



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE
MICROORGANISMOS PROVENIENTES DE SUELOS
CONTAMINADOS CAPACES DE REMOVER
BIFENILO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

MÓNICA GABRIELA GODDARD JUÁREZ



TUTORA:
DRA. NORMA GABRIELA ROJAS AVELIZAPA

2010



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.

HOJA DE DATOS DEL JURADO

1. Datos de la alumna

Goddard

Juárez

Mónica Gabriela

442 223 54 31

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

406081128

2. Datos de la tutora

Dra.

Norma Gabriela

Rojas

Avelizapa

3. Datos del sinodal 1

Dr.

Jorge Antonio

García

Álvarez

4. Datos del sinodal 2

M. en C.

Iván Emmanuel

Reyes

Solís

5. Datos del sinodal 3

M. en C.

Claudia Andrea

Segal

Kischinevzky

6. Datos del sinodal 4

M. en C.

Regina

Hernández

Gama

7. Datos de la tesis

Identificación molecular de microorganismos provenientes de suelos contaminados capaces de remover bifenilo

63 p.

2010

AGRADECIMIENTOS

A mi ángel cósmico, que me acompaña, me cuida, me despeja la cabeza para pensar con claridad, va por detrás y por delante de mí.

A mi familia, por acompañarme durante este proceso ahora que regresé con ustedes. Los quiero mucho.

A mi mamá, por luchar incansablemente por nuestra familia, por su gran amor y dedicación, por cada uno de sus detalles, paciencia y por enseñarme a dar sin esperar recibir.

A mi papá, por ser el mejor ejemplo que tengo de perseverancia, por sus sabios consejos, por su amor, por enseñarme a ser analítica y por compartirme su experiencia de vida.

A mis hermanas, a Cinthia, por apoyarme con cuestiones técnicas a lo largo de la escritura de mi tesis, a Milu por interesarse en mi avance y en lo que estaba haciendo y a Adriana por estar ahí.

A mis tíos Ale y Sergio, a mi tía Chela y mi primo Paco, por ser mi familia en el DF cuando estuve lejos de mi casa, por alimentarme, transportarme, telefonarme y acompañarme a lo largo de mi carrera.

A mis amigos que fueron mi contacto con la fac mientras hice mi tesis en Querétaro, especialmente a Les y Ñola que me ayudaron con GRAN parte de los trámites y dieron muchas vueltas; a Zitla, Jime, Mitzy y Ricardo que me consiguieron alguna información y a Frambel que me dio alojamiento, agradezco a todos muchísimo su apoyo y su amistad.

A mis amigos queretanos que se interesaron en mi tema y me preguntaron una y otra vez cuuuuuaaando acabaría, especialmente a Parka, Galaviz y Arasi. Me dio gusto regresar al pueblo y además compartirles mi trabajo.

A la UNAM, por mantenerse como una institución de prestigio y ser un sitio donde convergen una amplia diversidad de criterios, gracias a esto recibí una educación holística y de calidad. Por proporcionar el espacio para desarrollarme como estudiante universitaria y como deportista, por el campus CU que inspira a estudiar y porque estoy orgullosa de ser PUMA.

A la Dra. Norma, por darme la oportunidad de participar en su proyecto, por su paciencia, sus enseñanzas, su exigencia que me impulsó a trabajar mejor y por ser amigable.

A Regina, por todo lo que, pacientemente, me enseñó en el laboratorio, por todas las explicaciones que me dio una y otra vez y por su buen humor.

A los miembros de mi jurado, por sus rápidas correcciones y útiles sugerencias que me ayudaron a mejorar el manuscrito de mi tesis.

A mis papás y a mis abuelitos 😊

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	i
RESUMEN.....	ii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
I.1 La contaminación por compuestos orgánicos persistentes	
I.2 Efectos tóxicos de los BPCs e hidrocarburos	
I.3 La fracción microbiana del suelo	
I.4 Aspectos relacionados con la degradación de compuestos recalcitrantes por microorganismos	
I.5 Degradación de bifenilo por bacterias	
I.6 Degradación de bifenilo por hongos	
I.7 Métodos moleculares para la identificación de microorganismos	
I.7.1 El gen bacteriano 16S rRNA como marcador molecular	
I.7.2 PCR-RFLP para estimar la diversidad de un consorcio microbiano	
I.7.3 Identificación de bacterias mediante el análisis del gen 16S rRNA	
II. ANTECEDENTES.....	11
II.1 Problemática ambiental de San Nicolás, Tequisquiapan, Querétaro	
II.2 Evaluación de la contaminación en San Nicolás	
II.3 Situación actual	
III. JUSTIFICACIÓN.....	14
IV. HIPÓTESIS.....	15
V. OBJETIVOS.....	16
V.1 Objetivo general	
V.2 Objetivos particulares	
VI. ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO	17
VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
VII.1 Degradación de bifenilo por microorganismos de suelos contaminados	
VII.1.1 Colecta de muestras de suelo	
VII.1.2 Preparación de cultivos de enriquecimiento	
VII.1.3 Caracterización macro y microscópica	
VII.1.4 Conservación de los microorganismos	
VII.1.5 Estandarización de extracción de bifenilo en medio líquido	
VII.1.6 Análisis de bifenilo por cromatografía de gases	
VII.1.7 Ensayo preliminar de degradación de bifenilo	
VII.1.8 Cinética de crecimiento y degradación de bifenilo	
VII.1.9 Evaluación de crecimiento y de degradación de bifenilo	
VII.2 Identificación molecular del cultivo microbiano proveniente de la muestra Acosta	
VII.2.1 Extracción de DNA metagenómico	
VII.2.2 Evaluación de la cantidad y calidad del DNA extraído	
VII.2.3 Amplificación del gen 16S rRNA	
VII.2.4 Purificación del producto de PCR	
VII.2.5 Clonación de los fragmentos amplificados en el vector pJET1.2/blunt y transformación en <i>Escherichia coli</i>	
VII.2.6 Selección y cultivo de clonas	
VII.2.7 Biblioteca de genes ribosomales bacterianos	
VII.2.8 Obtención del DNA plasmídico	

VII.2.9 Digestión para liberar el fragmento clonado	
VII.2.10 Análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)	
VII.2.11 Amplificación del fragmento del gen 16S rRNA clonado con oligonucleótidos pJET1.2	
VII.2.12 Aislamiento en agar nutritivo de microorganismos provenientes de un cultivo en suspensión de la muestra Acosta	
VII.2.13 Extracción de DNA de microorganismos aislados en agar nutritivo	
VII.2.14 Purificación de los productos de PCR	
VII.2.15 Secuenciación	
VII.2.16 Análisis de la secuencias	
VIII. RESULTADOS	31
VIII.1 Degradación de bifenilo por microorganismos provenientes de suelos contaminados	
VIII.1.1 Descripción de muestras de suelo	
VIII.1.2 Características macro y microscópicas de los cultivos microbianos	
VIII.1.3 Extracción y análisis de bifenilo en medio líquido	
VIII.1.4 Ensayo preliminar de degradación de bifenilo	
VIII.1.5 Cinética de crecimiento y degradación de bifenilo	
VIII.2 Identificación molecular del cultivo microbiano proveniente de la muestra Acosta	
VIII.2.1 Extracción de DNA metagenómico y determinación de su calidad y cantidad	
VIII.2.2 Amplificación y clonación del gen 16S rRNA bacteriano	
VIII.2.3 Extracción y digestión del DNA plasmídico recombinante de la biblioteca de genes ribosomales bacterianos	
VIII.2.4 Análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) de las clonas de biblioteca de genes ribosomales bacterianos	
VIII.2.5 Aislamiento en agar nutritivo de microorganismos provenientes del cultivo en suspensión de la muestra Acosta	
VIII.2.6 Identificación molecular de los microorganismos aislados a partir de la muestra Acosta	
IX. DISCUSIÓN.....	49
X. CONCLUSIONES.....	56
XI. RECOMENDACIONES.....	57
XII. REFERENCIAS.....	58

ABREVIATURAS

2,4-D:	ácido 2,4-dichlorofenoxiacético
acetil CoA:	acetil coenzima A
BLAST:	Basic Local Alignment Search Tool
BPCs:	bifenilos policlorados
BTEX:	benceno, tolueno, etilbenceno, xileno
CCA:	Comisión para la Cooperación Ambiental
CEACA:	Centro de Estudios Académicos sobre Contaminación Ambiental
COFEPRIS:	Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios
D.O.:	densidad óptica
DDE:	1,1- <i>bis</i> -(4-clorofenil)-2,2-dicloroetano
DDT:	1,1- <i>bis</i> -(4-clorofenil)-2,2,2-tricloroetano
DNA:	siglas en inglés de ácido desoxiribonucleico (desoxyribonucleic acid)
dNTP's:	siglas en inglés de desoxirribonucleótidos trifosfato (deoxyribonucleotide triphosphate)
EPA:	siglas en inglés de Agencia de Protección Ambiental (Environmental Protection Agency)
FDA:	siglas en inglés de Administración de Alimentos y Fármacos (Food and Drug Administration)
FID:	siglas en inglés de detector de ionización de flama (flame ionization detector)
g:	intensidad de la gravedad
G:	Gram
HPAs:	hidrocarburos policíclicos aromáticos
IARC:	siglas en inglés de Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (International Agency for Research on Cancer)
Kb:	kilobase
MPM:	marcador de peso molecular
NCBI:	National Center for Biotechnology Information
pb:	pares de bases
PCR:	siglas en inglés de reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction)
PDA:	siglas en inglés de agar papa y dextrosa (potato and dextrose agar)
ppm:	partes por millón
RFLP:	siglas en inglés de polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (restriction fragment length polymorphism)
RNA:	siglas en inglés de ácido ribonucleico (ribonucleic acid)
rRNA:	RNA ribosomal
S:	svedverg
TAE:	tris-acetato-EDTA
UFC:	unidades formadoras de colonias
UPGMA:	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean

RESUMEN

Los suelos aledaños a los hornos ladrilleros de la población de San Nicolás, Tequisquiapan, Querétaro se encuentran presuntamente contaminados con compuestos orgánicos persistentes tales como los bifenilos policlorados, contenidos en aceites gastados, y combustóleo, que es una mezcla compleja de hidrocarburos de alto peso molecular. Desde hace varios años, estos materiales se han empleado como combustible en la fabricación de ladrillos, razón por la cual este poblado presenta una fuerte afectación ambiental debido a su naturaleza tóxica y recalcitrante a la degradación. En el caso específico de los bifenilos su toxicidad aumenta ya que se biomagnifican a lo largo de la cadena trófica. Por fortuna, el ambiente tiende a recuperarse y los microorganismos que prevalecen en esas condiciones desarrollan la capacidad de adaptarse a ellas, inclusive a utilizarlos como fuente de carbono y energía y así removerlos del medio. El objetivo del presente trabajo fue estudiar, mediante técnicas de biología molecular, las poblaciones microbianas que se encuentran presentes en muestras de suelo provenientes de San Nicolás, identificando aquellas que presentan la mayor capacidad para remover un compuesto modelo como es el bifenilo. Este compuesto se eligió ya que su presencia en el medio activa la maquinaria enzimática responsable de la degradación de compuestos más complejos como los bifenilos clorados, los hidrocarburos aromáticos policíclicos y compuestos organoclorados, entre otros. El trabajo inició con la colecta de tres muestras de suelo en la entrada de tres hornos ladrilleros que fueron identificadas como Tele, Reforma y Acosta. Inicialmente se establecieron cultivos de enriquecimiento en medio mineral líquido a partir de las tres muestras de suelo y una vez estabilizados los cultivos microbianos, se llevó a cabo su caracterización macro y microscópica mediante tinción Gram y microcultivo. Posteriormente, se realizó un ensayo de 72 horas para determinar el periodo de máxima degradación del bifenilo por cada uno de los cultivos microbianos, la remoción del bifenilo se determinó por cromatografía de gases con detector de ionización de flama. Los resultados demostraron que los cultivos microbianos de las tres muestras de suelo presentan la capacidad de degradar cerca del 50% del bifenilo presente (50 partes por millón) en un periodo de 12 horas. A las 24 horas, el cultivo microbiano proveniente de la muestra Acosta fue capaz de remover al contaminante en su totalidad. Así, se eligió a este cultivo para proceder a su identificación molecular empleando la secuencia del gen 16S rRNA. Cabe indicar que a diferencia de los otros dos cultivos, el cultivo seleccionado estaba formado únicamente por bacterias. Mediante la construcción de árboles filogenéticos y matrices de distancia se determinó que los cuatro microorganismos aislados se asociaban estrechamente con *Chryseobacterium moeclotypicola*, *Brevibacillus parabrevis*, *Acinetobacter baumannii* y *Stenotrophomonas sp.* Los resultados obtenidos demostraron que la diversidad bacteriana de los suelos contaminados de San Nicolás es baja muy probablemente debido a las presiones de selección que imperan en este sitio. Todos los organismos identificados poseen la maquinaria enzimática necesaria para degradar bifenilo aunque lo hacen a distintas tasas. La plasticidad genotípica de muchos de los microorganismos que se desarrollan en ambientes contaminados, como los que fueron aislados en el presente estudio, les otorga la capacidad para emplear una variedad de sustratos como fuentes de carbono y energía; por lo tanto, son candidatos potenciales para aplicarse en procesos de biorremediación.

I. INTRODUCCIÓN

I.1 La contaminación por compuestos orgánicos persistentes

La industria química produce una gran cantidad de compuestos que difieren en su estructura química de los orgánicos naturales. Estos son utilizados ampliamente en la industria, la agricultura y las actividades humanas cotidianas; un gran porcentaje de ellos son resistentes a la degradación, por lo tanto resultan en contaminación ambiental. Otros se degradan lentamente por cometabolismo en presencia de un segundo sustrato, que es empleado como fuente de energía primaria (Allard y Neilson, 1997; Atlas y Bartha, 2002; Furukawa, 2006). Los compuestos con diversos grupos sustituidos, como los grupos halógenos o nitrogenados, son considerados recalcitrantes a la degradación ya que los sustituyentes bloquean las rutas bioquímicas de degradación (Atlas y Bartha, 2002).

Una gran cantidad de los xenobióticos presentes en el ambiente son halocarburos. El enlace carbono-halógeno es altamente estable y su rompimiento es un proceso endotérmico que requiere gran cantidad de energía (Atlas y Bartha, 2002). Un ejemplo son los compuestos aromáticos clorados. En el último siglo se emplearon con frecuencia como herbicidas, pesticidas y en otras aplicaciones industriales. Específicamente, los bifenilos policlorados (BPCs) son contaminantes resistentes prioritarios (según la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos) que se han utilizado en la industria como lubricantes, refrigerantes, aislantes eléctricos y retardantes de flama. Se produjeron comercialmente en los Estados Unidos por la Monsanto Chemical Company desde 1929 hasta 1977 (Ruiz-Aguilar, 2005) cuando se dejaron de elaborar. Una de sus características más sobresalientes y por la cual estos compuestos recalcitrantes se reconocen como uno de los contaminantes ambientales más preocupantes en todo el mundo, es su propiedad lipofílica, que los lleva a bioacumularse a lo largo de la cadena trófica (Sylvestre, 1995; Ruiz-Aguilar, 2005; Furukawa, 2006). Su resistencia a la biodegradación aumenta con el número de sustituyentes clorados.

La volatilización de BPCs presente en transformadores, condensadores y otros residuos contenidos en los vertederos contamina el aire, se transportan a través de él y se sedimentan mediante precipitación, reincorporándose al suelo y a los cuerpos de agua (Allard y Neilson, 1997; Ruiz-Aguilar, 2005).

Otros contaminantes orgánicos de importancia son los hidrocarburos del petróleo. Aunque no se consideran persistentes ni resistentes a la degradación (Atlas y Bartha, 2002), ya que la mayoría de sus componentes son biodegradables, su uso a gran escala y los derrames accidentales han provocado daños ambientales graves debido a que suceden a mayor velocidad que la capacidad de depuración natural de los sitios.

El combustóleo o *fuel oil* es un hidrocarburo líquido oscuro, insoluble en agua, con olor típico a petróleo. Se elabora a partir de productos residuales que se obtienen de los procesos de refinación del petróleo crudo y está diseñado para usarse especialmente como combustible en hornos, secadores y calderas. También puede utilizarse para calentadores (unidades de calefacción) y en plantas de generación de energía eléctrica. Este combustible contiene 4% de azufre (PEMEX, 2007) y nitrógeno; además, contiene una mezcla compleja y variable de hidrocarburos de alto peso molecular entre los que se encuentran alcanos, alquenos, cicloalcanos e hidrocarburos aromáticos (Sangabriel *et al.*, 2006).

Los hidrocarburos de cadena larga son de difícil degradación ya que cuando superan un peso molecular de 500 g/l dejan de servir como fuentes de carbono para el crecimiento microbiano. Asimismo, aquellos que presentan un gran número de ramificaciones son más recalcitrantes a la degradación ya que los átomos de carbono terciarios y cuaternarios interfieren con los mecanismos de degradación o los bloquean totalmente. Finalmente, los compuestos aromáticos, especialmente los polinucleares, se degradan más lentamente que los alcanos (Atlas y Bartha, 2002).

I.2 Efectos tóxicos de los BPCs e hidrocarburos

Debido a la naturaleza tóxica y recalcitrante de una gran mayoría de los compuestos orgánicos persistentes, su presencia constante tanto en suelos como en cuerpos de agua, donde pueden llegar a través de la lixiviación desde el suelo, resulta en una amenaza para la biota y puede además ocurrir la transformación de sus componentes en otros más tóxicos (Allard y Neilson, 1997).

Los BPCs se acumulan en el tejido adiposo de los animales, mostrando efectos tóxicos, particularmente en el caso de exposiciones repetidas o dosis altas. La patología más común se manifiesta sobre todo en la piel provocando un acné característico. Estas sustancias afectan las funciones del hígado, los riñones, la tiroides y el sistema inmune y también ocasionan alteraciones en el desarrollo neurológico. La Agencia de Protección Ambiental (EPA, por sus siglas en inglés) de Estados Unidos así como la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) han determinado que los BPCs son cancerígenos para el humano (ATSDR, 2000).

El combustóleo contiene hidrocarburos aromáticos peligrosos como benceno, tolueno, etilbenceno, xileno (BTEX) y naftaleno, los cuales son contaminantes comunes del suelo y los cuerpos de agua y están clasificados como contaminantes prioritarios por la EPA. Su presencia en el medio afecta la salud de plantas, animales y humanos (Dibyendu *et al.*, 2005; Witzing *et al.*, 2006). Además, los suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo tienen alteraciones en sus propiedades físico-químicas tales como cambio en la textura, incremento en la cantidad de materia orgánica, incremento en la capacidad de

intercambio catiónico, disminución de la densidad al igual que de la porosidad (Martínez y López, 2001).

I.3 La fracción microbiana del suelo

En la mayoría de los sistemas naturales se encuentran presentes una variedad de microorganismos. El suelo es un ambiente muy apropiado para el desarrollo y proliferación de bacterias, hongos, algas y protozoos. Estos establecen relaciones diversas que contribuyen a las características propias del suelo por su papel en la modificación de las fases sólida, líquida y gaseosa. Los microorganismos desempeñan funciones de gran importancia en relación con procesos de edafogénesis, incluyendo ciclos biogeoquímicos y son agentes activos en la degradación de xenobióticos (McCaig *et al.*, 2001; Nogales, 2005).

En el suelo se desarrolla una gran diversidad bacteriana. Generalmente, en este hábitat existen de 10^6 a 10^9 bacterias por gramo de suelo (Atlas y Bartha, 2002). Los géneros más frecuentes son *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Caulobacter*, *Callulomonas*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Xanthomonas* (Atlas y Bartha, 2002).

Los hongos constituyen la proporción más elevada de la biomasa microbiana del suelo y los géneros que se encuentran con mayor frecuencia incluyen a *Aspergillus*, *Geotrichum*, *Penicillium* y *Trichoderma* (Atlas y Bartha, 2002). Las levaduras también son frecuentes en la mayoría de los suelos.

Algunos de los microorganismos presentes en el suelo sólo exhiben una actividad intensa y un crecimiento rápido cuando se presentan condiciones favorables y altas concentraciones de sustratos fácilmente asimilables; entre ellos se encuentran géneros como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Penicillium*, *Aspergillus* y *Mucor* (Atlas y Bartha, 2002).

Determinados suelos favorecen el crecimiento de un grupo de microorganismos con un metabolismo particular. Tal es el caso de la presión de selección que ejercen los compuestos orgánicos persistentes en suelos contaminados. Asimismo, los factores abióticos tales como la temperatura, las condiciones de luz o el pH, también delimitan el tipo de poblaciones microbianas que se puede desarrollar (Atlas y Bartha, 2002).

I.4 Aspectos relacionados con la degradación de compuestos recalcitrantes por microorganismos

Todo compuesto natural es biodegradable, prueba de ello, es que no existen acumulaciones de algún compuesto en particular en el ambiente, exceptuando el caso particular de los combustibles fósiles debido a las condiciones adversas en que se generan. En 1965, Alexander observó que si se dan las condiciones adecuadas en el ambiente, ningún compuesto natural es resistente a la degradación. La reciente aparición de nuevos sustratos disponibles en el ambiente, tales como los xenobióticos, activa vías metabólicas que permiten su aprovechamiento y conlleva a su degradación (Atlas y Bartha, 2002).

La degradación de contaminantes orgánicos recalcitrantes es posible por la actividad de un porcentaje de los microorganismos que habitan en el suelo. La presencia de un solo tipo de sustrato en el medio es un evento muy poco común por lo tanto es importante examinar las vías de degradación de los diferentes componentes por separado así como la interacción y dinámica que pudiera existir entre los componentes microbianos del consorcio y los múltiples sustratos disponibles (Allard y Neilson, 1997).

Algunos de los factores involucrados en la biodegradación de un compuesto orgánico recalcitrante son el número y posición de sus sustituyentes halogenados, el peso molecular, la biodisponibilidad y el tipo y cantidad de microorganismos empleados en su degradación.

Los compuestos de dos a cuatro anillos como el naftaleno, antraceno o pireno, son fácilmente biodegradados por muchos organismos; su oxidación se inicia por oxigenasas que requieren oxígeno elemental. Los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs) de mayor número de anillos, son bastante persistentes debido a su complejidad y baja solubilidad, por lo tanto son los que representan una mayor amenaza ambiental (Allard y Neilson, 1997).

Los BPCs con pocos átomos de cloro en la molécula pueden entrar fácilmente en la trayectoria de la oxidación aerobia del bifenilo. Un alto grado de cloración hace difícil el ataque mediante enzimas. Los BPCs sujetos a degradación aerobia son los que contienen de uno a tres átomos de cloro en la molécula (Ruiz-Aguilar, 2005).

En general, hay que considerar una serie de factores en la degradación de los compuestos recalcitrantes. El oxígeno juega un papel importante en la degradación de una gran variedad de compuestos orgánicos persistentes, ya que las bacterias lo utilizan como aceptor de electrones (Allard y Neilson, 1997). Por otro lado, un estudio realizado con *Pseudomonas cepacia* (Comeaeu *et al.*, 1993) demostró el papel que juega la densidad celular del inóculo en la degradación del herbicida xenobiótico 2,4-D (ácido 2,4-dichlorofenoxiacético). Otras consideraciones referentes a la degradación de compuestos recalcitrantes incluyen la activación de las enzimas involucradas en su degradación así como la biodisponibilidad del

contaminante. Aunque los microorganismos en el medio presenten la maquinaria enzimática para degradarlo, si no tienen acceso a él, su degradación no procederá. Por otro lado, los metabolitos producidos a lo largo de la transformación pueden ser tóxicos para el mismo organismo encargado de la biodegradación o para los demás microorganismos u otros organismos como plantas o animales. Los metabolitos también pueden jugar un papel en la biodisponibilidad del contaminante, en caso de que faciliten su asociación con otros compuestos y dificulten su degradación. Sobre todo en medios líquidos, hay un límite por debajo del cual la degradación del compuesto es lenta o incluso despreciable, esto habla de que se requieren ciertas concentraciones para inducir y mantener la actividad de las enzimas degradadoras. Aunque algunos grupos de microorganismos son metabólicamente versátiles y por lo tanto son capaces de degradar un amplio espectro de sustratos, no hay organismos o grupos de ellos que se puedan aplicar universalmente en las tecnologías de biorremediación. Es necesario considerar el potencial fisiológico y bioquímico del microorganismo empleado en cada caso particular. También hay que considerar que la biodegradación implica la mineralización del contaminante y no solamente su biotransformación (Allard y Neilson, 1997).

I.5 Degradación de bifenilo por bacterias

El bifenilo es un compuesto formado por dos anillos de benceno. Los BPCs se producen comercialmente por la cloración del bifenilo en presencia de cloruro férrico y/o yoduro férrico (Ruiz-Aguilar, 2005). A través de este proceso es posible obtener hasta 209 congéneres diferentes conteniendo desde uno hasta diez átomos de cloro (Sylvestre 1995, Ruiz-Aguilar, 2005; Furukawa, 2006).

Varios congéneres de BPCs pueden ser transformados tanto por microorganismos aerobios como anaerobios (Abramowicz, 1990; Furukawa, 1994; Evans *et al.*, 1996; Abraham *et al.*, 2002). Las bacterias que son capaces de utilizar el bifenilo como fuente de carbono y energía cometabolizan los BPCs a ácidos clorobenzoicos (Sylvestre, 1995; Furukawa, 2006) y 2-hidroxipenta-2,4-dienoato a lo largo de la vía superior del bifenilo y utilizan enzimas catabólicas *vía* una ruta oxidativa. Posteriormente, a lo largo de la vía inferior alifática del bifenilo, se convierte el segundo producto de la vía superior a acetil CoA (Seeger *et al.*, 1997). Ésta es también la trayectoria habitual para la degradación de los hidrocarburos aromáticos (Fig. 1).

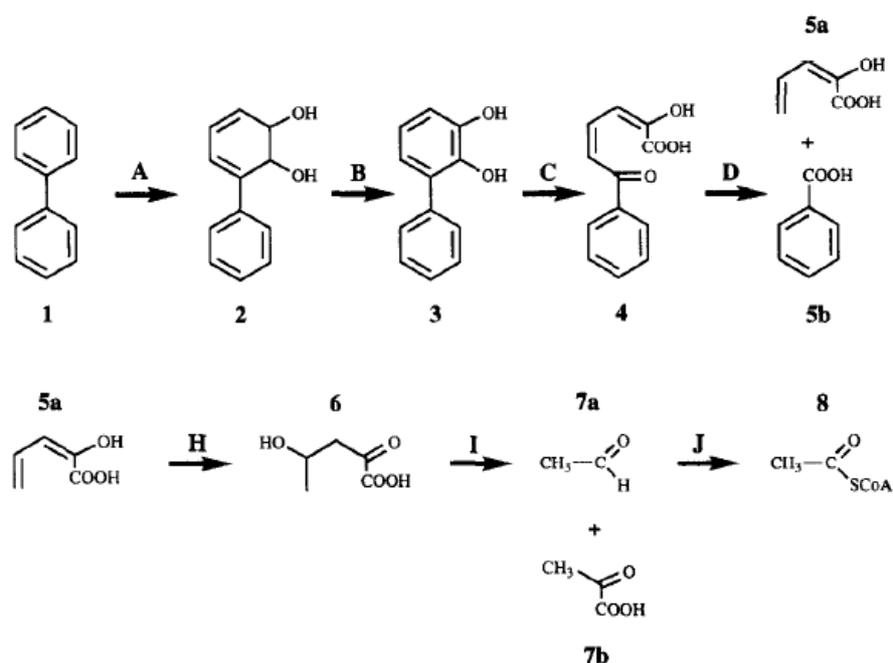


Figura 1. Vía de degradación del bifenilo codificada por el locus *bph*. Metabolitos: 1) bifenilo; 2) bifenil-2,3-dihidrodiol; 3) 2,3-dihidroxibifenil; 4) ácido 2-hidroxi-6-oxo-6-fenilhexa-2,4-dienóico; 5a) ácido 2-hidroxipenta-2,4-dienóico; 5b) ácido benzóico; 6) ácido 4-hidroxi-2-oxovalérico; 7a) acetaldehído; 7b) ácido pirúvico; 8) acetil CoA. Enzimas: A) bifenil-2,3-dioxigenasa; B) bifenil-2,3-dihidrodiol-2,3-deshidrogenasa; C) 2,3-dihidroxibifenil-1,2-dioxigenasa; D) 2-hidroxi-6-oxo-6-fenilhexa-2,4-dienoato hidrolasa; H) 2-hidroxipenta-2,4-dienoato hidratasa; I) 4-hidroxi-2-oxovalerato aldolasa; J) acetaldehído deshidrogenasa (FUENTE: Seeger *et al.*, 1997).

Desde hace más de 30 años, los estudios de Ahmed y Focht (1972) y Furukawa (1978) demostraron que la vía catabólica del bifenilo/BPC era inducida por la presencia del bifenilo, específicamente se inducen las enzimas de la vía superior.

Las enzimas de la vía del bifenilo no son muy específicas y pueden utilizarse para degradar compuestos análogos a los BPCs, por lo tanto los microorganismos que crecen en presencia de bifenilo son más eficientes para degradar un amplio grupo de compuestos relacionados que aquellos que no lo hacen (Nam *et al.*, 2001; Kasai *et al.*, 2003).

Los genes encargados del catabolismo del bifenilo y de los BPCs se denominan *bph* y constituyen un operón. En presencia del bifenilo se activa su transcripción (Furukawa, 2006). La vía de degradación del bifenilo está bien conservada en bacterias y parece ser que los genes que codifican para las enzimas involucradas en la vía superior del bifenilo están filogenéticamente relacionadas en un amplio grupo de bacterias incluyendo *Pseudomonas*

sp. cepa LB400, *Comamonas testosteroni* y *Escherichia coli* (Keil *et al.*, 1972; Erickson y Mondello, 1992; Bergeron *et al.*, 1994).

I.6 Degradación de bifenilo por hongos

Existen pocos reportes sobre la degradación de bifenilo por hongos. Se sugiere que los hongos ligninolíticos son los organismos más promisorios para la degradación de contaminantes ambientales. *Phanerochaete chrysosporium* es el mejor estudiado de este tipo de organismos (Ruiz-Aguilar *et al.*, 2002). Este hongo es el principal degradador de lignina en la naturaleza y las mismas enzimas que emplea para su degradación pueden ser las responsables de transformar BPCs. De la misma forma, se ha reportado la utilización de *Trametes versicolor* y *Lentinus edodes* para la biodegradación de BPCs presentes en el suelo (Ruiz-Aguilar *et al.*, 2002).

Valli y Gold (1991) propusieron una vía general de degradación oxidativa de compuestos aromáticos clorados por hongos que comienza con una dechloración-4-oxidativa ya sea por una lignina peroxidasa o por la peroxidasa dependiente de manganeso.

I.7 Métodos moleculares para la identificación de microorganismos

La identificación de los microorganismos provenientes de una muestra de suelo es posible mediante la combinación de técnicas de biología molecular que incluyen el empleo de marcadores moleculares, su amplificación y análisis mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) y los polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, por sus siglas en inglés) y finalmente su identificación a partir del análisis de su secuencia nucleotídica. Esta metodología para identificar microorganismos se puede ampliar también con estudios de genómica y proteómica.

I.7.1 El gen bacteriano 16S rRNA como marcador molecular

El análisis de marcadores moleculares en los ácidos nucleicos (DNA y RNA) es una herramienta para conocer la diversidad bacteriana del suelo. El gen bacteriano 16S rRNA puede emplearse como marcador molecular ya que se encuentra presente en todas las células y su secuencia está bien conservada. Este gen permite determinar la composición de los consorcios bacterianos así como la cuantificación de la abundancia de microorganismos específicos (Nogales, 2005).

Hay dos factores que son clave al momento de aplicar esta técnica de biología molecular al estudio de composición de un consorcio microbiano. Uno de ellos es la eficiencia de

extracción del DNA metagenómico, que se realiza mediante procesos químicos, físicos y enzimáticos que aseguran la ruptura de las estructuras celulares resistentes, características de algunos microorganismos del suelo; otro factor es la eliminación de sustancias contaminantes (en este caso, como componentes del medio de cultivo o solventes) que se extraen conjuntamente con los ácidos nucleicos y afectan la calidad del DNA e interfieren en los análisis posteriores (O'Donnell y Görres, 1999).

El análisis de la secuencia de los genes que codifican para RNA ribosómico, particularmente el gen que codifica para la porción ribosómica de la subunidad ribonucleoproteica menor del ribosoma bacteriano (16S rRNA) ha demostrado ser una herramienta poderosa para analizar la composición de consorcios bacterianos (Dojka *et al.*, 1998; Head *et al.*, 1998; Miskin *et al.*, 1999; Nogales *et al.*, 2001; Nogales, 2005). Este marcador molecular presenta una serie de ventajas: está presente en todos los organismos y en todos tiene la misma función; diferentes regiones de la molécula presentan distinto grado de variabilidad en secuencia, lo que permite realizar comparaciones con diferente nivel de resolución taxonómica; su transferencia es vertical por lo tanto el gen sólo puede transmitirse entre la misma especie; la longitud de su secuencia tiene un tamaño adecuado para proporcionar suficiente información, las bases de datos están muy bien representadas y el análisis de la secuencia permite realizar reconstrucciones filogenéticas de los microorganismos (Nogales, 2005).

I.7.2 PCR-RFLP para estimar la diversidad de un consorcio microbiano

El análisis molecular de la composición de un consorcio microbiano es posible a través de la comparación de secuencias del gen 16S rRNA para lo cual es necesario amplificar los ácidos nucleicos, purificados, mediante PCR utilizando oligonucleótidos específicos para bacterias. Posteriormente se lleva a cabo una clonación con lo cual es posible ligar fragmentos del DNA metagenómico, en este caso el gen 16S rRNA, para su propagación dentro de un hospedero. Desde la década de 1970 se han utilizado plásmidos, moléculas circulares de DNA y de replicación independiente al cromosoma, como receptoras de fragmentos de DNA provenientes del mismo o de otro organismo (Bolívar, 2004). Una vez obtenidas las clonas, se construye una biblioteca de genes ribosomales y finalmente se caracterizan mediante el análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) (Muyzer *et al.*, 1993; McCaig *et al.*, 2001; Escalante *et al.*, 2004).

Los cambios en la secuencia de un gen que se heredan a la siguiente generación y que coexisten con el gen original resultan en polimorfismos, por lo tanto, es posible que dos o más variantes de un gen circulen en una población simultáneamente (Lemey *et al.*, 2009). La técnica de RFLP consiste en cortar genes de rRNA clonados con endonucleasas de restricción y aprovecha la variación en la posición de los sitios de restricción (secuencias de

corte de las endonucleasas de restricción) para distinguir filotipos que corresponden a especies o géneros filogenéticamente distantes (Vallaey *et al.*, 1997).

La técnica que combina PCR con RFLP se aplica exitosamente para estimar la diversidad de microorganismos de muestras ambientales. Mediante la clonación, solo las secuencias más abundantes son detectadas aunque de manera azarosa se pueden seleccionar (detectar) algunas secuencias poco abundantes (McCaig *et al.*, 2001). El análisis de la abundancia de secuencias de distintos tipos (perfiles en el RFLP) es una manera semi-cuantitativa de evaluar la abundancia de microorganismos presentes en el medio estudiado (Dojka *et al.*, 1998).

I.7.3 Identificación de bacterias mediante el análisis del gen 16S rRNA

El análisis del metagenoma de un consorcio microbiano permite la caracterización filogenética de la diversidad microbiana así como la identificación de sistemas biológicos de resistencia a compuestos contaminantes (Escalante *et al.*, 2004). La identificación bacteriana por comparación filogenética utilizando el gen 16S rRNA permite determinar si los microorganismos del consorcio son bacterias ya conocidas o si pertenecen a nuevos grupos y si están o no relacionadas filogenéticamente a las ya conocidas (Escalante *et al.*, 2004).

GeneBank es el archivo de secuencias de DNA más importante y extenso. Esta base de datos contiene secuencias de DNA de diversos organismos equivalente a 85,759,764 pares de bases lo que a su vez equivale a aproximadamente 82,853,685 genes (Lemey *et al.*, 2009) y cuatro mil genomas bacterianos completos de tamaño similar al de *E. coli* (Escalante *et al.*, 2004). Mediante paquetes computacionales de bioinformática es posible determinar si el DNA clonado tiene similitud significativa con alguna de las secuencias presentes en la base de datos. Si existe dicha similitud y se conoce la función de la secuencia depositada en el banco, entonces la secuencia clonada podría tener una actividad biológica similar (Escalante *et al.*, 2004) lo que resultaría útil para extrapolar la capacidad para metabolizar compuestos resistentes a la degradación.

La complejidad genética de una muestra de suelo es una función del número de genomas presentes en ella. Estudios realizados por Øvreås *et al.* (1998) y Torsvik y Øvreås (2002) indicaron que un suelo sin perturbar posee una complejidad equivalente a 6,000 – 10,000 genomas mientras que un suelo agrícola contaminado con metales pesados posee entre 350 a 1,500 genomas que equivalen a tan sólo 40 genomas cultivables.

La identificación de microorganismos tradicionalmente se ha realizado mediante técnicas de cultivo tales como el conteo en placa. Sin embargo, únicamente entre 0.1% y el 10% de las bacterias en el ambiente son cultivables. Esto se debe a que se desconocen los

requerimientos nutricionales y las condiciones fisicoquímicas necesarias para el desarrollo de un gran número de grupos microbianos. Además, se tiene poca información y no se asemejan las relaciones simbióticas, comensales o parasitarias que mantienen los miembros de una comunidad en su ambiente natural (Muyzer *et al.*, 1993; Dojka *et al.*, 1998; Escalante *et al.*, 2004; Nogales, 2005).

Se ha propuesto que las bacterias no cultivables son microorganismos filogenéticamente similares a los cultivables, pero en un estado fisiológico que los hace difícilmente cultivables (McDougald *et al.*, 1998). La base de esta explicación es que algunas bacterias cultivables pueden ser viables pero no cultivables en condiciones ambientales adversas y posteriormente revertirse a un estado cultivable cuando las condiciones favorables se restauran. Entonces, del 90 al 99% de las bacterias no cultivables están representadas por su contraparte cultivable (Rondon *et al.*, 1999).

II. ANTECEDENTES

II.1 Problemática ambiental en San Nicolás, Tequisquiapan, Querétaro.

La fabricación de ladrillos de manera artesanal es la principal actividad de la localidad y una de las fuentes más importantes de ingresos económicos (Anaya *et al* 2010; Benitez, 2010). Uno de los principales problemas ambientales asociados a las ladrilleras es la combustión ineficiente en los hornos donde se cuecen los ladrillos. El combustóleo es el principal combustible empleado y está compuesto por una mezcla de hidrocarburos de alto peso molecular; sin embargo es un producto caro y los fabricantes de ladrillo optan por otras alternativas. Así, se emplea una variedad de combustibles como basura, madera, llantas (Costilla *et al.*, 2006) y plásticos (Anaya *et al.*, 2010). Anteriormente se utilizó aceite quemado que resultaba más económico porque es un desecho e incluso su venta es ilegal. Los aceites que se emplearon durante algún tiempo en la fabricación de ladrillos en San Nicolás estaban contaminados con cantidades importantes (300 partes por millón) de BPCs (UAQ *et al.*, 2005). Asimismo, las cenizas generadas por los hornos contienen estos compuestos (Costilla *et al.*, 2006) y en el peor de los casos dioxinas y furanos. En general, la quema de estos combustibles por la actividad de producción artesanal del ladrillo, genera grandes cantidades de contaminantes por periodos prolongados (Álvarez, 2009; Anaya *et al.*, 2010).

La mayoría de los hornos ladrilleros se encuentran dentro de la comunidad, el 47% se encuentra en el traspatio de casas habitación (Anaya *et al.*, 2010; Benítez, 2010; Costilla *et al.*, 2006). Anaya *et al* (2010) estiman que 190,000 personas viven en zonas a 5 km de las fuentes de emisión y un promedio de 8 personas por horno se exponen ocupacionalmente. Además, la única escuela primaria de la localidad está rodeada de hornos ladrilleros. Los niños son más vulnerables a los compuestos contaminantes provenientes de los hornos ya que consumen más aire y agua en relación con su peso que los adultos y pasan más tiempo en “microambientes”, lo que aumenta su tiempo de exposición y su riesgo.

II.2 Evaluación de la contaminación en San Nicolás

Se han hecho múltiples estudios que caracterizan el suelo y a la población infantil de este sitio. El departamento de Toxicología Ambiental de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí junto con el Centro de Estudios Académicos sobre Contaminación Ambiental (CEACA) de la Universidad Autónoma de Querétaro llevaron a cabo un estudio sobre la presencia de BPCs en el suelo y en los niños de San Nicolás. Encontraron que de las 36 muestras de suelo analizadas, el 30% superó la guía de referencia para suelo en lugares habitacionales propuesta por la Agencia de Protección

Ambiental de los Estados Unidos que es de 50 ppm (partes por millón) de BPCs; además, dos de estas muestras presentaron 3035 y 6060 ppm de BPCs respectivamente, los cuales son niveles muy altos. Además, llevaron a cabo una estimación de riesgo y concluyeron que el 100% de la población está expuesta a niveles superiores del nivel de riesgo mínimo (0.02 µg/kg/día BPCs oral) para presentar daño inmunológico. Por otro lado, se evaluó la sangre de 43 niños habitantes de la localidad y se encontraron desde 28 hasta 309 ppm de BPCs de 3 diferentes congéneres en el 47% de las muestras. Estos valores se consideran altos comparados con los resultados de un estudio llevado a cabo en Estados Unidos donde se midió la concentración de los tres mismos congéneres y no se detectaron en sangre (Costilla *et al.*, 2006).

Por otro lado, Ize-Lema *et al* (2004) midieron la presencia de metales y compuestos orgánicos persistentes en sangre de niños habitantes de sitios contaminados, incluyendo la localidad de San Nicolás. Encontraron que el 30% de los 37 niños muestreados contenía lindano (plaguicida prohibido desde 1991), todos presentaron niveles detectables de DDE (1,1-*bis*-(4-clorofenil)-2,2-dicloroetano) lo que indica una exposición generalizada al insecticida DDT (1,1-*bis*-(4-clorofenil)-2,2,2-tricloroetano) en el pasado ya que aquél es su principal metabolito. El 35% de los niños presentó plomo y el 5% arsénico. Finalmente, el 50% de la población estudiada presentó BPCs en sangre.

La COFEPRIS junto con la Comisión de Evidencia y Manejo de Riesgos y la Secretaría de Salud llevaron a cabo, en 2005, un monitoreo de BPCs en suelos de San Nicolás y encontraron que todas las muestras presentaron BPCs; sin embargo, el 100% de las muestras de suelo en zona residencial cumplieron con el límite de 5.0 mg/kg establecido por la Norma Oficial Mexicana NOM-133-SEMARNAT-2000 para este uso. En el caso de suelo de uso industrial (entrada de horno ladrillero), el 90% de las muestras de suelo presentó niveles de BPCs por debajo del límite de 25.0 mg/kg establecido en la norma. El 10% restante se encuentra dos veces por arriba de dicho límite.

II.3 Situación actual

Es un hecho que los habitantes de San Nicolás están expuestos a una multitud de contaminantes (Costilla *et al.*, 2006). Los niveles de BPCs alcanzaron niveles alarmantes (Ize-Lema *et al.*, 2004) sin embargo no hay que dejar de lado la exposición a hidrocarburos policíclicos aromáticos, aldehídos, dioxinas (Costilla *et al.*, 2006), hidrocarburos aromáticos halogenados (Anaya *et al.*, 2010) y metales (Ize-Lema *et al.*, 2004). Además, debido a la semivolatilidad de algunos congéneres de BPCs, el suelo no es el único contaminado sino también al aire y el polvo (Costilla *et al.*, 2006).

En San Nicolás y sus alrededores se encuentran campos agrícolas, empresas productoras de leche y la presa Centenario, de donde se extraen peces para consumo humano. Como los

estudios lo demuestran, los niveles de BPCs en suelo han disminuido; sin embargo, considerando que la Administración de Alimentos y Fármacos de Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) establece límites desde 0.2 hasta 2 ppm de BPCs para alimentos (COFEPRIS, 2005), que los BPCs se biomagnifican a lo largo de la cadena alimentaria y que los niños de la localidad presentan altos niveles del compuesto en la sangre, resulta prioritario prevenir la contaminación por este compuesto así como dar un tratamiento a la que ya existe.

La población de San Nicolás no está consciente de los riesgos ambientales y a la salud por la prolongada y continua exposición al humo de las ladrilleras y al uso de aceites quemados, combustóleo y demás combustibles (Benítez, 2010). En general, en México no se han establecido medidas para el tratamiento o disposición de los BPCs, tampoco hay programas de biomonitoreo en sitios de alto riesgo (Costilla *et al.*, 2006), todo esto impide el establecimiento de estrategias para prevenir y resolver los problemas de contaminación generados por BPCs.

En 1996, una de las metas del plan de Acción Regional de América del Norte sobre BPCs, aprobado en el marco de la Comisión para la Cooperación Ambiental (CCA), consistió en la eliminación y manejo adecuado de BPCs existentes a lo largo de todo su ciclo de vida. Con base en los resultados de su estudio, la COFEPRIS, propone elaborar un programa de restauración de sitios contaminados con dicho compuesto lo que incluye su remediación.

De esta forma, el presente trabajo pretende ofrecer un mejor conocimiento sobre el tipo y potencial de aplicación que pueden tener microorganismos provenientes de estos sitios.

III. JUSTIFICACIÓN

La industria, la agricultura, las actividades minera y petrolera, además de áreas no controladas como los basureros e incluso fuentes naturales, liberan al ambiente grandes cantidades de metales y compuestos orgánicos resistentes a la degradación, lo que resulta en sitios contaminados. Debido a que muchos de estos compuestos son tóxicos y además se encuentran en altas concentraciones en el ambiente, resultan peligrosos para la biota. Asimismo, perturban las características físico-químicas del agua, el aire y el suelo.

Es necesario disponer y tratar de manera adecuada estos contaminantes con el fin de evitar su dispersión y acumulación, así como disminuir las concentraciones que ya existen en el ambiente.

La biorremediación es un método alternativo de descontaminación a los métodos físicos y químicos. Emplea microorganismos para degradar contaminantes, puede resultar más eficiente y genera un menor impacto ambiental (Allard y Neilson, 1997). La microbiota que habita en sitios contaminados activa rutas de degradación para aprovechar los contaminantes como fuente de carbono, nitrógeno y energía; de hecho, los microorganismos más versátiles se han aislado de estos sitios ya que presentan una gran flexibilidad genotípica que les permite aprovechar una variedad de sustratos (Witzing *et al.*, 2006).

Existen una variedad de estudios acerca de microorganismos capaces de degradar compuestos orgánicos persistentes, así como de acumular metales, que pueden emplearse en tecnologías de biorremediación; sin embargo, cuando se propone un proceso de remediación, los procedimientos deben ser específicos al sitio evaluado ya que deben considerarse sus propiedades geográficas, físico-químicas y microbiológicas. De la misma forma deben ser específicos al contaminante que se planea remover (Allard y Neilson, 1997).

Los resultados del presente estudio contribuirán con la identificación y caracterización de una fracción de la población microbiana que habita en el sitio específico de San Nicolás; asimismo, los microorganismos descritos pueden emplearse como base para desarrollar técnicas de biorremediación.

IV. HIPÓTESIS

Si los suelos están contaminados con compuestos orgánicos persistentes entonces albergan microorganismos poco estudiados que presentan capacidades interesantes para ser propuestos en sistemas de biorremediación.

V. OBJETIVOS

V.1 Objetivo general

Estudiar e identificar a los microorganismos provenientes de suelos contaminados con combustóleo y bifenilos policlorados (BPCs) de la localidad de San Nicolás, Tequisquiapan, Querétaro, que tengan la capacidad de degradar bifenilo como compuesto modelo.

V.2 Objetivos particulares

1. Cultivar y enriquecer las poblaciones microbianas provenientes de suelos de San Nicolás, Tequisquiapan, utilizando bifenilo.
2. Estandarizar la técnica de extracción y análisis de bifenilo por cromatografía de gases con detector FID.
3. Evaluar el crecimiento de los cultivos microbianos enriquecidos en cultivo en suspensión en presencia del contaminante.
4. Evaluar la biodegradación del contaminante modelo por cultivos microbianos en cultivo en suspensión.
5. Identificar a los componentes del consorcio que presente la mayor capacidad de degradación de bifenilo utilizando técnicas de biología molecular.

VI. ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO

El trabajo realizado se dividió en dos etapas: la primera consistió en evaluar la degradación de bifenilo por microorganismos provenientes de suelos contaminados y la segunda consistió en identificarlos mediante la clonación del gen 16S rRNA y en construir una biblioteca de genes ribosomales (Fig. 2).

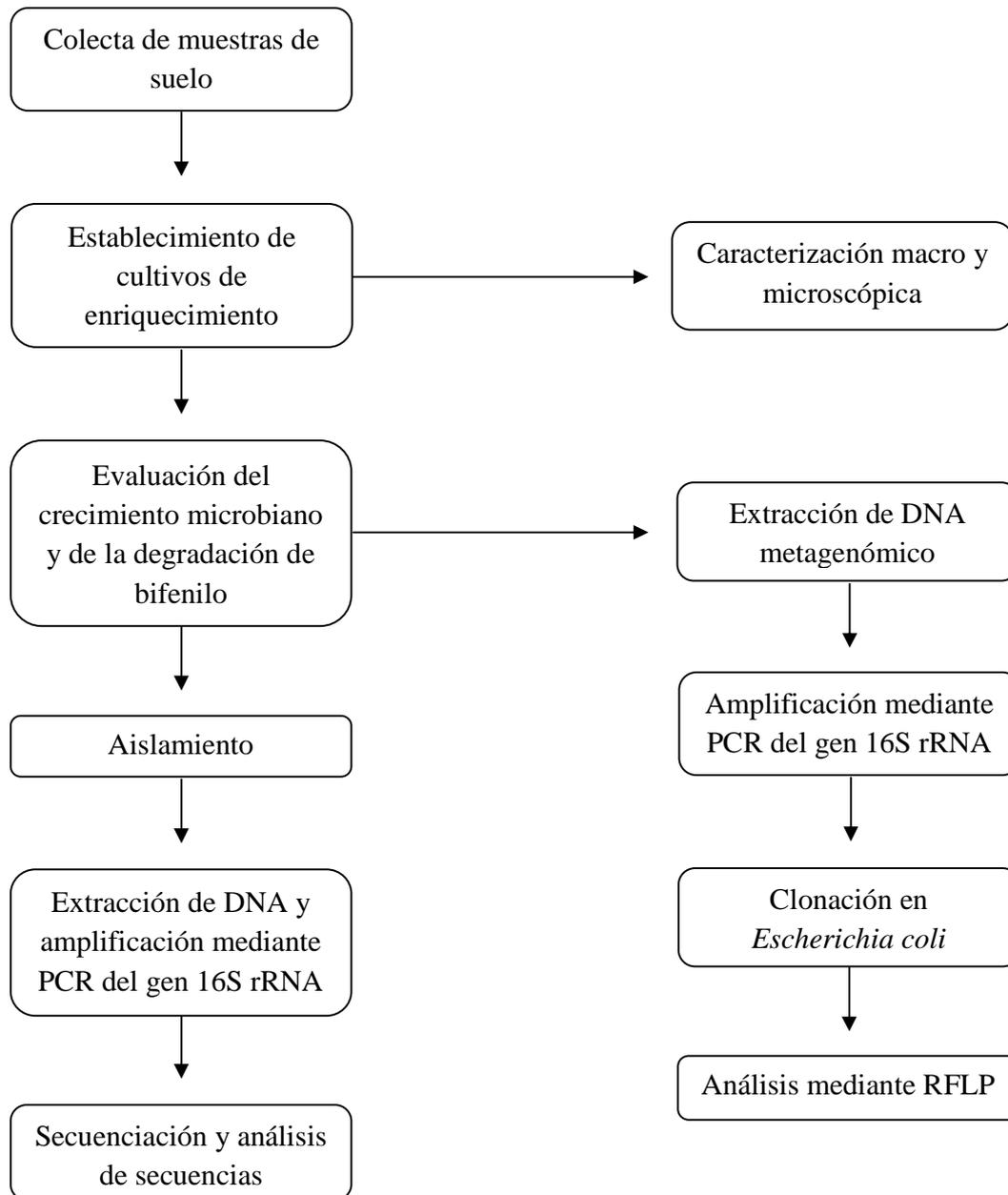


Figura 2. Esquema general de trabajo

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

VII.1 Degradación de bifenilo por microorganismos provenientes de suelos contaminados

La primera etapa consistió en evaluar la degradación de bifenilo por los microorganismos presentes en los consorcios provenientes de los suelos contaminados. Para realizar lo anterior fue necesario realizar un muestreo del sitio en estudio. A continuación se describe a detalle los materiales y métodos que incluyeron esta etapa del proyecto.

VII.1.1 Colecta de muestras de suelo

El sitio de muestreo se ubicó en la localidad de San Nicolás, municipio de Tequisquiapan, al sureste del estado de Querétaro. Se encuentra a 20° 28.42' N, 99° 56.15' O y a 1,920 metros sobre el nivel del mar (COFEPRIS, 2005). De acuerdo a los datos del segundo Censo de Población y vivienda de 2005 del INEGI, el municipio cuenta con un total de 54,929 habitantes, de los cuales el 7.4% (4,065) habitan en San Nicolás. Esta localidad se sitúa, aproximadamente, a 8 kilómetros de la cabecera municipal y su principal actividad económica es la producción artesanal de tabique para la construcción (González *et al.*, 2005). Se colectaron 3 muestras de suelo en la entrada de 3 hornos ladrilleros en julio de 2009 (Fig. 3). El primer punto de muestreo se ubicó enfrente de la telesecundaria de la localidad, el segundo en la calle de Reforma y el tercero en la calle de Acosta. El suelo se colectó con pala y se almacenó en cubetas de plástico de 4 litros, cerradas y en refrigeración, hasta su utilización. En la figura 3 se presenta el mapa de San Nicolás. Los puntos en rojo señalizan los tres puntos de muestreo.



Figura 3. Mapa de localización de los sitios de muestreo en la localidad de San Nicolás, Tequisquiapan, Querétaro (fuente: COFEPRIS, 2005).

VII.1.2 Preparación de cultivos de enriquecimiento

Se estableció un cultivo de enriquecimiento a partir de las tres muestras de suelo. Por cada muestra, se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 125 ml, un gramo de suelo tamizado con malla #10 (2,000 μm) y 25 ml de medio mineral líquido (Tabla 1) adicionado con 100 ppm de bifenilo (Aldrich® Chemical Company, EUA, 99.5%) disuelto en hexano (Burdick & Jackson® Honeywell, EUA, grado HPLC). Éste se agregó una vez que el medio mineral estuvo estéril y frío. El procedimiento se hizo por duplicado. Las unidades experimentales se mantuvieron en una incubadora de agitación orbital (IKA® KS 4000 i control), a 120 rpm y 30°C.

Tabla 1. Formulación del medio mineral líquido.

Reactivo	Cantidad (g)
KNO ₃ (Karal, México, 99%)	1
FeCl ₃ (Karal, México, 97-102%)	0.02
Mg ₂ SO ₄ (Karal, México, 98-102%)	0.2
NaCl (Karal, México, 99%)	0.1
CaCl ₂ (Karal, México, 99-105%)	0.1
K ₂ HPO ₄ (Karal, México, 98%)	1
Extracto de levadura (Becton Dickinson de México)	0.05

* Los nutrientes se disolvieron en 1,000 ml de agua desionizada, siguiendo el orden

* Se ajustó el pH a 7.0

* Se filtró

* Se esterilizó a 15 psi durante 15 min.

Se realizaron resiembras cada siete días, en total se llevaron a cabo tres. En cada ocasión, se tomó 1 ml del medio de cultivo anterior y se agregó a un matraz Erlenmeyer con 25 ml de medio de cultivo mineral fresco adicionado con 100 ppm de bifenilo. En todas las ocasiones se incubaron a 120 rpm y 30°C.

VII.1.3 Caracterización macro y microscópica

A partir de la última resiembra, del cultivo de enriquecimiento se tomaron muestras para caracterizar a los microorganismos provenientes del suelo contaminado. La caracterización microscópica de bacterias se llevó a cabo mediante tinción de Gram. Por cada matraz, se tomó una asada del medio de cultivo y se colocó en un portaobjetos. Se dejó secar y posteriormente se fijó aplicando calor, en 3 ocasiones, con un mechero de Bunsen por la parte de abajo. Se procedió con la tinción y se observó al microscopio (Leica Galen III) con una resolución 100X.

La caracterización microscópica de hongos se llevó a cabo mediante microcultivo. Con el fin de aislar a las diferentes morfologías, se hizo un cultivo por dilución en agar dextrosa y papa (PDA por sus siglas en inglés) (Bioxon® Becton Dickinson de México) con 5% de agar bacteriológico

(Bioxon® Becton Dickinson de México) como agente gelificante adicionado con 1,000 U/ml (unidades por mililitro) de penicilina y estreptomina. Se sembraron 100 µl del medio de cultivo de la última siembra del cultivo de enriquecimiento adicionado con bifenilo. Se incubaron a 30°C de 3 a 7 días.

Se describió la forma, los bordes, la elevación, el aspecto y el color de las colonias de hongos obtenidas. Posteriormente se realizó el microcultivo, para lo cual se colocó un portaobjetos sobre una varilla de vidrio, dentro de una caja de Petri. A cada extremo del portaobjetos, se colocó 1 cuadro de PDA de 1cm x 1cm. Con un asa micológica, se tomó una muestra de micelio y se picaron 4 extremos del cubo de agar. Esto se repitió por cada hongo con aparente morfología diferente. El agar se cubrió con un cubreobjetos y se llenó la caja de Petri con una solución de glicerol al 10%. Se incubaron a 30°C durante 6 días.

VII.1.4 Conservación de los microorganismos

Una vez que el cultivo de enriquecimiento se estabilizó se procedió a cosecharlo. Se colocaron 1.2 ml de medio de cultivo en microtubos, se centrifugaron en una microcentrifuga (Spectrafuge 16M Labnet) a 16,000 x g durante 5 min, se descartó el sobrenadante. El botón celular resultante se secó y se le agregó glicerol al 25%. Se resuspendió en vórtex y se almacenó a -20°C. La cosecha se hizo por duplicado.

VII.1.5 Estandarización de extracción de bifenilo en medio líquido

Con el fin de evaluar con precisión la degradación del bifenilo, fue necesario estandarizar la técnica de extracción de dicho compuesto en medio líquido así como elaborar una curva patrón. Se colocaron 25 ml de agua destilada en un matraz Erlenmeyer y se agregó bifenilo a una concentración de 100 ppm. Se hicieron 5 repeticiones. El compuesto de interés se extrajo con hexano en tres extracciones sucesivas (15 ml, 15 ml y 10 ml). La fase orgánica final se deshidrató con Na₂SO₄ (Productos químicos Monterrey, México, 99%) y el bifenilo se concentró en 10 ml de hexano con ayuda de un rotavapor (Heidolph Laborota 4000).

Por otro lado, se prepararon las muestras para la curva patrón. Se construyó con concentraciones de 0, 10, 30, 50, 100, 150, 200 ppm de bifenilo.

VII.1.6 Análisis de bifenilo por cromatografía de gases

La concentración de bifenilo se evaluó por medio de un cromatógrafo de gases (PerkinElmer™ Clarus 500) con detector FID. La temperatura del detector fue de 220°C y la temperatura del inyector fue de 100°C. Las especificaciones del método fueron las siguientes: la temperatura

inicial del horno se situó en 80°C y se mantuvo ahí por 1 min, aumentó 6°C cada min hasta llegar a 180°C y ahí se mantuvo 2 min. La corrida duró 19.67 min en total. El gas acarreador fue nitrógeno y el flujo inicial fue 6.1ml/min. Se empleó una columna capilar Rtx®-5.

En cada ocasión, se inyectó 1 µl de muestra. Generalmente, las lecturas se hicieron por duplicado en el caso de la estandarización y por triplicado en el caso de la curva patrón.

Se consideró que la técnica estaba estandarizada cuando se logró una eficiencia de recuperación de bifenilo mayor al 90%.

VII.1.7 Ensayo preliminar de degradación de bifenilo

Con el fin de determinar qué muestra contenía al consorcio microbiano más eficiente para degradar bifenilo y en qué tiempo presentaba la mayor actividad, se llevó a cabo una cinética de degradación preliminar. A partir de los cultivos estables provenientes de cada muestra, se tomó un inóculo de 1.5 ml y se colocó en un matraz con 25 ml de medio mineral líquido adicionado con 100 ppm de bifenilo. Se incubaron en las mismas condiciones que el cultivo de enriquecimiento (apartado VII.1.2) y se realizaron 2 repeticiones por muestra. La cinética de degradación de bifenilo se evaluó durante 72 h. Cada 12 h se retiró un matraz, junto con su duplicado, y se conservaron a -20°C hasta el proceso de extracción. Se incluyeron 4 unidades experimentales (matraces) sin inóculo para evaluar la degradación abiótica a las 0 y a las 72 h.

El bifenilo se extrajo, del medio de cultivo, con hexano y se cuantificó por cromatografía de gases de la misma forma que durante el proceso de estandarización de la extracción y construcción de la curva patrón (apartados VII.1.5 y VII.1.6). Se determinó el tiempo de mayor actividad de degradación de bifenilo por parte de los consorcios microbianos presentes en las tres muestras.

VII.1.8 Cinética de crecimiento y degradación de bifenilo

Se seleccionó el consorcio que presentó la mayor capacidad de degradación de bifenilo. Con el fin de obtener un cultivo sincronizado, se dejó crecer a los microorganismos hasta su momento de mayor actividad (apartado VII.1.7) y se estableció una nueva cinética de degradación que se evaluó durante 24 h bajo las condiciones antes mencionadas. Los matraces se fueron retirando y almacenando a -20°C cada 4 h. Se agregaron 6 unidades experimentales sin inóculo para evaluar la degradación abiótica a las 0, 12 y 24 h.

VII.1.9 Evaluación de crecimiento y de degradación del bifenilo

Se evaluó la degradación del bifenilo por cromatografía de gases con detector FID (Apartado VII.1.6) y el crecimiento microbiano mediante espectrofotometría. La densidad óptica (D.O.) de las muestras se midió a 595 nm. Se realizaron tres lecturas por muestra y el valor asignado fue el promedio de las tres.

VII.2 Identificación molecular del cultivo microbiano proveniente de la muestra Acosta

Se seleccionó al consorcio con mayor capacidad para degradar bifenilo y así la segunda etapa consistió en construir una biblioteca de genes ribosomales y en identificar a los microorganismos que componían dicho consorcio mediante amplificación, clonación y análisis del gen 16S rRNA.

VII.2.1 Extracción de DNA metagenómico

Para proceder a la construcción de bibliotecas ribosomales e identificación molecular de los microorganismos degradadores de bifenilo, fue necesario obtener su DNA. Cuando se realizó la extracción con hexano de los productos de la cinética de degradación, se escogió la muestra con mayor capacidad de degradación de bifenilo en el tiempo 12 y se conservó la fase polar. La muestra se separó en dos tubos Falcon de 15 ml, se centrifugaron a 3000 x g durante 10 min. Se desechó el sobrenadante y se repitió la operación. Se agregó 1 ml de agua estéril y se homogenizó con vórtex. Con ayuda de una micropipeta, se transfirió la solución a 2 microtubos. Se centrifugaron a 16 000 x g durante 3 min, se desechó el sobrenadante y se repitió la operación. El DNA se extrajo a partir de los botones celulares obtenidos con el kit “illustra tissue and cells genomicPrep Mini Spin” (GE Healthcare) siguiendo el protocolo del fabricante.

VII.2.2 Evaluación de la cantidad y calidad del DNA extraído

La cantidad de DNA extraído se determinó por espectrofotometría a 260 nm utilizando un espectrofotómetro PerkinElmer™ Lambda 35 UV/VIS y celdas de cuarzo. Para cuantificar el DNA se partió del supuesto de que 1 D.O. equivale a 50 µg/ml de DNA.

La calidad del DNA extraído se evaluó por la ausencia de RNA y DNA degradado así como por su tamaño. Se separaron 10 µl del DNA extraído de cada muestra por electroforesis en gel de agarosa al 1% en regulador TAE (Sambrook y Russell, 2001) 1X a 70 volts. El DNA se tiñó con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) y se observaron en un transiluminador de luz ultravioleta 3UV™. Las bandas de DNA obtenidas se compararon con un marcador de peso molecular (MPM) de una kilobase (Kb) (Fermentas).

VII.2.3 Amplificación del gen 16S rRNA

Se utilizó el gen 16S rRNA para construir una biblioteca de genes ribosomales y para clasificar a los organismos de interés mediante RFLP. Dicho gen tiene un tamaño aproximado de 1540 pares de bases (pb). Se amplificó un fragmento de aproximadamente 1484 (pb) utilizando los oligonucleótidos 8 (derecho 5'GCGGATCCGCGGCCGCTGCAGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') y 1492 (reverso 5'GGC TCGAGCGGCCGCCC GGTTACCTTGTTACGACTT3') los cuales son universales para bacterias y arqueas (Relman, 1993).

La mezcla de reacción y las condiciones utilizadas para amplificar el fragmento del gen 16S rRNA se muestra en las tablas 2 y 3. La PCR se llevó a cabo en un termociclador Techne TC 3000.

Tabla 2. Formulación para la amplificación del gen 16S rRNA

Reactivo	Concentración final
DNA molde	13.28 ng/μl
Regulador 10X de Taq	1X
Oligonucleótidos	0.4 pM de cada uno
dNTP's	0.2mM
Taq DNA Polimerasa	1.25U
MgCl ₂	2.5 mM
Agua inyectable	hasta completar 50 μl

Tabla 3. Condiciones de PCR para la amplificación del gen 16S rRNA

# Ciclos	Etapa	Condiciones
1	Desnaturalización	94°C durante 5 min
35	Desnaturalización	94°C durante 1 min
	Hibridación	55°C durante 1 min
	Polimerización	72°C durante 1 min
1	Polimerización	72°C durante 5 min

Los productos de la PCR se separaron, por triplicado, mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en regulador TAE (Sambrook y Russell, 2001) 1X a 90 volts, para comprobar la presencia y el tamaño del amplificado.

VII.2.4 Purificación del producto de PCR

Una vez comprobada la amplificación del fragmento del gen 16S rRNA, el producto de PCR restante (~47µl) se separó por electroforesis en gel de agarosa al 1% a 80 volts. El DNA se purificó a partir del gel de agarosa utilizando el kit de purificación “Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit” (Zymo Research) siguiendo las instrucciones del fabricante. El purificado se resuspendió en 20 µl de agua inyectable y se comprobó su pureza mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

VII.2.5 Clonación de los fragmentos amplificados en el vector pJET1.2/blunt y transformación en *Escherichia coli*.

Se clonó el amplificado del gen 16S rRNA purificado en el vector pJET1.2/blunt (Fig. 4) de 2974 pb (CloneJET™ PCR Cloning Kit, Fermentas) siguiendo el protocolo del fabricante.

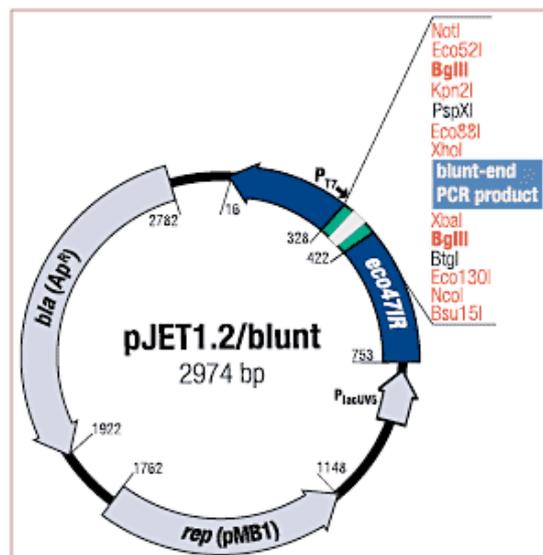


Figura 4. Mapa del vector plasmídico de clonación pJet 1.2/blunt utilizado para clonar los fragmentos de 1484 pb equivalentes al gen 16S rRNA (fuente: FERMENTAS).

La figura 4 muestra al vector plasmídico de clonación pJet 1.2/blunt. Se trata de un vector linearizado que acepta insertos desde 6 pb hasta 10 Kb. La orilla 5' del sitio de clonación contiene grupos fosforilo, por lo tanto la fosforilación de los productos de PCR no es necesaria. Se observa el elemento rep(pMB1) responsable de la replicación del vector. También contiene un gen de resistencia a la ampicilina, bla(Ap^R), utilizado para la selección y mantenimiento de las células recombinantes de *E. coli*. El vector presenta también el gen letal eco47IR. Este gen se

inactiva cuando se liga un inserto de DNA en el sitio de clonación por lo tanto sólo las células con plásmidos recombinantes son capaces de propagarse.

Se prepararon células competentes de *Escherichia coli* con el kit “TransformAid™ Bacterial Transformation Kit” (Fermentas). Se utilizó la cepa JM107 (Fermentas). Por otro lado, se preparó la reacción para generar extremos romos (tabla 4) y posteriormente se preparó la mezcla de ligación agregándole 1 µl del vector de clonación pJet 1.2/blunt (50 ng/µl) y 1 µl de T4DNA ligasa (5.0 u/µl) (CloneJET™ PCR Cloning Kit, Fermentas).

Tabla 4. Formulación de la reacción para generar extremos romos

Reactivo	Cantidad (µl)
DNA purificado	2
Enzima generadora de extremos romos de DNA	1
2X regulador	5
Agua inyectable	0.5

La mezcla de ligación junto con las células competentes se extendió en cajas Petri con medio LB (tabla 5) adicionado con ampicilina (50 µg/ml). Se incubaron a 30°C durante 24 h.

Tabla 5. Formulación del medio de cultivo LB

Reactivo	Cantidad (g)
Bacto™ Triptona (Becton, Dickinson y Co., EUA)	10
Extracto de levadura (Becton Dickinson de México)	5
Cloruro de Sodio (J.T. Baker, México, 99.6%)	10
Difco™ Agar noble (Becton, Dickinson y Co., EUA)	25 (2.5%)

* Los nutrientes se disolvieron en 1,000 ml de agua desionizada

* el pH se ajustó a 7.0

VII.2.6 Selección y cultivo de clonas

Las clonas con plásmido que crecieron exitosamente en el medio de cultivo adicionado con ampicilina se transfirieron con palillos de madera estériles a tubos con tapón de rosca conteniendo 5 ml de medio LB con ampicilina (100 µg/ml). Se incubaron en agitación durante 18 h a 37°C.

VII.2.7 Biblioteca de genes ribosomales bacterianos

Las clonas que crecieron exitosamente en los tubos con medio LB y ampicilina se cosecharon por duplicado. Se colocaron 1.5 ml del cultivo en microtubos, se centrifugaron a 16,000 x g durante 5 min y se descartó el sobrenadante. El botón celular obtenido del primer duplicado se conservó en glicerol al 25% a -20°C.

VII.2.8 Obtención del DNA plasmídico

El segundo duplicado se centrifugó una segunda ocasión, se descartó el sobrenadante y se secó el botón celular. A partir de éste se extrajo el DNA plasmídico mediante minipreparaciones por lisis alcalina (Sambrook y Russell, 2001). El botón celular obtenido se resuspendió en 30 µl de agua inyetable adicionada con RNAsa (100µg/ml) (Fermentas) y se conservó a -20°C.

VII.2.9 Digestión para liberar el fragmento clonado

Se identificaron las clonas que contenían el fragmento de aproximadamente 1,484 pb del gen 16S rRNA por liberación del mismo con la endonucleasa de restricción *Bg*III (Fermentas) cuyas secuencias de corte flanquean el sitio de inserción en el plásmido. La mezcla de reacción se preparó de la siguiente manera:

Tabla 6. Mezcla de reacción para la digestión con *Bg*III

Reactivo	Cantidad (µl)
DNA plasmídico	6
Regulador 10X	1
<i>Bg</i> III (2U/µl)	0.1
RNAsa (100 µg/ml)	0.029
Agua inyetable	hasta completar 10 µl

La mezcla se incubó durante 16 h a 37°C. Los productos de la digestión se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

VII.2.10 Análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)

El fragmento de 1,484 pb clonado se digirió por separado con las endonucleasas de restricción *Hpa*II y *Hha*I (Fermentas). Para esto se mezclaron los siguientes componentes (tabla 7):

Tabla 7. Mezcla de reacción para la digestión con *HhaI* y *HpaII*

Reactivo	Cantidad (µl)
DNA plasmídico	4
Regulador 10x	1
Endonucleasa de restricción	0.1
RNAsa (100 µg/ml)	0.049
Agua inyectable	hasta completar 10 µl

La mezcla se incubó durante 16 h a 37°C. Los productos de la digestión se separaron por electroforesis en gel de agarosa de alta resolución al 3%.

VII.2.11 Amplificación del fragmento del gen 16S rRNA clonado con oligonucleótidos pJET1.2

Se identificaron y clasificaron los polimorfismos resultantes de la digestión con las enzimas de restricción. Se escogieron 1 ó 2 muestras de cada uno. Se amplificó el fragmento de 1,484 pb del gen 16S rRNA plasmídico mediante los oligonucleótidos de secuenciación pJET 1.2 derecho (5'CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC3') y reverso (5'AAGAACATCGATTTTCCATGG CAG3') (CloneJET™ PCR Cloning Kit, Fermentas) (Fig. 5).

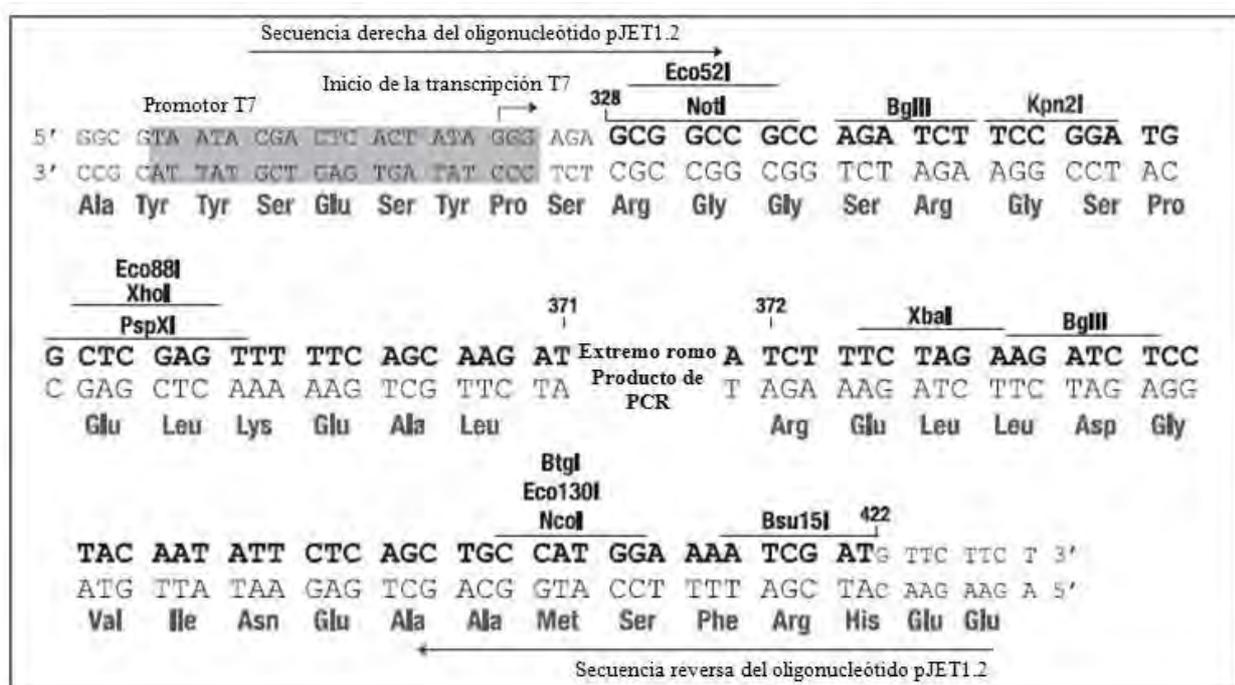


Figura 5. Secuencia de DNA de la región del sitio de clonación múltiple perteneciente al vector pJet 1.2/blunt (fuente: FERMENTAS)

La mezcla de reacción y las condiciones utilizadas para amplificar el fragmento del gen 16S rRNA plasmídico se muestran en las tablas 8 y 9.

Tabla 8. Formulación para la amplificación del gen 16S rRNA plasmídico

Reactivo	Concentración final
DNA molde	2 µl
Regulador 10X de Taq	1x
Oligonucleótidos	1µM*
dNTP's	0.2mM
Taq DNA Polimerasa	0.63 U
MgCl ₂	2.5 mM
Agua inyectable	hasta completar 25 µl

*De acuerdo con el fabricante.

Tabla 9. Condiciones de PCR para la amplificación del gen 16S rRNA

# Ciclos	Etapas	Condiciones
1	Desnaturalización	94°C durante 5 min
35	Desnaturalización	94°C durante 1 min
	Hibridación	58°C durante 1 min
	Polimerización	72°C durante 1 min
1	Polimerización	72°C durante 5 min

VII.2.12 Aislamiento en agar nutritivo de microorganismos provenientes de un cultivo en suspensión de la muestra Acosta

Debido a que no fue posible amplificar los productos de PCR con el procedimiento previo, entonces se procedió a identificar las diferentes morfologías bacterianas que componían el consorcio mediante un aislamiento en placa y posteriormente se extrajo su DNA para secuenciarlo.

A partir de un cultivo estable de microorganismos provenientes de la muestra Acosta, se prepararon diluciones de 10^{-5} y 10^{-3} en solución salina (8.5g NaCl/1000ml). De cada una, se tomó un inóculo con asa estéril y se extendió en cajas Petri con agar nutritivo (Becton Dickinson de México). El procedimiento se hizo por duplicado. Se incubaron a 30°C durante 48 h.

Una vez obtenidas las colonias, se identificaron las diferentes morfologías y se sembraron, utilizando un asa, en agar nutritivo adicionado con 100 ppm de bifenilo con el fin de seleccionar a las colonias que eran capaces de crecer en estas condiciones, que eran las mismas que aquellas del medio de cultivo líquido en el cual se enriqueció el cultivo. Se incubaron a 30°C durante 24 h.

Las morfologías obtenidas se transfirieron con palillos de madera estériles a un tubo de vidrio con rosca conteniendo caldo nutritivo (Becton Dickinson de México). Se incubaron a 30°C durante 96 h. Se confirmó su pureza y se describieron microscópicamente mediante tinción de Gram, posteriormente se cosecharon.

VII.2.13 Extracción de DNA de microorganismos aislados en agar nutritivo

Se extrajo su DNA utilizando el kit “illustra tissue and cells genomicPrep Mini Spin” (GE Healthcare) siguiendo el protocolo del fabricante. Se comprobó la integridad y calidad del DNA mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se amplificó un fragmento de aproximadamente 1484 pb del gen 16S rRNA bacteriano utilizando oligonucleótidos universales para bacterias y arqueas.

VII.2.14 Purificación de los productos de PCR

Se purificaron los fragmentos obtenidos a partir de gel de agarosa utilizando el kit “Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit” (Zymo Research), se siguieron las instrucciones del fabricante con una modificación en la etapa final. El DNA se eluyó dos veces con 6 µl de agua inyectable y al producto final se le adicionaron 14 µl de agua inyectable para obtener finalmente 26 µl del producto de purificación.

VII.2.15 Secuenciación

Se cuantificó el DNA purificado por espectrofotometría a 260 nm y se envió a secuenciar al laboratorio LANGEBIO de CINVESTAV, Irapuato. La secuenciación del DNA purificado se realizó de manera automatizada con un secuenciador ABI PRISM 310 Genetic Analyzer PE (Applied Biosystems). Se realizaron reacciones de secuenciación para cada una de las clonas previamente seleccionada a partir del extremo 5' y 3' con los mismos oligonucleótidos.

VII.2.16 Análisis de las secuencias

Las secuencias obtenidas de los 4 aislados degradadores de bifenilo se editaron manualmente con el programa BioEdit (Hall, 1999) y posteriormente se sometieron a una búsqueda de secuencias similares en GenBank por medio del programa BLAST versión 2.2.3 (Altschul *et al.*, 1997) en la página de la NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Una vez determinada la identidad, las secuencias de organismos relacionadas se seleccionaron considerando los niveles jerárquicos y linaje taxonómico descrito en la base de datos TaxBrowser del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=taxonomy>). Para obtener el mejor alineamiento, se hicieron alineamientos múltiples de las secuencias con el programa CLUSTAL X versión 2.0.1 (Thompson *et al.*, 2007); los parámetros usados fueron 15.5 para apertura de gaps, 6.6 para extensión de los mismos, eliminación de secuencias divergentes en 30% o más, peso de 0.5 para las transiciones y la matriz IUB para peso del DNA, no se utilizó matriz negativa. Los alineamientos se editaron manualmente con el programa “Seaview” (Galtier *et al.*, 1996).

Las relaciones filogenéticas entre las secuencias se establecieron por métodos de distancia. El modelo de sustitución nucleotídica se eligió tomando en cuenta las frecuencias nucleotídicas determinadas con el programa DAMBE (Xia y Xie, 2001); el índice de transiciones y transversiones se calculó con el programa MEGA versión 2.1. Para obtener los árboles filogenéticos se empleó el paquete de programas computacionales MEGA versión 4.1 (Tamura *et al.*, 2007), se empleó el método de agrupamiento de Neighbour Joining y se realizó un análisis bootstrap con 1000 aleatorizaciones.

Adicionalmente se construyó una matriz de similitud de identidad con el programa MatGat (Bitincka, 2003).

VIII. RESULTADOS

VIII.1 Degradación de bifenilo por microorganismos provenientes de suelos contaminados

VIII.1.1 Descripción de muestras de suelo

Un estudio realizado por Jaime (2010) describió las características físico-químicas y microbiológicas de las muestras de suelos colectadas, las cuales fueron identificadas como Tele, Reforma y Acosta y fueron objeto del presente estudio. El suelo de las tres muestras es moderadamente alcalino y presentó una humedad menor al 5%. La textura de la muestra Tele se determinó como franco arcillo arenosa, la de Reforma como franco limosa y la de Acosta como franco arcillosa. Los parámetros químicos revelaron que las muestras tenían concentraciones de carbono desde 17,251 mg/kg hasta 256,311 mg/kg, siendo este último valor el correspondiente a la muestra identificada como Tele. Esta misma muestra presentó los valores más altos de nitrógeno (8,889 mg/kg) mientras que las muestras Reforma y Acosta presentaron valores cercanos a 1,000 mg/kg. La concentración de fósforo osciló alrededor de los 650 mg/kg en todas las muestras. En cuanto al conteo de bacterias heterótrofas e hidrocarbonoclastas, éste osciló alrededor de 10^6 UFC/g (unidades formadoras de colonias por gramo). La muestra Tele presentó la menor cantidad de bacterias heterótrofas totales (4×10^3 UFC/g) así como de bacterias hidrocarbonoclastas (243 UFC/g). La caracterización de las muestras del suelo indicó que los hidrocarburos del petróleo en el rango de C10 hasta C63 eran predominantes. Se encontraron metales tales como Fe, Cu, Zn, Pb, Ni y Mn.

VIII.1.2 Características macro y microscópicas de los cultivos microbianos

El cultivo de enriquecimiento de microorganismos provenientes de las muestras de suelo de San Nicolás, Tequisquiapan, Querétaro en medio mineral líquido adicionado con 100 ppm de bifenilo se estabilizó a los 34 días. La caracterización microscópica de los consorcios microbianos establecidos reveló la presencia de cocos Gram positivos, bacilos cortos y largos Gram negativos (tabla 10).

Tabla 10. Caracterización microscópica de los cultivos obtenidos

Muestra	Descripción microscópica
Tele	cocos G(+) y bacilos largos G(-)
Reforma	bacilos cortos y largos G(-)
Acosta	bacilos largos G(-), bacilos cortos grandes G(ND)*, bacilos cortos G(-)

*no determinado

Por otro lado, el cultivo en PDA reveló la morfología macroscópica de los hongos aislados a partir de las muestras de suelo, la cual se describe en la tabla 11. Se encontraron dos morfologías diferentes en la muestra Tele (Fig. 6) y una en la muestra Reforma mientras que la muestra Acosta no presentó hongos.

Tabla 11. Caracterización macroscópica de los hongos encontrados en los cultivos líquidos

Morfología colonial						
	Forma	Bordes	Elevación	Aspecto	Color anverso	Color reverso
Tele	fusiforme	filamentoso	rugosa	algodonoso	blanco	blanco
Tele	fusiforme	filamentoso	rugosa	polvoriento al centro algodonoso por encima	verde al centro y cubierto de blanco	verde oscuro
Reforma	circular	entero	convexa	viscosa	negro opaco	negro

La figura 6 muestra las dos morfologías coloniales de hongos obtenidos mediante cultivo en PDA adicionado con estreptomomicina y penicilina a partir de la muestra Tele. Se incubaron a 30°C de 3 a 7 días y en ambos casos el crecimiento colonial fue abundante.

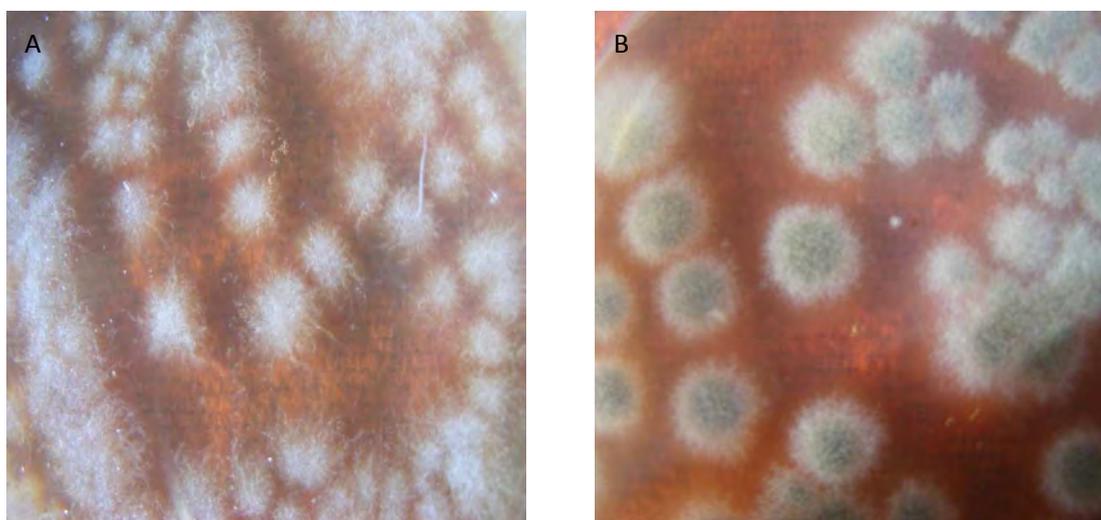


Figura 6. Fotografías que muestran las dos morfologías coloniales de hongos obtenidos a partir de la muestra Tele. A) Presentó un aspecto algodonoso y color blanco. B) Presentó un aspecto polvoriento y verde al centro y estaba cubierto por una estructura de aspecto algodonoso blanco.

A partir de estas colonias se llevó a cabo un microcultivo que reveló las características microscópicas de los hongos. La primera morfología colonial encontrada en la muestra Tele (Fig. 6A) corresponde a *Fusarium sp.* En la morfología microscópica presentada en la figura 7 se observa abundante micelio septado, un conidióforo, macroconidios septados y microconidios característicos del género.

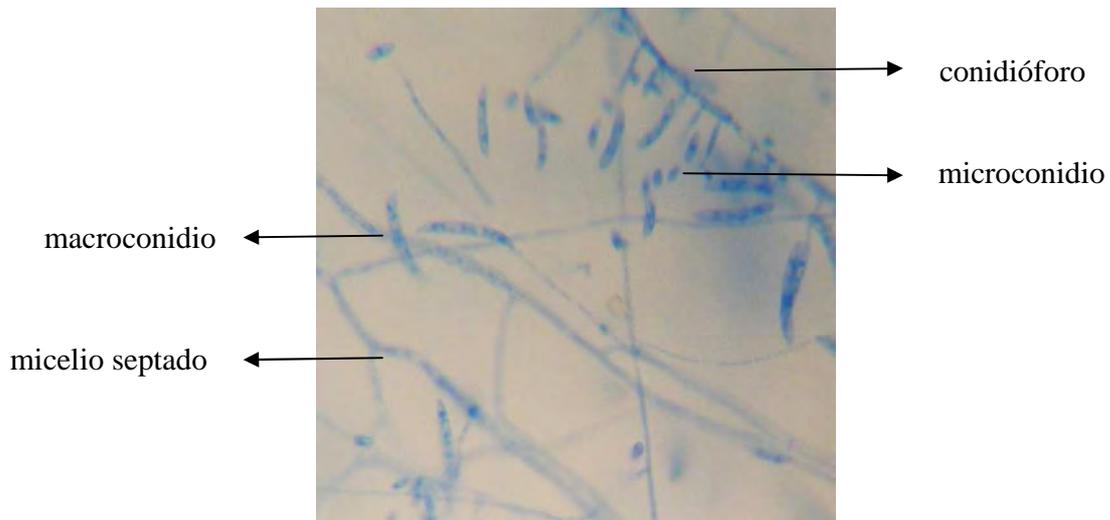


Figura 7. Fotografía que muestra la morfología microscópica de *Fusarium sp.* obtenido a partir de la muestra Tele cultivado en PDA a 30°C durante 6 días.

Como se observa en la figura 8, la segunda morfología colonial observada y proveniente de la muestra Tele (Fig. 6B) corresponde al hongo *Aspergillus sp.* Se distingue un grupo de conidióforos con la vesícula característica del género, que además es un elemento que permite diferenciarlo de *Penicillium sp.* y a partir de la cual se sostienen las esporas. También se observan filamentos de micelio.

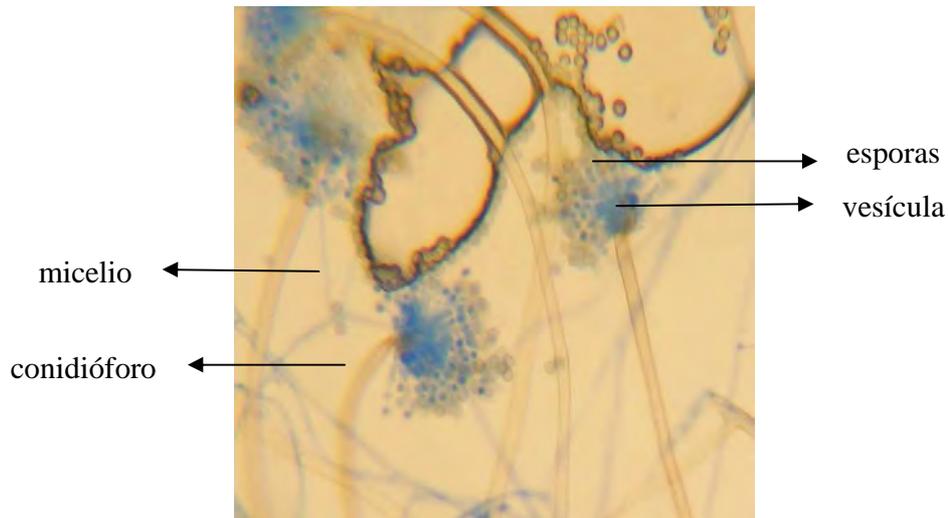


Figura 8. Fotografía que muestra la morfología microscópica *Aspergillus* sp. obtenido a partir de la muestra Tele cultivado en PDA a 30°C durante 6 días.

Como se describe en la tabla 11, en la muestra Reforma sólo se observó una morfología colonial a nivel macroscópico; sin embargo, como se observa en la figura 9, a nivel microscópico se presentaron dos morfologías distintas. En la figura 9A se distinguen hifas modificadas y globosas que probablemente se desprenden como esporas. En la figura 9B se observa un conidióforo con esporas. No fue posible identificar el género de los hongos.

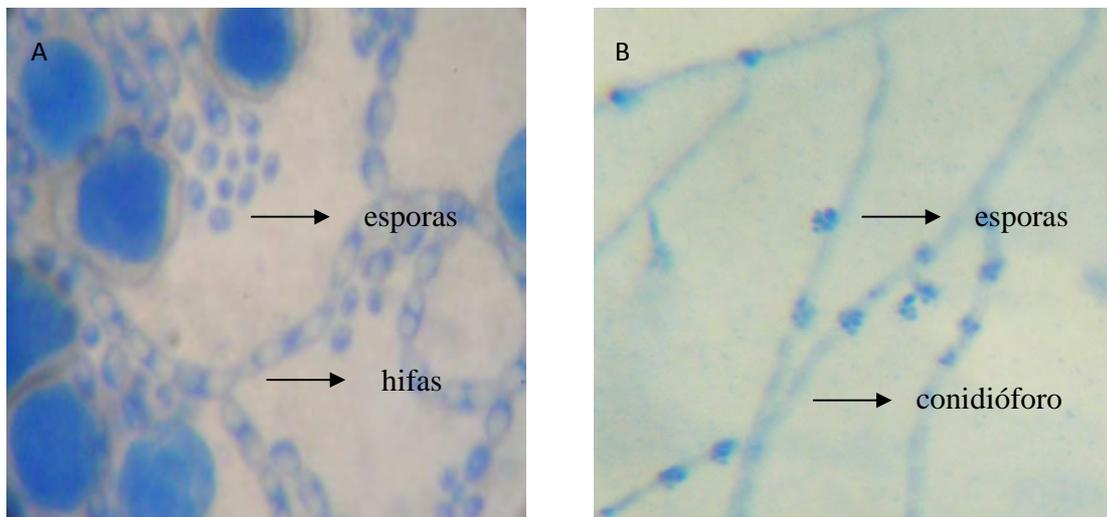


Figura 9. Fotografías que muestran la morfología microscópica de los hongos obtenidos a partir de la muestra Reforma cultivados en PDA a 30°C durante 6 días.

VIII.1.3 Extracción y análisis de bifenilo en medio líquido

A fin de establecer el porcentaje de recuperación de bifenilo y con fines de cuantificar la remoción del compuesto modelo, se estandarizó la extracción en medio líquido y el análisis de bifenilo por cromatografía de gases con detector FID. Una vez establecida se construyó una curva patrón con concentraciones conocidas de bifenilo que van de 0, 10, 30, 50, 100, 150 y 200 ppm.

La tabla 12 muestra la concentración de bifenilo (ppm) obtenida a lo largo de cuatro extracciones con hexano. El valor promedio muestra el porcentaje de recuperación. Como se observa, en la primera extracción se logró un porcentaje de recuperación muy cercano al 90%, sin embargo la desviación estándar fue muy grande. En la tercera y cuarta extracción el porcentaje fue mayor a 90% y la desviación estándar estuvo cercana a las 5 ppm; por lo tanto, en este punto se consideró que la técnica de extracción de bifenilo estaba estandarizada, siendo el porcentaje de recuperación adecuado para demostrar la remoción biológica del compuesto.

Cabe indicar que únicamente en la primera extracción se realizaron 5 replicados para posteriormente realizar únicamente tres.

Tabla 12. Serie de repeticiones a lo largo de cuatro extracciones de bifenilo con el fin de estandarizar la técnica

Repetición	Extracción 1 (ppm)	Extracción 2 (ppm)	Extracción 3 (ppm)	Extracción 4 (ppm)
1	63.78	112.18	97.86	91.2
2	90.19	56.06	87.79	97.86
3	110.73	80	90.07	88.93
4	91.26	NR	NR	NR
5	92.97	NR	NR	NR
Promedio (%)	89.786	82.746	91.906	92.663
DesvEst	16.788	28.160	5.280	4.641
Valor Min	72.997	54.586	86.626	88.021
Valor Max	106.574	110.907	97.186	97.304

NR no realizada

La figura 10 muestra la curva patrón empleada para estimar las concentraciones de bifenilo a lo largo de las cinéticas de degradación. Debido a que el coeficiente de determinación obtenido fue cercano a 1, se consideró que el ajuste de la recta a los puntos fue bueno, por lo tanto la ecuación $y = 646.02x - 357.13$ fue confiable para cuantificar el bifenilo.

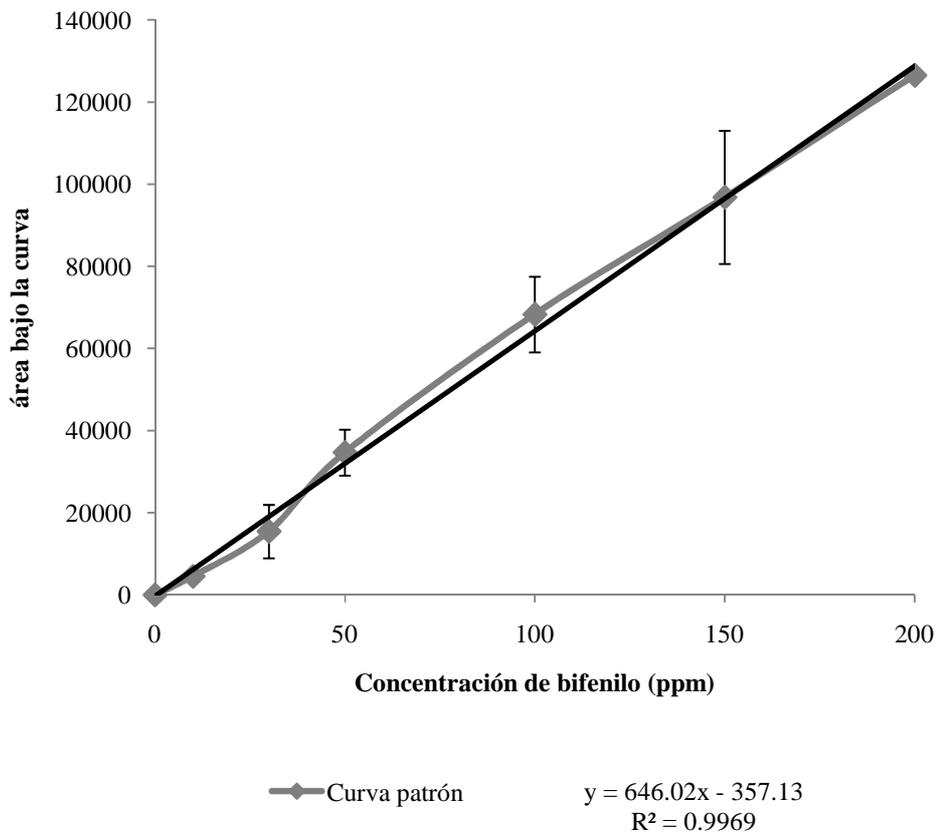


Figura 10. Curva patrón utilizada como referencia para estimar la cantidad de bifenilo presente en las muestras evaluadas.

VIII.1.4 Ensayo preliminar de degradación de bifenilo

Como se mencionó en materiales y métodos, se realizó un ensayo preliminar para establecer los periodos de máxima degradación de bifenilo y con base en este parámetro establecer el momento en el cual era más adecuado tomar el cultivo para realizar las cinéticas de crecimiento y remoción.

Como se observa en la figura 11, el consorcio microbiano proveniente de la muestra Tele exhibió su periodo de mayor degradación de las cero a las 12 h, tiempo en el cual degradó 47 ppm (50.23%) de bifenilo. En el caso de los microorganismos presentes en la muestra Reforma, degradaron 59 ppm (59%) de bifenilo en este mismo periodo. Finalmente en la muestra Tele se observó una degradación de 41 ppm (45%) de bifenilo hasta las 12 h. En la figura 11 se puede apreciar claramente que de las cero a las 12 h, la tasa de degradación fue similar en las tres muestras (3.9, 4.9, 3.4 ppm/h).

Posteriormente, de las doce a las 24 h tanto los porcentajes como las tasas de degradación variaron en las diferentes muestras. En la muestra Tele se degradaron 18 ppm adicionales (69.09% en total) con una tasa de degradación de 1.48 ppm/h. En la muestra Reforma no se presentó degradación en este periodo de tiempo. En la muestra Acosta, se degradaron 51 ppm adicionales (100% en total) con una tasa de degradación de 4.24 ppm/h. En este caso, a las 24 h el bifenilo había desaparecido por completo.

De las 24 a las 36 h, el consorcio microbiano de la muestra Tele degradó 25 ppm adicionales (95.39% en total) mientras que aquél de la muestra Reforma degradó 40.87 ppm adicionales (99.87% en total). Como se observa en la figura 11, la tasa de degradación de bifenilo en la muestra Reforma (3.38 ppm/h) fue ligeramente mayor que en la muestra Tele (2.07 ppm/h).

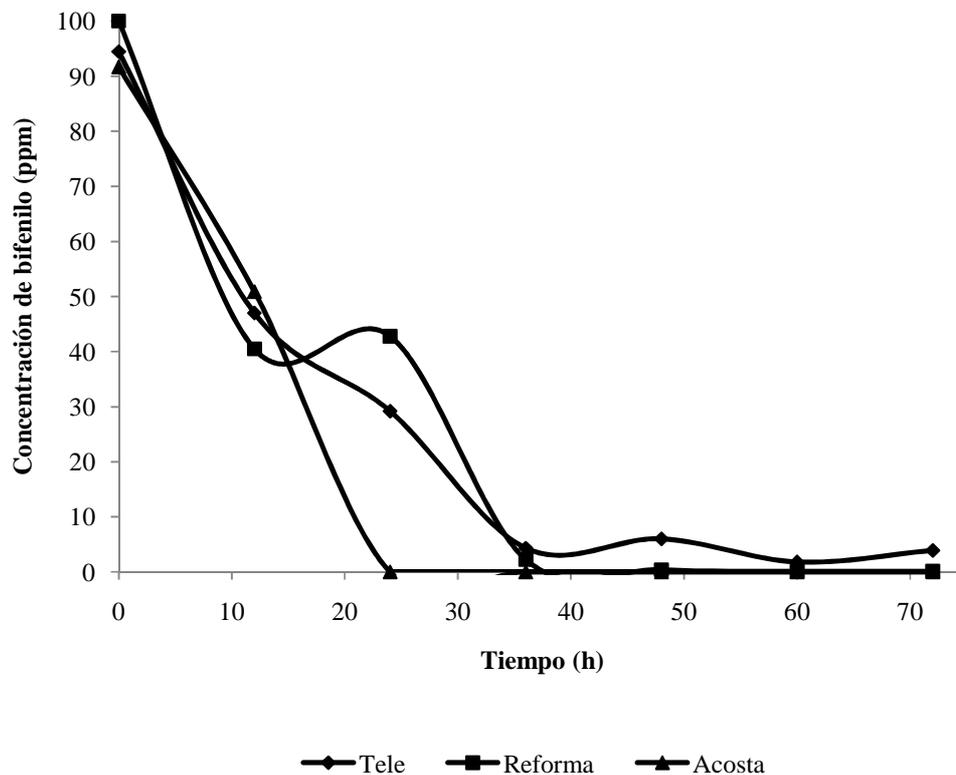


Figura 11. Remoción de bifenilo por los consorcios provenientes de las muestras Tele, Reforma y Acosta. Las condiciones de incubación fueron 120 rpm y 30°C.

El cultivo proveniente de la muestra Acosta presentó la mayor capacidad de degradación de bifenilo lo que fue evidenciado por la mayor tasa de degradación de bifenilo de las doce a las 24 h y además fue el único consorcio que a las 24 h había removido el contaminante por completo. En el caso de los cultivos de las muestras Tele y Reforma, la capacidad de degradación fue menor (y además similar entre ellas) pues hasta las 72 h permanecieron 3.9 ppm (4.6%) de bifenilo en la muestra Tele y 0.13 ppm (0.13%) en Reforma. En el caso de estas muestras, la mayor actividad de degradación de los microorganismos se observó de las cero a las 12 h, tiempo en el cual el bifenilo se degradó alrededor del 50% (50 ppm). En la muestra Acosta, el periodo de mayor actividad fue de las doce a las 24 h pues se degradó el 55% (51ppm) del bifenilo.

VIII.1.5 Cinética de crecimiento y degradación de bifenilo

Una vez que se estableció que los microorganismos encontrados en la muestra Acosta poseían la mayor capacidad de degradación de bifenilo y se determinó que su momento de mayor actividad de degradación y por ende de crecimiento eran las 18 h, entonces se procedió a determinar la cinética de crecimiento y remoción del bifenilo, aunque en esta ocasión los microorganismos empleados como inóculo se dejaron crecer durante 18 h (método descrito en el apartado VI.1.8) para que alcanzaran su fase de mayor actividad.

La figura 12 muestra la cinética de remoción de bifenilo y el crecimiento bacteriano proveniente de la muestra Acosta. Se observa que el periodo de mayor degradación fue de las 8 a las 12 h, tiempo en el que se degradaron aproximadamente 30 ppm (30%) de bifenilo. Además, en este periodo de tiempo la tasa de degradación fue de 7.70 ppm/h. Comparando con el ensayo previo, ésta es la más alta de todas las muestras en cualquier periodo de tiempo. Al igual que en el ensayo preliminar de la muestra Acosta, el bifenilo desapareció por completo a las 24 h.

En el caso de la curva de crecimiento, se observa que el periodo de mayor degradación de bifenilo coincide con un crecimiento estable evidenciado por invariabilidad de la absorbancia; además este periodo estuvo precedido y seguido de una fase de crecimiento.

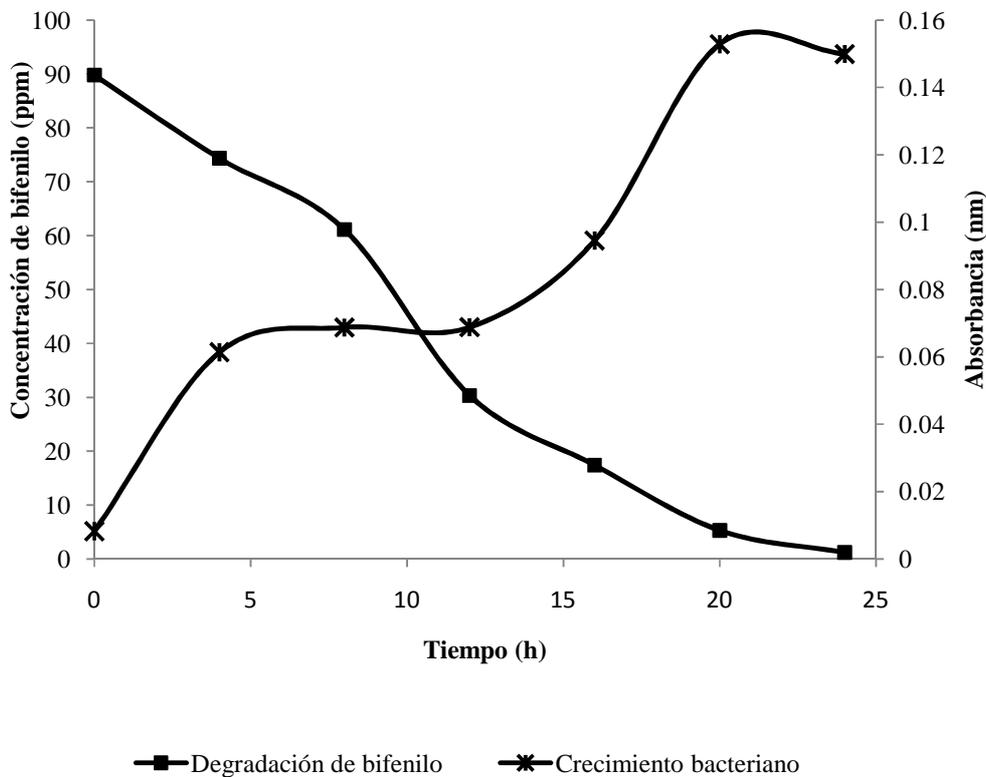


Figura 12. Cinética de crecimiento y remoción de bifenilo por microorganismos provenientes de la muestra Acosta.

VIII.2 Identificación molecular del cultivo microbiano proveniente de la muestra Acosta

VIII.2.1 Extracción de DNA metagenómico y determinación de su calidad y cantidad

Debido a que el consorcio microbiano presente en la muestra Acosta mostró la mayor capacidad de degradación de bifenilo en cultivo en suspensión, se eligió ésta para identificar a los microorganismos que lo componían. La cantidad de DNA extraído del consorcio microbiano fue de 332 ng/μl.

Como se muestra en la figura 13, el DNA extraído presentó un tamaño superior a las 10,000 pb, muy poca degradación y no se aprecia RNA. Esto sugiere que fue de muy buena calidad ya que la probabilidad de que los genes, incluyendo el 16S rRNA, estuvieran completos, fue muy grande.

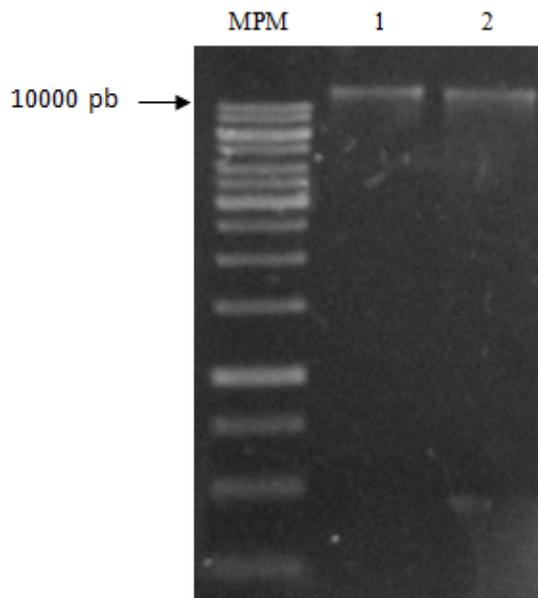


Figura 13. Se muestra el marcador de peso molecular (MPM) y la separación mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% del DNA extraído por duplicado (1, 2) a partir del consorcio microbiano proveniente de la muestra Acosta.

VIII.2.2 Amplificación y clonación del gen 16S rRNA bacteriano

El fragmento de aproximadamente 1484 pb del gen 16S rRNA bacteriano del DNA metagenómico del consorcio microbiano proveniente de la muestra Acosta se amplificó con oligonucleótidos universales para bacterias y arqueas y se clonó. Los productos de la amplificación se verificaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% (Fig. 14). Posteriormente, la banda del tamaño esperado se purificó a partir del gel y se comprobó su integridad nuevamente por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

La figura 14 muestra los productos de amplificación del gen 16S rRNA a partir de la extracción del DNA metagenómico. Se realizó por duplicado, y por cada uno se llevaron a cabo tres repeticiones en el proceso de amplificación. Se puede observar que el fragmento amplificado del gen 16S rRNA tiene un tamaño de 1,484 pb aproximadamente; además la intensidad de las bandas es alta, lo que refleja una alta concentración de DNA. El negativo no amplificó tal y como se esperaba.

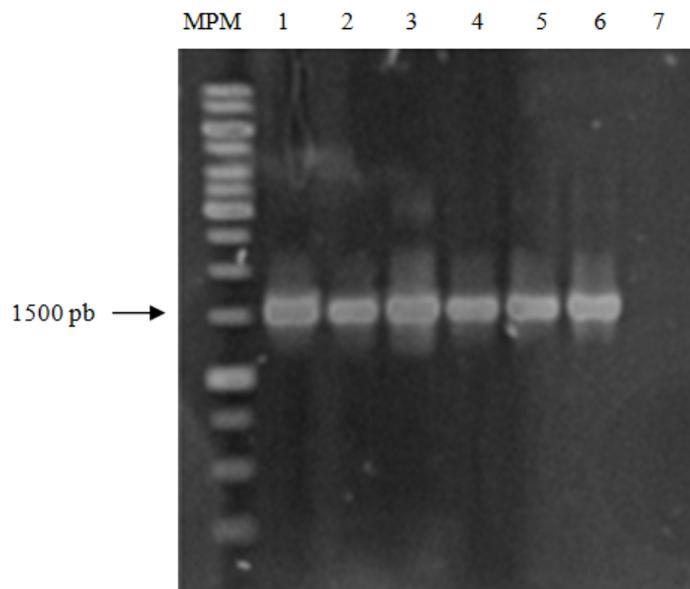


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de amplificación del gen 16S rRNA de 1484 pb aproximadamente. 1,2,3. Amplificados del gen a partir de la primera repetición de la extracción de DNA metagenómico de la muestra Acosta; 4,5,6. Amplificados del gen a partir de la segunda repetición de la extracción de DNA metagenómico de la muestra Acosta; 7. Negativo

VIII.2.3 Extracción y digestión del DNA plasmídico recombinante de la biblioteca de genes ribosomales bacterianos

Las clonaciones y transformaciones realizadas en medio de cultivo selectivo con antibiótico permitieron el crecimiento de colonias transformantes. Se seleccionaron 52 clonas y con ellas se construyó una biblioteca de genes ribosomales de microorganismos capaces de degradar bifenilo.

El DNA plasmídico extraído de las clonas transformantes se separó por electroforesis en gel de agarosa al 1%. En la figura 15 se observa la separación en gel de 14 de las 52 clonas que portaron el plásmido. El vector plasmídico pJet 1.2 es multicopia. Las bandas obtenidas en el gel de agarosa corresponden a las isoformas características de los plásmidos con conformación distinta. Generalmente se obtienen 3 bandas que corresponden a los plásmidos superenrollados, superenrollados desnaturalizados y relajados. En el carril 2 no se observó plásmido.

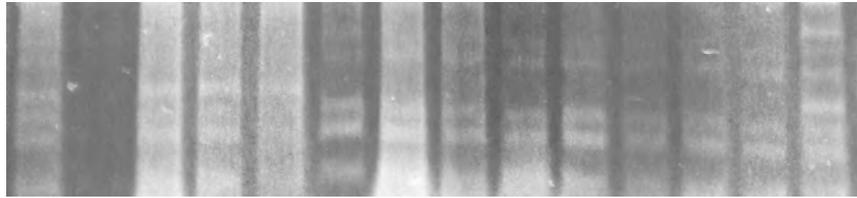


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los plásmidos extraídos de 14 clonas diferentes procedentes de la muestra Acosta.

Debido a que en el plásmido se puede insertar cualquier fragmento de DNA de entre 6 pb y 10 kb, el DNA plasmídico se digirió con la endonucleasa de restricción *Bgl*III para liberar al inserto y se confirmó que éste correspondió al gen 16S rRNA, de aproximadamente 1,484 pb, mediante separación por electroforesis en gel de agarosa en 35 de las 52 clonas obtenidas.

VIII.2.4 Análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) de las clonas de la biblioteca de genes ribosomales bacterianos

La digestión de las 35 clonas con el inserto esperado exhibieron 5 patrones de bandeo diferentes al ser digeridas con las enzimas de restricción *Hpa*II y *Hha*I. Estos se analizaron en un gel de agarosa de alta resolución al 3% .La figura 16 muestra los perfiles obtenidos que se identificaron con las letras a, b, c, d y e.

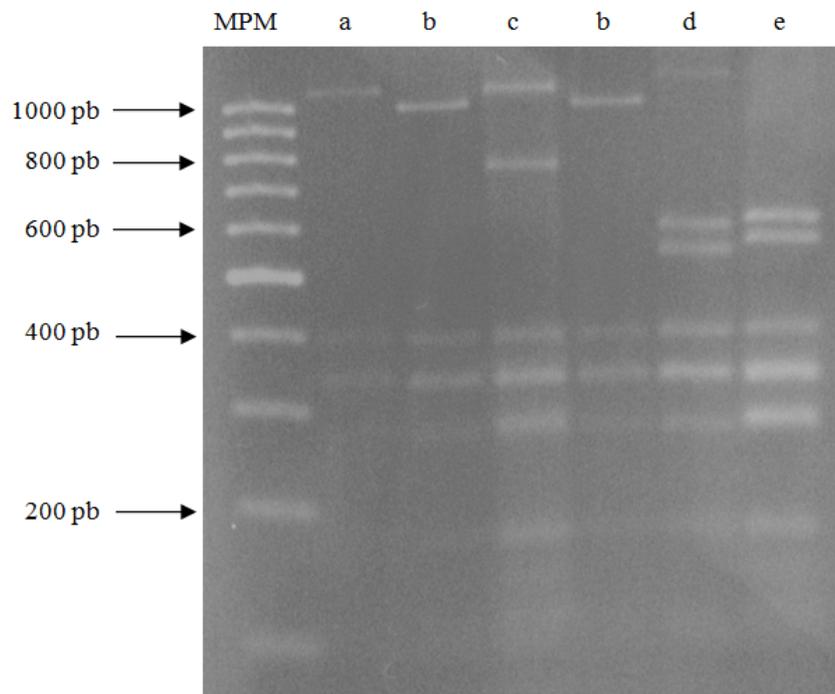


Figura 16. RFLP obtenidos con la enzima de restricción *HhaI*

Tal y como se describió en el método, se eligieron clonas representativas de cada perfil de RFLP para enviarlas a secuenciar. Se planeó amplificar el gen 16S rRNA clonado en el vector pJet 1.2/blunt mediante los oligonucleótidos pJet 1.2; sin embargo, la amplificación del gen mediante PCR no fue exitosa. Se aumentó la concentración de Mg^{2+} en la mezcla de reacción de PCR, se diluyó el DNA para disminuir la concentración de inhibidores de la amplificación (en caso de que los hubiera), se purificó el amplificado del gen 16S rRNA a partir del gel de agarosa para eliminar el DNA no blanco, se probaron diferentes lotes de enzimas y mezclas de ellos y se hicieron pruebas con los oligonucleótidos universales para bacterias y arqueas que se habían utilizado con anterioridad; sin embargo, la amplificación no fue exitosa.

VIII.2.5 Aislamiento en agar nutritivo de microorganismos provenientes del cultivo en suspensión de la muestra Acosta

Se anticipó que este inconveniente impediría la secuenciación de las clonas seleccionadas. Con el fin de identificar las diferentes morfologías presentes en el consorcio microbiano de la muestra Acosta, se aislaron los microorganismos en medio nutritivo a partir de un cultivo en suspensión estable. Se reconocieron 4 morfologías coloniales distintas que se describen en la tabla 13.

Tabla 13. Descripción microscópica y morfología colonial de los diferentes microorganismos aislados a partir de la muestra Acosta

Aislado	Descripción microscópica	Morfología colonial				
		Forma	Bordes	Elevación	Textura	Color
1	bacilos cortos G(-)	circular	Entero	convexa	butirosa	amarillo opaco
2	bacilos cortos G(-)	circular	Entero	convexa	butirosa	amarillo claro translúcido
3	bacilos largos G(+)	circular	Entero	convexa	acuosa	blanco translúcido
4	bacilos cortos G(-)	circular	Entero	convexa	butirosa	blanco opaco

La figura 17 muestra las fotografías de los cuatro aislados con morfologías coloniales distintas obtenidos a partir de cultivos de la muestra Acosta e incubados a 30°C durante 24 h en agar nutritivo adicionado con bifenilo.

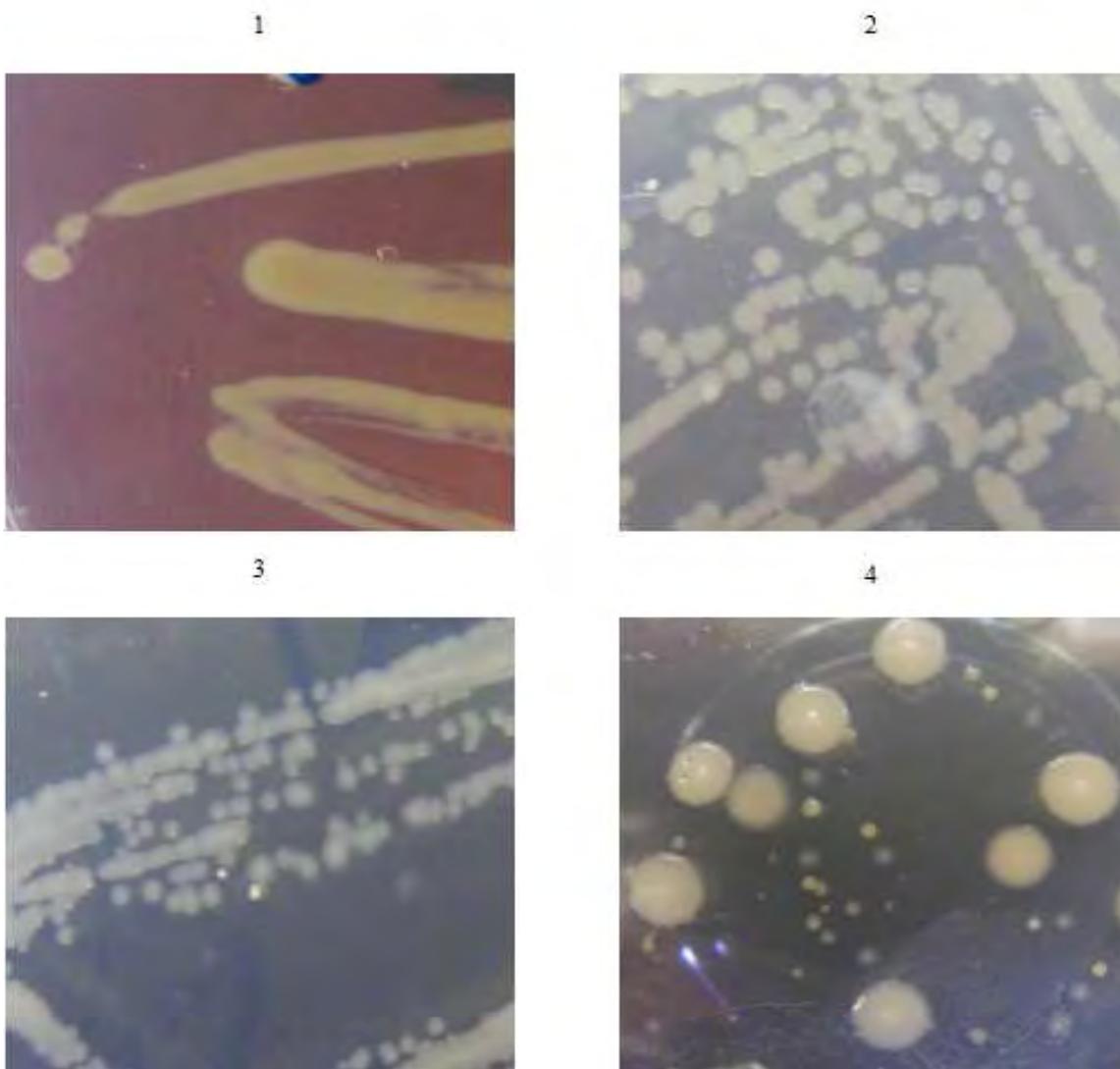


Figura 17. Cuatro aislados con morfologías coloniales distintas encontradas en la muestra Acosta (ver tabla 13).

El aislamiento en placa presenta la limitante de sólo permitir el crecimiento de las bacterias cultivables. La diversidad bacteriana obtenida por este método fue equiparable a los resultados obtenidos con el RFLP, por lo tanto se sugiere que los microorganismos obtenidos a partir del aislamiento en placa representaban una fracción considerable del consorcio.

VIII.2.6 Identificación molecular de los microorganismos aislados a partir de la muestra Acosta

Se obtuvieron secuencias del gen 16S rRNA para 4 microorganismos aislados a partir del consorcio microbiano proveniente de la muestra Acosta. El análisis BLAST sugirió que las secuencias se asocian con secuencias de microorganismos de los géneros *Chryseobacterium*, *Stenotrophomonas*, *Brevibacillus* y *Acinetobacter*.

La figura 18 muestra el árbol filogenético construido con secuencias 16S rRNA de las especies representativas de los cuatro géneros así como especies que tenían una alta similitud con las secuencias del presente trabajo. La secuencia del aislado 1 se asoció estrechamente con *Chryseobacterium moeclatypicola* y tuvo un porcentaje de similitud de 97.3%. La secuencia del aislado 2 se asoció por igual en el árbol a *Stenotrophomonas chelatiphaga*, *Stenotrophomonas humi* y *Stenotrophomonas maltophilia* y tuvo un porcentaje de similitud de 98.8%. La secuencia del aislado 3 se asoció con una secuencia de *Brevibacillus parabrevis* con la cual compartió el 98.3% de similitud. Finalmente el aislado 4 se asoció con *Acinetobacter baumannii* con un porcentaje de similitud de 99.7%.

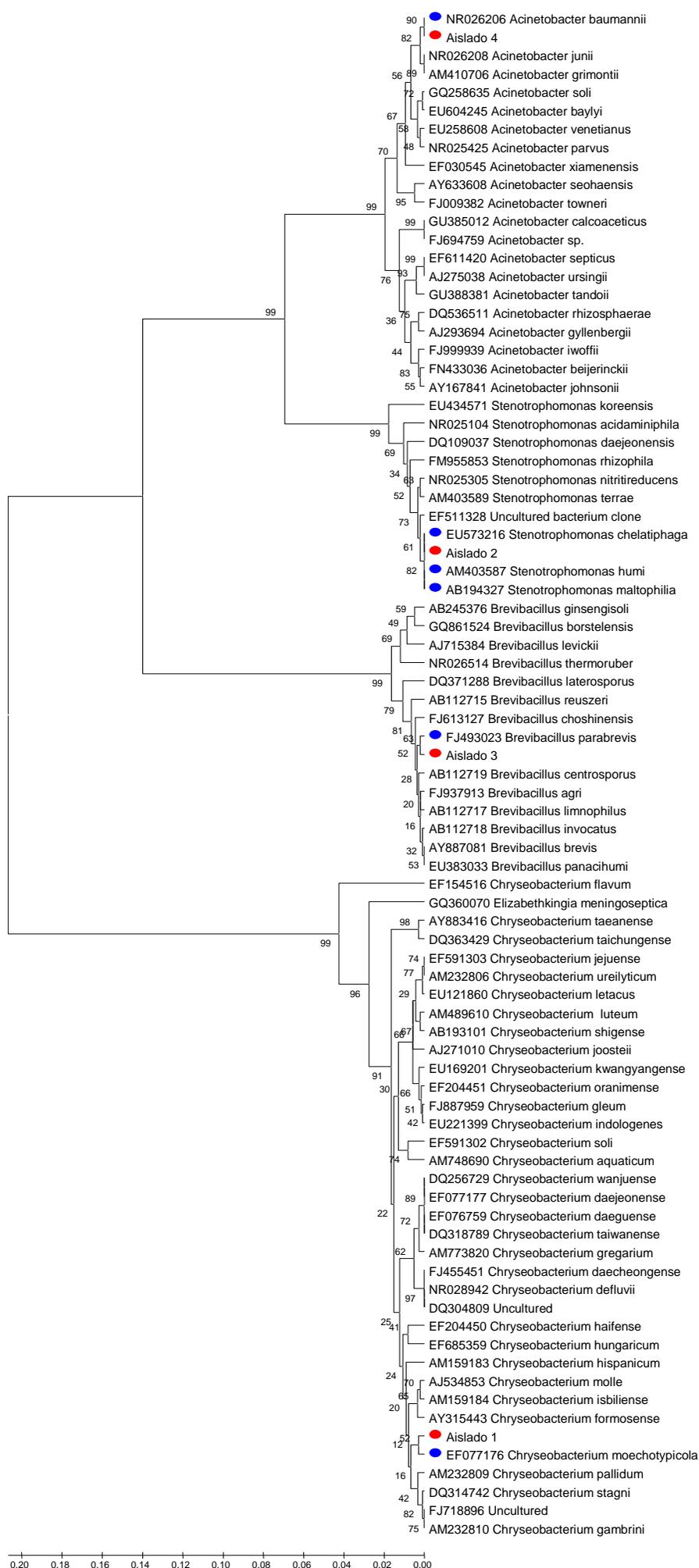


Figura 18. Relaciones filogenéticas de las secuencias del gen 16S rRNA de los aislados de la muestra Acosta. El árbol se construyó a partir de un alineamiento de 571 posiciones con organismos integrantes de los géneros *Chryseobacterium*, *Stenotrophomonas*, *Brevibacillus* y *Acinetobacter*.

Se empleó el modelo de sustitución de Jukes Cantor y el método de agrupamiento UPGMA, se aplicó un remuestreo tipo bootstrap con 1,000 aleatorizaciones. Las etiquetas rojas son las secuencias del presente trabajo mientras que las etiquetas azules muestran las secuencias de los organismos con una asociación más estrecha.

IX. DISCUSIÓN

Se ha reportado ampliamente la capacidad de una gran diversidad de bacterias para degradar bifenilo; entre las más eficientes se encuentran los géneros de *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Acinetobacter* y *Burkholderia* (Haddock *et al.*, 1993; Maeda *et al.*, 1995; Furukawa, 2006). La ruta catabólica del bifenilo es la encargada de metabolizar este compuesto en donde la primera enzima que actúa es la bifenilo-2,3-dioxigenasa.

Los experimentos realizados en el presente estudio demostraron que los microorganismos provenientes de suelos presuntamente contaminados con BPCs, hidrocarburos del petróleo y metales fueron capaces de degradar bifenilo a distintas tasas. El bifenilo se eligió como compuesto modelo ya que activa las enzimas necesarias para su degradación, particularmente la bifenilo-2,3-dioxigenasa, que es la primera enzima de la ruta de degradación del bifenilo. Esta misma enzima también cataliza la degradación de otros compuestos orgánicos recalcitrantes como los BPCs y los HPAs (Pieper *et al.*, 2004; Furukawa, 2006; Witzig *et al.*, 2006; Ferraro *et al.*, 2007).

Es importante poner atención también en las dioxigenasas involucradas en la degradación de HPAs ya que los microorganismos del presente trabajo fueron aislados de suelos contaminados con estos compuestos (Jaime, 2010) y es posible que la maquinaria enzimática necesaria para degradarlos haya sido activada. Kasai *et al* (2003) analizaron el grupo de genes asociado a la degradación de fenantreno en una cepa de *Cycloclasticus* y se concluyó que una de las enzimas codificada posee poca especificidad que incluye fenantreno, naftaleno y bifenilo; con esto se demostró que una misma enzima es capaz de degradar un par de HPAs y bifenilo, lo que puede ser el caso de los microorganismos aislados durante el presente estudio.

La cantidad de microorganismos presentes en las muestras de suelo Tele, Reforma y Acosta fue variable. La caracterización del suelo llevada a cabo por Jaime (2010) indicó que el número de bacterias encontrado en las muestras Reforma y Acosta (alrededor de 10^6 UFC/g) es equivalente a la población bacteriana mínima reportada en suelos sanos que va de 10^6 a 10^9 UFC/g (Atlas y Bartha, 2002). Aunque Fernández *et al* (2001) reportaron que no se ha encontrado una relación entre el número de microorganismos hidrocarbonoclastas y la concentración de hidrocarburos presentes, Jaime (2010) también reportó una cantidad suficiente de bacterias hidrocarbonoclastas, por lo que se sugiere que estos suelos, desde el punto de vista microbiológico, puede ser sujeto a un proceso de biorremediación; sin embargo, los parámetros a considerar para un proceso de este tipo son mucho más que el contenido microbiano.

Según datos de Rodríguez (2009), en un suelo contaminado por metales, la cantidad de bacterias disminuye hasta 10^4 UFC/g, por lo tanto el número de bacterias encontrado en la muestra Tele (4×10^3 UFC/g) resulta consistente tomando en cuenta que la combinación de

condiciones imperantes en el suelo puede resultar muy estresante para la mayoría de los microorganismos.

Los consorcios microbianos presentes en las muestras Tele y Acosta estaban formados tanto por hongos como por bacterias y, en el caso de la muestra Reforma, únicamente se observó crecimiento bacteriano. Las características físico-químicas tuvieron una influencia importante sobre la biomasa microbiana de los suelos. Los resultados de Jaime (2010) mostraron que el suelo de las tres muestras era medianamente alcalino; para la mayoría de las especies bacterianas el pH óptimo está cercano a la neutralidad, por lo tanto el valor encontrado parece favorable para el crecimiento.

Por otro lado, el contenido de humedad en las tres muestras fue bajo (menor al 5%), la muestra Acosta presentó un porcentaje de humedad de 1.19% que fue el más bajo de los tres y puede deberse a que el sitio presentaba gran cantidad de drenaje o una gran exposición al sol. El contenido de humedad ideal de un suelo para el crecimiento microbiano es aproximadamente de 20% (Rodríguez, 2009) a 30% (Alexander, 1980). La humedad está correlacionada positivamente con la cantidad de hongos; sin embargo, éstos son capaces de sobrevivir en estado de latencia en condiciones de sequía.

En los sitios ricos en materia orgánica o material carbonáceo, las bacterias son numerosas. Asimismo, el número de hongos filamentosos en el suelo varía directamente con el contenido de materia orgánica utilizable. La presencia de sustratos orgánicos favorece el dominio de géneros como *Aspergillus* y *Fusarium* (ambos encontrados en la muestra Tele), *Penicillium*, *Mucor* y *Trichoderma* (Alexander, 1980).

El contenido de carbono total más elevado se presentó en la muestra Tele por lo que se esperaría un alto conteo microbiano; sin embargo, es posible que el número de bacterias se haya reducido debido a la competencia con los hongos, los cuales probablemente fueron favorecidos por las altas concentraciones de nitrógeno (Alexander, 1980).

En cuanto al contenido de algunos metales como fierro, cobre, zinc y manganeso observados en las muestras de suelo (Jaime, 2010) es posible que estos metales estén ejerciendo una cierta presión de selección sobre las comunidades microbianas y también activen mecanismos de detoxificación codificados genéticamente (Silver y Misra, 1988).

La mayoría de las bacterias son microorganismos de rápido crecimiento por lo tanto superan en actividad a los hongos. A lo largo de la estabilización de los cultivos microbianos, se observó claramente el desarrollo sobresaliente de bacterias, identificadas por la turbidez que causaron en el medio de cultivo así como por los agregados celulares. Se ha reportado una mayor diversidad de bacterias que de hongos capaces de utilizar el bifenilo como fuente de carbono y energía (Abramowicz, 1990; Kamei *et al.*, 2006; Ruiz-Aguilar *et al.*, 2002) por lo tanto parece que aquellas son capaces de utilizar este sustrato más eficientemente.

Una muestra de suelo contiene varios microorganismos que desempeñan papeles diferentes en el proceso de mineralización, las condiciones nutricionales van determinando la actividad de cada uno de ellos. Cuando a una bacteria se le proporciona una mezcla de diferentes nutrientes, utilizará uno preferentemente y comenzará a utilizar el segundo cuando el primero se haya consumido (Davis *et al.*, 1984). Durante la transición de un nutriente a otro, el crecimiento disminuirá o incluso se detendrá (Singleton, 1995). La curva de crecimiento de los microorganismos encontrados en la muestra Acosta, comparada con la de remoción de bifenilo (Fig. 12), permite identificar dos grupos de microorganismos: se sugiere que el primero fue capaz de aprovechar el bifenilo (primer sustrato) como fuente de carbono y energía y fue el primero en crecer; el segundo aprovechó los productos de degradación de bifenilo (segundo sustrato) y creció una vez que estos se acumularon en el medio.

En la curva de la cinética de remoción de bifenilo se observa que éste se consumió al tiempo que los microorganismos capaces de aprovecharlo crecieron. Posteriormente, tras una pausa, comenzaron a crecer los demás. A lo largo de la degradación de bifenilo, se acumularon los subproductos hasta que se tuvo una cantidad suficiente para inducir las enzimas requeridas para su metabolismo (Davis *et al.*, 1984); entonces, inició el crecimiento de los otros componentes del consorcio que aprovecharon tales subproductos.

Los metabolitos juegan un papel importante en la asociación del sustrato con otros componentes. Allard y Neilson (1997) reportaron que los metabolitos del naftaleno producidos por hongos juegan un papel en la asociación de este compuesto con material húmico. También mostraron que alguna fracción de los sustratos puede adherirse al micelio fúngico. Entonces, es posible que en la muestra Tele y Reforma los metabolitos del bifenilo producidos por hongos favorecieran su asociación con otros componentes del medio y por lo tanto se afectara su biodisponibilidad o interfiriera con su catabolismo enzimático. También, se sugiere que el bifenilo se haya adherido al micelio y por lo tanto no estuviera fácilmente disponible para ser biodegradado.

El consorcio microbiano presente en la muestra Acosta y que creció hasta su supuesta fase más activa (18 h) degradó 60 ppm de bifenilo en 12 h con una tasa de degradación de 7.7 ppm/h. A las 24 h había degradado 100 ppm de este compuesto. Esta tasa fue la más alta lograda en el presente estudio por lo tanto se sugiere que los microorganismos efectivamente se encontraban en su momento de mayor actividad de degradación. Además, estudios realizados por Hong *et al* (2009) documentan que una cepa de *Achromobacter sp.* aislada de suelos contaminados con petróleo, fue capaz de remover 50 ppm de bifenilo en 12 h mientras Li *et al* (2009) documentan que un ejemplar de *Dyella ginsengisoli*, aislado de un lodo activado, degradó 95 ppm de bifenilo en 36 h; por lo tanto, se considera que los microorganismos de la muestra Acosta son muy eficientes para degradar bifenilo.

La efectividad de un consorcio microbiano depende de la capacidad metabólica que tengan sus integrantes para degradar y utilizar un contaminante en particular así como de la posibilidad de que las enzimas responsables de su degradación sean expresadas. Las bacterias son microorganismos con gran flexibilidad metabólica que colonizan muchos ambientes. El consorcio bacteriano encontrado en la muestra Acosta fue el más eficiente para degradar bifenilo debido a que era de rápido crecimiento, los metabolitos no eran tóxicos en las cantidades que se acumularon y la concentración de bifenilo logró activar la maquinaria enzimática necesaria para su degradación.

La incapacidad de un compuesto para inducir la síntesis de las enzimas responsables de su degradación conlleva a que sea persistente, incluso cuando tales enzimas son capaces de metabolizarlo (Atlas y Bartha, 2002). Los resultados obtenidos proporcionan información acerca de la capacidad del bifenilo para activar la vía de degradación que permite su remoción y que también está implicada en la de otros muchos compuestos orgánicos recalcitrantes.

El estudio de la composición del consorcio microbiano capaz de llevar a cabo la degradación de un contaminante en particular es importante porque los microorganismos involucrados forman parte de comunidades complejas y dinámicas conformadas por numerosas especies. Para comprender su función en sus nichos específicos, es esencial identificar y cuantificar cada uno de los miembros que conforman estas comunidades. Además, el conocimiento de los integrantes de un consorcio proveniente de un suelo contaminado aporta información acerca de la caracterización de dichos hábitats y del papel que están jugando los microorganismos en procesos ambientales como la biodegradación de contaminantes (Nogales *et al.*, 2001).

Una de las principales limitantes al momento de estudiar una comunidad microbiana es que más del 90% de sus integrantes no son cultivables. Las técnicas moleculares, como la PCR-RFLP, que se valen de la extracción directa de DNA a partir de la muestra ambiental superan esta barrera ya que no dependen de un cultivo previo de los microorganismos para obtener su DNA.

La divergencia en la secuencia del gen 16S rRNA entre diferentes especies bacterianas, ha sido empleado como un indicador de diversidad. Para evaluar dicha diversidad se llevó a cabo la amplificación, clonación y análisis de la secuencia del gen 16S rRNA de las clonas seleccionadas. Con esta técnica es posible obtener información acerca de la mayoría, no de la totalidad, de los integrantes de un consorcio microbiano, ya que las especies que constituyen un porcentaje menor de la población no son fácilmente detectables por este medio (Muyzer *et al.*, 1993). La PCR es una técnica que, como muchas otras, presenta un sesgo. Al momento de llevar a cabo la ligación, se presentará una competencia entre los genes por unirse al vector, por lo tanto los genes de las especies más abundantes tendrán

mayores posibilidades de ser exitosos. Posteriormente, debido a la naturaleza logarítmica de la PCR, las clonas más abundantes se sobrerrepresentarán.

Se estima que en un suelo contaminado por metales hay de 350 a 1500 genomas diferentes. En el presente estudio se obtuvieron 5 patrones de bandeo diferentes; tal y como sucedió, se esperaba una baja diversidad bacteriana ya que además de la selección a la que los organismos estuvieron sujetos en su ambiente natural contaminado, fueron sometidos a una segunda presión de selección, que fue el bifenilo en el medio de cultivo. La poca humedad del suelo también pudo haber ido en detrimento de la diversidad bacteriana (Escalante *et al.*, 2004).

El uso de RFLP para estimar la diversidad en un consorcio microbiano puede presentar algunas características que subestimen la diversidad. La co-emigración de diferentes secuencias hacia la misma posición del gel reduce el número de bandas observadas y algunas manchas pueden contener varias bandas (McCaig *et al.*, 2001). También existe el riesgo de homoplasia; varias líneas filogenéticas pueden tener en común los mismos caracteres aunque no estén relacionados con un ancestro común y por lo tanto especies distintas van a exhibir el mismo patrón de bandeo.

Con el fin de secuenciar únicamente el fragmento del gen 16S rRNA presente en el vector y no incluir aquél del hospedero, se intentó amplificar utilizando oligonucleótidos específicos; sin embargo, el procedimiento no fue exitoso desde el principio y encontramos un variedad de explicaciones.

La presencia de inhibidores puede interferir con la interacción entre la polimerasa y el DNA, impidiendo la amplificación. Ejemplos de inhibidores son detergentes, reguladores, enzimas, ácidos, sales e incluso constituyentes de las células o el DNA no blanco. Su acción puede explicar la obtención de falsos negativos.

Si no se lleva a cabo una extracción de DNA adecuada, los compuestos fenólicos utilizados en el proceso pueden acarrear, unirse con la polimerasa e inactivarla. Asimismo, las proteinasas utilizadas en la extracción pueden desnaturalizarla. Los detergentes pueden permitir la solución de inhibidores que de otra forma se agregarían y precipitarían.

La efectividad de los oligonucleótidos puede reducirse cuando estos reconocen de manera inespecífica al DNA no blanco. Además, altas concentraciones de este DNA previenen la interacción específica entre la polimerasa y el DNA blanco.

Nogales *et al.* (2001) demostraron que en ocasiones ocurre la inhibición temprana de la amplificación de hebras de DNA molde abundantes mientras las menos abundantes continúan siendo amplificadas; entonces en el presente trabajo se diluyeron las muestras y además se purificaron para eliminar posibles inhibidores y eliminar el DNA no blanco. Sin embargo, estas modificaciones no permitieron la amplificación.

Los testigos negativos indicaron que no había contaminación al tiempo que los positivos indicaron que los componentes de la mezcla de reacción estaban funcionando. Es probable que las muestras que no amplificaron presentaran inhibidores que no estaban presentes en las muestras con amplificación positiva y que no pudieron ser eliminados a través de la purificación y la dilución.

Si no es posible exponer los ácidos nucleicos para que sean blanco de amplificación, este procedimiento no será exitoso. Una lisis inadecuada de la pared celular puede deberse a condiciones subóptimas de temperatura o agitación, desnaturalización de las enzimas líticas, que éstas sean de baja calidad o estén interferidas por inhibidores. El método de extracción debe ser lo suficientemente agresivo para lisar la pared celular pero sin dañar la integridad del DNA. En el presente estudio el hecho de que algunas muestras amplificarán sugiere que el protocolo de extracción era eficiente; sin embargo, en algunos casos la susceptibilidad a la lisis tiene que ver con la etapa en el ciclo celular así como con las condiciones de nutrición.

Otro factor pudieron haber sido las polimerasas comerciales que presentan diferencias de fidelidad y pureza; se combinaron diferentes polimerasas con el fin de aumentar las posibilidades de amplificación.

Los iones de Mg^{2+} son cofactores vitales de la *Taq* DNA polimerasa y su concentración afecta el éxito y especificidad de la amplificación. Se aumentó la concentración de Mg^{2+} con el fin de disminuir la posibilidad de secuestro de estos iones por varios otros compuestos (contaminantes exógenos y endógenos) así como su interferencia con iones de Ca^{2+} lo cual puede inhibir la amplificación.

La estructura primaria de DNA es susceptible a la inestabilidad y decaimiento debido a hidrólisis, daño oxidativo o degradación enzimática (nucleasas), sin embargo se comprobó que el DNA empleado en el presente estudio era de buena calidad lo que aumentaba considerablemente las posibilidades de poder amplificar alguno de sus genes.

El análisis de la secuencia del gen 16S RNA y su comparación con las secuencias encontradas en la base de datos Gene Bank, permitió asociarlas con especies conocidas así como identificar capacidades importantes que pueden aplicarse en la biorremediación.

Un gran número de especies del género *Chryseobacterium* han sido aisladas de sitios contaminados con compuestos orgánicos persistentes tales como hidrocarburos (Nishikawa *et al.*, 2006; Szoboszlay *et al.*, 2008), alquitrán (Shen *et al.*, 2005) y aguas residuales de una refinería; en este último caso las bacterias fueron capaces de utilizar carbazol, fenantreno, naftaleno e imidazol como fuente de carbono, nitrógeno y energía (Weiqiang *et al.*, 2008). Por otro lado Radianingtyas *et al* (2003) reportaron que *Chryseobacterium* y *Stenotrophomonas maltophilia*, aisladas de un suelo agrícola, utilizaron anilina y 4-

cloroanilina como fuente de carbono. Este género también es capaz de degradar pesticidas (Rama y Ligy, 2009) y crecer en suelos contaminados con cadmio (Zhang *et al.*, 2007).

Se han reportado una amplia variedad de sustratos potencialmente degradables por *Brevibacillus*. Especies de este género se han aislado de suelos contaminados con petróleo y son capaces de utilizarlo como fuente de carbono (Cervantes-González, *et al.*, 2008), otras tienen el potencial para decolorar diversos colorantes azo textiles (Gomare y Govindwar, 2009) y también han sido aisladas de suelos contaminados con cadmio y zinc (Vivas *et al.*, 2005).

En el caso de *Acinetobacter*, Ahmad *et al* (2009) comprobaron su capacidad para remover cromo de medios líquidos; también se han aislado ejemplares de suelos contaminados con hidrocarburos capaces de degradar benceno, tolueno y etilbenceno (Kim y Jeon, 2009).

Stenotrophomonas maltophilia es la especie más predominante del género y posee un amplio rango de actividades en el ambiente entre las que se encuentran la degradación de contaminantes antropogénicos y naturales. Este género es capaz de adaptarse a una variedad de nichos ecológicos (Ryan *et al.*, 2009). Al igual que los géneros anteriores, *Stenotrophomonas maltophilia* es un habitante común de sitios contaminados con HPAs, incluyendo petróleo, por lo que es capaz de biorremediarlos (Abbassi y Shquirat, 2008). Puede utilizar pireno como única fuente de carbono y energía, así como otros HPAs de alto peso molecular que contienen hasta siete anillos aromáticos (Boonchan *et al.*, 1998); también lleva a cabo la degradación reductiva de pirazina-2-carboxilato ya que lo utiliza como única fuente de nitrógeno (Rajini *et al.*, 2010). Especies del mismo género utilizan p-nitrofenol y 4-clorofenol como única fuente de carbono, nitrógeno y energía por lo que se proponen como candidatos potenciales para degradar compuestos fenólicos (Liu *et al.*, 2007). Kaparullina *et al* (2009) demostraron que una especie aislada de lodos residuales era capaz de utilizar EDTA.

La diversidad de sustratos que pueden ser utilizados como fuente de carbono, nitrógeno y energía por *Chryseobacterium*, *Brevibacillus*, *Acinetobacter* y *Stenotrophomonas* sugiere que poseen una flexibilidad genética amplia que les permite adaptarse a una variedad de medios, aunque presenten condiciones adversas. Además, considerando que estos ejemplares formaban parte del consorcio bacteriano presente en la muestra Acosta que fue el que presentó la mayor capacidad de degradación de bifenilo, se sugiere que poseen mecanismos enzimáticos eficientes para la degradación de un amplio rango de compuestos orgánicos persistentes por lo que se proponen como candidatos potenciales en la aplicación de tecnologías de biorremediación.

X. CONCLUSIONES

1. Los microorganismos aislados a partir de suelos de la localidad de San Nicolás, Tequisquiapan, Querétaro, presentan la maquinaria enzimática necesaria para degradar bifenilo, la cual fue activada en presencia de dicho compuesto.
2. Los resultados de las cinéticas de remoción de bifenilo demostraron que los microorganismos con mayor capacidad para degradar este compuesto fueron aquellos provenientes de la muestra Acosta ya que degradaron 100 ppm en 24 horas.
3. Los perfiles de RFLP y los aislados en placa permitieron delimitar que existían alrededor de cuatro especies bacterianas diferentes en el consorcio presente en la muestra Acosta lo que corresponde a una diversidad microbiana baja; sin embargo, era la esperada debido a las presiones de selección a las que fueron sometidas los microorganismos.
4. La comparación del gen 16S rRNA resultó de utilidad para determinar que las especies presentes en la muestra Acosta corresponden a *Chryseobacterium moeclotypicola*, *Brevibacillus parabrevis*, *Acinetobacter baumannii* y *Stenotrophomonas sp.*
5. La diversidad genética de las vías metabólicas presente en estas especies, aunada a su capacidad para degradar bifenilo, reflejan divergencias funcionales en su capacidad de degradación por lo que se propone a estas especies como candidatos potenciales para la remediación de sitios contaminados con compuestos orgánicos persistentes, aunque se requiere profundizar en los mecanismos bioquímicos y fisiológicos implicados en la degradación de contaminantes así como en los genes relacionados.

XI. RECOMENDACIONES

- * Evaluar si los microorganismos identificados en el presente estudio son capaces de degradar compuestos más persistentes que el bifenilo.
- * Medir la actividad enzimática de la dioxigenasa como un indicador adicional de biodegradación de compuestos aromáticos.
- * Caracterizar la diversidad microbiana que habita en el suelo de San Nicolás presuntamente contaminado con BPCs, hidrocarburos y metales con el fin de identificar tanto a los microorganismos cultivables como a los no cultivables.
- * Analizar la función de cada uno de los miembros de la comunidad microbiana en sus nichos específicos así como los mecanismos bioquímicos y fisiológicos implicados en la degradación de contaminantes persistentes.
- * Evaluar el potencial que presentan los microorganismos obtenidos como candidatos para el establecimiento de tecnologías de biorremediación de compuestos recalcitrantes.

XII. REFERENCIAS

- Abbassi, B., Shquirat, W. 2008. Kinetics of Indigenous Isolated Bacteria used for Ex-Situ Bioremediation of Petroleum Contaminated Soil. *Water, Air and Soil Pollution* 192:221–226.
- Abraham, W., Nogales, B., Golyshin, P., Pieper, D., Timmis, K. 2002. Polychlorinated biphenyl-degrading microbial communities in soils and sediments. *Current Opinion in Microbiology* 5:246-253.
- Abramowicz, D. 1990. Aerobic and anaerobic biodegradation of PCBs: A review. *Critical Reviews in Biotechnology* 10:241-251.
- Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. (ATSDR). 2000. Reseña Toxicológica de los Bifenilos policlorados (BPCs) (en inglés). Atlanta, GA: Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU. Servicio de Salud Pública.
- Ahmad, W., Zakaria, Z., Razali, F., Samin, J. 2009. Evaluation of the Combined Cr(VI) Removal Capacity of Sawdust and Sawdust-Immobilized *Acinetobacter haemolyticus* Supplied with Brown Sugar. *Water, Air and Soil Pollution*. 204:195-203.
- Ahmed, D., Focht, D. 1972. Degradation of polychlorinated biphenyls by two species of *Achromobacter*. *Canadian Journal of Microbiology* 19:47-52.
- Alexander, M. 1965. Interacciones microbianas con contaminantes xenobióticos e inorgánicos. En: Atlas, R., Bartha, R. 2002. *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. Pearson Educación, S.A. Madrid. 677 pp.
- Alexander, M. 1980. *Introducción a la microbiología del suelo*. AGT Editor, S.A. México. 491 pp.
- Allard, A., Neilson, A. 1997. Bioremediation of organic waste sites: A critical review of microbiological aspects. *International Biodeterioration and Biodegradation* 39:253-285.
- Álvarez, R. 2009. Advierten en Querétaro de ladrilleras “ecológicas”. Consultado en el periódico Excélsior en línea www.exonline.com.mx el 30-01-10.
- Atlas, R., Bartha, R. 2002. *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. Pearson Educación, S.A. Madrid. 677 pp.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25:3389-3402.
- Anaya, A. Rico, R y Rea, L. 2010. Inventario geo-referenciado de la industria ladrillera en el estado de Querétaro y su impacto. Consultado en www.uaemex.mx/Red_Ambientales/docs/congresos el 20-01-2010.
- Benítez, R. 2010. La Comunidad del ladrillo. *Tribuna de Querétaro*. Periódico semanal editado por la Facultad de Ciencias Políticas y Sociales de la Universidad Autónoma de Querétaro. Consultado en <http://www.uaq.mx/fcps/tribuna> el 29-01-2010.
- Bergeron, J., Ahmad, D., Barriault, D., Larose, A., Sylvestre, M., Powlowski, J. 1994. Identification and mapping of the gene translation products involved in the first steps of the *Comamonas testosteroni* B-356 biphenyl/chlorobiphenyl biodegradation pathway. *Canadian Journal of Microbiology* 40:743-53.
- Bitincka, L. 2003. Laboratorio del Dr. James Campanella en la Universidad Montclair State. Departamento de biología y biología molecular. Montclair, NJ 07043.

Bolivar, F. 2004. Ingeniería genética: las herramientas moleculares y los métodos para aislar, caracterizar y manipular el DNA. En: Bolívar, F. Fundamentos y Casos Exitosos de la Biotecnología Moderna. El Colegio Nacional. México. 57-84pp.

Boonchan, S., Britz, M., Stanley, G. 1998. Surfactant-enhanced biodegradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia*. Biotechnology and Bioengineering 59:482-494.

Cervantes-González, E. N., Rojas-Avelizapa, G., Cruz-Camarillo, R., García-Mena, J., Rojas-Avelizapa, I. 2008. Oil-removal enhancement in media with keratinous or chitinous wastes by hydrocarbon-degrading bacteria isolated from oil-polluted soils. Environmental Technology 29:171-182.

Comeau, Y., Greer, C., Samson, R. 1993. Role of inoculum preparation and density in the bioremediation of 2,4-D-contaminated soil by bioaugmentation. Applied Microbiology and Biotechnology 38:681-687.

Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS). Comisión de Evidencia y Manejo de Riesgos. 2005. Monitoreo de bifenilos policlorados (BPCs) en suelo generados por la contaminación de las ladrilleras en San Nicolás Tequisquiapan, Querétaro.

Costilla, R., Pérez, I., Trejo, A., Verduzco, B., Gómez, H., Torres, A., Díaz-Barriga, F. 2006. Análisis de Bifenilos policlorados (PCBs) en suelo superficial y en niños de San Nicolás, Tequisquiapan, Querétaro. Consultado en www.ine.gob.mx el 29-01-2010.

Davis, B., Dulbecco, R., Eisen, H., Ginn, H. 1984. Tratado de microbiología. Salvat editores. S. A. 3ra edición. México. 1097 pp.

Dibyendu, S., Ferguson, M., Datta, R., Birnbaum, S. 2005. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: Comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation. Environmental Pollution 136:104-107.

Dojka, M., Hugenholtz, P., Haack, S., Pace, N. 1998. Microbial Diversity in a Hydrocarbon- and Chlorinated-Solvent-Contaminated Aquifer Undergoing Intrinsic Bioremediation. Applied and Environmental Microbiology 64:3869-3877.

Erickson, B., Mondello, F. 1992. Nucleotide sequencing and transcriptional mapping of the genes encoding biphenyl dioxygenase, a multicomponent polychlorinated-biphenyl degrading enzyme in *Pseudomonas* strain LB400. Journal of Bacteriology 174:2903-12.

Escalante, A., Gosset, G., Martínez, A., Bolivar, F. 2004. Diversidad Bacteriana del Suelo: Métodos de Estudio no Dependientes del Cultivo Microbiano e Implicaciones Biotecnológicas. Agrociencia 38:1405-3195.

Evans, B., Dudley, C., Klasson, K. 1996. Sequential anaerobic/aerobic biodegradation of PCBs in soil slurry microcosms. Applied Biochemistry and Biotechnology 57/58:885-894.

FERMENTAS. Catálogo de productos. Disponible en: <http://www.fermentas.com>. Consultado el 12-02-2010.

Fernández, L., Molina, I., Mejía, M. 2001. Estudios de fitorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. Instituto Mexicano del Petróleo. IX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Consultado en www.smbb.com.mx el 03-05-2010.

Ferraro, D., Brown, E., Yu, C., Parales, R., Gibson, D., Ramaswamy, S. 2007. Structural investigations of the ferredoxin and terminal oxygenase components of the biphenyl 2,3-dioxygenase from *Sphingobium yanoikuyae* B1. BMC Structural Biology 7:10.

Furukawa, K., Matsumura, F., Tonomura, K. 1978. *Alcaligenes* and *Acinetobacter* strains capable of degrading polychlorinated biphenyls. Agricultural Biology and Chemistry 42: 543-8.

- Furukawa, K. 1994. Molecular genetics and evolutionary relationship of PCB-degrading bacteria. *Biodegradation* 5:289-300.
- Furukawa, K. 2006. Oxygenases and Dehalogenases: Molecular Approaches to Efficient Degradation of Chlorinated Environmental pollutants. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 70:2335-2348.
- Galtier, N., Gouy, M., Gautier, C. 1996. SEAVIEW and PHILO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Computational Applied Bioscience* 12:543-548.
- Gomare, S.S., Govindwar, S.P. 2009. *Brevibacillus laterosporus* MTCC 2298: a potential azo dye degrader. *Journal of Applied Microbiology* 106:993-1004.
- González, H., Herrera, G., Landaverde, J., Morales, A., Garduño, M. 2005. Enciclopedia de los Municipios de México. Querétaro. Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal. Gobierno del Estado de Querétaro. Consultado en www.e-local.gob.mx el 05-02-2010.
- Haddock, J., Nadim, L., Gibson, D. 1993. Oxidation of biphenyl by a multicomponent enzyme system from *Pseudomonas sp.* strain LB400. *Journal of Bacteriology* 175: 395-400.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.
- Head, I., Saunders, J., Pickup, R., 1998. Microbial evolution, diversity and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganism. *Microbial Ecology* 35:1-21.
- Hong, Q., Dong, X., He, L., Jiang, X., Li, S. 2009. Isolation of a biphenyl-degrading bacterium, *Achromobacter sp.* BP3, and cloning of the bph gene cluster. *International Biodeterioration and Biodegradation* 63:365-370.
- INEGI. 2005. II Censo de Población y Vivienda. Consultado en www.inegi.org.mx el 05-02-2010.
- Ize-Lema, I., Yarto-Ramírez, M., Gavilán-García, A., Yañez-Estrada, L., Carrizales, L., Trejo, A., Pérez-Maldonado, I., Díaz-Barriga, F. 2004. Metales y contaminantes orgánicos persistentes en niños de sitios contaminados de México. Consultado en www.ine.gob.mx el 20-01-2010.
- Jaime, S. 2010. Biotratibilidad de un sitio contaminado con compuestos recalcitrantes. Tesis profesional de licenciatura. División Ciencias de la Vida. Universidad de Guanajuato. Irapuato.
- Kamei, I., Sonoki, S., Haraguchi, K. 2006. Fungal bioconversion of toxic polychlorinated biphenyls by white-rot fungus, *Phlebia brevispora*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 73:932-94.
- Kaparullina, E., Doronina, N., Chistyakova, T., Trotsenk, Y. 2009. *Stenotrophomonaschelatifhaga sp. nov* a new aerobic EDTA-degrading bacterium. *Systematic and Applied Microbiology* 32:157-162.
- Kasai, Y., Shindo, K., Harayama, S., Misawa, N. 2003. Molecular characterization and substrate preference of a polycyclic aromatic hydrocarbon dioxygenase from *Cycloclasticus sp.* strain A5. *Applied Environmental Microbiology* 69:6688-6697.
- Keil, J., Sandifer, S., Graber, C., Priester, L. 1972. DDT and polychlorinated biphenyl(Aroclor 1242): Effects of uptake on *E. coli* growth. *Water Research* 6:837-41.
- Kim, J., Jeon, C. 2009. Isolation and Characterization of a New Benzene, Toluene and Ethylbenzene Degrading Bacterium, *Acinetobacter sp.* B113. *Current Microbiology* 58:70-75.

- Lemey, P., Salemi, M., Vandamme, A. 2009. The phylogenetic handbook. 2da edición. Cambridge University Press. Reino Unido. 723 pp.
- Li, A., Qu, Y., Zhou, J., Gou, M. 2009. Isolation and characteristics of a novel biphenyl-degrading bacterial strain, *Dyella ginsengisoli* LA-4. *Journal of Environmental Sciences* 21: 211-217.
- Liu, Z., Yang, C., Qiao, C. 2007. Biodegradation of p -nitrophenol and 4-chlorophenol by *Stenotrophomonas* sp. *FEMS Microbiology Letters* 277:150-156.
- Maeda, M., Chung, S., Song, Y., Kudo, T. 1995. Multiple genes encoding 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase in the gram-positive polychlorinated biphenyl-degrading bacterium *Rhodococcus erythropolis* TA421, isolated from a termite ecosystem. *Applied Environmental Microbiology* 65:549-555.
- Martínez, V., López, F. 2001. Efecto de hidrocarburos en las propiedades físicas y químicas de suelo arcilloso. *TERRA Latinoamericana* 19:9-17.
- McCaig, A., Glover, A., Prosser, J. 2001. Numerical Analysis of Grassland Bacterial Community Structure Under Different Land Management Regimens by Using 16S Ribosomal DNA Sequence Data and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Banding Patterns. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 4554-4559.
- McDougald, D., Rice, S., Weichart, D., Kjelleberg, S. 1998. Nonculturability: adaptation or debilitation. *FEMS Microbiology Ecology* 25:1-9.
- Miskin, I., Farrimond, P., Head, I. 1999. Identification of novel lineages as active members of microbial populations in a freshwater sediment using a rapid RNA extraction procedure and RT-PCR. *Microbiology* 145:1977-1987.
- Muyzer, G., De Waal, E., Uitterlinden, A. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59:695-700.
- Nam, J., Nojiri, H., Yoshida, T., Habe, H., Yamane, H., Omori, T. 2001. New classification system for oxygenase components involved in ring-hydroxylating oxygenations. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 65:254-263.
- NCBI. National Center for Biotechnology Information. Consultado en www.ncbi.nlm.nih.gov/ el 24-01-2010.
- Nishikawa, Y., Saito, M., Naganuma, T. 2006. Succession of bacterial communities during petroleum degradation in bark compost as detected by small subunit ribosomal RNA gene profiles. *Aquatic Ecosystem Health and Management* 9:457-462.
- Nogales, B., Moore, E., Llobet-Brossa, E., Rossello-Mora, R., Amann, R., Timmis, K. 2001. Combined Use of 16S Ribosomal DNA and 16S rRNA to Study the Bacterial Community of Polychlorinated Biphenyl-Polluted Soil. *Applied and Environmental Microbiology* 67:1874-1884.
- Nogales, B. 2005. La microbiología del suelo en la era de la biología molecular: descubriendo la punta del iceberg. *Ecosistemas* 14:41-50.
- O'Donnell, A., Görres, H. 1999. 16S rDNA methods in soil microbiology. *Current Opinion in Biotechnology* 10:225-229.
- Øvreås, L., Jensen, S., Daae, F.L., Torsvik, V. 1998. Microbial community changes in a perturbed agricultural soil investigated by molecular and physiological approaches. *Applied Environmental Microbiology* 64:2739-2742.
- PEMEX. 2007. Subdirección de auditoría en seguridad industrial y protección ambiental. Gerencia de seguridad industrial. Hoja de datos de seguridad de sustancias. Consultado en <http://www.pemex.com> el 10-09-09.

- Pieper, D., Martins dos Santos, V., Golyshin, P. 2004. Genomic and mechanistic insights into the biodegradation of organic pollutants. *Current Opinion in Biotechnology* 15:215-224.
- Radianingtyas, H., Robinson, G., Bull., A. 2003. Characterization of a soil-derived bacterial consortium degrading 4-chloroaniline. *Microbiology* 149:3279-3287.
- Rajini, K.S., Sasikala, Ch., Ramana, Ch. V. 2010. Reductive degradation of pyrazine-2-carboxylate by a newly isolated *Stenotrophomonas sp.* HCU1. Biodegradation DOI 10.1007/s10532-010-9345-0.
- Rama, K., Ligy, P. 2009. Biodegradation of mixed pesticides by mixed pesticide enriched cultures. *Journal of Environmental Science and Health, Part B, Pesticides, Food Contaminants and Agricultural Wastes* 44:18-30.
- Relman, D. A. 1993. Universal bacterial 16S rDNA amplification and sequencing. En Persing, D.H. T.F, Smith. F.C, Tenover y T.J, White. *Diagnostic molecular microbiology: principles and applications*. American Society of Microbiology. Nueva York. 489-496 pp.
- Rodríguez, W. 2009. Estudio de la remoción vía microbiana de Ni y V presentes un catalizadores gastados. Tesis profesional de maestría. Instituto Politécnico Nacional. Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada. Querétaro. 70 pp.
- Rondon, M., Goodman, M., Handelsman, J. 1999. The earth's bounty: assessing and accessing the soil microbial diversity. *Trends in Biotechnology* 17:403-409.
- Ruiz-Aguilar, G. 2005. Biodegradación de Bifenilos Policlorados (BPCs) por Microorganismos. *Acta Universitaria* 15:19-28.
- Ruiz-Aguilar, G., Fernández-Sánchez, J., Rodríguez-Vázquez, R., Poggi-Varaldo, H. 2002. Degradation by white-rot fungus of high concentrations of PCB extracted from a contaminated soil. *Advances in Environmental Research* 6:559-568.
- Ryan, R., Monchy, S., Cardinale, M., Taghavi, S., Crossman, L., Avison, M., Berg, G., Van der Lelie, D., Maxwell Dow, J. 2009. The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nature Reviews Microbiology* 7:514-525.
- Sambrook, J., Russell, D. W. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 3ra Edición. Nueva York.
- Sangabriel, W., Ferrera-Cerrato, R., Trejo-Aguilar, D., Mendoza-López, M., Cruz-Sánchez, J., López-Ortíz, C., Delgadillo-Martínez, J., Alarcón, A. 2006. Tolerancia y capacidad de fitorremediación de combustóleo en el suelo por seis especies vegetales. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 22:63-73.
- Seeger, M., Timmis, K., Hofer, B. 1997. Bacterial pathways for the degradation of polychlorinated biphenyls. *Marine Chemistry* 58:327-333.
- Shen, F.T., Kämpfer, P., Young, C.C, Lai W.A., Arun, A.B. 2005. *Chryseobacterium taichungense* sp. nov., isolated from contaminated soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55:1301-1304.
- Silver, S., Misra, T. 1988. Plasmid-mediated Heavy Metal Resistances. *Annual Reviews on Microbiology* 42: 717-43.
- Singleton, P. 1995. *Bacteria in biology, biotechnology and medicine*. John Wiley & Sons. 3ra edición. Inglaterra. 319 pp.
- Sylvestre, M. 1995. Biphenyl/Chlorobiphenyls catabolic pathway of *Comamonas testosteroni* B-356: Prospect for use in Bioremediation. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 189-211

- Szoboszlay, S., Atzél, B., Kukolya, J., Tóth, E., Márialigeti, K., Schumann, P., Kriszt, B. 2008. *Chryseobacterium hungaricum* sp. nov., isolated from hydrocarbon-contaminated soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 2748-2754.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. 2007. *MEGA4*: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 24:4876-4882.
- Torsvik, V., Øvreås, L. 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* 5: 240-245.
- UAQ, UASLP, UNAM. 2005. Estudio de la contaminación generada por los hornos ladrilleros de la población de San Nicolás, municipio de Tequisquiapan, Querétaro.
- Vallaes, T., Persello-Cartieaux, F., Rouard, N., Lors, C., Laguerre, G., Soulas, G. 1997. PCR-RFLP analysis of 16S rRNA, *tfdA* and *tfdB* genes reveals a diversity of 2,4-D degraders in soil aggregates. *Microbiology Ecology* 24:269-278.
- Valli, K., Gold, M. 1991. Degradation of 2,4-dichlorophenol by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Bacteriology* 173:345-352.
- Vivas, A., Barea, J.M., Azcón, R. 2005. *Brevibacillus brevis* Isolated from Cadmium- or Zinc-Contaminated Soils Improves in Vitro Spore Germination and Growth of *Glomus mosseae* under High Cd or Zn Concentrations. *Microbial Ecology* 49:416-424.
- Weiqiang, G., Li, D., Tao, Y., Gao, P., Hu, J. 2008. Isolation and Description of a Stable Carbazole-Degrading Microbial Consortium Consisting of *Chryseobacterium* sp. NCY and *Achromobacter* sp. NCW. *Current Microbiology* 57:251-257.
- Witzig, R., Junca, H., Hecht, H.J., Pieper, D. 2006. Assessment of Toluene/Biphenyl Dioxygenase Gene Diversity in Benzene-Polluted Soils: Links between Benzene Biodegradation and Genes Similar to Those Encoding Isopropylbenzene Dioxygenases. *Applied and Environmental Microbiology* 72:3504-3514.
- Xia, X., Xie, Z. 2001. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity* 92:371-373.
- Zhang, H., Yang, M., Shi, W., Zheng, Y., Sha, T., Zhao, Z. 2007. Bacterial Diversity in Mine Tailings Compared by Cultivation and Cultivation-independent Methods and their Resistance to Lead and Cadmium. *Microbial Ecology* 54:705-712.