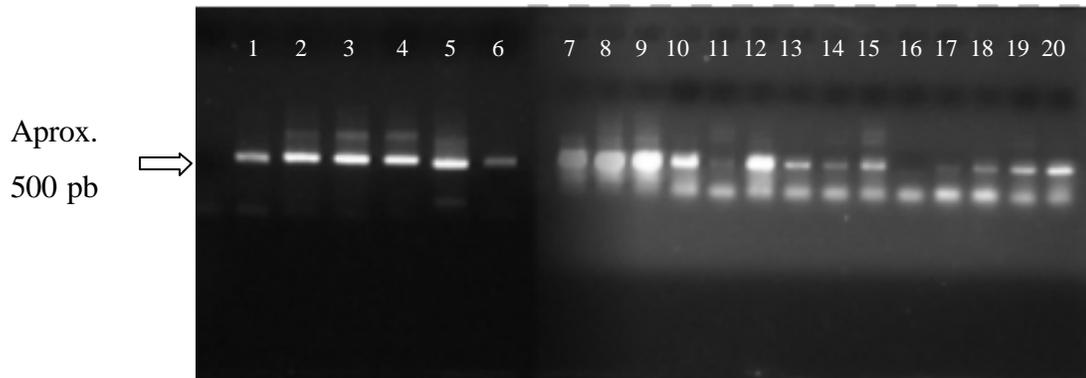
También se amplificó por PCR la región V6-V8 del 16S rDNA de todas las muestras del suelo de Poza Rica. Se obtuvieron amplicones de aproximadamente 500 pb. de las muestras de suelo y de los distintos tiempos de la biopila, excepto en la muestra del bagazo de caña, como se muestra en la Fig. 22.



**Fig. 22.** Amplificación de la región V6-V8 del gen 16S rRNA del suelo de Poza Rica. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Suelo control. Carril 3: Suelo contaminado. Carril 4: Suelo contaminado seco. Carril 5: Tiempo 0 de la biopila (0 días). Carril 6: Tiempo 1 de la biopila (15 días). Carril 7: Tiempo 2 de la biopila (30 días). Carril 8: Tiempo 3 de la biopila (45 días). Carril 9: Bagazo de Caña. Carril 10: Tiempo 4 de la biopila (60 días) Carril 11: Control positivo (con DNA). Carril 12: Control negativo (sin DNA).

Se amplificó la región V6-V8 del 16S rDNA de los diferentes microorganismos degradadores de hidrocarburos aislados del suelo de Poza Rica (Fig. 23). Estos productos de amplificación permitieron identificar posteriormente a través de la comparación de las

bandas de DGGE la presencia de un microorganismo aislado, a lo largo del tiempo del tratamiento en la biopila.



**Fig. 23.** Amplicones de la región V6-V8 del 16S rDNA, de las cepas hidrocarbonoclastas de Poza Rica.

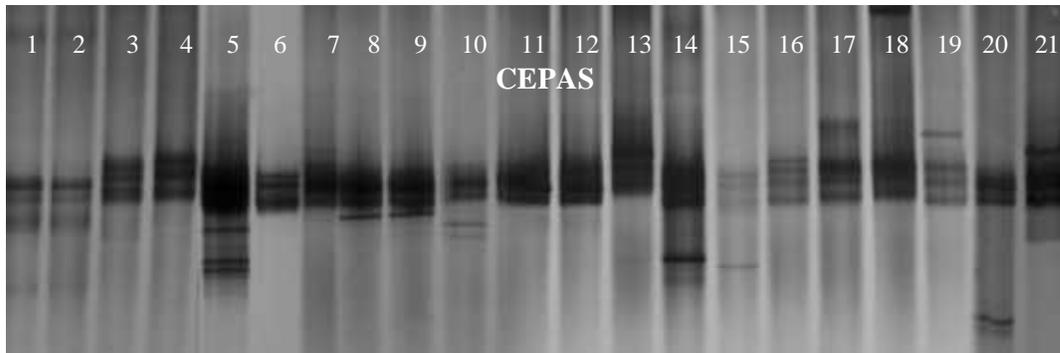
Carril 1, 2 y 3: *S. maltophilia*. Carril 4: Cepa 4. Carril 5: Cepa 5. Carril 6: *C. luteola*. Carril 7: Cepa 7. Carril 8 y 9: *B. cepacia*. Carril 10: *C. luteola*. Carril 11 y 12: *S. paucimobilis*. Carril 13: Cepa 13. Carril 14: *B. cepacia*. Carril 15: *A. radiobacter*. Carril 16: Cepa 16. Carril 17: *A. radiobacter*. Carril 18: Cepa 18. Carril 19: *C. luteola*. Carril 20: *S. paucimobilis*.

#### 7.6. Dinámica de poblaciones en la biopila mediante (DGGE).

El análisis DGGE permite conocer la estructura, diversidad y dinamismo de las poblaciones microbianas. Con el propósito de conocer el perfil electroforético de cada una de las 21 cepas hidrocarbonoclastas aisladas del suelo de Poza Rica, se corrió un gel de DGGE con un gradiente de desnaturizantes del 42 al 54%, de los amplicones obtenidos de la región V6-V8 del gen 16S rRNA. Se encontró que las cepas 5, 14, 15 y 20 presentaron un corrimiento electroforético mayor que el resto de las cepas, ya que las muestras de suelo y los diferentes tiempos de la biopila se presentaron también en la parte más concentrada del gel. De acuerdo a los resultados de la Fig. 24 varias cepas presentaron más de una banda, debido a la presencia de más de un operón del 16S rDNA, lo cual concuerda con lo encontrado por Nübel y col. (1996), quienes encontraron más de una banda para una cepa de *Paenibacillus polymyxa* en un gel de TGGE, detectando una alta heterogeneidad en un fragmento de 347 pb.

Los perfiles obtenidos para cada una de las cepas concuerdan con los resultados de la tipificación de la Tabla 9, en donde las cepas de *S. maltophilia* (1 y 2), *B. cepacia* (8, 9) y *S. paucimobilis* (11 y 12) presentaron el mismo corrimiento electroforético en el DGGE entre sí, por lo que estas cepas son genotípicamente iguales.

Por otra parte, la otra cepa de *S. maltophilia* (3), la cepa de *B. cepacia* (14), *S. paucimobilis* (20) mostraron un corrimiento electroforético diferente con respecto a las cepas de su mismo género en el DGGE. En tanto las dos cepas *A. radiobacter* (15 y 17) y las cepas de *C. luteola* (6 y 19) mostraron una diferencia entre sí, en la movilidad electroforética en el DGGE, lo que concuerda con el resultado anteriormente mostrado de PCR-REA del ITS (Tabla 9).



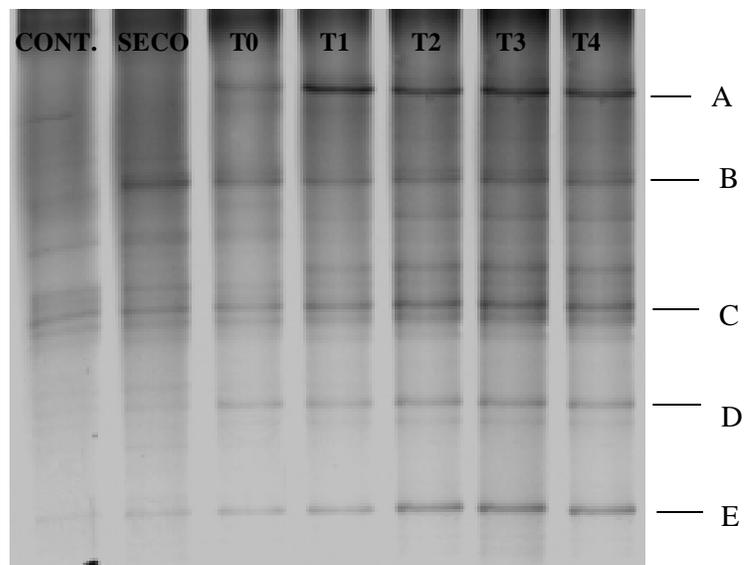
**Fig. 24.** DGGE con un gradiente de desnaturalización del 42-54% de las cepas hidrocarbonoclastas aisladas del suelo de Poza Rica, Veracruz.

Para caracterizar y comparar las comunidades bacterianas de los diferentes tiempos de muestreo de la biopila, se amplificó de la región V6 a la V8 del 16S rDNA y los productos de PCR obtenidos se aplicaron a un gel de DGGE con una concentración de desnaturalizantes del 42 al 54%. No se encuentra una gran diferencia en los perfiles electroforéticos que presentó el suelo control (sin contaminantes) con respecto los suelos contaminado húmedo y seco como se aprecia en la Fig. 25, en donde las poblaciones que se encuentran en el suelo control, permanecen también los suelos contaminados.

Se presentan alrededor de 12 bandas de poblaciones en los tiempos de la biopila. En los carriles 3 al 7 se trata de muestras de suelo con el texturizante y solamente se aprecia una banda diferente comparando con el carril 2 o 3 de muestras de suelo contaminado, la adición del bagazo de caña parece no influir en un incremento en el número de bandas de las poblaciones. Las bandas A, B, C, D y E, corresponden a poblaciones bacterianas importantes, ya que están presentes a lo largo del tratamiento de la biopila y la mayoría de estas bandas incrementan su intensidad en el tiempo. Como se ve la banda E se encontró muy abajo del gel por lo que se realizó otro gel aumentado el gradiente. La cepa 5 se utilizó

como referencia de la corrida, ya que dicha cepa se encontraba en la parte concentrada del gel además por que presentó como huella digital 3 bandas.

Por los patrones de bandas obtenidos y correlacionando con la cinética de crecimiento bacteriano (Fig. 7) se observa que diferentes poblaciones son las responsables de la oxidación de los hidrocarburos en las muestras de suelo analizadas y que no siempre las cepas que pudieron cultivarse son las responsables del proceso de biorremediación de los suelos, ya que ninguno de los perfiles genómicos de los 21 aislados obtenidos coincidieron con los perfiles que presentaron los suelos y con los distintos tiempos de muestreo en la biopila.



**Fig. 25.** DGGE con un gradiente de desnaturalizantes del 42-54% de las muestras de suelo y de los tiempos de muestreo de la biopila.

Carril 1: Suelo contaminado. Carril 2: Suelo contaminado seco. Carril 3: Tiempo 0 de la biopila (0 días). Carril 4: Tiempo 1 de la biopila (15 días). Carril 5: Tiempo 2 de la biopila (30 días). Carril 6: Tiempo 3 de la biopila (45 días). Carril 7: Tiempo 4 de la biopila (60 días).

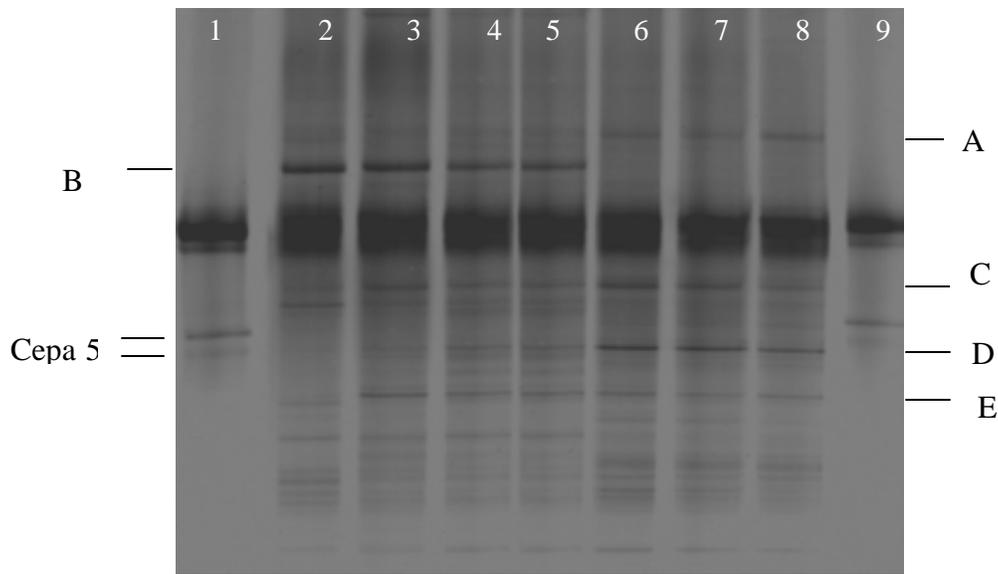
Con el propósito mejorar la resolución del gel, se realizó un DGGE con un gradiente de desnaturalizantes de 44 al 56%. Los amplicones de la región V6-V8 del 16S rDNA aplicados corresponden a las muestras de suelo y los diferentes tiempos de muestro de la biopila, en donde se encontraron perfiles de bandas más complejos al encontrarse una mayor cantidad de poblaciones como se muestra en la Fig. 26.

En el suelo contaminado se presentaron alrededor 15 poblaciones la mayoría de las cuales permanecieron también en el suelo contaminado seco. Se observó un incremento en el

número de bandas de las poblaciones el suelo contaminado con bagazo de caña con respecto al suelo contaminado, posiblemente incrementadas estas poblaciones por la microbiota introducida con el bagazo de caña. Las poblaciones más prominentes que se encontraron en las muestras son la A, B, C, D y E. La banda A, es una población prominente y constante durante el tratamiento de la biopila. La banda B es una población prominente, tanto en los suelos contaminados así como en la muestra del Tiempo 0 de la biopila. Se observó una disminución muy importante hasta que desaparece después de los primeros 15 días, posiblemente se ve afectada por algún producto del metabolismo de la comunidad microbiana de la biopila.

Los perfiles electroforéticos C y D se incrementan a los 30 días de haberse montado la biopila. Estas poblaciones pudieron ser favorecidas con el producto del metabolismo de algunas poblaciones degradadoras de hidrocarburos. El perfil genómico de la banda E es dominante y constante a lo largo de los 60 días del tratamiento y fue una población que se encontraba en el suelo contaminado seco posiblemente siendo una cepa que involucrada en la oxidación de los hidrocarburos anteriormente. Se encontró que el perfil electroforético de los aislados hidrocarbonoclastas no coincidieron con el patrón de bandas de los suelos contaminados, este fenómeno es similar a lo reportado por Colores y col. (2000) y Abed y col., (2002) en donde las poblaciones bacterianas responsables de la mineralización de los hidrocarburos son no cultivables. Además se correlaciona con la Fig. 7, en donde se ve la biodegradación de los HTP en el sistema de biopila.

Debido al medio de aislamiento utilizado se tiene un sesgo de las bacterias hidrocarbonoclastas aisladas en donde se utilizó hidrocarburos de bajo peso molecular como fuente de carbono, siendo que en el suelo se encuentran también hidrocarburos de alto peso molecular.



**Fig. 26.** DGGE con un gradiente de desnaturalizantes del 44-56% de los tiempos de la biopila. Carril 1: Ceba 5. Carril 2: Suelo Contaminado. Carril 3: Suelo contaminado seco. Carril 4: Tiempo 0 de la biopila (0 días). Carril 5: Tiempo 1 de la biopila (15 días). Carril 6: Tiempo 2 de la biopila (30 días). Carril 7: Tiempo 3 de la biopila (45 días). Carril 8: Tiempo 4 de la biopila (60 días). Carril 9: Ceba 5.

Así mismo, los suelos contaminados contienen una alta diversidad de microorganismos no cultivables y por tanto desconocidos, que pueden contribuir en la biodegradación. Sin embargo, es necesario poder aislar a los microorganismos para tener una exploración completa de los potenciales de cada una de estas poblaciones para degradar los diferentes compuestos del petróleo. La identificación de bandas de poblaciones dominantes permite enfocar esfuerzos hacia el aislamiento de los microorganismos viables pero no cultivables y conocer la actividad de cada uno de los miembros de la comunidad mediante la detección de genes funcionales que participen en el metabolismo de los hidrocarburos.

El uso de técnicas de biología molecular da información que permite la caracterización detallada *in situ* de las poblaciones microbianas en suelos contaminados, tanto a nivel de la composición poblacional como de los cambios bioquímicos, aumentando el entendimiento de la estructura y la función de estos ecosistemas microbianos del suelo, así como las interacciones que ocurren dentro de cada habitat. Los estudios de comunidades microbianas de suelo enfocan nuevos métodos que proporcionen información entre la relación filogenética y la diversidad funcional. El análisis de los fragmentos amplificados del 16S rDNA permite tener librerías de clonas del 16S rDNA, cuya posterior secuencia y análisis permitirá determinar la diversidad microbiana y realizar comparaciones filogenéticas.

Identificar a los miembros de la comunidad mediante la comparación de las secuencias de los fragmentos del 16S rDNA en bases de datos como RDP (Ribosomal Database Project).

Conocer el metagenoma (información genómica, evolutiva y funcional de comunidades bacterianas del suelo y de procesos de biorremediación) abre nuevas perspectivas en ecología microbiana teniendo un mayor conocimiento de la comunidad microbiana.

## 8. CONCLUSIONES.

- Se determinaron  $5.2 \times 10^6$  UFC/ g de suelo en el caso de bacterias totales y  $2.28 \times 10^7$  UDC/g de suelo, de bacterias hidrocarbonoclastas, en los suelos de Huimanguillo, Tabasco.
- En los suelos de Poza Rica, Ver., se cuantificaron  $7.54 \times 10^7$  y  $1.5 \times 10^7$  UFC/ g de suelo, de bacterias totales e hidrocarbonoclastas respectivamente.
- Se aislaron 7 cepas degradadoras de hidrocarburos del suelo de Huimanguillo, Tab. y 21 cepas degradadoras de hidrocarburos del suelo de Poza Rica, Ver.
- Se identificaron mediante API 20 NE, 13 cepas bacterianas de las 28 cepas aisladas.
- El análisis de PCR-REA de la región intergénica del operón *rrn* permitió tipificar las 21 cepas hidrocarbonoclastas en 18 grupos distintos.
- El mejor método de extracción de DNA de los suelos contaminados con hidrocarburos es el que utiliza Bead Beater-lisozima-SDS. El método de purificación más adecuado para DNA proveniente de suelos contaminados resultó ser el cloruro de cesio.
- Mediante el método de DGGE se pudieron identificar bandas dominantes de poblaciones bacterianas. La mayoría de las comunidades observadas por DGGE, probablemente están involucradas en la mineralización de hidrocarburos y son poblaciones no cultivables o que no pudieron ser aisladas con las técnicas utilizadas.
- En los diferentes tiempos de muestreo de la biopila analizada, se observaron cambios en el número y la intensidad de las bandas de los perfiles genómicos por DGGE. Esto podría sugerir un dinamismo y diversidad en la composición de las poblaciones bacterianas involucradas a través del tiempo.

## 9. BIBLIOGRAFIA.

Abed, R.; Safí, N.; Köster, J.; Beer, D.; El-Nahhal, Y.; Rullkötter, J.; García-Pichel, F. (2002). Microbial diversity of a heavily polluted microbial mat and its community changes following degradation of petroleum compounds. *Appl. Environ. Microbiol* 68: 1674–1683.

Agteren, van, M.H.; S. Keuning, D.B; Janssen. (1998). Handbook on biodegradation and biological treatment of hazardous organic compounds. Kluwer Academic Publishers.

Amann, R.I.; Ludwig, W.; Schleifer, K.H (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59:143-169.

Alexander, M. (1994). Biodegradation and Biorremediation. Academic Press. San Diego, California. U.S.A.

Atlas, R.M. (1981). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: and environmental perspective. *Microbiol. Rev.* 45: 180-209.

Atlas, R. M. (1991). Microbial hydrocarbon degradation-bioremediation of oil spills. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 52: 149-156.

Atlas, R.; M.; Bartha, R. (1998). Microbial Ecology Fundamentals and Applications. Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. Menlo Park, California, U.S.A.

Bajpai, R.; Zappi, M.E.; Gunnison. (1991). Additives for establishment of biologically active zones during *in situ* bioremediation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 450-465.

Baker, K. H.; Herson, D.S. (1994) Bioremediation. McGraw Hill Inc. U.S.A.

Barry, T. G.; Collieran, M.; Glennon, L. K.; Dunican, E.; Gannon F. (1991). The 16S/23S ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria. *PCR Methods Appl.* 1:51-56.

Bossert, Y.; Bartha R. (1984). The fate of petroleum in soil ecosystems. En: Petroleum Microbiology, Atlas, R. M. Ed. Macmillan, New York, U.S.A. pp. 435 – 474.

Bouwer, E. J.; Zehnder, A. J. B. (1993). Bioremediation of organic compounds-putting microbial metabolism to work. *Trends in Biotechnol.* 11: 360-367.

Bruce, K. D.; Hiorns, W. D.; Holban, J. L.; Osborn A. M.; Strike, P.; Ritchie, D. A. (1992). Amplification of DNA from populations of soil bacteria by using the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol* 58: 3413-3416.

Cerniglia, C. E. (1992). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation* 3: 351 – 368.

Chow, P.S. (1987). Petroquímica y sociedad. La ciencia desde México. Secretaría de Educación Pública. México, D.F. pp 15 – 22.

Colores, G. M.; Macur, R. E.; Ward, D. M.; Inskeep, W. (2000). Molecular Analysis of Surfactant Driven Microbial Population Shifts in Hydrocarbon Contaminated Soil. *Appl. Environ. Microbiol* 66: 2959-2964 .

- Cookson, J. T. Jr. (1995). *Bioremediation Engineering. Design and application*. McGraw Hill, Inc. U.S.A.
- Dagley, S. (1984). Microbial degradation of aromatic compounds. *Dev. Ind. Microbiology*. 25: 53-65.
- Dalton, H.; Stirling, D. I. (1982). Co-metabolism. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*. 297: 481-496.
- Eweis, J.B.; Ergas, S.J.; Chang, D. P. Y.; Schroeder, E.D. (1998). *Bioremediation principles*. McGraw Hill Inc., Series in Water Resources and Environmental Engineering, U.S.A.
- Faegri, A.; Torsvik V. L.; Goksoyr, J. (1977). Bacterial and fungal activities in soil: separation of bacterial and fungi by a rapid fractionated centrifugation technique. *Soil Biol Biochem*. 9: 105-112.
- Fernández, L. (1995). *Mecanismos d'halotolerance associats a la biodegradation d'un hidrocarbure (eicosane) chez une bactérie marine hydrocarbonoclaste*. Tesis doctoral. Université d' Aix Marseille II. Francia.
- Felske, A.; Engelen, B.; Nübel, U.; Backhaus, H. (1996). Direct ribosome isolation from soil to extract bacterial rRNA for community analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 : 4162-4167.
- Gibson, S. A.; Subramanian, V. (1984). Microbial degradation of aromatic hydrocarbons. En: *Microbial degradation of organic compounds*. Gibson, D.T.; Marcel, D. Eds. Marcel Dekker, Inc. New York, U.S.A. pp. 182-252.
- Gürtler, V.; V. A. Stanisich. (1996). New approaches to typing and identification of bacteria using 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology* 142: 3-16
- Hauben, L.; Vauterin, L.; Moore, E.R.; Hoste, B.; Swings J. (1999). Genomic diversity of the genus *Stenotrophomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 1749-1760.
- Holben E.E.; Jansson, J.K.; Chelm B.K.; Tiedje J.M. (1988). DNA probe method for detection of specific microorganisms in the soil bacterial community. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 703-711.
- Höfle, M. G. (1992). Bacterioplankton community structure and dynamics after large scale release of nonindigenous bacteria as revealed by low molecular weight RNA analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3387-3394.
- Jensen, M. A.; Webster J. (1993). Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction amplified ribosomal DNA spacer polymorphism. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 945-952.
- Kästner, M.; Breuer-Jammali.; Mahro, B. (1998). Impact of Inoculation protocols, salinity and pH on the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degrading bacteria introduced into soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:359-362.
- King, B. R.; Long, G. M.; Sheldon, J. K. (1992). *Practical Environmental Bioremediation*. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, U.S.A.
- Kostman, J. R.; Edling, T.D.; LiPuma, J.J.; Stull, T.L. (1992). Molecular epidemiology of *Pseudomonas cepacia* determined by polymerase chain reaction ribotyping. *J. Clin. Microbiol.* 30: (8), 2084-2087.

- Krsek, M.; Wellington E. M. H. (1999). Comparison of different methods for the isolation and purification of total community DNA from soil. *J. Microbiol. Meth.* 39: 1–16.
- Lamé, F.P.J.; Defize. P. R. (1993). Sampling of contaminated soil: sampling error in relation to sample size and segregation. *Environ Sci. Technol.* 27: 2035-2044.
- Leahy, J.G.; R.R. Colwell. (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol Rev.* 54: 305-315.
- Leefflang, P.; Smit, E. (1997). Use of the expand PCR System to amplify the 16S Ribosomal genes for the characterization of bacterial communities in Soil. *Biochemia.* 1: 16–18.
- Leff, L. G.; Dana, J. R.; McArthur, J. V; Shimkets, L. J.(1995). Comparison of methods of DNA extraction from stream sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1141-1143.
- Liesack, W.; Janssen, P.H.; Rainey, F.A.; Ward-Rainey, N.; Stackebrandt, E. (1997). Microbial diversity in soil: The need for a combined approach using molecular and cultivation techniques. En: *Modern soil Microbiology*, pp 375-438. Edited by. van Elsas J.D, Trevors J.T. and Wellington E.M.H. Marcel Dekker Inc., New York.
- Madsen, E. L (1991). Determining In Situ Biodegradation: Facts and Challenges. *Environ. Sci. Technol.* 25: 1663-1673.
- Marmur, J. (1963.). A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *Meth. Enzymol.* VI: 726-738.
- Mill, D. K.; Fitzgerald, K.; Litchfield, C. D.; Gillevet, P. M. (2003). A comparison of DNA profiling techniques for monitoring nutrient impact on microbial community composition during bioremediation of petroleum contaminated soils. *J. Microbiol. Meth.* 54: 57 – 74.
- Miller, D. N.; Bryant, J. E.; Madsen, E. L.; Ghiorse W. C. (1999). Evaluation and optimization of DNA and purification procedures for soil and sediment samples. *Appl. Environ Microbiol.* 65: 4715-4724.
- Morgan, P.; Watkinson, R.J. (1994). Biodegradation of components of petroleum. En: *Biochemistry of Microbial Degradation*. Ed. C. Ratledge, Kluwer Academic Publishers.
- Muñoz, A.; Rojas, N.; Roldán, T.; Zaragoza D.; Fernández, L. (2003). Adición de nutrientes y residuos agrícolas una alternativa para la limpieza de un suelo contaminado con lodos de perforación. *Memorias de X Congreso de Biotecnología e Bioingeniería*. Puerto Vallarta, Jalisco.
- Muyzer, G.; de Waal, E.C.; Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polimerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 695–700.
- Navarro E; Simonet, P.; Normand, P.; Bardin R. (1992). Characterization of natural populations of *Nitrobacter* spp. using PCR/RFLP analysis of the ribosomal intergenic spacer. *Arch. Microbiol.* 157: 107-115.

Normand, P.; Ponsonnet, C.; Nesme, X.; Neyra, M.; Simonet, P. (1996). ITS análisis of prokaryotes. En: Molecular Microbial Ecology Manual. Cap. 3.4.5.. Edit. A.D.L. Akkermans, J.D. van Elsas and F.J. de Bruijn, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. pp. 1-12.

Nübel, V.; Engelen, B.; Felske, A.; Snajdr, J.; Wieshuber, A.; Amann, R. I.; Ludwig, W.; Backhaus, H. (1996). Sequence of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. J. Bacteriol. 178: 5636-5643.

Nyer, E. K.; Fam, S.; Kidd, D. F.; Johnstii, F. J.; Palmer, P. L.; Boettcher, G.; Crossman, T. L.; Suthersan, S. S. (1996). *In situ* treatment technology. CRC Lewis Publishers, Inc. Boca Ratón, Florida, U.S.A. 63 -64.

Ogram, A.; Sayler G.S.; Barkay, T. (1987). DNA extraction and purification from sediments. J. Microbiol Meth. 7: 57 – 66.

Ogram A. (1988). The extraction and purification of microbial DNA from sediments. Ph. D. Dissertation, University of Tennessee, Knoxville.

Olsen R.A.; Bakken L.R. (1987). Viability of soil bacteria: optimization of plate-couing technique and comparason between total counts and plates counts within different size groups. Microbial Ecol. 13: 59-74.

Ovreas, L.; Torsvik, V. (1998). Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. Microbial Ecol. 36: 303-315.

Park, K. S.; Sims, R.C.; Dupont, R. R. (1990). Transformation of PAHs in soils systems. J. Environ. Eng. 116(3): 632-640.

Parkin, T.B. (1993). Spatial variability of microbial proceses in soil- a review. J. Enviro. Qual. 22: 409-417.

Petróleos Mexicanos. 2001. Informe 2001: Seguridad, salud y medio ambiente. Dirección Corporativa de Seguridad Industrial y Protección Ambiental.

Petróleos Mexicanos 2004. Informe sobre Seguridad, Salud y Medio Ambiente. Semana del Desarrollo Sustentable en PEMEX. <http://www.mural.com/negocios/articulo/38650/inico#inicio>

Pérez, A. B.; Loera, O.; Fernández, L.; Esparza, G. F.; Rodríguez, V. R. (2004). Biostimulation of microorganisms from sugar cane bagasse pith for the removel of weathered hydrocarbon from soil. Letters Appl. Microbiol. 38: p.373-377.

Quintero, R.; Castañon, R.; Solleiro, J. L. (1996) Biorremediación de suelos. ¿Oportunidades de desarrollo en México? En: Fronteras en Biotecnología y Bioingeniería. Galindo, E. Ed. Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C. México, D.F. pp. 301-308.

Ramírez, S. H.; Akkermans, W.L.; Akkermans, A.D.L. (1996). DNA extraction from actinorhizal nodules. Cap. 1.4.4. En: Molecular Microbial Ecology Manual. Edit. A.D.L. Akkermans, J.D. van Elsas and F.J. de Bruijn. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. Pp. 1-11.

Ramírez, S. H. (1999). Molecular Ecology of *Frankia* and other soil bacteria under natural and clorobenzoate stressed conditions. Tesis doctoral. Wageningen Agricultural University, The Netherlands.

- Ramírez, S. H.; Sessitsch, A.; M. De Vos, W.; Akkermans, D. L. (2000). Bacterial community and enrichment of Burholderia-like bacteria induced by chlorinated benzoates in a peat-Forest soil-microcosm. *System. Appl. Microbiol.* 23: 591-598.
- Ranjard, L.; Brothier, E.; Nazaret, S. (2000). Sequencing bands of ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints for characterization and microscale distribution of soil bacterium populations responding to mercury spiking. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 5334–5339.
- Reilly, K.A.; Banks, M.K.; Shwab A.P.(1996). Organic chemicals in the environment. *J. Environ. Qual.* 25: 212-219.
- Riser-Roberts, E. (1998). Remediation of petroleum contaminated soils. Biological, Physical and Chemical processes. Lewis Publishers, 542 pp.Boca Ratón, Florida, U.S.A.
- Roberts, R. J.; Macelis, D. (1999). REBASE-Restriction enzymes and methylases. *Nucleic Acids Res.* 27 (1): 312-313.
- Romanowski, G.; Lorenz, M. G.; Wackernagel, W. (1993). Use of polymerase chain reaction and electroporation of *Escherichia coli* to monitor the persistence of extracellular plasmid DNA introduced into natural soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 3438-3446.
- Rosenberg, E. R.; Legmann, A.; Kushmaro, R.; Taube, E.; Adler; Ron, E.Z. (1992). Petroleum bioremediation a multiphase problem. *Biodegradation.* 3: 337-350.
- Roszka, D. B.; Colwell, R. R. (1987). Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol. Rev.* 51: 365-379.
- Sayler, GS.; Hooper, S. W.; Layton, A. C.; Henry King J. M. (1990). Catabolism plamids of enviromental and ecological significance. *Microbiol. Ecol.* 19: 1-20.
- Sayler, G. S.; Fleming, J. T.; Applegate, B.; Werner, C. (1992). Nucleic acid extraction and analysis: detecting genes and their activity in the environment. In: Wellington, E. M. H.; van Elsas, J. D. (Eds.), *Genetic interactions among microorganisms in the natural environment*, Pergamon Press, pp 237 – 257.
- Smalla, K.; Cresswell, N.; Mendoca-Hagler, L.C.; van Elsas, J. D. (1993). Rapid DNA extraction protocol from soil for polymerase cañ reaction mediated amplification. *J. Appl. Bacteriol.* 74: 78-85.
- Singleton, Ian. (1994). Microbial metabolism of xenobiotics: fundamental and applied research. *J. Chem. Techn. Biotech.* 59: (1) 9-23.
- Simonet, P.; Grosjean M. C.; Misra, Nazaret S.; Cournoyer B.; Normand P. (1991). *Frankia* genus-specific characterization by polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3278-3286.
- Smit, M. R. (1994). The physiology of aromatic hydrocarbon degrading bacteria. En: *Biochemistry of microbial degradation*. C. Ratledge, Edit. A.D.L. Akkermans, J.D. van Elsas and F.J. de Bruijn, Kluwer Academic Publishers.
- Smit E.; Leeftang, P. K. (1997). Detection of shifts in microbial community structure and diversity in soil caused by copper contamination using amplified ribosomal DNA restriction analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* 23:249-261.

- Steffan R.J.; Atlas R. (1988). DNA amplification to enhance detection of genetically engineered bacteria in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2185-2191.
- Steffan, R. J.; Goksoyr, J.; Bej, A. K.; Atlas, R. M. (1988) Recovery of DNA from soils and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2908-2915.
- Stephen, J. R.; Chang, Y-J.; Gan, Peacock, A.; Pfiffner, S.; Barcelona M. J.; White, D.; Macnaughton, S. J. (1999). Microbial characterization of a JP-4 fuel contaminated site using a combined lipid biomarker-polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE)-based approach. *Environ. Microbiol.* 1: (3) 231-241.
- Suzuki, M. T.; Giovannoni, S. J. (1996). Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 625-630.
- Sylvia, D. M.; Fuhrmann, J.J.; Hartel, P. G.; Zuberer, D. A. (1998). Principles and applications of soil microbiology. Prentice Hall, Inc. New Jersey, U.S.A.
- Tan, K. H. (1994). Environmental Soil Science. Marcel Dekker, Inc., New York, U.S.A. 19-58.
- Tien, C. C.; Chao, C. C.; Chao W. L. (1999). Methods for DNA extraction from various soils: a comparison. *J. Appl. Microbiol.* 86: 937-943.
- Torsvik, V. L. (1980). Isolation of bacterial DNA from soil. *Soil Biol Biochem* 12: 15-21.
- Torsvik, V.; Goksoyr, J.; Daae, F.L.; Sorheim, R.; Michalsen, J.; Salte, K (1994). Use of DNA analysis to determine the diversity of microbial communities. In: Beyond the biomass, pp 39-48. Edited by K. Ritz, J. Dighton and K.E. Giller. British Soc. Soil Science Chichester.
- Torsvik, V.; Overas, L. (2002). Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Science* 5: 240-245.
- Trejo, M.; Quintero, R. (2000). Bioremediation of contaminated soils. En: Environmental Biotechnology and cleaner bioprocesses. Olguin, J. E. Sánchez, G.; Hernández, E. Eds. Taylor & Francis Limited. London, Great Britain. pp 179-189.
- Trevors, J. T.; Cook, S. (1992). Direct extraction of DNA from soil. *Microbial Rel* 1: 111-115.
- Tu. J.; Zilling, W. (1982). Organization of rRNA structural genes in the archaeobacterium *Thermoplasma acidophilum*. *Nucl. Acids Res* 10: 7231-7245.
- Uemori, T.; Asada, K.; Kato I.; Harasawa R. (1992). Amplification of the 16S-23S spacer region in rRNA operons of micoplasmata by the polymerase chain reaction. *Syst Appl Microbiol* 15: 181 -186.
- U.S. Environmental Protection Agency (EPA) (2001). Treatment Technologies for Site Cleanup: Annual Status Report. 10<sup>th</sup> Edition. Office of Solid Waste and Emergency Response. <http://www.epa.gov/TIO>.
- Van Elsas, J. D.; Smalla, K. (1995). Extraction of microbial community DNA from soils. *Molecular Microbial Ecology Manual* 1.3.3.:1-11. Edit. A.D.L. Akkermans, J.D. van Elsas and F.J. de Bruijn.
- Van Hamme, J. D.; Singh, A.; Ward, O. P. (2003). Recent Advances in Petroleum Microbiology. *Microbiol. and Molec. Biology Reviews.* 67: No. 4, 503-549.

Vogel, T. M. (1996). Bioaugmentation as a soil bioremediation approach. *Curr. Opin. Biotechnol.* 7: 311-316.

Wacket, L. P.; Brusseau, G.A.; Hueseholder, S.R.; Hansen, R. S. (1989). Survey of microbial oxygenase: Trichloroethylene degradation by propane-oxidizing bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 2960-2964.

Zhou, J.; Bruns, M. A.; Tiedje, J. M. (1996). DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 316- 322.