



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

CARACTERIZACIÓN DE LOS GENES
QUE CODIFICAN PARA LA ENZIMA CARDO
DE LA RUTA DE DEGRADACIÓN DE
CARBAZOL EN BACTERIAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A :

NELLY RAQUEL GONZALEZ ARENAS

**TUTORA: DRA. SYLVIE LE BORGNE LE
GALL**



2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



AGRADECIMIENTOS.

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias

Agradezco a la Dra. Sylvie Le Borgne por la Dirección y asesoramiento en el desarrollo del presente trabajo. Gracias Sylvie por tu apoyo, tu disposición y por tu amistad.

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Caracterización de los genes que codifican para la enzima
CARDO de la ruta de degradación de carbazol en bacterias."

Gracias a la Dra. Esperanza Martínez, Dra Mónica Rosenbueh y M. en C. Lourdes Loret, por sus enseñanzas en el taller de Microbiología Básica Agrícola y Ambiental y por su contribución en el mejoramiento de esta tesis.

Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Dra. Maria del carmen Watcher agradezco su colaboración en la revisión de este trabajo.

Director de Tesis
Propietario

Dra. Sylvie Le Borgne Le Gall *Le Borgne*

Propietario

Dra. Esperanza Martínez Romero *Esperanza Martínez*

Gracias a la Dra. Gladis Castorena por su apoyo en la parte experimental del presente trabajo.

Propietario

Dra. Mónica Teresa Rosenblueth Laguette *Mosenblueth*

Suplente

M. en C. Lourdes Loret y Sánchez *Loret Sánchez*

Suplente

Dra. María del Carmen Wachter Rodarte *Ma del Carmen Watch*

Gracias a los biólogos Guihdani Villalobos y Fernando González por su asesoramiento en la construcción de árboles filogenéticos.

Consejo Departamental de Biología

FACULTAD DE CIENCIAS



Gracias al proyecto D.00139/306/293 del Instituto Mexicano del Petróleo por el financiamiento y la beca otorgados para la elaboración de esta tesis.

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

UNIVERSIDAD DE ENSEÑANZA DE BIOLOGÍA

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco a la Dra. Sylvie Le Borgne por la Dirección y asesoramiento en el desarrollo del presente trabajo. Gracias Sylvie por tu apoyo, tu disposición y por tu amistad.

Gracias a la Dra. Esperanza Martínez, Dra Mónica Rosenbueth y M. en C. Lourdes Lloret, por sus enseñanzas en el taller de Microbiología Básica Agrícola y Ambiental y por su contribución en el mejoramiento de esta tesis.

Dra. Maria del carmen agradezco su colaboración en la revisión de este trabajo.

Gracias a la Dra. Gradys Castorena por su apoyo en los laboratorio de microbiología del IMP.

Gracias a los biólogos Guihdani Villalobos y Fernando Martínez por su asesoramiento en la construcción de árboles filogenéticos.

Biol. Eddy Cuauhtémoc Martínez gracias por tu apoyo en la revisión de el presente estudio.

Gracias al proyecto D.00139/306/293 del Instituto Mexicano del Petróleo por el financiamiento y la beca otorgados para la elaboración de esta tesis.

DEDICATORIAS.

A mis padres: Sabina y Julio, por el amor y la confianza que depositan en mí, gracias por su apoyo incondicional y por la libertad que me brindan. Para ustedes y por ustedes es este trabajo.

A mis hermanos: Oliva, Isabel, Laura y Julio, por sus enseñanzas y porque soy muy afortunada al tener cuatro amigos como ustedes en quienes puedo confiar.

A Dani, Vale, Vane, Citlali, Pepín y Alex por el corazón puro y sincero que poseen y por ser la alegría de la gran familia.

A mi muégano de la Fac. de Ciencias: Guihdani, Yajaira, Vanessa, Yesenia, Melina, Isabel, Marcia, Fabiola, Yazmín y Jaco. Por esos momentos de angustia y de felicidad que hemos compartido, por haberme mostrado el valor de la amistad. Los quiero mucho.

A mis amigos del IMP: Gustavo, Estela, Miguel Ángel, Oscar, Irlanda, Olivia, Pedro, Elía, Gladys, Ana, Eduardo y José Antonio porque su apoyo y su compañía hicieron de mi estancia en el IMP algo muy grato.

A todos los que contribuyeron en la elaboración de este trabajo, quizás con solo una sonrisa, a todos ustedes gracias.

*Mira que te mando a que te esfuerces
y seas valiente; no temas, ni desmayes,
porque El Señor, tu Dios, estará contigo
a donde quiera que vayas.*

Josué: 1:9

CONTENIDO.

Resumen.....	9
1. Introducción.....	10
2. Antecedentes.....	11
2.1. Composición del petróleo.....	11
2.1.1. <i>Compuestos nitrogenados en el petróleo</i>	12
2.1.2. <i>Carbazol</i>	14
2.2. El problema con la contaminación por nitrógeno.....	14
2.2.1. <i>Lluvia ácida</i>	15
2.2.2. <i>Envenenamiento por catalizadores en el proceso de refinación del crudo</i>	16
2.3. Eliminación de compuestos nitrogenados de fracciones de petróleo.....	17
2.3.1. <i>Hidrogenitrogenación (HDN)</i>	18
2.3.2. <i>Bionesnitrogenación (BDN)</i>	18
2.3.2.1. <i>Ruta bioquímica para la degradación del carbazol</i>	20
2.3.2.2. <i>Biología molecular de la degradación del carbazol</i>	23
2.3.2.3. <i>La enzima CARDO</i>	24
2.3.2.4. <i>Microorganismos degradadores de carbazol</i>	25
2.4. Los microorganismos como agentes de biorremediación en derrames de petróleo.....	26
2.5. Sistemática bacteriana.....	29
2.5.1. <i>El rRNA como cronómetro evolutivo</i>	29
2.5.2. <i>Las técnicas moleculares</i>	31
3. Justificación.....	33
4. Objetivos.....	34
5. Estrategia experimental.....	35
6. Materiales y métodos.....	36
6.1. Análisis bibliográfico.....	36
6.2. Alineamiento de secuencias.....	36
6.3. Diseño de oligonucleótidos.....	36
6.4. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.....	37

6.5. Purificación de DNA genómico y DNA de suelos.....	37
6.6. Purificación de plásmido de la cepa IMP5GC.....	37
6.7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	38
6.7.1. PCR de genes codificando para la actividad CARDO.....	38
6.7.2. PCR de genes 16S rDNA.....	41
6.8. Digestiones enzimáticas.....	41
5.9. Clonación del gen 16S rDNA.....	42
6.10. Clonación de genes que codifican para la enzima CARDO.....	44
6.11. Secuenciación de genes clonados.....	44
7. Resultados y discusión.....	46
7.1. Análisis de secuencias.....	46
7.2. Diseño de oligonucleótidos para la detección de genes de CARDO.....	50
7.3. Detección de genes <i>carA</i> por PCR.....	55
7.4. Secuenciación de genes <i>carA</i>	64
6.5. Identificación y filogenia de cepas degradadoras de carbazol.....	66
8. Conclusiones y perspectivas.....	76
9. Bibliografía.....	77

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.

Tabla 1. Composición elemental de diferentes crudos.....	13
Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en las PCR de genes de CARDO.....	39
Tabla 3. Condiciones de amplificación.....	40
Tabla 4. Programas de amplificación para los diferentes genes de CARDO.....	40
Tabla 5. Oligonucleótidos para la amplificación y secuenciación del gen 16S rDNA.....	41
Tabla 6. Reacción de ligación con el kit pGEM-T.....	42
Tabla 7. PCR para verificar la presencia del inserto en colonias blancas.....	43
Tabla 8. Microorganismos con actividad CARDO.....	46
Tabla 9. Tamaño de los fragmentos (pbs) esperados en la simulación de digestión de los genes CARDO de <i>P. resinovorans</i> CA10.....	57
Tabla 10. Análisis de secuencias de los genes <i>carAa</i> y <i>carAc</i> de la cepa IMP5GC realizadas por BLAST.....	65
Tabla 11. Resultados del análisis del gen 16S rDNA de la cepa IMP5GC realizado por BLAST.....	67
Tabla 12. Resultados del análisis del gen 16S rDNA de la cepa C2 realizado por BLAST.....	68
Tabla 13. Cepas degradadoras de carbazol reportadas en GeneBank.....	73
Figura 1. Ejemplos de compuestos aromáticos nitrogenados contenidos en el petróleo.....	12
Figura 2. Proceso de refinación del petróleo.....	14
Figura 3. Reacciones del azufre y nitrógeno que llevan a la formación de lluvia ácida.....	15
Figura 4. Formación de lluvia ácida.....	16
Figura 5. Ruta bioquímica para la degradación del carbazol.....	22
Figura 6. Ruta de degradación de carbazol seguida por <i>P. resinovorans</i> CA10. .	23
Figura 7. Subunidades de un ribosoma procariótico.....	29
Figura 8. Molécula de rRNA 16S.....	31
Figura 9. Organización de los genes <i>car</i> en tres cepas diferentes	47

Figura 10. Árboles filogenéticos de los genes <i>carAa</i> , <i>carAc</i> y <i>carAd</i>	48
Figura 11. Árboles filogenéticos de las proteínas CarAa, CarAc y CarAd.....	49
Figura 12. Oligonucleótidos tipo CA10 y tipo KA1 diseñados para detectar el gen <i>carAa</i> de CARD0.....	51
Figura 13. Oligonucleótidos C1036-C2495.....	51
Figura 14. Oligonucleótidos FAdCA10-RAAdCA10, diseñados para detectar el gen <i>carAd</i> de CARD0.....	52
Figura 15. Par de oligonucleótidos FAcCA-RAcCA diseñados para detectar el gen <i>carAc</i> de CARD0.....	53
Figura 16. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación del gen <i>carAa</i>	54
Figura 17. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación del gen <i>carAd</i> , basados en la secuencia de nucleótidos de la cepa <i>P. resinovorans</i> CA10.	54
Figura 18. Análisis de PCR realizada con oligonucleótidos tipo CA10 y DNA de <i>P. sutzeri</i> OM1.	55
Figura 19. PCR realizada con oligonucleótidos tipo CA10 y DNA de la cepa IMP5GC.	56
Figura 20. PCR realizada con oligonucleótidos FAdCA10-RAAdCA10.....	57
Figura 21. PCR para detectar el gen <i>carAd</i> en DNA de muestras de suelos contaminados con derrame de petróleo.	58
Figura 22. Obtención de plásmido de la cepa IMP5GC.	60
Figura 23. PCR para detectar genes CARD0 en plásmido de la cepa IMP5GC.....	60
Figura 24. Reacción de digestión enzimática del gen <i>carAa</i> de la cepa IMP5GC.....	61
Figura 25. Reacción de digestión enzimática del gen <i>carAd</i> de la cepa IMP5GC.	62
Figura 26. Reacción de digestión enzimática del gen <i>carAc</i> de la cepa IMP5GC.	63
Figura 27. Árbol filogenético de cepas degradadoras de carbazol.....	69
Figura 28. Árbol filogenético del género <i>Burkholderia</i>	72

RESUMEN.

El carbazol representa la mayor parte del nitrógeno contenido en el petróleo, su eliminación en los combustibles fósiles es necesaria ya que en los procesos de refinación envenena a los catalizadores, además de que genera agentes contaminantes que llevan a la formación de lluvia ácida. La biodesnitrógenación (BDN) es una alternativa para la eliminación biológica de estos compuestos, por lo que para detectar los genes que codifican para la primera enzima de la ruta de degradación de carbazol, 1-9a dioxigenasa (CARDO), se diseñaron varios pares de oligonucleótidos con base en secuencias reportadas. Se llevaron a cabo reacciones de PCR para amplificar los genes *carAa*, *carAc* y *carAd* (genes de CARDO) en diferentes cepas degradadoras de carbazol aisladas a partir de muestras de suelo contaminado con hidrocarburos. Teniendo los productos de amplificación se clonó cada uno de ellos para su posterior secuenciación y análisis. De las ocho cepas degradadoras de carbazol y cinco muestras de suelos analizadas, solo en la cepa denominada IMP5GC se logró detectar los genes *car* en preparaciones de DNA genómico y DNA plasmídico de esta cepa. Este resultado sugiere que los genes responsables de la dioxigenación angular en la ruta de degradación del carbazol para la cepa IMP5GC, podrían estar contenidos en plásmido. La secuenciación y análisis de estos productos indicaron que los genes *car* de la cepa IMP5GC comparten un 99% de identidad con los presentes en *Pseudomonas resinovorans* cepa CA10. La clonación y análisis del gen 16S rDNA de la cepa IMP5GC mostró que esta cepa presenta un 98% de identidad con *Burkholderia* sp. cepa IC138, por lo tanto la cepa IMP5GC pertenece al género *Burkholderia*. El análisis del gen 16Sr DNA de otra cepa degradadora de carbazol denominada C2, cuyos genes *car* no fueron detectados por PCR, reveló que pertenece al género *Pseudomonas* ya que comparte un 98% de identidad con cepas de *Pseudomonas saccharophila*. Sin embargo, es probable que los genes *car* de esta cepa no sean similares a los de *P. resinovorans* CA10 ya que no pudieron ser amplificados por los mismos pares de oligonucleótidos diseñados al iniciar este trabajo.

1. INTRODUCCIÓN.

El nitrógeno contenido en el petróleo contribuye a la formación de lluvia ácida al formarse óxidos de nitrógeno durante la quema de combustibles fósiles. En el proceso de refinación del petróleo, el nitrógeno, cuya principal fuente es el carbazol, provoca un bajo rendimiento por envenenamiento de los catalizadores utilizados en el hidrotreamiento de diferentes fracciones. La remoción del carbazol antes de la combustión y la refinación es entonces deseable y podría realizarse por métodos fisicoquímicos. Sin embargo, éstos resultan ineficientes y costosos además de que usan altas temperaturas y presiones que tienen un alto costo ambiental y energético. Una alternativa es la biodesnitrigenación (BDN), que propone el uso de microorganismos degradadores de carbazol capaces de utilizar dicho compuesto como fuente de carbono y nitrógeno.

La secuencia del gen 16S rRNA ha sido utilizada para establecer la relación filogenética entre los microorganismos procariontes (Woese, 1987). Esto ha permitido que sea utilizada como una herramienta molecular para aproximar su identificación. El análisis de la secuencia del gen 16S rRNA permite conocer la diversidad de microorganismos degradadores de carbazol u otros compuestos xenobioticos y en un futuro poder elegir el más adecuado para su aplicación en biorremedio, BDN del petróleo u otros procesos biotecnológicos. A la fecha se conocen alrededor de 13 géneros distintos de bacterias degradadoras de carbazol, se conocen los genes *car* de solo unas de ellas y se ha elucidado su vía de degradación del carbazol, donde la enzima carbazol-1,9a-dioxigenasa (CARDO), que cataliza la dioxigenación angular del carbazol, juega el papel central.

En el presente trabajo nos dimos a la tarea de identificar microorganismos autóctonos degradadores de carbazol así como los genes que codifican para la enzima CARDO, a través de métodos de Biología Molecular.

2. ANTECEDENTES.

2.1. Composición del petróleo.

El petróleo es una mezcla no homogénea de hidrocarburos con números de átomos de carbono y estructuras diferentes. De estos hidrocarburos dependen las distintas propiedades que determinan su posible uso como combustibles, lubricantes, ceras o solventes.

Las cadenas lineales de carbono asociadas a hidrógeno constituyen las parafinas; cuando las cadenas son ramificadas se tienen las isoparafinas; al presentarse dobles uniones entre los átomos de carbono se forman las olefinas; las moléculas en las que se forman ciclos de 5 carbonos son los naftenos, y cuando los ciclos presentan dobles uniones alternas (anillo bencénico de 6 carbonos) se tiene la familia de los aromáticos. El número de compuestos constituyentes del petróleo es muy grande, en un crudo determinado se han aislado hasta 277 compuestos de hidrocarburos. Además, en el petróleo hay hidrocarburos con presencia de átomos de azufre, nitrógeno y oxígeno formando familias de estos compuestos bien caracterizadas. Al aumentar el peso molecular de los hidrocarburos las estructuras se hacen verdaderamente complejas y difíciles de identificar químicamente con precisión. Un ejemplo son los asfaltenos que forman parte del residuo de la destilación al vacío, éstos compuestos están presentes como coloides en una suspensión estable que se genera por el agrupamiento envolvente de las moléculas grandes por otras cada vez menores para constituir un todo semicontinuo.

Los componentes útiles del petróleo se obtienen por destilación en las refinerías en donde los componentes no deseados: azufre, oxígeno, nitrógeno, metales, agua y sales se eliminan mediante procesos físico-químicos. Es importante la eliminación de estos compuestos ya que los combustibles que los contienen, al quemarse, liberan óxidos de azufre, nitrógeno y partículas metálicas que contribuyen a la contaminación atmosférica.

2.1.1. *Compuestos nitrogenados en el petróleo.* Los compuestos nitrogenados en el petróleo se clasifican en dos clases: los compuestos no-básicos, es decir sustancias aceptoras de electrones, como los pirroles, indoles y mezclas alquil derivadas del carbazol (Figura 1); y los compuestos básicos, donadores de electrones, derivados de piridina y quinolina (Tissot y Welte, 1984).

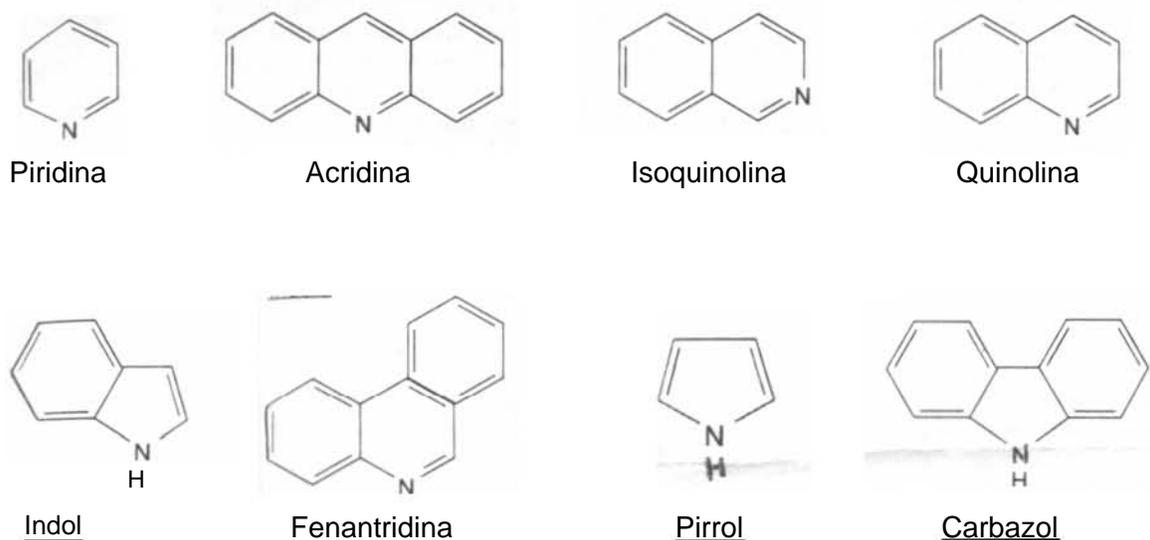


Figura 1. Ejemplos de compuestos aromáticos nitrogenados contenidos en el petróleo. Los compuestos no-básicos están subrayados.

El contenido de nitrógeno en el crudo varía de acuerdo a la fuente de extracción de éste, pero se estima que en promedio solamente 0.3 p/p corresponde a compuestos nitrogenados (Tabla 1), de los cuales del 70 al 75 % corresponden a compuestos no-básicos (Benedik *et al.*, 1998).

Tabla 1. Composición elemental de diferentes crudos.

%(p/p)	Maya pesado	Petróleo pesado estándar	Petróleo estándar
Carbono	84.7	86.68	84-87
Hidrógeno	10.4	11.3	11-14
Azufre	3.8	1.0	0-6
Nitrógeno	0.4	0.35	0-1
Oxígeno	Sin dato	Sin dato	0-2

Los compuestos nitrogenados se encuentran naturalmente presentes en las fracciones pesadas provenientes de la destilación primaria del petróleo crudo, estas fracciones son utilizadas en la producción de gasolina FCC (Craqueo Catalítico Fluidizado) y diesel (Figura 2). Estos compuestos están generalmente asociados a la formación de materiales gomosos, corrosión de equipos de refinación y se encuentran relacionados con problemas ambientales como la generación de óxidos de nitrógeno durante la quema de los combustibles que los contienen. En el proceso de hidrodesulfuración (HDS, conversión del azufre orgánico en sulfuro de hidrógeno usando altas temperaturas y presiones de hidrogeno molecular) los compuestos nitrogenados se han identificado como poderosos inhibidores, incluso en muy bajas concentraciones (Laredo *et al.*, 2002 y Benedik *et al.*, 1998). Es por ello que han llamado la atención de los principales grupos de investigación en catalizadores para HDS como lo veremos mas adelante.

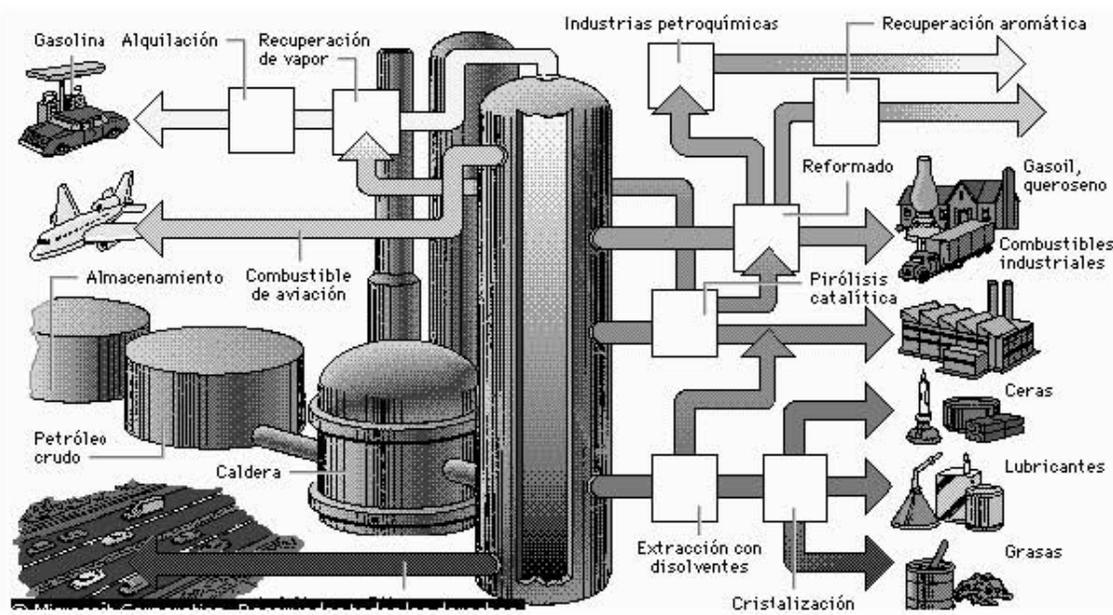


Figura 2. Proceso de refinación del petróleo.

2.1.2. *Carbazol*. El carbazol es el compuesto aromático nitrogenado no-básico más abundante en el petróleo. Es utilizado en la formulación de tintas, medicinas, insecticidas y plásticos entre otros usos, por lo cual se ha convertido en un contaminante ampliamente distribuido en el medio ambiente. Este compuesto ha sido encontrado en aire, sedimentos de ríos, aguas subterráneas y sitios contaminados con petróleo. Esta ubicuidad del carbazol ha causado preocupación ya que se sabe que tiene propiedades mutagénicas y tóxicas. No obstante que el carbazol no es por si mismo muy tóxico pero puede sufrir cambios químicos promovidos por radicales produciendo hidroxinitrocarbazoles que son potentes genotóxicos.

2.2. El problema con la contaminación por nitrógeno.

El uso de combustibles con alto contenido de nitrógeno causa tanto problemas ambientales al contribuir en la formación de la lluvia ácida, como problemas en la refinación del petróleo.

2.2.1. *Lluvia ácida*. La mayor fuente de contaminación atmosférica es el uso de combustibles fósiles como energéticos; petróleo, gas y carbón que son usados en cantidades enormes del orden de millones de toneladas por día y los desechos de su combustión se arrojan a la atmósfera en forma de polvo, humo y gases, siendo estos últimos peligrosos para el medio ambiente.

Los principales gases liberados a la atmósfera derivados de la combustión son los óxidos de nitrógeno (NO_x) y anhídrido sulfuroso (SO₂). Estos compuestos y sus derivados ácidos (Figura 3) pasan del aire a las nubes mediante la solubilización en las gotas de agua que las integran, formándose así al momento de la precipitación la lluvia ácida cuyo pH es menor a 5.5.

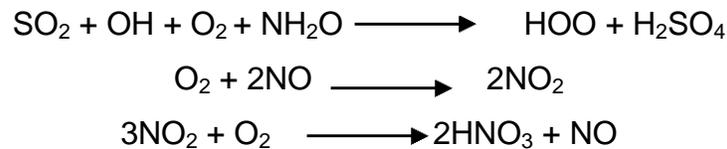


Figura 3. Reacciones del azufre y nitrógeno que llevan a la formación de lluvia ácida.

Los principales compuestos nitrogenados que contaminan la atmósfera son el monóxido de nitrógeno (NO) y el dióxido de nitrógeno (NO₂), estos participan en la formación de contaminantes secundarios del aire (Figura 4), la mayoría de los NO_x se convierten finalmente en ácido nítrico (HNO₃) y nitratos (NO₃), en esta forma se depositan sobre la tierra o en el mar como consecuencia de las lluvias o se depositan como macropartículas causando así la acidificación de agua y suelo.

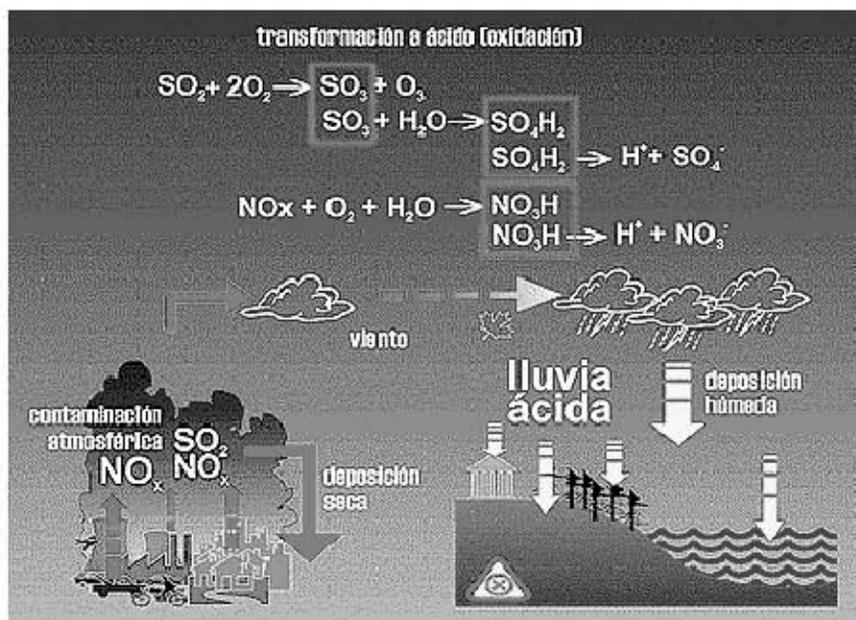


Figura 4. Formación de lluvia ácida.

2.2.2. *Envenenamiento de catalizadores en el proceso de refinación del petróleo.* La presencia de compuestos aromáticos nitrogenados puede conducir al envenenamiento de los catalizadores utilizados en el proceso de refinación del petróleo, estos compuestos bloquean el sitio activo de los catalizadores, lo que lleva a disminuir en forma significativa la eficacia de la refinación de ciertas fracciones.

Tradicionalmente se ha considerado que las especies nitrogenadas básicas son las causantes del envenenamiento de los catalizadores empleados en la eliminación del azufre en combustibles, en el proceso de hidrodesulfuración (HDS). La caracterización de la reactividad de especies nitrogenadas en el proceso de hidrodesnitrogenación (HDN) ha mostrado que, en general, las especies básicas (anilina, quinolina, benzoquinolina y sus derivados) son más fácilmente eliminadas durante la HDN, que las especies no-básicas (indol, carbazol y sus derivados). También es muy claro que la presencia de grupos metilo en la vecindad del heteroátomo del anillo de carbazol, inhibe poderosamente el proceso de HDN (Shin *et al.*, 2000). La resistencia de las

especies no-básicas a la HDN se debe a una velocidad de reacción muy baja en la cual se genera un producto que es, invariablemente, una especie básica. Esto convierte a la remoción de las especies no-básicas, en el paso limitante del proceso de HDN. Por esta razón, es necesario trabajar en el desarrollo de catalizadores para HDN, capaces de modificar a los compuestos básicos y además, que permitan una modificación más rápida de los compuestos nitrogenados no-básicos (Bej *et al.*, 2001).

Durante el proceso de desintegración catalítica de fracciones de petróleo, el carbazol es transformado a compuestos nitrogenados básicos que se adsorben sobre los catalizadores inhibiendo así su acción. Se ha comprobado experimentalmente que a altas concentraciones de nitrógeno en las fracciones que se utilizan para producir gasolina, el rendimiento de obtención de gasolina se reduce significativamente. La empresa Petrolite estimó que con la eliminación del 90 % de compuestos nitrogenados, se podría obtener un 20 % más de gasolina en procesos de refinación de alto volumen (Benedik *et al.*, 1998). Además, el carbazol por sí mismo, actúa como un potente inhibidor del proceso de HDS (Benedik *et al.*, 1998; Laredo *et al.*, 2001).

2.3. Eliminación de compuestos nitrogenados de fracciones de petróleo.

Actualmente la desnitrógenación del petróleo está enfocada a la degradación de compuestos no-básicos, principalmente carbazoles y sus alquil derivados ya que estos representan la mayor proporción de nitrógeno contenido en el petróleo, además de que son los más difíciles de eliminar.

Los compuestos nitrogenados del petróleo pueden ser eliminados usando métodos físicos como presión y temperaturas muy altas, pero estos procesos requieren de un gran gasto energético y son muy laboriosos, además de que

durante el proceso también se modifican muchos otros compuestos de importante valor energético (Benedik *et al.*, 1998).

También existen métodos químicos como la extracción por solventes para la remoción de los compuestos no-básicos (carbazol), Con éste método se logra disminuir considerablemente la concentración de nitrógeno en el petróleo. Sin embargo, aproximadamente el 30% del crudo es retenido en la fase de extracción por lo que éste método también resulta ineficiente en cuanto a pérdida del energético.

2.3.1. Hidrodesnitrogenación. El hidrotratamiento es efectivo en la remoción de azufre, produciendo petróleo con muy bajas concentraciones de este compuesto, pero no sucede así en la eliminación del nitrógeno pues resulta un proceso difícil de llevarse a cabo; la remoción del átomo de nitrógeno contenido en compuesto aromático ocurre vía hidrogenación del anillo aromático, seguido de la ruptura del enlace C-N y finalmente la eliminación de NH₃. El número de pasos para la remoción del nitrógeno y la débil interacción de los compuestos nitrogenados neutros con los catalizadores tienden a formar derivados del carbazol, que son muy resistentes en la HDN. En éste proceso se consume más hidrógeno por mol de carbazol o compuesto nitrogenado que en la HDS, y más hidrogeno que el nitrógeno removido, teniendo así que ésta es una de las reacciones más costosas económicamente hablando (Bressler y Murray, 2002).

2.3.2. Biodesnitrogenación. En cuanto a procesos biotecnológicos empleados en la refinación del petróleo el más estudiado ha sido la biodesulfuración (BDS), en este campo se han aislado microorganismos capaces de degradar selectivamente el átomo de azufre de compuestos azufrados como los dibenzotiofenos ya que es importante conservar el poder catalítico del combustible, en tanto que en la BDN, la investigación se ha enfocado a microorganismos degradadores de compuestos nitrogenados pero no selectivos al

átomo de nitrógeno, es decir microorganismos que puedan llevar a cabo la mineralización completa de éstos compuestos.

La BDN del petróleo ha sido considerada como una posible alternativa complementaria al proceso de HDN, debido a los problemas que los compuestos nitrogenados producen en los combustibles y a la ineficiencia ya discutida del proceso de HDN para eliminar los compuestos nitrogenados no-básicos. Algunos grupos de investigadores han trabajado en el aislamiento de microorganismos capaces de utilizar compuestos como la quinolina y el carbazol, el objetivo principal de estos trabajos ha sido la remoción de este tipo de compuestos en suelos contaminados, esto es, para un proceso de biorremediación. Se ha identificado la necesidad de hacer BDN en combustibles fósiles por las dificultades tecnológicas que representan su presencia en estos productos si se desean emplear como materia prima para la manufactura de combustibles ligeros (Benedik *et al.*, 1998).

El posible uso de microorganismos aun no es de común aceptación en procesos de refinación debido a la gran diversidad de compuestos químicos presentes en el petróleo, la toxicidad de los solventes utilizados y la especificidad de las cepas en la degradación del sustrato (Riddle *et al.*, 2003). Sin embargo, se han aislado bacterias capaces de utilizar al carbazol como única fuente de carbón, energía y nitrógeno.

Los microorganismos que degradan carbazol muestran una limitada especificidad de sustratos, son capaces de degradar otros hidrocarburos aromáticos nitrogenados similares en tamaño molecular como las quinolinas pero son incapaces de degradar otros policíclicos aromáticos (Finnerty *et al.*, 1983).

Kirimura y colaboradores realizaron estudios con células en reposo de *Sphingomonas*, en un sistema de dos fases (agua/aceite) para la degradación del carbazol, encontrando que 500mg/L de carbazol se degradaron completamente en

3 horas, con acumulación transitoria de amoniaco durante la experimentación (Kirimura *et al.*, 1999). Éstos mismos autores evaluaron a *Sphingomonas* sobre otros sustratos estructuralmente relacionados: dibenzofurano, fluoreno y bifenilo, encontrando que esta cepa es selectiva al carbazol ya que no degrado ninguno de estos compuestos.

El uso de microorganismos puede ser útil para disminuir la inhibición o el envenenamiento de los catalizadores en las diferentes etapas de la refinación. En el caso del carbazol, este puede ser completamente metabolizado hasta CO₂, biomasa y amonio o convertido a ácido antranílico u otros intermediarios que pueden ser fácilmente extraídos del petróleo.

2.3.2.1. Ruta bioquímica para la degradación del carbazol. La remoción inicial del nitrógeno en distintos compuestos nitrogenados es normalmente llevada a cabo por oxigenasas, enzimas que adicionan átomos de oxígeno a diferentes moléculas orgánicas, estas enzimas funcionan bajo condiciones de pH y temperaturas moderadas produciendo compuestos hidroxilados.

Las dioxigenasas adicionan dos átomos de oxígeno molecular en una molécula de sustrato mientras que las monooxigenansas adicionan solo un átomo de oxígeno, la mayoría de estas adicionan un solo grupo hidroxilo a un sustrato previamente hidroxilado para generar productos dihidroxilados.

Las dioxigenasas que forman cis-dioles están compuestas de dos o tres componentes y forman cis-dihidrodiol y ácido carboxílico cis-dioles, respectivamente. Las proteínas de tres componentes están compuestas de una flavoproteína, una ferredoxina, y una oxigenasa terminal, comúnmente las dioxigenasas tienen una amplia especificidad de sustrato (Mason, 1988). Las oxigenasas juegan un papel importante en la degradación de compuestos nitrogenados como lo veremos más adelante en la ruta metabólica de degradación del carbazol.

La vía metabólica propuesta para la degradación del carbazol, basada en el análisis de metabolitos en el género bacteriano *Pseudomonas*, muestra que la vía de degradación inicia con dioxigenasas especiales que llevan a cabo una dioxigenación angular para formar vía un intermediario inestable de cis-dihidrodiol al 2'-aminobifenil-2,3-diol, el cual es seguido del rompimiento del anillo aromático por vía *meta* para formar ácido 2-hidroxi-6-oxo-6-(2 aminobifenil) hexa-2,4-dieneoico. Este intermediario es hidrolizado para formar 2-hidroxi-4-pentenoato y ácido antranílico, los cuales entran al ciclo de los ácidos tricarbóxicos para convertirse en catecol o triptofano (Figura 5) (Ouchiyama *et al.*, 1993). La dioxigenación angular, necesaria para degradar al carbazol, no es común, lo cual explica la resistencia de este compuesto al ataque microbiano.

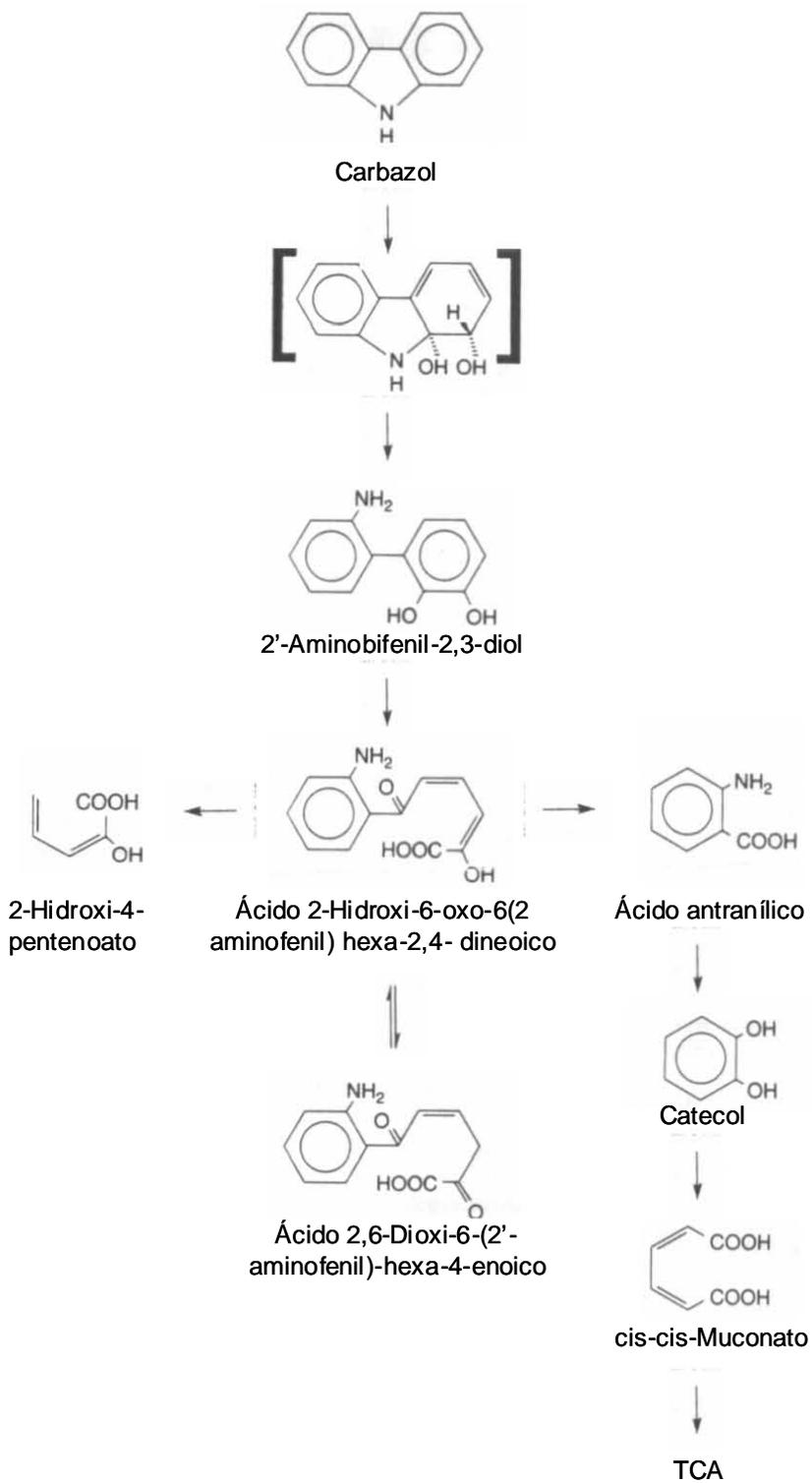


Figura 5. Ruta bioquímica para la degradación del carbazol seguida por *Pseudomonas resinovorans* CA10 (Ouchiyama *et al.*, 1993).

2.3.2.2. *Biología molecular de la degradación del carbazol*. Uno de los microorganismos degradadores de carbazol que ha sido más estudiado es *Pseudomonas resinovorans* CA10. Este microorganismo utiliza el carbazol mediante tres reacciones enzimáticas principales (Figura 6) codificadas en un mismo operón. El paso inicial consiste en una dioxigenación que produce un compuesto dihidroxilado en el que se rompe el anillo central que contiene el carbazol. En un segundo paso, el anillo dihidroxilado se rompe por un mecanismo de *meta*-ruptura para formar ácido 2-hidroxi-6-oxo-6-(2'-aminofenil)-hexa-2,4-dienoico, el cual es posteriormente hidrolizado para formar ácido antranílico y otros intermediarios que también son degradados por otros genes codificados por el grupo de genes *car* y sus regiones vecinas. Este grupo de genes, consta de 10 genes *car* (*carAaAaBaBbCAcAdDFE*) aunque la región completa (44.3 kb) consta de 32 marcos de lectura abierta que incluye los genes encargados de la degradación del antranilato (Nojiri *et al.*, 2001) y están ubicados en el plásmido pCAR1 el cual tiene un tamaño de 199,035 pb (Maeda *et al.*, 2003)

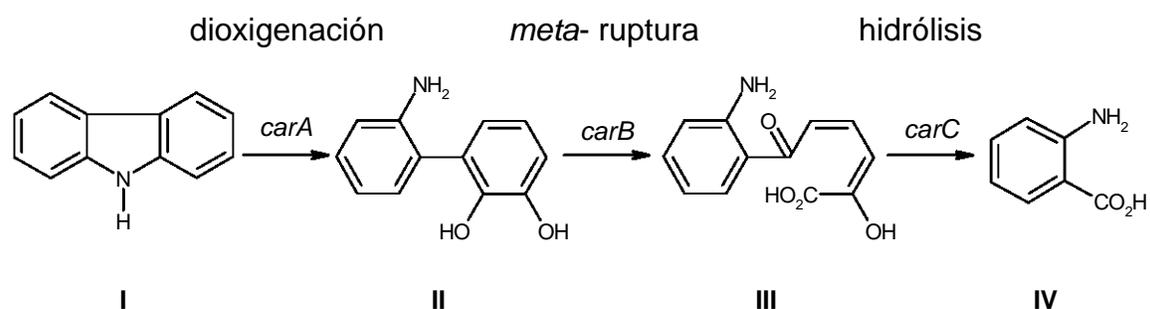


Figura 6. Ruta de degradación de carbazol seguida por *P. resinovorans* CA10. Genes: *carA*, carbazol-1,9a-dioxigenasa; *carB*, 2'-aminobifenil-2,3-diol 1,2-dioxigenasa; *carC*, ácido 2-hidroxi-6-oxo-6-(2'-aminofenil)-hexa-2,4-dienoico hidrolasa. Compuestos: I, carbazol; II, 2'-aminobifenil-2,3-diol; III, ácido 2-hidroxi-6-oxo-6-(2'-aminofenil)-hexa-2,4-dienoico; IV, ácido antranílico (Sato *et al.*, 1997).

2.3.2.3. *La enzima CARDO.* La primera enzima de la vía, CarA, es la carbazol-1,9a-dioxigenasa, también conocida como CARDO. Esta enzima es un sistema de multicomponentes formado por los productos de los genes *carAa*, *carAc* y *carAd* (que por estudios de homología se considera que se trata de una dioxigenasa terminal, una ferredoxina y una ferredoxina reductasa, respectivamente), aunque en *Escherichia coli* se ha visto que el producto de *carAc* no es necesario para la actividad CARDO. El gen *carAa* se encuentra repetido de manera contigua y su secuencia deducida de aminoácidos presenta 30% de identidad con dioxigenasas terminales. Contiene la secuencia consenso tipo Rieske (CXHX₁₆₋₁₇CXXH), de proteínas ligantes de hierro-azufre [2Fe-2S]. También contiene la secuencia consenso (GX₃₋₄DX₂HX₄₋₅H) de unión a un átomo de hierro en el sitio de activación del oxígeno. El gen *carAc* presenta una identidad de aproximadamente un 58% con los componentes de ferredoxina de otras dioxigenasas, además de también contener la secuencia de unión de hierro-azufre. El gen *carAd* presenta una secuencia de unión a hierro-azufre, típica de plantas (CX₄CXXCX₂₉C) localizada cerca del extremo N-terminal de la proteína y presenta 53% de identidad con las ferredoxina reductasas que forman parte de algunas monooxigenasas y dioxigenasas (Sato *et al.*, 1999). Los sistemas de dioxigenasas conocidos están formados por dos tipos de cadenas, una grande (α) y una pequeña (β), sin embargo CARDO ha demostrado que funcionalmente se trata de una sola proteína aunque podría tratarse de un homodímero (Nojiri *et al.*, 1999).

La enzima carbazol 1,9a-dioxigenasa, CARDO, de *P. resinovorans* CA10 cataliza la dioxigenación angular del carbazol, aunque también tiene la capacidad de catalizar la oxigenación de otro tipo de moléculas, como dibenzofurano y dibenzo-*p*-dioxina. De hecho, es activa sobre una gran variedad de sustratos como son el xanteno, fenoxatina, dibenzotiofeno (DBT), naftaleno, antraceno, fenantreno, fluoreno, fluoranteno y bifenilo.

La dioxigenación catalizada por CARDO ocurre en la posición angular adyacente a un átomo de oxígeno o nitrógeno, pero no adyacente a un átomo de azufre o carbono. Esta enzima también produce la sulfoxidación de DBT a dibenzotiofen-5-óxido como reacción principal (Nojiri *et al.*, 1999).

Es claro que CARDO tiene la capacidad de catalizar reacciones muy interesantes desde la perspectiva de la industria petrolera. Tener un microorganismo con la actividad CARDO, sin el resto de la vía de mineralización del carbazol, permitiría eliminar a este compuesto de las corrientes que alimentan los procesos de desintegración, HDN e HDS.

2.3.2.4. Microorganismos degradadores de carbazol. Se han descrito varios microorganismos capaces de metabolizar compuestos aromáticos nitrogenados del petróleo, entre ellos se encuentran algunas especies de *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Commamonas* y *Sphingomonas* (Benedik *et al.*, 1998; Schneider *et al.*, 2000; Sugaya *et al.*, 2001). Aunque Inoue (Inoue *et al.*, 2005) ha reportado microorganismos degradadores clasificados dentro de los géneros *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Erythrobacter*, *Nocardioides*, *Stenotrophomonas* y *Marinobacterium*.

Es evidente que la mayoría de las bacterias conocidas como degradadoras de carbazol son bacterias gram-negativas sin embargo, el género *Nocardioides* representa la excepción, pues la cepa IC177 de este género es una bacteria gram-positiva que ha sido reportada como degradadora de carbazol.

La ruta de degradación seguida por las cepas de los diferentes géneros bacterianos aún no ha sido estudiada (a excepción de *P. resinovorans* CA10) pero si se han encontrado diferencias a nivel de organización de genes *car*. Se han encontrado tres variantes, aquellos representados por la bacteria *P. resinovorans* CA10, los correspondientes a *Sphingomonas* sp. CB3 y los representados por la cepa *Sphingomonas* sp. KA1. Estudios realizados por medio de hibridación

muestran que la mayoría de las cepas degradadoras de carbazol posee genes similares a los presentes en *P. resinovorans* CA10, solo las cepas KA1 y CB3 muestran claras diferencias.

Sphingomonas sp. KA1 posee un plásmido catabólico llamado pCAR3 que contiene los genes *carAaBaBbCAc* (Habe *et al.*, 2002) que también codifican para carbazol 1,9a-dioxigenasa, sin embargo, ésta presenta una ferredoxina del tipo putidaredoxina que media el transporte de electrones de reductasas no identificadas a oxigenasas terminales, a diferencia de *P. resinovorans* CA10 que posee una ferredoxina de tipo Rieske.

Sphingomonas sp. CB3 es otra bacteria degradadora de carbazol diferente a las mencionadas anteriormente, tiene una carbazol dioxigenasa única, codificada por los genes *carAa*, *carAb*, *carAc* y *carAd*. La carbazol 1,9a-dioxigenasa de la cepa CA10 ha sido clasificada como dioxigenasa clase III, mientras que su pariente oxigenasa en la cepa CB3 pertenece a la clase IIB (Shepherd, 1998).

2.4. Los microorganismos como agentes de biorremediación en derrames de petróleo.

En la actualidad, uno de los problemas del medioambiente más preocupantes es el de los derrames de petróleo ya que estos causan grandes desastres ecológicos, y económicos.

Teniendo en cuenta que la composición del petróleo es variable, el riesgo ambiental que suponen los derrames de petróleo dependerá de la naturaleza y proporción de los diferentes componentes de este, así, las características físico-químicas del crudo, su persistencia y biodegradabilidad en un determinado ambiente son determinantes para evaluar el impacto de un vertido de petróleo en un ecosistema (Colwell y Walker, 1977).

El impacto ecológico de un vertido accidental de petróleo incluye efectos a corto, medio y largo plazo, cuando esto ocurre, el petróleo puede ser dispersado y degradado de manera natural por los microorganismos presentes en el sitio contaminado al cabo de varios años. Diversas investigaciones han mostrado que la eliminación natural es muy lenta y los depósitos de petróleo permanecen durante varios años, de manera que la recuperación de los ecosistemas puede tardar. Éste hecho ha impulsado el desarrollo de numerosas estrategias con el objetivo de mitigar los efectos de la contaminación por derrames o vertidos de petróleo y acelerar el proceso de recuperación de los ambientes dañados (Atlas,1981). Una posibilidad es usar una combinación de métodos físicos y químicos los cuales son especialmente útiles en situaciones graves; aunque, pueden ser procesos caros cuando la zona afectada es muy extensa. Otra alternativa es la utilización de métodos biológicos que implican la utilización de microorganismos ya sea en cultivo axénicos o en forma de consorcios en los llamados procesos de biorremedio (Korda *et al.*, 1997; Swannell *et al.*, 1996).

La biorremediación se basa en la existencia o introducción de microorganismos capaces de transformar los hidrocarburos convirtiéndolos en productos no tóxicos los cuales pueden integrarse a los ciclos biogeoquímicos naturales. El éxito de la técnica depende de la existencia, en el lugar contaminado, de microorganismos con las capacidades metabólicas apropiadas, así como de concentraciones adecuadas de oxígeno, nutrientes y de las características del petróleo vertido (Leahy y Colwell, 1990).

Cuando es aplicable, el biorremedio puede ser una opción rentable para reestablecer la calidad del medio ambiente. No obstante, y a pesar de la relativamente larga historia de la investigación en el campo de la biorremediación de derrames de petróleo, esta continúa siendo una disciplina empírica, en la cual muchos de los factores biológicos que controlan los procesos no han sido adecuadamente comprendidos (Korda *et al.*, 1997).

Los derrames de petróleo tienen un profundo impacto sobre la estructura de las comunidades microbianas naturales, el cual se ve reflejado en la reducción de la diversidad, cantidad de biomasa y de su actividad (Macnaughton *et al.*, 1999). Se ha visto que en los ambientes sometidos a una contaminación crónica tienden a predominar los microorganismos capaces de utilizar los compuestos contaminantes o con capacidad de sobrevivir en su presencia; pero que bajo condiciones normales dichos grupos de microorganismos están presentes a bajas concentraciones (Kanaly *et al.*, 2000).

A la fecha se han identificado numerosas cepas bacterianas tanto de ambientes marinos como terrestres capaces de degradar diferentes hidrocarburos incluyendo al carbazol y otros compuestos nitrogenados, muchas de estas usan un número limitado de compuestos hidrocarbonados como fuente de carbono y por eso pueden ser consideradas como especialistas (Engelhardt *et al.*, 2001). No obstante también se han aislado cepas que no presentan esta especialización.

El conocimiento de la diversidad microbiana es importante para evaluar el impacto que supone una perturbación ecológica como la asociada a los derrames de petróleo, así como para determinar que poblaciones microbianas pueden estar implicadas en la degradación de hidrocarburos. Las metodologías tradicionales utilizadas para el estudio de los procesos de biorremediación consistían en la utilización de métodos microbiológicos convencionales para la obtención de cultivos axénicos con capacidad de degradar hidrocarburos, sin embargo se ha enfatizado la necesidad de utilizar métodos de biología molecular para conocer la diversidad bacteriana en un sitio perturbado (Amann, 1995). Las aproximaciones basadas en el análisis del gen 16S rDNA han revelado una enorme diversidad en los ambientes naturales y contaminados facilitando la identificación de aquellos microorganismos útiles en la biorremediación.

2.5. Sistemática bacteriana.

Los cronómetros moleculares abarcan un buen número de constituyentes celulares, casi todos los marcadores quimiotaxonómicos pueden ser utilizados en este sentido. La química de la membrana o pared celular y la comparación de los sistemas de transporte de electrones son los ejemplos más sobresalientes. Sin embargo, la evaluación cronológica de las relaciones filogenéticas requiere la utilización de moléculas con contenido informativo codificado, por lo que un cronometro molecular ha de ser un ácido nucleico o una proteína.

La hipótesis del cronómetro molecular asume que el número de cambios de las secuencias de estas moléculas es equivalente al tiempo transcurrido desde la divergencia de dos líneas evolutivas que comparten la molécula.

Para determinar las verdaderas relaciones evolutivas entre especies, es esencial que se elijan las moléculas adecuadas para el estudio de la secuencia. Esto es importante por varias razones. En primer lugar ha de ser una molécula distribuida universalmente en el grupo elegido para su estudio. Además, ha de realizar una función homóloga en cada organismo (Madigan *et al.* 1999). La longitud de la secuencia debe ser suficiente para que las estimaciones de semejanza tengan validez estadística, la tasa de cambio, al menos en una parte de la molécula, debe ser suficientemente baja como para permitir la detección de las relaciones evolutivas lejanas.

La comparación de secuencias de ácidos nucleicos ha demostrado ser uno de los métodos más útiles para inferir la historia filogenética de los organismos.

2.5.1. Los RNAs ribosomales como cronómetro evolutivo. Los ribosomas fueron vistos por primera vez por Albert Claude a finales de los años 30s, él los observó con microscopia de campo oscuro en homogenados de tejido animal. A mediados de los 50s George Palade los observó también en células de tejido animal pero mediante microscopía electrónica, y en 1955 Paul Zamecnik demostró

que los ribosomas son el sitio de síntesis de las proteínas en las células (Dams *et al.*, 1988).

El ribosoma en *E. coli* consisten de dos tercios de RNA y un tercio de proteína, posee un coeficiente de sedimentación de 70S y se compone de dos subunidades desiguales en tamaño con valores de sedimentación (Svedbergs) de 30S y 50S. La subunidad pequeña (30S) consiste de una molécula de rRNA 16S y 21 proteínas diferentes, mientras que la subunidad grande (50S) contiene una de rRNA 5S y otra de rRNA 23S, con 31 proteínas diferentes (Figura 7). El 16S de *E. coli* consiste de 1542 nucleótidos, de los cuales el 46% están apareados entre sí (Figura 8). Esta molécula posee 4 dominios en su estructura secundaria (Voet, D. y Voet, J., 1995).

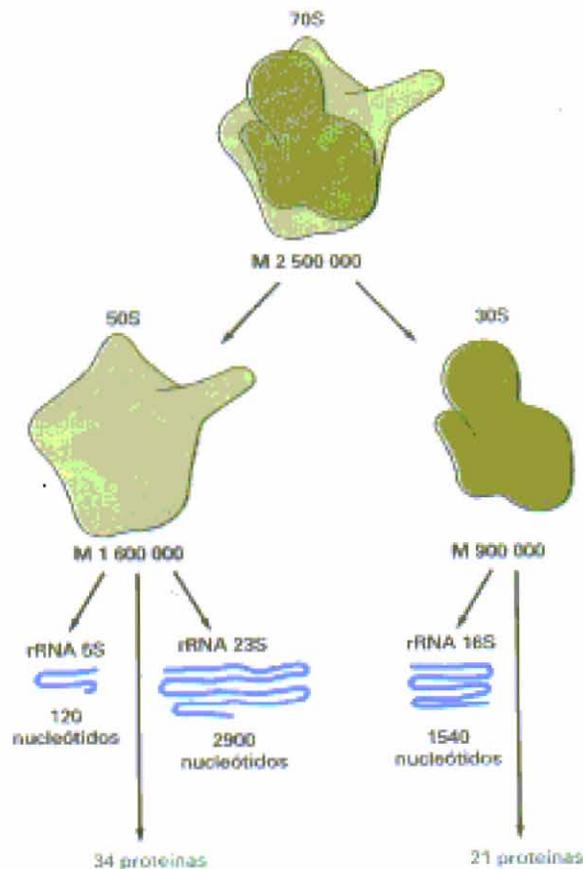


Figura 7. Subunidades de un ribosoma procariótico.

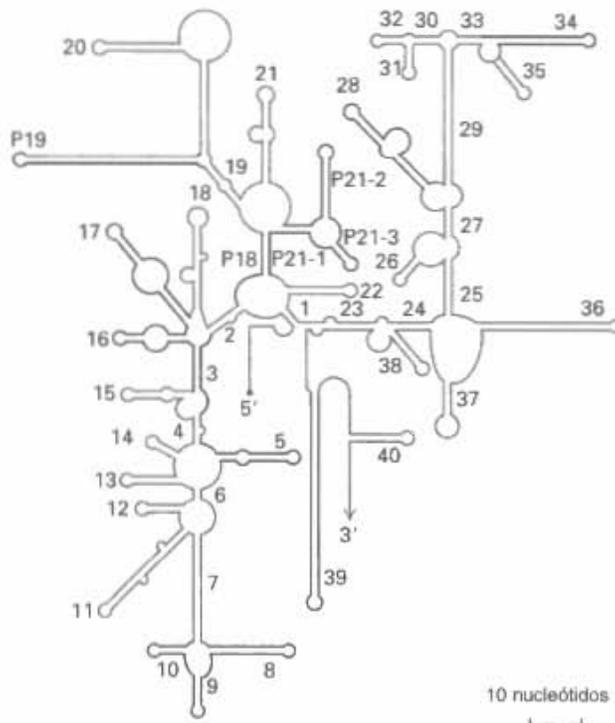


Figura 8. Molécula de rRNA 16S.

Los ribosomas participan en la síntesis de las proteínas, debido a la antigüedad de este proceso el RNA ribosómico se ha convertido en una molécula excelente para discernir las relaciones filogenéticas de los seres vivos. Se trata de moléculas antiguas, funcionalmente constantes, distribuidas universalmente y relativamente bien conservadas a través de un largo trayecto filogenético, además, dado que hay un elevado número de diferentes secuencias posibles, el parecido entre dos de éstas indica su relación filogenética. El análisis comparativo de secuencias permite determinar genealogía y construir el árbol filogenético que muestre la verdadera relación evolutiva entre los organismos (Woese, 1987).

2.5.2. Las técnicas moleculares. Los métodos de estudios más empleados son la secuenciación del rRNA 5S, 16S y 23S. Carl Woese y colaboradores examinaron la secuencia del 16S rRNA de diversos organismos y

después del análisis, propusieron que los procariotas fueran divididos en dos grupos llamados arqueobacterias y eubacterias.

La secuenciación completa del rRNA 5S, debido a su pequeño tamaño, es más rápida y económica, no obstante el análisis del rRNA 16S con un tamaño aproximado de 1550 pbs contiene un número mayor de sitios y por tanto mayor información para establecer relaciones filogenéticas, para esto al menos deben ser consideradas 1000 bases para cada organismo (Stackebrandt y Liesack, 1993).

Los métodos moleculares pueden ser aplicados en la búsqueda de cualquier gen directamente del medio ambiente sin necesidad de cultivar al organismo que lo posee. Se pueden obtener genes de una comunidad total de DNA con la ayuda de genes ya conocidos de organismos ya identificados (Pace *et al.*, 1986)

La manera más rápida de conocer los constituyentes de los ecosistemas microbianos es pues mediante el uso de la PCR utilizando primers universales para los tres dominios de organismos (eucariotas, procariotas y arqueobacterias), que amplifican los genes de RNA de todos los tipos de organismos presentes en un ambiente, seguida de la clonación de dichos fragmentos y su posterior secuenciación (Steffan y Atlas, 1991).

Una razón para usar el gen 16S rRNA es que existen bases de datos como el GenBank, el Laboratorio Europeo de Biología Molecular (EMBL) y el más especializado Ribosomal Database Project (RDP), las cuales contienen miles de secuencias de rRNA pertenecientes a una gran variedad de microorganismos. Estas bases de datos pueden consultarse libremente para realizar una comparación de las secuencias obtenidas de un aislamiento, contra las que ya están publicadas, y así poder elaborar dendogramas donde se incluya la posición de los microorganismos aislados y aproximar su posición filogenética.

3. JUSTIFICACIÓN.

El carbazol es un compuesto nitrogenado abundante en el petróleo, cuya presencia reduce los rendimientos de refinación del crudo hasta en un 20%, lo cual repercute en los costos de operación y productividad; envenena los catalizadores reduciendo su vida útil en los procesos de HDS y HDN y disminuye su eficacia para obtener combustibles limpios con bajo contenido de nitrógeno y azufre, además, la presencia de este compuesto en los combustibles fósiles genera agentes contaminantes como los NO_x de forma directa, e indirectamente SO_x , lluvia ácida y ozono. Por otra parte, el carbazol al ser liberado en el medio ambiente, ya sea por derrames de petróleo o por desechos industriales, es transformado a hidroxinitrocarbazoles, compuestos cancerígenos y mutagénicos.

Por lo anterior, es de gran importancia eliminar el carbazol de los combustibles fósiles y del medio ambiente, sin embargo a través de métodos físicos y químicos no se ha logrado de manera eficiente su eliminación. El empleo de microorganismos como herramienta biotecnológica en BDN y biorremediación es una alternativa útil ya que estos pueden utilizar de manera natural el carbazol. El aislamiento de microorganismos autóctonos con estas capacidades y su posterior identificación y caracterización resulta primordial en este ámbito.

4. OBJETIVOS.

El objetivo general de este trabajo es:

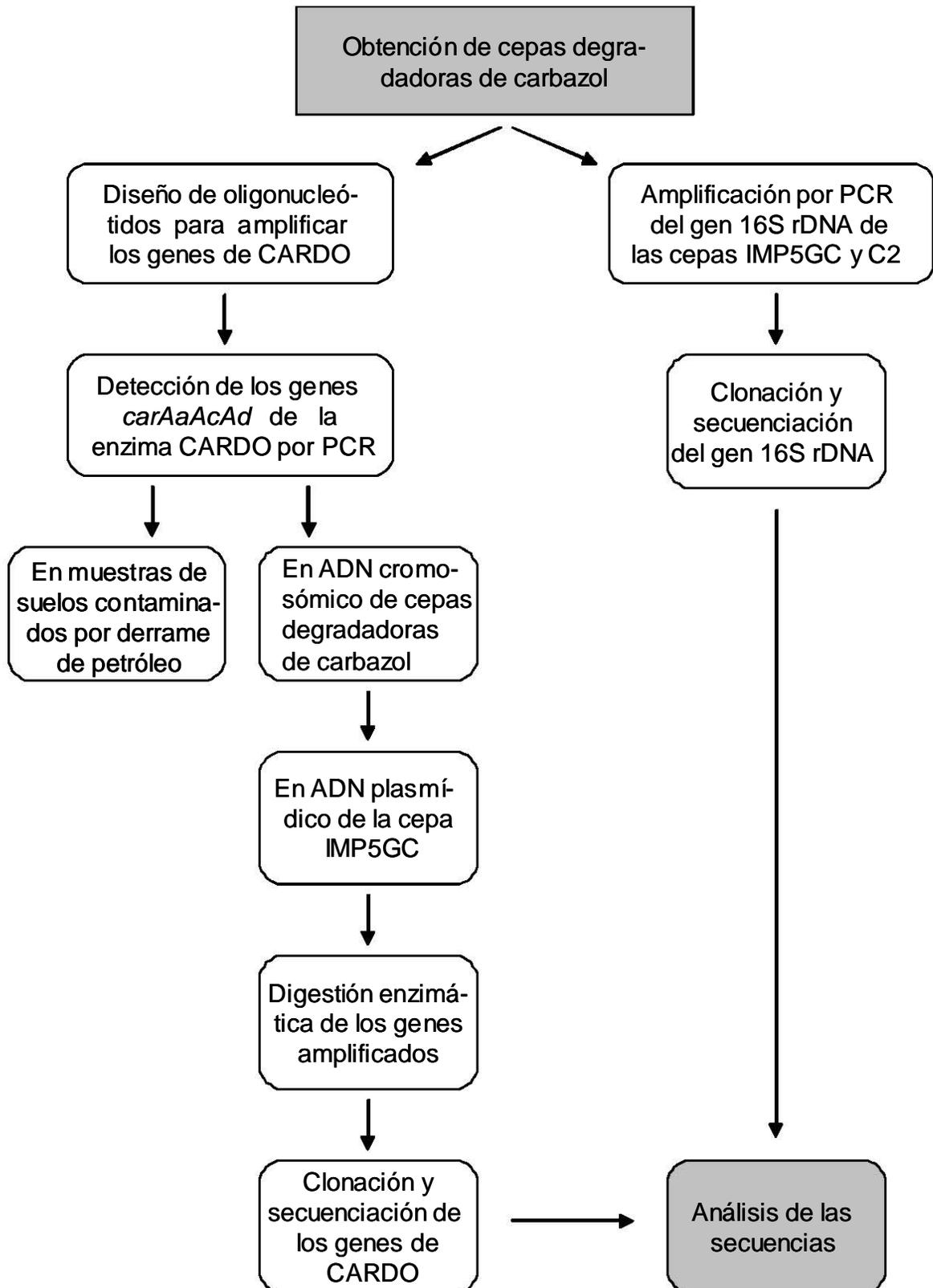
Detectar y obtener genes que codifiquen para la enzima CARDO (carbazol 1,9a-dioxigenasa), primera enzima de la ruta de degradación de carbazol, en bacterias degradadoras de este compuesto, mediante técnicas moleculares basadas en la amplificación de genes o fragmentos de genes específicos.

Los objetivos particulares derivados del anterior, son los siguientes:

- Purificar DNA de las cepas degradadoras de carbazol y de muestras de suelos contaminados con derrames de petróleo.
- Realizar la identificación molecular de microorganismos degradadores a través de la clonación y secuenciación del gen 16S rDNA.
- Detectar por medio de la técnica de PCR los genes *carAa*, *carAc* y *carAd* de la enzima carbazol 1,9a-dioxigenasa (CARDO), primer enzima de la ruta de degradación de carbazol conocida.
- Analizar el patrón de restricción de los genes *carAa*, *carAc* y *carAd* amplificados por PCR, con el fin de corroborar que estos productos si correspondan a lo genes de CARDO.

Clonar y secuenciar los genes que codifican para CARDO para su posterior análisis.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.



6. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1. Análisis bibliográfico.

Se realizaron búsquedas periódicas de artículos relacionados con los microorganismos que presentan la actividad CARDO utilizando el sitio web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>. En particular se buscaron los artículos correspondientes a microorganismos que tuvieran genes *car* reportados en la base de datos pública GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

6.2. Alineamiento de secuencias y construcción de árboles filogenéticos.

Se realizaron búsquedas periódicas de secuencias de genes *car* y sus productos proteicos correspondientes, en particular los que codifican para la actividad CARDO en GenBank. Las secuencias obtenidas fueron transferidas y alineadas en el programa Aligment Explorer de la paquetería de software MEGA 3.1 (Kumar, *et al*; 2004). Se realizaron alineamientos tanto de secuencias de nucleótidos de genes *car*, aminoácidos de la enzima CARDO y nucleótidos del gen 16S rDNA de diferentes cepas por medio del método de alineación múltiple, utilizando los parámetros Clustal W. Los árboles filogenéticos se construyeron en el software MEGA 3.1 empleando el modelo evolutivo Kimura 2-parámetros, el método de inferencia filogenética Tamura-Nei y el método de reconstrucción Neighbor-Joinig.

6.3. Diseño de oligonucleotidos.

Una vez alineadas las secuencias de nucleótidos y aminoácidos, se realizó el diseño de oligonucleótidos o cebadores para la amplificación de los genes *carA* (*carAa*, *carAd* y *carAc*) que codifican para la enzima CARDO a través del programa PrimerSelect de paquetería de software Lasergene (DNASTAR, Inc, Madison Wi.). También se utilizaron oligonucleótidos reportados en trabajos ya

publicados como se mencionará mas adelante en la parte de Resultados y Discusión.

6.4. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.

Las cepas 2.4 3.1, 3.4, 6, A, C2, IMP5GC y RM fueron aisladas de muestras de suelos contaminados por derrame de petróleo, en el laboratorio de Microbiología del Instituto Mexicano del Petróleo, a través de resiembras periódicas en medios selectivos para microorganismos degradadores de carbazol (Ouchiyama *et al.*, 1993). Para posteriores estudios, las cepas siempre fueron mantenidas en medio mineral agar (KH_2PO_4 0.2g/L, KHPO_4 0.8g/L, MgSO_4 0.25g/L, CaSO_4 0.05g/L y FeSO_4 0.01g/L) suplementado con 9 ml de solución stock de carbazol (1g de carbazol disuelto en 30ml de dimetil sulfoxido) como única fuente de carbono y nitrógeno.

6.5. Purificación de DNA de cultivos bacterianos y DNA de suelos.

La extracción y purificación de DNA contenido en suelos y DNA de cultivos bacterianos puros se realizó con los kits Ultra Clean Soil DNA isolation Kit y Ultra Clean Microbial DNA isolation Kit (MoBio Inc. Solana Beach Calif.) respectivamente, siguiendo los protocolos recomendados por el fabricante. El DNA obtenido se analizó por electroforesis en geles de agarosa al 1% (peso/volumen) corridos en amortiguador TBE 1X (Tris 89 mM, ácido bórico 89mM, EDTA 2mM).

6.6. Purificación de plásmidos de la cepa IMP5GC.

La extracción de los plásmidos, probables portadores de los genes *car* en la cepa IMP5GC, se realizó con el kit MiniPlasmid Prep de la marca QIAGEN (Katswongth, Calif.) siguiendo el protocolo del fabricante. Con este kit se pueden obtener plásmidos de hasta 150 kb.

6.7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

6.7.1. *PCR de genes codificando para la actividad CARDO.* A través de la técnica de PCR, se realizó la búsqueda de genes codificando para la actividad CARDO en muestras de DNA genómico de cepas puras degradadoras de carbazol denominadas 2.4, 3.1, 3.4, IMP5GC, 6, A, C2, RM y *Pseudomonas stutzeri* OM1, y en muestras de suelos contaminados con hidrocarburos M1, M2, M3, M4 y M5. Los oligonucleótidos utilizados se muestran en la tabla 2 y los componentes de las reacciones de PCR y sus concentraciones se muestran en la tabla 3. Dichas reacciones se realizaron en un termociclador RoboCycler (Stratagene, USA) siguiendo los programas de amplificación mostrados en la tabla 4. De igual manera se realizaron reacciones de PCR para identificar los genes *carAa*, *carAc* y *carAd* en la cepa IMP5GC poniendo 1µl de DNA plasmídico (obtenido como se describe en el párrafo 6.6) como templado.

El análisis de los productos de PCR se llevó a cabo por medio de electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% con amortiguador TBE 1X. Las muestras a analizar se prepararon de la siguiente manera: 5µl de producto de PCR, 5µl de agua y 2µl de colorante 6X conteniendo azul de bromofenol, xilencianol y glicerol, dejándose migrar durante 45 minutos a 85 volts. Se tiñó el ADN con solución 0.15µg/ml de bromuro de etidio. Para identificar las bandas de interés, se utilizó el marcador de peso molecular 1kb de la marca Invitrogen (Carlsbad, Calif.). Una vez identificados los genes de CARDO, estos fueron reamplificados por medio de PCR poniendo 2.5µl de producto de PCR como templado.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en las PCR de genes de CARDO.

Gen	Oligonucleótido	Secuencia 5' → 3'	Fragmento amplificado (pbs)	Tm (°C)
<i>carAa</i>	FAaCA10	GAGGGCGAGCCGAAGACACTAA	692	65
	RAaCA10	AGAACACCCGGGAGCCAAATG		61
<i>carAa</i>	C1036*	GGGATCTTTGAACAGGACGA	1460	55
	C2495*	AGGAGCCTGTCACTGACCAT		57
<i>carAa</i>	FAaKA1	GAAGGTACTCCCGTTCCCGTCA	728	70
	RAaKA1	AGTACGCCCGGCAGCCAGATC		70
<i>carAa</i>	FAa1CA	GTGGCGAACGTTGATGAGGC	1150	64
	RAa2CA	TCAGCCCGAACGTGCGCTT		64
<i>carAc</i>	FAcCA	CCAAATTTGGTTGAAAGTAT	320	52
	RAcCA	TCTACTTCTTTTCTCCGGCGA		60
<i>carAd</i>	FAdCA10	AGGTCCGGGCGCTAACTCAT	472	59
	RAdCA10	GTA ACTGCCTGGACGACCTCAAG		67
<i>carAd</i>	FAdCA	ATGTACCAACTCAA AATTGA	990	52
	RAdCA	TTAGAAAAATGCGTCAA AAT		50

*Oligonucleótidos diseñados por Shepherd y Lloyd-Jones, 1998.

Tabla 3. Condiciones de amplificación.

	<i>carAa</i>	<i>carAc</i>	<i>carAd</i>	16S rRNA
DNA templado	*	*	*	*
Buffer de PCR 10X	2.5 µl	2.5µl	2.5µl	2.5µl
dNTPs 10mM	0.5µl	0.5µl	0.5µl	0.5µl
Oligo F 50µM	0.25µl	0.25µl	0.25µl	0.25µl
Oligo R 50µM	0.25µl	0.25µl	0.25µl	0.25µl
Taq DNA polimerasa 5u/µl (Promega)	0.5µl	0.5µl	0.5µl	0.5µl
Agua		necesaria	Para 25 µl	

*cepa 5, 6, A, C2: 0.5µl; cepa 2.4, 3.1, 3.3: 2µl, cepa RM: 1µl; suelos y *Pseudomonas stutzeri* OM1: 1µl

Tabla 4. Programas de amplificación para los diferentes genes de CARD0.

Gen	Oligonucleótidos	Desnaturalización Inicial (1 ciclo)	Desnaturalización (30 ciclos)	Apareamiento (30 ciclos)	Extensión (30 ciclos)	Extensión final (1 ciclo)
<i>carAa</i>	FAaCA10-RAaCA10	94°C 3 min.	94°C 1 min.	51°C 1 min.	72°C 1 min.	72°C 10 min.
	C1036 - C2495			55 °C 1 min.	72°C 1.5 min.	
	FAaKA1-RAaKA1			51°C 1 min.	72°C 1 min.	
	FAa1CA-RAa2CA			55°C 1 min.	72°C 1.5 min.	
<i>carAc</i>	FAcCA-RacCA	94°C 3 min.	94°C 1 min.	50°C 1 min.	72°C 0.50 min.	72° C 10 min.
<i>carAd</i>	FAdCA10-RAAdCA10	94°C 3 min.	94°C 1 min.	55°C 1 min.	72°C 1 min.	72°C 10 min.
	FAdCA-RAAdCA			51°C 1 min.	72°C 1 min.	

6.7.2. *PCR de genes 16S rDNA*. La secuencia de genes 16S rDNA sirve en la identificación de las bacterias por lo que se realizó su amplificación a partir de las cepas IMP5GC y C2 utilizando el par de oligonucleótidos fD1-rD1 cuya secuencia y sitio de unión en *Escherichia coli* se muestran en la tabla 5. Los componentes de la reacción se detallaron en la tabla 3, esta reacción se llevó a cabo en un termociclador RoboCycler bajo las siguientes condiciones: 3 minutos a 94°C, 1 ciclo; 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 53°C y 1.5 minutos a 72°C, 30 ciclos; 10 minutos a 72°C, 1 ciclo. Los productos de PCR fueron analizados a través de electroforesis en gel de agarosa al 1% como se describe anteriormente.

Tabla 5. Oligonucleótidos para la amplificación y secuenciación del gen 16S rDNA (Weisburg, 1991)

Oligonucleótido	Posición con respecto al gen 16S rDNA de <i>E. coli</i>	Secuencia(5' → 3')
fD1	8	CAGAGTTTGATCCTGGCTCAG
rD1	1542	AAGGAGGTGATCCAGCC
R2	519	GTATTACCGCGGCTGCTG
F1.1	519	CAGCAGCCGCGGTAATAC
R5	1100	GGGGTTGCGCTCGTTG
F3	907	AAACTCAAAGGAATTGACGG

6.8. Digestiones enzimáticas.

En el programa MapDraw de la paquetería de software Lasergene se realizó la búsqueda de los sitios de restricción presentes en las secuencias de los genes *carAa*, *carAc* y *carAd* de *P. resinovorans* CA10. Posteriormente se seleccionaron algunas enzimas para realizar reacciones de digestión a los fragmentos de PCR correspondientes a los genes de la enzima CARDO (*carAa*, *carAc* y *carAd*) de la cepa IPM5GC. Las enzimas utilizadas fueron: *EcoRV*, *KpnI*, *RsaI*, *AluI*, *HaeIII*, *HhaI*, *Sau3A*, *SphI*, *NdeI* y *SphI* de la marca New England Biolabs (Beverly, Ma.)

siguiendo las indicaciones sugeridas por el fabricante. Estas reacciones fueron analizadas por electroforesis en geles de agarosa al 1% con amortiguador TBE 1X.

6.9. Clonación del gen 16S rDNA.

Para la clonación del fragmento del gen 16S rDNA amplificado por PCR se utilizó el kit pGEM-T de la marca Promega (Madison, Wi.). Los componentes de las reacciones de ligación de productos de PCR al vector pGEM-T se muestran en la tabla 6, la mezcla permaneció incubándose toda la noche a 4°C.

Tabla 6. Reacción de ligación con el kit pGEM-T.

Reactivos	Volumen (μ l)
Agua MilliQ	2.0
Buffer de ligacion 2X	5.0
Vector pGEM-T	1.0
Producto de PCR	1.0
DNA T4 Ligasa	1.0
Total	10

Una vez ligados los productos de PCR al vector de clonación fue necesario introducirlo a las bacterias, por lo cual realizaron experimentos de transformación. Para ello se electroporaron 50 μ l de células electrocompetentes *E. coli* cepa JM109 y diferentes volúmenes de mezcla de ligación pGEM-T/gen 16S rDNA. Las mezclas se electroporaron con un Multiporator de la marca Eppendorf (Hamburg, Germany) en celdas de 2mm de ancho aplicando un voltaje de 2,400V durante 5 milisegundos. Después de ser electroporadas las células bacterianas fueron resuspendidas en 1ml de medio de cultivo rico S.O.C. de la marca Invitrogen y permanecieron en incubación durante 1 hora a 37°C con agitación para permitir la expresión del gen de resistencia a ampicilina, codificado por genes del plásmido.

Al término del tiempo de incubación se platearon 150µl de estos cultivos en placas con medio selectivo LB agar conteniendo el antibiótico carbenicilina (50µg/ml), X-gal (0.2mg/ml) e IPTG (0.1mM). Se dejaron incubando durante la noche a 37°C. Las colonias positivas que crecieron de color blanco corresponden a aquellas que tienen insertado un fragmento de DNA en el gen *lacZ*.

Para verificar que las colonias blancas transformadas realmente contuvieran el fragmento del gen 16S rDNA, se realizaron reacciones de PCR con los oligonucleotidos F24mer y R22mer que hibridan en el sitio de clonación múltiple del plásmido, amplificando una parte de este y el fragmento insertado dando un producto de 1750pbs. Las secuencias de los oligonucleotidos F24mer y R22mer son 5'CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC3' y 5' TCACACAGGAAACA GCTATGAC 3', respectivamente. Las reacciones de PCR se realizaron usando colonias blancas como templado y una colonia azul como control negativo. Los componentes de la reacción se muestran en la tabla 7 y las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 3 minutos a 94°C, un ciclo; 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C, 1.5 minutos a 72°C, 30 ciclos; y 10 minutos a 72°C, un ciclo.

Tabla 7. PCR para verificar la presencia del inserto en colonias blancas.

	A partir de colonias (µl)	A partir de plásmido (µl)
Templado	Biomasa	1.0
Buffer de PCR 10X sin MgCl ₂	2.5	2.5
MgCl ₂ 25mM	1.5	1.5
dNTPs 10 mM	0.5	0.5
Oligonucleótido F24mer 50µM	0.25	0.25
Oligonucleótido R22mer 50µM	0.25	0.25
Taq DNA polimerasa. Promega	0.125	0.125
5u/µl		
Agua destilada	18.87	18.87
Total	25	25

El análisis del producto de PCR se llevó a cabo por medio de la técnica de electroforesis en gel de agarosa 1% con amortiguador TBE.

6.10. Clonación de genes que codifican para la enzima CARDO.

Los genes *carAa*, *carAc*, y *carAd* de la cepa IMP5GC, amplificados por PCR fueron ligados al vector pGEM-T de la marca Promega siguiendo el protocolo del fabricante y fueron clonados como se describe en el párrafo 6.9, solo que en éste caso las reacciones de PCR realizadas para verificar la presencia de los genes deseados en las colonias blancas, se realizaron con los pares de oligos FA1CA-RA2CA, FAdCA-RAcCA y FAcCA-RAcCA para cada gen (Tabla 2). El producto se analizó en geles de agarosa al 1% con amortiguador TBE.

6.11. Secuenciación de genes clonados.

Se inocularon 3ml de medio líquido LB conteniendo carbenicilina con las colonias *E. coli* conteniendo los genes CARDO o el gen 16S rDNA de la cepa IMP5GC, se dejaron en incubación toda la noche a 37°C con agitación. De estos cultivos se realizó la extracción y purificación de los plásmidos con el kit Ultra Clean Mini Plasmid Prep Kit (MoBio) siguiendo el protocolo del fabricante. La purificación del plásmido se verificó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1% con amortiguador TBE1X.

La secuenciación de los genes clonados fue realizada en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Para el gen 16S rDNA se llevó a cabo usando los oligonucleótidos fD1, rD1, R2, F.1, R5 y F3, cuya secuencia aparece en la tabla 4. En el caso los genes *car* se usaron los siguientes oligos: FAaCA10, RAaCA10, FAa1CA y RAa2CA para el gen *carAa*; FAcCA y RAcCA para el gen *carAc* (Tabla 2).

Teniendo las secuencias del gen 16S rDNA y de los genes de la enzima CARDO de la cepa IMP5GC se realizó su análisis en el programa BLAST del sitio web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Análisis de secuencias.

En la revisión bibliográfica de microorganismos que presentan actividad CARDO realizada en NCBI, se encontraron ocho bacterias diferentes cuyos genes *car* son conocidos (Tabla 8). Los genes que codifican para CARDO en éstas cepas tienen diferente arreglo, observándose tres prototipos diferentes correspondientes a la cepa *Sphingomonas* sp. CB3, *Pseudomonas. resinovorans* CA10 y *Pseudomonas* sp. KA1 (Figura 9).

Tabla 8. Microorganismos con actividad CARDO.

Microorganismo	# acceso en GenBank	Fecha de publicación en GenBank	Referencias	Genes <i>car</i>
<i>Sphingomonas</i> sp. CB3	AF060489	22-06-98	(45)	<i>carAaAbAcAdBCD</i>
<i>Sphingomonas</i> sp. GTIN11	AF442494	22-10-02	(18), (15)	<i>carAaBaBbCAc</i>
<i>Pseudomonas</i> <i>resinovorans</i> CA10	AB088420	03-05-03	(41), (42)	<i>carAaAaBaBbCAc</i> <i>AdDFE</i>
<i>Janthinobacterium</i> sp J3	AB095952	04-02-03	(15)	<i>carAaBaBbCAcAd</i> <i>D</i>
<i>Sphingomonas</i> sp. KA1	AB095953	24-07-04	(14), (15)	<i>carAaBaBbCAc</i>
<i>Nocardioides</i> sp. IC177	AB196258	09-04-05	(16)	<i>carAaC</i>
<i>Pseudomonas</i> sp. K23	AB088844	24-07-04	(15)	<i>carAa</i>
<i>Pseudomonas</i> <i>stutzeri</i> OM1	AB001723	07-07-98	(36)	<i>carAaBaBbCAcAd</i> <i>DFE</i>

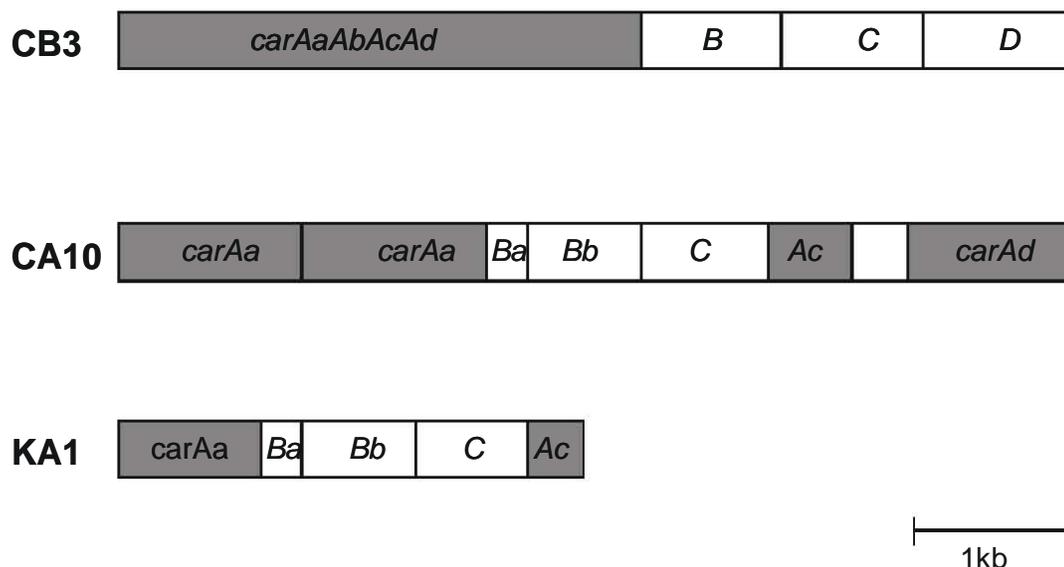


Figura 9. Organización de los genes *car* en tres cepas diferentes. Los genes que codifican para la enzima CARDO (carbazol 1,9a-dioxigenasa) se muestran sombreados.

La alineación de las secuencias de los genes de CARDO de estas cepas degradadoras también muestra que los microorganismos se organizan en tres grupos, esto se observa en los árboles filogenéticos obtenidos (Figura 10), donde *Sphingomonas* sp. CB3 está sola en una rama, las bacterias *P. sutzeri* OM1, *Pseudomonas* sp. K23, *P.resinovorans* CA10 y *Janthinobacterium* sp. J3 se organizan en un grupo; y *Sphingomonas* sp. GTIN11, *Sphingomonas* sp. KA1 y *Nocardioides* sp. IC177 forman otro grupo más. Resultados similares se observaron en los árboles filogenéticos para las secuencias de aminoácidos de los componentes CarAa, CarAc y CarAd de CARDO (Figura 11).

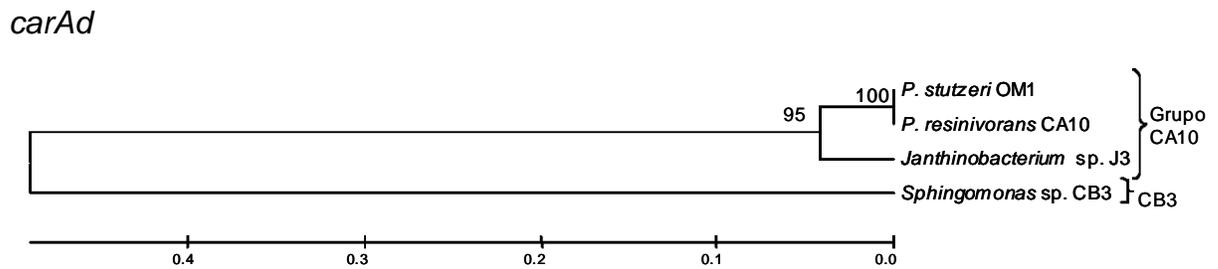
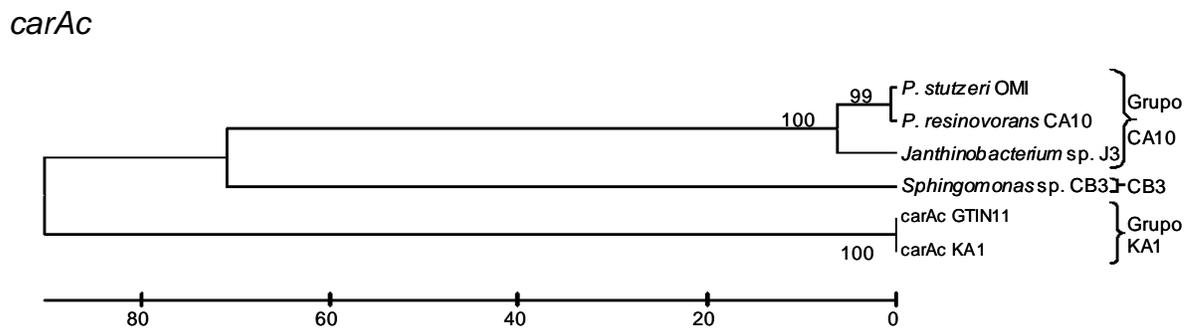
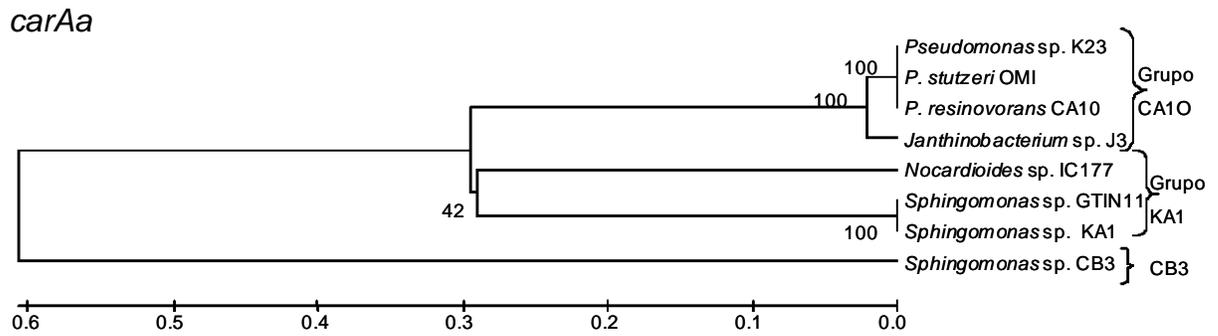


Figura 10. Árboles filogenéticos de los genes *carAa*, *carAc* y *carAd* de diferentes cepas bacterianas degradadoras de carbazol reportadas en GeneBank. Realizados con el modelo evolutivo Kimura 2-parámetros, el método de inferencia filogenética Tamura-Nei y el método de reconstrucción Neighbor-Joining.

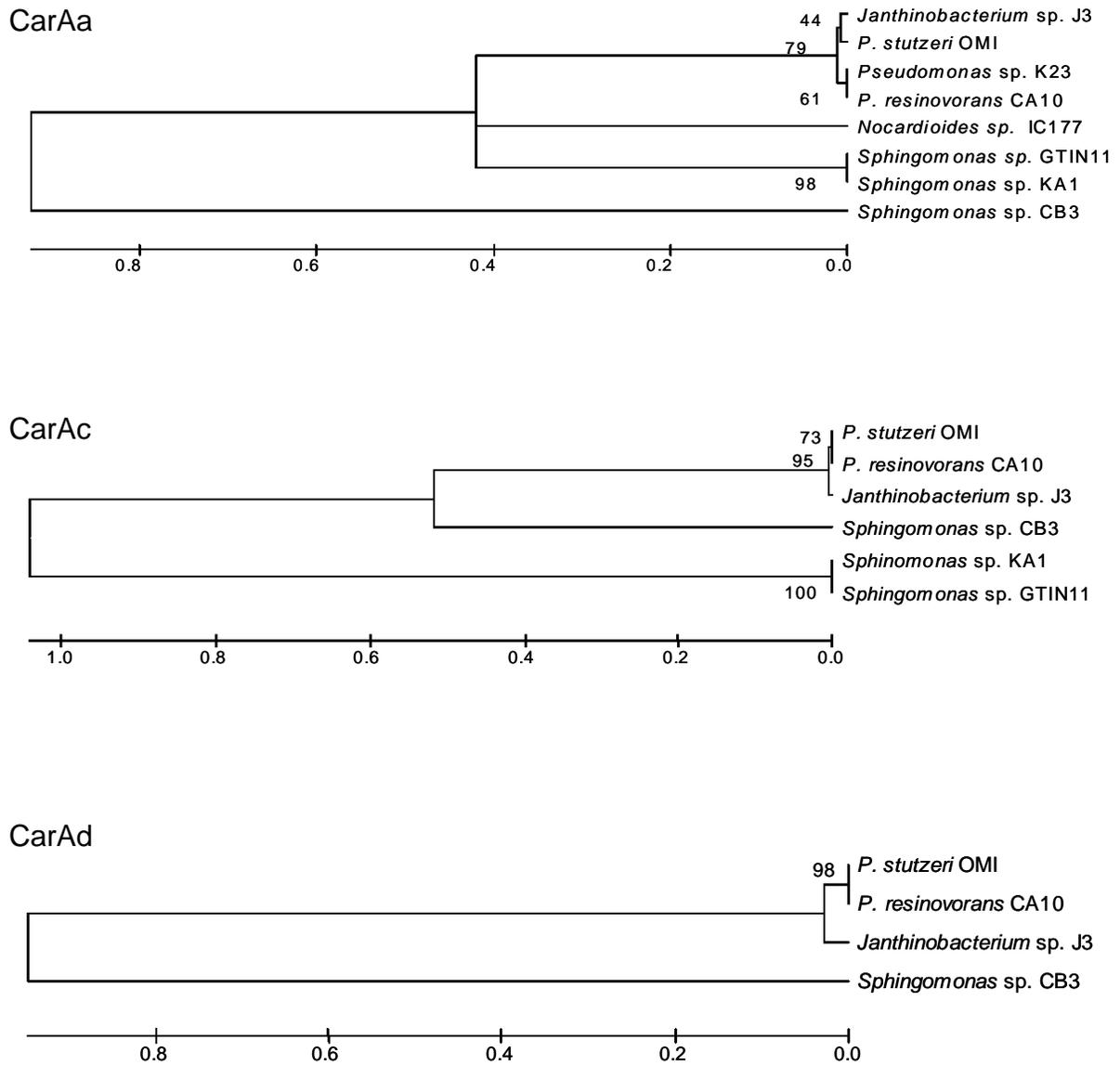


Figura 11. Árboles filogenéticos de las proteínas CarAa, CarAc y CarAd de diferentes cepas bacterianas degradadoras de carbazol reportadas en GeneBank. Realizados con el modelo evolutivo Kimura 2-parámetros, el método de inferencia filogenética Tamura-Nei y método de reconstrucción Neighbor-Joining.

A pesar de las diferencias observadas en las secuencias de aminoácidos y organización de genes en las diferentes cepas, todas inician la degradación del carbazol con la dioxigenación angular de dicho compuesto, realizada por la enzima CARDO (carbazol 1,9a-dioxigenasa). Este paso es crucial para la degradación de carbazol, por lo que se decidió verificar la presencia de los genes que codifican para CARDO (*carAa*, *craAc* y *carAd*) en muestras de suelos y cepas bacterianas degradadoras de carbazol.

7.2. Diseño de oligonucleótidos para la detección de genes de CARDO.

Como se observó en el párrafo anterior, el alineamiento de secuencias de nucleótidos de genes *carA* muestra que estos se organizan en tres grupos de acuerdo a su similitud, tomando en cuenta esto, se diseñaron diferentes pares de oligonucleótidos representativos de cada grupo de genes, en las regiones más conservadas en todas las especies.

Inicialmente para detectar el componente dioxigenasa terminal de CARDO (*carAa*) se diseñaron tres pares de oligonucleótidos: FAaCA10-RAaCA10, representativos del grupo de *P. resinovorans* CA10 y que amplifican un fragmento de 692 pbs (Figura 12); FAaKA1-RAaKA1, representativos del grupo de *Sphingomonas* sp. KA1 que amplifican 728pbs (Figura 12) y C1036-C2495, representativo de *Sphingomonas* sp.CB3 (Figura 13).

La dioxigenación angular necesaria para la degradación de carbazol es rara en la naturaleza por lo que la identificación del gen *carAa* (dioxigenasa terminal) fue clave para la posterior detección de los genes *carAc* y *carAd*.

Para detectar los genes *carAc* (ferredoxina) y *carAd* (ferredoxina reductasa) de CARDO en las diferentes bacterias y muestras de suelos, se diseñaron los oligonucleótidos FAdCA10-RAAdCA10 que amplifica un fragmento de 472 pbs del gen *carAd* de *P. resinovorans* CA10 (Figura 14) y FAcCA-RAcCA que amplifica la secuencia completa (320 pbs) del gen *carAc* de *P. resinovorans* CA10 (Figura 15).

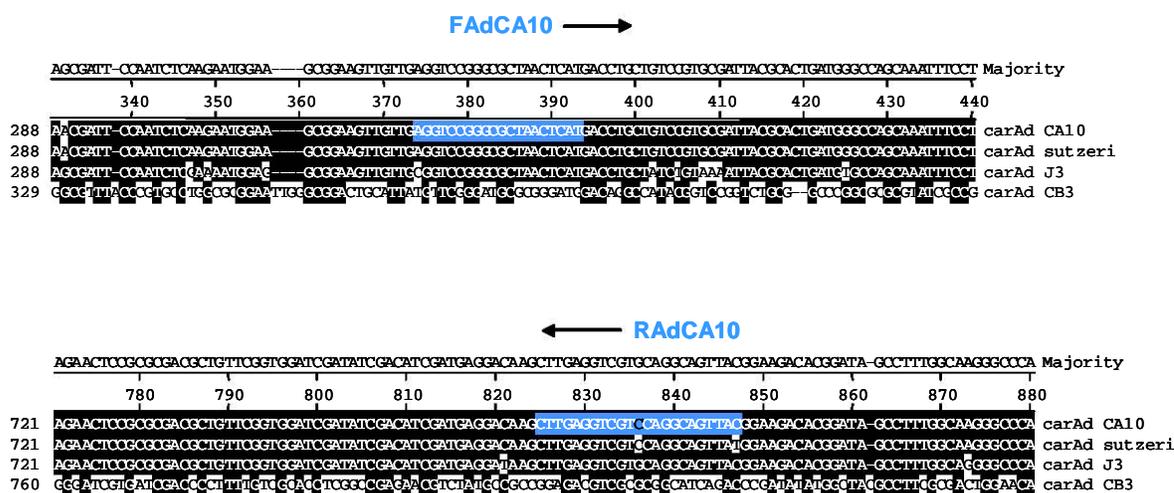


Figura 14. Oligonucleótidos FAdCA10-RAAdCA10, diseñados para detectar el gen *carAd* de CARDO.

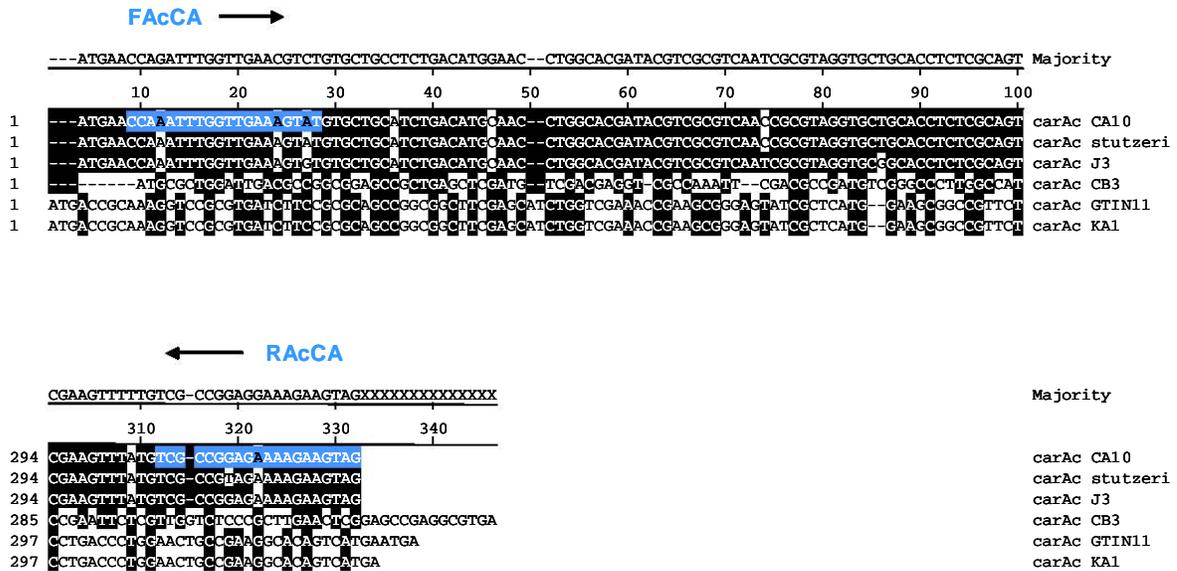


Figura 15. Par de oligonucleótidos FAcCA-RAcCA diseñados para detectar el gen *carAc* de CARDO.

Una vez detectados los genes *carAa* y *carAd*, para amplificar su secuencia completa se diseñaron nuevos oligonucleótidos basados en las secuencias de genes *car* de *P. resinovorans* CA10, estos son: FAa1CA-RAa2CA que amplifica las 1155 pbs del gen *carAa* (Figura 16) y FAdCA-RAAdCA que amplifica las 990 pbs del gen *carAd* (Figura 17).

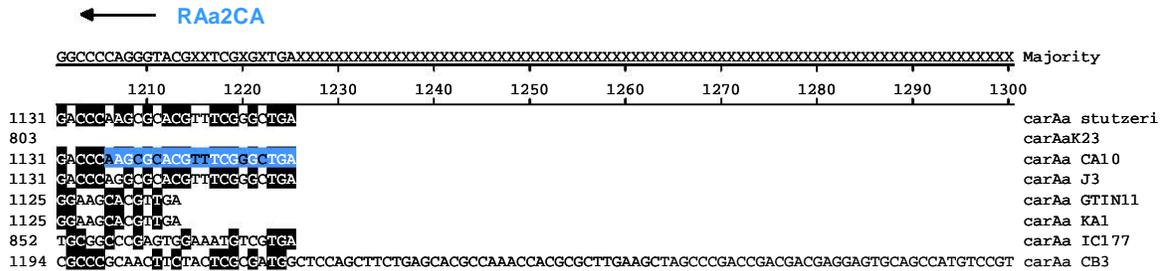
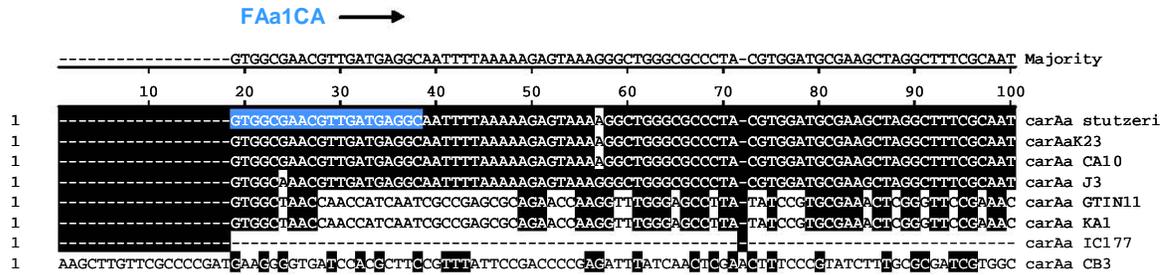


Figura 16. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación del gen *carAa*, basados en la secuencia de nucleótidos de la cepa *P. resinovorans* CA10.

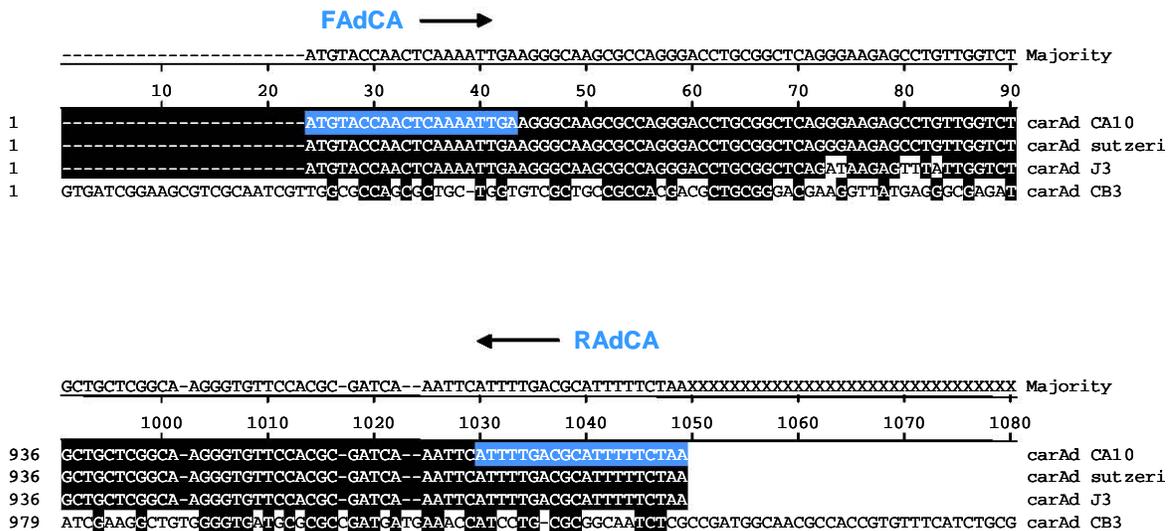


Figura 17. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación del gen *carAd*, basados en la secuencia de nucleótidos de la cepa *P. resinovorans* CA10.

7.3. Detección de genes *carA* por PCR.

Se realizaron diferentes reacciones de PCR en las que se utilizaron los oligonucleótidos diseñados para la detección de genes que codifican para la enzima CARDO, DNA de diferentes cepas degradadoras de carbazol y DNA de muestras de suelos contaminados con hidrocarburos, como se describe en la parte de Materiales y Métodos y en el párrafo anterior.

De las reacciones de PCR para detectar genes *carA* en la cepa de colección *Pseudomonas stutzeri* OM1, degradadora de carbazol, las reacciones realizadas con oligonucleótidos representativos del grupo de *P. resinovorans* CA10 mostraron resultados positivos, ya que se observaron los fragmentos de genes amplificados, *carAa* (692 pbs), *carAc* (320 pbs) y *carAd* (472 pbs). Para amplificar la secuencia completa de los genes *carAa* y *carAd* en ésta misma cepa, se realizaron reacciones de PCR utilizando los oligos FA1CA-RA2CA y FAdCA-RAAdCA, el análisis de dichas reacciones mostró bandas de 1155 pbs y 990 pbs correspondientes a los genes *carAa* y *carAd* respectivamente (Figura 18, carriles 2, 3 y 4).

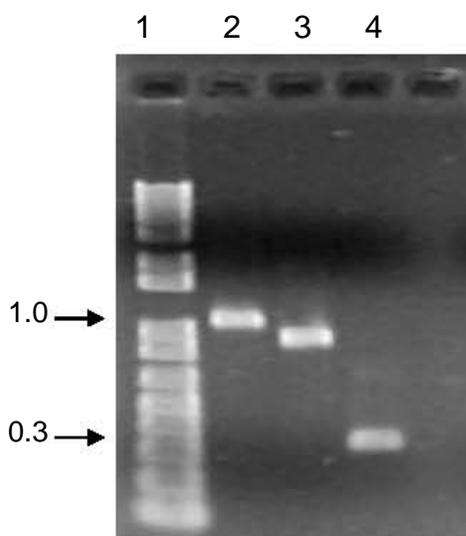


Figura 18. Análisis de PCR realizada con oligonucleótidos tipo CA10 y DNA de *P. stutzeri* OM1. Carril 1: peso molecular 1kb plus; carril 2: gen *carAa* (1155 pbs); carril 3: *carAd* (990 pbs); carril 4: *carAc* (320 pbs).

La alineación de las secuencias de los genes *carAa*, *carAc* y *carAd* de la cepa *P. resinovorans* CA10 y *P. stutzeri* OM1 mostraron casi un 100% de identidad, lo que justifica que se generen los productos de PCR en *P. stutzeri* OM1; esto nos indica que los oligonucleótidos fueron bien diseñados y las condiciones de PCR fueron correctas, por lo que para las posteriores reacciones de amplificación, con éste tipo de oligonucleótidos, se tomó a la cepa *P. stutzeri* OM1 como control positivo, obteniéndose siempre los fragmentos deseados.

Se realizaron reacciones de PCR para detectar el gen *carAa* en las cepas bacterianas 2.4, 3.1, 3.4, IMP5GC, 6, A, C2 y RM degradadoras de carbazol y aisladas en el IMP. Las reacciones realizadas con oligonucleótidos tipo CB3 (C1036-C2495) que amplifican un fragmento del gen *carAa*, no presentaron algún producto de amplificación. Tampoco se observaron resultados positivos en las PCR realizadas con los oligonucleótidos tipo KA1 (FAaKA1-RAaKA1), que amplifican 728 pbs; por lo tanto, las cepas podrían no tener genes *carAa* similares a los presentes en *Sphingomonas* sp. CB3 y *Shingomonas* sp. KA1. En el caso de las reacciones de amplificación realizadas con los oligos tipo CA10 (FAaCA10-RAaCA10), que amplifican un fragmento de 472 pbs, solo se logró la amplificación de este fragmento en la reacción realizada con DNA genómico de la cepa IMP5GC (Figura 19, carril 2).

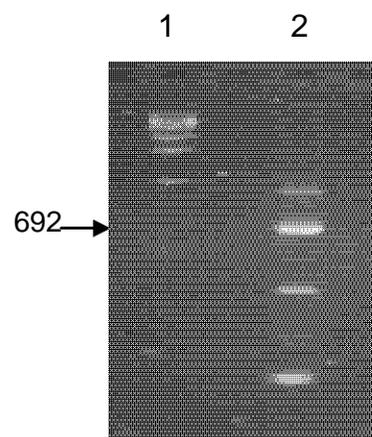


Figura 19. PCR realizada con oligonucleótidos tipo CA10 y DNA de la cepa IMP5GC. Carril 1: peso molecular 1kb; carril 2: gen *carAa* (692 pbs).

Con respecto a la detección del gen *carAd* en éstas mismas bacterias, el fragmento de 472 pbs, amplificado con los oligos FAdCA10-RAdCA10, se observó en las cepas 2.4, IMP5GC, 6, A y RM (Figura 20, carriles 3, 6, 7, 8 y 9), no obstante también se observan otras bandas indicando que la amplificación para este gen es inespecífica.

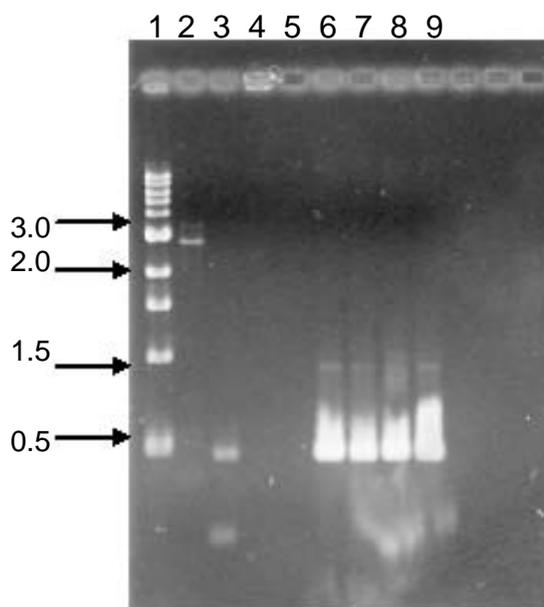


Figura 20. PCR realizada con oligos FAdCA10-RAdCA10 que amplifican un fragmento de 472 pbs del gen *carAd*. Carril 1: peso molecular 1kb; carril 2: cepa C2; carril 3: cepa 2.4; carril 4: cepa 3.1; carril 5: cepa 3.3; carril 6: cepa IMP5GC; carril 7: cepa 6; carril 8: cepa A; carril 9: cepa RM.

En cuanto a la detección de genes de CARD0 en muestras de suelos contaminados con hidrocarburos, el gen *carAa* no se logró amplificar con alguno de los tres tipos de oligonucleótidos utilizados en las PCR. En cambio el gen *carAd* si se logró amplificar dando un fragmento de 472 pbs, amplificado con los oligos FAdCA10-RAdCA10, el cual se observó en las muestras M1, M2 y M5 (Figura 21, carril 2,3 y 6).

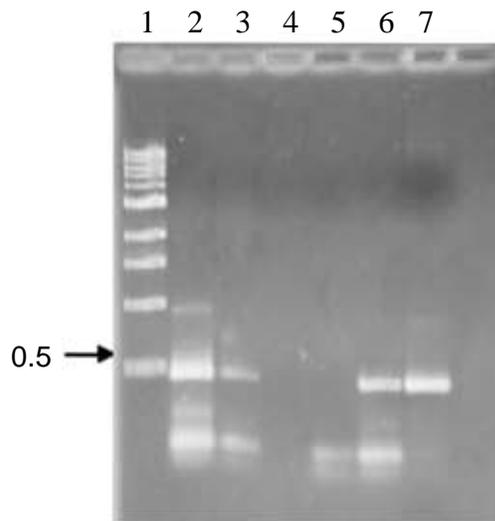


Figura 21. PCR para detectar el gen *carAd* en DNA de muestras de suelos contaminados con hidrocarburos. Carril 1: peso molecular 1kb; carril 2: suelo M1; carril 3 suelo M2; carril 4: suelo M3; carril 5: suelo M4; carril 6: suelo M5; y carril 7: control positivo (*P. stutzeri* OM1).

El gen *carAa* codifica para dioxigenasas terminales (Sato *et al.*, 1997). Estas proteínas son conocidas como componentes importantes de enzimas bacterianas degradadoras de hidrocarburos, en las que se encargan de iniciar el catabolismo aeróbico de algunos hidrocarburos aromáticos, esta actividad no es muy común en la naturaleza; de ahí que el gen *carAa* solo se haya detectado en la cepa IMP5GC de ocho cepas analizadas y en ninguna de las muestras de suelos.

El gen *carAd* codifica para ferredoxinas reductasas (Sato *et al.*, 1997), las cuales se han observado asociadas a diversas dioxigenasas y monoxigenasas de bacterias degradadoras de hidrocarburos, además, éstas proteínas participan en la cadena transportadora de electrones tanto en células procariontas como eucariotas, es decir, cumplen papeles fundamentales en el proceso de la respiración, lo que explica que este gen esté más ampliamente distribuido en la naturaleza. Esto se ve reflejado en los resultados obtenidos, ya que la amplificación del gen *carAd* fue exitosa en un mayor número de cepas y muestras de suelos.

Dado que solo en la cepa IMP5GC fue posible detectar los genes *carAa* y *carAd* se decidió seguir trabajando solo con esta cepa. Conociendo que al parecer sus genes *carA* son similares a los presentes en *P. resinovorans* CA10, se diseñaron nuevos pares de oligonucleótidos para obtener estos genes completos, así como también para amplificar el gen *carAc*, éstos son: FAa1CA-RAa2Ca, FAcCA-RAcCA y FAdCA-RAdCA. Las reacciones de PCR realizadas con dichos oligonucleótidos mostraron resultados muy irregulares, pues en algunos ensayos se observaban los genes amplificados y al realizarlos nuevamente, bajo las mismas condiciones, no se obtenían los mismos resultados. Se descartó la posibilidad de que el programa de amplificación o algún componente de la reacción fueran inadecuados ya que en el control positivo si se observaban siempre los productos de amplificación.

Maeda et al., 2003, reporta que los genes *car* de *P. resinovorans* CA10 están contenidos en un plásmido catabólico, por lo que se pensó que probablemente los genes de CARDO, responsables de la dioxigenación angular en la ruta de degradación de la cepa IMP5GC, también podrían estar alojados en plásmido.

Para corroborar la hipótesis anterior se obtuvo DNA plasmídico de la cepa IMP5GC (Figura 22, carril 2), el cual fue utilizado como templado en las reacciones de PCR para amplificar los genes *carAa*, *carAc* y *carAd*. En este caso los resultados siempre fueron positivos ya que al analizar las reacciones de PCR por electroforesis se observó la banda de 1155 pbs correspondiente al gen *carAa*, la banda de 325 pbs del gen *carAc* y la banda de 990 pbs del gen *carAd* (Figura 23, carriles 2, 3 y 4). Esta amplificación exitosa sugiere que los genes de CARDO de la cepa IMP5GC se encuentran alojados en plásmido y que parecen ser similares a los presentes en la cepa *P. resinovorans* CA10 ya que fueron amplificados con oligos basados en la secuencia de los genes *carA* de esta cepa. Sin embargo, habría que verificar que los productos de amplificación en realidad correspondieran a los genes que codifican para CARDO en la cepa IMP5GC.



Figura 22. Purificación de plásmido de la cepa IMP5GC. Carril 1: peso molecular λ HindIII; carril 2: plásmido IMP5GC.

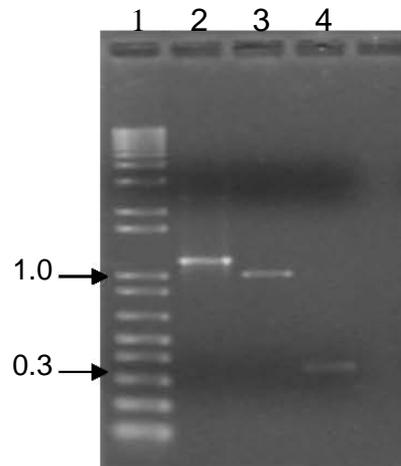


Figura 23. PCR para detectar genes *carA* en plásmido de la cepa IMP5GC. Carril 1: peso molecular 1kb plus; carril 2: *carAa*; carril 3: *carAd* y carril 4: *carAc*.

Para corroborar que los productos de PCR, obtenidos a partir de DNA plasmídico de la cepa IMP5GC, si correspondieran a los genes de CARD0 (*carAa*, *carAd* y *carAc*) y no a artefactos de la reacción de amplificación, se realizó la digestión con enzimas de restricción de cada uno de estos productos. Los resultados de las digestiones fueron comparados con la simulación realizada en el programa MapDraw (Lasergene) para los genes *carAa*, *carAc* y *carAd* de *P. resinovorans* CA10, empleando las mismas enzimas de restricción. Los resultados del tamaño de los fragmentos en pb se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Tamaño de los fragmentos (pbs) esperados en la simulación de digestión de los genes *carA* de *P. resinovorans* CA10.

	<i>EcoRV</i>	<i>KpnI</i>	<i>RsaI</i>	<i>AluI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HhaI</i>	<i>Sau3A</i>	<i>NdeI</i>	<i>SphI</i>
<i>carAa</i>	785 370	878 188 89	580 298 188 89	652 175 66 57	722 433	NA	NA	NA	NA
<i>carAc</i>	NA	NA	225 99	NA	NA	211 103	108 216	NA	234 90
<i>carAd</i>	752 278 5	NA	4 93 183 226	774 216	NA	NA	NA	480 590 6	226 764 7

NA= no aplica

De las digestiones del producto de PCR de 1155 pbs, correspondiente al gen *carAa* de la cepa IMP5GC, se observaron los fragmentos del tamaño esperado en las realizadas con las enzimas de restricción *EcoRV*, *HaeIII*, *KpnI* y *RsaI* (Figura 25, carriles 2, 4, 5 y 6), solo la digestión realizada con la enzima *AluI* no mostró los fragmentos previstos (Figura 24, carril 3)

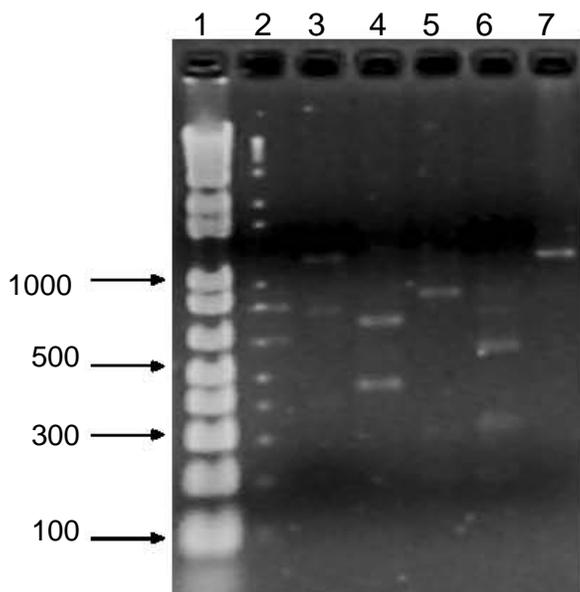


Figura 24. Reacción de digestión enzimática del gen *carAa* de la cepa IMP5GC. Carril 1: peso molecular 1kb; carril 2: *EcoRV*; carril 3: *AluI*; carril 4: *HaeIII*; carril 5: *KpnI*; carril 6: *RsaI* y carril 7: control negativo sin digerir.

En el caso de las digestiones del producto de PCR de 990 pbs, correspondiente al gen *carAd*, las realizadas con las enzimas *AluI*, *EcoRV*, *NdeI* y *SphI* mostraron los fragmentos esperados después del corte (Figura 26, carriles 2, 4, 5 y 6), y solo en la digestión realizada con la enzima *RsaI* se observaron fragmentos distintos a los esperados (Figura 25, carril 3).

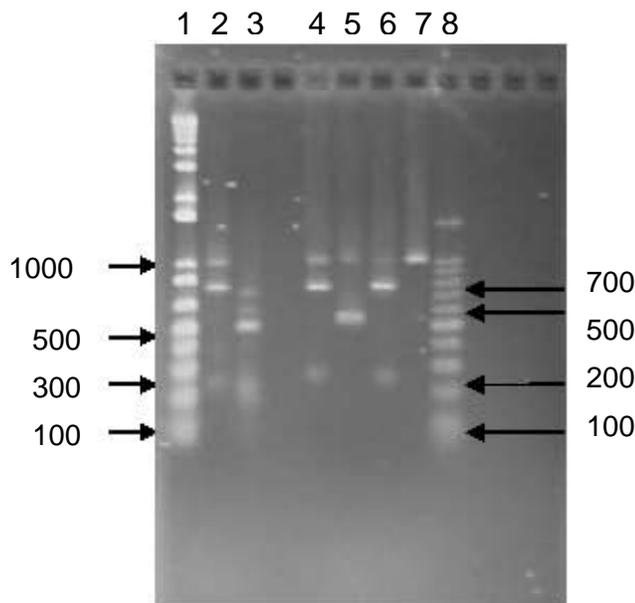


Figura 25. Reacción de digestión enzimática del gen *carAd* de la cepa IMP5GC. Carril 1: peso molecular 1kb; carril 2: *AluI*; carril 3: *RsaI*; carril 4: *EcoRV*; carril 5: *NdeI*; carril 6 *SphI*; carril 7: control negativo (sin digerir) y carril 8: peso molecular 1kb plus.

Con respecto a las reacciones de digestión del producto de amplificación de 320pbs, correspondiente al gen *carAc* de la cepa IMP5GC, se observó que todos los fragmentos obtenidos con las enzimas *HhaI*, *RsaI*, *Sau3A* y *SphI*, corresponden a los observados en la simulación de la digestión enzimática para el gen *carAc* de *P. resinovorans* CA10 (Figura 26, carriles 2, 3, 4 y 5).

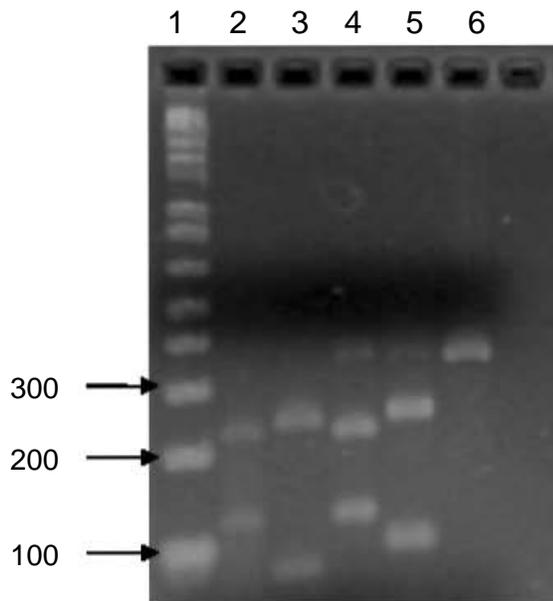


Figura 26. Reacción de digestión enzimática del gen *carAc* de la cepa IMP5GC. Carril 1: peso molecular 1kb; carril 2: *HhaI*; carril 3: *RsaI*; carril 4: *Sau3A*; carril 5: *SphI*; carril 6: control negativo (sin digerir).

Los resultados observados en las digestiones enzimáticas de los productos de amplificación de la cepa IMP5GC, confirman que estos productos de amplificación sí corresponden a los genes *CARDO* de la cepa IMP5GC, y que, efectivamente, son muy parecidos a los presentes en *P. resinovorans* CA10, pues se observó que siguen un patrón de restricción similar a esta cepa. Las diferencias observadas en los cortes de algunas enzimas con respecto a los observados en la simulación nos indican de que hay variación entre las secuencias de los genes *carA* de la cepa IMP5GC y *P. resinovorans* CA10.

Diferentes artículos reportan que los genes que codifican para enzimas de degradación de compuestos xenobióticos se encuentran localizados en elementos genéticos móviles como plásmidos y transposones (Tan, 1999). En el caso de *P. resinovorans* CA10 y *Sphingomonas* sp. KA1 se ha reportado que poseen el plásmido pCAR1 y pCAR3, respectivamente, conteniendo los genes para la degradación del carbazol. Tal parece que éste también es el caso de la cepa

IMP5GC pues los resultados obtenidos en las reacciones de PCR y las digestiones con endonucleasas de restricción muestran que los genes CARDO podrían estar alojados en el plásmido purificado de esta cepa.

6.4. Secuenciación de gene *carA*.

Los productos de PCR amplificados a partir de DNA plasmídico de la cepa IMP5GC, correspondientes a los genes *carAa* y *carAc*, fueron clonados utilizando el plásmido pGEM-T como vector para su posterior secuenciación.

La alineación de las secuencias y su posterior análisis por BLAST, mostró que el gen *carAa* de la cepa IMP5GC posee un 99% de identidad con la secuencia de este mismo gen de *P. resinovorans* CA10, 99% de identidad con el gen *carAa* de *P. stutzeri* y 96% de identidad con el gen *carAa* de *Janthinobacterium* sp. J3, a lo largo de toda la secuencia (Tabla 10).

Por su parte la alineación de la secuencia del gen *carAc* de la cepa IM5GC mostró que tiene un 99% de identidad con el gen de la carbazol 1,9a-dioxigenasa de *Pseudomonas* sp. CA10, 98% de identidad con genes catabólicos de la degradación del carbazol de *P. stutzeri*, y 95% con el operón *car* de la cepa J3 de *Janthinobacterium* sp. (Tabla 10).

Tabla 10. Análisis de secuencias de los genes *carAa* y *carAc* de la cepa IMP5GC realizado por BLAST.

Gen	Cebador de secuenciación	Secuencias más cercanas (BLAST)	No. de acceso (GeneBank)	% de identidad
<i>carAa</i>	FA1CA	Plásmido pCAR1 de <i>Pseudomonas resinovorans</i> CA10	AB088420	99
		DNA de <i>P. resinovorans</i> CA10	AB047548	99
		Gen de la enzima carbazol 1,9a-dioxigenasa de <i>Pseudomonas</i> sp. CA10	D89064	99
		Operón <i>car</i> de <i>Pseudomonas</i> sp. K23	AB094786	99
		Genes catabólicos de la degradación del carbazol de <i>P. stutzeri</i> .	AB001723	99
		Operón <i>car</i> de la cepa J3 de <i>Janthinobacterium</i> sp.	AB095952	96
<i>carAc</i>	FCCA	Plásmido pCAR1 de la cepa CA10 de <i>Pseudomonas resinovorans</i>	AB088420	99
		DNA de la cepa CA10 de <i>P. resinovorans</i>	AB047548	99
		Gen de la carbazol 1,9a-dioxigenasa de <i>Pseudomonas</i> sp. CA10	D89064	99
		Operón <i>car</i> de la cepa K23 de <i>Pseudomonas</i> sp.	AB094786	99
		Genes catabólicos de la degradación del carbazol de <i>P. stutzeri</i>	AB001723	98
		Operón <i>car</i> de la cepa J3 de <i>Janthinobacterium</i> sp.	AB095952	95

La secuenciación de los genes *carAa* y *carAc* de la cepa IMP5GC confirmó el parecido que estos tienen con los genes de CARDO de *P. resinovorans* CA10, ya que se está hablando de que son 99 % idénticos; además, dado que los genes *car* secuenciados fueron amplificados de DNA plasmídico, también se propone que los genes *carAa*, *carAd* y *carAc* están contenidos en un plásmido catabólico de la cepa IMP5GC, lo que lleva a pensar que los genes de CARDO de la cepa IMP5GC son el resultado de la transferencia horizontal de genes. Sin embargo para demostrar que los genes *car* de la cepa IMP5GC si están contenidos en un plásmido sería necesario llevar a cabo ensayos de hibridación en gel con el DNA plasmídico y usar como sonda DNA de los genes *car*.

6.5. Identificación y filogenia de cepas degradadoras de carbazol.

Por medio de la técnica de PCR se amplificó un fragmento de 1500 pbs del gen 16S rDNA de las cepas IMP5GC y C2, sobresalientes por su capacidad de degradar carbazol y aisladas en el Instituto Mexicano del Petróleo. Posteriormente este fragmento fue clonado utilizando el plásmido pGEM-T como vector y se determinó su secuencia (No. de acceso en GenBank: AY914317 para la cepa IMP5GC) la cual corresponde a la región 8 a 1542 del gen 16S rDNA en *E. coli*.

El análisis de las secuencias realizado por BLAST, mostró que la secuencia de nucleótidos del gen 16S rDNA de la cepa IMP5GC tiene un 98, 98 y 96% de identidad con *Burkholderia* sp. IC138 (AB196252), *Burkholderia* sp. IC049 (AB196247) y *Oxolobacteraceae bacterium* HTCC315, respectivamente (Tabla 11). Estos resultados sugieren que la cepa IMP5GC puede ser clasificada dentro el género *Burkholderia*. Al realizar un árbol filogenético del gen 16S rDNA de cepas degradadoras de carbazol (Tabla 13, figura 27) observamos que efectivamente esta cepa se encuentra estrechamente relacionada con *Burkholderia* sp. IC049 y *Burkholderia* sp. IC138.

La cepa *Burkholderia* sp. IMP5GC no es un género novedoso en cuanto a la degradación del carbazol ya que como se observa en la tabla 13, ya se habían reportado dos cepas más correspondientes a este género como degradadoras de dicho compuesto.

Por su parte la alineación de la secuencia 16S rDNA de la cepa C2, mostró que probablemente se trate de *Pseudomonas saccharophila*, ya que comparte un 98% de identidad con *P. saccharophila* cepa 5-1, 98 % de identidad con *P. saccharophila* MG65 y 97% de identidad con *P. saccharophila* DSM654T (Tabla 12). *P. saccharophila* ha sido reportada por su capacidad de degradar hidrocarburos policíclicos, no obstante a pesar de que la cepa C2 degrada carbazol, no se logró identificar los genes que le dan esta característica.

Tabla 11. Resultados del análisis del gen 16S rDNA de la cepa IMP5GC realizado por BLAST.

Gen secuenciado	Cebador de secuenciación	Secuencias más cercanas (BLAST)	Identidad (%)	Afiliación filogenética	No. acceso (GeneBank)	Referencia
16S rDNA de la cepa IMP5GC	fD1	<i>Burkholderia sp.</i> IC138	98	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Burkholderiaceae; Burkholderia	AB196252	Inoue, K, <i>et al.</i> Diversity of carbazole- degrading bacteria having the <i>car</i> gene cluster: Isolation of a novel gram-positive caarbazole-degrading bacterium.FEMS Microbiol. Lett. 245 (1), 145-153 (2005)
		<i>Burkholderia sp.</i> IC049	98	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Burkholderiaceae; Burkholderia	AB196247	Inoue, K, <i>et al.</i> Diversity of carbazole- degrading bacteria having the <i>car</i> gene cluster: Isolation of a novel gram-positive caarbazole-degrading bacterium.FEMS Microbiol. Lett. 245 (1), 145-153 (2005)
		<i>Oxalobacteraceae bacterium</i> HTCC315	97	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Oxalobacteraceae	AY429715	Connon, S.A. <i>et al.</i> Bacterial community composition determined by culture independent and -dependent methods during propane -stimulated bioremediation in trichloroethene-contaminated groundwater. Environ. Microbiol. 7 (2), 165-178 (2005)

Tabla 12. Resultados del análisis del gen 16S rDNA de la cepa C2 realizado por BLAST.

Gen secuenciado	Cebador de secuenciación	Secuencias más cercanas (BLAST)	Identidad (%)	Afiliación filogenética	No. acceso (GeneBank)	Referencia
16S rDNA de la cepa C2	fD1	<i>Pseudomonas saccharophila</i> 5-1	98	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Comomonadaceae; Pelomonas	AF36 8755	Kulakov, L.A <i>et al.</i> Analisis of bacteria contaminating ultrapure water in industrial systems. Appl. Environ. Microbiol. 68 (4), 1548-1555 (2002)
		<i>Pseudomonas saccharophila</i> MG65	98	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Comamonadaceae; Pelomonas	AJ746122	Gomila, M. y col. Identification of culturable bacteria present in haemodialysis water and fluid. FEMS Microbiol. Ecol. 52 (1), 101-114 (2005)
		<i>Pseudomonas saccharophila</i> DSM654T	97	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Comamonadaceae; Pelomonas	AB021407	Anzai, Y. y col. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50 Pt 4, 1563-1589 (2000)

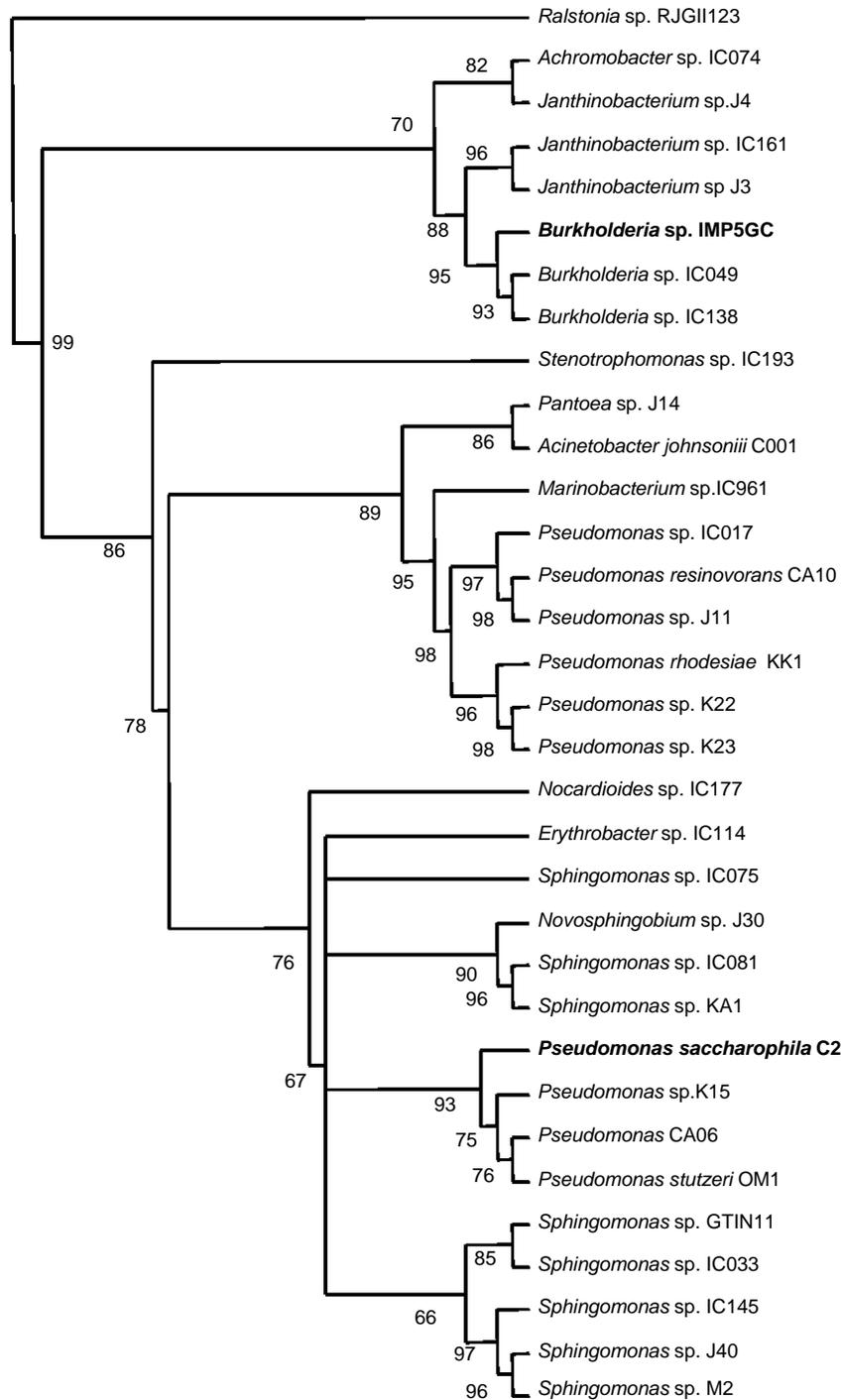


Figura 27. Árbol filogenético de cepas degradadoras de carbazol reportadas en el GenBank (tabla 13) y dos cepas aisladas en este estudio (negritas), basado en la secuencia de 1400 pbs del gen 16S rDNA. Árbol construido con el modelo evolutivo Kimura 2-parametros empleando el método de inferencia filogenética Tamura-Nei y el método de reconstrucción Neighbor-Joining.

Se encontraron 33 bacterias reportadas como cepas degradadoras de carbazol en la base de datos pública GenBank (Tabla 13), las cuales corresponden a 13 géneros distintos, aunque la mayoría son del género *Pseudomonas* y *Sphingomonas*. Solo se han reportado los genes responsables de la degradación de carbazol en ocho de estas cepas: *P. stutzeri* OM1, *P. resinovorans* CA10, *Pseudomonas* sp. K23, *Janthinobacterium* sp. J3, *Sphingomonas* sp. GTIN11, *Sphingomonas* sp. KA1, *Nocardioides* sp. IC177 y *Sphingomonas* sp CB3. Inoue *et al*, 2005 realizó estudios de hibridación para conocer los genes de degradación del carbazol del resto de las cepas degradadoras reportadas, en donde observó que 3 de las cepas analizadas poseen genes parecidos a los de la cepa CA10, 17 tienen genes *car* similares a los de la cepa KA1, y los genes de 2 cepas fueron similares a los genes *car* de CB3. En este mismo estudio se observó que la cepa *Burkholderia* sp. IC049 tiene genes *car* similares a los presentes en *P. resinovorans* CA10. El análisis de la secuencia de genes *car* de *Burkholderia* sp. IMP5GC mostró resultados similares a los obtenidos por Inoue, pues se encontró que la cepa IMP5GC también tiene genes parecidos a los de CA10 y *P. stutzeri* OM1, esto a pesar de que corresponden a distintos géneros bacterianos.

En cuanto a la cepa C2, identificada como *Pseudomonas saccharofila*, se podría pensar que tendría genes *car* similares a los de *P. resinovorans* CA10 por pertenecer al mismo género bacteriano. No obstante estos genes no pudieron ser detectados por PCR, así que ésta y las demás cepas cuyos genes *car* no pudieron ser identificados probablemente posean genes novedosos, aunque faltarían estudios para corroborarlo.

Por otra parte, 32 de las 33 bacterias degradadoras de carbazol son clasificadas como gram-negativas y sólo una, *Nocardioides* sp. IC177 fue reportada como gram-positiva. En nuestro estudio observamos a través de la construcción de árboles filogenéticos que el gen *carAa* de *Nocardioides* sp. IC117 está relacionado con el gen *carAa* de *Sphingomonas* sp. KA1, experimentos realizados por hibridación muestran la homología entre estos dos genes (Inoue, K. *et al.*, 2005).

Inoue explica la presencia de los mismos genes tanto en bacterias gram-positivas como en bacterias gram-negativas a través la transferencia horizontal de genes mediada por el plásmido pCAR3 conteniendo los genes *car* de *Sphingomonas* sp. KA1.

En el caso de los genes *car* tipo CA10, presentes en diferentes géneros bacterianos y en nuestra cepa de estudio *Burkholderia* sp. IMP5GC, suponemos que también son adquiridos por transferencia horizontal de genes, por ejemplo a través de plásmidos portadores de genes *car*. Esta probabilidad es apoyada por el hecho de que la cepa *P. resinovorans* CA10 posee el plásmido catabólico pCAR1 conteniendo genes *car* además de los genes *tra* y *trh* que le confieren la característica de ser un plásmido autotransmisible. Ya que el árbol filogenético obtenido por el gen 16S rDNA no concuerda con el árbol filogenético obtenido por los genes *car*, también sugiere una transferencia horizontal de los genes, además de que vemos los mismos genes en diferentes géneros bacterianos.

Como se mencionó anteriormente *Burkholderia* sp. IMP5GC es capaz de degradar carbazol y utilizarlo como única fuente de carbono y nitrógeno, los genes *car* que codifican para la enzima CARDO han podido ser identificados, por lo que consideramos que esta cepa podría ser empleada en el proceso de biodesnitrógeno del petróleo o en biorremedio. Sin embargo, algunas especies del género *Burkholderia* han sido identificadas como microorganismos patógenos de plantas y como patógenos oportunistas en humanos, particularmente en pacientes con fibrosis quística *Burkholderia cepacia* es la causante de graves complicaciones. Por ésta razón surgió el interés por conocer las relaciones filogenéticas entre *Burkholderia* sp. IMP5GC y algunas especies patógenas y no patógenas de este mismo género. En la figura 28 observamos que las cepas patógenas (en azul) se agrupan principalmente en un clado y que *Burkholderia* sp. IMP5GC (en negritas) se encuentra en un clado aparte. Basándonos en este análisis tenemos que la cepa IMP5GC es una especie no patógena, aunque faltarían estudios para verificar que el empleo de *Burkholderia* sp, IMP5GC

realmente sea seguro ya que también se observan especies patógenas no agrupadas.

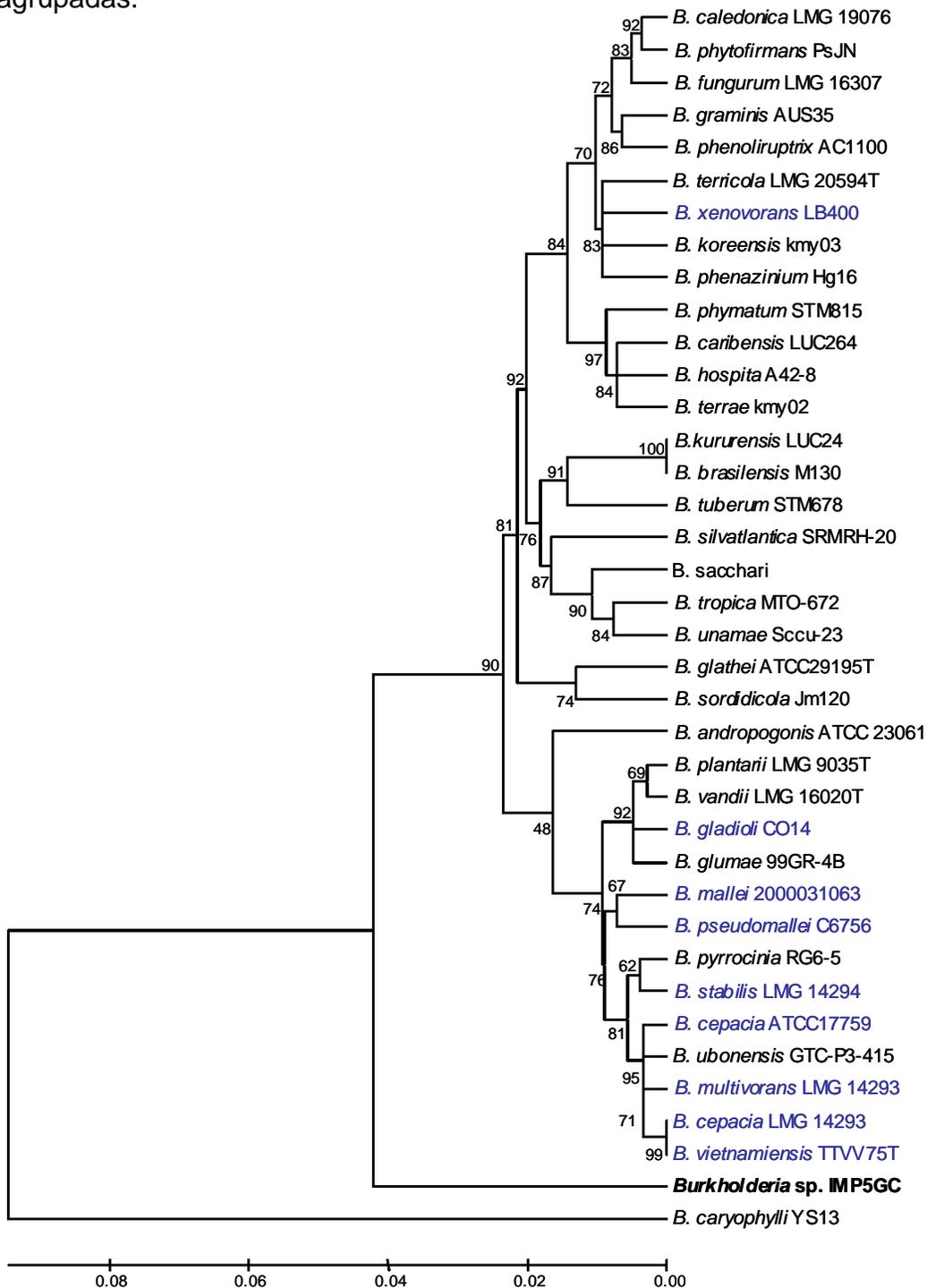


Figura 28. Árbol filogenético del género *Burkholderia*, basado en la secuencia de 1000 pbs del gen 16S rDNA. Construido con el modelo evolutivo Kimura 2-parámetros empleando el método de inferencia filogenética Tamura-Nei y el método de reconstrucción Neighbor-Joining.

Tabla 13. Cepas degradadoras de carbazol reportadas en GeneBank.

Cepa	Referencias	# acceso en GeneBank	Clase taxonómica	Secuencia de genes <i>car</i>
<i>Nocardioides</i> sp. ICC177	(16)	AB196258	Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales; Propionibacterineae; Nocardioideaceae; Nocardioides.	Conocidos
<i>Marinobacterium</i> sp. IC961	(16)	AB196257	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Alteromonadales; Alteromonadaceae; <i>Marinobacterium</i>	Desconocidos
<i>Stenotrophomonas</i> sp. IC193	(16)	AB196256	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Xanthomonadales; Xanthomonadaceae; <i>Stenotrophomonas</i>	Desconocidos
<i>Janthinobacterium</i> sp. IC161	(16)	AB196254	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Oxalobacteraceae; <i>Janthinobacterium</i> .	Desconocidos
<i>Sphingomonas</i> sp. IC145	(16)	AB196253	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales; Sphingomonadaceae; <i>Sphingomonas</i> .	Desconocidos
<i>Burkholderia</i> sp. IC138	(16)	AB196252	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Burkholderiaceae; <i>Burkholderia</i> .	Desconocidos
<i>Erythrobacter</i> sp. IC114	(16)	AB1196251	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales; Sphingomonadaceae; <i>Erythrobacter</i> .	Desconocidos
<i>Sphingomonas</i> sp. IC081	(16)	AB196250	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales; Sphingomonadaceae; <i>Sphingomonas</i>	Desconocidos
<i>Sphingomonas</i> sp. IC075	(16)	AB195249	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales; Sphingomonadaceae; <i>Sphingomonas</i> .	Desconocidos
<i>Achromobacter</i> sp. IC074	(16)	AB196248	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Alcaligenaceae; <i>Achromobacter</i> .	Desconocidos
<i>Burkholderia</i> sp. IC049	(16)	AB196247	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Burkholderiaceae; <i>Burkholderia</i>	Desconocidos

..... Continuación tabla 13

Cepa	Referencias	# acceso en GeneBank	Clase taxonómica	Secuencia de genes <i>car</i>
<i>Sphingomonas</i> sp. IC033	(16)	AB196246	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales; Sphingomonadaceae; Sphingomonas.	Desconocidos
<i>Pseudomonas</i> sp. IC017	(16)	AB196245	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; Pseudomonas.	Desconocidos
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	(16)	AB196244	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Moraxellaceae; Acinetobacter.	Desconocidos
<i>Burkholderia</i> sp. IMP5GC	(7)	AY914317	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Burkholderiaceae; Burkholderia.	Conocidos
<i>Pseudomonas resinovorans</i> CA06	(35)	NC04444	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; Pseudomonas.	Desconocidos
<i>Sphingomonas</i> sp. M2	(16)	AB097176	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales; Sphingomonadaceae; Sphingomonas.	Desconocidos
<i>Sphingomonas</i> sp. J40	(16)	AB097175	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales; Sphingomonadaceae; Sphingomonas.	Desconocidos
<i>Pseudomonas</i> sp. J11	(16)	AB097174	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; Pseudomonas.	Desconocidos
<i>Pantoea</i> sp. J14	(16)	AB097173	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Pantoea.	Desconocidos
<i>Janthinobacterium</i> sp. J3	(15)	AB097172	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Oxalobacteraceae; Janthinobacterium.	Conocidos
<i>Janthinobacterium</i> sp. J4	(16)	AB097171	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Oxalobacteraceae; Janthinobacterium.	Desconocidos

.....Continuación tabla 13

Cepa	Referencias	# acceso en GeneBank	Clase taxonómica	Secuencia de genes <i>car</i>
<i>Pseudomonas</i> sp. K23	(16)	AB088844	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; Pseudomonas.	Conocidos
<i>Novosphingobium</i> sp. J30	(16)	AB088760	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales; Sphingomonadaceae; Novosphingobium.	Desconocidos
<i>Pseudomonas</i> sp. K22	(16)	AB088756	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; Pseudomonas.	Desconocidos
<i>Pseudomonas</i> sp. K15	(16)	AB088755	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; Pseudomonas.	Desconocidos
<i>Sphingomonas</i> sp. KA1	(14), (15)	AB064271	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales; Sphingomonadaceae; Sphingomonas.	Conocidos
<i>Pseudomonas stutzeri</i> OM1	(36)	AB0887544	Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; Pseudomonas.	Conocidos
<i>Sphingomonas</i> sp. GTIN11	(18), (15)	AY056468	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales; Sphingomonadaceae; Sphingomonas.	Conocidos
<i>Ralstonia</i> sp. RJGII.123	(44)	AF153194	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Burkholderiaceae; Ralstonia.	Desconocidos
<i>Pseudomonas</i> sp. CA10	(41), (42)	AB047273	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; Pseudomonas.	Conocidos
<i>Sphingomonas</i> sp. CB3	(45)		Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales; Sphingomonadaceae; Sphingomonas.	Conocidos
<i>Pseudomonas rhodesiae</i> KK1	(16)	AY043360.	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; Pseudomonas.	Desconocidos

7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El análisis del gen 16S rDNA de la cepa IMP5GC indica que pertenece al género *Burkholderia*, este género posee una diversidad metabólica que le permite sobrevivir en ambientes altamente contaminados.

Por medio de la técnica de PCR se logró obtener los genes *carAa*, *carAc* y *carAd* de *Burkholderia* sp. IMP5GC, Estos genes fueron amplificados con oligonucleótidos tipo CA10 debido a que son similares a los presentes en *P. resinovorans* CA10. El patrón de restricción obtenido y el análisis de la secuencia de los genes *carAa* y *carAc* de *Burkholderia* sp. IMP5GC confirmaron el parecido entre genes *car* de nuestra cepa de estudio y *P. resinovorans* CA10 ya que se tuvo un 99% de identidad entre las secuencias de genes *car*. Además, dado que la amplificación de los genes *car* se llevó a cabo con DNA plasmídico obtenido de *Burkholderia* sp. IMP5GC, se llegó a la conclusión de que esta cepa puede ser portadora de un plásmido catabólico que probablemente contiene los genes *car* que codifican para la enzima carbazol 1,9a-dioxigenasa (CARDO), responsable de la dioxigenación angular en la ruta de degradación del carbazol.

A partir de los resultados de los alineamientos de la secuencia del gen 16S rDNA perteneciente a la cepa C2, se concluye que esta cepa puede ser clasificada como *Pseudomonas saccharophila*. No se logró identificar a los genes de degradación de carbazol de esta cepa por lo que la investigación para lograrlo queda abierta.

La identificación molecular de genes *car* de la cepa IMP5GC demuestra que es una buena candidata para su uso en el desarrollo de procesos de BDN de combustibles o de biorremediación, sin embargo serian necesarios estudios que confirmen que esta cepa no es patógena. El plásmido de *Burkholderia* sp. IMP5GC también podría emplearse en el diseño de bacterias recombinantes capaces de eliminar el nitrógeno que envenena a los catalizadores en el proceso de refinación del petróleo o en el desarrollo de otros procesos biotecnológicos.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Amann, R.I., Ludwig, W. y Schleifer, K.H. (1995). Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev.* 51:143-169.
2. Arcos, J. y Argus M.F. (1968) Molecular geometry and carcinogenic activity of aromatic compounds. New perspectives. *Adv. Cancer Res.* 11: 305-471
3. Atlas, R. M. (1981) Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiol. Rev.* 45:180-209.
4. Bej, S. K., Dalai, A. K. y Adjayes, J. (2001) Comparison of hydrodenitrogenation of basic and nonbasic nitrogen compounds present in oil sands derived heavy gas oil. *Energy & Fuels.* 15:377-383.
5. Benedik, M.J., Gibas P.R., Riddle R.R y Willson R.C. (1998) Microbial denitrogenation of fossil fuels. *Trends Biotechnol.* 16 : 39-45.
6. Bressler D.C. y Murray R.G. (2002) Hidrotreating chemistry of model products from bioprocessing of carbazoles. *Energy & Fuels.* 16:1076-1086.
7. Castorena, G., Mujica, A.V., Le Borgne, S., Acuña, E., Aburto, J. y Bustos-Jaimes, I. (2006) Carbazole biodegradation in gas oil/water biphasic media by a new isolated bacterium *Burkholderia* sp. strain IMP5GC. *J. Appl. Microbiol.* 4:739-745.
8. Choi, K-H., Korai, Y., Mochida, I., Ryu, J-W. y Min, W. (2004) Impact of removal extent of nitrogen species in gas oil on its HDS performance : an efficient approach to its ultra deep desulfuration. *Appl. Catal. A* 50: 9-16.
9. Colwell, R.R y Walker, R.D. (1977) Ecological aspects of microbial degradation of petroleum in the marine environment. *Crit. Rev. Microbiol.* 5:423-445.
10. Dams, E., Hendricks, L., Van De Peer, Y., Neef, J., Smits, G., Vandenbempt, I. y De Wachter, R. (1998) Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. *Nucleic Acid Research.* 16:87-175.
11. Engelhardt, M.A., Daly, K., Swannell, R.P y Head, I.M. (2001) Isolation and characterization of a novel hydrocarbon-degrading, Gram-Positive bacterium, isolated from intertidal beach sediment, and description of *Planococcus alkanoclasticus* sp. *J. Appl. Microbiol.* 237:247.
12. Finnerty, W.R., Shockley, K. y Attaway, H. (1983) Microbial desulfuration and denitrogenation of hidrocarbons. In microbial enhanced oil recovery. Penn Well Books.
13. Grosser R.J., Warshawsky y Vestal J.R. (1991) Indigenous and enhanced mineralization of pyrene, benzo [a] pyrene, and carbazole in soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:3462-3469.
14. Habe, H., Ashikawa, Y., Yoshida, T., Nojiri, H y Omori, T. (2002) *Sphingomonas* sp. KA1 carrying a carbazole dioxigenase gene homologue, degrades chlorinated dibenzo-*p*-bioxins in soils. *FEMS Microbiol. Lett.* 211: 43-49.
15. Inoue, K., Widada, J., Nakai, S., Endoh T., Urata, M., Ashikawa, Y., Shintani, M., Saiki, Y., Yoshida, T., Habe, H., Omari, T. y Nojiri, H. (2004)

- Divergent structures of carbazole degradative *car* operons isolated from Gram- bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70: 1467-1480.
16. Inoue, K., Habe, H., Yamane, H., Omori, T. y Nojiri, H. (2005) Diversity of carbazole-degrading bacteria having the *car* gene cluster: Isolation of a novel gram-positive carbazole-degrading bacterium. *FEMS Microbiol. Lett.* 245 : 145-153.
 17. Kanaly, R.A., Bartha, R., Watanabe, K. y Harayama, S. (2000) Rapid mineralization of benzo [a] pyrene by a microbial consortium growing on diesel fuel. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:4205-4211.
 18. Kilbane, J.J., Daram, A., Abbasian, J. y Kayser, K.J. (2002) Isolation and characterization of *Sphingomonas* sp. GTIN11 capable of carbazole metabolism in petroleum. *Biochem. Biophys. Res. Comun.* 297:242-248.
 19. Kirimura, k., Nakagawa, H., Tsuji, H., Matsuda, K., Kurane, R. y Usami, S. (1999) Selective and continuous degradation of carbazole contained in petroleum oil by resting cells of *Sphingomonas* sp. CDH-7. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63:1563-1568.
 20. Korda, A., Santas, P., Tenente, A. y Santas, R. (1997) Petroleum hydrocarbon biorremediation: sampling and analytical techniques, in situ treatments and comercial microorganims currently used. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48: 677-686.
 21. Laredo, G., De los Reyes, A., Cano, L. y Castillo, J. (2001) Inhibition effects of nitrogen compounds on the hydrodesulfurization of dibenzothiophene. *Appl. Catal. A* 207:103-112.
 22. Laredo, G., Leyva, S., Alvares, R., Mares, M. T., Castillo, J. y Cano, L. (2002) Nitrogen compounds characterization in atmospheric gas oil and light cycle oil from a blend of Mexican crudes. *Fuel* 81:1341-1350.
 23. La Vopa, V. y Satterfield, C.N. (1988) Poinsoning of thiophene hydrodesulfurization by nitrogen compounds. *J. Catal.* 110:375-387.
 24. Leahy, J.G. y Colwell, R. (1990) Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol. Rev.* 54: 305-315.
 25. Macnaughton, S.J., Stephen, J.R., Venosa, A. D., Davis, G. A., Chang, Y-J. y White, D .C. (1999) Microbial population on changes buring biorremediation of experimental oil spill. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3566-3574.
 26. Madigan, M.T., Martinko, J.M. y Parker, J. (1999) Brock Biología de los microorganismos. Octava edición. Prentice Hall. Madrid.
 27. Maeda, K., Nojiri, H., Shintani, M., Yoshida, T., Habe, H. y Omari, T. (2003) Complete nucleotide sequence of carbazole/dioxin-degrading plasmid pCAR1 in *Pseudomonas resinovorans* stain CA10 indicates its mosaicity and the presence of large catabolic transposon Tn4676. *J. Mol. Biol.* 326: 21-33.
 28. Mason, R. J. (1988) Oxigenase catalyzed hydroxilation of aromatic compounds: simple chemistry by complex enzymes. *Int. Ind. Biotechnol.* 8:19-24.
 29. Mason, R. J. (1992) The electron-transport protein of hidroxylating bacterial dioxigenases. *Annu. Rev. Microbiol.* 46:277-305.

30. Moore, R.L. y McCarthy, B.J. (1967). Comparative study of ribosomal ribonucleic acid cistrons in enterobacteria and myxobacteria. *J. Bacteriol.* 94:1066-1074.
31. Nagai, M. Y Kabe, T. (1983) Selectivity of molybdenum catalytic in hydrodesulfurization, hydrodenitrogenation, hydrodeoxygenation: effect of additives on dibenzothiophene hydrodesulfurization. *J. Catal.* 81:440-449.
32. Nam, J.W., Nojiri, H., Yoshida, T., Habe, H., Yamane, H. y Omori, T. (2001) New clasification system for oxigenase components involved in ring-hidroxilatin oxigenation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65:254-263.
33. Nojiri, H., Nam, J-W., Kosaka, M., Morii, K-I., Takenura, T., Furihata, k., Yamane, H. Y Omori, T. (1999). Diverse Oxigenations catalyzed by carbazole 1,9a-dioxigenase from *Pseudomonas* sp. Strain CA10. *J. Bacteriol.* 181:3105-3113.
34. Nojiri, H., Sekiguchi, H., Maeda, K., Urata, M., Nakai, S-I., Yoshida, T., Habe, H. y Omori, T. (2001) Genetic characterization and evolutionary implications of a *car* gene cluster in the carbazole degrader *Pseudomonas* sp. strain CA10. *J. Bacteriol.* 183:3663-3679.
35. Ouchiyama, N., Zhang, Y., Omori, T. y Kodama, T. (1993) Biodegradation of carbazole by *Pseudomonas* spp. CA06 and CA10. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 57:455-460.
36. Ouchiyama, N., Miyachi, S. y Omori, T. (1998) Cloning and nucleotide sequence of carbazole catabolic genes from *Pseudomonas stutzeri* stain OM1, isolated from activated sludge. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 44:57-63.
37. Pace, N., Olsen, G. y Woese, C. (1986) Ribosomal RNA phylogeny and the primary lines of evolutionary descent. *Cell.* 45:325-326.
38. Riddle, R.R., Gibbs, P.R., Willson, R.C. y Benedik, M.J. (2003) Recombinant carbazole-degrading strains for enhanced petroleum processing. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30:6-12.
39. Saiki, Y., Habe, H., Yuuki, T., Ikeda, M., Yoshida, T., Nojiri, H. y Omori, T. (2003) Rhizoremediation of dioxin-like compounds by a recombinant *Rhizobium tropici* strain expressing carbazole 1,9a-dioxigenase constitutively. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67:1144-1148.
40. Sambrook, J., Fritsch, E. F., y Maniatis. T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2a ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N. Y.
41. Sato, S., Nam, J-W., Kasuga, K., Nojiri, H., Yamane, H., y Omori, T. (1997) Identification and characterization of genes encoding carbazole 1,9a-dioxigenase in *Pseudomonas* sp. Stain CA10. *J. Bacteriol.* 179, 4850-4858.
42. Sato, S., Ouchiyama, N., Kimura, K., Nijiri, H., Yamane, H. y Omori, T. (1999) Cloning of genes involved in carbazole degradation of *Pseudomonas* sp. Strain CA10: nucleotide secuencias of genes and characterization of *meta*-cleavage enzymes and hydrolase. *J.Bacteriol.* 179: 4841-4849.
43. Schneider, J., Grosser, R.J., Jayasimhulu, K., Xue, W., Kinkle, B. y Warshawsky, D. (2000) Biodegradation of carbazole by *Ralstonia* sp. RJGII.123 isolated from a hydrocarbon contaminated soil. *Can. J. Microbiol.* 46:269-277.

44. Shepherd, J.M. y Lloyd-Jones, G. (1998) Novel carbazole degradation genes of *Sphingomonas* CB3: sequence analysis, transcription, and molecular ecology. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247: 129-135.
45. Shinn, S., Sakanishi, K. y Mochida, I. (2000) Identification and reactivity of nitrogen molecular species in gas oil. *Energy & Fuels.* 14:539-544.
46. Shotbolt-Brown, J., Hunter, D.W.F. y Aislabie, J. (1996) Isolation and description of carbazole-degrading bacteria. *Can. J. Microbiol.* 42:79-82.
47. Sumbogo M, S.D., Yang, H., Choi, K-H., Korai, Y. Y Mochida, I. (2003) Influences of nitrogen species on the hydrodesulfurization reactivity of a gas oil over sulfide catalysts of variable activity. *Appl. Catal. A* 252:331-346.
48. Stackebrandt, E. y Liesack, W. (1993) Bacterial diversity in a soil sample from a subtropical australian environment as determined by 16S rDNA analysis. *The Faseb J.* 7:232-236.
49. Steffan, R. y Atlas, R. (1991). Polymerase chain reaction: applications in environmental microbiology. *Annu. Rev. Microbiol.* 45:137-161.
50. Sugaya, K., Nacayama, O., Hinata, N., Kamekura, K., Ito, A., Yamagiwa, K. y Ohkawa, A. (2001) Biodegradation of quinoline in crude oil. *J. Chem. Technol. Biotech.* 76:603-611.
51. Swanell, R. P., Lee, K. y MacDonagh, M. (1996) Field evaluations of marine oil spill bioremediation. *Microbiol. Rev.* 60:342-365.
52. Kumar, S., Tamura, K. y Nei, M. (2004) MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5:150-163.
53. Tan, H.M. (1999) Bacterial catabolic transposons. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51:1-12.
54. Tissot, B.B. y Welte D.H. (1984) Petroleum formation and occurrence, Springer-Verlag.
55. Urata, M., Miyakoshi, M., Kai, S., Maeda, K., Habe, H., Omori, T., Yamane, H. y Nojiri, H. (2004) Transcriptional regulation of the *ant* operon, encoding two-component anthranilate 1,2-dioxygenase, on the carbazole degradative plasmid pCAR1 of *Pseudomonas resinovorans* strain CA10. *J. Bacteriol.* 186: 6815-68-23.
56. Vazquez-Duhalt, R., Torres, E., Valderrama, B. y Le Borgne S. (2002) Will biochemical catálisis impact the petroleum refining industry. *Energy & fuels.* 16:1239-1250.
57. Voet, D. y Voet, J. (1995). *Biochemistry*. Segunda edición. John Wiley & Sons, Inc.
58. Weisburg, W.W., Barns, S.M., Pelletier, D.A. y Lane, J. 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173:697-703.
59. Woese, C. R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51:221-271.